
INOKULASI AFLATOKSIN B1 PADA TELUR BEREMBRIO DAN RESIDUNYA PADA AYAM YANG MENETAS

R. WIDIASTUTI, DARMINTO, S. BAHRI dan R. FIRMANSYAH

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

ABSTRACT

The Effect of Inoculation of Aflatoxin B1 on Embryonic Egg and the Occurrence of Aflatoxins Residue on the Hatched Eggs

A study on the effect of inoculation of aflatoxin B1 on embryonic egg and the occurrence of aflatoxins residue on the hatched eggs had been conducted. Seven groups of embryonic eggs of broiler chicken aged 5 days were inoculated by 1000; 500; 250, 125; 62,5; 32,5 and 15,6 ng AFB1 through air sac and yolk routes. Both routes of AFB1 inoculation caused high mortality and decreased the hatchability. LD50 was 102,2 ng for inoculation through air sac and 106,2 ng through yolk egg, respectively. The residues detected from hatched eggs which inoculated through air sac and yolk eggs were dominated by AFB1.

Key words: Aflatoxin B1, embryonic eggs, residue

PENDAHULUAN

Produk hewani berupa daging dan telur ayam ras saat ini diupayakan peningkatan produksinya semaksimal mungkin dalam usaha meningkatkan gizi dan kesejahteraan masyarakat Indonesia. Namun kendala dalam peningkatan produk hewani tersebut sangat bergantung kepada kemampuan berproduksi dan reproduksinya termasuk daya tetasnya.

Daya tetas yang rendah disebabkan tidak hanya oleh penyakit, namun dapat juga disebabkan adanya kontaminan seperti aflatoksin B₁ (AFB1) (TIWARI *et al.*, 1989; KHAN *et al.*, 1989). AFB1 dapat secara cepat ditransfer ke telur dan menimbulkan residu pada telur melalui pemberian pakan (KOSUTZKA *et al.*, 1989). Residu tersebut akan ditransfer secara transovarial ke hewan yang menetas (ZDENEK *et al.*, 1986).

Mengingat kondisi iklim di Indonesia sangat mendukung terbentuknya aflatoksin yang diakibatkan tumbuhnya *Aspergillus flavus* baik pada bahan pakan maupun pakan, ada kemungkinan bahwa aflatoksin yang terbentuk di telur juga akan menyebabkan toksisitas terhadap embrio. Sejauh ini embriotoksitas yang diakibatkan oleh adanya kontaminasi AFB1 pada telur berupa penurunan daya tetas serta penghitungan kadar residu yang terbentuk belum dipelajari di Indonesia, maka tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari inokulasi AFB1 pada embrio terhadap daya tetas dan kadar residu yang terbentuk.

MATERI DAN METODE

Inokulasi AFB1 pada telur berembrio ayam pedaging melalui rute kantung udara dan kuning telur

Inokulasi dilakukan dengan cara menyuntikkan larutan AFB1 (sebanyak 10 µl dalam 5% etanol-PBS) dengan konsentrasi 1000, 500, 250, 125; 62,5; 31,2 dan 15,6 ng pada telur berembrio ayam pedaging (Shaver Starbro) (pada masa inkubasi hari ke-5) melalui rute kuning telur dan kantung udara. Sedangkan kelompok kontrol hanya diinokulasi dengan 10 µl etanol 5%-PBS. Telur yang telah dilubangi dan mendapat inokulasi kemudian ditutup kembali dengan parafin cair dan diinkubasikan hingga hari ke-21 atau hingga saat menetas.

Pengamatan perkembangan embrio dengan cara *candling* dan pemutaran posisi telur dilakukan setiap hari hingga hari ke-17. Pada saat menetas, dihitung jumlah ayam yang menetas hidup dan yang gagal/mati dari tiap kelompok untuk dihitung daya tetas dan LD₅₀-nya berdasarkan rumusan REED dan MUNCH yang disitir oleh BROWN (1964). Sedangkan ayam-ayam yang menetas hidup kemudian dibunuh untuk dilakukan analisis terhadap residu AFB1 dan metabolitnya.

