

Efek Toksin T-2 terhadap Perkembangan Embrio Praimplantasi dan Fetus Mencit Swiss Webster

The Effects of T-2 Toxin on Preimplantation Embryos and Fetuses of Swiss Webster Mice

AGUS HARYONO^{1*}, TIEN WIATI SURJONO², SRI SUDARWATI²

¹Study Programme of Biology Education, Palangkaraya University, Jalan Yos Sudarso C-11, Kampus Tunjung Nyaho, Palangkaraya 73112, Indonesia

²School of Life Sciences and Technology, Bandung Institute of Technology, Jalan Ganesha 10, Bandung 40132, Indonesia

Received July 26, 2006/Accepted February 28, 2007

T-2 toxin is a toxic and teratogenic mycotoxin produced by *Fusarium tricinctum* which may contaminate cereal, seed, and food. The aim of this research is to find out the effects of T-2 Toxin on preimplantation embryos and fetuses of Swiss Webster mice. Pregnant female of Swiss Webster mice on 0 or 2 day of gestation was injected intraperitoneally with T-2 toxin at doses 0.05 or 0.10 mg/kg body weight (bw) and the dam was observed at 3.5 and 18 days of gestation. At 0 day of gestation, embryos were arrested at one to eight cell and uncompact morulae stages ($P < 0.01$) compared to control, in both 0.05 and 0.10 mg/kg bw doses. The cell numbers of late blastocyst at all treated groups were decreased significantly compared to control. At 2 day of gestation, most of embryos were arrested on compacted morulae stage at dose 0.10 mg/kg bw ($P < 0.01$), the late blastocyst and its cell number were dose-dependently decreased. The live fetuses decreased significantly at all dose of T-2 toxin. No external malformation occurred in the fetuses. Results showed that T-2 toxin given at preimplantation stages inhibited development of preimplantation embryos as indicated by decreased number of live fetuses. Therefore, it was grouped as embryotoxic agent but those dosages did not cause malformation of the external appearance of Swiss Webster mice fetuses.

Key words: *Fusarium tricinctum*, T-2 toxin, mycotoxin, preimplantation embryos, embryotoxic

PENDAHULUAN

Beberapa jenis jamur dapat tumbuh pada makanan dan bahan makanan, seperti jamur *Fusarium* (Russell *et al.* 1991). Di Indonesia, jenis *Fusarium tricinctum* merupakan jamur yang tumbuh pada beras, kacang tanah dan jagung yang disimpan di dalam gudang (Haryoso 1976; Soesilowati 1992).

Fusarium tricinctum dapat menghasilkan toksin T-2 sebagai salah satu mikotoksin dari golongan Trikoteken yang bersifat toksik dan teratogenik (Schieffer *et al.* 1987). Setiap 1 kg berat kering biji-bijian yang terkontaminasi dengan *F. tricinctum* menghasilkan 2 mg toksin T-2 (Smalley 1973). Toksin T-2 dapat masuk ke dalam sel tubuh embrio dan menghambat sintesis protein, DNA dan RNA, serta mengganggu pembentukan gelendong pembelahan (Gyongyossy-Isa *et al.* 1985; Rousseaux & Schieffer 1987). Bila diberikan pada tahap organogenesis mencit, toksin T-2 mengakibatkan oligodaktili, sindaktili, eksensefali, dan terganggunya perkembangan rahang, bahkan dapat mengalami kematian (Stanford *et al.* 1975; Rousseaux & Schieffer 1987). Penurunan kemampuan fagositosis sel makrofag pada mencit terjadi akibat perlakuan dengan toksin T-2, baik secara *in vivo* maupun *in vitro* (Vidal & Mavet 1989). Efek toksin T-2 yang diberikan pada tahap

pembentukan sistem saraf fetus mencit Swiss Webster menyebabkan apoptosis pada sel-sel mesenkim yang membangun sistem saraf pusat (Ishigami *et al.* 1999). Efek T-2 toksin pada tahap praimplantasi mencit Swiss Webster belum diketahui secara pasti. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek toksin T-2 terhadap perkembangan embrio praimplantasi dan fetus mencit Swiss Webster. Perkembangan embrio diamati pada umur kebuntingan 3.5 hari dan kelainan pada fetus pada umur kebuntingan 18 hari.

