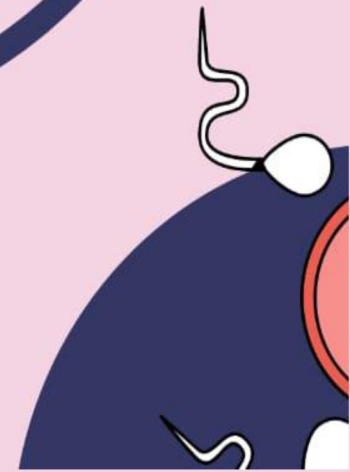


# ANALISIS BAHAN KIMIA

## TERHADAP PERKEMBANGAN EMBRIO



**Maslichah Mafruchati**



Penerbit

**Zifatama Jawara**

Jalan Taman Pondok Jati CQ 20,  
Taman Sidoarjo 61257, Jawa Timur  
Telp : 031-99786278 / 0812-1627-0501  
Email : zifatama1@gmail.com

ISBN 978-623-8222-06-3



9 786238 222063

# **Analisis Bahan Kimia terhadap Perkembangan Embrio**

Oleh:

**Dr. Maslichah Mafruchati., drh**



Penebit  
**ZIFATAMA JAWARA**

# Analisis Bahan Kimia terhadap Perkembangan Embrio

Penulis : **Maslichah Mafruchati**

© 2023

Diterbitkan Oleh:



Cetakan Pertama, April 2023

Ukuran/ Jumlah hal: 150 x 230 mm / 115 hlm

Layout : Maslichah Mafruchati

Cover: Maslichah Mafruchati

---

ISBN : 978-623-8222-06-3

Hak cipta dilindungi Undang-Undang

Sanksi Pelanggaran Pasal 22

Undang-Undang Nomor 19 Tahun 2002

Tentang Hak Cipta:

Barangsiapa dengan sengaja dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat (1) atau Pasal 49 ayat(1) dan ayat (2) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling singkat (satu) bulan dan/ atau denda paling sedikit Rp 1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/ atau denda paling banyak Rp 5.000.000.000,00 (lima milyar rupiah).

Barangsiapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau Hak Terkait sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dipidana dengan pidana paling lama 5 (lima) tahun dan/ atau denda paling banyak Rp 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

**Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi, atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini tanpa izin tertulis dari penerbit.**

## KATA PENGANTAR

Dengan Nama Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Penyayang segala puja dan puji syukur penulis panjatkan kehadirat-Nya Yang Maha Tinggi, serta shalawat dan salam saya haturkan kepada Rasulullah SAW, keluarga dan sahabatnya. Atas segala rahmat dan hidayah Allah SWT sehingga penulis dapat menyelesaikan buku yang berjudul **”Analisis Bahan Kimia terhadap Perkembangan Embrio”**. Penulis mengucapkan terima kasih berbagai pihak yang telah membantu. Akhirnya penulis menyadari bahwa buku ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh sebab itu kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Demikian, semoga buku ini dapat menjadi informasi yang berharga bagi mahasiswa, dosen,peneliti dan masyarakat.

Surabaya, 11 November 2022

Penulis

## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR .....	3
BAB I.....	6
1.1 Pendahuluan.....	6
1.2 Pertumbuhan dan Perkembangan Kondrosit Embrio Ayam Dalam Kultur Dengan Asam Borat.....	9
BAB II.....	15
2.1 Pendahuluan.....	15
2.2 Teratogenik 2,3,7,8- <i>Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin</i> (TCDD) Terhadap Diameter Mata dan Berat Badan Embrio Ayam..	18
BAB III.....	24
3.1 Pendahuluan.....	24
3.2 Efek Dimethyl Sulfoxide (DMSO) terhadap perkembangan embrio ayam umur 10 hari berdasarkan panjang badan dan diameter kepala .....	26
BAB IV.....	28
4.1 Pendahuluan.....	28
4.2 Perkembangan Embrio dan Penampilan Pasca Penetasan Ayam Kampung Setelah Pemberian L-Arginine .....	31
BAB V.....	35
5.1 Pendahuluan.....	35
5.2 Pengembangan aril hidrokarbon basal dan terinduksi (benzo[alpyrene) aktivitas hidroksilase pada ayam embrio dalam telur .....	37
BAB VI.....	45

BAB VII.....	63
BAB VIII.....	74
BAB IX.....	87
BAB X.....	99
Daftar Pustaka .....	110

## **BAB I**

### **Pertumbuhan dan Perkembangan Kondrosit Embrio Ayam Dalam Kultur Dengan Asam Borat**

#### **1.1 Pendahuluan**

Penggunaan bahan kimia dalam makanan pada umumnya bertujuan untuk meningkatkan keawetan. Salah satu bahan kimia yang sering digunakan sebagai bahan tambahan makanan adalah asam borat. Menurut Pangestiningih (1994) asam borat terkenal sebagai pengawet makanan karena tidak memiliki bau dan rasa yang mencolok. Weir dan Fisher (1972 *dalam* Smallwood, 1998) melakukan penelitian asam borat pada tikus dengan dosis 2,6; 8,8; 26,3; 87,5; dan 262,5 mg/kg bb per hari.

Pada dosis tertinggi asam borat menunjukkan kematian pada semua hewan uji, sedangkan dosis 87,5 mg/kg bb per hari menyebabkan terjadinya penurunan berat pada badan, hati, ginjal, otak, kelenjar adrenal, ovarium, dan testis. Asam borat juga menyebabkan teratogenesis pada embrio. Hasil penelitian Wijayanto (1993) yaitu pemberian asam borat pada tikus dengan dosis 30 sampai 90 mg/200 g bb/hari menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan tulang dan bentuk kosta yang abnormal

terutama pada dosis 90 mg/200 g bb/hari, tetapi tidak menunjukkan fusi kosta.

Hasil penelitian Kusmiyati (1999) menyebutkan bahwa pemberian asam borat pada mencit bunting dengan dosis 4 sampai 20 mg/20 g bb setiap hari menyebabkan terhambatnya pertumbuhan tulang ekstremitas dan kosta, serta berkurangnya tebal lapisan kondrosit kartilago epifisial femur pada fetus. Dari beberapa penelitian asam borat secara *in-vivo* belum banyak yang diketahui tentang mekanisme toksisitas dan teratogenisitas asam borat. Menurut Rinie *et al.* (1990) diperkirakan bahwa natrium borat dan borat yang lain berikatan dengan sisi ribitil riboflavin, membentuk suatu kompleks yang larut dalam air dan merupakan metabolit yang tidak aktif. Kompleks riboflavin-borat terdapat dalam plasma darah dan mengurangi jumlah riboflavin bebas yang seharusnya masuk ke sirkulasi fetus.

Menurut Smith *et al.* (1983) riboflavin berperan pada berbagai fungsi penting, antara lain sebagai koenzim pada sistem enzim respirasi, pada pertumbuhan dan perkembangan fetus, memelihara nukleus epitel dan jaringan penyusunan mata. Dengan demikian apabila riboflavin yang masuk ke fetus berkurang, maka akan dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan fetus.



Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Pangestiningih ternyata berbeda dengan yang diperkirakan oleh Rinie *et al.* (1990) dan Goldstein *et al.* (1974). Pemberian riboflavin mulai dosis rendah sampai dosis yang berlebihan ternyata tidak mengurangi terjadinya cacat pada fetus, tetapi justru memperparah terjadinya cacat (malaformasi).

Ku dan Chapin (1992) melaporkan bahwa pada penelitian secara *in-vivo* pada tikus terdapat perubahan struktur dan berat testis setelah mengkonsumsi 17,5 mg/ kg bb per hari selama 9 minggu. Penelitian dilanjutkan, hasilnya menunjukkan bahwa asam borat tidak berpengaruh terhadap perubahan hormon yang menyebabkan terjadinya atrofi pada testis. Untuk mengetahui lebih lanjut mekanisme toksisitas asam borat Ku dan Chapin (1992) melakukan penelitian secara *in-vitro* dengan mengkultur sel Leydig dan sel calon spermatogonium yang diberi perlakuan asam borat. Hasilnya menunjukkan terjadinya penurunan metabolisme energi yang ditandai dengan penurunan laktat, piruvat pada media dan ATP seluler.

Di samping itu juga terjadi penurunan sintesis DNA, sehingga menghambat terjadinya proliferasi sel pada sel Leydig maupun sel calon spermatogonium. Uji secara *in-vitro* tersebut dapat memperlihatkan manifestasi secara *in-*

*vivo* yaitu penurunan rasio sel calon spermatogonium dan sel sertoli yang menyebabkan atrofi pada testis.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Ku dan Chapin (1992) muncul pemikiran kemungkinan lain dari mekanisme teratogenisitas asam borat terhadap fetus yaitu terhadap mekanisme biologi sel target (pada sel calon pembentuk tulang atau sel kondrosit). Metode yang dapat digunakan adalah dengan memperlakukan asam borat pada kultur kondrosit dan diamati perubahan yang tampak pada kultur kondrosit.

## **1.2 Pertumbuhan dan Perkembangan Kondrosit Embrio Ayam Dalam Kultur Dengan Asam Borat**

Dari pengamatan secara mikroskopis mulai hari pertama sampai hari kesembilan dari perlakuan menunjukkan adanya perbedaan antara kontrol dan perlakuan, antara dosis rendah dengan dosis tinggi. Pada kontrol dan perlakuan dengan dosis rendah, populasi sel masih dapat membentuk koloni, sehingga antara sel yang satu dengan sel yang lain dapat saling berkomunikasi. Pada perlakuan dengan dosis tinggi, populasi sel tidak dapat membentuk koloni, sehingga antara sel yang satu dengan sel yang tidak dapat saling berkomunikasi.

Hal ini berarti asam borat dapat menghambat pembentukan koloni, sehingga antara sel yang satu dengan

sel yang lain tidak dapat saling komunikasi. Pada populasi sel yang tidak dapat membentuk koloni, tidak akan mengalami diferensiasi. Pada tulang menyebabkan sel-sel pembentuk tulang tidak mengalami kondensasi, sehingga kemungkinan menyebabkan tulang menjadi abnormal dalam pertumbuhannya.

Menurut Muller (1997), membran sel dari sel hewan dilengkapi dengan protein dan glikoprotein. Adesi sel antara sel yang satu dengan sel yang lain untuk membentuk koloni

dapat terjadi dengan membentuk ikatan nonkovalen dengan molekul permukaan dari sel tetangganya. Molekul spesifik dari permukaan sel tersebut disebut sebagai “Molekul Adesi Sel” (*Cell Adhesion Molecule/CAM*). Menurut Karp (1999), molekul adesi sel pada kondrosit adalah dari golongan “*cadherin*”. Adesi sel dapat terjadi dengan cara antara *cadherin* dari satu sel dengan sel tetangganya pada sel yang sama akan saling berikatan secara lateral untuk membentuk dimer. Terputusnya ikatan ini dapat menyebabkan tidak terbentuknya adesi. Kemungkinan asam borat yang diperlakukan pada kultur kondrosit dengan dosis tinggi dapat menyebabkan terputusnya ikatan tersebut, sehingga antara sel yang satu dengan sel yang lain

tidak dapat membentuk adesi sel. Jika adesi sel tidak terbentuk, maka koloni juga tidak dapat terbentuk.

Menurut Walum *et al.* (1990), suatu bahan kimia dapat bersifat toksik terhadap proliferasi sel dengan menghambat sintesis makromolekul (DNA, RNA, protein) atau menyebabkan pertumbuhan yang tidak seimbang dan memengaruhi rata-rata pertumbuhan populasi.

Ku dan Chapin (1992) melaporkan bahwa pada penelitian asam borat terhadap kultur sel sertoli dan sel calon spermatogonium menunjukkan penurunan sintesis DNA dan penurunan produksi energi pada pemberian asam borat dengan dosis tinggi, yang selanjutnya menginduksi sitotoksitas dan menyebabkan penghambatan pada proliferasi sel dan diduga menyebabkan terjadinya atrofi pada testis.

Terhambatnya atau menurunnya sintesis DNA dan produksi energi pada kultur sel sertoli dan sel calon spermatogonium yang diberi perlakuan asam borat, kemungkinan juga dapat terjadi pada kultur kondrosit yang diberi perlakuan asam borat sehingga menyebabkan terhambatnya proliferasi kondrosit. Penghambatan pada metabolisme makromolekul ini mungkin secara langsung dengan menghambat kerja enzim yang berperan pada

sintesis makromolekul, atau secara tidak langsung dengan menghambat atau menurunkan produksi energi.

Menurut Karp (1999), untuk dapat terjadinya sintesis DNA dibutuhkan enzim dan empat macam deoksiribonukleosida trifosfat/ asam nukleat berenergi tinggi (dTTP, dATP, dCTP, dGTP). Penghambatan pada kerja enzim dan produksi energi maka akan dapat menghambat sintesis DNA. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa asam borat dapat menghambat adesi sel, sehingga menyebabkan koloni pada kultur kondrosit tidak terbentuk dan juga menghambat pelekatan sel pada dasar cawan, sehingga menyebabkan sel terlepas (sel tersuspensi). Hal ini kemungkinan dapat menyebabkan tidak akan terjadinya kondensasi, sehingga tulang menjadi abnormal.

### **Daftar Pustaka**

Freshney RI, 1988. *Animal Cell Culture, A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.

Goldstein A, Ardnaw L, Kalman SM, 1974. *Principles of Drug Action, second edition*. A. Wiley Biomedical Publication, New York, 158–175.

Karp G, 1999. *Cell And Molekular Biology, Concepts and Experiments*, 2nd Ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Ku WW dan Chapin RE, 1992. *Mechanism of the Testicular Toxicity of Boric Acid in Rats: In vivo and In vitro Studies*. University of California.

Kusmiyati, 1999. *Pengaruh Asam Borat Terhadap Perkembangan Embrio dan Ekstremitas Mencit (Mus musculus)*. Tesis,

Fakultas Biologi UGM Yogyakarta.

Muller WA, 1997 *Developmental Biology*. Springer-Verlag New York, Inc.

Pangestiningih TW, 1994. *Pengaruh Dosis Sodium Borat pada Tikus (Rattus norvegicus albinus) Induk terhadap Fetus*. Tesis, Fakultas Kedokteran Hewan, UGM Yogyakarta.

Rinnie JS, Whitehead CC, Montanari A, 1990. *Effect of Dietary Borate and Aluminate on Riboflavin Metabolism in the Breeding Hen*. V. Res. In Vet. Science, 49.

Smith EL, Hill RL, Lehman IR, Lefkowitz RJ, Handler P, White A, 1983. *Principles of Biochemistry, Mammalian Biochemistry*, 7th ed. McGraw-Hill Book Co, New York: 644.

Smallwood C, 1998. *Boron, Environmental Health Criteria* 204.

World Health Organization, Geneva, 13, 21, 27, 49–50, 54–62, 77–94.

Walum E, Stenberg K, Jensen D, 1990. *Understanding Cell Toxicology, Principles and Practice*. Ellis Horwood Limited, New York, 13–20, 64–70.

Wijayanto H, 1993. *Gambaran Anatomi Fetus Tikus Akibat Pemberian Asam Borat Pada Induk*. Laporan Penelitian FKH, UGM.

**BAB II**  
**Teratogenik 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin**  
**(TCDD) Terhadap Diameter Mata dan Berat Badan**  
**Embrio Ayam**

**2.1 Pendahuluan**

Seiring berkembangnya dunia perindustrian baik di wilayah perkotaan dan sub-perkotaan menyebabkan pertambahan volume aktivitas manusia akan meningkatkan kebutuhan energi (Budiyono, 2001) yang menyebabkan salah satu dampak berupa pencemaran udara (Damara *et al.*, 2017).

Pencemaran udara dapat didefinisikan sebagai masuknya zat pencemar kedalam udara, baik secara alami ataupun akibat dari hasil kegiatan manusia (Soedomo, 2001). Sumber pencemaran udara selain karena pertambahan volume aktivitas transportasi dan industri, juga dapat disebabkan karena pencemaran alami berupa; letusan gunung api, debu meteroit, dan kebakaran hutan (Abidin dan Hasibuan, 2019).

Terdapat zat berbahaya yang terkandung di udara tercemar salah satunya dioksin. Dioksin yang memiliki nama lain 2,3,7,8-tetrachlorinedibenzo-p-dioxine (TCDD) ini merupakan salah satu jenis senyawa organoklorin yang mampu menimbulkan efek racun dan bersifat teratogenik



dan karsinogenik. Dioksin (TCDD) ini bermula dari senyawa kimia yang persisten terhadap degradasi baik fisik maupun metabolik.

Keberadaan TCDD ini dipicu oleh adanya industri maupun insenerator yang melakukan pembakaran bahan yang mengandung klor, seperti limbah organik, produk kertas, dan plastik. Selain itu, klorin dapat juga ditemukan pada sisa pembakaran sampah. Sisa pembakaran sampah tersebut berbentuk debu dan butiran-butiran halus yang mana dapat menyebar secara efisien di udara.

Debu atau butiran yang terbawa di udara tersebut mengandung dioksin yang akan kembali jatuh ke tanah kembali dan menyebabkan tanah, air, dan rumput atau dedaunan di lingkungan akan terkontaminasi oleh dioksin (Wakiefield dan Warlina *et al.*, 2008). Hal ini memungkinkan hewan pemakan rumput maupun pemakan hewan kecil (semut, cacing, dll) seperti unggas dapat terpapar oleh dioksin.

Dioksin amat berbahaya untuk kelangsungan hidup dari makhluk hidup, lantaran senyawa TCDD ini merupakan kongener atau senyawa yang terbentuk dari proses pembakaran dan mempunyai struktur kimia yang menyerupai kelompok senyawa dioksin yang paling toksik. Menurut evaluasi risiko pada manusia oleh International

Agency for Research on Cancer (IARC), TCDD masuk ke dalam grup 1 yang mengandung maksud bersifat karsinogen terhadap manusia (WHO, 1997).

Reaksi toksik yang ditimbulkan oleh TCDD kepada manusia, tanaman, dan hewan, antara lain; kerusakan kulit, imunotoksik, hepatotoksik, karsinogenik, teratogenik, efek pada reproduksi, proses pertumbuhan, neurobehavioral, serta efek endokrin yang bersifat spesifik (Van den Berg *et al.*, 2006).

