

KONSENTRASI METALOTIONEIN DALAM HATI AYAM YANG DIBERI PAKAN MENGANDUNG KADMIUM (Cd)

DARMONO¹, Z. ARIFIN¹, M.B. PURWADIKARTA¹, A. SAFUAN¹ dan U. WAZNAH²

¹Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E.Martadinata 30, P.O. Box 151 Bogor 16114.

²Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila
Jalan Borobudur 7, Jakarta 10320.

(Diterima dewan redaksi 11 Agustus 2000)

ABSTRACT

DARMONO, Z. ARIFIN, M.B. PURWADIKARTA, A. SAFUAN and U. WAZNAH. 2000. Concentration of metallothionein in the liver of chicken which were given cadmium (Cd) into their feed. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5 (4): 250-254.

Metallothionein is a metal-binding protein which always detected in the liver of chicken, especially essential element binding protein such as Zn-thionein. Zinc binding protein is usually used for enzyme activity in normal physiology of the animal. The aim of this study was to detect the effect of Cd given into feed on Zn-thionein contain in the liver of broiler chicken. Forty-five broiler chicken were divided into three groups, which was 15 animals in each group. Group 1 as a control group, Group 2 was given 100 mgCd/kg of feed, and group 3 was given 200 mgCd/kg of feed respectively. Body weight of five chicken per group were measured every day and liver samples of five animals per group were collected at day 7, 14 and 21 after treatment respectively for analysis of Cd and Zn total concentrations and Cd and Zn binding protein. The result indicated that body weight of chicken in the treatment groups were lower than the control group. Zinc binding protein was highest in the control group after 21 days of treatment (2.35 ug/g), but it was low in the two treatment groups were 1.30 and 0.64 ug/g respectively, in which Cd-thionein was formed. On the other hand total Zn concentration were almost similar between treatment, 20.95 ug/g for the control group and 21.24 ug/g for group 2, and 25.37 ug/g for group 3 respectively ($P>0.05$). It can be concluded that Cd contamination in feed can cause decreased of Zn-thionein within 21 days of treatment, causing retardation of the animals.

Key words: Cadmium, zinc, metallothionein, liver, chicken, feed

ABSTRAK

DARMONO, Z. ARIFIN, M.B. PURWADIKARTA, A. SAFUAN, dan U. WAZNAH. 2000. Konsentrasi metalotionein dalam hati ayam yang diberi pakan mengandung kadmium (Cd). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5(4): 250-254.

Metalotionein adalah logam yang terikat protein yang selalu ditemukan dalam hati ayam, terutama ikatan logam esensial dengan protein seperti Zn-tionein. Ikatan Zn dengan protein tersebut digunakan untuk aktivitas kerja sistem enzim sehingga enzim dapat berfungsi normal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian Cd dalam pakan terhadap kandungan Zn-tionein dalam hati ayam pedaging. Sebanyak 45 ekor ayam pedaging dibagi menjadi tiga kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 15 ekor. Kelompok 1 sebagai kontrol, Kelompok 2 diberi 100mgCd/kg pakan dan kelompok 3 diberi 200 mgCd/kg pakan. Bobot badan 5 ekor ayam per kelompok ditimbang setiap hari dan pengambilan sampel hati dilakukan pada hari ke-7, -14 dan -21 hari setelah perlakuan untuk di analisis kandungan Cd dan Zn total serta Cd dan Zn yang terikat protein. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bobot ayam yang diberi pakan mengandung Cd lebih rendah daripada ayam kontrol. Kandungan Zn-tionein pada ayam kontrol setelah 21 hari perlakuan terlihat tinggi (4,19 ug/g), tetapi rendah pada ayam perlakuan (kelompok 2 dan 3 masing-masing 1,30 dan 0,64 ug/g) yang dalam hal ini Cd-tionein telah terbentuk. Sementara itu, kandungan total Zn dalam hati setelah 21 hari perlakuan terlihat tidak jauh berbeda ($P>0,05$) yaitu masing-masing kelompok 1, 2 dan 3 adalah 20,95, 21,24 dan 25,37 ug/g. Hal tersebut menunjukkan bahwa pakan yang terkontaminasi Cd dapat menurunkan kandungan Zn-tionein dalam waktu 21 hari setelah perlakuan yang mengakibatkan hambatan pertumbuhan pada ayam.