BAHAN DAN METODE

Mencit Swiss Webster yang digunakan berjumlah 90 ekor berumur 10-12 minggu dengan berat 25-35 g. Sebanyak 72 ekor digunakan untuk pengamatan praimplantasi dan sisanya untuk pengamatan kelainan perkembangan pascaimplantasi. Penentuan umur kebuntingan dilakukan dengan cara mengawinkan mencit pada sore hari dan adanya sumbat vagina pada keesokan harinya ditentukan sebagai umur kebuntingan 0 hari (Taylor 1987).

Toksin T-2, Dosis, dan Umur Perlakuan. Toksin T-2 berasal dari Makor Chemical Ltd, Jerusalem. Dosis yang digunakan yaitu 0.05 atau 0.10 mg/kg bb, dosis tersebut didasarkan pada efek toksin T-2 bila diberikan pada tahap organogenesis dapat memunculkan berbagai kelainan

*Corresponding author. Phone/Fax: +62-536-3222157,
E-mail: h.suga@lycos.com

(Stanford *et al.* 1975). Pemberian toksin T-2 dilakukan secara intraperitoneal dalam 0.1 ml/10 g berat badan (bb) mencit pada umur kebuntingan nol hari atau dua hari. Sebagai kontrol, induk mencit hanya diberi propilen glikol 0.1 ml/10 g bb sebagai pelarut toksin T-2.

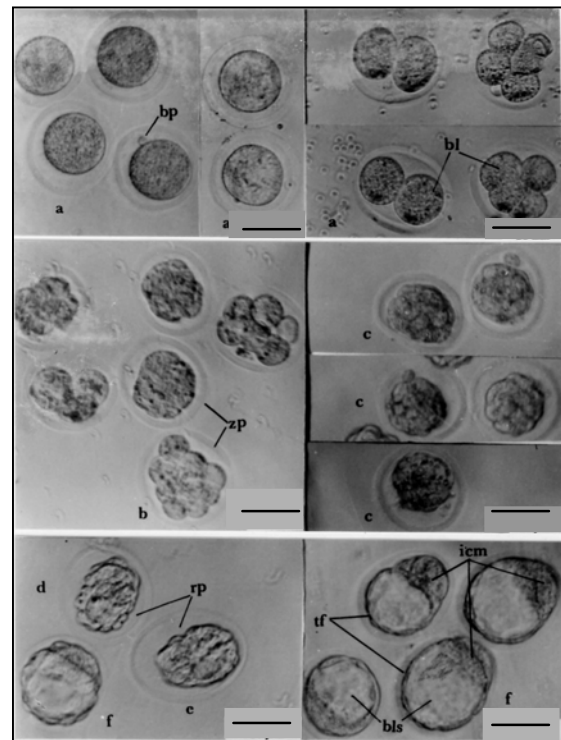
Koleksi Embrio, Penentuan Tahap Embrio Praimplantasi, dan Jumlah Sel Blastosis Akhir. Induk mencit yang diberi perlakuan dengan toksin T-2 maupun pelarut toksin T-2 pada umur kebuntingan nol atau dua hari, kemudian dibunuh pada umur kebuntingan 3.5 hari secara dislokasi leher dan dibedah. Uterus dan oviduk diambil dan ditempatkan dalam kaca arloji yang berisi larutan Hank. Embrio dikumpulkan dengan cara menyemprot oviduk dan uterus dengan larutan Hank menggunakan jarum 30 G, kemudian embrio dicuci dua kali dengan larutan Hank. Tahap perkembangan embrio ditentukan berdasarkan Setiorini *et al.* (1991), kemudian dihitung jumlahnya. Jumlah sel embrio yang mencapai tahap blastosis akhir dihitung dengan metode Tarkowski (1966) yang dimodifikasi. Zona pelusida dihancurkan dengan larutan tyrode (Hogan *et al.* 1986) dan dibiarkan 1 menit. Larutan tyrode dibuang, kemudian embrio dicuci dengan larutan NaCl 0.9% dua kali. Larutan tersebut diganti dengan larutan hipotonis (Natrium sitrat 0.7%) dan dibiarkan selama 15-20 menit. Setelah embrio mengembang, larutan hipotonis dibuang, kemudian diteteskan larutan fiksatif (metanol:asam asetat glacial = 3:1) dan dikeringkan. Embrio pada kaca objek kemudian diwarnai dengan Giemsa 2.5% selama 5 menit, dan dicuci dengan air mengalir. Jumlah blastomer dihitung menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran lensa objektif 20 x. Uji beda nyata ditentukan dengan uji *t Student* dan uji jumlah pangkat Wilcoxon (Steel & Torrie 1997).

