

## Peranan Choline Esterase (ChE) pada Pembentukan Vesikel Otak Embrio Ayam yang Terpapar Insektisida Karbofuran

**The Role of Choline Esterase on Vesicle Brain Development of Chicken Embryo of Exposure by Carbofuran Insecticide**

**Epy Muhammad Luqman<sup>1</sup>, Bambang Poernomo Soenardirahardjo<sup>1</sup> dan Laba Mahaputra<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Bagian Anatomi Veteriner, <sup>2</sup>Bagian Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga Jl. Muyorejo Surabaya 60115 Telp. 031.5992785 Fax. 031.5993015

email : epy\_fkh@unair.ac.id

### **Abstract**

Carbofuran exposure during embryonic development inhibit ChE and lead to abnormal brain development. This research was aimed to identify the effect of carbofuran exposure to chicken embryo on brain vesicle development during embryonal stage. This research used Randomized Complete design with 3 treatments and repetition with 10 fertile eggs each. Each egg in the control group were injected 0.1 ml NaCl physiologic 0.09%. All of eggs were stored into incubator in 38 °C with 60 – 80 % humidity. Observation to brain vesicle were carried out in 72 hr incubation using whole mounts technique. In 72 hr after incubation, the measurement of ChE concentration were carried out by grinding the brain vesicle and the other eggs adding 0.2 ml sterile NaCl physiologic 0.9% solution. The exposure of carbofuran in degraded dose resulted in the increase ChE which was significantly difference and no significant differences in the formation of brain vesicle in those groups. Increasing ChE concentration caused brain vesicle have responded to carbofuran as toxic agent and subserve growth regulatory and morphogenetic functions in developing embryo. Although carbofuran can promote cholinergic activity evoke neurodevelopmental damage, but brain vesicle resistant to carbofuran as good as adult brain.

**Key words:** Choline Esterase, Chicken Embryo, Carbofuran

### **Pendahuluan**

Pada semua sistem saraf vertebrata dan serangga terdapat pusat-pusat sinaps yang akan mengalirkan sinyal berupa senyawa kimia ke otot maupun atau neuron yang lain. Senyawa kimia tersebut berupa *neurotransmitter* yang disebut dengan asetilkolin (ACh). Asetilkolin yang terbentuk akan segera mengalami hidrolisis oleh kolin esterase (ChE) menjadi kolin dan asam asetat. Peran ChE dimulai sebelum sinaptogenesis pada pembentukan *neural tube* pada ayam (Layer, 1991) dan pembentukan ChE terjadi seiring dengan pertumbuhan akson (Gilbert, 1988). Sistem cholinergik pada awal perkembangan berfungsi sebagai regulasi pertumbuhan dan fungsi morfogenetik (Lauder dan Schambra, 1999) dengan cara mengendalikan proliferasi sel, motilitas, diferensiasi sel dan ekspresi gen (Weiss *et al.*, 1998). Dengan demikian sistem cholinergik sangat berperan

penting dalam perkembangan sel dan penyusunan perkembangan otak (Slotkin, 1999).

Mekanisme kerja *cholinotoxic* seperti insektisida, etanol dan nikotin (selanjutnya disebut dengan anti-ChE) menghambat aktivitas ChE dengan cara mengikat ChE membentuk ikatan kompleks dan menutup reseptor ACh baik reseptor nikotinik (*N-cholinoreceptor*) maupun muskarinik (*M-cholinoreceptor*) (Faiman *et al.*, 1991). Reseptor nikotinik menerima rangsangan ACh dari ujung saraf otot lurik, ganglion saraf autonom dan sedikit SSP, sedang reseptor muskarinik menerima rangsangan ACh dari ujung saraf otot polos, kelenjar eksokrin dan endokrin (Ballantyne dan Marrs, 1992). Penurunan aktivitas ChE menyebabkan terjadi penumpukan ACh pada sinaps dan aliran sinaps akan terganggu, kondisi demikian menyebabkan individu menjadi hipertonik kemudian lumpuh dan mati.

Tiga ensim utama yang dapat diukur untuk mengevaluasi perkembangan embrio ayam seperti 5' nucleotidase (5'NT), choline esterase (ChE) dan alkaline phosphatase (ALP). Abnormalitas perkembangan embrio ayam akan terjadi apabila kadar ke tiga ensim tersebut menurun karena pemaparan teratogen (Martin dan Moses, 1993). Pengukuran kadar ChE lebih sering dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemaparan insektisida dibanding dua ensim yang lain. Sebagian besar insektisida seperti karbofuran mempunyai mekanisme menghambat aktivitas serine esterase (ensim golongan ester) terutama ChE (Ballantyne dan Marrs, 1992; Jin dan Kitos, 1996).