Kata kunci: Kadmium, seng, metalotionein, hati, ayam, pakan

PENDAHULUAN

Metalotionein (Mt) ialah suatu senyawa ikatan antara logam dan protein yang biasanya mempunyai

bobot molekul yang rendah. Metalotionein selalu ditemukan dalam jaringan tubuh terutama hati dan ginjal dan secara normal ditemukan jenis ikatan antara logam esensial dan protein seperti Zn-tionein (GARVEY *et al.* 1982). Protein yang mengikat Zn

tersebut ditemukan dalam beberapa jaringan dan berfungsi sebagai homeostasis, sedangkan Zn yang terikat sistem enzim berfungsi dalam sistem metabolisme normal tubuh (GILLARD and LAURIE, 1992). Defisiensi unsur esensial Zn selain dapat mengganggu aktivitas sistem enzim tersebut juga dapat mengganggu syaraf yang berupa gangguan neuropsikologik (SANDSTEAD, 2000) dan perkembangan syaraf sentral (SANDSTEAD *et al.*, 2000). Defisiensi Zn dapat terjadi karena kurangnya intake pakan yang mengandung Zn atau dapat juga karena penyebab lain seperti masuknya unsur lain yang berinteraksi dengan Zn seperti Cd yang bersifat toksik.

Apabila pakan ayam tercemar Cd, maka Cd yang masuk kedalam tubuh akan mempengaruhi bentuk ikatan Zn-tionein tersebut, karena Cd juga berpotensi berikatan dengan protein sebagai Cd-tionein (GOERING and KLAASSEN, 1984). Kadmium yang terikat oleh enzim yang merupakan protein juga, dapat menurunkan kadar glutathione peroksidase dalam hati (STRUBEL T *et al.*, 1996), tetapi dilain pihak dapat meningkatkan kandungan beberapa jenis enzim dalam hati sebagai indikator adanya kerusakan sel hati, karena enzim tersebut tidak dapat diekskresikan (DUDLEY *et al.*, 1982). Diduga Cd dapat mengambil ikatan Zn dalam enzim sehingga sistem kerja enzim terhambat (MIYAHARA *et al.*, 1983). Hal tersebut mungkin dapat menyebabkan gangguan sistem metabolisme tubuh sebagai akibat tidak efisiennya penggunaan unsur nutrisi yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan (DARMONO *et al.*, 1996). Di samping itu, kondisi hewan akan melemah dan peka terhadap infeksi penyakit (KOLLER, 1980).

Hampir semua logam mikro baik esensial seperti Zn maupun non-esensial seperti Cd, dalam jaringan dapat terikat dengan protein ataupun dalam bentuk ion. Dalam penelitian ini akan diukur kandungan total Cd dan Zn serta kandungan kedua logam tersebut yang terikat protein sebagai metalotionein. Dari hasil penelitian ini akan diperoleh gambaran seberapa besar pengaruh logam toksik Cd terhadap logam esensial Zn, yang dalam sistem ikatan dengan protein, ikatan Zn-protein sangat berperan dalam sistem metabolisme tubuh.

MATERI DAN METODE

Hewan percobaan

Sebanyak 45 ekor ayam pedaging galur shaver Starbro umur satu hari (Cargill, Bogor), dibagi menjadi tiga kelompok masing-masing kelompok terdiri atas 15 ekor. Ayam diadaptasikan selama 7 hari diberi pakan starter yang dianalisis tidak mengandung Cd. Setelah di adaptasi ayam diberi perlakuan sebagai berikut: Kelompok 1 digunakan sebagai kontrol, Kelompok 2

diberi pakan mengandung 100mgCd/kg pakan dan Kelompok 3 diberi pakan mengandung 200mgCd/kg pakan dalam bentuk CdCl₂.H₂O (Merck German). Bobot badan ayam diukur setiap hari masing-masing 5 ekor per kelompok, sedangkan sampel hati diambil dengan memotong ayam 5 ekor per kelompok setiap 7, 14 dan 21 hari setelah perlakuan dan disimpan dalam lemari pendingin -20°C sampai tiba saatnya dianalisis.