Pengamatan Kelainan pada Fetus Mencit Swiss Webster. Induk mencit yang diperlakukan dengan toksin T-2 pada umur kebuntingan dua hari, kemudian dibunuh secara dislokasi leher pada umur kebuntingan 18 hari. Selanjutnya dilakukan pengamatan mengenai jumlah implantasi, fetus hidup, fetus mati, jumlah embrio yang diresorpsi, dan jumlah korpus luteumnya. Fetus yang hidup ditimbang dan diamati adanya kelainan eksternal menggunakan mikroskop stereo. Untuk mengetahui persentase kematian intrauterus, fetus hidup, kelainan eksternal, dan kehilangan praimplantasi digunakan rumus menurut Manson dan Kang (1989). Selanjutnya uji beda nyata dilakukan dengan uji *t Student* atau uji jumlah pangkat Wilcoxon (Steel & Torrie 1997).

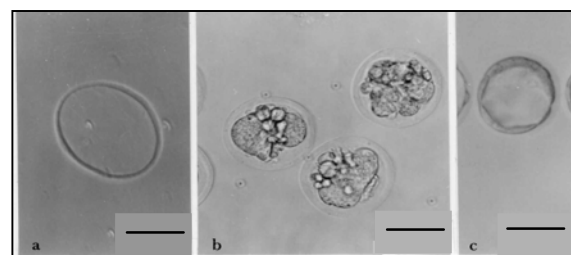
HASIL

Pengaruh Toksin T-2 yang Diberikan pada Umur Kebuntingan Nol Hari. Embrio yang ditemukan terdiri atas embrio satu sampai dengan delapan sel, morula tidak kompak, morula kompak, morula, blastosis awal, blastosis akhir (Gambar 1) dan embrio yang mengalami kelainan perkembangan (Gambar 2). Persentase embrio yang mencapai tahap blastosis akhir, baik pada dosis 0.05 maupun 0.10 mg/kg bb, menurun dan berbeda nyata ($P < 0.05$) dibandingkan dengan kontrol. Penurunan ini disebabkan oleh peningkatan jumlah embrio yang terhambat perkembangannya. Pada perlakuan dengan

dosis 0.05 mg/kg bb, embrio yang terhambat perkembangannya terjadi pada tahap 1-8 sel mencapai 37.12% dan pada dosis perlakuan 0.10 mg/kg bb meningkat menjadi 39.03% lebih tinggi ($P < 0.01$) dibandingkan dengan kontrol. Demikian pula dengan embrio yang terhambat pada tahap morula, persentase total meningkat sejalan dengan kenaikan dosis. Pada perlakuan dengan dosis 0.05 mg/kg bb, jumlah embrio mencapai 41.79% dan pada dosis 0.10 mg/kg bb meningkat menjadi 46.86% yang berbeda dibandingkan dengan kontrol. Jumlah sel yang menyusun blastosis akhir mengalami penurunan ($P < 0.05$) dibandingkan dengan kontrol. Pada perlakuan dengan dosis 0.05 mg/kg bb jumlah sel menurun (35.85 ± 1.31), bahkan pada