Residu AFB1 dan metabolitnya pada jaringan tubuh dan organ hati ayam yang menetas

Ditimbang sebanyak 10 g sampel jaringan tubuh (daging) atau 5 g sampel hati dari tiap ayam yang telah dicincang halus. Tambahkan dengan 12,5 ml asam sitrat 20% dan dikocok selama 5 menit kemudian ditambah dengan 25 mL diklorometan dan anhidrida natrium sulfat dan dikocok kembali selama 30 menit menggunakan shaker. Filtrat disaring dan diukur volumenya, lalu diuapkan hingga 1-2 mL. Ekstrak dimasukkan ke dalam kolom kromatografi yang terdiri dari lapisan silika gel 60 dan anhidrida natrium sulfat dan telah dibasahi dengan heksana-kloroform (1:1). Kolom dielusikan dengan 12,5 mL toluen-asam asetat (9:1), diikuti dengan 12,5 mL heksana dan dilanjutkan dengan 12,5 mL asetonitril-eter-heksana (1:3:6). Aflatoksin B1 dan metabolitnya akhirnya dielusikan dengan 20 mL pelarut kloroform-aseton (4:1), kemudian dikeringkan dan siap dianalisis dengan alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (MILLER *et al.*, 1982). Selanjutnya residu AFB1 dan aflatoksikol (Ro) dideteksi menggunakan KCKT dengan kolom μ -Bondapak C18, fasa gerak akubides-isopropanol-asetonitril (80:12:8) pada kecepatan alir 1,5 mL/menit dan menggunakan detektor fluoresen pada panjang gelombang eksitasi 365 nm dan emisi 425 nm. Ekstrak terakhir diderivatisasi dengan 50 μ l asam trifluoroasetat ditambah dengan 200 μ l heksana kemudian disuntikkan ke KCKT (MADDEN dan STAHR, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh inokulasi AFB1 pada telur berembrio terhadap daya tetas dan LD₅₀-nya

Pengaruh inokulasi AFB1 pada lokasi kantung udara dan kuning telur terhadap daya tetas dan LD₅₀ dari telur berembrio dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Daya tetas dan LD₅₀ telur berembrio ayam pedaging yang mendapat inokulasi AFB1 pada rute kantung udara dan kuning telur

Dosis inokulasi AFB1	Rute kantung udara			Rute kuning telur		
	Mati	Hidup	% kumulatif mati/total	Mati	Hidup	% kumulatif mati/total
1000 ng	9	0	100	9	0	100
500 ng	9	0	100	8	1	96
250 ng	9	0	100	2	7	66,6
125 ng	3	8	57,9	6	3	56
62,5 ng	2	9	32	3	6	32
31,2 ng	4	7	20	1	8	16,6
15,6 ng	2	9	5,7	4	5	11,8
LD ₅₀	102,2 ng			106,2 ng		

Kegagalan menetas sebesar 100% dari telur berembrio tersebut terjadi pada inokulasi 250 hingga 1000 ng AFB1 melalui rute kantung telur dan hanya pada inokulasi 1000 ng pada inokulasi kuning telur. Pada dosis AFB1 yang lebih rendah, mortalitas pada rute kantung udara berkisar antara 5,7 hingga 57,9% (dosis 15,6 hingga 125 ng AFB1), sedangkan pada rute kuning telur berkisar antara 11,8 hingga 96% (dosis 15,6 hingga 500 ng AFB1). CILIEVICI *et al.* (1980) melaporkan adanya peningkatan mortalitas hingga 35% pada telur berembrio umur 4 hari yang diinokulasi dengan 1/100 ppm AFB1. Demikian pula KHAN *et al.* (1989) mendapatkan bahwa inokulasi 216 ng AFB1 ke telur mengakibatkan mortalitas sebesar 93%, sedangkan EDRINGTON *et al.* (1995) mendapatkan bahwa inokulasi 0,05 μ g AFB1 mengakibatkan mortalitas sebesar 52%. CELIK *et al.* (2000) juga mendapatkan bahwa dengan meningkatnya dosis AFB1 yang diinokulasikan pada telur berembrio meningkatkan mortalitas dan kematian dini. Pada penelitian terlihat bahwa inokulasi AFB1 melalui rute kantung udara lebih mudah mengakibatkan kegagalan menetas dibandingkan dengan rute kuning telur.

