

PENGARUH ENDOXAN-ASTA (CYCLOPHOSPHAMIDE)  
PADA PERTUMBUHAN EMBRYO AYAM

Sri Sudarwati dan Tien Wiati Suryono \*)

R I N G K A S A N

Telah diteliti pengaruh Endoxan-Asta (cyclophosphamide) terhadap pertumbuhan embrio ayam dengan jalan menyuntikkannya ke dalam kantung yolk pada umur 4 dan 5 hari inkubasi.

Didapatkan, bahwa dosis teratogenik adalah 0.04 mg per telur. Malformasi yang ditimbulkannya adalah: gelembung meliputi mata, kelopak mata yang tidak tumbuh dengan sempurna, mata yang tidak tumbuh samasekali, paruh dengan sisi lateral yang bercelah, paruh bawah atau paruh atas yang pendek, paruh menyilang, micromelia, syndactyli, ectrodactyli, ectopia viscerum, exencephali dan "cleft palate". Selain itu Endoxan-Asta berpengaruh menghambat pertumbuhan pada umumnya.

A B S T R A C T

The influence of Endoxan-Asta (cyclophosphamide) on the development of chick embryos has been investigated by injecting the substance into the yolk sac of 4 and 5 days incubated eggs.

It was found that 0.04 mg Endoxan-Asta per egg is a teratogenic dose. Malformations obtained during the investigation were: bulb

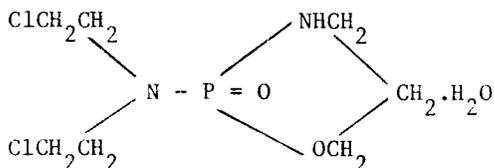
---

\*) Departemen Biologi, Institut Teknologi Bandung.

over the eye, eyelids not well developed, undeveloped eyes, cleft on the lateral sides of upper beak, short upper or lower beak, crossed beak, micromelia, syndactyly, ectrodactyly, ectopia viscerum, exencephaly and cleft palate. Besides that, Endoxan-Asta caused stunted growth.

## PENDAHULUAN

Cyclophosphamide, suatu agens antitumor yang sangat ampuh, tergolong dalam kelompok "alkylating agents" dan merupakan obat yang digunakan untuk chemoterapi kanker. Cyclophosphamide mempunyai rumus:



Percobaan Foye *et al.* (1960) membuktikan, bahwa obat ini sangat baik hasilnya dalam terapi malignant lymphoma, epidermoid carcinoma paru-paru dan epidermoid carcinoma larynx.

Cyclophosphamide yang diinjeksikan secara intraperitoneal pada mencit yang sedang mengandung pada hari-hari ke-9 sampai 14 dengan dosis 20 mg/kg menyebabkan bertambahnya jumlah embryo yang diresorpsi dan juga mempunyai efek teratogenik yang bermacam-macam, seperti: "cleft palate", exencephali, kelainan-kelainan pada digit, ekor yang pendek, polydactyli, syndactyli, ectrodactyli, adactyli, bersatunya tulang-tulang panjang, bengkaknya tulang-tulang panjang, hilangnya rusuk, mata terbuka, aphakia, microphakia, hydronephrosis dan hydrocephalus (Gibson dan Becker, 1968).

Cyclophosphamide juga bersifat teratogenik pada tikus dengan dosis 7-10 mg/kg hanya bila diinjeksikan secara intraperitoneal pada hari-hari mengandung yang ke-11 dan 12. Anomali yang didapat adalah: exencephali, "cleft palate", kaki-kaki yang abnormal dan juga ekor yang abnormal (Chaube *et al.*, 1967).

Penelitian yang dilakukan sekarang ini bertujuan untuk mempelajari bagaimana pengaruh cyclophosphamide bila diinjeksikan ke dalam kantung yolk embryo ayam yang sudah memperlihatkan pertumbuhan dari tunas-tunas ekstrimitas.

## BAHAN DAN TATAKERJA

Telur-telur fertil ayam "white leghorn" diperoleh dari peternak ayam "Missouri" di Bandung.