Gambar 1. Berbagai tahap perkembangan embrio praimplantasi mencit Swiss Webster yang diberi perlakuan dengan toksin-T-2 dosis 0.1 mg/kg berat badan. a. satu sampai delapan sel, b. morula tidak kompak, c. morula kompak, d. blastosis awal, e. blastosis sedang, f. blastosis akhir, zp: zona pelusida, bl: blastomer, rp: rongga perivitelin, bp: badan polar, tf: trofektoderm, icm: inner cell mass, bls: blastosol. Bar = 50 μ m.



Gambar 2. Berbagai kelainan pada embrio praimplantasi mencit Swiss Webster yang diberi perlakuan dengan toksin-T-2 dosis 0.5 mg/kg berat badan. a. zona pelusida tanpa embrio, b. embrio degeneratif, c. blastosis abnormal. Bar = 50 μ m.

Tabel 1. Keadaan perkembangan embrio praimplantasi yang diamati pada umur kebuntingan 3.5 hari dari induk mencit yang diberi perlakuan secara intraperitoneal dengan toksin T-2 pada umur kebuntingan (uk) nol dan dua hari.

uk (hari)	Dosis (mg/kg bb)	Jumlah induk	Rataan jumlah embrio $\bar{X} \pm \text{std}$ (jumlah) @	Rataan jumlah korpus luteum $\bar{X} \pm \text{std}$ (jumlah) @	Persentase embrio yang mengalami hambatan perkembangan dan embrio abnormal (jumlah)#											
					Embrio yang terhambat perkembangannya						Embrio abnormal					
					Morula			Blastosis			Blastosis akhir	Embrio tanpa ICM			Total	
					1-8 sel	Tidak kompak	Kompak	Total	Awal	Sedang		Total	ZP tanpa embrio	Embrio fragmentasi		Embrio tanpa ICM
Nol	Kontrol	12	9.50 ± 1.78 (114)	11.25 ± 1.54 (135)	0.75 (1)	1.66 (2)	19.75 (23)	21.41 (25)	7.00 (8)	8.32 (9)	15.21 (17)	60.45 (69)	0.00 (0)	1.19 (1)	0.93 (1)	2.12 (2)
	0.05	12	8.75 ± 3.13 (105)	11.17 ± 3.60 (134)	37.12** (46)	21.44** (21)	20.35 (22)	41.79 (43)	3.53 (5)	1.20 (1)	4.73* (6)	10.5** (10)	1.20 (1)	4.65 (3)	0.00 (0)	5.85 (4)
	0.10	12	8.50 ± 2.58 (102)	10.10 ± 2.12 (122)	39.02** (45)	33.95** (30)	12.88 (14)	46.86* (44)	5.95 (6)	3.42 (3)	9.37 (9)	3.58** (3)	1.19 (1)	0.00 (0)	0.00 (0)	1.19 (1)
Dua	Kontrol	12	9.00 ± 1.75 (108)	11.58 ± 2.5 (139)	0.00 (0)	7.26 (7)	4.66 (5)	11.92 (12)	4.71 (5)	5.03 (6)	9.74 (11)	78.32 (85)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)
	0.05	12	10.90 ± 2.57 (131)	12.41 ± 2.27 (149)	6.38* (7)	13.72 (22)	7.84 (10)	21.56 (32)	9.09 (12)	2.63 (4)	11.72 (16)	47.82** (63)	0.76 (1)	11.72 (12)	0.00 (0)	12.48 (13)
	0.10	12	10.00 ± 2.89 (120)	11.50 ± 2.06 (138)	2.51 (3)	14.85 (19)	28.27** (36)	43.12** (55)	7.13 (8)	8.25 (9)	15.38 (16)	34.39** (41)	0.00 (0)	0.00 (0)	3.66 (5)	3.66 (5)