Ayam yang terpapar karbofuran sangat potensial membentuk residu pada kuning telur (*yolk sac*), sedang kuning telur sangat dibutuhkan embrio sebagai sumber nutrisi dalam proses perkembangan. Residu karbofuran dalam kuning telur akan mengganggu tumbuh kembang embrio ayam yang dapat berakibat pada abnormalitas perkembangan. Pada pembentukan vesikel otak embrio ayam sangat diperlukan keberadaan ChE sebagai regulasi pertumbuhan dan fungsi morfogenetik. Bila pemberian ChE terhambat akibat zat *cholinotoxic* seperti insektisida karbofuran, maka akan terjadi hambatan pembentukan vesikel otak. Hambatan pembentukan vesikel otak pada masa embrional akan berdampak pada kelainan struktur dan fungsi otak saat dewasa kelak.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar ChE vesikel otak akibat pemaparan karbofuran pada masa embrional ayam dan peranan kadar ChE tersebut pada pembentukan vesikel otak. Ayam yang digunakan dalam penelitian ini mewakili golongan avian dan burung yang sangat peka terhadap karbofuran. Dengan demikian hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menggambarkan bahaya pencemaran karbofuran terhadap kehidupan predator bukan sasaran karbofuran seperti bangsa burung.

## **Metode Penelitian**

Desain penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 3 (tiga) perlakuan dan ulangan masing-masing 10 telur ayam bertunas (TAB). Perlakuan-perlakuan tersebut meliputi : kontrol, perlakuan dengan dosis pemaparan karbofuran yang disuntikkan dalam kuning telur sebesar fraksi LD<sub>50</sub> dan pendekatan residu yang berpotensi teratogenik. Penelitian ini dilakukan di Bagian Anatomi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga selama 4 (empat) bulan. Populasi penelitian ini adalah TAB umur 1 hari inkubasi sebanyak 300 butir yang didapat dari PT Multibreeder Adirama Indonesia Farm Unit 4, Desa Songsong Kecamatan Singosari Kabupaten Malang.

### **Penentuan Dosis**

Dalam penentuan dosis teratogenik pada ayam ras ini, dilakukan pendekatan pada LD<sub>50</sub> pada ayam sebesar 25 mg/Kg BB dan sifat metabolisme serta farmakokinetik karbofuran pada induk, sehingga hasil yang diperoleh dapat menunjukkan dosis riil pada kondisi lingkungan. Total konsentasi karbofuran yang dapat ditemukan dalam tubuh induk sebesar 91,8% (CEPA, 2000), sehingga potensi karbofuran membentuk residu dalam kuning telur sebesar 8,2%. Dosis teratogenik yang diberikan berdasarkan fraksi-fraksi tersebut yang tidak mematikan embrio ayam dan berpotensi menimbulkan efek tertogenik.

### **Perlakuan dan Pengamatan**

Dosis teratogenik yang digunakan adalah dosis dari dua perlakuan pada penelitian pendahuluan yang mempunyai *survival rate* setelah 10 hari inkubasi mencapai lebih dari 50%. Telur ayam berembrio (TAB) yang akan diberi perlakuan didisinfeksi terlebih dahulu menggunakan alkohol 70% dengan cara *spray*, demikian halnya pada inkubator sebelum digunakan. Pelabelan TAB menurut kelompok perlakuan menggunakan pensil dan TAB dibuat lobang menggunakan bor ukuran diameter 1 mm kemudian dilakukan penyuntikan pada lobang tersebut menggunakan *syringe tuberculin* sesuai dengan kelompok perlakuan. Setelah penyuntikan dilakukan penutupan lobang menggunakan selotip atau parafin cair. Dua kelompok perlakuan dan satu kelompok kontrol (menggunakan larutan NaCl fisiologis 0,9%) disuntikkan dalam kuning telur dengan volume 0,1 ml setiap butir. TAB tersebut kemudian dimasukkan dalam inkubator dengan suhu 38°C dan kelembaban 60-80%.

