

# Marine Toxin Saxitoxin

Winarti Andayani\*, Betty Marita Subrata\*\*, dan Esther Budiman\*\*\*

\*Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Atom Nasional, Jakarta

\*\* Staf Pengajar Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor

\*\*\* Mahasiswa Program Pasca Sarjana Kimia, Universitas Indonesia, Jakarta

## PENDAHULUAN

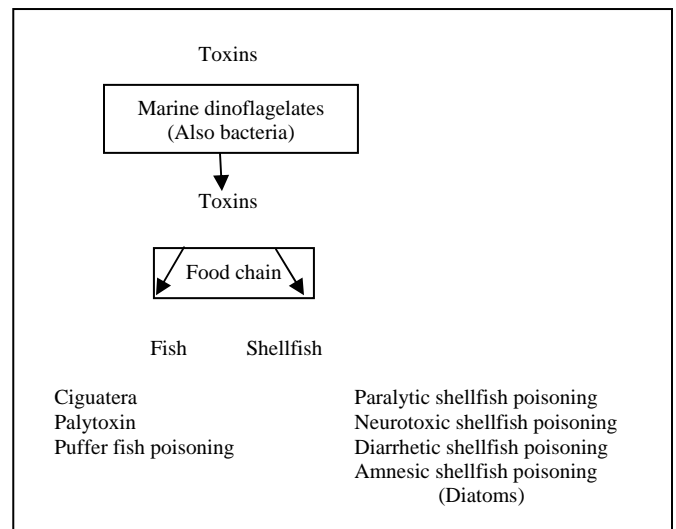
Pada umumnya orang berpikir dengan memakan *seafood*, mereka akan mendapatkan keuntungan protein yang tinggi, asam lemak omega-3 dan mineral, yang disertai dengan kandungan lemak dan kalori yang rendah. Namun mereka mengetahui bahwa *seafood* juga bisa mengakibatkan keracunan disebabkan oleh lingkungan yang tercemar. Tercemarnya *seafood* dapat terjadi secara alami (mikroorganisme dan toksin) maupun oleh kontaminasi bahan kimia beracun.

*Marine* toksin (toksin yang terdapat di laut) sudah lama diidentifikasi di berbagai tempat antara lain Jepang, Filipina, dan Indonesia. Toksin ini sangat berbahaya dan tidak dapat rusak oleh panas dan pemrosesan. Mereka berasal dari alam dan akibat kegiatan manusia seperti limbah industri dan kebakaran hutan, namun yang terpenting dari fitoplankton. Hampir semua *seafood* bisa terkontaminasi oleh toksin dan dapat menimbulkan sindrom yang berbeda-beda (**Gambar 1**).

Toksin yang berasal dari plankton ditemukan juga dalam kerang-kerangan. Hal ini karena kerang mempunyai sifat penyaring makanan (*filter feeding shellfish*). Jumlah toksin akan berlipat ganda sesuai dengan jumlah fitoplankton toksik yang dimakannya. Toksin ini dapat menyebabkan *paralytic*, *neurotoxic*, *amnesic* dan *diarrhetic shellfish poisoning* (PSP, NSP, ASP, dan DSP), disamping itu mungkin juga dapat memacu pertumbuhan tumor. *Paralytic Shellfish Poisoning* disebabkan oleh saxitoxin yang tidak berpengaruh pada tubuh kerang karena sudah kebal terhadap kondisi demikian setelah lama berhubungan dengan toksin tersebut, tetapi dapat berakibat kegagalan pernapasan yang fatal bagi manusia.

## SAXITOXIN

Mikroalgae adalah produsen utama yang menyusun dasar jaringannya makanan laut dan air tawar. Banyak mikroalgae yang



Gambar 1. Beberapa Sindrom Akibat Keracunan Seafood<sup>(1)</sup>

juga memproduksi komponen-komponen baru yang menunjukkan aktivitas biologis yang kuat. Komponen-komponen ini dianggap sebagai metabolik sekunder, yaitu komponen yang tidak esensial sebagai dasar metabolisme dan pertumbuhan pada organisme, dan terdapat dalam kelompok taksonomi yang terbatas. Biosintesis metabolit sekunder umum terjadi dalam bakteri seperti dalam mikroba eukariotik dan tanaman.