#Uji Wilcoxon's rank sum test terhadap kontrol; @: uji statistik t-Student terhadap kontrol; ICM: Inner Cells Mass; ZP: zona pelusida; *: berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95% (pada satu kolom); **: berbeda sangat nyata pada taraf kepercayaan 99% (pada satu kolom)

dosis 0.10 mg/kg bb tidak ditemukan blastosis akhir (Tabel 2). Total embrio yang mengalami kelainan, pada dosis perlakuan 0.05 mg/kg bb ditemukan zona pelusida tanpa embrio (1.2%) dan embrio yang mengalami fragmentasi (4.65%) cenderung meningkat dibandingkan dengan kontrol (Tabel 1, Gambar 2).

Pengaruh Toksin T-2 yang Diberikan pada Umur Kebuntingan Dua Hari. Persentase blastosis akhir dari kelompok perlakuan umur kebuntingan dua hari ditemukan menurun sejalan dengan kenaikan dosis (Tabel 1). Pada perlakuan dengan dosis 0.05 mg/kg bb, persentase embrio yang mencapai blastosis akhir 47.82% dan semakin menurun pada dosis 0.10 mg/kg bb mencapai 34.39% yang berbeda dibandingkan dengan kontrol (78.32%). Hambatan

perkembangan pada tahap morula mencapai 43.12% meningkat dibandingkan dengan kontrol (11.92%) yaitu terjadi pada perlakuan dengan dosis 0.10 mg/kg bb. Pada perlakuan dengan dosis 0.05 mg/kg bb, persentase embrio tahap morula cenderung meningkat (21.56%). Persentase embrio yang terhambat perkembangannya pada tahap 1-8 sel terjadi dari kelompok perlakuan dengan dosis 0.05 mg/kg bb, sedangkan pada dosis 0.10 mg/kg bb cenderung sama dengan kontrol (Tabel 1). Jumlah sel yang menyusun blastosis akhir menurun, baik pada perlakuan dengan dosis 0.05 mg/kg bb (39.52 ± 5.63) maupun pada dosis 0.10 mg/kg bb (36.06 ± 5.77) lebih sedikit ($P < 0.05$) dibandingkan dengan kontrol (59.05 ± 7.65). Total embrio yang mengalami kelainan, pada dosis perlakuan 0.05 mg/kg bb cenderung meningkat dibandingkan dengan kontrol. Namun peningkatan kelainan tersebut tidak sejalan dengan kenaikan dosis. Jumlah fetus hidup menurun sejalan dengan kenaikan dosis, perlakuan dengan dosis 0.05 mg/kg bb mencapai 86.33% dan menurun pada perlakuan dengan dosis 0.10 mg/kg bb menjadi 83.09%. Penurunan tersebut disebabkan oleh semakin meningkatnya kematian intrauterus yang mencapai 13.64% pada dosis 0.05 mg/kg bb dan 12.64% pada dosis perlakuan 0.10 mg/kg bb (Tabel 3). Kelainan eksternal pada fetus hanya ditemukan pada perlakuan 0.10 mg/kg bb yaitu berupa hematoma (1%) dan eksensefali mencapai 3.3%.

Tabel 2. Jumlah sel yang menyusun blastosis akhir pada perlakuan dengan toksin T-2 secara intraperitoneal pada umur kebuntingan (uk) nol atau dua hari

uk (hari)	Dosis mg/kgbb	Jumlah induk	Jumlah blastosis	Rataan jumlah sel blastosis
Nol	0.00	6	18	59.15 ± 5.50a
	0.05	6	8	35.85 ± 1.31b
	0.10	6	0	0.00c
Dua	0.00	6	18	59.05 ± 7.65a
	0.05	6	15	39.52 ± 5.63b
	0.10	6	10	36.06 ± 5.57b

Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama, tidak berbeda nyata berdasarkan LSD (Least Significance difference) taraf 1%