Sedangkan, pada hewan mampu menyebabkan terjadinya keabnormalan pertumbuhan termaktub; edema, nekrosis hati, dan deformasi pada mata serta ekstremitas dari tubuh (Blankenship *et al.*, 2003). Lain daripada itu, Sumingkrat (2002) juga melaporkan bahwa efek dioksin bagi hewan dapat bersifat karsinogen dan teratogen, yakni senyawa yang menimbulkan cacat lahir (birth defect) pada hewan. Bentuknya dapat berwujud; tumor, penipisan cangkang telur, dan cacat lahir di unggas.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Gostomska-Pampuch *et al.* (2017), TCDD dengan dosis tertentu (volume pemberian 5  $\mu$ L dengan dosis 5 ng/butir) yang di-induksikan pada Telur Ayam Berembrio (TAB) menunjukkan dampak yang mana dapat menimbulkan terjadinya abnormalitas dalam pertumbuhan, termasuk

edema, nekrosis hati, deformasi pada mata dan ekstremitas tubuh pada embrio ayam.

## **2.2 Teratogenik 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin (TCDD) Terhadap Diameter Mata dan Berat Badan Embrio Ayam**

Perkembangan embrio ayam normal menurut Murtidjo (1994) dan Aliah (2018), pada hari pertama, setelah 16 jam inkubasi, tanda pertama yang terlihat adalah embrio ayam dan setelah 24 jam inkubasi terlihat telah terbentuk mata. Pada hari kedua, setelah 25 jam inkubasi terlihat mulai terbentuknya jantung. Pada hari ketiga, setelah 33 jam inkubasi, mulai terlihat pembentukan amnion dan pada 39 jam inkubasi mulai terbentuk alantois, dan seterusnya sampai hari ke-21.

Pada penelitian ini, pengamatan pada saat panen embrio terlihat embrio ayam telah terbentuk kepala, mata, bakal sayap, bakal kaki, dan badan yang memiliki warna merah muda hingga kemerahan.

Blastula merupakan stadium lanjutan dari pembelahan berupa massa blastomer membentuk dasar calon tubuh ayam yang kemudian akan terbentuk blastoselom. Selanjutnya terjadi tahapan gastrula dimana pada tahap akhir proses gastrulasi akan ditandai dengan terbentuknya gastroselom dan sumbu embrio sehingga

embrio mulai tumbuh memanjang. Tahapan selanjutnya merupakan tubulasi yang dilanjutkan dengan neurolasi. Pada tahapan neurolasi ini terjadi pembentukan bumbung neural (Kusumawati *et al.*, 2016).

Setelah melalui 19-22 jam inkubasi, terjadi proses pembentukan kepala yang terlihat jelas di Hensen's node (pada 14 jam inkubasi menunjukkan primitive streak yang melebar ke arah kranial dari area sentralis). Kemudian ujung kaudal primitive streak disebut dengan nodus posterior. Pada inkubasi ke 24 jam terjadi pelipatan kepala yang menandakan dimulainya proses organogenesis (Zagris *et al.*, 2007).

Pada inkubasi ke 48-52 jam embrio mulai memperlihatkan perbedaan spesifik dibanding umur sebelumnya karena bagian anterior memutar ke arah kanan. Lubang auditoris mulai terbuka, jantung terbentuk seperti huruf S, lekukan kepala amnion menutupi seluruh area otak, serta plat oral, batang mata, dan neural tube yang sudah mulai terbentuk (Kusumawati *et al.*, 2016).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan penulis, menunjukkan bahwasannya Dioksin atau TCDD ini sangat berbahaya terhadap bagian tubuh dan kepala termasuk bagian mata dari embrio ayam. Hal ini disebutkan juga oleh Yoon *et al.* (2006) dan Calkosinski (2008),

Dioksin mempengaruhi tubuh dengan berbagai cara, menyebabkan gangguan reproduksi dan perkembangan, imunotoksitas, involusi timus, kerusakan hati, dan kanker. Selain itu, Blankership *et al.* (2003) menyebutkan bahwa paparan dioksin (TCDD) menghasilkan kelainan perkembangan termasuk edema, nekrosis hati, deformasi mata dan ekstremitas tubuh.

Sedangkan IvnitskiSteele *et al.* (2005) menyebutkan bahwa embrio yang sedang berkembang sangat sensitif terhadap TCDD dengan dosis rendah (<100 ng/kg), dengan efek teratogenik pada proses angiogenesis dan remodeling vaskular. TCDD juga mengurangi aliran darah dan fungsi peredaran darah pada berbagai model hewan ikan dan menyebabkan edema dan perdarahan pada semua spesies ikan, unggas, dan mamalia.

Menurut penjelasan Blankership *et al.* (2003), Deformasi mata atau perubahan bentuk sel atau ukuran sel pada mata ini dapat terjadi karena dioksin (TCDD) yang berikatan dengan AhR (Aryl Hidrocarbon Receptor) ini dapat meningkatkan : 1) Aktivitas fungsi oksidase campuran (MFOs atau Mixed Function Oxidases) dalam sel yang dapat menyebabkan peningkatan stres oksidatif yang dapat merusak lipid, DNA, serta protein; dan 2) Aktivitas

protein Tirosin-Kinase yang dapat menyebabkan perubahan pada pertumbuhan dan diferensiasi sel.

Dioksin merupakan kelompok senyawa yang toksik dan diketahui secara nyata merupakan faktor pemicu kanker (Anshori, 2011). Menurut Struciński *et al.* (2011), Telah ditemukan bahwa TCDD menyebabkan berbagai efek biokimia dan toksikologis, termasuk teratogenisitas dan penekanan kekebalan tubuh. Dioksin atau TCDD juga memengaruhi ekspresi gen yang mengendalikan sintesis dan metabolisme enzim, hormon, dan faktor pertumbuhan. Berdasarkan literatur, TCDD ini mengganggu perkembangan embrio pada sistem reproduksi, saraf, kekebalan tubuh, dan sistem endokrin serta mempengaruhi kondisi embrio pada TAB Ayam itu sendiri.

Dioksin merupakan senyawa bertoksitasitas paling tinggi yang diakibatkan oleh kegiatan manusia (Birnbaum, 1995). Lingkup toksisitasnya luas, mencakup reprotoksik (pada dosis TCDD yang lebih rendah dapat menyebabkan atrofi organ limfoid serta gonad), neurotoksik (dapat menghambat neurogenesis pada tubuh), hepatotoksik (adanya perubahan struktural di jantung dengan menyebabkan gangguan proliferasi kardiomyosit), dan imunotoksik (daya tahan tubuh menurun).

Dioksin juga memiliki sifat karsinogenik (menyebabkan kanker) serta teratogenik (menyebabkan cacat lahir) (Birnbaum, 1995 dan Gotomscha-Pampuch *et al.*, 2017). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) ini merupakan jenis dioksin bertoksistas tinggi. Oleh sebab itu, TCDD biasa dipakai untuk senyawa penggambaran toksistas dioksin dan sering diteliti perbandingan efeknya dengan jenis dioksin lain (Kimbrough dan Safe, 1998).

Gangguan perkembangan embrio karena dioksin pada hewan percobaan biasanya terlihat pada dosis yang sangat rendah, jauh lebih rendah dari tingkat dosis yang dibutuhkan untuk menimbulkan dampak dari toksistas jenis pencemar lainnya (Fiedler *et al.*, 2000). Menurut Bruggeman *et al.* (2003), dioksin mampu mengakibatkan penurunan berat badan pada embrio ayam yang terpapar.

Selain itu, Struciński *et al.* (2011) menyebutkan, Telah ditemukan bahwa TCDD menyebabkan berbagai efek biokimia dan toksikologis, termasuk teratogenisitas dan penekanan kekebalan tubuh. Dioksin atau TCDD ini juga dapat mempengaruhi ekspresi gen yang mengendalikan sintesis dan metabolisme enzim, hormon, serta faktor pertumbuhan. Dioksin atau TCDD merupakan padatan kristal tidak berwarna pada suhu ruang dan memiliki kestabilan termal yang tinggi. Zat ini dapat larut

dalam pelarut polar atau non-polar, oleh karena itu tingkat kelarutan pada pelarut non-polar lebih besar dibandingkan dengan pelarut polar. Selain itu, Dioksin atau TCDD ini memiliki sifat akan mudah terakumulasi di dalam jaringan lemak atau mempunyai sifat lipofilik (Connel dan Miller, 1995 dan Ratnaningsih *et al.*, 2020).



## **BAB III**

### **Efek Dimethyl Sulfoxide (DMSO) terhadap perkembangan embrio ayam umur 10 hari**

#### **berdasarkan panjang badan dan diameter kepala**

#### **3.1 Pendahuluan**

Dimetil sulfoksida (DMSO) merupakan senyawa kimia yang umum digunakan untuk melarutkan senyawa non polar. Namun, penggunaan senyawa sederhana telah menimbulkan kontroversi di kalangan peneliti atau publikasi populer. Beberapa agen terapeutik dan toksik non-polar dapat dilarutkan dalam DMSO karena senyawa tersebut memiliki afinitas tinggi terhadap air. Selain mudah larut bila terkena udara, sifat fisiologis dan farmasi lainnya dari senyawa tersebut tidak dipahami secara komprehensif.

Di sisi lain, senyawa tersebut memiliki penetrasi yang tinggi serta meningkatkan penetrasi senyawa lain pada membran biologis, radikal bebas, sifat koagulatif, aktivitas antikolinesterase dan dapat menginduksi pelepasan histamin oleh sel mast. Selain itu, toksisitas sistemik DMSO diketahui rendah meskipun kombinasi DMSO dengan senyawa toksik lainnya dapat meningkatkan toksisitasnya. Penggunaan DMSO saat ini masih terbatas pada hewan tertentu (Brayton, 1986), dengan penggunaan senyawa yang umum adalah untuk krioprotektan untuk

embrio hewan (Suzuki et al., 1995). DMSO juga memainkan beberapa peran pada fungsi dan perkembangan sel dengan mempengaruhi siklus sel dan apoptosis (Santos et al., 2003).

Pertumbuhan embrio sangat berkorelasi dengan fungsi dan perkembangan sel; Oleh karena itu, penelitian yang lebih mendalam harus dilakukan untuk memahami toksisitas DMSO terhadap perkembangan embrio. Pengamatan toksisitas senyawa telah banyak dilakukan pada embrio ayam, dengan telur ayam sebagai model pembelajaran untuk mengamati perkembangan embrio. Hewan yang dijadikan model penelitian memiliki peran penting untuk penelitian fundamental dan medis. Kemajuan dalam inovasi medis, seperti obat regeneratif dan kanker bergantung pada model *in vivo* untuk memvalidasi temuan, dan membuka pendekatan baru untuk pengobatan terapeutik.

Namun, penelitian pada hewan pengerat atau hewan besar konvensional sering menghadapi kesulitan etis, praktis dan teknis. Penggunaan embrio ayam yang tersedia pada telurnya kemudian menawarkan model yang lebih terjangkau dan ekonomis untuk penelitian *in vivo* untuk pengembangan genetik dan analisis ekspresi. Embrio telur ayam juga menunjukkan potensinya untuk digunakan

sebagai transplantasi sel untuk penelitian sel punca dan kanker (Rashidi & Sottile, 2009).

### **3.2 Efek Dimethyl Sulfoxide (DMSO) terhadap perkembangan embrio ayam umur 10 hari berdasarkan panjang badan dan diameter kepala**

Dimetil sulfoksida (DMSO) merupakan senyawa organosulfur dengan rumus kimia  $(CH_3)_2SO$  dan memiliki berat molekul 78,13 g/mol, yang menyebabkan senyawa tersebut lebih cepat menembus ke dalam sel. Dosis DMSO yang tepat akan membantu melarutkan senyawa baik polar maupun non polar menjadi berbagai senyawa organik dan tidak akan mempengaruhi pertumbuhan embrio (Gazali & Tambin, 2001).

Kajian toksisitas krioprotektan menunjukkan bahwa DMSO dan metanol tidak berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan embrio (Kopeika et al., 2003). Perkembangan embrio ayam terjadi pada suhu tinggi (39°C). Dimethyl sulfoxide (DMSO) diketahui mampu melindungi enzim beku, sedangkan di tangan dapat menjaga kestabilan protein selama suhu tinggi (Anchordoguy et al., 1992).

Diameter kepala embrio memiliki korelasi yang erat dengan perkembangan otak, yang merupakan sistem saraf pusat yang dilindungi oleh tempurung kepala. Selain itu, penggunaan DMSO umumnya pada konsentrasi yang

sangat rendah untuk mengembangkan antioksidan baru sebagai pelindung saraf. Efek neuroprotektif disebabkan oleh sifat DMSO yang mengikat radikal bebas yang berlebihan dan mencegah gangguan sel dari penetrasi  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Ca}^{2+}$  ke sel otak serta menghambat aktivitas NMDA-AMPA (Suarez et al., 2011).

Santos et al., (2003) menjelaskan bahwa DMSO berperan sebagai agen pembeda sel dan banyak digunakan sebagai obat untuk edema serebral. Ini menunjukkan bahwa DMSO pada konsentrasi rendah akan bertindak sebagai agen pelindung terhadap suhu dan sebagai agen pelindung saraf, meskipun mekanismenya masih belum jelas.

# **BAB IV**

## **Perkembangan Embrio dan Penampilan Pasca Penetasan Ayam Kampung Setelah Pemberian L- Arginine**

### **4.1 Pendahuluan**

Ayam kampung merupakan salah satu jenis ayam kampung di Indonesia. Ini banyak ditemukan di daerah pedesaan yang dipelihara sistem konvensional, semi intensif, dan intensif penuh. Dibandingkan dengan ras komersial, ayam kampung masuk habitat asli mereka menunjukkan kemampuan beradaptasi yang lebih baik dan resistensi penyakit (Sulistyoningsih et al., 2013; Azahan et al., 2014; Tamzil et al., 2015), tetapi kinerjanya lebih rendah penghasil protein hewani (daging dan telur).

Massa otot merupakan indikator penting dalam menentukan berat badan. Peningkatan massa otot memiliki dampak yang sangat besar korelasi erat dengan berat badan akhir yang lebih tinggi (Fernandes et al., 2009; Fouad et al., 2012). Di kondisi lingkungan yang optimal seperti nutrisi, manajemen, dan iklim, jumlah sel otot akan menjadi penentu massa otot.

Grodzicki et al. (2013) melaporkan bahwa jumlah otot yang terbentuk lebih banyak fase embrio, dan kemudian

lebih banyak sel otot hipertrofi. Kondisi tersebut akan berdampak pada peningkatan laju pertumbuhan, sehingga berat badan dapat lebih tinggi dapat dicapai dalam waktu singkat.

Perubahan jumlah sel otot pada unggas hanya terjadi selama masa inkubasi (embrionik pengembangan) (Guo-song et al., 2012; Grodzik et al., 2013). Jumlah sel otot pada periode ini tidak akan berubah dan hanya mengalami pembesaran (hipertrofi) setelah melewati fase embrionik. Itu tingkat hormon pertumbuhan dalam fase embrio menentukan aktivitas proliferasi sel (Fernandes et al., 2009; De Carvalho et al., 2012). Manipulasi dari kadar hormon pertumbuhan dapat dilakukan dengan meningkatkan ketersediaan nutrisi untuk embrio, terutama protein (Coskun et al., 2014).

Namun, embrio ayam perkembangan terjadi di luar tubuh dan gizi kebutuhan embrio telah ditentukan dalam proses pembentukan telur, jadi kita perlu metode yang tepat untuk menambahkan nutrisi eksogen ke dalam telur. In-ovo feeding adalah teknik penambahan eksogen nutrisi ke dalam telur pada masa inkubasi. Pemberian makan dalam telur dilaporkan dapat meningkatkan performa ayam setelah menetas (Daneshyar et al., 2010; Kornasio et al.,

2011; Chen et al., 2013; Shafey et al., 2014; Al-Shamery & Al-Suhaib, 2015).

Kondisi ini diyakini terjadi karena perkembangan optimal embrio selama embriogenesis. L-Arginine adalah asam amino yang diklasifikasikan sebagai asam amino semi esensial (Al-Daraji et al., 2012). Foye (2005) melaporkan bahwa pemberian L-Arginine pada fase embrio dapat meningkatkan laju pertumbuhan kalkun setelah menetas, sementara Murakami et al. (2012) menyarankan bahwa L-Arginine adalah stimulator penting pelepasan hormon pertumbuhan. Studi lain melaporkan bahwa L-Arginine dapat meningkatkan massa otot (Fernandes et al., 2009).

Selain itu, L-Arginine juga merupakan asam amino basa yang memiliki peran utama sebagai stimulator amino lainnya asam seperti prolin, ornitin, glutamin, dan keratin (Al-Daraji et al., 2012); serta senyawa yang berperan penting dalam aktivitas fisiologis ayam seperti oksida nitrat, poliamina, dan dimethylargininesa (Fouad et al., 2012).

Pemberian L-Arginine dengan dosis 0,7% in kalkun (Foye et al., 2006) dan 1,0% pada puyuh (Al-Daraji et al., 2012) dengan pemberian pakan in-ovo dapat meningkatkan berat badan dan kinerja pasca-penetasan.

Pemberian L-Arginine secara in-ovo menghasilkan hasil yang lebih tinggi berat embrio. Peningkatan berat embrio dapat disebabkan oleh peningkatan massa otot yang terkena dengan pemberian makanan in-ovo. L-arginin dulu dilaporkan sebagai salah satu asam amino yang dapat merangsang perkembangan otot (Zhao et al., 2011; Fu et al., 2016).

#### **4.2 Perkembangan Embrio dan Penampilan Pasca Penetasan Ayam Kampung Setelah Pemberian L-Arginine**

L-Arginine telah dilaporkan meningkat hormon pertumbuhan (Sahin et al., 2006; McKnight et al., 2010; Murakami et al., 2012) dan insulin (Foye, 2005; Fernandes et al., 2009; Silva et al., 2012). L-arginin dapat meningkatkan hormon pertumbuhan melalui pensinyalan GH/IGF. Peningkatan hormon pertumbuhan menyebabkan peningkatan aktivitas organogenesis seperti proliferasi, diferensiasi, dan pematangan sel (Deprem & Gulmez, 2007; Daneshyar et al., 2010).

Rata-rata asupan pakan semua perlakuan tidak berbeda secara signifikan. Ini dapat terjadi karena jenisnya dan bentuk pakan yang digunakan pada semua perlakuan sama, oleh karena itu palatabilitas pakan tidak berbeda. Ini



tingkat palatabilitas membuktikan bahwa asupan pakan tidak berbeda.

Nilai konversi pakan menunjukkan penurunan dengan konsentrasi L-arginin yang lebih tinggi. Injeksi dari L-arginin sekitar 1,0% dan 1,5% menghasilkan pakan yang lebih rendah rasio konversi dibandingkan perlakuan lainnya. Grup dari ayam dengan rasio konversi pakan yang lebih rendah menunjukkan peningkatan kinerja saluran pencernaan sebagaimana mestinya dipengaruhi oleh administrasi L-Arginine. Karena itu, penyerapan nutrisi lebih efektif dan berdampak pada derivasi konversi pakan.

