

PENCEGAHAN EFEK TERATOGENIK NATRIUM BORAT DENGAN RIBOFLAVIN PADA TIKUS PUTIH*

*Tri Wahyu Pangestiningih** dan Sumiyati Sunaryo***

Abstrak

Borat bersifat teratogenik pada tikus maupun ayam. Pada ayam efek teratogenik borat mirip dengan defisiensi riboflavin. Diduga dalam tubuh ayam borat membentuk ikatan dengan riboflavin sehingga riboflavin tidak dapat berfungsi dengan baik. Penelitian ini bertujuan untuk menajajagi kemungkinan riboflavin dapat digunakan untuk mencegah efek terogenik Na-borat pada tikus putih.

Sembilan belas tikus primigravida dibagi acak menjadi 2 kelompok. Kelompok borat (BO) sebanyak 9 ekor diberi Na borat yang dilarutkan pada tylose 3% per oral dengan dosis 180 mg/200 g BB/hari pada kebuntingan hari 6 sampai 15. Kelompok yang lain (BR) selain diberi Na borat dengan dosis sama juga diberi riboflavin dengan dosis 2,5 mg/ekor/hari. Pada hari ke 20 kebuntingan tikus dibedah cesar di bawah anestesi eter. Setelah dilakukan pemeriksaan langsung terhadap semua fetus hidup vs. tanpa pendarahan pada kedua perlakuan tidak berbeda, tetapi penambahan riboflavin secara nyata menaikkan jumlah fetus dengan cacat omfakel. Hasil uji t menunjukkan bahwa penambahan riboflavin secara sangat nyata memperkecil berat dan panjang fetus, memperparah cacat telapak kaki depan dan belakang, tulang rusuk dan tulang dada. Percobaan ini menunjukkan bahwa pada tikus penambahan riboflavin tidak dapat mencegah efek teratogenik, tetapi bahkan memperparah malformasi fetus yang dilahirkan.

Kata-kata kunci : teratogenik, Na-borat, riboflavin, tikus putih

*) Dibiayai dengan Dana Penunjang Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan UGM no UGM/7261/M/05/01

***) Jurusan Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

EFFECTS OF RIBOFLAVIN SUPPLEMENTATION ON THE TERATOGENIC EFFECTS OF SODIUM BORATE IN WHITE RATS

Tri Wahyu Pangestingsih and Sumiyati Sunaryo

Abstract

Na-borate gave teratogenic effects both to rats and chickens. In chickens the fetal malformations caused by borate treatments were similar to those due to riboflavin deficiency. It was proposed that in embryonated eggs borate built a bond with riboflavin, so that riboflavin could not function properly. This present investigation was conducted to assess the possibility of riboflavin to prevent the teratogenic effects of Na-borate in rats.

Nineteen primigravida Wistar rats were allocated randomly to one of two treatment groups, i. e. 9 rats were orally treated with 180 mg/200g BW/day Na-borate, the other 10 rats beside treated with Na-borate, they were also treated orally with 2.5 mg/rat/day riboflavin. The treatments were done during the pregnancy on day 6 to 15. On day 20 the pregnant does were caesarean sectioned under ether anaesthesia. After all fetal malformations were noted, then all fetuses were placed in alcohol 70%, prepared for alizarin method for microscopic skeleton inspection. Chi square analysis of the gross inspection malformations, i.e. the resorbed vs. the unresorbed, the alive vs. the dead, the haemorrhage vs. the nonhaemorrhage fetuses of the two treatments showed insignificant difference. Riboflavin supplementation increased significantly the number of fetuses with omphalocel. T-test analysis indicated that riboflavinsupplementation highly significantly caused the fore and hind paw, costal, sternal defects became more serious. It also significantly reduced the weight and the length of the fetuses. This investigation revealed that riboflavin supplementation failed to prevent, but even caused the teratogenic effects of the Na-borate to rats became more serious.

Key words : *teratogenic, Na-borate, riboflavin, white rats.*

PENDAHULUAN

Na-borat (boraks) dalam bahasa sehari-hari disebut bleng atau pijer memiliki rumus kimia $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Meskipun melalui Peraturan Menteri Kesehatan tahun 1988 pemerintah sudah melarang penggunaan bahan ini untuk bahan tambahan makanan, namun kenyataannya bahan ini masih digunakan secara luas (Anonim, 1991). Terlepas dari bahaya yang dapat ditimbulkannya, penggunaan boraks menguntungkan karena di samping tidak mengganggu cita rasa, penggunaan boraks membuat makanan lebih awet dan lebih remah (Sollman, 1957).