Telur-telur diinkubasikan dengan menggunakan mesin-mesin penetas telur buatan "Missouri" Bandung. Setelah embryo berumur 4 dan 5 hari inkubasi, telur-telur diinjeksi dengan larutan Endoxan-Asta. Injeksi dilakukan ke dalam kantung yolk dengan dosis 0.04 mg per telur sebanyak 0.02 cc. Embryo-embryo seri kontrol diinjeksi dengan aquabidestilata sebanyak 0.2 cc per telur.

Telur-telur kemudian diinkubasikan kembali sampai umur 16 hari. Sesudah umur ini tercapai, embryo dibunuh, diperiksa abnormalitas-abnormalitas morfologis yang dideritanya dan kemudian ditimbang beratnya. Embryo-embryo yang berumur lebih tua dari 9 hari dan tidak dapat mencapai umur 16 hari, diperlakukan sama, hanya saja tidak ditimbang beratnya. Untuk pewarnaan rangka digunakan metoda pewarnaan dengan Alizarin Red S (Conn, 1960).

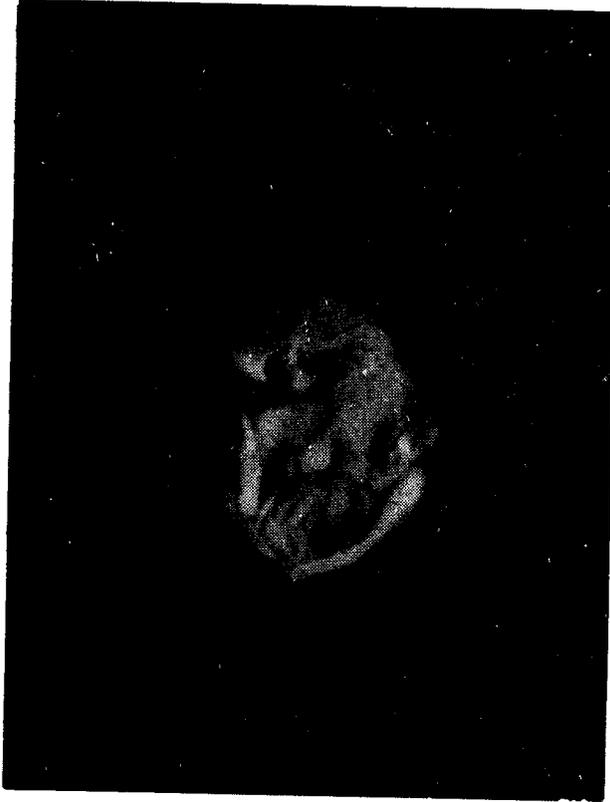
## HASIL PENGAMATAN

Malformasi yang ditimbulkan oleh Endoxan-Asta bila diinjeksikan ke dalam kantung yolk pada umur 4 hari dan 5 hari inkubasi adalah:

- Pada mata : - Gelembung meliputi mata (Gambar I)  
- Kelopak mata tidak tumbuh, sehingga mata terbuka (Gambar II)  
- Mata tidak tumbuh sama sekali (Gambar III)
- Pada paruh : - Sisi lateral paruh bercelah (Gambar IV)  
- Paruh bawah pendek (Gambar IV)  
- Paruh atas pendek (Gambar V)  
- Paruh atas dan bawah pendek (Gambar I, VI, VII)  
- Paruh menyilang
- Pada ekstrimitas belakang: - Micromelia (Gambar I, II, VII)
- Pada digiti ekstrimitas belakang : - Syndactyli (Gambar V, VII)  
- Ectrodactyli (Gambar I, II, VII)  
- Melengkung  
- Salah arah (Gambar VI)



Gambar I: Embryo ayam umur 15 hari yang diinjeksi dengan 0.04 mg Endoxan-Asta pada umur 5 hari inkubasi. Malformasi: gelembung meliputi mata, "cleft palate", paruh atas dan bawah yang tidak tumbuh dengan sempurna, micromelia, syndactyli dan ectrodactyli.



Gambar II: Embryo ayam umur 15 hari yang diinjeksi dengan 0.04 mg Endoxan-Asta pada umur 5 hari inkubasi. Malformasi: kelopak mata tidak tumbuh sempurna, micromelia dan ectrodactyli.