Analisis metalotionein

Gelambir kiri (lobus sinister) dari hati (-5g) dicairkan pada suhu kamar, kemudian digerus dihaluskan dalam lumpang porselein, dihomogenkan dengan 20 ml sukrose 0,5M (Merek, German). Sampel homogenat diputar pada 4.000 rpm selama 1 jam pada suhu 4°C, kemudian supernatan diambil, diputar lagi pada kecepatan 32.000 rpm selama 1 jam pada suhu 4°C. Sebanyak 5 ml alikuot dari supernatan di lewatkan dalam kolom kromatografi sephadex G-75 (2,5X80 cm) yang telah di seimbangkan dengan tris-HCl buffer pada pH 7,5 dan suhu 4°C. Kolom dielusi dengan laju tetesan 30 ml/jam dan 5ml/fraksi dikumpulkan minimal 80 fraksi. Setiap fraksi diukur proteinnya dengan sistem kolorimetri dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm. Setiap fraksi juga diukur kandungan Cd dan Zn dengan spektrofotometer serapan atom (AAS) masing-masing pada panjang gelombang 228,8 dan 219,9 nm, dan hasilnya (Cd dan Zn-tionein) ditentukan pada puncak yang tertinggi (EATON dan TOAL, 1982).

Analisis total Cd dan Zn

Gelambir kanan (lobus dexter) hati ditimbang (-5g) dalam bobot basah dimasukkan dalam Erlenmeyer 150 ml, kemudian ditambah HNO₃ pekat sebanyak 10 ml dan dibiarkan semalam. Hari berikutnya sampel dipanaskan di atas cawan pemanas pada suhu 120°C sampai larutan berwarna jernih. Kemudian dilarutkan dalam 10% HNO₃ dan disaring dengan kertas saring Whatman 42 sampai volume menjadi 25 ml. Larutan dibaca dengan SAA pada panjang gelombang 228,8 nm untuk Cd dan 219,9 nm untuk Zn.

Analisis statistik

Hasil analisis dinyatakan dalam ug/g bobot basah, kandungan total Cd dan Zn dalam hati diuji dengan analisis varian (ANOVA) untuk menentukan beda nyata terkecil kandungan Cd dan Zn di antara perlakuan pada hari ke-7, -14 dan -21 setelah perlakuan. Sementara itu, hubungan antara kandungan metalotionein dari kedua logam dan waktu perlakuan, serta di antara Cd dan Zn yang terikat protein, dilakukan uji korelasi pada setiap perlakuan.

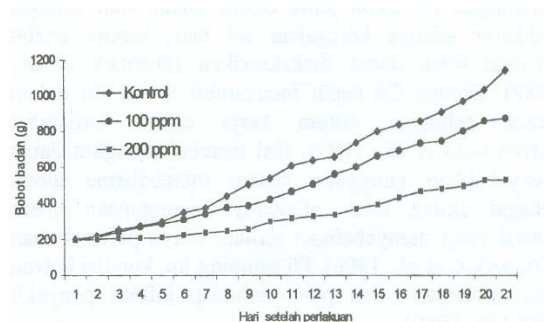
HASIL DAN PEMBAHASAN

Bobot badan ayam kontrol meningkat dengan cepat dan lebih tinggi daripada bobot badan ayam perlakuan (Gambar 1). Bobot badan ayam Kelompok 2 yang diberi dosis 100 ug/g Cd lebih tinggi daripada ayam kelompok 3. Hal tersebut sesuai dengan penelitian terdahulu, yaitu Cd yang mencemari pakan ayam dapat menyebabkan hambatan pertumbuhan ayam sampai 50% (DARMONO *et al.*, 1996). Hambatan pertumbuhan ayam tersebut mungkin disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya pengaruh toksik dari Cd, kurangnya efisiensi penggunaan unsur nutrisi, dan mungkin disebabkan oleh terganggunya ikatan Zn dengan protein dalam bentuk enzim. Menurut DUDLEY *et al.* (1982), Cd dapat merusak sel hati dan menurut STRUBEL T *et al.* (1996) Cd dapat mengganggu sistem kerja enzim dalam hati. Dalam hal ini diduga Cd dapat mengganggu sistem ikatan Zn dengan protein sehingga dapat menurunkan efisiensi penggunaan unsur nutrisi.