Manusia yang setiap harinya mengkonsumsi makanan awetan rata-rata sehari dapat mengkonsumsi asam borat 0,5 g atau boraks dengan berat ekuivalennya. Konsumsi sebesar ini tidak akan segera menimbulkan gangguan pada individu sehat. Bila terjadi keracunan akut boron dapat ditemukan di substansia alba sistem syaraf pusat maupun perifer. Boron juga terakumulasi dalam hati dan jaringan, dan dapat menembus barier plasenta menuju fetus (Sollman, 1957).

Boraks bersifat tertogenik pada tikus Wistar. Di samping menimbulkan kematian dan resorpsi fetus, boraks menyebabkan terjadinya berbagai malformasi, seperti pendarahan bawah kulit, memperkecil ukuran berat dan panjang, gangguan pertumbuhan tulang kaki, dada, rusuk dan omfatokel (Sunaryo dan Pangestingsih, 1992). Borat juga bersifat tertogenik pada ayam. Perubahan yang ditimbulkan mirip efek teratogenik akibat defisiensi riboflavin (Goldstein dkk., 1974). Riboflavin memikul berbagai fungsi penting, antara lain sebagai koenzim pada sistem enzim respirasi, sebagai unsur utama flavoprotein sistem redoks enzim respirasi, berperan pada perkembangan dan pertumbuhan fetus, memelihara mukosa, epitel dan jaringan-jaringan penyusun mata (Smith dkk., 1983). Riboflavin bebas tidak menembus plasenta tetapi pada hewan bunting estrogen menginduksi pembentukan protein pembawa riboflavin yang mentranspor vitamin tersebut melalui plasenta ke sirkulasi fetal (Martin, 1984).

Bagaimana mekanismenya sehingga boraks bersifat teratogen belum jelas. Pada ayam diperkirakan bahwa dalam tubuh boraks berikatan dengan sisi ribitil riboflavin, membentuk suatu kompleks yang larut dalam air dan merupakan metabolit yang tidak aktif (Rennie dkk., 1990). Pemberian boraks 15 g / kg pakan bersama-sama dengan riboflavin 6 mg/kg pakan dalam waktu 10 hari menyebabkan konsentrasi riboflavin

dalam plasma darah, kuning telur dan albumen turun secara bermakna (White, sitasi Rennie dkk., 1990).

Penelitian ini bertujuan untuk menjajagi kemungkinan pemberian riboflavin yang berlebihan dapat menghilangkan atau paling tidak mengurangi efek teratogenik yang ditimbulkan oleh Na-borat pada tikus.

MATERI DAN METODE

Sembilan belas ekor tikus Wistar primigravida yang dibeli dari UPHP UGM dibagi secara acak menjadi 2 kelompok. Kelompok pertama (BO) terdiri dari 9 ekor diberi Na borat yang dilarutkan dalam tylose 3% per oral dengan dosis 180 mg/200 g BB/hari. Kelompok yang lain (BR) terdiri dari 10 ekor di samping diberi Na borat, juga diberi riboflavin peroral sebanyak 2,5 mg/ekor/hari. Pemberian riboflavin dilakukan 2 jam sesudah pemberian borat, agar tidak terjadi reaksi antara keduanya sebelum memasuki tubuh. Perlakuan dilakukan pada periode organogenesis, yaitu pada hari ke 6 - 15 masa kebuntingan (Harbinson, 1980). Pada hari ke-20 masa kebuntingan tikus dibedah cesar di bawah anestesi eter. Fetus dikeluarkan, ditimbang dan diukur panjang badannya dari kepala sampai pangkal ekor, diamati langsung cacat yang dapat terlihat, dicatat jumlah fetus yang diresorpsi (= jumlah plasenta kosong), demikian juga jumlah fetus hidup dan mati. Selanjutnya 2/3 jumlah fetus hidup difiksasi dalam alkohol 70%, disiapkan untuk transparansi skeleton metode alizarin (Humason, 1967). Skeleton diamati dengan menggunakan stereo mikroskop, kemudian dilakukan skoring. Cacat diberi nilai kecil, sedang normal diberi nilai tinggi.