Hasil serupa juga dilaporkan oleh Foye et al. (2009) tentang kalkun, Al-Daraji et al. (2012) pada puyuh, dan De Carvalho et al. (2012) pada ayam petelur. Seperti dilansir Fouad et al. (2012), L-Arginin terstimulasi proliferasi sel usus halus. Meningkatkan kadar L-arginin pada fase embrionik akan menyebabkan peningkatan jumlah sel usus kecil (Lin et al., 2011). Tako dkk. (2004) dan Cheled-Shoval dkk. (2011) menjelaskan bahwa terjadi peningkatan ukuran vili dan crypts adalah hasil dari peningkatan jumlah sel karena aktivitas proliferasi usus halus tinggi pada awal pertumbuhan.

Meningkatnya ukuran vili dan kript akan menyebabkan peningkatan di area permukaan usus kecil

(Foye, 2005). Peningkatan ini menyebabkan peningkatan penyerapan nutrisi. Sementara Smirnov et al. (2006) dan Ospina-Rojas dkk. (2013) menjelaskan bahwa peningkatan luas permukaan kecil usus adalah hasil dari peningkatan gen musin ekspresi oleh sel goblet. Meskipun injeksi L-Arginine menghasilkan bobot badan yang lebih tinggi, pada minggu awal masa pemeliharaan, konsentrasi yang berbeda dari L-Arginine itu disuntikkan tidak mempengaruhi berat badan.

Namun, paling lambat minggu masa pemeliharaan, ayam disuntik dengan dosis yang lebih tinggi dari L-Arginine memiliki berat badan yang lebih tinggi. Kondisi ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi dari L-Arginine yang disuntikkan menghasilkan jumlah yang lebih tinggi sel otot.

Perubahan jumlah sel otot sebenarnya tidak langsung dipengaruhi oleh L-Arginine. L-arginin adalah stimulator IGF yang akan bekerja sebagai stimulator aktivitas proliferasi sel otot pada embrionik fase. Oleh karena itu, L-Arginine merangsang produksi IGF (IGF-1 dan IGF-2) melalui mekanisme sumbu GH/IGFs (Fernandes et al., 2009; Hazim et al., 2012). Peningkatan kadar IGF disebabkan oleh peningkatan sensitivitas

reseptor hormon di mekanisme aksis GH/IGFs oleh L-Arginine (Foye et al., 2009; De Carvalho dkk., 2012).

Sedangkan Fouad dkk. (2012) melaporkan bahwa Arginine adalah bahan baku penting dalam struktur kimia IGF. Meningkatkan kadar IGF pada fase embrionik akan menghambat aktivitas myostatin dan mengaktifkan jalur MAP kinase (Kollias & McDermott, 2008). Aktivitas jalur MAP kinase menyebabkan proses proliferasi sel dalam waktu yang lama.

## **BAB V**

### **Pengembangan aril hidrokarbon basal dan terinduksi (benzo[alpyrene) aktivitas hidroksilase pada ayam embrio dalam telur**

#### **5.1 Pendahuluan**

Embrio ayam merupakan indikator sensitif teratogenik dan mutagenik kapasitas xenobiotik. Sejak perkembangannya sebagai pengujian sister chromatid exchange (SCE) in vivo pertama (3), telah digunakan untuk menyaring lebih dari 50 senyawa aktivitas mutagenik, termasuk aksi langsung dan tidak langsung senyawa .

Induksi SCEs pada 3 hari inkubasi (DI) oleh senyawa yang diketahui membutuhkan aktivasi menjadi mutagenic metabolit menunjukkan adanya xenobiotic-metabolizing sistem sangat awal dalam perkembangan embrio ayam. Selain itu, terjadi peningkatan frekuensi SCEs pada 6 DI dari dosis yang sama dari mutagen/karsinogen dibandingkan dengan frekuensi SCE pada 3 DI, meskipun peningkatan berat embrio 17 kali lipat, padahal sama dosis mutagen kerja langsung pada 6 DI seperti pada 3 DI menyebabkan penurunan di SCEs pada embrio yang lebih tua. Respons diferensial ini antara 3 DI dan 6 DI berpotensi dapat dijelaskan baik oleh peningkatan

kadar enzim basal atau peningkatan inducibility enzim metabolisme xenobiotik.

Drummond et al (7) melaporkan bahwa embrio ayam memiliki 45- 60% dari aktivitas metabolisme obat dewasa beberapa hari sebelumnya penetasan, sedangkan ayam umur 1 hari memiliki aktivitas dua kali lipat orang dewasa. Belakangan dilaporkan bahwa ayam yang baru menetas memiliki 3-4 kali aktivitas enzim dewasa dan ini tetap tinggi selama beberapa hari sebelum kembali ke tingkat dewasa (8). 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo- p-dioxin (TCDD) pertama kali terbukti ampuh penginduksi sintetase asam 8-aminolevulinat dan aril hidrokarbon hidroksilase (AHHase; ditunjuk di tempat lain sebagai AHH) aktivitas dalam embrio ayam 17-DI (9). Selain itu, ayam embrio diinduksi sesaat sebelum menetas oleh 3,4,3',4'-tetraklorobifenil (CICB) dan 3,4,5,3',4',5'-hexachlorobiphenyl (10) sebagai serta oleh 3-methylcholanthrene (3MC), fenobarbital, Bnaphthoflavone (/3NF), dan allylisopropylacetamide.

Penelitian lain menunjukkan adanya fungsi campuran yang aktif oksidase (MFO) sistem enzim di awal pengembangan, inducibility dari enzim ini oleh xenobiotics terlambat dalam pembangunan, dan perubahan signifikan dalam enzim ini di beberapa poin dalam pembangunan.

Namun, banyak aspek penting dari metabolisme tetap ada untuk dijelaskan. Meskipun awal kehadiran sistem MFO ditunjukkan dengan induksi SCEs pada 3 dan 6 DI oleh pro-mutagen/ karsinogen, tingkat spesifik metabolisme basal pada ini kali tidak ditentukan. Perbedaan respon dari Embrio 3- dan 6-DI dengan dosis direct-acting dan indirectacting yang sama mutagen menyiratkan perubahan perkembangan enzim tingkat, tetapi data genetik tidak menunjukkan apakah ini merupakan perubahan di tingkat enzim basal atau inducibility dari MFO oleh xenobiotik. Akhirnya walaupun embrio ayam sudah terbukti dapat diinduksi oleh xenobiotik yang terlambat dalam perkembangannya tidak diketahui seberapa dini induksi perkembangan dapat terjadi atau apakah kinetika induksi oleh induser diketahui bervariasi sebagai salah satu fungsi pembangunan.

Sangat menarik untuk ditentukan tingkat metabolisme basal dan inducibility Enzim MFO pada tahap awal perkembangan karena metabolisme xenobiotik selama periode kritis embriogenesis ini dapat memiliki konsekuensi perkembangan yang serius.

## **5.2 Pengembangan aril hidrokarbon basal dan terinduksi (benzo[alpyrene) aktivitas hidrosilase pada ayam embrio dalam telur**

Embrio ayam menunjukkan aktivitas ARHase basal yang sebanding ke tingkat dewasa pada 3 DI, titik paling awal dalam perkembangan di mana secara teknis dimungkinkan untuk menguji aktivitas dan sehari penuh sebelum hati mulai berdiferensiasi. Aktivitas ini diinduksi oleh TCB sedini 5 DI. Induksi maksimum meningkat bersamaan dengan diferensiasi hepatosit, mencapai tingkat dewasa induksi oleh 7 DI. Umumnya mamalia memiliki tingkat aktivitas MFO yang sangat rendah selama perkembangan janin.

Namun, ARHase dan aktivitas MFO lainnya telah terdeteksi di jaringan janin manusia sedini trimester pertama. Aktivitas ARHase telah dilaporkan dapat diinduksi oleh xenobiotik sebelum lahir pada marmut, tikus, kelinci, dan tikus. Baik ARHase basal dan yang dapat diinduksi aktivitas meningkat tajam selama hari-hari atau minggu-minggu pertaman setelah lahir.

Jondorf et di melaporkan peningkatan 3 kali lipat dalam MFO basal aktivitas di hati ayam setelah menetas dan kemudian dilaporkan bahwa aktivitas kontrol tetap sekitar dua kali normal selama beberapa hari sebelum kembali ke level dewasa sekitar 7 hari usia.

Haug et at melaporkan bahwa aktivasi mutagenik dari 2-acetylaminofluorene tertinggi dalam preparat

microsomal dari ayam yang baru menetas; itu kemudian perlahan-lahan menurun tetapi tetap tinggi sampai umur 10 hari. Kuning telur yang tersisa adalah diinternalisasi oleh embrio sesaat sebelum menetas dan diserap kembali oleh ayam yang baru menetas pada umur 7-8 hari pertama, menunjukkan adanya zat penginduksi di kuning telur yang menyebabkan peningkatan aktivitas MFO basal selama ini periode.

Hati embrio ayam berdiferensiasi pada 4 DI dan meningkat dari 0,9% dari total berat badan pada 4 DI menjadi 2,1% pada 10 DI dan kemudian secara bertahap menjadi 3% saat menetas. Studi ultrastruktural telah menunjukkan bahwa hepatosit secara morfologis sepenuhnya dibedakan oleh 8 DI dan pertumbuhan hati sebelum 7 DI adalah karena untuk pertumbuhan dan pembelahan sel sedangkan setelah 7 DI pertumbuhan hati adalah hampir semata-mata karena pembelahan sel. Salah satu yang utama perubahan hepatosit dari 4 menjadi 7 DI adalah proliferasi retikulum endoplasma, dan aktivitas UDP-glucuronyltransferase diinduksi oleh fenobarbital dalam embrionik 7 DI yang dikultur dengan rakit hati, agen yang juga menginduksi peningkatan yang signifikan dalam retikulum endoplasma.



Timbulnya induksibilitas Aktivitas ARHase oleh TCB terjadi bersamaan dengan pertumbuhan dan diferensiasi hepatosit, dan pada 7 DI embrionik hati diinduksi ke tingkat yang sebanding dengan orang dewasa hati. Ini "menyalakan" induksi mekanisme adalah contoh yang jelas dari regulasi ekspresi gen berhubungan dengan diferensiasi sel. Todd dan Bloom (6) melaporkan peningkatan respons SCE dari 3 DI hingga 6 DI setelah terpapar aflatoxin mutagen kerja tidak langsung B<sub>1</sub>, dan penurunan respons SCE dari akting langsung mutagen etil metanasulfonat.

Meskipun ARHase basal aktivitas tidak berubah dari 3 DI ke 10 DI, induksibilitas hati berubah secara substansial selama periode ini, menunjukkan bahwa respons diferensial yang terlihat dalam studi SCE mencerminkan induksi MFO oleh mutagen yang bekerja langsung dan tidak langsung, meningkatkan metabolisme mereka sendiri menjadi nonmutagenik dan metabolit mutagenik, masing-masing. Peningkatan inducibility dari 10 DI ke 14 DI tampaknya dikaitkan dengan peningkatan paralel dalam aktivitas ARHase basal, menunjukkan perubahan perkembangan yang sebenarnya. Burchell et al diselidiki pengembangan kontrol fenobarbital-sensitif mekanisme hati embrio ayam yang dikultur. Mereka

menyarankan bahwa perbedaan dalam derajat dan waktu-kursus induksi UDP-glucuronyltransferase dalam hati dari ayam 5-DI dan 11-DI embrio adalah hasil dari perbedaan mekanisme regulasi induksi enzim pada dua usia dan bahwa perbedaan ini mencerminkan perubahan perkembangan yang terjadi di ovo.

Aktivitas ARHase turun tajam antara 14 dan 17 DI, dalam embrio kontrol dan embrio induksi. Demikian pula, Baker et al melaporkan bahwa 14 DI mewakili titik balik dalam induksi MFO dalam hati embrio ayam oleh CO. Peningkatan tajam dalam induksibilitas ARHase saat menetas secara dekat sejajar dengan peningkatan aktivitas kontrol, memuncak pada 1 hari usia untuk kedua kontrol dan hewan yang diinduksi. Tapi, sedangkan kontrol hewan terus memetabolisme sekitar dua kali tingkat normal selama 7 hari, inducibility ARHase turun ke tingkat dewasa dengan usia 3 hari, mungkin terlepas dari mekanisme yang menyebabkan peningkatan aktivitas basal. Puncaknya pada usia 1 hari, maksimal Induksi ARHase oleh TCB adalah 15,13 nmol/menit per mg, aktivitas spesifik >50% lebih tinggi dari induksi maksimal pada orang dewasa.

Rifkind et al juga melaporkan peningkatan "terjal" dalam 8- inducibility asam aminolevulinic synthetase sesaat sebelum menetas. Kinetika dosis-respons untuk induksi

AHHase oleh TCB adalah serupa di semua usia yang diamati. Dari data tersebut, maksimal dosis induksi 5 Aumol/kg embrio diperoleh untuk studi perkembangan. Potensi relatif AHHase induksi oleh TCDD, TCB, 3MC, /NF, dan fenobarbital di 17 DI sebanding dengan yang dilaporkan untuk ayam dewasa dan hewan lainnya. 8NF telah dilaporkan menjadi penginduksi kuat aktivitas AHHase pada spesies lain.

Meskipun kisaran dosis efektif untuk /3NF mirip dengan bahwa untuk 3MC dalam embrio ayam, induksi maksimalnya Aktivitas AHHase sekitar setengah dari aktivitas 3MC. Perbedaan dalam profil metabolik antar spesies mungkin penting dalam hal ini mengingat saran baru-baru ini bahwa 3NF mungkin memerlukan aktivasi metabolik sebelum dapat menjadi penginduksi yang efektif. Perjalanan waktu awal induksi AHHase oleh TCB dan 3MC sangat berbeda.

Penurunan tajam dalam induksi AHHase oleh 3MC setelah 24 jam menunjukkan hal itu 3MC secara efektif dimetabolisme oleh embrio tetapi TCB tidak. TCDD, TCB, 3MC, dan /3NF telah disarankan untuk diinduksi sitokrom P1450 dan aktivitas AHHase terkait melalui reseptor sitosolik dengan cara yang analog dengan yang diamati dengan hormon steroid. Timbulnya inducibility dari

Aktivitas AHHase pada embrio ayam awal mungkin merupakan hasilnya produksi reseptor atau ekspresi gen structural terkait dengan proses induksi. Rifkind et al mengamati tidak ada perbedaan dalam tingkat MFO aktivitas antara embrio ayam jantan dan betina, tetapi mereka umumnya ditemukan perbedaan sebanyak 5 kali lipat antar individu.

Karena banyak individu harus dikumpulkan untuk mendapatkan materi yang cukup untuk titik waktu sebelumnya, kami tidak dapat untuk menentukan variasi individu sebelum 14 DI. Namun, tidak ada perubahan dalam SD ulangan antara sebelumnya sampel dikumpulkan dan embrio yang lebih tua berjalan sebagai individu.

Ini mungkin mencerminkan susunan genetik dari percobaan hewan karena Cornell K-strain adalah populasi yang seragam dihasilkan dari seleksi ekstensif untuk pengendalian genetik tersebut karakteristik seperti ukuran telur, fertilitas, ketahanan terhadap penyakit, dan daya tetas.

Embrio ayam telah terbukti penting dan sistem yang berguna untuk mempelajari teratogenesis, mutagenesis dan karsinogenesis, dan metabolisme xenobioti. Fitur unik dari sistem embrionik unggas adalah mereka kemandirian dari pengaruh ibu. Akibatnya, mereka memberikan model yang berguna untuk mempelajari aspek-aspek perkembangan

Metabolisme MFO. Aktivitas AHHase rendah tetapi dapat dideteksi dilaporkan pada embrio tikus awal *in vitro*.

Namun, hasil ini samar-samar karena pemindahan an-embrio dari lingkungan keibuannya atau pembiakan embrio *in vitro* secara dramatis mempengaruhi aktivitas enzim. Seperti yang dilaporkan di sini, lebih awal dalam perkembangannya embrio ayam memiliki sistem MFO yang aktif yang sangat diinduksi. Sistem embrio ayam dapat menyediakan model penting untuk mempelajari perkembangan Sistem MFO dan mekanisme induksinya serta menyediakan informasi tentang konsekuensi genetik dari paparan embrionik menjadi pro-mutagen/karsinogen dan xenobiotik lainnya secara *in vivo*.

## **BAB VI**

### **Perubahan Fisiologis pada Embrio Ayam yang Diinokulasi Narkoba**

#### **Pendahuluan**

Telur berembrio mandiri, dan perkembangan alaminya pada suhu 37 °C dan Kelembaban 60% menjamin pemeliharaan hewan-hewan ini tanpa cara yang lebih rumit dukungan. Selain itu, di dalam telur, embrio sangat terkontrol, dapat diakses dan model yang relatif transparan di mana fisiologi normal, patologi penyakit dan konsekuensi dari manipulasi eksperimental dapat dengan mudah divisualisasikan, memungkinkan tinggi reproduktifitas dan eksperimen yang disederhanakan dan ekonomis.

Sejumlah penelitian telah dilakukan dengan menggunakan embrio *Gallus gallus* sebagai model eksperimental untuk mengevaluasi efek toksik obat dan infeksi. Studi-studi ini biasanya dievaluasi parameter biokimia darah, allantoic dan cairan ketuban, eritrosit morfologi, stres oksidatif dan lesi histopatologi. Seperti halnya dalam metode evaluasi dan bahan yang dikumpulkan, terdapat banyak variasi dalam umur dan inokulasi rute, di antaranya membran cangkang (SM), cairan allantoid (AF), chorioallantoic

membran (CAM), kantung kuning telur dan amnion banyak digunakan. Perkembangan embrio ayam (CE) selesai hanya dalam 21 hari, menjadi yang tercepat di antara model hewan yang paling banyak digunakan dan hanya setara dengan embrio tikus. Jadi, pada setiap hari usia inkubasi, banyak perubahan fisiologis dapat mempengaruhi secara signifikan studi dan tanggapan yang dievaluasi, membuat definisi hari inokulasi dan koleksi penting untuk mewujudkan studi eksperimental yang sangat baik.