Kandungan total Zn diantara perlakuan pada hari ke-7 setelah perlakuan terlihat tidak berbeda nyata ($P>0,05$), tetapi pada hari ke-14 meningkat dalam arti semakin tinggi dosis pemberian Cd semakin tinggi pula kandungan total Zn ($P<0,01$). Tetapi pada hari ke-21 kandungan total Zn hampir sama diantara perlakuan ($P>0,05$). Hal tersebut mungkin karena pada hari ke-14 terjadi perombakan Zn dalam jaringan sehingga Zn terkumpul dalam hati. Pada hewan percobaan tikus, toksisitas Cd dapat menimbulkan peningkatan Zn total dalam hati dan ginjal dan penurunan dalam organ lainnya (PETERING *et al.*, 1971; ROBERT *et al.*, 1973). Peristiwa demikian mungkin terjadi dalam penelitian ini yakni pada hari ke-14 setelah perlakuan. Sementara itu, kandungan total Cd terlihat meningkat terus seiring dengan peningkatan dosis Cd yang diberikan dan lama perlakuan pada hari ke-7, -14 dan -21 (Tabel 1). Hal tersebut sesuai dengan penelitian RACHMAWATI *et al.* (1999), yang melaporkan mengenai pengaruh pemberian Cd dalam pakan ayam pedaging

terhadap akumulasi Cd dalam hati.

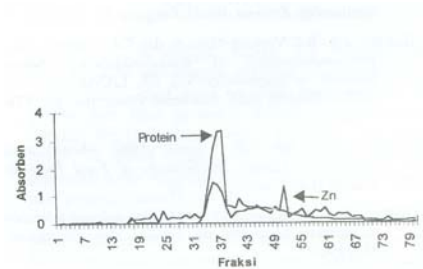
HasH analisis fraksi protein hari ke-7 setelah perlakuan pada kelompok kontrol menunjukkan bahwa kandungan Zn-tionein cukup tinggi dan terdeteksi pada fraksi ke-37 dan ke-50 (lihat Gambar 2), dalam hal ini, kandungan Cd-tionein tidak terdeteksi. Tetapi pada hari ke-14 setelah perlakuan, pada kelompok 3 kandungan Cd-tionein terdeteksi cukup tinggi, yaitu pada fraksi ke-71. Sedangkan kandungan Zn sangat rendah dan bersama dengan ikatan Cd sebagai Cd-Zn-tionein, yaitu pada fraksi ke-36 (Gambar 3). Pada perlakuan selama 21 hari, kandungan Zn-tionein menurun dan kandungan Cd-tionein meningkat (Gambar 4). Sementara itu, hubungan antara kandungan Zn-tionein dan Cd-tionein terlihat hubungan negatif dengan persamaan adalah $y = -0,3277x + 1,4599$, dengan koefisien korelasi $R = 0,1416$, yang bila kadar Cd-tionein tinggi, maka kadar Zn-tionein rendah. (Gambar 5).



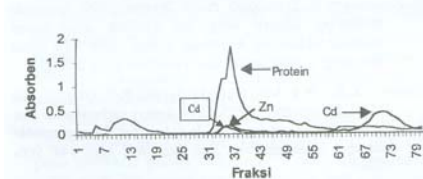
Gambar 1. Bobot badan ayam rata-rata selama 21 hari setelah perlakuan pemberian Cd dalam pakan.

Tabel 1. Kandungan total Zn dan Cd dalam hati ayam yang diberi Cd dalam pakan

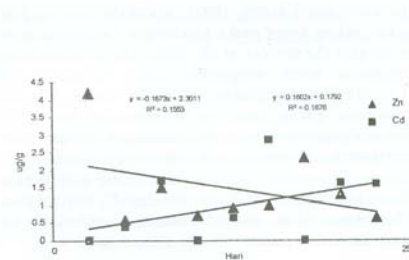
Perlakuan	Total logam (ug/g, bobot basah)					
	Hari ke- 7		Hari ke-14		Hari ke-21	
	Zn	Cd	Zn	Cd	Zn	Cd
Kontrol	10,69 ±2,31	0	56,03 ±3,42	0,10 ±0,003	20,95 ±2,60	0
100 ug/g Cd	14,46 ±1,56	6,1 ±0,41	156,32 ±13,40	34,11 ±6,28	21,24 ±4,76	25,43 ±1,93
200 ug/g Cd	18,98 ±2,64	31,63 ±2,69	549,7 ±75,99	48,97 ±5,79	25,37 ±3,64	50,90 ±12,8
Beda antar perlakuan	$P>0,05$	$P<0,01$	$P<0,01$	$P<0,01$	$P>0,05$	$P<0,05$



