

Potensi Mycotoxin Binders Terhadap Gambaran Histopatologi Neoplasia Kelenjar *Mammæ* Mencit (*Mus musculus*) Bunting yang Terpapar Zearalenon

Potential Mycotoxin Binders on Histopathology of the Mammary Gland Experiencing Neoplasia in Pregnant Mice (*Mus musculus*) with Exposed Zearalenone

¹Muhammad Thohawi Elziyad Purnama, ²Abdul Samik

¹Program Studi Magister Ilmu Biologi Reproduksi

²Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : elziyad_9@yahoo.com

Abstract

Zearalenone is a resorcylic acid lactone compound that is produced by fungal *Fusarium graminearum* infection of edible grains and is believed to influence reproduction by binding to estrogen receptors. In order to study the potential estrogenic effect of this compound in the mammary gland, we examined the potential of mycotoxin binders to eliminate the effect of zearalenone on the expression of histopathology of the mammary gland experiencing neoplasia in pregnant mice (*Mus musculus*). We analyzed 20 pregnant mice specimens randomly divided into 5 groups. All groups were given treatment per oral with sonde till 10 days. K+ as positive control weren't treated zearalenone and mycotoxin binders, K- as negative control were treated with zearalenone 0,1 mg/mice/day, P1 were treated with zearalenone 0,1 mg/mice/day and mycotoxin binders 0,5 mg/mice/day, P2 were treated with zearalenone 0,1 mg/mice/day and mycotoxin binders 1 mg/mice/day, P3 were treated with zearalenone 0,1 mg/mice/day and mycotoxin binders 2 mg/mice/day. The data was compared by ANOVA and to compare the mean differences among treatments tested by Duncan's multiple range test. The result showed that the amount of grade in neoplasia had a significant difference ($p < 0,05$) between K+, P2, P3 with P1 and K-. The conclusion in this study, mycotoxin binders 1 mg/mice/days is minimumdose to eliminate zearalenone effect.

Keywords: Mycotoxin binders, Zearalenone, Neoplasia, Mammary gland, Pregnant mice

Pendahuluan

Pertanian merupakan salah satu bidang yang mendominasi komoditas perekonomian global dan menyediakan bahan pakan berkualitas tinggi untuk memenuhi kebutuhan seiring bertambahnya laju populasi ternak di seluruh dunia. Laju produksi bahan pakan sangat bergantung terhadap adanya bahan baku pakan

yang siap diolah untuk dikemas di industri pakan serta disalurkan melalui lalu lintas perdagangan. FAO memperkirakan bahwa 25% tanaman yang menjadi bahan pakan ternak di seluruh dunia terkontaminasi mikotoksin yang mengakibatkan kerugian ekonomi dan penurunan produktivitas ternak (FAO, 2007).

Jagung merupakan bahan pakan berenergi tinggi tetapi mengandung protein yang relatif rendah jika dibandingkan dengan biji-bijian pakan yang lain. Jagung mengandung kadar protein sekitar 8,6-9,0%. Protein jagung tidak difermentasi atau didegradasi oleh mikroorganisme rumen, melainkan dicerna dan diabsorpsi di usus halus sebagai *bypass protein* (Lardy, 2013).

Zearalenon merupakan mikotoksin estrogen alami karena dibiosintesis oleh jamur *Fusarium graminearum* (Frizzell *et al.*, 2011). Jamur *Fusarium graminearum* biasanya terdapat pada jagung, sereal, oat, dan jerami. *Fusarium graminearum* bersifat seperti *phytoestrogen* yang dapat meningkatkan kadar hormon estrogen sehingga memicu terjadinya gangguan siklus birahi (Nikov *et al.*, 2000).

Hormon estrogen saat hewan bunting berfungsi untuk menjaga elastisitas dinding endometrium pasca implantasi dan mempengaruhi pertumbuhan sel-sel epitel kelenjar mammae sebagai persiapan masa laktasi. Zearalenon memiliki struktur *resorcylic acid lactone* yang dapat menembus membran sel untuk mengikat reseptor estrogen (E_2) di dalam sitosol dan membentuk *Zearalenone E_2 Receptor Complex* (ZEA- E_2 R). Kompleks ini akan ditransfer menuju inti sel dan mengikat reseptor estrogen spesifik di inti sel yang akan mengaktifkan respon mRNA yang biasanya diperankan oleh reseptor estrogen (E_2) (Frizzell *et al.*, 2011).