Standarisasi parameter, seperti hari inokulasi dan pengumpulan, rute inokulasi yang digunakan, bahan biologis yang dikumpulkan, dan jenis analisis dilakukan sangat penting untuk keberhasilan eksperimen. Studi yang mencari standarisasi parameter tersebut diperlukan untuk lebih memahami dan mengidentifikasi kelangsungan CE dan studi *in ovo* sebagai model untuk uji praklinis. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk memverifikasi apakah hasilnya viabilitas, berat badan, perubahan patologis dan histopatologis, hitung darah, dosis metabolit dan / atau enzim dan stres oksidatif pada CE dari berbagai usia spesifik untuk model, mengusulkan dan mendiskusikan perlunya standarisasi embrio, menggunakan referensi virus yang menyebabkan perubahan yang diketahui pada ayam dewasa dan dua obat, yaitu DX

glukokortikoid banyak digunakan pada hewan dan manusia dan dapat menyebabkan immunosupresif efek dan FG yang merupakan stimulator prekursor granulosit banyak digunakan pada manusia di pengobatan kanker.

### **Embrio Ayam Sebagai Model**

Embrio Ayam memberikan model yang ideal untuk menyelidiki perkembangan patogen seperti virus dan menguji efek obat, mengevaluasi toksisitas dan farmakokinetik. Jadi, Embrio Ayam sebagai model hewan dapat menjadi sekutu penting untuk melakukan eksperimen yang membutuhkan

eksekusi yang cepat dan tidak terlalu rumit serta dengan sumber daya yang terbatas.

Embrio Ayam dan lampirannya merupakan lingkungan yang menguntungkan untuk mereplikasi beberapa virus, yang banyak digunakan untuk isolasi atau produksi vaksin. penyebab IBV kekerdilan, perdarahan dan kematian ketika diinokulasi ke dalam telur berembrio.

Beberapa strain Gammacoronavirus dapat menyebabkan nefropati dan hemaglutinasi lainnya. Namun, IBV memiliki kapasitas aglutinasi minimal untuk eritrosit pada ayam. Studi kami menunjukkan penurunan konsentrasi hemoglobin, nilai hematokrit dan jumlah eritrosit pada embrio yang terinfeksi dibandingkan dengan



kelompok NC, menunjukkan anemia. Indeks hematometri tidak berbeda dalam kaitannya dengan kelompok NC. Dengan demikian, kita dapat mengklasifikasikan anemia sebagai normositik dan normokromik. Ini berarti sel-sel itu berukuran standar dan konsentrasi hemoglobin, sehingga terjadi penurunan sel darah merah, tetapi tidak ada respon dari sumsum tulang untuk melepaskan sel ke dalam aliran darah. Normositik dan normokromik anemia dapat menunjukkan penurunan produksi eritrosit, yang dapat berkembang pesat pada unggas dengan penyakit yang melibatkan agen infeksi.

Meskipun secara statistik tidak ada perbedaan jumlah leukosit pada orang yang terinfeksi hewan dibandingkan dengan embrio pada kelompok NC, beberapa hewan memiliki leukosit yang tinggi hitungan ( $>30.000/\text{mm}^3$ ). Sebaliknya, yang lain memiliki jumlah yang rendah ( $<4000/\text{mm}^3$ ). Hasil ini berkontribusi pada peningkatan standar deviasi dalam analisis ini. Selama infeksi, respons jumlah sel darah putih dapat bervariasi. Di awal dari penyakit, leukositosis dapat terjadi sebagai respon oleh tubuh. Namun, seperti halnya leukosit dikonsumsi, leukopenia dapat terjadi ketika permintaan leukosit melebihi produksi kapasitas sel-sel ini oleh sumsum tulang. Dari 12 EID, hematopoiesis di CE adalah lebih aktif dan

terjadi terutama di sumsum tulang. Oleh karena itu, dalam karya ini, hematopoiesis di CE sangat intens karena kami menggunakan hewan antara 10-17 EID. Namun, meskipun EMBRIO AYAM yang digunakan dalam pekerjaan ini berasal dari kawanan yang sama dan induknya memiliki kekerabatan yang tinggi, mungkin ada variasi yang melekat dalam model itu sendiri.

Tidak ada perubahan kadar Creat dalam sampel serum dan allantois dari EMBRIO AYAM yang terinfeksi dibandingkan dengan kelompok NC, dan lesi ginjal makroskopik tidak diamati juga. Di sisi lain, hati hewan yang terinfeksi berubah secara makroskopik, dengan peningkatan volume dan warna kehijauan. Selain itu, kami mengamati reaksi inflamasi sedang dengan analisis histopatologis, meskipun hati enzim tidak meningkat dalam serum atau allantois dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Ada juga penurunan peroksidasi lipid daripada peningkatan. Tidak adanya peningkatan GGT, ALT, AST dan pengurangan peroksidasi lipid menunjukkan bahwa stres itu sangat intens, mengurangi respon hati. Kadar kalsium serum dari EMBRIO AYAM yang terinfeksi virus menurun dibandingkan dengan kelompok NC.

Kemungkinan virus dapat membajak mesin sel inang dan memanfaatkan kalsium sel inang untuk menciptakan lingkungan yang diadaptasi untuk memenuhi tuntutan mereka sendiri untuk replikasi. Ini hipotesis didukung dalam karya Cao et al. (2011). Para penulis ini mengamati hal itu tingkat ekspresi beberapa protein pengikat kalsium meningkat setelah in ovo IBV infeksi. Protein ini memfasilitasi transportasi transeluler kalsium, menunjukkan hal itu IBV dapat mengganggu homeostasis  $Ca^{2+}$  seluler untuk keuntungannya sendiri.

Selain percobaan virus, studi obat menggunakan EMBRIO AYAM sebagai model memberikan cara sederhana secara teknis untuk mempelajari sistem biologis yang kompleks untuk toksisitas obat in vivo dan penilaian farmakokinetik. Misalnya, DX adalah glukokortikoid yang banyak digunakan. Pemberiannya di EMBRIO AYAM dapat menyebabkan efek immunosupresif meningkatkan katekolamin embrionik yang mengubah perkembangan dan menyebabkan kematian.

Ada lesi makroskopik yang tinggi dan angka kematian setelah inokulasi DX, serupa untuk studi lain. Seperti yang diharapkan, kematian itu tergantung pada usia. Selain itu, di kami belajar, EMBRIO AYAM diobati dengan DX mengurangi berat badan di semua EMBRIO

AYAM yang hidup. Berat badan yang berkurang di EMBRIO AYAM yang diobati dengan DX dapat dikaitkan dengan penghambatan perkembangan otot dan tulang.

Selanjutnya, glukokortikoid dosis tinggi dapat menghasilkan penekanan hormon pertumbuhan aktivitas di kelenjar hipofisis yang sepenuhnya terbentuk pada awal minggu terakhir perkembangan embrio EMBRIO AYAM . Dengan demikian, kami dapat menyarankan agar DX mempromosikan penundaan perkembangan embrionik, secara negatif memengaruhi penambahan berat badan embrio, yang mungkin menjelaskan keterlambatan dalam pembentukan lengkap CAM ditemukan oleh kami. Tidak seperti DX, FG tidak menyebabkan perubahan dan kematian yang signifikan. Satu-satunya kematian yang diamati pada embrio yang diinokulasi pada nol EID tidak disertai perubahan dan terjadi dalam embrio dari kelompok NC, kemungkinan disebabkan oleh proses alami. Demikian pula, Embrio Ayam dera pada EMBRIO AYAM yang diinokulasi melalui CAM kemungkinan disebabkan oleh proses inokulasi sejak itu perdarahan dapat terjadi menggunakan rute ini.

EMBRIO AYAM diobati dengan DX pada 10 dan 12 EID adalah anemia. EMBRIO AYAM diperlakukan dengan DX menunjukkan penurunan jumlah eritrosit dan

penurunan hematokrit dan pada 10 EID, konsentrasi hemoglobin dibandingkan dengan EMBRIO AYAM pada kelompok NC. Ada juga penurunan hematokrit, nilai hemoglobin dan eritrosit pada hewan yang diobati dengan DX pada 12 EID, tetapi hanya eritrosit yang menunjukkan perbedaan statistik untuk kelompok NC. Meskipun begitu, ada yang tinggi korelasi antara hemoglobin dan hematokrit (nilai  $r = 0,78$ ), hematokrit dan eritrosit (nilai  $r = 0,77$ ) dan hemoglobin dan eritrosit (nilai  $r = 0,81$ ).

Oleh karena itu, Penurunan eritrosit disertai penurunan hemoglobin dan hematokrit. Meskipun EMBRIO AYAM yang diobati dengan DX mengalami anemia, indeks hematimetri tidak berbeda secara statistik antara kelompok yang diobati dan NC, mendefinisikan anemia sebagai normositik dan normokromik. Ayam yang diobati dengan kortikosteroid menunjukkan peningkatan pengeluaran energi. Embrio perlakuan dengan DX pada 10 Lebaran memiliki konsumsi kuning telur yang lebih tinggi, ditunjukkan dengan kuning telur yang lebih rendah berat embrio ini dibandingkan dengan hewan dalam kelompok NC. Defisit gizi terkait dengan kerusakan hati yang disebabkan oleh obat mungkin telah mengganggu produksi eritrosit, menyebabkan anemia normokromik normositik.

Pada EMBRIO AYAM yang diinokulasi dengan DX pada 10 EID terjadi penurunan jumlah trombosit dibandingkan dengan embrio dari kelompok NC. Mungkin produksi trombosit di EMBRIO AYAM diobati dengan DX pada 10 EID terganggu oleh kerusakan yang disebabkan di hati. Trombopoietin (TPO) adalah pengatur perkembangan megakaryocyte dan produksi trombosit dan ekspresinya pada ayam terjadi terutama di hati.

Pada hewan yang diobati dengan DX pada 12 EID, hal sebaliknya diamati. Terjadi peningkatan di jumlah trombosit dibandingkan dengan EMBRIO AYAM dari kelompok NC. Trombositosis mungkin respon rebound setelah pemulihan dari kondisi lain yang berhubungan dengan berlebihan penggunaan trombosit. Mengingat EMBRIO AYAM memiliki hati yang lebih matang, aktif sumsum tulang dan aktivitas hemopoietik, trombositosis dapat dijelaskan pada EMBRIO AYAM yang diobati. Selain itu, perlu diperhatikan juga bahwa pada unggas, trombosit memiliki fungsi fagositik dan pengaruh glukokortikoid pada sel-sel ini tidak diketahui.

Pada embrio yang diberi perlakuan DX pada 12 Idul Fitri, terjadi peningkatan jumlah leukosit, berbeda dengan yang diamati pada EMBRIO AYAM yang diinokulasi pada 10 Idul Fitri. Hal ini dapat dijelaskan oleh

timbulnya aktivitas limfoid di Bursa Fabricius pada 12 EID, dengan lebih besar kapasitas untuk menanggapi rangsangan yang disebabkan oleh obat. Pada mamalia yang diobati dengan DX, leukositosis awal dapat terjadi, terutama karena neutrofilia. Faktanya, EMBRIO AYAM diinokulasi menunjukkan peningkatan rasio H/L karena peningkatan heterofil dan penurunan dalam limfosit. Ini menguatkan beberapa penelitian pada hewan yang dilahirkan. Selama EMBRIO AYAM pengembangan, granulopoiesis lebih dominan; Namun, saat menetas, granulosit mulai digantikan oleh limfosit dalam tiga hari pertama.

Secara keseluruhan, hasilnya menunjukkan bahwa embrio dengan perbedaan kecil pada embrio tahap pengembangan benar-benar dapat mengubah respon jumlah sel. Kami tidak tahu kalau ini terjadi dengan obat lain. Namun, mengetahui bahwa embrio adalah model hewan menaik, pekerjaan lebih lanjut harus dilakukan untuk mempertimbangkan usia terbaik untuk menggunakan model tergantung pada tujuan yang diharapkan.

Sebagai faktor penstimulasi koloni granulosit (G-CSF), FG digunakan dalam pengobatan manusia untuk meningkatkan kadar neutrofil dalam aliran darah. Oleh karena itu, kami berharap bahwa efek yang sama akan diamati di EMBRIO AYAM dalam percobaan ini,

meningkatkan heterofil itu memiliki karakteristik dan kinerja yang sesuai dengan neutrofil manusia. Namun, tidak peningkatan granulosit diamati pada hewan yang diobati baik dengan inokulasi di CAM atau SM. Mungkin ini tidak terjadi karena FG adalah sintesis senyawa untuk digunakan manusia dan mungkin tidak memiliki hasil yang sama pada spesies lain.

Analisis parameter biokimia memberikan data penting untuk penilaian status klinis hewan. Namun, sampel darah yang dikumpulkan dalam penelitian dengan EMBRIO AYAM dilakukan tidak selalu memungkinkan analisis ini karena tidak mudah dan membutuhkan waktu. Oleh karena itu, alternatif sampel telah digunakan untuk menilai parameter ini, seperti cairan ketuban dan AF.

Analisis biokimia serum dan AF dan mengamatinya nilai yang ditemukan untuk kedua sampel tidak selalu sama. Namun, perbedaannya diamati antar kelompok dalam sampel serum juga diamati pada sampel AF, kecuali untuk AST, yang mungkin menunjukkan bahwa enzim ini tidak memiliki analisis yang baik dari allantois.

Diketahui bahwa protein yang terdapat dalam serum memiliki sifat fisik dan biokimia yang berbeda sifat dan perubahan dalam berbagai kondisi fisiologis dan patologis. Salah satu dari masalah dengan metode analisis enzimatik



adalah bahwa reagen dirancang untuk menyediakan substrat dan konsentrasi optimalnya untuk plasma manusia, tetapi variabel ini bisa berubah tergantung spesiesnya. Misalnya, burung memiliki tingkat aktivitas yang kurang enzim ALT dalam jaringan hati, sehingga dalam kasus kerusakan hati yang parah, enzim ini mungkin menyajikan nilai normal. Aktivitas AST terjadi di banyak jaringan, tetapi yang utama adalah hati dan otot, dianggap sensitif tetapi tidak terlalu spesifik dalam kasus masalah hati.

Aktivitas GGT meningkat pada semua kondisi dimana terjadi kerusakan hepatoselular. ALP dikaitkan dengan regulasi pertumbuhan burung, berpartisipasi dalam kondrogenik dan aktivitas osteoblastik. Dengan demikian, variasi fisiologis dapat diamati, dengan aktivitas yang lebih tinggi tingkat yang dihasilkan dari pertumbuhan tulang pada burung muda. Ketinggian di ALP mungkin terkait dengan penyakit hati meskipun aktivitasnya di organ ini minimal [26]. Dalam penelitian kami, hanya enzim AST EMBRIO AYAM yang diobati dengan DX pada 10 EID yang menunjukkan statistik perbedaan dibandingkan dengan kelompok CN. Namun, temuan dan hasil histopatologi biomarker stres oksidatif menunjukkan bahwa ada kerusakan hati. tidak ada peningkatan AST di

EMBRIO AYAM yang diobati dengan DX. Pada usia ini, hanya 50% EMBRIO AYAM yang memiliki makroskopik

Embrio Ayam dan mungkin karena ini, tingkat AST tidak meningkat. Namun, nilai maksimum AST kelompok yang diberi perlakuan DX lebih besar dari NC. Dengan demikian, AST mungkin merupakan parameter terbaik untuk analisis hati berfungsi dalam serum embrio. Konsentrasi tinggi (hingga lima kali) UA dalam plasma dapat menyebabkan presipitasi asam ini dalam bentuk kristal, yang menumpuk di jaringan. Situasi hipourisemia jarang terjadi dan mungkin terkait dengan kerusakan hati yang parah dengan akibat penurunan produksi. Ekskresi Crea terjadi melalui ginjal, tetapi pada burung, kebanyakan creatine diekskresikan sebelum diubah menjadi kreatinin. Dengan demikian, konsentrasi Crea meningkat jarang dan dapat terjadi pada gangguan ginjal berat, secara signifikan jika filtrasi terpengaruh.

Tidak ada perubahan dalam urea atau Creat yang diamati pada salah satu perawatan. Makroskopik lesi juga tidak diamati. Ini bisa berarti bahwa tidak ada kerusakan pada ginjal EMBRIO AYAM. Namun, karena kami tidak melakukan analisis histopatologi ginjal, kami tidak dapat mengesampingkannya keluar kemungkinan bahwa

kerusakan tinggi yang disebabkan oleh perawatan tidak menyebabkan perubahan dalam parameter biokimia.

Narkoba dapat menyebabkan peningkatan produksi oksidan dan pembentukan radikal bebas, yang, dengan melebihi kemampuan tubuh untuk menetralkan dan mengais radikal ini, dapat menyebabkan kerusakan organ. Studi kami menunjukkan peningkatan biomarker stres oksidatif ROS di hati embrio yang diobati dengan DX peningkatan lipid peroksidasi pada embrio yang dirawat pada 12 EID. Pada hewan dewasa, kortikosteroid dapat meningkat stres oksidatif, tetapi pendekatan serupa tidak pernah dipelajari di EMBRIO AYAM. Energi yang meningkat pengeluaran yang dipicu oleh tingginya kadar kortikosteroid yang bersirkulasi mungkin menjadi penyebab peningkatan ROS yang tercermin dari peningkatan peroksidasi lipid. Tubuh menggunakan antioksidan enzimatik dan non-enzimatik untuk menetralsir kerusakan akibat radikal bebas dan meminimalkan stres oksidatif yang berlebihan. Gugus sulfhidril adalah contoh esensial status antioksidan, menunjukkan bagaimana proses ini dikendalikan dan dilindungi dari oksidatif kerusakan. Embrio yang dirawat menunjukkan penurunan gugus sulfhidril dan Nilai FRAP, menunjukkan bahwa embrio tersebut mengalami kesulitan

untuk mencocokkan kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dalam induksi stres oksidatif oleh DX.

Embrio yang diobati dengan FG tidak menunjukkan perubahan biomarker stres oksidatif dibandingkan dengan EMBRIO AYAM dari kelompok NC. Namun, di EMBRIO AYAM diinokulasi melalui CAM, FG meningkatkan kandungan gugus sulfhidril. Filgrastim adalah perangsang koloni granulositik faktor (G-CSF). Ini memiliki aktivitas biologis yang identik dengan G-CSF manusia endogen sistein bebas pada posisi 17 dengan gugus sulfhidril terionisasi yang sangat reaktif terhadap bebas oksidasi radikal. FG mungkin telah menunjukkan antioksidan efek, dengan kemungkinan perlindungan embrio terhadap ROS. Untuk mengukur hemoglobin dalam percobaan ini, kami menggunakan larutan Drabkin dan membandingkannya dengan nilai yang diperoleh dengan menggunakan rasio  $3Hb/Hc$ . Studi kami menunjukkan korelasi sedang pada embrio yang dirawat pada 12 EID dan korelasi yang kuat pada embrio yang dirawat.

Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa perhitungan berdasarkan hematokrit dapat digunakan untuk mendekati nilai hemoglobin dalam situasi di mana pengukuran dengan spektrofotometri itu tidak mungkin. Namun, penggantian ini hanya mungkin dilakukan jika

tidak ada kecurigaan hemolisis, karena hemolisis karena pengumpulan atau masalah patologis, mendorong penurunan dalam hematokrit tanpa pengurangan proporsional dalam hemoglobin. Untuk melakukan perhitungan diferensial leukosit pada unggas, terdapat kesulitan yang besar membedakan antara trombosit dan limfosit. Meskipun tidak identik, inti dari trombosit dan limfosit kecil terlalu mirip untuk dijadikan dasar perbedaan antara kedua jenis sel tersebut. Dalam penelitian ini, sel-sel dalam darah EMBRIO AYAM bernoda panoptik cepat apusan dengan inti kecil, bulat atau lonjong dengan gumpalan kromatin padat dikategorikan sebagai trombosit jika mereka memiliki vakuola sitoplasma dan sitoplasma tidak berwarna. Sel diklasifikasikan karena limfosit kecil memiliki nuklei yang serupa tetapi sedikit sitoplasma biru atau biru tua tanpa vakuola. Untuk menetapkan dasar kategorisasi sel-sel ini, beberapa sitokimia sifat dari sel-sel ini dibandingkan.

Trombosit khas divisualisasikan oleh UV setelah terkena gas formaldehida. Swayne et al. (1986) mengamati bahwa sebagian besar dari trombosit (99%) telah berpendar setelah perlakuan formaldehida gas dan semua limfosit kecil tidak berpendar. Fluoresensi ini dihasilkan dari produk kondensasi serotonin. Kami mengukur trombosit

yang ditemukan pada slide hewan diinokulasi dalam penelitian ini dan membandingkannya dengan sel yang ditemukan dalam apusan darah slide ayam dewasa. Trombosit dari ayam dewasa memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok NC, yang rata-rata 8,5  $\mu\text{m}$ . Kami tidak dapat menentukan mengapa FG meningkatkan ukuran trombosit.

Menggunakan PAS, kami menandai trombosit sebagai PAS positif, sedangkan limfosit dan eritroblas adalah PAS negatif. Eosinofil adalah SBB positif, sedangkan heterofil adalah SBB negatif. Penggunaan PAS dan SBB itu penting untuk klasifikasi sel yang lebih baik. Meskipun berbagai bentuk diferensiasi digunakan untuk mengidentifikasi sel-sel dalam apusan darah embrio dalam percobaan ini, beberapa sel tetap tanpa identifikasi konklusif. identifikasi sel-sel ini sebagai jenis granulosit, tetapi mereka dapat membingungkan dengan eosinofil, basofil atau prekursor granulosit. Sel-sel ini ditemukan di sampel dari embrio yang diberi FG (20%) dan DX (25%) diinokulasi pada 10 Idul Fitri, hewan terinfeksi virus (100%), dan pada hewan dari kelompok NC (23,07%) diinokulasi. Respon lain yang diamati dalam penggunaan FG pada manusia adalah stimulasi endotel sel dengan konsekuensi angiogenesis. Dalam penelitian ini, kami

menganalisis pembuluh darah dari CAM hewan yang diinokulasi dengan FG untuk mengidentifikasi kemungkinan peningkatan kepadatan pembuluh mencirikan terjadinya angiogenesis. Namun, tidak ada perbedaan statistik antara EMBRIO AYAM diinokulasi dengan FG dan kelompok NC.

## **BAB VII**

### **Efek toksiko-patologis embrionik dari meglumine antimoniate menggunakan embrio ayam**

#### **Pendahuluan**

Leishmaniasis adalah masalah medis dan kedokteran hewan utama di seluruh dunia, mempengaruhi 12 juta orang di 98 negara dengan dua juta kasus baru setiap tahun dan 350 juta orang berisiko. Saat ini, penyakit ini merupakan penyakit parasit terpenting ketiga (setelah malaria dan Afrika trypanosomiasis) dan tetap menjadi salah satu dari 9 penyakit menular penting secara global dampak, dan menyumbang lebih dari 20.000–40.000 kematian per tahun. Beberapa bentuk klinis dan epidemiologis dominan, tergantung pada spesies penyebab.

Saat ini, 22 spesies bertanggung jawab atas berbagai bentuk klinis termasuk leishmaniasis kulit, mukokutan, visceral, difus dan post kala-azar dermal dalam lima benua. Sebagian besar kasus sebagian besar tersembunyi, terkonsentrasi di daerah pedesaan terpencil, dan berada lebih umum di daerah kumuh perkotaan dan kota kumuh. Penyakit ini juga sangat menonjol, karena orang yang terkena dampak memiliki sedikit suara politik dengan standar hidup yang rendah dalam hal sosio-ekonomi. dan kondisi higienis.



Meglumine antimoniate (MA) adalah senyawa antimon pentavalen yang dianggap sebagai agen lini pertama dalam pengobatan leishmaniasis. Beberapa mekanisme aksi antimon pentavalen telah disarankan: "Prodrug Model", "Intrinsic Antileishmanial Activity Model" dan "Model Aktivasi Kekebalan Tubuh". Obat MA komersial saat ini adalah Glucantime<sup>1</sup>, diproduksi oleh Sanofi-Aventis, Prancis. Sudah diketahui bahwa setelah injeksi, MA dengan cepat menyilang plasenta ke dalam sirkulasi janin. Selanjutnya, obat tersebut dikategorikan dalam kelompok C dari obat farmakologis Administrasi Makanan dan Obat Amerika Serikat (FDA) dan tidak memadai penelitian telah dilakukan untuk mengetahui efek buruknya selama kehamilan. Perkembangan janin intrauterin yang normal selalu menjadi perhatian utama. Beberapa salah satu faktor terpenting yang memengaruhi fenomena biologis ini adalah efek toksik dari obat-obatan dan proses yang mengatur asal-usul dan proliferasi jaringan pembuluh darah. Konsumsi obat-obatan tertentu selama kehamilan berhubungan dengan peningkatan risiko kehamilan kelainan, termasuk malformasi kongenital, cedera histopatologis, retardasi pertumbuhan dan perubahan karakteristik biokimia cairan ketuban. Obat juga dapat

memiliki sifat toksik vaskulo, menyebabkan kerusakan sel dan mempengaruhi perkembangan vaskular perifer embrionik. Kegiatan ini telah didokumentasikan dalam berbagai penyelidikan eksperimental. Pembentukan dan proliferasi jaringan pembuluh darah adalah dikenal sebagai vasculogenesis dan angiogenesis dan merupakan langkah penting yang terkait dalam embrio pertumbuhan. Vasculogenesis adalah generasi de novo pembuluh darah dari angioblas, sedangkan angiogenesis berkaitan dengan percabangan dan pertumbuhan pembuluh darah baru dari yang sudah ada sebelumnya.

Beberapa jalur, faktor pertumbuhan dan protein sangat penting untuk regulasi, promosi dan penghambatan proses-proses ini. Protein yang paling penting dalam proses sebelumnya adalah Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) yang dihasilkan oleh organ mesenkim, dan menempel pada beberapa subfamili reseptor tirosin kinase seperti VEGF-R1, -R2 dan -R3. Penentuan efek samping unsur kimia dan obat perlu menggunakan model praklinis. Embrio ayam menyediakan model yang cocok untuk evaluasi in vivo toksisitas, biokompatibilitas, biodistribusi dan farmakokinetik obat karena kesederhanaan, biaya rendah, reproduksibilitas hasil yang baik, mengurangi aspek etika dan hukum, dan ibu tidak mempengaruhi

farmakokinetik obat. Selanjutnya, anak ayam itu ekstra-embriolik membran (EEM) dikembangkan untuk menilai efek faktor dan senyawa angiogenik/anti-angiogenik dan vaskulogenik/anti-vaskulogenik.

Pleksus vaskular anak ayam EEM sederhana dan mengandung pembuluh yang tidak berdiferensiasi yang memungkinkannya bercabang secara progresif selama pertumbuhan embrio. Dalam hal ini, dapat menghasilkan toksisitas bawaan dan menyebabkan efek samping mempengaruhi perkembangan janin manusia selama kehamilan. Meskipun meningkatkan penggunaan dan produksi MA diprediksi di beberapa wilayah dunia [16], sedikit yang telah dilaporkan efek toksik dan patologis dari senyawa ini pada perkembangan embriolik dan pembuluh darah. Selain itu, mekanisme pasti yang mempengaruhi genesis dan ekspansi vaskular adalah belum sepenuhnya dipahami.

### **Efek toksiko-patologis embriolik dari meglumine antimoniate menggunakan embrio ayam**

Data dari studi saat ini menunjukkan bahwa efek toksik utama dari MA, pada dosis 75 mg per kg (dosis terapeutik manusia yang direkomendasikan), berada pada

trimester kedua dari masa pertumbuhan. Keparahan lesi kasar dan histopatologis tertinggi pada embrio yang ada diobati dengan dosis obat tertinggi. Efek toksik embrio yang paling parah dihasilkan oleh dosis MA yang lebih tinggi juga didukung oleh beberapa data percobaan. MA disuntikkan ke dalam yolk sac telur berembrio. Terlihat bahwa perkembangan toksisitas, setelah pemberian MA, tergantung pada lamanya pengobatan . Fenomena ini mendorong penulis untuk meningkatkan periode resorpsi obat agar masuk pekerjaan ini, obat disuntikkan ke dalam kantung kuning telur untuk menutupi seluruh durasi embrio organogenesis (hari 1–18). Perlu dicatat bahwa pengobatan leishmaniasis berhasil membutuhkan periode 21-28 dosis harian MA. Lesi bruto seperti perdarahan adalah juga dicatat pada EEM anak ayam dan lesi tidak terlalu parah pada kelompok yang diobati dosis lebih rendah. Toksisitas embrio yang diinduksi secara eksperimental oleh MA telah dilaporkan pada beberapa spesies. Misalnya, setelah injeksi subkutan tikus Wistar dengan MA, embrio-mematikan dan efek teratogenik seperti anomali tulang atlas terjadi secara spontan pada embrio. Augmentasi organ lunak (mis. ureter yang melebar) dan cedera tulang (sternebra yang tidak sejajar dan iga servikal rudimenter) juga dilaporkan.

Sebaliknya, Santos et al. (2008) dilaporkan bahwa MA dapat diadministrasikan dalam organisme ibu tanpa merusak keturunan masa depan. Dalam beberapa kasus, tingkat MA yang aman tanpa hasil toksisitas embrio di Tikus Wistar adalah 75 mg/(kg berat badan hari). Patogenesis, farmakokinetik, dan distribusi jaringan MA pada embrio tidak didefinisikan dengan jelas. Berdasarkan hasil saat ini, disimpulkan bahwa MA dapat didistribusikan ke otak, ginjal, jantung, dan hati embrio ayam, karena lesi mikroskopis terlihat di organ-organ ini. Kelainan visceral lainnya tidak dievaluasi; oleh karena itu, demonstrasi lesi histopatologis pada jaringan yang dipertahankan tidak mengesampingkan kemungkinan itu anomali organ lain mungkin terjadi karena dosis paparan. Oleh karena itu, akan berguna untuk mengidentifikasi perincian lebih lanjut yang terlibat dalam patogenesis embrio MA di masa depan. Kedua indikasi gangguan MA adalah retardasi pertumbuhan dan penurunan berat badan.

Ada beberapa penelitian dalam literatur, yang berfokus pada berat embrio setelah perawatan dengan senyawa antimon pentavalen. Alkhawajah dkk. (1996) merawat 15 tikus Sprague Dawley hamil dengan MA pada hari ke 6 dan menemukan bahwa janin dari induk yang dirawat memiliki tubuh yang lebih rendah. berat.

Pengurangan berat janin, setelah paparan MA, juga dilaporkan oleh orang lain. Demikian pula dalam penelitian ini, embrio yang menerima MA, terutama pada dosis 150 mg per kg berat telur, menunjukkan penurunan berat badan yang signifikan. Indikasi ketiga gangguan MA adalah perubahan besar dalam beberapa biokimia parameter cairan ketuban anak ayam seperti ALP, ALT, AST dan amilase mengikuti MA perlakuan. Cairan ketuban memiliki sifat dinamis yang sangat kompleks yang mengelilingi embrio, dan pemantauan itu memiliki penggunaan yang luas dalam diagnosis klinis sebagai indikator status embrio selama tahap perkembangan. ALP adalah enzim yang ditemukan di beberapa jaringan unggas, termasuk tulang, ginjal, usus dan hati. ALT hadir dalam sel-sel berbagai jaringan unggas dan perubahannya disebabkan oleh cedera jaringan. AST adalah enzim intraseluler yang berguna untuk mendeteksi gangguan hepatoseluler dan elevasi sering dikaitkan dengan lesi hati. Pada burung, pankreas, hati dan kecil usus menghasilkan amilase. Ketinggian telah dikaitkan dengan pankreatitis, enteritis dan cedera hati.

Dalam studi saat ini, peningkatan parameter cairan ketuban yang disebutkan di atas disarankan karena cedera jaringan setelah pengobatan MA dan kemungkinan transfer enzim ke dalam cairan ketuban, karena luka di otak, ginjal,

hati dan jantung terlihat dalam penyelidikan. Perubahan parameter biokimia cairan ketuban karena agen teratogenisitas telah dilaporkan sebelumnya. Penelitian ini menunjukkan bahwa embrio-toksisitas dengan perubahan sifat normal cairan ketuban dapat dihasilkan oleh paparan MA selama masa pertumbuhan embrio.

Indikasi terakhir gangguan MA adalah penghambatan perkembangan vaskular awal pada EEM dan penurunan ekspresi VEGF-A dan reseptornya. Pola vaskular yang berubah ini mungkin menawarkan hubungan antara paparan MA dan kelainan perkembangan, seperti malformasi embrionik, retardasi pertumbuhan dan lesi patologis, yang diamati pada saat ini. belajar. MA digunakan dengan dosis 75 atau 150 mg per kg berat telur pada telur berembrio.

Dosis sebelumnya sebanding dengan dosis terapeutik rutin yang digunakan untuk mengobati leishmaniasis pada manusia. Dosis ini tampaknya memiliki kecenderungan efek samping MA pada EEM-vaskularisasi dan ekspresi gen. Patogenesis dan efek toksik embrio dari senyawa antimon pentavalen pada embrio didukung oleh beberapa data percobaan pada perilaku obat dan farmakokinetik. Misalnya, lesi mungkin karena akumulasi obat dalam jaringan embrionik. Pada manusia,

diindikasikan bahwa dosis berulang MA menyebabkan akumulasi obat dalam tubuh. Toksisitas MA juga mungkin karena perubahan osmolaritas. Penjelasan selanjutnya untuk cedera jaringan yang terkena adalah produksi trivalent senyawa antimon.

Itu didalilkan oleh Chulay et al. (1988) antimon pentavalen itu senyawa dapat dikonversi menjadi senyawa trivalen selama administrasi. Trivalen senyawa umumnya lebih beracun daripada yang pentavalen dan mungkin terkait dengan racun efek obat. Selain itu, karakteristik bawaan tertentu dari MA dapat dikaitkan dengan efek buruknya. Sebagai contoh, beberapa temuan menunjukkan bahwa obat tersebut bersifat genotoksik properti dan bertindak sebagai senyawa pro-mutagenik yang menyebabkan kerusakan pada DNA. Lebih-lebih lagi, MA mampu menginduksi kematian sel dengan nekrosis. Kegiatan MA ini juga dapat terlibat anti-vasculogenesis dan anti-angiogenesis, yang menjelaskan pengurangan pleksus vascular dalam embrio yang disuntikkan dalam penyelidikan saat ini.

Paparan MA memengaruhi ekspresi VEGF dan VEGFR-2. Berkurangnya ekspresi gen tersebut, mekanisme berikut disarankan: kerusakan sel, dengan penurunan berturut-turut vasculogenesis dan angiogenesis,



yang ditimbulkan oleh MA mungkin telah menyebabkan aliran darah yang terbatas melalui pembuluh darah. Penurunan aliran darah ini berkorelasi dengan beberapa data sebelumnya bahwa MA menginduksi anemia dan penurunan hemoglobin.

Perubahan aliran darah dapat menyebabkan penurunan shear stress, yang dideteksi oleh sel endotel. Umumnya, ketika tegangan geser meningkat, VEGF-A dan VEGFR-2 diregulasi. Oleh karena itu, pengurangan tegangan geser yang disarankan setelah perawatan MA dapat berkurang Ekspresi VEGF-A dan VEGFR-2. Selanjutnya, VEGF-A memiliki fungsi yang berbeda dalam pembuluh darah pertumbuhan. Misalnya, merangsang sintesis DNA yang dimediasi VEGF-R2. Dengan demikian, pengurangan dalam VEGF-A akan mengakibatkan penurunan VEGFR-2. Ini mungkin menjelaskan penurunan ekspresi VEGFR-2 di tempat tidur vaskular embrio yang diobati dengan MA. Dalam karya ini, dua metode yang digunakan untuk mengeksplorasi efek anti-vasculogenic/antiangiogenic dari MA adalah analisis fraktal dan perhitungan rata-rata area kapiler dari memperoleh gambar dari EEM-vaskularisasi. Sejauh ini, metode ini telah banyak diterapkan di studi vaskular.

Pembuluh darah EEM cewek adalah fraktal karena tersusun dalam sebuah bidang hampir dua dimensi dan hanya ada sedikit penyeberangan kapal. Waktu pengobatan juga dipilih agar sesuai dengan waktu sensitif yang diakui sebelumnya untuk teratogenesis, di mana kelainan vaskular telah didokumentasikan. Untuk yang terbaik dari penulis pengetahuan, ini adalah studi pertama yang menargetkan lesi embrionik yang berbeda setelah MA paparan, dengan bantuan model embrio ayam. Studi ini memberikan data yang rumit tentang aspek toksiko-patologis senyawa MA. Temuan ini sejalan dengan keterbatasan sebelumnya melaporkan data yang berfokus pada toksisitas MA terhadap embrio. Selain itu, data ini menunjukkan bahwa MA tidak hanya memiliki efek buruk pada embrio dan parameter biokimia cairan ketuban, tetapi juga membatasi vasculogenesis/angiogenesis embrio awal dan menghasilkan konsekuensi yang menghancurkan.