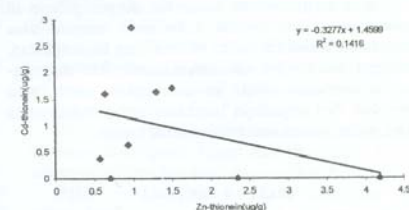
Gambar 2. Grafik fraksi protein dan kandungan metalotionein (Zn-tionein) dalam setiap fraksi pada supernatan gerusan hati yang dilewatkan melalui sephadex G-75 pada ayam kontrol minggu ke-1 (Cd-tionein tidak terdeteksi)



Gambar 3. Gambar grafik fraksi protein dan Kandungan metalotionein (Zn dan Cd-tionein) dalam setiap fraksi dalam supernatan gerusan hati yang dilewatkan melalui sephadex G-75 pada ayam perlakuan kelompok 3 minggu ke-2 setelah perlakuan



Gambar 4. Hubungan antara waktu perlakuan dan konsentrasi Cd dan Zn-tionein dalam hati ayam



Gambar 5. Hubungan antara Cd-tionein dan Zn-tionein dalam hati ayam selama 21 hari perlakuan pemberian Cd dalam pakan

Interaksi antara logam yang terikat protein belum begitu jelas dimengerti (DARMONO, 1999). ELINDER dan PISCATOR (1978) menduga bahwa ada tiga bentuk ikatan metalotionein yang terlibat dalam peristiwa ini, yaitu: metalotionein yang mengikat Cd dan Zn bersama-sama, metalotionein yang mengikat Cd saja, dan metalotionein yang mengikat Zn saja. Dengan adanya rangsangan pembentukan metalotionein yang mengikat Cd tersebut, maka pelepasan Zn dari ikatannya akan meningkat, sehingga terjadi peningkatan konsentrasi Zn bebas dari jaringan lain dan terkumpul di dalam hati, yang dalam penelitian ini mungkin terjadi

pada hari ke-14 setelah perlakuan (Tabel I). Dalam penelitian *in vitro*, Cd menghambat aktivitas beberapa enzim yang mengikat Zn, hal tersebut mungkin terjadi karena Cd mengambil alih ikatan Zn dalam enzim tersebut (VALLEE dan ULMER, 1972). Karena enzim yang diproduksi sel hati terhambat aktivitasnya maka efisiensi penggunaan unsur nutrisi mungkin juga terhambat sehingga ayam terhambat pertumbuhannya (Gambar 1). Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian terdahulu (DARMONO *et al.*, 1996).

Protein yang mengikat Zn dalam bentuk enzim sangat berperan dalam proses fisiologi makhluk hidup, karena sekitar 200 jenis enzim mengandung Zn

(GILLARD dan LAURIE, 1992). Manakala Zn diberikan dalam pakan ayam maka kandungan Zn-tionein akan meningkat (SANDOVAL *et al.*, 1998). Hal tersebut dapat digunakan untuk pengobatan kasus toksikosis Cd (CHOWDHURY dan CHANDRA, 1987). Tetapi, bila Cd mencemari pakan ayam, maka kandungan ikatan Zn-tionein yang secara normal ditemukan dalam hati akan menurun sesuai dengan waktu perlakuan (Gambar 3), karena kadar kedua logam tersebut saling berinteraksi dalam menduduki ikatannya (Gambar 4), Hal tersebut diharapkan dapat dicegah dengan pemberian Zn tambahan dalam pakan.

KESIMPULAN

Logam non-esensial termasuk Cd dapat berpengaruh negatif terhadap sistem fisiologik makhluk hidup. Salah satu akibat yang ditimbulkannya ialah menghambat sistem kerja enzim berupa Zn-tionein. Hasil penelitian menyimpulkan bahwa konsumsi pakan yang tercemar Cd, akan menimbulkan ikatan Cd dengan protein di dalam hati dalam bentuk Cd-tionein dengan jalan mengambil ikatan Zn dalam protein yang bersangkutan, sehingga kandungan Cd-tionein meningkat dan Zn-tionein menurun. Hal ini merupakan salah satu penyebab dari terjadinya hambatan pertumbuhan pada ayam akibat keracunan toksisitas Cd kronis.