Dari banyak metabolit sekunder algae yang telah diidentifikasi, beberapa di antaranya merupakan toksin kuat yang bertanggung jawab terhadap sejumlah penyakit pada manusia, ketidaknormalan dan kematian hewan mamalia dan burung, serta kematian ikan. Toksin yang terutama berarti bagi kesehatan manusia berasal dari 3 kelas algae bersel satu, yaitu dinoflagelata, diatoms dan *cyanobacteria*. Dinoflagelata mem-

punyai jaringan yang luas, namun demikian hanya beberapa lusin spesies, dari beberapa ribu spesies dinoflagelata yang diketahui, kelihatan bersifat toksigenik. Pada diatoms, genus tunggal, *pseudo-nitschia*, menghasilkan toksin yang memiliki pengaruh kuat terhadap kesehatan manusia, sebaliknya pada *cyanobacteria* hanya beberapa yang teridentifikasi menghasilkan toksin.

Toksikologi terdiri dari bermacam-macam berdasarkan struktur dna fungsinya dan banyak yang merupakan turunan dari jalur biosintesis yang unik. Misalnya dinoflagelata, mensintesis semacam toksin polimer yang terbagi atas dua grup struktural linier dan gabungan (seperti tangga). Toksin algae yang mempunyai pengaruh kuat terhadap kesehatan manusia mungkin dikategorikan sebagai neurotoksin atau hepatotoksin. Neurotoksisitas dari toksin algae diperantarai oleh bermacam-macam interaksi yang sangat spesifik dengan saluran-saluran ion yang terlibat dalam neurotransmisi.

Saxitoxin dihasilkan oleh beberapa spesies dinoflagelata<sup>(2)</sup>, antara lain *Alexandrium catenella*, *Alexandrium minutum*, *Alexandrium tamarense*, *Gymnodinium catenatum*, dan *Pyrodinium bahamense var. compressum* (Tabel 1). Beberapa spesies dari genus *Alexandrium*, antara lain *A. cohorticula* dan *A. tamayavanichi*, masih belum dapat dipastikan toksisitasnya sehingga keberadaannya perlu diwaspadai. Ledakan populasi (*blooming*) dari spesies-spesies tersebut di atas menyebabkan perubahan warna air laut dari biru-biru menjadi merah kecoklatan. Perubahan warna air laut ini umumnya dikenal sebagai fenomena *red tide*. Fenomena *red tide* dapat dikaitkan dengan beberapa fenomena alam seperti El Nino, yang ikut menjadi penyebab *red tide blooms* di wilayah Indonesia. Diperkirakan awal musim hujan merupakan masa-masa terjadinya *blooms* dari spesies-spesies berbahaya yang bertujuan untuk mengambil makanan dari daratan. Namun tidak semua gejala *red tide* menyebabkan dampak negatif, bahkan umumnya *red tide* terjadi sebagai tanda

Tabel 1. Plankton penghasil PSP<sup>(2)</sup>

| Spesies                            | Areas  | PSP Components |
|------------------------------------|--|----------------|
| <i>Alexandrium catenella</i>       | Pacific coasts-California, British Columbia, Alaska, Japan, Venezuela, Chile           | GTXs, STXs     |
| <i>A. tamarense</i>                | North Atlantic coasts-New England, Canada, Denmark, W. Germany, Holland, Norway, Japan | GTXs, STXs     |
| <i>A. acatenella</i>               | British Columbia   | unknown        |
| <i>A. phoneus</i>                  | North Sea  | unknown        |
| <i>A. cohorticula</i>              | Gulf of Thai   | GTXs           |
| <i>Pyrodinium bahamense</i>        | Brunei, Papua New Guinea   | unknow         |
| <i>P. bahamense var. compressa</i> | Palau Island   | GTXs, STXs     |
| <i>Gymnodinium calenatum</i>       | Tasman Sea, Japan  | PXs, GTXs      |
| <i>Cochlodinium sp.</i>            | Japan  | Zn-bound PXs   |
| <i>Aphanizomenon flau-aquae</i>    | New England (lakes)  | STXs           |

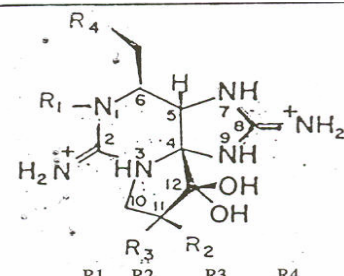
meningkatnya kesuburan suatu perairan. *Red tide* yang berdampak merugikan disebut *Harmful Algal Bloom* (HAB).