Pengamatan perkembangan vesikel otak setelah inkubasi 72 jam melalui teknik *whole mounts*. Pada inkubasi 72 jam tersebut dilakukan pengukuran kadar ChE menggunakan metode Knedel (*Diagnostica Merck-Germany*) dengan cara melakukan penggerusan vesikel otak kemudian ditambahkan larutan NaCl fisiologis 0,9% sebanyak 0,2 ml dan siap dilakukan pengukuran.

Untuk mengetahui perbedaan kadar ChE antar kelompok menggunakan analisis varian (ANOVA). Bila terdapat perbedaan antar perlakuan dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT). Hambatan perkembangan vesikel otak menggunakan analisis *nonparametric Chi-square* (Steel dan Torrie, 1993). Untuk memudahkan perhitungan statistik digunakan *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi 10.0.

## **Hasil dan Pembahasan**

### **Penentuan Dosis**

Ayam yang terpapar karbofuran sangat potensial membentuk residu pada kuning telur (*yolk sac*),

sedang kuning telur sangat dibutuhkan embrio sebagai sumber nutrisi dalam proses perkembangan. Pemaparan *carbaril* pada ayam broiler menunjukkan adanya residu pada jaringan dan telur berkisar antara 0,02 hingga 0,06 ppm (Tyl, 1992). Investigasi terhadap insektisida *thiodicarb* pada ayam menunjukkan adanya residu pada *yolk* yang kadarnya lebih tinggi dibanding pada organ hati (FAO dan WHO, 2000). Residu karbofuran dalam kuning telur akan mengganggu tumbuh kembang embrio ayam yang dapat berakibat pada abnormalitas perkembangan saat menetas dan dewasa.

Pada penelitian ini menggunakan pendekatan LD<sub>50</sub> karbofuran pada ayam sebesar 25 mg/Kg (CEPA, 2000). Dalam penelitian pendahuluan didapat fraksi 1/10 dan 1/12 LD<sub>50</sub> (masing-masing sebesar 0,4241 dan 0,3534 mg/butir equivalen dengan karbofuran 0,0127 dan 0,0106 mg/butir) yang mempunyai *survival rate* setelah 10 hari pemaparan mencapai lebih dari 50%. Dosis yang digunakan dalam penelitian utama adalah fraksi 1/8 dan 1/10 LD<sub>50</sub> (0,4241 dan 0,3534 mg/butir Furadan 3G).

#### **Hasil Pengukuran Kadar ChE dalam Otak Embrio Ayam**

Setelah dilakukan pengukuran kadar ChE vesikel otak embrio ayam umur inkubasi 72 jam diperoleh hasil seperti yang tertera dalam Tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil Pengukuran Kadar ChE Dalam Otak Embrio Ayam (U/L)

Kelompok	N	Rentangan	Rata-rata ± SD
P0	10	60 -130	92 ± 22.0101 <sup>b</sup>
P1	10	80 - 200	116 ± 36.2706 <sup>b</sup>
P2	10	120 - 290	190 ± 73.6357 <sup>a</sup>

Keterangan: Superskrip huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ( $p>0,05$ ); P0: Penyuntikan larutan NaCl fisiologis 0,9% steril sebanyak 0,1 ml; P1: Penyuntikan Furadan 3G dengan dosis 0,3534 mg/0,1 ml; P2: Penyuntikan Furadan 3G dengan dosis 0,4241 mg/0,1 ml; UL: Unit perliter

Hasil analisis Kruskal Wallis dan analisis perbandingan berganda diperoleh hasil terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok P2 dengan P1 dan P0, sedang P1 tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Proses neurulasi embrio ayam dimulai pada inkubasi 24 - 33 jam hingga terbentuk *neural tube*, setelah masa inkubasi 48 jam perkembangan otak menjadi 3 vesikel. Setelah 50 - 60 jam inkubasi terjadi pembentukan bagian-bagian SSP seperti otak besar dan otak kecil, *lobus optikus*, *bulbus olfactorius*, *medulla oblongata*, *medulla spinalis*, *infundibulum*, *epiphysis*, *hipotalamus* dan *ventrikel*. Pada inkubasi hari

ke tujuh SSP pada embrio ayam sudah berfungsi seperti halnya pada ayam dewasa.