Zearalenon juga dimetabolisme di hati dengan enzim dehidrogenase hidroksisteroid yang diubah menjadi dua isomer metabolit, yakni α Zearalenol dan β Zearalenol. Kedua isomer ini yang dapat bekerja mengikat reseptor estrogen (E_2) dan meningkatkan kadar estrogen disebut hiperestrogenisme. Keberadaan α Zearalenol dan β Zearalenol berlebihan dalam darah dapat berdampak proliferasi sel yang tidak terkendali sehingga memacu terjadi karsinogenik (Malekinejad *et al.*, 2005; Fink-Gremmels, 2008; Frizzell *et al.*, 2011).

Estrogen bersifat lipofilik sehingga dapat dengan mudah menembus lapisan lipid bilayer. Mitokondria bertindak sebagai organel utama dalam mengontrol sintesis hormon steroid sehingga akan mengalami gangguan homeostasis apabila terdapat perpindahan estrogen eksogen yang dibiosintesis dari mikotoksin zearalenon (Frizzell *et al.*, 2011).

Mycotoxin binders mengandung bahan yang berpotensi besar untuk diserap seperti karbon aktif aluminosilikat, selulosa, polisakarida, peptidoglikan, dan polimer sintetis seperti cholestyramine, polivinilpirolidon beserta turunannya (Avantaggiato *et al.*, 2005). Mekanisme kerja *mycotoxin binders* dengan mengeliminasi gugus metil pada struktur kimia zearalenon serta memunculkan senyawa *charcoal*. *Mycotoxin binders* mengandung biotin, tiamin, aluminosilikat, serta vitamin C dan E yang bersifat antioksidan untuk menurunkan dampak paparan dari residu mikotoksin sebelum dimetabolisme tubuh (Doll *et al.*, 2004).

Materi dan Metode Penelitian

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di kandang hewan coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Pembuatan preparat histopatologi kelenjar mammae dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penelitian ini dimulai pada bulan Desember 2013 sampai Januari 2014.

Bahan dan Alat Penelitian

Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) betina sebanyak 20 ekor, umur 8 minggu dengan berat badan berkisar antara 18-35 gram dengan ciri-ciri bulu halus, mata bersinar, tidak pincang, tidak ada bekas luka dan belum pernah digunakan untuk penelitian lain lalu dikawinkan dengan mencit (*Mus musculus*) jantan yang sehat.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini : Zearalenon[®] (Tocris Bioscience), *Mycotoxin Binders*, hormon PMSG 100 IU dan HCG 100 IU untuk sinkronisasi birahi dan superovulasi, pakan mencit pellet 511, air minum, kloroform untuk pembiusan, buffer formalin untuk fiksasi, reagen untuk pembuatan histopatologi yakni alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, xylol, parafin, canada balsam, serta pewarnaan HE.

Alat yang digunakan pada penelitian ini yakni, jarum sonde lambung dan spuit Terumo syringe[®], termometer, gelas ukur, erlenmeyer, timbangan digital, pipet Vinmed[®], higrometer BG365[®], *Dissecting set* Onemed[®], papan seksi, *cotton buds*, kandang hewan coba, tempat pakan dan minum, *object glass*, *cover glass*, mikroskop Olympus[®] CX-41.

Prosedur Pengawinan Mencit

Mencit merupakan hewan poliestrus, artinya dalam satu tahapan dapat beberapa kali mengalami birahi, kecuali dalam keadaan bunting. Penelitian ini menggunakan *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) dan *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG) untuk superovulasi. PMSG diberikan secara subkutan sebanyak 5 IU kemudian HCG diberikan sebanyak 5 IU 48 jam setelah pemberian PMSG (Mustofa dkk., 2013).

Mencit dikawinkan sesuai kelompok perlakuan dengan cara dikumpulkan dengan satu mencit jantan dalam satu kandang (*personal mating*). Mencit betina yang sudah kawin bisa diketahui dengan memeriksa sumbat vagina (*vaginal plug*) pada 17 jam sesudah penyuntikan HCG. Sumbat vagina terdiri dari gelatin yang sudah menggumpal dan berfungsi agar spermatozoa tidak tumpah keluar. Apabila terdapat sumbat vagina maka dianggap kopulasi telah terjadi dan pada saat itu dianggap kebuntingan hari ke nol.