Saxitoxin berupa cairan tidak berwarna dengan bau menyengat (seperi asam cuka), dan mempunyai berat jenis 1,0 (g/mL) Saxitoxin bersifat racun dan menyebabkan iritasi apabila kontak dengan kulit, mata, pernafasan dan mulut. Senyawa ini mempunyai nilai LD<sub>50</sub> sebesar 263 g/kg bobot badan (oral mencit).

Saxitoxin mempunyai sifat fisik larut dalam air dan metil alkohol, sedikit larut dalam etil alkohol dan asam asetat tetapi tidak larut dalam pelarut organik (non polar). Senyawa ini mudah terhidrolisis dalam larutan basa dan toksinnya tidak aktif setelah dididihkan selama 3 sampai dengan 4 jam pada pH 3. Racun PSP tidak dapat dihilangkan dari kerang-kerangan baik melalui proses pemanasan maupun hidrolisis.

Struktur kristal dari komponen induk saxitoxin mula-mula dilukiskan oleh Schantz dkk yang dapat dilihat pada Gambar 2.

Pada Gambar 2 terlihat bahwa struktur dari *congener* saxitoxin bervariasi, yang dibedakan oleh kombinasi substitusi OH dan sulfat pada 4 sisi dalam molekul (R1-4). Berdasarkan substitusi pada R4, saxitoxin dapat dibagi atas 4 kelompok, yaitu toksin karbamat, sulfo-karbamoil, dekarbamoil dan deoksikarbamoil. Adanya perbedaan substituen pada R4



|                  | R1 | R2                 | R3                 | R4                     | Mu/μmol |
|------------------|----|--------------------|--------------------|------------------------|---------|
| Carbamate        |    |                    |                    |                        |         |
| STX              | H  | H                  | H                  | OCONH <sub>2</sub>     | 2483    |
| Neo STX          | OH | H                  | H                  | OCONH <sub>2</sub>     | 2295    |
| GTX1             | OH | OSO <sub>3</sub> - | H                  | OCONH <sub>2</sub>     | 2468    |
| GTX2             | H  | OSO <sub>3</sub> - | H                  | OCONH <sub>2</sub>     | 892     |
| GTX3             | H  | H                  | OSO <sub>3</sub> - | OCONH <sub>2</sub>     | 1584    |
| GTX4             | OH | H                  | OSO <sub>3</sub> - | OCONH <sub>2</sub>     | 1803    |
| Sulfocarbamoil   |    |                    |                    |                        |         |
| GTX5 (B1)        | H  | H                  | H                  | OCONHSO <sub>3</sub> - | 160     |
| GTX6 (B2)        | OH | H                  | H                  | OCONHSO <sub>3</sub> - | -       |
| C1               | H  | OSO <sub>3</sub> - | H                  | OCONHSO <sub>3</sub> - | 15      |
| C2               | H  | H                  | OSO <sub>3</sub> - | OCONHSO <sub>3</sub> - | 239     |
| C3               | OH | OSO <sub>3</sub> - | H                  | OCONHSO <sub>3</sub> - | 33      |
| C4               | OH | H                  | OSO <sub>3</sub> - | OCONHSO <sub>3</sub> - | 143     |
| Deoxydecarbamoil |    |                    |                    |                        |         |
| dcSTX            | H  | H                  | H                  | OH                     | 1274    |
| dcNeoSTX         | OH | H                  | H                  | OH                     | -       |
| dcGTX1           | OH | OSO <sub>3</sub> - | H                  | OH                     | -       |
| dcGTX2           | H  | OSO <sub>3</sub> - | H                  | OH                     | 1617    |
| dcGTX3           | H  | H                  | OSO <sub>3</sub> - | OH                     | 1872    |
| dcGTX4           | OH | H                  | OSO <sub>3</sub> - | OH                     | -       |
| doSTX            | H  | H                  | H                  | H                      | -       |
| doGTX2           | H  | H                  | OSO <sub>3</sub> - | H                      | -       |
| doGTX            | H  | OSO <sub>3</sub> - | H                  | H                      | -       |