Hasil pengukuran berat dan panjang fetus antara 2 kelompok dibandingkan dengan menggunakan uji t (Snedecor dan Cochran, 1967). Uji t juga digunakan untuk membandingkan cacat mikroskopik pada sternum, kostae, telapak kaki muka (metakarpus dan jari), telapak kaki belakang (metatarsus dan jari) setelah diberi skor. Data cacat morfologik yang dapat diamati secara langsung, yaitu fetus dengan omfalkel atau tidak, fetus diresorpsi atau tidak (hidup + mati) dianalisis dengan kikuadrat (Scefler, 1984).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berat, Panjang dan Malformasi Skeleton

Tabel 1 menunjukkan bahwa penambahan riboflavin secara sangat nyata memperparah malformasi fetus. Berat rerata 39 fetus hidup kelompok BO = 2,41 g, sedang 37 fetus hidup kelompok BR = 1,70 g. Panjang fetus rerata kelompok BO = 2,97 cm, sedang kelompok BR = 2,66 cm. Uji t menunjukkan bahwa penambahan riboflavin sangat nyata menurunkan berat maupun panjang fetus ($P < 0,01$).

Tabel 1 Data berat dan panjang badan serta skor berbagai skeleton fetus yang berasal dari induk yang diberi Na-borat (BO) dan Na-borat ditambah riboflavin (BR)

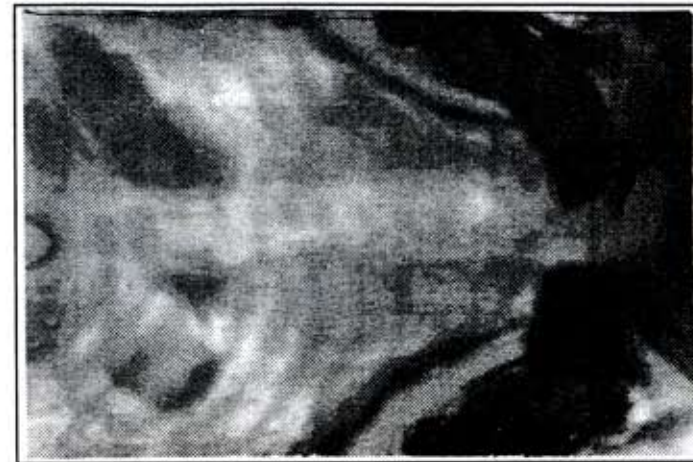
Yang diukur	BO	BR
Berat badan (g) ^{ss}	2,41 (39)	1,70 (37)
Panjang badan (cm) ^{ss}	2,97 (39)	2,66 (37)
Sternum (Σ sternbrae tercatat merah + 1)	1 (5) 2 (3) 3 (6) 4 (2) 5 (7) 6 (3)	1 (14) 2 (2) 3 (1) 4 (4) 5 (2) 6 (1)
Rerata ^{ss}	3,46 (26)	2,21 (24)
Kostae*	5 (10) 10 (16)	2 (10) 10 (14)
Rerata ^{ss}	8,08 (26)	7,92 (24)
Telapak kaki depan/belakang (Σ ruas tercatat merah)	5 (23) 10 (2) 15 (1)	5 (23) 10 (1) 15 (0)
Rerata ^{ss}	5,77 (26)	5,21 (24)

Keterangan : BO : induk diberi Na-borat 180mg/200g BB/hari. BR : induk diberi Na-borat dosis sama dengan BO ditambah riboflavin 2,5 mg/ekor/hari. Perlakuan pada masa kebuntingan hari 6-15. Angka dalam tanda kurung menunjukkan jumlah fetus. * Kostae normal skor = 10, cacat = 5. ss = hasil uji t berbeda sangat nyata ($p < 0,01$)