Tabel 3. Penampilan reproduksi induk mencit yang diberi toksin T-2 secara intraperitoneal pada umur kebuntingan dua hari dan diamati pada umur kebuntingan 18 hari

Dosis (mg/kg bb)	Jumlah induk	Jumlah korpus luteum total $\bar{x} \pm \text{std}$ @	Jumlah implantasi total $\bar{x} \pm \text{std}$ @	Kehilangan praimplantasi total (%) b	Fetus hidup		Kematian intrauterus			Pertambahan berat badan induk (gram) b
					Jumlah (%) b	Rataan (gram) @	Jumlah fetus mati (%) b	Embrio diresopsi (%) b	Total	
0.00	6	69	66	3	65	1.24 ± 0.11	0	1	1	24.1 ± 1.90
		11.50 ± 1.60	11.00 ± 1.29	(3.96)	(98.33)			(1.66)	(1.66)	
0.05	6	65	58	7	51	1.09 ± 0.14	6	1	7	17.5 ± 6.37*
		13.00 ± 1.78	11.60 ± 2.00	(9.08)	(86.33)*			(11.64)*	(1.96)	(13.64)*
0.10	6	75	66	9	52	1.04 ± 0.17	14	0	14	15.4 ± 2.81*
		12.50 ± 1.70	11.00 ± 1.63	(10.86)	(83.09)**			(12.64)**	(0)	(12.64)**

Uji t Sudent terhadap kontrol. b: Uji Wilcoxon's rank sum test terhadap kontrol, std: standar deviasi, *: berbeda nyata pada taraf 95%, **: berbeda sangat nyata pada taraf 99%.

PEMBAHASAN

Efek suatu teratogen terhadap perkembangan embrio dicerminkan dari jumlah sel mati atau terhambat perkembangannya. Apabila jumlah sel yang mati banyak, mengakibatkan embrio mati, sedangkan bila sedikit, maka sel sisanya dapat mengganti sel yang rusak dan embrio berkembang secara normal (Spielmen *et al.* 1977; Wilson 1977). Pernyataan itu dikenal dengan teori *all or none* seperti juga dikemukakan oleh Nagao *et al.* (1986). Toksin T-2 yang diberikan pada tahap praimplantasi menyebabkan hambatan perkembangan embrio dengan menurunnya jumlah embrio yang mencapai tahap blastosis akhir, baik pada dosis perlakuan 0.05 maupun 0.10 mg/kg bb. Hal itu menunjukkan, bahwa embrio mengalami hambatan dan tidak dapat berkembang.

Pada penelitian ini, persentase embrio yang paling banyak terhambat ditemukan terjadi pada tahap satu sampai delapan sel dan morula kompak pada perlakuan umur kebuntingan nol hari, sedangkan pada perlakuan umur kebuntingan dua hari terutama terjadi pada tahap perkembangan morula. Hal itu disebabkan oleh perbedaan tahap perkembangan embrio pada saat terdedah dengan toksin T-2. Pada umur kebuntingan nol hari, embrio masih berada pada tahap satu sel, sedang pada umur kebuntingan dua hari, embrio sudah mencapai 8-16 sel (Rugh 1986). Hasil yang sama juga ditemukan akibat perlakuan dengan mitomicin C (Nagao *et al.* 1986) dan metil merkuri (Kajiwara & Inouye 1986). Hambatan perkembangan embrio oleh kedua toksin tersebut terjadi pada satu sampai dengan delapan sel, bila diberikan pada umur kebuntingan nol hari.