LD₅₀ yang dihitung berdasarkan rumusan REED dan MUNCH dan disitir oleh BROWN (1964) pada inokulasi melalui rute kantung udara adalah 102,2 ng sedangkan melalui kuning telur adalah 106,2 ng. Kedua hasil pengamatan tersebut juga memperlihatkan bahwa rute inokulasi melalui kantung udara memberikan sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan melalui kuning telur. Namun, nilai LD₅₀ tersebut berbeda dengan yang diperoleh VERRET *et al.*, (1964) yang mendapatkan LD₅₀ untuk inokulasi melalui kantung udara 25 ng dan 48 ng pada inokulasi melalui kuning telur pada telur berembrio umur 3 hari. Kemungkinannya disebabkan oleh adanya variasi sensitivitas dari jenis embrio yang digunakan sebagaimana yang dinyatakan oleh PRELUSKY *et al.*, (1987) disamping kemungkinan perbedaan sensitivitas

Tabel 2 Kandungan residu AFB1 dan metabolitnya pada jaringan tubuh dan hati ayam pedaging yang menetas dari telur berembrio yang mendapat inokulasi AFB1 melalui kantung udara dan kuning telur

Dosis inokulasi AFB1	Inokulasi AFB1 rute kantung udara				Inokulasi AFB1 rute kuning telur			
	Residu AFB1		Residu Ro		Residu AFB1		Residu Ro	
	Jar. tubuh	Hati	Jar. tubuh	Hati	Jar. tubuh	Hati	Jar. tubuh	Hati
1000 ng	TA	TA	TA	TA	TA	TA	TA	TA
500 ng	TA	TA	TA	TA	62,5	192,3	50,0	TT
250 ng	TA	TA	TA	TA	32,5	63,6	TT	TT
125 ng	15,4	5,0	TT	TT	15,0	19,2	TT	TT
62,5 ng	9,2	6,2	TT	TT	12,0	15,4	TT	TT
31,2 n	7,7	TT	TT	TT	TT	TT	TT	50,0
15,6 ng	6,2	6,2	TT	TT	TT	TT	TT	TT

TA: tidak dianalisis, TT: tidak terdeteksi
AFB1: aflatoksin B1, Ro: aflatoksikol

yang disebabkan oleh perbedaan usia embrio yang digunakan dimana VERRET *et al.* (1964) menggunakan telur berembrio usia 3 hari, sedangkan pada penelitian ini digunakan umur 5 untuk alasan setelah terlihat adanya kepastian fertilitas dari embrio yang digunakan. Abnormalitas berupa kelainan fisik ataupun perubahan warna hati tidak nampak pada ayam hasil tetasan yang diinokulasi AFB1 maupun kelompok kontrol.

Residu AFB1 dan metabolit yang terdeteksi pada ayam yang menetas

Hasil analisis penetapan residu AFB1 dan metabolitnya (aflatoksikol, Ro) yang terdeteksi pada ayam yang menetas ditunjukkan pada Tabel 2 untuk tetasan hasil inokulasi AFB1 pada kantung udara dan kuning telur.

Pada inokulasi AFB1 melalui kantung udara, residu AFB1 yang terdeteksi berkisar antara 6,2 hingga 15,4 ppb pada jaringan tubuh dan 5,0 hingga 6,2 ppb pada hati. Sedangkan Ro tidak terdeteksi pada jaringan tubuh maupun hati. Pada inokulasi AFB1 melalui kuning telur, residu AFB1 yang terdeteksi berkisar antara 12,0 hingga 62,5 ppb pada jaringan tubuh dan 15,4 hingga 192,3 ppb pada hati. Sedangkan residu aflatoksikol (Ro) hanya terdeteksi pada jaringan tubuh dari ayam menetas yang mendapat inokulasi 500 ng AFB1 sebesar 50,0 ppb dan pada hati terdeteksi pada ayam menetas yang mendapat inokulasi 31,2 ng AFB1 yaitu sebesar 50,0 ppb.

Tingginya residu AFB1 yang terbentuk baik pada jaringan tubuh maupun hati meningkat sesuai dengan besarnya dosis AFB1 yang diinokulasikan pada telur berembrio tersebut. Sedangkan residu Ro tidak selalu terdeteksi pada ayam yang menetas. Dari hasil penelitian tersebut dapat dikatakan bahwa konsentrasi residu yang terbentuk pada ayam tetasan hasil inokulasi AFB1 pada rute kuning telur lebih besar dibandingkan dengan rute kantung udara. Sedangkan jenis aflatoksin

yang terdeteksi didominasi oleh AFB1 baik untuk tetasan hasil inokulasi melalui kantung udara maupun rute kuning telur.