Gambar III: Embryo ayam umur 13 hari yang diinjeksi dengan 0.04 mg Endoxan-Asta pada umur 4 hari inkubasi. Malformasi: exencephali, paruh atas tidak tumbuh, mata yang tidak tumbuh dan ectopia viscerum.



Gambar IV: Embryo ayam umur 16 hari yang diinjeksi dengan 0.04 mg Endoxan-Asta pada umur 4 hari inkubasi. Malformasi: paruh atas sisi lateralnya bercelah, paruh bawah pendek, ectrodactyli (jari kaki ke I hilang).



Gambar V: Embryo ayam umur 13 hari yang diinjeksi dengan 0.04 mg Endoxan-Asta pada umur 5 hari inkubasi. Malformasi: kelopak mata tidak tumbuh, paruh atas tidak tumbuh sempurna, micromelia, syndactyli, ectrodactyli dan ectopia viscerum.



Gambar VI: Embryo ayam umur 14 hari yang diinjeksi dengan 0.04 mg Endoxan-Asta pada umur 4 hari inkubasi. Malformasi: gelembung meliputi mata kanan, paruh atas dan bawah tidak tumbuh sempurna, micromelia, jari kaki kanan melengkung ke dalam dan ectrodactyli.



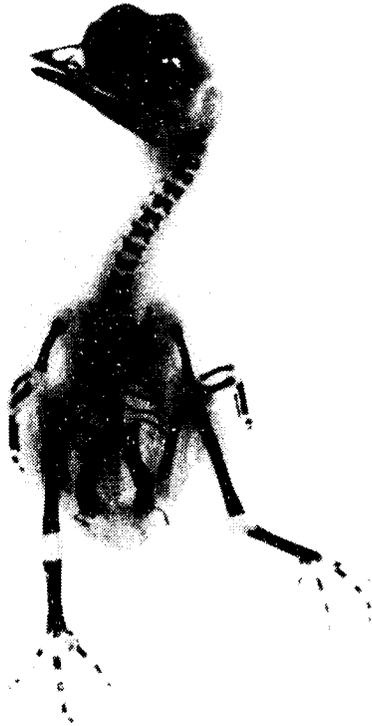
Gambar VII: Embryo ayam umur 16 hari yang diinjeksi dengan 0.05 mg Endoxan-Asta pada umur 5 hari inkubasi. Malformasi: kelopak mata tidak tumbuh, paruh atas dan bawah tidak tumbuh sempurna, micromelia dan ectrodactyli.



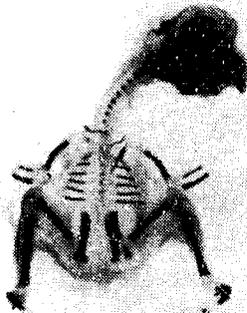
Gambar VIII: Embryo ayam umur 15 hari yang diinjeksi dengan 0.04 mg Endoxan-Asta pada umur 5 hari inkubasi. Malformasi: kelopak mata tidak tumbuh sempurna, ectopia viscerum sampai wilayah jantung, syndactyli dan bulu tidak berkembang.



Gambar IX: Embryo ayam umur 16 hari dari seri kontrol yang diinjeksi dengan aquabidest sebanyak 0.2 cc pada umur 4 hari inkubasi.



Gambar X: Rangka embryo ayam umur 16 hari dari seri kontrol.  
Diwarna dengan Alizarin Red S.



Gambar XI: Rangka embryo ayam umur 15 hari yang diinjeksi dengan 0.04 mg Endoxan-Asta pada umur 4 hari inkubasi. Malformasi: paruh bawah yang tidak tumbuh dengan sempurna dan micromelia. Tampak tulang tarso-metatarsus yang tereduksi dan melengkung. Pewarnaan dengan Alizarin Red S.

Ectopia viscerum : - Viscera terbuka sampai wilayah hati (Gambar V)  
- Viscera terbuka sampai wilayah jantung (Gambar VIII)

Exencephali (Gambar III)

"Cleft palate"

Di samping malformasi tersebut di atas didapatkan juga embryo-embryo yang mengalami edema dan pendarahan.