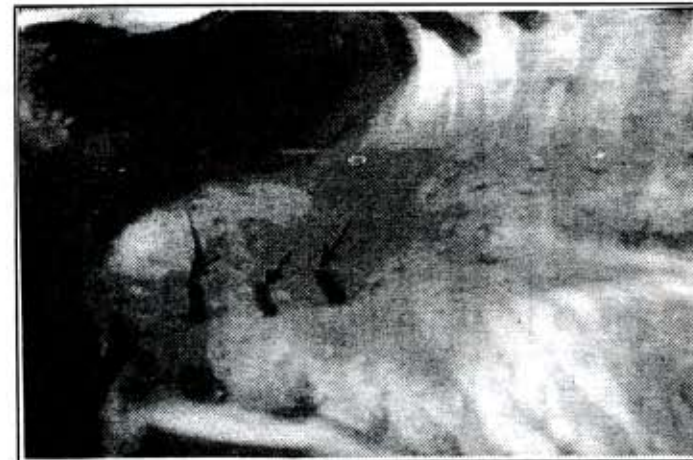
Dalam penelitian ini secara acak hanya diambil 2/3 jumlah total fetus hidup untuk dicat dengan alizarin. Jumlah sternebrae yang dapat tercatat alizarin bervariasi dari 1-6. Perbedaan yang sangat mencolok terlihat pada data sternebrae ini (Tabel 1). Pada kelompok BR, 14 dari 24 fetus tidak memiliki sternebrae tercatat, sedang kelompok BO hanya 5 ekor dari 26 ekor. Skor rerata kelompok BO = 3,46, kelompok BR = 2,21. Keduanya berbeda sangat nyata ($P < 0,01$). Contoh gambaran sternum dapat dilihat pada gambar 1 dan 2

Malformasi kostae yang dapat ditemukan pada kelompok BO maupun BR adalah pembengkokan maupun adhesi. Untuk analisis dengan ujian t maka malformasi kostae diberi skor 5, sedang yang normal diberi skor 10. Skor rerata kelompok BO = 8,08 sedang BR = 7,92. Keduanya berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) (Tabel 1).

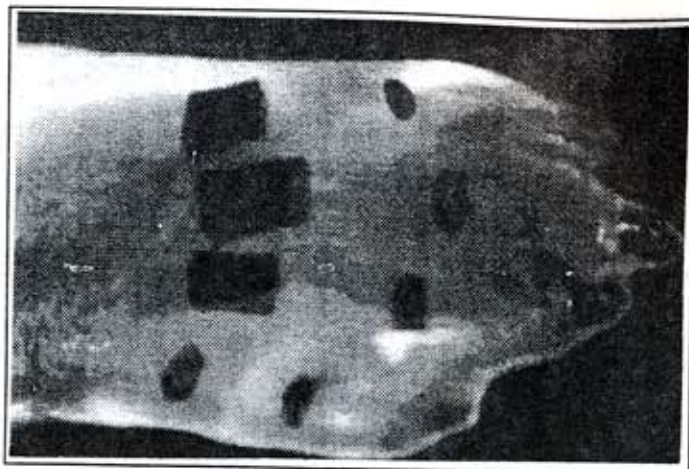
Hasil pemeriksaan telapak kaki muka dan belakang tidak menunjukkan perbedaan. Baik pada kelompok BO maupun BR menunjukkan 3 macam variasi hasil pengecatan alizarin. Telapak kaki yang normal menunjukkan 3 deretan skeleton tercatat merah yaitu di daerah metakarpus dan metatarsus, jari dan ujung jari (kuku). Setiap deretan punya 5 ruas kecil. Telapak kaki semacam ini diberi skor 15 (Gambar 3). Malformasi telapak kaki ada 2 macam, yaitu masing-masing diberi skor 10 dan 5. Nilai 10 diberikan pada telapak kaki yang punya 2 deret skeleton tercatat alizarin, yaitu di metakarpus/metatarsus dan kuku (Gambar 4), sedang telapak kaki dengan nilai 5 diberikan pada telapak kaki yang hanya memiliki 1 deretan skeleton (Gambar 5). Rerata skor untuk kelompok BO = 5,77, kelompok BR = 5,21. Analisis dengan uji t menunjukkan bahwa penambahan riboflavin sangat nyata memperparah malformasi akibat boraks ($P < 0,01$, tabel 1).