Prosedur Pemberian *Mycotoxin Binders* dan Zearalenon

Sebanyak 20 ekor mencit dibagi secara random ke dalam lima kelompok perlakuan sehingga masing-masing perlakuan terdapat empat ulangan. Rincian perlakuan adalah sebagai berikut :

K⁺ : tanpa diberi mycotoxin binders dan zearalenon

K⁻ : hanya diberi zearalenon dosis 0,1 mg/ekor/hari

- P1 : diberi dosis zearalenon 0,1 mg/ekor/hari dan mycotoxin binders 0,5 mg/ekor/hari
P2 : diberi dosis zearalenon 0,1 mg/ekor/hari dan mycotoxin binders 1 mg/ekor/hari
P3 : diberi dosis zearalenon 0,1 mg/ekor/hari dan mycotoxin binders 2 mg/ekor/hari

Perlakuan dilakukan secara per oral dengan sonde selama 10 hari. Pada hari ke 11 mencit dibedah dan diambil kelenjar mammae untuk dibuat sediaan histopatologi.

Prosedur Skoring

Characteristic	Score		
1. Tubule formation	1	2	3
2. Hyperchromatism and mitoses	1	2	3
3. Irregular size and shape of nuclei	1	2	3

Scoring

1. Tubule formation: 1 point if the section has well-marked tubule formation and 3 points if there are very few or no tubules
2. Hyperchromatism and mitoses: 1 point if only an occasional hyperchromatic or mitotic figure per high-power field is seen, 2 points if there are two or three such figures and 3 points if the number is higher
3. Irregular size and shape of nuclei: 1 point if the nuclei are fairly uniform in size, shape, and staining and 3 points if plemorphism is marked.

Total Score	Grade of Malignancy
3-5	I
6-7	II
8-9	III

There is no grading system for mammary sarcomas.

(Sumber : Misdorp, 2002)

Analisis Data

Hasil rata-rata jumlah skoring grade neoplasia dianggap sebagai data yang didapat dan diuji homogenitas dengan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Jika data homogen akan dilakukan analisis parametrik menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) satu arah atau *one way ANOVA* dan bila berbeda nyata ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test*. Jika data tidak homogen akan dilakukan analisis non-parametrik menggunakan Uji *Kruskal-Wallis* dan bila berbeda nyata ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan Uji *Mann-Whitney*. Seluruh proses analisis dikerjakan dengan program SPSS 20 for Windows (Kusriningrum, 2008).

Hasil dan Pembahasan

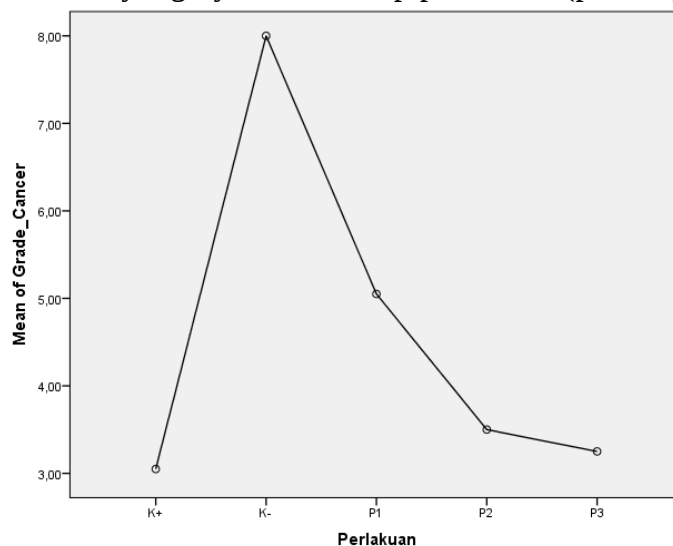
Dari hasil analisis statistik dengan uji homogenitas Kolmogorov-Smirnov didapatkan hasil signifikansi ($p > 0,05$) yang artinya bahwa data homogen dan terdistribusi normal sehingga analisis selanjutnya menggunakan uji ANOVA.