Tabel 1: Frekwensi malformasi pada embryo ayam yang dapat hidup sesudah 9 hari inkubasi setelah disuntik dengan Endoxan-Asta ke dalam kantung yolk pada umur 4 dan 5 hari inkubasi.

Hari	4 hari	5 hari
Dosis	0.04 mg	0.04 mg

Malformasi pada:

Mata:		
- Gelembung meliputi mata	3	3
- Kelopak mata tidak tumbuh	1	4
- Mata tidak tumbuh	1	0
Paruh	9	18
Micromelia	5	6
Digit	10	10
Ectopia viscerum	16	9
Exencephali	5	2
"Cleft palate"	2	3
Edema	1	8
Pendarahan	4	1

Catatan:

Jumlah telur	137	106
Jumlah yang abnormal	30	26
Jumlah yang normal	9	10
Jumlah yang mati sebelum 10 hari inkubasi	98	70

Malformasi yang paling sering didapatkan adalah kelainan-kelainan pada paruh, digiti dan ectopia viscerum. Dalam keadaan yang parah sekali, viscera dapat terbuka sampai wilayah jantung. Ectopia viscerum dijumpai pula dalam seri kontrol, tiga kejadian dari 53 telur.

Jumlah macam anomali per embryo yang cacat, dengan anomali lebih dari dua macam, untuk yang disuntik pada umur 4 dan 5 hari inkubasi tidak mengalami perbedaan, yakni 3.8 per embryo (Tabel 2 dan 3).

Tabel 2: Embryo ayam yang memperlihatkan lebih dari dua macam anomali sesudah diinjeksi dengan 0.04 mg Endoxan pada umur 4 hari inkubasi.

Embryo	D <sub>II</sub> <sub>8</sub>	D <sub>II</sub> <sub>11</sub>	I <sub>I</sub> <sub>4</sub>	J <sub>I</sub> <sub>23</sub>	K <sub>I</sub> <sub>23</sub>	M <sub>I</sub> <sub>13</sub>	Total
							6
<b>Malformasi:</b>							
Gelembung meliputi mata		+					
Kelopak mata tidak tumbuh				+			
Mata tidak tumbuh			+				
Paruh	+	+	+				
Micromelia		+					
Digit	+	+		+	+	+	
Ectopia viscerum				+	+	+	
Exencephali			+	+	+	+	
"Cleft palate"	+	+					
Edema							
Pendarahan				+			
Jumlah macam anomali	3	5	4	5	3	3	23

Hasil pewarnaan rangka dengan Alizarin Red S membuktikan, bahwa dalam keadaan micromelia, maka tulang yang tidak tumbuh sempurna adalah tarso-metatarsus. Selain pendek sekali juga seringkali melengkung (Gambar XI).

Syndactyli umumnya berlangsung antara digit ke III dan IV. Anomali ini hanya terbatas pada indentasi yang tidak sempurna pada waktu pertumbuhan berlangsung. Tulang-tulang phalanx yang menyokong masing-masing digit tersebut tetap terpisah.

Tabel 3: Embryo ayam yang memperlihatkan lebih dari dua macam anomali sesudah diinjeksi dengan 0.04 mg Endoxan pada umur 5 hari inkubasi.

Embryo	E <sub>II</sub> <sub>4</sub>	F <sub>II</sub> <sub>3</sub>	F <sub>II</sub> <sub>10</sub>	G <sub>I</sub> <sub>5</sub>	G <sub>I</sub> <sub>17</sub>	H <sub>I</sub> <sub>20</sub>	H <sub>I</sub> <sub>8</sub>	L <sub>I</sub> <sub>11</sub>	L <sub>I</sub> <sub>20</sub>	L <sub>I</sub> <sub>22</sub>	L <sub>II</sub> <sub>28</sub>	Total
												11
Malformasi:												
Gelembung meliputi mata							+	+				
Kelopak mata tidak tumbuh		+	+		+	+						
Mata tidak tumbuh												
Paruh	+	+	+	+	+		+		+	+	+	
Micromelia		+	+		+	+	+					
Digit	+	+		+	+		+	+	+	+	+	
Ectopia viscerum		+				+		+	+	+	+	
Exencephali										+		
"Cleft palate"	+			+	+							
Edema		+				+	+					
Pendarahan												
Jumlah macam anomali	3	6	3	3	5	4	5	3	4	3	3	42