## **BAB VIII**

### **Tumor Ayam Pada Chorioallantoic Membrane (TCAM) In Ovo**

#### **Pendahuluan**

Pemodelan kanker manusia untuk penelitian onkologi merupakan isu sentral dalam konteks uji praklinis yang menyertai pengembangan terapi antikanker baru. Kriteria utama yang dipertimbangkan dalam pengembangan model hewan adalah reliabilitas model, perhatian etis, kecepatan eksekusi, dan biaya realisasi. Saat ini, model hewan tipikal yang dikembangkan untuk studi onkologi adalah pada tikus. Itu pengembangan model ini melibatkan waktu produksi yang relatif lama dan biaya tinggi. Selain itu, beberapa jenis sel kanker, seperti sel kanker manusia, tidak bisa ditanamkan pada tikus yang sepenuhnya imunokompeten dan membutuhkan penggunaan imunodefisiensi tikus yang tidak memiliki sistem kekebalan fungsional.

Termotivasi oleh masalah etika, Russell dan Burch mengembangkan strategi 3R dalam “The Principles of Humane Experimental Technique” untuk mengurangi, memurnikan, dan mengganti hewan dan untuk membatasi jumlah dan penderitaan hewan dalam percobaan. Saat ini, masih ada kebutuhan untuk menggunakan model alternatif

meningkatkan penelitian kanker. Salah satu model alternatif adalah pemanfaatan embrio ayam untuk penelitian kanker. Telur digunakan sebagai bioreaktor dengan lingkungan mikro dinamis yang mendukung tumor pembanguana. Selama perkembangan embrio unggas, mesoderm berkembang pesat, menghasilkan chorioallantoic membrane (CAM) yang kaya vaskularisasi dan transformasi struktur telur. CAM berfungsi sebagai organ pernapasan embrio ayam.

CAM tumbuh dan menyatu dengan korion sejak hari embrionik 3 (ED3). Di panggung ini, pembuluh darah ke dalam CAM mengembang dan bersentuhan dengan cangkang berpori, memungkinkan pertukaran gas. Membran vaskularisasi terus tumbuh sampai ED13 dan menutupi permukaan cangkang, memungkinkan transportasi oksigen, nutrisi, dan mineral ke embrio. Jaringan pembuluh limfatik juga berkembang di CAM sampai ED9, tetapi sistem kekebalan tidak aktif sebelum ED18. Embrio ayam, oleh karena itu, tidak sepenuhnya imunokompeten sebelum tahap ini. Yang penting, embrio ayam tidak digambarkan sebagai memiliki nosisepsi fungsional hingga tahap perkembangan selanjutnya.

Terakhir, ayam embriogenesis berlangsung selama 21 hari hingga menetas. Transplantasi jaringan ke CAM

dapat dilakukan hingga ED18, karena tidak adanya sistem yang sepenuhnya imunokompeten, mewakili model yang menarik untuk dilakukan secara *in vivo* eksperimen. Uji CAM juga telah dicirikan secara ekstensif untuk mempelajari angiogenesis dan remodeling vaskular. Ini merupakan praklinis serbaguna dan relevan model onkologi *in vivo* menggunakan xenografts tumor dari berbagai jenis kanker dari limfoma hingga tumor padat seperti model kepala dan leher atau hepatoma.

Studi tentang proliferasi dan migrasi sel juga dapat dipantau pada embrio ayam. Yang penting, uji tumor CAM (TCAM) dapat dianggap lebih dapat ditoleransi secara etis daripada model hewan pengerat, karena CAM tidak dipersarafi, sehingga lebih sesuai dengan pedoman 3R penggunaan hewan dalam penelitian. Uji TCAM mewakili cepat dan model relatif murah untuk pengujian efikasi dan keamanan serta penyaringan perpustakaan besar zat farmakologis. Memang, Eckrich dan kolaborator menghitung bahwa biaya uji TCAM sekitar 20 kali lipat lebih murah daripada model tikus. belum ada perbandingan langsung antara embrio tikus dan ayam diterbitkan untuk memantau respons tumor atau masalah keamanan setelah pengobatan obat antikanker.

Uji TCAM dapat menjadi alternatif yang cocok untuk hewan pengerat evaluasi awal obat antikanker. Prosedur kami menggunakan sel dalam suspensi yang diunggulkan dalam campuran Matrigel™ dan medium untuk menghindari penyebaran sel dan memberikan nutrisi dukungan sampai sel-sel merekrut pasokan vaskular. Sel-sel tumor diendapkan ke CAM embrio ayam dan menghasilkan tumor yang dipantau selama 10 hari. Tumor biasanya memanfaatkan jaringan vaskular yang dikembangkan untuk tumbuh. Model ini digunakan untuk mengevaluasi lima agen antikanker dalam model tumor khusus. Sebanyak 12 lini sel tumor yang berasal dari tumor payudara, usus besar, paru-paru, hati, dan otak menunjukkan berbagai respon obat. Kami juga menunjukkan hubungan positif dari respon obat dengan dua agen kemoterapi, cisplatin dan temozolomide, antara xenograft embrio tikus dan ayam. Terakhir, kami membandingkan profil keamanan keduanya agen kemoterapi, cisplatin dan siklofosamid, dan menunjukkan sebanding respon pada tikus dan embrio ayam.

### **Tumor Ayam Pada Chorioallantoic Membrane (TCAM) In Ovo**

Model TCAM dapat digunakan untuk skrining awal dalam kohort besar jenis tumor untuk mengevaluasi

beberapa agen antikanker dan mungkin pengganti model xenograft subkutan tikus standar emas. Baik khasiat maupun masalah keamanan dapat diselidiki dengan respons obat yang sesuai. Untuk yang terbaik dari pengetahuan kami, ada sangat sedikit perbandingan langsung dari perkembangan tumor dalam model TCAM dan murine. Memang, Strojnik dan kolaborator membandingkan arsitektur tumor glioblastoma pada embrio ayam dan model tikus. Lyu dan kolaborator membandingkan ekspresi u-PAR dan profil pertumbuhan tumor antara ayam embrio dan model tikus. Aguirre-Ghiso dan kolaborator membandingkan p38/ERK aktivasi dalam sel karsinoma. Dalam tiga artikel ini, tidak ada evaluasi farmakologis dilakukan perbandingan. Sebaliknya, Weiss dan kolaborator menunjukkan beberapa kesamaan respon tumor ovarium manusia A2780 pada kombinasi terapi antiangiogenik pada embrio ayam dan model xenograft tikus, dan mereka juga menunjukkan bahwa RAPTA-C, senyawa berbasis dasar ruthenium, mampu menekan pertumbuhan tumor baik pada embrio ayam maupun pada model xenograft tikus dengan dosis masing-masing 0,2 mg/kg (dosis diekstrapolasi pada berdasarkan berat embrio) dan 100 mg/kg. Di luar dua artikel ini dari Weiss dan kolaborator, kami tidak menemukan artikel tambahan yang

membandingkan respons obat pada tikus dan model embrio ayam. Dengan demikian, evaluasi tatap muka obat antikanker saat ini menyajikan hasil asli dengan penskalaan yang memadai dalam hal jumlah garis sel kanker dan obat-obatan disaring untuk menunjukkan reproduktifitas dan keandalan model TCAM sebagai pengganti tikus.

Dalam pekerjaan kami, kami menguji dalam percobaan kami dua obat di kedua xenograft tikus dan Model TCAM, TMZ yang merupakan SOC untuk GBM dan cisplatin, kemoterapi yang banyak digunakan untuk mengobati pasien kanker paru-paru, testis, prostat, atau ovarium. Apalagi kemoterapi berbasis platinum untuk TNBC, kanker hati, melanoma, atau kolorektal kanker menunjukkan ketertarikan baru dan kuat pada tingkat praklinis dan klini. Karena bukti klinis menunjukkan resistensi sel tumor terhadap cisplatin pengobatan pada pasien, beberapa strategi sensitisasi yang mungkin menghindari resistensi obat harus diuji pada tingkat praklinis dan harus divalidasi *in vivo*. Dengan demikian, Model TCAM mewakili jalan untuk skrining obat dengan mengusulkan model kanker yang sensitif dan resisten. Data kami menunjukkan respon antikanker yang mirip dengan cisplatin tumor payudara dan usus besar 4T1 dan CT26 baik pada embrio ayam.



Sensitivitas dan resistensi terhadap cisplatin bisa diamati pada kedua model. Memang, kami tidak mengamati efek terapeutik cisplatin pada model tumor paru garis sel PC-9 yang resisten xenograft dalam TCAM atau pada tikus. Selain itu, kami menunjukkan, melalui garis sel GBM U118MG digambarkan buruk responsif terhadap TMZ dalam model xenograft tikus, bahwa TMZ menginduksi reduksi tumor pada model tikus dan TCAM dengan pola penghambatan pertumbuhan tumor yang serupa. Dengan demikian, TCAM mungkin merupakan alternatif yang menarik untuk model murine menguraikan resistensi obat.

Embrio ayam juga bisa menjadi model yang relevan untuk farmakologi keamanan nonklinis untuk perawatan akut atau sub-kronis. Hasil kami menggunakan cisplatin dan siklofosamid in ovo sebagian merekapitulasi beberapa pengamatan in vivo, dan nasib ayam embrio memprediksi toksisitas obat yang dapat diamati pada tikus, biasanya diamati sebagai berat badan penurunan selama masa pengobatan. Oleh karena itu, analisis keamanan pada embrio ayam dapat berfungsi sebagai dasar untuk mengidentifikasi dosis beracun senyawa sebelum percobaan hewan pengerat. Pertama dosis pengobatan yang mempengaruhi kelangsungan hidup embrio, misalnya, dapat digunakan sebagai yang tertinggi dosis diberikan

pada tikus untuk membatasi stres fisiologis yang tidak perlu.

Saat ini perbandingan tatap muka menunjukkan kesamaan yang masuk akal dalam efek obat di TCAM dan model xenograft tikus. Secara keseluruhan, data ini menunjukkan bahwa model TCAM dapat berfungsi untuk menguji pendekatan terapeutik baru in ovo dengan respons serupa dalam hal antikanker kemanjuran dan toksisitas dibandingkan dengan model murine. Salah satu kendala model TCAM adalah pentingnya kematian embrio setelah manipulasi sel telur, seperti yang dijelaskan dalam literatur.

Beberapa langkah kunci dalam protokol kami kemungkinan besar menjelaskan peningkatan kelangsungan hidup embrio, serta peningkatan keandalan pertumbuhan tumor. Memang, dengan protokol kami, kematian embrio terbatas pada kelompok kontrol dirawat dengan kendaraan dengan kematian kurang dari 10%. Kematian yang diamati mungkin tidak dapat disangkal manipulasi telur atau akibat beban tumor. Selain itu, kami mengamati hampir 100% beban tumor dengan model seluler yang digunakan. Data ini berkorelasi dengan data kami di tikus, di mana semua model seluler yang digunakan dalam ovo juga menghasilkan tumor setelah subkutan engraftment pada tikus. Identifikasi beberapa langkah kritis

yang dapat memengaruhi keefektifan model termasuk (i) metode untuk melepaskan CAM dari cangkang dengan menerapkan depresi melalui kantung udara, (ii) penggunaan larutan etanol untuk membersihkan cangkang untuk membatasi kontaminasi, (iii) penggunaan Matrigel™ sebagai scaffold pro-survival untuk pertumbuhan sel tumor, (iv) penggunaan cincin silikon steril untuk memusatkan sel dan memungkinkan pertumbuhan tumor yang cepat, (v) penggunaan konsentrasi stabil dua juta sel, dan (vi) penanganan telur yang terbatas selama prosedur.

Pengukuran alternatif di luar berat tumor juga relevan untuk menilai tumor perkembangan, termasuk ukuran tumor, jumlah sel tumor, tumor angiogenesis, atau paru-paru dan metastasis hati dalam embrio. Analisis tambahan menggunakan pencitraan *in vivo* metode, dengan sel reporter atau imunohistokimia, memungkinkan karakterisasi yang lebih baik perkembangan tumor. Model xenograft CAM mewakili cara yang hemat biaya dengan cepat mendapatkan data dalam pengaturan yang lebih relevan secara biologis daripada sel yang tumbuh budaya, dan itu adalah langkah perantara yang berharga dalam menjembatani kerja *in vitro* murni dengan lebih banyak model kompleks kanker, seperti model hewan orthotopic.

Evaluasi volume tumor dan pemberian perawatan pada hewan pengerat menginduksi ketidaknyamanan dan stres akibat penanganan, pembatasan, inokulasi intravena/intraperitoneal, atau sedasi. Sebaliknya, CAM tidak dianggap menantang dari segi etika karena embrio ayam paling tidak bereaksi terhadap rangsangan nosiseptif dari periode perkembangan mereka. Bahkan, analisis rasa sakit akibat sengatan listrik ditunjukkan tidak adanya reaksi pada embrio ayam sampai ED15. Apalagi embrio ayam tidak menunjukkan aktivitas elektroensefalografi berkelanjutan yang terkait dengan persepsi nyeri sebelum ED17. Tidak adanya nosisepsi fungsional selama tahap pertama perkembangan membuat eksperimen TCAM lebih dapat diterima secara etis karena membatasi pengaruh titik akhir yang manusiawi seperti rasa sakit dan stres pada hasil eksperimen. Prosedur ini dapat, oleh karena itu, dianggap lebih disukai secara etis daripada percobaan tikus standar di untuk mendapatkan bukti konsep in vivo praklinis pertama.

Model TCAM memungkinkan pemantauan selama 10 hari untuk perkembangan tumor. Satu model mouse, PC-9/CR xenograft, memungkinkan setidaknya 30 hari jendela terapeutik karena profil pertumbuhan yang relatif rendah (Gambar 4H), tetapi model lain seperti itu karena model syngeneic U118MG xenograft dan CT26 masing-masing

hanya menawarkan 7 dan 13 hari, sebelum pengorbanan hewan untuk pertimbangan etis. Oleh karena itu, periode 10 hari pemantauan in ovo tampaknya sebanding dengan beberapa model tikus tergantung pada tumornya garis sel.

Keterbatasan lain mungkin bahwa metabolisme obat mungkin berbeda antara model tetikus dan TCAM. Memang, rute administrasi antara tikus dan ayam embrio berbeda dengan pemberian intravena/ip/per os pada tikus dibandingkan pemberian topikal pada CAM untuk embrio ayam dalam protokol kami. Namun demikian, metabolisme xenobiotik telah dijelaskan dalam embrio setelah pemberian topikal. Temozolomide, misalnya, yang diberikan ke dalam sirkulasi mengalami nonenzimatik yang cepat konversi pada pH fisiologis menjadi senyawa aktif monomethyl 5-triazino imidazole carboxamide (MTIC) sekali beredar dan menginduksi represi pertumbuhan tumor di model TCAM. Dalam kasus metabolisme enzimatik yang kompleks dan spesifik organ, benar evaluasi aktivasi metabolisme senyawa harus diselidiki dengan hati-hati, dan rute pemberian alternatif selain topikal dapat digunakan. Injeksi senyawa intravena atau intraallantois dapat mewakili alternatif yang benar dan layak.

Aspek penting menggunakan model hewan adalah memilih kisaran dosis yang tepat menerjemahkan data antar

spesies. Memang, untuk manusia, dosis sering dinyatakan sebagai kuantitas per luas permukaan tubuh ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ). Misalnya, TMZ, standar perawatan untuk GBM, diberikan dari 75 sampai 200  $\text{mg}/\text{m}^2$  untuk pasien, yang sesuai dengan kira-kira 2 sampai 6  $\text{mg}/\text{kg}$ . Cisplatin digunakan sekitar 40 sampai 300  $\text{mg}/\text{m}^2$  untuk pengobatan paru-paru kanker pada pasien, yang setara dengan kira-kira 1 sampai 8  $\text{mg}/\text{kg}$ . Dalam studi ini, TMZ diberikan pada tumor dengan dosis 1  $\text{mg}/\text{kg}$ , sedangkan cisplatin diberikan pada 0,4  $\text{mg}/\text{kg}$ . Mempertimbangkan berat embrio rata-rata pada ED10 hingga ED13, sekitar 7 g. dosis sebenarnya yang diberikan kepada embrio harus sekitar 0,1-0,2  $\text{mg}/\text{kg}$ . Namun demikian, konversi antara spesies berdasarkan  $\text{mg}/\text{m}^2$  tidak dapat langsung diterapkan untuk obat yang diberikan oleh administrasi topikal seperti halnya untuk model TCAM. Dengan demikian, tidak mungkin untuk secara tepat mengekstrapolasi korespondensi dosis manusia, bahkan jika kisaran dosisnya berdasarkan berat telur utuh sangat mirip. Dosis menginduksi respon farmakologis di TCAM secara global 2-10 kali lipat lebih rendah dibandingkan dengan tikus. Memang pada tikus, TMZ ada diberikan pada 10  $\text{mg}/\text{kg}$  secara oral dan cisplatin diberikan pada 1  $\text{mg}/\text{kg}$  atau 2  $\text{mg}/\text{kg}$  intraperitoneal,

konsisten dengan dosis yang digunakan pada manusia tanpa koreksi.

Secara keseluruhan, model TCAM dapat berfungsi sebagai metode pengganti untuk percobaan hewan pengerat, memenuhi kewajiban etis dan pedoman 3R untuk penggunaan hewan di penelitian tumor, sambil tetap memiliki respons prediktif terhadap obat antikanker. TCAM assay tetap menjadi model serbaguna untuk penemuan obat, termasuk skrining, kemanjuran, dan pendekatan toksisitas. Berbagai macam jenis kanker dapat diselidiki di TCAM model xenograft. Pertumbuhan tumor dan kemanjuran senyawa dapat dinilai secara efisien dengan pengukuran berat tumor. Parameter tambahan, termasuk target atau mekanisme tindakan, dapat dinilai dengan analisis penanda tumor dan jalur molekuler.

Tumor angiogenesis juga dapat dievaluasi dengan pencitraan *in vivo*. Uji TCAM adalah metode hemat biaya dan waktu untuk menghasilkan data prediktif untuk pengembangan obat antikanker dan direkomendasikan sebagai alat transisi *in vivo* untuk skrining dini pengobatan antikanker, menjembatani kultur sel tumor *in vitro* dengan prosedur yang lebih kompleks, seperti orthotopic model hewan pengerat.

## **BAB IX**

### **Eksploitasi embrio ayam membran chorioallantoic (CAM) sebagai platform untuk anti-metastatik pengujian obat**

#### **Pendahuluan**

Metastasis adalah penyebab utama kematian akibat kanker. Mengungkap target terapi baru pada kanker metastatic pasti bergantung pada model yang cocok dan fungsional yang dapat menerima tes farmakologis. Strain tikus imunodefisiensi yang berbeda memungkinkan pengikatan sel manusia dan membuka kemungkinan untuk mengembangkan model. Di atas beberapa tahun terakhir, upaya luar biasa telah dilakukan untuk membangun xenografts yang diturunkan dari pasien (PDX) yang berbeda untuk memodelkan penyakit pasien dan menguraikan strategi terapi baru. PDX saat ini adalah yang paling relevan secara klinis model tetapi kesulitan untuk mendapatkan pertumbuhan metastatik dari tumor PDX membuat studi fungsional dan pendekatan skrining menantang. Bergantung pada tujuan penelitian, beragam situs pengikatan tumor diterapkan, seperti orthotopical atau langsung dalam sistem vaskular. Namun, keduanya jarang mencerminkan metastasis pasien yang sebenarnya penyakit.