KESIMPULAN

Kegagalan menetas sebesar 100% terjadi pada inokulasi AFB1 mulai 250 ng pada rute kantung udara dan 1000 ng pada rute kuning telur. Pada dosis AFB1 yang lebih rendah, mortalitas pada rute kantung udara berkisar antara 5,7 hingga 57,9% (dosis 15,6 hingga 125 ng AFB1), sedangkan pada rute kuning telur berkisar antara 11,8 hingga 96% (dosis 15,6 hingga 500 ng AFB1). Sedangkan LD₅₀ yang diperoleh pada inokulasi melalui rute kantung udara adalah 102,2 ng dan pada rute kuning telur adalah 106,2 ng. Residu yang terdeteksi pada ayam tetasan yang diinokulasi AFB1 melalui kantung udara maupun rute kuning telur didominasi oleh AFB1.

DAFTAR PUSTAKA

- BROWN, WF. 1964. Variance Estimation in the REED-MUNCH Fifty Percent End-Point Determination. *Am. J. Hgy.* 79:37-46.
- CELIK, I., H OGUZ, O DEMET, M BOYDAK, Hh DONMEZ, E SUR and F NIZAMLIOGLU. 2000. Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *Br. Poult. Sci.* 4(14) 401-9.
- CILIEVICI, O., I CORDOS, E GHIDUS and A MOLDOVAN. 1980. The toxic and teratogenic effects of aflatoxin B1 on the chick embryo development. *Morphol. Embryol (Bucur):* 26(4): 309-14.
- EDRINGTON, TS., RB. HARVEY and LF. KUBENA. 1995. Toxic Effects of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A, Alone and in Combination, on Chicken Embryos. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54:331-336.

- KHAN, BA., SS. HUSSAIN and M.A. AHMAD. 1989. Toxicity of Aflatoxin B1 to Chick Embryo. Pakistan J. Scien. Indust. Res. 32 (5): 353-354.
- KOZUTZKA, E., J. KOZUTZKY and B. SARNIKOVA. 1989. Hydinarstvo,-Vedecke-Prace-Vyskumenho-Ustavu-Chovu-a-Sl'achtenia-Hyniny-v-Ivanke-pri-Dunaji. 24:13-20.
- MADDEN, UA and HM. STAHR. 1995. Retention and Distribution of Aflatoxin in Tissues of Chicks Fed Aflatoxin-Contaminated Poultry Rations Amended with Soil. Vet. Hum. Toxicol. 37 (1): 24-29.
- MILLER, DM., D.M. WILSON, R.D. WYATT, J.K. MCKINNEY, W.A. CROWELL and B.P. STUART. 1982. High Performance Liquid Chromatographic Determination and Clearance Time of Aflatoxin Residues in Swine Tissues. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65:1-4.
- PRELUSKY, D.B., R.M.G. HAMILTON, B.C. FOSTER, H.L. TRENHOLM and B.K. THOMPSON. 1987. Optimization of Chick Embryotoxicity Bioassay for Testing Toxicity Potential of Fungus Metabolites. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70: 1049-1055.
- TIWARI, RP., JS. VIRDI, LK. GUPTA, SS. SAINI and D.V. VADEHRA. 1989. Development of Chicks Exposed to Aflatoxin B1 During Embryogenesis. Indian J. Animal Sci. 59 (11):1473-1474.
- VERRET, MJ, J-P MARLIAC and J MCLAUGHLIN. 1964. Use of the Chickens Embryo in the Assay of Aflatoxin Toxicity. J. ASSOC. Off. Anal. Chem. 47: 1003-1006.
- ZDENEK, Z., L FUKAL, J PROSEK, A SLAMOVA and J VOPALKA. 1986. Bi aflatoxin (AFB1) transfer from reproductive organs of farm birds into their eggs and hatched young. Conference-Europeene-d'Aviculture. No. 7. 618.

DISKUSI

Pertanyaan:

1. *Bagaimana recovery residu yang diperoleh?*
2. *Bagaimana daya tetas? Residu pada kulit telur?*

Jawaban:

1. *Recovery berkisar antara 10-15 %*
2. *Rute kantong udara lebih besar dari 250 mg inokulasi terjadi 100% kematian. Kumulatif mati/total inokulasi 15,6-125 mg adalah 5,7-58%. Rute kuning telur, 100 mg inokulasi terjadi 100% kematian. % kumulatif mati/total inokulasi 15,6-500 mg adalah 11,8-96%. Residu pada kulit telur, tidak dilakukan pengujian.*