Hasil pengukuran kadar ChE vesikel otak embrio ayam umur inkubasi 72 jam diperoleh hasil fraksi 1/8 LD<sub>50</sub> berbeda nyata dengan fraksi 1/10 LD<sub>50</sub> dan kontrol (P0), sedang P1 dengan P0 tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemaparan karbofuran pada inkubasi hari ke 0 yang diukur pada inkubasi hari ke 3 menunjukkan peningkatan yang nyata. Pada masa embrional ayam proses pembentukan otak sudah dimulai pada inkubasi hari pertama dan berfungsi sempurna pada inkubasi hari ke 7. Peran ChE dimulai sebelum sinaptogenesis pada pembentukan *neural tube* pada ayam (Layer, 1991) dan pembentukan ChE terjadi seiring dengan pertumbuhan akson (Gilbert, 1988). Sistem *cholinergic* pada awal perkembangan berfungsi sebagai regulasi pertumbuhan dan fungsi morfogenetik (Lauder dan Schambra, 1999) dengan cara menge ndalikan proliferasi sel, motilitas, diferensiasi sel dan ekspresi gen (Weiss *et al.*, 1998). Dengan demikian sistem *cholinergic* sangat berperan penting dalam perkembangan sel dan penyusun perkembangan otak (Slotkin, 1999).

Pemaparan karbofuran pada inkubasi hari ke 0 yang diukur pada inkubasi hari ke 3 belum mencerminkan fungsi karbofuran sebagai anti-ChE yang tidak ditandai dengan penurunan kadar ChE. Penampakan karbofuran sebagai anti-ChE bila dipaparkan pada hari ke 3 atau 4 hingga 6 inkubasi (Kumar dan Devi, 1992) dan diukur pada hari ke 6 - 20 inkubasi (Misawa *et al.*, 1981). Pengukuran ChE otak embrio ayam umur inkubasi hari ke 9 sebesar 0,364 μmoles dan kadar tersebut akan meningkat sesuai dengan umur inkubasi serta akan berhenti bertambah sesaat setelah menetas (Farege-Elawar, 1991).

Peningkatan ChE akibat pemaparan karbofuran disebabkan struktur sinaptogenesis yang masih sederhana dan belum memberikan respon terhadap reaksi hidrolisis *neurotransmitter*. Disamping itu ChE pada awal perkembangan mempunyai peran yang dominan sebagai pengendali proliferasi sel, motilitas, diferensiasi sel dan ekspresi gen daripada bersifat hidrolisis *neurotransmitter* (Weiss *et al.*, 1998; Brimijoin dan Koenigsberger, 1999). Bahkan Bigbee *et al.* (1999) secara tegas menyatakan bahwa ChE sebagai zat hidrolisis tidak diperlukan dalam pertumbuhan neuron.

Pada pemaparan organofosfat *chlorpyrifos* (CPF) dijumpai mekanisme penting mengatur efek toksitas sistemik dengan akibat hiperstimulasi cholinergik. Pemaparan CPF sering digunakan untuk mengamati pengaruh perkembangan neurotoksikan pada fase awal perkembangan termasuk replikasi abnormal dan

kematian sel selama perkembangan *neural tube* (Meyer *et al.*, 2003). *Chlorpyrifos* akan memasuki dinding sel yang mengandung reseptor spesifik membentuk ikatan CPF-reseptor. Ikatan komplek tersebut akan mengaktifkan ensim *adenilsiklase* (AC) yang sebelumnya belum aktif. *Adenilsiklase* akan memasuki sitoplasma untuk mengkatalisasi reaksi perubahan dari adenosin trifosfat (ATP) menjadi siklik adenosin monofosfat (cAMP) yang biasa disebut dengan *second messenger*. Selanjutnya cAMP akan bekerja mengaktifkan ensim proteinkinase dalam sitoplasma dan membentuk ikatan cAMP-proteinkinase regulator yang diikuti dengan sintesa DNA dalam inti. Proses transkripsi oleh RNA-polimerase membentuk mRNA yang akan keluar melalui dinding inti dan masuk dalam sitoplasma menghasilkan ensim ChE (Lu, 1995; Meyer *et al.*, 2003).

*Adenilsiklase* merupakan target dari pemaparan CPF dan pemaparan CPF dapat menginduksi konsentrasi molekul AC yang pada akhirnya dapat meningkatkan produksi ensim ChE (Meyer *et al.*, 2003). Peningkatan ensim terkait dengan upaya pencegahan lebih lanjut terhadap efek keracunan (Lu, 1995) tetapi peningkatan yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan abnormalitas perkembangan (Slotkin, 1999).