## **Eksplorasi embrio ayam membran chorioallantoic (CAM) sebagai platform untuk anti-metastatik pengujian obat**

Selain itu, biaya yang terkait dengan pembuatan dan pemeliharaan model mouse dan masalah etika sangat membatasi penggunaannya. Baru-baru ini, organoid 3D telah muncul sebagai alat baru yang kuat untuk memodelkan heterogenitas tumor dan melakukan tes skrining obat. Upaya besar telah dilakukan untuk menghasilkan budaya bersama 3D untuk disimulasikan lingkungan mikro tumor *ex vivo*. Namun, kurangnya kompleksitas *host in vivo* menjadikan pemodelan metastatic penyakit tidak lengkap. Untuk mengatasi beberapa keterbatasan ini dan menjembatani kesenjangan antara *in vitro* dan *in vivo* mempelajari metastasis, kami dan yang lainnya mencoba menggunakan model embrio ayam chorioallantoic membrane (CAM). Aplikasi pertama embrio ayam dan CAM dalam penelitian onkologi diumumkan lebih dari satu abad yang lalu. Model telur ayam pada dasarnya berkontribusi pada penemuan paling signifikan dan beberapa peraih Nobel, termasuk penemuan onkogen (c-src) pertama yang diketahui. Embrio anak ayam berkembang selama 21 hari hingga menetas. Te CAM terbentuk dalam 4 sampai 5 hari inkubasi (ID) melalui fusi

lapisan mesodermal dari allantois dan korion yang tumbuh lebih besar. Sifat CAM yang sangat vaskularisasi adalah keuntungan yang cukup besar, itu sangat merangsang pertumbuhan sel-sel yang dicangkokkan. Khususnya, model unggas ini secara alami tuan rumah yang imunodefisien; sebuah fitur yang memungkinkan implantasi sel dan jaringan tumor tanpa spesifik spesies pembatasan. Selaput ekstraembrionik terhubung ke embrio melalui jalur ekstraembrionik yang kontinu sistem kapal mudah diakses untuk manipulasi dan observasi. Menurut hukum Eropa (Directive 2010/63/EU Parlemen Eropa dan Dewan 22 September 2010 tentang perlindungan hewan digunakan untuk tujuan ilmiah), sistem model CAM tidak menimbulkan masalah etika atau hukum apa pun alternatif yang menarik untuk percobaan hewan lainnya. Model CAM dipertahankan dalam inkubator pada suhu 37 °C membutuhkan ruang terbatas. Ini secara signifikan membatasi persyaratan peternakan dibandingkan dengan imunodefisiensi penangkaran tikus dan mengurangi biaya percobaan. Ketersediaan model CAM untuk skrining sangat bermanfaat dibandingkan dengan kultur in vitro, di mana peran pembuluh darah tumor dan tropisme jaringan tidak dapat diperhitungkan.

Beberapa laporan sebelumnya menunjukkan kelayakan mendapatkan pertumbuhan tumor dalam bentuk nodul pada CAM, mulai dari garis atau jaringan sel tumor yang berbeda. Studi ini biasanya bertujuan untuk mengevaluasi morfologi dan karakteristik morfometrik nodul tumor. Memang, pertumbuhan tumor telah dievaluasi dengan mengukur ukuran dan berat nodul serta luasnya jaringan vascular atau dengan studi imunohistokimia pada tumor primer CAM terisolasi. Perkembangan teknologi, khususnya di bidang pencitraan semakin terbuka kemungkinan baru untuk mengukur pertumbuhan tumor primer dan mempelajari migrasi sel tumor<sup>1</sup>. Sampai saat ini, evolusi tumor metastatik dianalisis dengan Alu-PCR kuantitatif untuk mendeteksi sel tumor manusia di organ terisolasi dari embrio ayam.

Sel tumor berpendar juga terdeteksi pada bagian jaringan dari organ yang diisolasi. Di sini, kami menyelidiki apakah model CAM dapat digunakan untuk mengevaluasi kapasitas metastatik sel dan berfungsi sebagai tes obat anti-metastatik praklinis yang potensial. Kami melaporkan teknologi langkah demi langkah untuk diperoleh pertumbuhan metastatik dimulai dari sejumlah kecil sel tumor yang berkarakteristik baik. Kami menunjukkan kuantitatif penilaian metastasis menggunakan pencitraan

optik tomografi 3D hewan utuh. Akhirnya, kami memberikan bukti konsep untuk kelayakan uji praklinis senyawa anti-metastatik dalam model embrio ayam.

Pengembangan lebih lanjut dalam pembentukan model praklinis *in vivo* baru diperlukan untuk menambah pengetahuan tentang penyemaian tumor dan menawarkan wawasan baru ke dalam strategi terapi. Dalam penelitian ini kami menunjukkan bahwa metastasis di organ embrio ayam dapat diperoleh setelah pengerjaan angka serendah 103 tumor sel ke dalam CAM. Pencitraan tomografi optik 2D dan 3D standar memungkinkan deteksi yang sangat sensitive fokus metastatik neon dalam waktu 7 hari dari pengerjaan sel. Pembentukan metastasis pada embrio ayam dikonfirmasi oleh studi molekuler. Kami mengukur efek penghambatan dari berbagai perawatan standar perawatan termasuk kemoterapi dan terapi bertarget menggunakan beberapa lini sel NSCLC dan PCa. Kami juga mengamati itu sistem embrio ayam CAM memungkinkan pemulihan tropisme metastatik tulang dari garis sel PCa. sistem CAM dapat memberikan metode yang cepat dan sensitif untuk mengevaluasi aktivitas metastatic sel kanker dan menilai kemanjuran senyawa anti-metastatik.

Sampai saat ini, analisis pertumbuhan tumor pada CAM mengandalkan inspeksi visual dengan mikroskop dan

kuantifikasi ukuran atau berat nodul. Metode ini terus dioptimalkan. Dua penelitian telah melaporkan keberhasilan pengukuran bioluminesensi tumor manusia yang tumbuh di CAM11. Dinamika dari pertumbuhan tumor primer menggunakan reporter luciferase ditunjukkan untuk Pca dan osteosarcoma. Dalam pekerjaan kami, pertumbuhan nodul primer divisualisasikan, mirip dengan yang lain, dengan fluoresensi. Evaluasi mikroskopis primer tumor pada CAM mengungkapkan interaksi seluler yang sangat dinamis antara sel tumor neon dan lingkungan mikro. Selama hari-hari pertama inkubasi, CAM berisi tiga lapisan: ektoderm yang menempel membran cangkang, mesoderm yang diperkaya dengan pembuluh darah dan endoderm. Di ID , saat tumor sel ditanamkan, ektoderm CAM dicirikan oleh sistem kapiler yang sangat berkembang, yaitu penting untuk penyediaan dan penyebaran tumor. Teknik penilaian mikroskopis angiogenesis tumor yang ditingkatkan mengkonfirmasi pengamatan ini menggunakan pemotongan optik CAM di samping histologis klasik dan fluoresen pewarnaan.

Motilitas dan migrasi sel tumor divisualisasikan dalam CAM menggunakan pencitraan intravital. Ini metodologi sangat berguna untuk mempelajari migrasi awal sel pada CAM dan membutuhkan besar jumlah sel yang

ditanam bervariasi dari 10625 hingga  $8 \times 10^6$ . Jumlah sel yang lebih rendah ditanamkan ke dalam CAM untuk ikuti pembentukan fokus metastatik dimulai pada  $2 \times 10^4$  per telur. Namun konsentrasi yang paling sering digunakan dari sel tumor terukir adalah  $2 \times 10^6$  per telur. Di sini kami menjelaskan protokol yang hanya membutuhkan 103 sel tumor untuk mendapatkan pertumbuhan nodul yang terlihat pada CAM dan perkembangan metastasis pada embrio ayam. Sorotan hasil ini sensitivitas metode dan teknik deteksi kami, yang mungkin memiliki kepentingan khusus dalam aplikasi dengan jumlah sel yang terbatas. Misalnya, pendekatan ini mungkin menarik untuk mengevaluasi subpopulasi langka sel induk kanker atau subklon tumorigenik yang dimodifikasi secara genetik.

Pembentukan metastasis dan sensitif untuk deteksi mereka dibandingkan studi lain menggunakan sistem CAM. Kami mengadaptasi jumlah sel tumor yang mampu bertahan selama periode tersebut persis sama, kedua garis sel berbeda dalam kapasitas penyemaian metastatik. Akhirnya, sensitivitas fluoresensi deteksi teknik pencitraan yang digunakan juga merupakan faktor penting. Untuk menambah pengetahuan kita tentang pembenihan metastatik, diperlukan pengamatan yang lebih dalam pada embrio ayam. Namun, karena adanya cangkang telur,

sebagian besar teknik visualisasi biasanya terbatas pada CAM dan CAM-nya daerah yang terikat erat. Pembentukan metastasis yang dilaporkan sebelumnya pada embrio ayam dievaluasi dengan analisis imunohistokimia bagian organ. Jika tidak, beban tumor diperkirakan oleh qPCR dari ALU urutan dari DNA organ terisolasi. Saat ini, embrio ayam dan sel metastatik dapat divisualisasikan berkat modalitas pencitraan yang sensitif. Aplikasi pertama computer tomography (CT) dilaporkan pada tahun 2013.

Pencitraan CT dikombinasikan dengan PET untuk memvisualisasikan serapan pelacak tumor<sup>30</sup>. Laporan menarik lainnya menunjukkan bahwa sel-sel tumor yang diberi label dengan polimer magnetik dapat divisualisasikan di berbagai organ anak ayam embrio menggunakan Magnetic Resonance Imaging (MRI<sup>31</sup>). Namun, metode ini membutuhkan agen kontras yang disesuaikan dan sejumlah besar sel yang akan ditanamkan pada CAM, karena hilangnya sinyal secara substansial proliferasi sel yang intensif. Dalam beberapa kasus, untuk menghindari penghalang cangkang telur, percobaan dilakukan secara *ex ovo* untuk menyajikan motilitas sel tumor dinamis dengan videomicroscopy. Dalam percobaan *in ovo* dilaporkan di sini, sejak sinyal fluoresensi tidak terdeteksi di seluruh cangkang telur, kami mengukur fokus

metastatik post mortem di dalamnya embrio ayam menggunakan pencitraan fluoresensi 3D. Selain itu, menggabungkan akuisisi fluoresensi ke 3D CT memungkinkan lokalisasi spesifik dari fokus metastatik dalam embrio. Penting untuk menyatakan bahwa, seperti yang diamati menggunakan sebagian besar teknik in ovo, metode kami tidak secara langsung mengatasi ukuran lesi tumor. Memang, backscattered sinyal tergantung pada jumlah sel fluoresen, tingkat ekspresi protein fluoresen intraseluler dan ketebalan jaringan embrio. Modalitas pencitraan tambahan diperlukan untuk memenuhi kebutuhan ini.

Proses metastasis dapat dirangsang oleh lingkungan embrio ayam dan waktu yang sangat singkat memimpin untuk pembentukan metastasis kemungkinan besar mempengaruhi fitur akhir tumor. Namun, hasil kami menyoroiti utilitas potensial dari model CAM embrio ayam sebagai alat in vivo untuk menilai sensitivitas tumor terhadap terapi senyawa. Fluoresensi 3D yang sangat sensitif dan pencitraan CT memungkinkan lokalisasi metastasis pada anak ayam embrio tetapi juga memberikan kemungkinan untuk mengukur sinyal fokus metastatik dibandingkan dengan kontrol negatif atau embrio ayam yang dirawat. Oleh karena itu, sistem CAM muncul sebagai



uji pelengkap untuk pengujian obat. Baru-baru ini, optimalisasi kultur primer 3D telah memberikan informasi yang relevan secara biologis tentang tumor pertumbuhan dan respons terhadap berbagai rangsangan.

Namun, interaksi kompleks dalam organisme itu sulit ditiru dalam teknik ko-kultur 3D2 dan alat praklinis pelengkap diperlukan. Sampai sekarang, banyak uji obat yang berhasil dilakukan pada nodul primer CAM dan memastikan pemanfaatan model ini sebagai model praklinis yang dapat diandalkan untuk menguji terapi baru. Efek obat antikanker berbasis nanopartikel pada sel kanker ovarium dalam model CAM juga telah dilaporkan. Di sini kami fokus pada penargetan kapasitas metastatik sel tumor pada embrio ayam. Pertama, kami mendemonstrasikan efek kemoterapi umum seperti itu sebagai docetaxel dan cisplatin pada pertumbuhan metastatik kanker prostat dan paru-paru. Sepuluh kita meniru respon NSCLC positif-ALK menjadi crizotinib penghambat tirosin kinase. Penghambatan pertumbuhan farmakologis pancreas adenokarsinoma duktal oleh crizotinib sebelumnya dilaporkan dengan mengukur aktivitas luciferase pada nodul primer pada CAM.

Kemungkinan untuk menggunakan model CAM untuk menguji terapi bertarget dikonfirmasi secara

kuantitatif menggunakan dua molekul lain, yaitu gefitinib (penghambat EGFR) dan enzalutamide (penghambat reseptor androgen) untuk mengobati telur ditanamkan dengan sel H1650 dan LNCaP masing-masing. Ini menunjukkan bahwa, dengan kombinasi fluoresensi dan pencitraan seluruh embrio 3D CT, pengujian embrio ayam dapat berfungsi sebagai metode yang cepat dan efisien untuk melakukan penyaringan pertama dari molekul terapeutik potensial.

Salah satu kejadian yang jarang direkapitulasi dalam model metastatik adalah tropisme jaringan tumor<sup>34</sup>. Memang, tulang tertentu tropisme PCa tingkat lanjut hampir tidak terjadi pada model PCa spontan. Hingga saat ini, paling representative model diperoleh setelah injeksi sel tumor intrakardiak atau intraoseus pada tikus imunodefisiensi atau, seperti yang baru-baru ini dilaporkan, dalam model tikus yang direayasa secara biologis dengan tulang manusia<sup>36</sup>. Baru-baru ini CAM PCa berhasil didirikan. Studi sebelumnya tentang PCa menggunakan CAM didasarkan pada visualisasi tumor primer dan int proses perusakan. Fokus metastatik sel PC3 PCa ditemukan di otak anak ayam embrio dan evaluasi tulang tidak disebutkan. Dalam penelitian ini, IGR-CaP1 dan GR-CDX paling agresif Garis sel P1 PCa secara istimewa membentuk

metastasis pada tulang embrio ayam yang sedang berkembang, yang menunjukkan relevansi CAM dalam memodelkan perkembangan metastatik PCa dan tropismenya.

## **BAB X**

### **Enam jenis karbon nanopartikel dalam embrio ayam**

#### **Pendahuluan**

Nanopartikel karbon (CNP), seperti diamond NPs (DNPs), grafit NPs (GNPs), graphene murni (pG), graphene oksida (GO), dan GO tereduksi (rGO), adalah karbon alotrop yang menjadi bahan utama untuk berbagai aplikasi industri dan medis, karena kombinasi unik sifat kimia dan fisiknya. CNP adalah sebagian besar dieksploitasi dalam biomedis untuk pencitraan sel dan jaringan, pengiriman obat, dan perancah rekayasa jaringan, meskipun laporan mengenai toksisitasnya masih bertentangan.

Oleh karena itu, diperlukan karakterisasi yang tepat dari biokompatibilitas dan toksisitasnya untuk eksploitasi yang aman dan bertanggung jawab atas bahan-bahan ini. Di antara CNP adalah kelompok berbeda yang disebut bahan keluarga graphene (GFM). Itu struktur semua GFM didasarkan pada graphene, yang merupakan bahan setebal satu atom yang terdiri dari atom karbon yang disusun dalam struktur kisi sarang lebah yang mengarah ke luar biasa sifat fungsional dan mekanik. Graphene dianggap sebagai bahan tertipis di dunia, karena tebalnya hanya satu atom karbon, meskipun luas permukaan hingga 1 cm<sup>2</sup> mungkin tercapai. Permukaan GFM terdiri dari sp<sup>2</sup> - atom karbon hibridisasi,

tapi karena adanya ikatan yang menjuntai dan tepi permukaan GO dan rGO, sp<sup>3</sup> hibridisasi juga ada. Akibatnya, sifat interaksi antara molekul biologis dan GFM kemungkinan tergantung pada sp<sup>2</sup>- atau sp<sup>3</sup> -status hibridisasi karbon.<sup>4,5</sup> Oleh karena itu, sangat penting untuk selidiki dan bandingkan dampak dari GFM yang berbeda di model biologis.

Ada berbagai metode produksi untuk CNP. Metode fabrikasi utama termasuk peledakan dan teknik tekanan tinggi yang diinduksi ledakan untuk DNPs<sup>6–8</sup> atau perlakuan panas di atas 1.000°C untuk produksi GNP. Pembelahan mikromekanis, pengendapan uap kimia, oksidasi, pengelupasan kulit, dan reduksi grafit digunakan untuk GFM manufaktur. Metode dimana CNP disintesis secara langsung mempengaruhi sifat fisikokimia mereka dan pada gilirannya potensi toksisitasnya dalam sistem biologis. Oleh karena itu, salah satu tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi pengaruh metode sintesis, ukuran, bentuk, dan permukaan karakteristik CNP pada perkembangan embrio ayam.

Embrio ayam menempati tempat istimewa di antara model hewan yang digunakan dalam studi perkembangan dan toksisitas, dan juga telah berkontribusi secara signifikan terhadap imunologi, genetika, virologi, kanker,

dan biologi sel. Perkembangan pesat dan fakta bahwa embrio mudah diakses untuk visualisasi dan manipulasi eksperimental hanyalah beberapa di antaranya karakteristik yang menjadikan mereka model vertebrata pilihan selama lebih dari dua ribu tahun.

Embrio ayam model memungkinkan administrasi dikendalikan zat dan pengamatan langsung perkembangan embrionik. Embrio pengembangan selesai pada saat menetas pada 21 hari, seperti yang dijelaskan dalam tahapan Hamburger–Hamilton (HH). tahap awal pertumbuhan embrio ayam yang cepat memberikan model sensitif untuk menyelidiki potensi efek toksik pada berat badan, perkembangan organ, dan kerusakan oksidatif. Ada beberapa laporan dalam literatur yang menunjukkan toksisitas CNP yang berbeda dalam berbagai biologis model embrio, seperti ayam, ikan zebra, dan *Xenopus laevis*. Misalnya, tabung nano karbon menghambat angiogenesis membran chorioallantoic pada ayam embrio dan menyebabkan kematian sebelum hari ke-12 inkubasi period. Embrio ikan zebra diobati dengan nanodiamond (ND) cacat dalam cara yang tergantung pada dosis.