Dalam hal ectrodactyli didapatkan kemungkinan, bahwa digit ke I atau ke II atau ke IV yang hilang. Dalam penelitian yang dilakukan sekarang ini dijumpai pula embryo yang digit ke II, III dan IV hilang sekaligus. Mengenai ectrodactyli ini tidak dapat dikatakan digit mana yang lebih mudah hilang. Selain dari itu juga tidak didapatkan adanya simetri daripada anomali ini antara kaki kiri dan kanan. Tingkatan (degree) hilangnya digit juga tidak sama. Ada yang seluruh digit hilang samasekali, ada juga yang terbatas pada beberapa phalanx saja.

Digit yang memperlihatkan salah arah, disebabkan oleh pertumbuhan digit yang membelok ke luar atau ke dalam. Dalam keadaan normal, arah tumbuh adalah lurus menurut sumbu longitudinal digit.

Embryo yang cacat dengan macam-macam anomali yang kebanyakan dapat hidup hingga umur 16 hari adalah dari embryo yang diinjeksi dengan Endoxan pada umur 5 hari inkubasi. Dari berat badannya, jika dibandingkan dengan embryo-embryo seri kontrol, jelas tampak adanya penurunan berat badan yang menyolok (Tabel 4). Ini membuktikan adanya pertumbuhan menyeluruh yang terhambat (stunted growth).

Tabel 4: Berat embryo ayam pada umur 16 hari sesudah diinjeksi dengan Endoxan-Asta ke dalam kantung yolk pada hari inkubasi ke-5 dengan dosis 0.04 mg per telur dibandingkan dengan seri kontrol.

Dosis/telur	Eksperimental 0.04 mg Endoxan	Kontrol 0.2 cc aquabidest
Umur	5 hari	5 hari
Berat dalam gram umur 16 hari	2.9408 3.5850 4.2798 4.5329 4.9678 5.3910 5.9245	7.3984 8.8710 9.5963 10.2560 11.3949 12.8025 13.6819

## DISKUSI

Penelitian ini membuktikan, bahwa Endoxan-Asta bila diinjeksikan ke dalam kantung yolk embryo-embryo ayam umur 4 dan 5 hari inkubasi menghasilkan cacat pada: mata, paruh, kaki, digit, langit-langit mulut. Selain itu dapat pula menyebabkan ectopia viscerum, exencephali, pertumbuhan keseluruhan yang terhambat, edema dan pendarahan.

Salzgeber (1972) melakukan penelitian terhadap pengaruh "nitrogen mustard" pada pertumbuhan embryo ayam dengan jalan mengaplikasikannya pada umur 3 dan 4 hari inkubasi. Didapatkannya, bahwa sayap dan kaki kedua-duanya sangat tereduksi atau hilang samasekali. Urutan hilangnya bagian-bagian rangka ekstrimitas sangat teratur, yakni: fibula, tibia, metatarsal untuk kaki dan radius, metacarpal untuk sayap. Bagian proximal, seperti femur dan humerus tetap ada dan yang paling sedikit mengalami perubahan-perubahan dibandingkan dengan segmen-segmen lainnya.

Cyclophosphamide yang dalam studi-studi klinis memiliki suatu spektrum aktivitas antitumor yang dalam banyak hal mirip dengan "nitrogen mustard" dalam penelitian ini memperlihatkan perbedaan kerja sebagai berikut:

Reduksi daripada bagian-bagian ekstrimitas hanya dijumpai pada kaki. Sayap samasekali tidak dipengaruhi pertumbuhannya oleh cyclophosphamide.

Untuk umur yang sama pada waktu zat diaplikasikan, yakni umur 4 hari inkubasi, "nitrogen mustard" menyebabkan phocomelia, sedang cyclophosphamide hemimelia (reduksi dari bagian-bagian distal ekstremitas).