Gambar 2. Struktur Saxitoxin dan Tosisitas Relatif dari PSP (van Dolah, in press)

mengakibatkan perubahan yang besar pada sifat toksisitasnya. Toksin karbamat adalah yang paling kuat sifat toksisitasnya (892-2483 mouse unit (MU) / $\mu\text{mol}$ ). Toksin dekarbamoil mempunyai potensi di tengah-tengah yaitu 1274-1872 MU/ $\mu\text{mol}$  dan toksin sulfo karbamoil merupakan toksin yang paling lemah (15-239 MU/ $\mu\text{mol}$ ). Nilai toksisitas ditentukan dalam satuan *Mouse Unit* (MU), dimana 1 MU sama dengan jumlah toksin yang dibutuhkan untuk membunuh seekor mencit seberat 20 g dalam 15 menit.

### PARALYTIC SHELLFISH POISONING (PSP)

*Seafood* yang telah terkontaminasi oleh saxitoxin apabila dikonsumsi oleh manusia akan menyebabkan sindrom yang disebut *Paralytic Shellfish Poisoning*. Gejala utama dari keracunan saxitoxin adalah kelumpuhan (*paralysis*) pada otot, selain otot jantung<sup>(3)</sup>. Penderita mula-mula akan merasakan kesemutan dan mati rasa pada bibir yang menjalar ke seluruh mulut dan leher. Gejala selanjutnya terasa pada ujung jari tangan dan kaki yang nyeri seperti ditusuk-tusuk, pusing, mual, muntah dan kejang pada otot perut, kesukaran bernafas dan akhirnya berhenti bernafas, tetapi jantung masih tetap berdenyut. Bila tidak ditolong maka penderita akan meninggal dalam waktu 24 jam. Pertolongan hanya dapat dilakukan dengan cara menguras isi perut dan memberikan pernafasan buatan.

Pada suatu penelitian sampel klinis dari terjangkitnya PSP di Alaska tahun 1994, pembuangan saxitoxin dari darah manusia berlangsung dalam waktu kurang dari 24 jam, juga pada pasien yang mengalami kelumpuhan pernafasan dan dibantu dengan bantuan pernafasan. Pembuangan ini sebagian besar melalui urin. Saat ini masih belum tersedia penangkal untuk PSP Antibodi monoklonal anti saxitoxin yang diuji secara *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan perlindungan terhadap terikatnya saxitoxin dan pengurangan gerakan di sekeliling saraf akibat saxitoxin pada saraf mencit, diduga antibodi mungkin berpotensi menyediakan reagen yang berguna untuk perlindungan terhadap toksisitas secara *in vivo*. Sebagai tambahan, penghalang saluran K, 4-aminoantipirin, baru-baru ini menunjukkan pembalikan efek secara signifikan pada serangan saxitoxin dalam mencit, mungkin hal ini berguna sebagai penangkal bagi PSP.

### PENYEBARAN PLANKTON PENGHASIL PSP

Penyebaran dari mikroalgae dapat terjadi mengikuti beberapa pola, baik alami maupun karena kegiatan manusia. Dengan demikian mikroalgae tersebut dapat terbawa oleh arus ke arah tertentu dan apabila kondisinya sesuai, berkembang dengan baik. Dengan perantaraan arus inilah umumnya mikroalgae menyebar.

Di Jepang *Alexandrium catenella* pertama kali didapatkan sebagai penghasil PSP di Owase Bay. Survey lain menunjukkan bahwa spesies plankton ini secara luas terdistribusi di sebagian besar bagian utara sampai bagian selatan Jepang<sup>(2)</sup>. *Pyrodinium bahamense var. compressum* merupakan spesies utama penyebab PSP di perairan Indo-Pasifik, seperti di Papua Nugini, Sabah, Brunei Darussalam, Filipina, Sarawak dan Semenanjung Malaysia. Di Indonesia spesies ini sudah diidentifikasi dari

beberapa perairan, seperti Teluk Kao, Halmahera, Teluk Ambon, Teluk Peru, perairan sekitar Biak, Teluk Jakarta, dan Selat Bangka. Namun sampai saat ini masalah PSP hanya dijumpai di perairan Teluk Kao dan Nunukan. Tempat penyebaran plankton penghasil PSP dapat dilihat pada **Gambar 3**.