Namun, tidak efek toksik diamati untuk neon ND. Dalam kasus ini, cacat morfologis bruto yang bergantung pada dosis, penetasan keterlambatan, dan kematian embrio

ikan zebra diamati. Dalam percobaan *in vivo* dengan embrio *X. laevis*, ND adalah sangat embriotoksik dan teratogenik. Namun demikian, penyelidikan dijelaskan hanya terfokus pada nanomaterials tertentu tanpa membandingkan efek biologis yang berbeda alotrop karbon diproduksi dengan metode yang berbeda dan dengan sifat fisikokimia yang beragam. , 16 pG memiliki efek berbahaya pada otak perkembangan embrio ayam. Selanjutnya, pG, GO, dan rGO menyebabkan kerusakan mitokondria dan atipikal ultrastruktur hepatosit pada embrio ayam. Namun, tidak ada penelitian yang melaporkan toksisitas yang bergantung pada dosis. DNP tidak mempengaruhi perkembangan embrio, meskipun mereka membentuk endapan di jaringan hati.

### **Studi toksisitas dari enam jenis karbon nanopartikel dalam model ayam-embrio**

Toksisitas beberapa CNP diselidiki pada 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , seperti yang telah ditunjukkan bahwa dosis GFM 0,5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  meningkatkan angka kematian. Ini adalah dosis yang sama sebelumnya diberikan pada tikus laboratorium dalam penelitian kami sebelumnya. CNP disuspensikan kembali di WFI, yang biasanya digunakan untuk mengencerkan atau melarutkan obat untuk injeksi parenteral (termasuk injeksi intravena, intra-arteri,

intramuskular, atau subkutan). Sifat WFI berbeda dari Milli-Q air, dan mungkin menjelaskan tentang embriotoksisitas GFM. Pertama, perbedaan dapat diamati pada tingkat kelangsungan hidup untuk placebo kelompok: dalam penelitian ini, tingkat kelangsungan hidup adalah 80%, sedangkan penelitian yang menggunakan air Milli-Q telah dilaporkan rate 0,90%. Hasil ini menunjukkan bahwa WFI dapat mempengaruhi keseimbangan cairan dan elektrolit dalam albumin telur. Namun, melarutkan CNP di WFI meningkatkan persentase relative embrio yang selamat dari pengobatan CNP dibandingkan dengan penelitian dengan CNP yang dilarutkan dalam air Milli-Q.

Menurut Szmidt et al,<sup>17</sup> konsentrasi yang lebih rendah (50 dan 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) graphene menembus embrio lebih banyak efisien daripada konsentrasi yang lebih tinggi, karena tingkat NPdispersi yang berbeda. Hasil ini dijelaskan oleh alam kecenderungan CNP untuk menggumpal ketika mereka dilapisi oleh protein albumin yang mengelilingi embrio. CNP ke albumin telur, yang secara progresif dikonsumsi oleh embrio selama proses perkembangan dan akhirnya diserap sepenuhnya, memastikan bahwa seluruh dosis disampaikan selama embriogenesis. Selanjutnya, self-assembly CNP dengan albumin amino asam dengan ikatan nonkovalen sangat



efisien, menyiratkan bahwa CNP dapat diangkut secara efektif ke dalam embrio. Meskipun tingkat kelangsungan hidup menurun pada pengobatan CNP kelompok relatif terhadap kelompok plasebo, kecuali untuk DNP, morfologi makroskopis dari tubuh 5-, 10-, Embrio berumur 15, dan 20 hari, bobot badan, dan bobot organ tidak berbeda antara kelompok plasebo dan pengobatan.

Hasil ini konsisten dengan penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa DNPs<sup>18</sup> dan pG16,<sup>17</sup> tidak berbahaya bagi perkembangan embrio. Karena sistem peredaran darah digunakan untuk transportasi CNP dari albumin telur hingga embrio, sangat penting untuk menyelidiki dampak CNP pada sel darah merah, yang sangat sensitif terhadap perubahan patologis apa pun. Itu harus ditekankan bahwa dalam penelitian ini, CNP diberikan pada hari pertama embriogenesis, sebelum perkembangan sistem peredaran darah. Hematopoiesis pada embrio ayam dimulai di pulau darah kantung kuning telur selama yang kedua hari inkubasi, hanya menghasilkan eritrosit berinti dan trombosit.<sup>41–43</sup> Saat pulau darah tumbuh, mereka bergabung menjadi membentuk jaringan kapiler yang mengalir ke vena vitelline, yang membawa nutrisi dan BC ke jantung yang baru terbentuk embrio. Kantung kuning telur tetap hematopoietik untuk sebagian besar

perkembangan embrionik. Apusan darah dari kelompok plasebo, DNP, GNP, pG, dan IGO tidak menunjukkan gejala peradangan atau deformasi BC.

Eritrosit tampak sebagai sel elips pipih dengan nukleus yang terletak di tengah dan bahan retikuler yang diaglomerasi, seperti biasa untuk sel darah merah unggas. Biokompatibilitas DNP dengan sel darah merah. Selanjutnya, sebuah studi *in vitro* menunjukkan adsorpsi itu komponen plasma sebesar 5 dan 100 nm ND (hingga 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) tidak berpengaruh signifikan pada konformasi atau koagulasi protein plasma darah. Telah ditunjukkan bahwa 100 nm ND adalah terlokalisasi di sekitar sel darah merah, sementara partikel 5 nm menembus sel darah merah; kedua ukuran ND, bagaimanapun, tidak beracun pada konsentrasi 5 dan 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Spektrum Raman tidak menunjukkan apapun perubahan sel darah merah, hemoglobin, atau hemoglobin-oksigenasi negara. Di sisi lain, Puzyr et al menunjukkan hal itu Partikel ND disintesis dengan metode ledakan yang diinduksi kematian pada BC putih manusia dan hemolisis eritrosit *in vitro*. Efek merusak itu karena 1) pengikatan langsung ND ke protein membran sel, yang dapat menyebabkan penghambatan ireversibel dari fungsinya, dan 2) ketidakseimbangan keseimbangan elektrolitik dan osmotik disebabkan oleh

adsorpsi komponen protein plasma darah untuk partikel ND. Namun, model *in vivo* menunjukkan bahwa ND dapat menempel pada membran RBC dan bersirkulasi bersama darah selama minimal 30 menit, menyiratkan bahwa ND memiliki potensi aplikasi dalam kedokteran. Pada penelitian ini, bentuk dan ukuran eritrosit dipertahankan dalam kelompok IGO dan sGO, dengan hanya sedikit peningkatan ukuran inti sel darah merah di sGO. Di keduanya kelompok, adanya adhesi serpihan GO ke Permukaan sel darah merah selama pemeriksaan apusan darah tepi.

Telah terbukti bahwa serpihan GO dapat menempel pada permukaan sel darah merah; Namun, seperti dalam penelitian kami, tidak ada efek yang signifikan pada morfologi eritrosit atau integritas membran. Lebih lanjut, GO mempromosikan transisi dari hemangioblast ke endotel hemogenik. Promosi keduanya primitive dan hematopoiesis definitif oleh GO konsisten dengan fakta bahwa nenek moyang primitif dan definitif dihasilkan dari prekursor endotelium hemogenik. Hasil menunjukkan bahwa rGO mempengaruhi bentuk dan ukuran sel darah merah, yang menjadi lebih lonjong dan umumnya lebih kecil. Namun, kami berpikir bahwa sel darah merah dari kelompok rGO bentuk eritrosit unggas yang belum matang daripada indikasi patologi, karena mereka memiliki

sitoplasma yang tidak teratur polikromasia dan nukleus pucat yang lebih bulat. fitur juga diamati pada kelompok sGO. Indeks biokimia serum darah tidak dipengaruhi oleh salah satu perawatan CNP. Hasil serupa memiliki telah dilaporkan sebelumnya. Namun, karena darah homeostasis serum dikontrol dengan ketat, kurangnya efek pada indeks serum mungkin belum tentu mencerminkan kurangnya racun efek. Oleh karena itu, kami juga memeriksa efek toksik dari CNP dengan menyaring status kerusakan oksidatif di hati dari embrio ayam.

Peroksidasi lipid dievaluasi dengan mengukur MDA tingkat. Tak satu pun dari CNP yang diselidiki menyebabkan oksidatif kerusakan hati. Dalam laporan kami sebelumnya, kami menyarankan bahwa baik DNP, IGO, maupun GNP tidak memicu stres oksidatif pada tikus, dan yang lebih penting mereka mungkin memainkan peran dalam pemulungan spesies oksigen reaktif, karena tingkat mereka lebih rendah dibandingkan dengan kelompok plasebo. Muatan permukaan juga ditemukan mempengaruhi biologis sifat-sifat NP. Dalam penelitian ini,  $\zeta$ -potensi diukur untuk enam CNP berbeda yang disuspensikan kembali di WFI pada waktu yang sama konsentrasi untuk membandingkan dan memperkirakan dampak pelarut atas biaya CNP, properti yang menentukan

mereka biodistribusi dan toksisitas. Dua dari nanomaterial yang diselidiki bermuatan positif, sedangkan sisanya bermuatan negatif. pG memiliki potensi  $\zeta$  positif yang rendah (4,15 mV), yang menunjukkan stabilitas koloid murni dan menyarankan agar kita mungkin perlu menggunakan pelarut yang lebih polar untuk memasukkan bahan hidrofobik ini ke dalam larutan. Dibandingkan dengan literatur, bahkan Air Milli-Q adalah pelarut yang lebih baik untuk melarutkan pG pada konsentrasi yang sama sambil mempertahankan muatan negatifnya.

Larutan GNP juga bermuatan positif (35,57 mV), yang merupakan karakteristik GNP meskipun pelarut, terutama mengingat bahwa dalam larutan garam steril pada saat yang sama konsentrasi, itu juga bermuatan positif (12,5 mV). CNP lain bermuatan negatif, tetapi kami mengharapkannya interaksi dengan albumin telur akan mengubah potensial- $\zeta$  menjadi sekitar -9 mV, seperti yang telah didemonstrasikan sebelumnya. Untuk GNP dan rGO, stabilitas relatif meningkat dalam larutan garam terhadap air Milli-Q. Namun, untuk pG, sGO, dan lGO, stabilitas menurun, dan potensi  $\zeta$  untuk DNP sedang.

Namun demikian, ada baiknya menyelidiki tuduhan CNP dalam media biologis, seperti albumin telur, untuk memahami caranya muatan dapat berubah setelah opsonin

atau protein lain berikatan nanomaterial yang diselidiki. Menurut Wang et al, semakin tinggi  $\zeta$ -potensi GO dan turunan GO menyebabkan kerusakan sel yang lebih parah, tetapi ketika tingkat muatan di permukaannya cukup tinggi, biaya tidak berkorelasi langsung dengan toksisitas. Mereka juga berhipotesis bahwa partikel bermuatan positif dapat mengganggu keseimbangan muatan membran sel dan menginduksi kerusakan sel pada tahap selanjutnya, sementara NP bermuatan negative memiliki tingkat endositosis yang lebih rendah dan tidak memanfaatkan jalur endositosis yang dimediasi clathrin. faktor toksikologi kunci mungkin tergantung pada parameter lain, seperti identitas gugus fungsi pada struktur CNP.

## Daftar Pustaka

- Abidin, J., & Hasibuan, F. A. (2019). Pengaruh Dampak Pencemaran Udara Terhadap Kesehatan Untuk Menambah Pemahaman Masyarakat Awam Tentang Bahaya Dari Polusi Udara. Prosiding SNFUR-4, Pekanbaru, 7 September 2019.
- Aliah, M. (2018). Pengaruh Murottal Al-Qur'an Pada Saat Inkubasi Terhadap Bobot Tetas Dan Viabilitas Pada Puyuh. [Skripsi]. Makassar : Jurusan Ilmu Peternakan, Fakultas Sains Dan Teknologi, UIN Alauddin Makassar.
- Anshori, I. 2011. Bahaya Dioksin. Beranda Pusarpedal. Tangerang: Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, 3:1-3.
- Birnbaum, L. S., & DeVito, M. J. (1995). Use Of Toxic Equivalency Factors For Risk Assessment For Dioxins And Related Compounds. *Toxicology*, 105(2-3), 391–401.
- Blankenship, A. L., Hilscherova, K., Nie, M., Coady, K.K., Villalobos, S.A., Kannan, K., Powell, D.C., Bursian, S.J., & Giesy, J.P. (2003). Mechanisms of TCDD-induced abnormalities and embryo lethality in white leghorn chickens. *Comp Biochem Physiol C*, 136, 47–62.
- Bruggeman, V., Swennen, Q., De Ketelaere, B., Onagbesan, O., Tona, K., & Decuyper, E. (2003). Embryonic Exposure To 2,3,7,8-tetrachlorodibenzop-

dioxin In Chickens: Effects Of Dose And Embryonic Stage On Hatchability And Growth. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 136(1), 17–28.

Budiyono, A. (2001). Pencemaran Udara : Dampak Pencemaran Udara Pada Lingkungan. *Jurnal Berita Dirgantara*, Vol. 2(1).

Całkosin'ski, I. (2008). The influence of tocopherol on diagnostic indexes of inflammatory reaction in rats undergoing dioxin exposition. Habilitation thesis. Wrocław Medical University, Wrocław. ISBN 978-837055-507-7.

Connell, D. W., & Miller, G. J. (1995). *Pollution Chemistry Ecotoxicology*. Jakarta : UI Press.

Couture, L. A., Abbott, B. D., & Birnbaum, L. S. (1990). A Critical Review of the Developmental Toxicity and Teratogenicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin: Recent Advances Toward Understanding the Mechanism. *Teratology*, 42, 619-627.

Damara, D. Y., Wardhana, I. W., & Sutrisno, E. (2017). Analisis Dampak Kualitas Udara Karbon Monoksida (Co) Di Sekitar Jl. Pemuda Akibat Kegiatan Car Free Day Menggunakan Program Caline4 Dan Surfer (Studi Kasus: Kota Semarang). Semarang. *Jurnal Teknik Lingkungan*, 6(1).



Fiedler, H., Rottler, H., Peichl, L., Knetsch, G., & Basler, A. (2000). Concentrations Of PCDD/PCDF In Atmospheric Samples In Germany. *Organohalogen Compound* 45, 264-268.

Gostomska-Pampuch, K., Ostrowska, A., Kuropka, P., Dobrzn'ski, M., Ziółkowski, P., Kowalczyk , A., Łukaszewicz , E., Gamian , A., & Całkosin'ski , I. (2017). Protective Effects Of Levamisole, Acetylsalicylic Acid, And A-Tocopherol

Against Dioxin Toxicity Measured As The Expression Of Ahr And COX-2 In A Chicken Embryo Model. *Histochem Cell Biol*, 147, 523–536.

Ivnitski-Steele, I. D., Friggens, M., Chavez, M., & Walker, M. K. (2005). 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) Inhibition of Coronary Vasculogenesis is Mediated, in Part, by Reduced Responsiveness to Endogenous Angiogenic Stimuli, including Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A). *Birth Defects Research (Part A)*, 73, 440 – 446.

Jaya, B. W. (2018). Efek Potensi Ekstrak Anggur Laut (*Caulerpa racemora*) Sebagai Preventif Fowl Pox Terhadap Ketebalan Epidermis Dan Histopatologi Kulit Embrio Telur Ayam Berembrio. [Skripsi]. Malang : Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

Kimbrough, R. D. (1995). PCB And Human Health: An Update. *Crit. Rev. in Toxicol*, 25, 133-163.

Kusumawati, A., Febriany, R., Hananti, S., Dewi, M.S., & Istiyawati, N. (2016). Perkembangan Embrio dan Penentuan Jenis Kelamin DOC (Day-Old Chicken) Ayam Jawa Super. *Jurnal Sain Veteriner*, 34(1).

Murtidjo, B. A. (1994). Mengelola Ayam Kampung. Yogyakarta : Kanisius.

Ratnaningsih, D., Syofyan, Y., Yuriska, A., & Endah, K. (2020). Potensi Pencemaran Persistent Organic Pollutants Di Daerah Aliran Sungai Ciliwung. *ECOLAB*, 14(1), 21-30.

Safe, S. (1995). Development And Validation Of The Toxic Equivalency Factor (TEF) Approach For The Risk Assessment Of PCBs. *Orgunohalogen Compds*, 22, 131141.

Soedomo, M. (2001). Pencemaran Udara. Bandung : ITB.

Struciński, P., Piskorska-Pliszczyńska, J., Góralczyk, K., Warenik-Bany, M., Maszewski, S., Czaja K., & Ludwicki JK. (2011). Dioxins And Food Safety. *Roczn PZH*, 62(1), 3–17.

Sumingkrat. (2002). Terbentuknya Dioksin Akibat Reaksi Kimia Pada Proses Pembakaran Dan Dampaknya Bagi Manusia. *Bulletin Penelitian*. Juni 2002. Vol. XXIV. No. 1.

Van den Berg, M., Birnbaum, L. S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Peterson, R. E. (2006). The 2005 World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-Like Compounds. *Toxicological Sciences*, 93(2), 223–241.

Wakiefield. (2008). Public Policy and Retirement Saving Incentives In The United Kingdom. MIT Press (With Woojin Chung, Richard Disney, and Carl Emmerson).

Warlina, Lina, E., Noor, A., Fauzi, Rudi, C., Tarumingkeng, & Sutjahjo, S. H. (2008). Kebijakan Manajemen Lingkungan Untuk Emisi Dioksin/Furan Yang Bersumber Dari Industri Logam. Bogor. *Jurnal Organisasi dan Manajemen*, 4(2).

WHO. (1997). 69 IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Polychlorinated Dibenzo-Para -Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans.

Yoon, C. Y., Park, M., Kim, B. H., Park, J. Y., Park, M. S., Jeong, Y. K., Kwon, H., Jung H. K., Kang, H., Lee, Y. S., & Lee, B. J. (2006). Gene expression profile by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-pdioxin in the liver of wild-type (AhR+/+) and aryl hydrocarbon receptor-deficient (AhR-/-) mice. *J Vet Med Sci*, 68, 663– 668.

Zagris, N., Duprat, A.M., & Durston, A. (1995).  
Organizaton Of The Early Vertebrate Embryo. USA:  
Springer