Peningkatan ChE otak dan *spinal cord* juga ditunjukkan pada pemaparan etanol inkubasi hari ke 1 sampai 3 (Brodie *et al.*, 1991). Hasil analisis kultur jaringan otak yang dipapar dengan insektisida golongan organofosfat menunjukkan kadar ChE yang berasal dari otak embrio ayam yang masih muda lebih tinggi dibanding ChE yang berasal dari otak embrio ayam sudah menetas (Funk *et al.*, 1994). Perbedaan hasil ditunjukkan pada pemaparan insektisida diazinon pada inkubasi hari ke 3 yang dapat menurunkan aktivitas ChE otak yang diukur pada inkubasi hari ke 6 - 20. Pada inkubasi hari ke 6 - 8 terjadi penurunan ChE sebesar 90% dan pada inkubasi hari ke 10 terjadi penurunan sebesar 50%. Setelah inkubasi hari ke 13 tidak terjadi penurunan lebih lanjut (Misawa *et al.*, 1981).

Hal ini menunjukkan bahwa meskipun sebagian besar mekanisme anti-ChE terhadap SSP sudah dapat dijelaskan, tetapi beberapa riset menyebutkan hal-hal yang kontradiktif dan sulit untuk diinterpretasikan (Lotti, 1992).

#### Jumlah embrio ayam yang mengalami hambatan pembentukan vesikel otak

Setelah dilakukan pembuatan sediaan *whole mount* embrio ayam umur inkubasi 72 jam diperoleh jumlah embrio ayam yang mengalami hambatan pembentukan vesikel otak terutama kelompok P1 sebanyak 1 embrio dan P2 sebanyak 2 embrio,

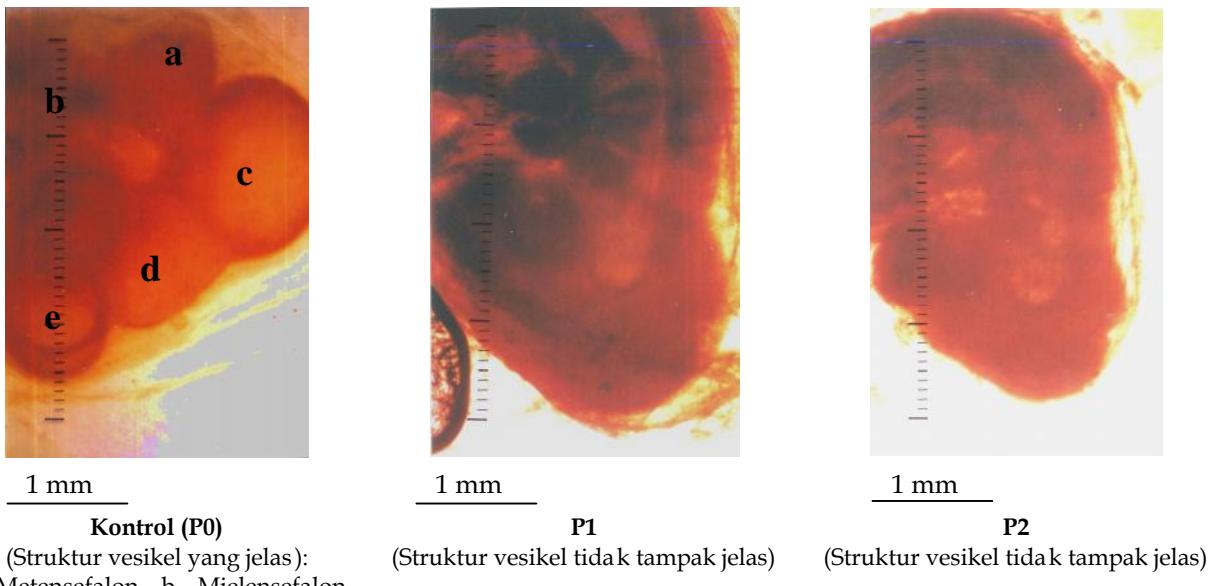
namun tidak terdapat perbedaan yang bermakna setelah dilakukan analisis *nonparametric Chi-square*. Pada masa inkubasi 24 jam sampai 33 jam terbentuk *neural tube* dan setelah masa inkubasi 48 jam terbentuk 3 vesikel otak. Bagian depan disebut *prosencephalon*, bagian tengah disebut *mesencephalon* dan bagian belakang disebut *rhombencephalon*. Ke tiga vesikel otak tersebut berdiferensiasi lagi, prosencephalon menjadi *telencephalon* dan *diencephalon* sedang *rhombencephalon* menjadi *metencephalon* dan *myelencephalon*. Proses diferensiasi tersebut terbentuk sempurna pada inkubasi 72 jam dan selama proses tersebut sangat rentan terhadap gangguan perkembangan bila terpapar zat teratogen.