DAFTAR PUSTAKA

- CHOWDHURY, B.A. dan R.K. CHANDRA. 1987. Biological and health implications of toxic heavy metals and essential trace elements interactions. *Prog. Food Nutr. Sci.* 11: 55-113.
- DARmono. 1999. Interaksi logam toksik dengan logam esensial dalam sistem biologik dan pengaruhnya terhadap kesehatan temak. *Wartazoa*, 9(1): 30-40.
- DARmono, S. RACHMAWATI, S. BAHRI, A. SAFUAN, dan Z. ARIFIN. 1996. Toksisitas kadmium terhadap pertumbuhan ayam broiler dan pengaruhnya terhadap pemberian seng. *Prosiding Temu Ilmiah Nasional Bidang Veteriner*, Bogor 12-13 Maret, 1996. Bahri et al (Ed). Balai Penelitian Veteriner. Bogor. hal. 269-272.
- DUDLEY, R.E., DJ. SVOBODA, dan C.D. KLAASSEN. 1982. Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. *Toxicol. App. Pharmacol.* 65: 302-313.
- EATON, D.L. dan B.F. TOAL. 1982. Evaluation of the Cd/haemoglobin affinity assay for rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol. App. Pharmacol.* 66: 134-142.
- ELINDER, C.G. dan PISCATOR. 1978. Cadmium and zinc relationship. *Environ. Health Perspect.* 25: 129-132.
- GARVEY, I.S., RJ. VANDER-MALLIE, dan C.C. CHANG. 1982. Radioimmunoassay of metallothioneins. dalam: *Methods in Enzymology* Vol 84, LANGONE and VANVUNAKIS (ed), Academic Press, Inc. pp. 121138.
- GILLARD, R.D. dan S.H. LAURIE. 1992. Metal-Protein interactions. Dalam: *Biochemistry of Food Proteins*. Hudson (Ed). Elsevier, N.Y., pp
- GOERING, P.L dan KLAASESEN. 1984. Zinc induced tolerance to cadmium hepatotoxicity. *Toxicol. App. Pharmacol.* 74: 299-307.
- KOLLER,LD. 1980. Immunotoxicology of heavy metals: a review. *Int. J. Immunopharmacol.* 2:269-279.
- MIYAHARA, T. Y. OH-E, E. TAKAINE, dan H. KOZUKA, 1983. Interaction between cadmium and zinc, copper, or lead in relation to collagen and mineral content of embryonic chick bone in tissue culture. *Toxicol. App. Pharmacol.* 67:41-48.
- PETERING, H.G., M.A. JOHNSON, dan K.L. STEMMER. 1971. Studies of zinc metabolism in rat. *Arch. Environ. Health* 23: 93-101.
- RACHMAWATI, S., DAAMONO, dan Z. ARIFIN. 1999. Pengaruh pemberian mineral seng dan kalsium pada pakan terhadap akumulasi kadmium dalam organ hati ayam pedaging.1. *Ilmu ternak dan Veteriner*. 4(3): 209-214.
- ROBERT, K.R., W.J. MILLER, P.E. STOKES, R.P. GENTRY dan M.W. NEARTEY. 1973. High dietary cadmium on zinc absorption and metabolism in calves fed for comparable nitrogen balances. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 144: 906908.
- SANDOVAL, M., P.R. HENRY, X.G. Luo, R. LITTEL, R.D. MILES, dan C.8. AMMERMAN 1998. Performance and tissue zinc and metallothionein accumulation in chicks fed a high dietary level of zinc. *Poultry Science* 77: 1354-1363.
- SANDSTEAD, H.H. 2000. Causes of iron and zinc deficiencies and their effects on brain. 1. *Nutr.* 130: 347s-349s.
- SANDSTEAD, H.H., CJ. FREDERICKSON, dan J.G. PENLAND 2000. History of zinc as related to brain function. 1. *Nutr.* 130: 496s-502s.
- STRUBELT, O., I. KLWMER, A. TRLSE, I. KEOGH, R. PENTZ, 1996. Comparative studies on the toxicity of mercury, cadmium, and copper toward the isolated perfused rat liver. 1. *Toxicol. Environ. Hlth.* 47: 267-283.
- VALLEE, B. dan D.D. ULMER. 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.* 41: 91128.