Pada perkembangan normal, embrio mencit Swiss Webster umur kebuntingan 3.5 hari sudah mencapai tahap blastosis akhir. Diduga, toksin T-2 bersifat embriotoksik dengan menghambat pembelahan sel atau blastomer, sehingga ketika toksin T-2 masuk ke dalam uterus menghambat perkembangan embrio pada tahap tertentu. Toksin T-2 dapat masuk ke dalam sel tubuh embrio dan menghambat sintesis protein, DNA, dan RNA, serta mengganggu pembentukan gelendong pembelahan (Gyongyossy-Isa *et al.* 1985; Rousseaux & Schieffer 1987). Uji beberapa teratogen terhadap perkembangan praimplantasi memperlihatkan kejadian utama seperti yang terjadi oleh toksin T-2 yaitu berupa hambatan perkembangan pada embrio (Nagao *et al.* 1986; Setiorini *et al.* 1991; Darmanto *et al.* 1994; Sumarsono *et al.* 2001). Hal tersebut mengakibatkan jumlah blastosis akhir menurun yang sesuai dengan hasil penelitian akibat perlakuan toksin T-2.

Pembelahan sel embrio mamalia pada tahap praimplantasi hanya memiliki dua fase pembelahan yaitu: mitosis dan sintesis DNA (Muray & Hunt 1993; Gilbert 1997), sedangkan kontrol pembelahan dikendalikan oleh mRNA dari maternal embrio (fase transisi) dan mRNA embrional. Pada umur kebuntingan nol dan dua hari, ketika embrio masih berada pada tahap 1-8 sel, kontrol genom masih dilakukan oleh mRNA maternal. Christian *et al.* (2000) mengemukakan bahwa kegagalan pewarisan mRNA dari gen *Heat shock factor 1 (Hsf1)* menyebabkan kegagalan pembelahan zigot. Dengan demikian kehadiran toksin T-2 dapat mengganggu kontrol

genom pada masa transisi, dan kontrol genom embrio yang dapat mengakibatkan kelambatan pembelahan sel.

Toksin T-2, secara tidak langsung dapat menyebabkan penurunan persentase blastosis akhir pada perkembangan embrio dan mengganggu fisiologis induk. Hal itu terbukti dari penurunan berat badan induk pada kelompok perlakuan (Tabel 3). Toksin T-2 yang diberikan pada tahap pascaimplantasi atau organogenesis bersifat toksik pada induk (Smalley 1973), ditandai dengan penurunan berat badan, perdarahan pada lambung, jantung, dan paru-paru. Dengan terganggunya fisiologis induk, secara tidak langsung akan mengganggu proses perkembangan embrio. Selain itu, toksin T-2 juga dapat mengakibatkan lisis pada blastomer. Hal itu dibuktikan dengan kultur makrofag dalam medium yang ditambahkan toksin T-2, sel menjadi lisis karena toksin T-2 dapat meningkatkan permeabilitas membran sel (Kemppaine *et al.* 1986). Peningkatan permeabilitas membran sel akibat toksin T-2 dapat mengaktifkan *caspase-3*, sehingga terjadinya fragmentasi DNA, kemudian sel mengalami apoptosis (Bouaziz *et al.* 2006).