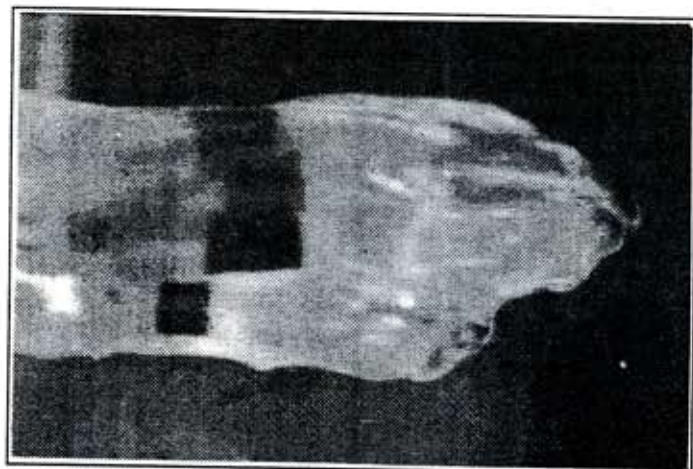
Gambar 1 . Contoh gambar sternum fetus dilihat dari ventral. Ruas sternebrae tidak ada yang tercatat alizarin. Fetus berasal dari induk yang diberi Na borat 180 mg/200 g BB/hari dan riboflavin 2,5 mg/ekor/hari selama kebuntingan hari ke 6-15 Skor sternum = 1.



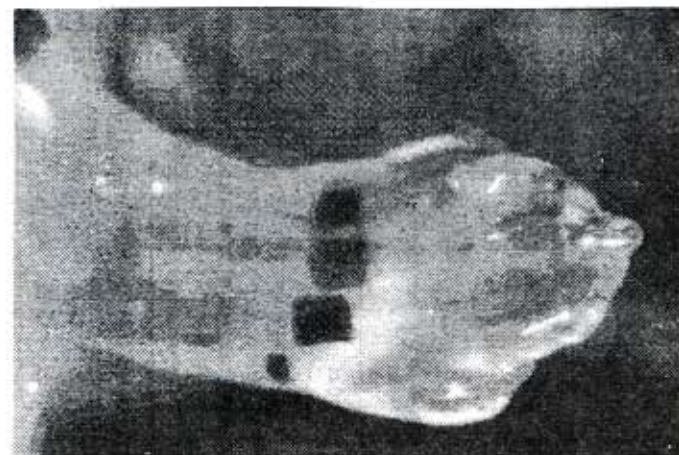
Gambar 2. Keterangan sama dengan Gambar 1 Sternebrae yang tercatat alizarin ada 3 ruas. Skor sternum = 4.



Gambar 3. Contoh gambar telapak kaki fetus. Ada 3 deretan ruas tulang tercat alizarin, masing-masing terdiri dari 5 ruas (satu ruas tidak terlihat). Fetus berasal dari induk yang diberi Na borat 180 mg/200 g BB/hari. Skor telapak kaki = 15



Gambar 4. Keterangan sama dengan gambar 3. Skor telapak kaki = 10



Gambar 5. Keterangan sama dengan gambar 3. Skor telapak kaki = 5

Pemeriksaan Malformasi Secara Langsung

Data hasil pemeriksaan malformasi langsung yang meliputi kematian fetus, resorpsi fetus, adanya cacat omfalokel dan pendarahan bawah kulit yang ada pada fetus tersaji pada Tabel 2. Dari tabel tersebut dapat terlihat bahwa semua malformasi kecuali omfalokel tidak menunjukkan perbedaan. Cacat lain yang dapat diamati langsung (tidak dimuat dalam tabel) yaitu tidak adanya batas yang jelas antara kepala dan dada (1 ekor dari 41 ekor total tikus) berasal dari kelompok BR (Gambar 6), serta eksensefali (1 ekor dari total 41 ekor fetus), juga berasal dari kelompok BR (Gambar 7).

Tabel 2. Data pemeriksaan langsung berbagai malformasi fetus berasal dari induk yang diberi Na borat (BO) dan Na borat ditambah riboflavin (BR)