Karbofuran sebagai anti-ChE sangat potensial mempengaruhi neurogenesis, karena proses transmisi *neurotransmitter* menjadi terganggu. Pada awal perkembangan struktur gen pemberi perintah dan induktor sebagai protein yang merangsang perkembangan organ sangat besar peranannya. Namun setelah terbentuk sistem saraf dan endokrin, peran tersebut mulai berkurang.

Pada pengukuran kadar ChE akibat pemaparan karbofuran tidak terjadi penurunan yang bermakna dan setelah dilakukan pembuatan sediaan *whole mount* embrio ayam umur inkubasi 72 jam diperoleh persentase abnormalitas pembentukan vesikel otak yang tidak bermakna antar perlakuan ( $p > 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa meski umumnya insektisida bersifat anti-ChE dan berpotensi menghambat perkembangan otak, beberapa riset menyebutkan bahwa otak janin juga mempunyai daya tahan terhadap zat teratogen serta mempunyai kerentanan yang tidak berbeda dengan otak dewasa (Lassiter *et al.*, 1999).

Pemaparan insektisida *thiodicarb* sebesar 3000 ppm (equivalen dengan 180 mg/Kg) tidak bersifat teratogenik seperti menginduksi keterlambatan neurogenesis (FAO dan WHO, 2000). Disamping itu karbamat kurang dapat menembus barier pembuluh darah otak dibanding golongan organofosfat sehingga sedikit sekali berpengaruh terhadap SSP (Ballantyne dan Marrs, 1992).

Meskipun tidak menunjukkan pengaruh terhadap pembentukan vesikel otak embrio ayam, dari hasil penelitian tersebut menunjukkan peningkatan kejadian abnormalitas seiring dengan peningkatan dosis yang dipaparkan. Dengan demikian karbamat secara alami pada kasus akut dan temporer sebagai anti-ChE kurang berpengaruh terhadap perkembangan SSP, tetapi perkembangan sistem menjadi pertimbangan terhadap kerentanan saat perkembangan dibanding sistem yang telah sempurna dan mempengaruhi waktu kritis yang dapat menghasilkan efek abnormalitas yang permanen (Tyl, 1992).



**Gambar 1.** Perkembangan vesikel otak embrio ayam antar kelompok (pembesaran 400X). Keterangan: perkembangan vesikel otak embrio ayam antar kelompok P0 : Penyuntikan larutan NaCl fisiologis 0,9% steril sebanyak 0,1 ml; P1 : Penyuntikan Furadan 3G dengan dosis 0,3534 mg/0,1 ml; P2 : Penyuntikan Furadan 3G dengan dosis 0,4241 mg/0,1 ml .

## Kesimpulan

Peningkatan kadar ChE disebabkan sebagai respon vesikel otak terhadap keberadaan bahan toksik (karbofurran) dari pada fungsi ChE sebagai regulasi pertumbuhan dan fungsi morfogenetik pada awal perkembangan embrio. Meski karbofurran bersifat anti-ChE dan berpotensi menghambat perkembangan otak, namun otak janin juga mempunyai daya tahan terhadap zat teratogen serta mempunyai kerentanan yang tidak berbeda dengan otak dewasa.

## Ucapan Terima kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Pemerintah Republik Indonesia melalui Tim Managemen Program Doktor (TMPD) yang telah memberikan bantuan finasial sehingga dapat diselesaikan penelitian ini dan dapat dipublikasikan.

## Daftar Pustaka

- Alvares AP. 1992. Pharmacology and toxicology of carbamates. In: *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphat and Carbamates*. Ballantyne B. and T. C. Marrs (ed). Butterworth-Heinemann Ltd. Oxford.

Ballantyne B, and Marrs TC. 1992. Overview of the biological and clinical aspects of organophosphat and carbamates. In: *Clinical and experimental toxicology of organophosphat and carbamates*. Ballantyne B, and Marrs TC (ed). Butterworth-Heinemann Ltd. Oxford.