Penelitian untuk mengetahui kelainan perkembangan akibat toksin T-2 digunakan perlakuan umur kebuntingan dua hari. Hal itu diputuskan karena jumlah sel yang menyusun blastosis akhir pada umur perlakuan dua hari lebih banyak dibandingkan dengan nol hari (Tabel 2). Toksin T-2 juga bersifat embriotoksik dengan menurunnya jumlah fetus hidup karena meningkatnya jumlah embrio yang direabsorpsi (Tabel 3). Embrio yang mengalami kelainan terjadi sebagai kelainan yang spontan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bouaziz C, Abid S, Bouslimi AE, Golli E, Bacha H. 2006. Cytotoxicity and related effects of T-2 toxin on cultured Vero cells. *Toxicon* 3:343-52.
- Christian E, Davis AA, Thomas SD, Benyamin IJ. 2000. Maternal effect of Hsf1 on reproductive success. *Nature* 407:693-694.
- Darmanto W, Kabir N, Inouye M, Takagishi Y, Yamamura H. 1994. Effects of methoxyethanol and methoxyacetic acid on preimplantation embryos *in vivo*. *Environ Med* 38:29-32.
- Gilbert SF. 1997. *Developmental Biology*. 5th ed. Sunderland: Sinauer Assoc.
- Gyongyossy-Isa MIC, Khana V, Khachatourians CG. 1985. Changes induced by T-2 toxin in the erythrocyte membrane. *Fd Chem Toxic* 24:311-317.
- Haryoso 1976. *Jamur penghasil mikotoksin pada beras dan gabah* [Thesis]. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Hogan B, Constantini F, Lacy E. 1986. *Manipulation the Mouse Embryo, a Laboratory Manual*. New York: Cold-Spring Lab.
- Ishigami N *et al.* 1999. Apoptosis in the developing mouse embryos from T-2 toxin-inoculated dams. *Histol Histopathol* 3:729-733.
- Kajiwara Y, Inouye M. 1986. Effects of methylmercury and mercury chloride on preimplantation mouse embryos *in vivo*. *Teratology* 33:231-237.
- Kemppaine BW, Riley RT, Pace JG, Hoer FJ. 1986. Effects of skin storage condition and concentration of applied dose on (H) T-2 toxin penetration through excised human and monkey skin. *Fd Chem Toxic* 24:221-227.
- Manson JM, Kang YJ. 1989. Test Methods for Assessing Female Reproduction and Developmental Toxicology. In: Hayes AW (ed). *Principles and Methods of Toxicology*. New York: Raven P Ltd. p 354-355.
- Muray A, Hunt T. 1993. *The Cell Cycle. An Introduction*. New York: Oxford Univ Pr.

- Nagao T, Ishizuka Y, Mizutami M. 1986. Effects of mitomycin C treatment before implantation on development of mouse embryo. *Cong Anom* 26:93-101.
- Rousseaux CG, Schieffer HB. 1987. Maternal toxicity, embryoletality, and abnormal fetal development in CD-1 mice following one dose of T-2 toxin. *J App Toxicol* 7:281-288.
- Rugh R. 1986. *The Mouse*. Minneapolis: Burges Publ Comp.
- Russell L, Cox DF, Larsen G, Bodwell K, Nelson CE. 1991. Incidence of molds and mycotoxin in commercial animal feed mills in seven Midwestern States. *J Anim Sci* 69:5-12.
- Schieffer HB, Rousseaux CG, Hancock CS, Blakley BR. 1987. Effect of low-term oral exposure to T-2 toxin in CD-1 mice. *Food Chem Toxic* 25:593-601.
- Setiorini R, Inouye M, Oda S. 1991. Effects of zinc chloride, mercuric chloride, and cadmium chloride on preimplantation mouse embryos *in vivo*. *Environ Med* 35:135-138.
- Smalley EB. 1973. T-2 toxin. *JAVMA* 163:1278-1280.
- Soesilowati R. 1992. *Deteksi jamur pada beras di gudang dolog Jawa Barat*. Bandung: Departemen Biologi, Institut Teknologi Bandung.
- Spielmen H, Eibs HG, Merker HJ. 1977. Effects of cyclophosphamide treatment before implantation on the development of rat embryo after implantation. *J Embryol Exp Morph* 41:65-78.
- Stanford GK, Hood RD, Hayes AW. 1975. Effects of prenatal administration of T-2 toxin to mice. *J Chem Path Pharm* 10:743-746.
- Steel RG, Torrie RD. 1997. *Principles and Procedure of Statistic, A Biometry Approach*. Ed Ke-3. Singapura: Mc Graw-Hill, Inc.
- Sumarsono H, Adelina M, Kusumaningtyas H. 2001. Asam metoksiasetat menurunkan kualitas embrio mencit Swiss Webster tahap praimplantasi. *Hayati* 8:62-65.
- Tarkowski AK. 1966. An air drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenetics* 5:394-400.
- Taylor LR. 1987. *Practical Teratology*. London: Acad Pr.
- Vidal D, Mavet S. 1989. In vitro and in vivo toxicity of T-2 toxin, a *Fusarium* mycotoxin, to mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 7:2260-2264.
- Wilson JG. 1977. *Environment and Birth Defects*. New York: Acad Pr.