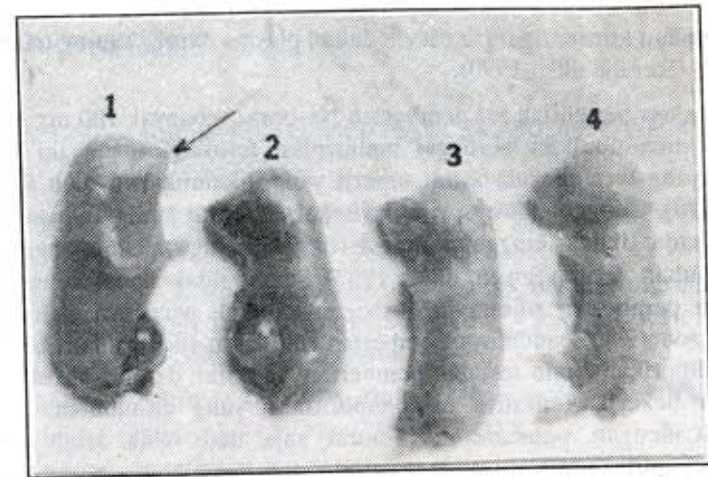
Malformasi	Kelompok	S (keterangan)	S (keterangan)
Kematian fetus ^{ns}	BO	2 (mati)	39 (hidup)
	BR	4 (mati)	37 (hidup)
Resorpsi fetus ^{ns}	BO	30 (resorpsi)	41 (tidak)
	BR	39 (resorpsi)	40 (tidak)
Omfalokel ^s	BO	8 (omfalokel)	33 (tidak)
	BR	16 (omfalokel)	24 (tidak)
Pendarahan bawah kulit ^{ns}	BO	14 (pendarahan)	25 (tidak)
	BR	10 (pendarahan)	27 (tidak)

Keterangan :

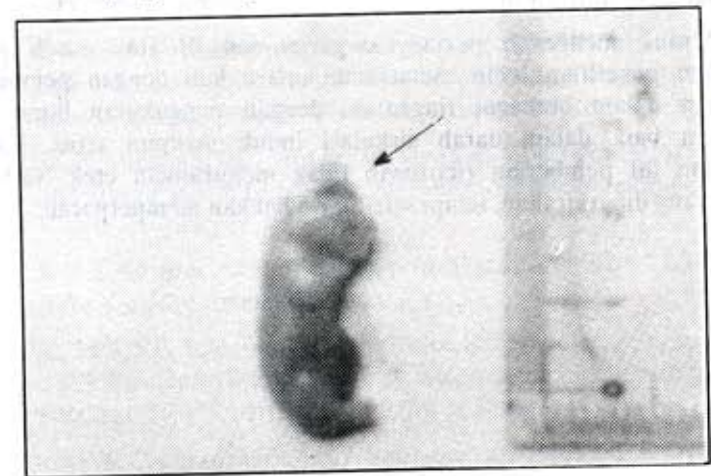
BO : induk diberi Na-borat 180 mg/200 mg BB/hari. BR : induk diberi Na-borat dengan dosis sama dengan BO ditambah riboflavin 2,5 mg/ekor/hari. Perlakuan pada hari ke 6-15 masa kebuntingan; ns; dengan ki-kuadrat tidak berbeda, s : berbeda nyata ($P < 0.05$).

Dosis Na-borat yang digunakan dalam penelitian ini merupakan dosis yang sudah terbukti menimbulkan malformasi yang cukup berat (Sunaryo dan Pangestiniingsih, 1992). Dosis riboflavin yang digunakan juga merupakan megadosis yaitu 20 kali lebih besar dari kebutuhan riboflavin yang dibutuhkan oleh tikus yang sedang tumbuh sebesar 120 mg/hari (Farris dan Griffith, 1971).

Asam borat bersifat teratogen pada ayam. Perubahan yang terjadi mirip efek teratogenik akibat defisiensi riboflavin (Goldstein dkk., 1974). Diperkirakan borat dalam tubuh berikatan dengan sisi ribitol riboflavin. Ikatan tersebut membentuk suatu kompleks yang larut dalam air dan merupakan metabolit yang tidak aktif (Rennie dkk., 1990). Kompleks riboflavin borat terdapat dalam plasma darah dan mengurangi jumlah riboflavin bebas yang seharusnya membentuk ikatan dengan protein (White dkk., sitasi Rennie dkk., 1990). Pemberian borat 15 g/kg pakan bersama-sama dengan riboflavin 6 mg/kg pakan dalam waktu 10 hari



Gambar 6. Gambar 4 ekor fetus berasal dari induk yang diberi Na borat 180 mg/200 g BB/hari + riboflavin 2,5 mg/ekor/hari pada masa kebuntingan hari ke 6 - 15. Tikus no 3 normal, tikus no 1, 2 dan 4 mengalami omfalokel. Tikus no 1 tidak punya batas jelas antara kepala dan dada.



Gambar 7. Keterangan sama dengan Gambar 3. Fetus menunjukkan eksensefali.

menurunkan konsentrasi riboflavin dalam plasma darah, kuning telur dan albumen (Rennie dkk., 1990).