Pada uji ANOVA untuk nilai grade dari neoplasia berdasarkan skoring tubulus asiner, jumlah mitosis dan pleomorfisme nukleus menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) antara tiap kelompok K+, K-, P1, P2, dan P3. Hasil tersebut dilanjutkan dengan Duncan's multiple range test, dan dapat dilihat pada tabel sebagai berikut :

Tabel 1. Mean Grade Neoplasia Kelenjar Mammae pada Semua Kelompok Perlakuan

Perlakuan	Mean $\pm$ SD
K+	3,05 ^a $\pm$ 0,100
K-	8,00 ^c $\pm$ 0,231
P1	5,05 ^b $\pm$ 0,379
P2	3,50 ^a $\pm$ 0,258
P3	3,25 ^a $\pm$ 0,379

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata antar tiap perlakuan ($p < 0,05$)



Gambar 1. Means Plot Grade Neoplasia Kelenjar Mammae pada Semua Kelompok Perlakuan

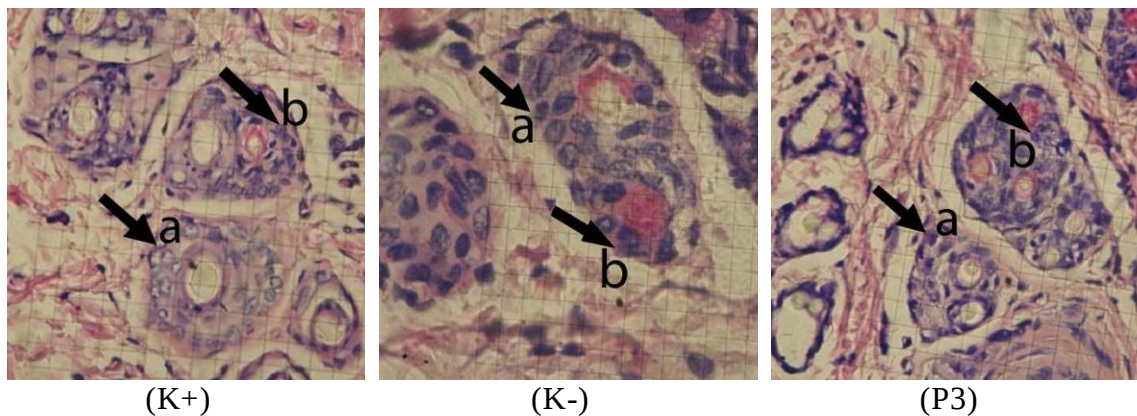
Grade III neoplasia kelenjar mammae terjadi pada K- ($8,00^c \pm 0,231$), menunjukkan kejadian neoplasia terjadi pada kelenjar mammae mencit (*Mus musculus*) bunting yang telah dipapar zearalenon. Zearalenon merupakan agen onkogenik yang berasal dari fitoestrogen. Zearalenon yang dimetabolisme di hati dengan enzim dehidrogenase hidroksisteroid akan memunculkan senyawa metabolit α Zearalenol dan β Zearalenol yang sangat reaktif. Senyawa ini selain dapat berikatan dengan reseptor estrogen membentuk *Zearalenon E₂ Receptor Complex* (ZEA-E₂R) juga dapat menginisiasi metastasis sel-sel epitel kelenjar mammae (Weng, 2012).

Keberadaan metabolit α Zearalenol dan β Zearalenol dapat menghambat pengaturan pembelahan sel yang diperankan oleh *Cyclin Dependent Kinase* (CDK). CDK yang tidak aktif akan menurunkan performa protein retinoblastoma (pRb) yang bertindak sebagai pengatur proliferasi sel dan akan merusak mekanisme transkripsi DNA. Kerusakan transkripsi DNA dari protein pRb, dapat

menimbulkan mutasi dari gen Rb yang bertindak sebagai *master brake* sehingga proliferasi sel pada siklus replikasi sel (G1-Sintesis) tidak dapat terkendali (Price dan Wilson, 2006).

Efek endogenus reseptor estrogen (ER), progesteron (PR), prolaktin (PRL-R), dan *Epidermal Growth Factors* (EGF-R) yang berlebihan dapat berdampak pada regulasi *Growth Hormon* (GH). Hiperestrogenisme menimbulkan negatif efek pada peningkatan produksi GH di hipofisis. GH dapat berakibat imunoreaktif dengan meningkatkan pertumbuhan sel epitel kelenjar mammae. Peningkatan sel epitel kelenjar mammae merupakan indikasi adanya metastasis serta hiperkromatisasi dan mitosis nukleus (Misdorp, 2002).

Grade I neoplasia dapat dilihat pada K+ ($3,05^a \pm 0,100$), P2 ($3,50^a \pm 0,258$) dan P3 ($3,25^a \pm 0,379$) dengan gambaran optimal pada P2. Hasil tersebut menunjukkan bahwa *mycotoxin binders* secara efektif dapat menurunkan efek yang ditimbulkan zearalenon pada dosis 1 mg/ekor/hari. *Mycotoxin binders* mengandung bahan yang berpotensi besar untuk diserap termasuk karbon aktif aluminosilikat, selulosa, polisakarida, peptidoglikan, dan polimer sintetis seperti cholestyramine, polivinilpirolidon beserta turunannya (Avantaggiato *et al.*, 2005).