Tulang panjang yang lebih kurang tidak dikenai pengaruh "nitrogen mustard" adalah tulang femur. Pada cyclophosphamide tulang-tulang femur, tibia dan fibula merupakan tulang-tulang yang tahan terhadap pengaruh zat tersebut. Sedang tulang tarso-metatarsus, serta phalanx merupakan bagian-bagian yang peka terhadap pengaruh cyclophosphamide. Oleh karena itu pada keadaan micromelia, tulang tarso-metatarsus tampak sangat tereduksi. Dalam hal ectrodactyli, jumlah phalanx pada suatu digit dapat tereduksi atau tidak tumbuh samasekali.

Walaupun hasil teratogenesitas oleh cyclophosphamide tergantung tidak hanya pada species, tetapi juga "strain" dari hewan-hewan percobaan (Gibson dan Becker, 1968), malformasi yang ditimbulkan oleh cyclophosphamide pada ayam dibandingkan dengan pada mencit dan tikus, memperlihatkan persamaan. Anomali pada kepala, seperti exencephali, mata terbuka karena kelopak mata yang tidak tumbuh sempurna dan "cleft palate" pada tikus (Chaube *et al.*, 1967), dijumpai pula pada ayam. Pembentukan digit yang tidak sempurna pada mencit (Gibson dan Becker, 1968) dan tikus (Chaube *et al.*, 1967) seperti syndactyli, ectrodactyli dan adactyli, dapat pula dijumpai pada ayam. Ectopia viscerum yang merupakan anomali yang sangat sering dijumpai pada embryo ayam, tidak pernah dilaporkan oleh kedua peneliti tersebut pada mencit maupun tikus yang diperlakukan dengan cyclophosphamide.

#### RINGKASAN

1. Telah diteliti pengaruh Endoxan-Asta (cyclophosphamide) pada pertumbuhan embryo ayam umur 4 dan 5 hari inkubasi dengan menginjeksikannya ke dalam kantung yolk.
2. Dosis 0.04 mg per telur merupakan dosis teratogenik.
3. Malformasi yang dapat ditimbulkannya adalah: gelembung meliputi mata, kelopak mata yang tidak tumbuh sempurna, mata yang tidak tumbuh samasekali, paruh dengan sisi lateral yang bercelah, paruh bawah atau paruh atas yang pendek, paruh menyilang, micromelia, syndactyli, ectrodactyli, ectopia viscerum, exencephali dan "cleft palate".
4. Pada keadaan micromelia, tulang tarso-metatarsus merupakan bagian yang sangat tereduksi.
5. Endoxan-Asta hanya berpengaruh terhadap pertumbuhan ekstremitas belakang dan bersifat hemimelia.
6. Sifat anomali pada ekstremitas tidak simetris dan tingkatannya juga tidak sama.

7. Endoxan-Asta berpengaruh menghambat pertumbuhan pada umumnya.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Badan Riset-ITB yang telah membantu membiayai penelitian ini. Juga kepada Perpustakaan "Hubrecht Laboratorium" di Utrecht-Nederland yang telah membantu mengirimkan kopi dari tulisan-tulisan yang menunjang penelitian ini, penulis menyampaikan penghargaananya.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Chaube, S., G. Kury and M.L. Murphy, 1967. Teratogenic effects of cyclophosphamide (NSC-26271) in the rat. *Cancer Chemotherapy Reports* 51 (6) : 363-376.
- Conn, H.J., M.A. Darrow and V.M. Emmel, 1960. *Staining Procedures*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Foye, L.V. *et al.*, 1960. Cyclophosphamide, a preliminary study of a new alkylating agent. *Cancer Chemotherapy Reports* 6 : 39-40.
- Gibson, J.E. and B.A. Becker, 1968. The teratogenicity of cyclophosphamide in mice. *Cancer Research* 28 : 475-480.
- Salzgeber, S., 1972. Limb malformation production in chicken embryos treated with nitrogen mustard at 48 hours of incubation. *Proc. Int. Symp. on the effects of prolonged drug usage on fetal development*. Plenum Press, New York.

(Diterima 15 April 1975)

---