Dalam penelitian ini pemberian Na-borat sebanyak 180 mg / 200 g BB/hari menimbulkan berbagai malformasi fetus. Keadaan ini sesuai dengan yang terjadi pada ayam seperti yang dikemukakan oleh Rennie dkk. (1990). Gangguan fungsi riboflavin karena borat mungkin juga dapat terjadi pada tikus. Gangguan fungsi riboflavin juga akan mengganggu pertumbuhan fetus (Smith dkk., 1983). Yang tidak dapat dimengerti mengapa pemberian riboflavin, justru menambah parahnya malformasi (Tabel 1 dan 2). Seandainya pemberian riboflavin sudah tidak berguna karena diberikan 2 jam sesudah pemberian Na borat, dan Na-borat sudah terlanjur bekerja, tentunya hasil malformasi yang ditimbulkan hanya setingkat dengan pemberian Na-borat saja dan tidak lebih parah. Demikian pula seandainya mekanisme teratogenik Na-borat bukan melalui gangguan riboflavin seperti yang terjadi pada ayam, tentunya pemberian Na-borat akan memberikan malformasi yang sama dengan Na-borat dan riboflavin. Masih terlalu spekulatif untuk memperkirakan bahwa pemberian borat tidak hanya membuat riboflavin tidak berfungsi dengan baik, tetapi ikatan Na-borat dan riboflavin (yang diberikan berlebihan) bersifat lebih teratogenik dibanding dengan pemberian Na-borat dalam kondisi riboflavin normal (tanpa suplemen tambahan).

Untuk menjawab pertanyaan-pertanyaan di atas masih perlu dilakukan penelitian lebih mendalam, antara lain dengan pemberian riboflavin dalam berbagai tingkatan, dengan pengukuran borat dan riboflavin baik dalam darah sirkulasi induk maupun fetus. Dalam penelitian ini pemberian riboflavin tidak menurunkan efek Na-borat seperti yang diperkirakan, tetapi sebaliknya bahkan memperparah.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1991. Ancaman boraks lewat bakso. Tempo, no. 1, tahun XXI. PT Gramedia, Jakarta : 37.
- Berry, CL. 1983. Reproductive toxicity, dalam *Animals and alternatives testing* : Acad. Press, London : 197-226.
- Delatour, P. 1983. Chemical induced teratogenesis, dalam *Veterinary pharmacology and toxicology*, ed. 2. MTP Press, Lt. Boston the Hagut Dor Dracht, Landscasten : 93-97.
- Farris, EJ dan Griffith Jr, JQ. 1971. *The rat in laboratory investigation*. Hafner Publishing Co. New York : 89-90.
- Goldstein, A, Aronow, L, Kalman, SM. 1974. *Principles of drug action*, ed. 2 Wiley Biomed. Publ., New York : 158-175.
- Harbinson, RD. 1980. Teratogens, dalam *Toxicology, the basic science of poisons*, editor Klaasen DJ, Amdur MO. ed.2. McMillan Publ. Co., New York : 158-175.
- Humason, GL. 1967. *Animal tissue techniques*. Freeman & Co., London : 64-67.
- Martin, DW. 1984. Vitamin yang larut dalam air dalam *Biokimia (Review of biochemistry)*, ed. 2. Alih bahasa Adji Dharma dan Andreas Sanusi, E.G.C. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Rennie, JS, Whitehead, CC, Montanari, A. 1990. Effects of dietary borate and aluminate on riboflavin metabolisme in the breeding hen. *Res. in vet. science*, 49 : 253-255.
- Scefler, WC. 1984. *Statistics for health professionals*. Addison - Wesley Publ. Co., California : 253-255.
- Smith, EL, Hill, RL, Lehman, IR, Lefkowitz, RJ, Handler, P, White, A. 1983. *Principles of biochemistry, mammalian biochemistry*, ed. 7. McGraw Hill Book Co., New York : 644-647.
- Snedecor, GW, Cochran, WG. 1967. *Statistical methods*, ed. 2. Oxford & IBH Publ. Co. : 104-105.

Sollman, T. 1957. A manual of pharmacology and its applications to therapeutics and toxicology, ed. 8. WB Saunders Co., Philadelphia : 1535-1536.

Sunaryo, S, dan Pangestiningih, TW. 1992. Cacat fetus akibat pemberian asam borat pada induk di masa kebuntingan. Penelitian DPP Fakultas Kedokteran Hewan UGM.

(SS)