Gambar 2. Gambaran Grade Neoplasia Kelenjar Mammae

Keterangan : (K+) a. Uniform nucleus, b. Lower mitosis; (K-) a. Pleomorphism nucleus, b. Higher mitosis; (P3) a. Uniform nucleus, b. Lower mitosis (HE; 1000x)

Evaluasi mekanisme kerja *mycotoxin binders* telah dilakukan dengan metode *in vivo* maupun *in vitro*. Metode *in vitro* menunjukkan gambaran tentang afinitas ikatan dan kapasitas terhadap mikotoksin. Metode *in vitro* juga bertindak sebagai uji biologis untuk mengukur residu bahan kimia di jaringan serta mengetahui efektivitas ikatan *mycotoxin binders* (Bailey *et al.*, 1998).

Doll *et al.* (2004) menjelaskan mekanisme kerja *mycotoxin binders* dengan mengeliminasi gugus metil pada struktur kimia zearalenon serta memunculkan senyawa charcoal, biotin, tiamin, aluminosilikat, serta vitamin C dan E yang bersifat antioksidan untuk menurunkan dampak paparan dari residu mikotoksin sebelum dimetabolisme tubuh. *Mycotoxin binders* juga dilengkapi dengan bahan dekontaminan yang bermanfaat dalam memperbaiki kondisi hewan (Whitlow dan Hagler, 2005).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis data dan rangkaian pembahasan yang telah diuraikan, dapat disimpulkan bahwa *mycotoxin binders* dosis 1 mg/ekor/hari merupakan dosis efektif minimal yang dapat mengeliminasi paparan zearalenon pada kasus neoplasia kelenjar mammae.

Daftar Pustaka

- Avantaggiato, G., M. Solfrizzo, and A. Visconti. 2005. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*. 22:379–388.
- Bailey, R.H., L.F. Kubena, R.B. Harvey, S.A. Buckley, and G.E., Rottinghaus. 1998. Efficacy of various inorganic sorbents to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. *Poult. Sci.* 77:1623-1630
- Döll, S., S., Dänicke, H., Valenta, and G., Flachowsky. 2004. In vitro studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. *Arch. Anim. Nutr.* 58:311-324
- Fink-Gremmels, J. 2008. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *J. Vet.* 176 (1): 84-92.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2007. Strengthening National Food Control Systems. A quick guide to assess capacity building needs. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/0010/a1142e/a1142e00.pdf>
- Frizzell, C., D. Ndossi, S. Verhaegen, E. Dahl, G. Eriksen, M. Srrlie, E. Ropstad, M. Muller, C.T. Elliott and L., Connolly. 2011. Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicol Lett* 206: 210-217.
- Kusriningrum, R.S. 2008. Perancangan Percobaan. Airlangga University Press. Surabaya.
- Lardy, G. 2013. Feeding Corn to Beef Cattle. Department Head Animal Sciences. North Dakota State University. Fargo. North Dakota.
- Malekinejad, H., R.F. Mass-Bakker and J. Fink-Gremmels. 2005. Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. In *Vet Research*, 36 (5-6): 799-810.
- Misdorp, W. 2002. An Overview of Cancer Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *Book of Tumor in Domestic Animals*. 4th Ed. Page 575-578
- Mustofa, I., L. Mahaputra, Y.P. Dachlan, dan F.A. Rantam. 2013. Eksplorasi Potensi Imunokontraseptif gZP3. Airlangga University Press dengan LP3 Unair. Surabaya. Hal : 33-34
- Nikov, G.N., N.E., Hopkins, S., Boue, and W.L., Alworth. 2000. Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. *Environ. Health Perspect.* 108, 867 – 872.
- Price A.S., and L.M. Wilson. 2006. *Patofisiologi : Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Ed 6. Penerbit Buku Kedokteran. EGC. 139-162

- Weng, D., J.H. Penzner, B. Song, S. Koido, S.K. Calderwood, and J. Gong. 2012. Metastasis is an early event in mouse mammary carcinomas and is associated with cells bearing stem cell markers. Department of Medicine. Boston. University of School Medicine. USA. *J. Breast Cancer Research*. 14:R18
- Whitlow, L.W. and W.M. Hagler, Jr. 2005. Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs* 77 (38):9-79.