Bigbee JW, Sharma KV, Gupta JJ, and Dupree JL. 1999. Morphogenic role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. Environ. Health Perspect. 107 (S1) : 81-87.

Brimijoin S, and Koenigsberger C. 1999. Cholinesterases in neural development: new findings and toxicologic implications. Environ. Health Perspect. 107 (S1).

Brodie C, Kentroti S, and Varnadakis A. 1991. Growth factors attenuate the cholinotoxic effects of ethanol during early neuroembryogenesis in the chick embryo. Int. J. Dev Neurosci. 9 (3): 203-213.

California Environmental Protection Agency, 2000. Carbofurran. Public Health Goals for Chemicals in Drinking Water. California Environmental Protection Agency. Sacramento. California

- Faiman MD, Chu F, Hart BW, and Kitos PA. 1991. Covalent binding of chick embryo proteins by the alkylthiocarbamate molinate. *Toxicologist*. 11(1): 73 [Abstract].
- Farege-Elawar M. 1991. Development of esterase activities in the chick embryo and chicken. *Toxicologist*. 11(1): 81 [Abstract].
- FAO and WHO. 2000. Thiodicarb. Pesticide residues in food. Toxicology evaluations. FAO and WHO working groups. Food and Agriculture Organization and World Health Organization. United Nation Organization. United Nation Organization. Geneva - Switzerland.
- Funk KA, Liu CH, Wilson BW, and Higgins RJ. 1994. Avian embryonic brain reaggregate culture system: Characterization for organophosphorus compound toxicity studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 124 (1).
- Gilbert S. 1988. Developmental Biology. 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer Associates. Massachusetts.
- Jin O, and Kitos P. 1996. Teratogenic synergy between a thiocarbamate herbicide and an organophosphorus insecticide. *Faseb. J.* 10(3): 792 [Abstract].
- Kumar KBS, and Devi KS. 1992. Teratogenic effects of methyl parathion in developing chick embryos. *Vet and Human Toxicol.* 34(5): 408-410.
- Layer PG. 1991. Choline esterase during development of the avian nervous system. *Cell Mol Neurobiol.* 11:7-13
- Lauder JM, and Schambra UB. 1999. Morphogenetic roles of acetylcholine. *Environ. Health Perspect.* 107 (S1): 65-69.
- Lassiter TL, Hunter DL, Chanda SM, Das K, Haykal-Coates N, Marshall RS, Barone S Jr, and Padilla S. 1999. Is the fetal brain protected from gestational exposure to chlorpyrifos?. *Neurotoxicology*. 20(1): 261. [Abstract].
- Lotti M. 1992. Central neurotoxicity and behavioural effects of anticholinesterases. In: *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. Ballantyne B. and T. C. Marrs (ed). Butterworth-Heinemann Ltd. Oxford
- Lu FC. 1995. Toksikologi Dasar. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Martin AH, and Moses GC. 1993. Magnetic field effects on 5'nucleotidase: acetylcholinesterase and alkaline phosphatase in developing chick embryos. *Teratology* 48(2): 316 [Abstract].
- Meyer A, Seidler FJ, Cousins MM, and Slotkin TA. 2003. Developmental neurotoxicity elicited by gestational exposure to chlorpyrifos: When is anenyl cyclase a target?. *Environ Health Perspect* 111: 1871-1876.
- Misawa M, Doull J, Kitos PA, and Uyeki EM. 1981. Teratogenic effects of cholinergic insecticides in chick embryos.. Diazinon treatment on acetylcholinesterase and choline acetyltransferase activities. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 57(1): 20-29.
- Soenardirahardjo BP, Widjiati, Mafruchati M, Luqman EM, Masithah ED dan Mukti AT. 2007. Penuntun Embriologi. Pustaka Melati. Surabaya. 159 - 164.
- Slotkin TA. 1999. Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Environ. Health Perspect.* 107 (S1): 71-80
- Steel RGD and Torrie JH. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. PT Gramedia. Pustaka Utama.
- Tyl RW. 1992. Development and reproductive toxicity of anticholinesterases. In: *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. Ballantyne B. and T. C. Marrs (ed). Butterworth-Heinemann Ltd. Oxford.
- Weiss ER, Maness P, and Launder JM. 1998. Why do neurotransmitters act like growth factors?. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 5(4): 323-335.