**Gambar 3.** Tempat penyebaran plankton penghasil PSP<sup>(4)</sup>.

Gejala PSP yang muncul di Jepang, teramati di Barat Daya kepulauan Jepang. Terdapat paling sedikit 15 orang meninggal akibat mengkonsumsi kepiting selama 1909-1988. Selama 20 tahun (1972 sampai dengan 1992), lebih dari 90% makanan yang terkontaminasi oleh saxitoxin berakibat fatal. Jumlah korban mencapai 11.157 orang, dengan jumlah korban yang meninggal sebanyak 271 orang.

Gejala PSP lainnya muncul di Taiwan bagian utara<sup>(5)</sup>. Mereka melakukan penelitian di perairan Ilan County di Taipei dari bulan November 1996 sampai dengan Oktober 1997, ternyata spesies *Puffer takifugu rupripes* telah terkontaminasi oleh saxitoxin.

Di Indonesia PSP umumnya terjadi di perairan Teluk Kao, Halmahera, Maluku. Di perairan sekitar Larantuka-Flores Timor, gejala keracunan PSP telah tercatat semenjak tahun 1959 dengan korban tiga orang meninggal dan lima orang mengalami kelumpuhan setelah memakan ikan laut. Kejadian ini berulang pada tahun 1983, 1985, 1992, dan terakhir tahun 1997. Semua musibah terjadi pada awal musim penghujan, sekitar bulan November-Desember. Musibah terparah terjadi pada tahun 1983 dengan korban empat orang meninggal dunia dan 236 orang mengalami kelumpuhan. Kejadian di Flores Timor ini agak menyimpang dari kebiasaan, karena korban jatuh setelah memakan ikan dan bukan kerang. Selain itu sampai sekarang belum dapat ditentukan spesies mikroalgae yang menghasilkan toksin PSP. Kesimpulan terjadinya keracunan PSP hanya didasarkan pada gejala klinis penderita.

Lokasi lain di Indonesia yang mengalami kejadian PSP tercatat di Kalimantan Timur, tepatnya di perairan Nunukan dan Pulau Sebatik sebelah selatan, suatu pulau yang berbatasan dengan Sabah. Kejadiannya berlangsung pada tahun 1988 setelah orang mengkonsumsi sejenis kerang, *Merethrix merethrix*

(kerang tahu). Dua jam setelah memakan kerang, sebanyak 68 orang jatuh sakit dengan gejala PSP dan akhirnya 2 orang meninggal dunia.

konsumsi 5.000-20.000 MU toksin (0,9-3,6 mg).

### MEKANISME SAXITOXIN DI DALAM TUBUH

Berdasarkan aktivitas tiap molar senyawa, ternyata saxitoxin paling aktif dalam menghambat (*blocking*) saluran-saluran. dari susunan saraf dan membran-membran sel jika dibandingkan dengan senyawa-senyawa derivatnya yang lain.

Skema tahapan pengikatan saxitoxin terhadap saluran natrium afinitas tinggi dapat dilihat pada **Gambar 4**, yang menunjukkan bahwa ikatan ionik dari dari 7,8,9-guanidinium terhadap gugus anionik dari reseptor (A, B) menyebabkan dehidrasi gemdiol pada posisi C-12, menghasilkan suatu keton (C1) yang terdapat dalam keadaan kesetimbangan yang cepat dengan karbokation (C2). Ikatan kedua berupa ikatan kovalen yang terbentuk di antara reseptor dan C-12 (D).

Saxitoxin terikat dengan afinitas yang kuat pada reseptor asetilkolin di saluran Natrium sehingga menghambat pembukaan saluran. Polaritas molekuler saxitoxin sebagian besar menghambatnya untuk melintasi penghalang darah otak, karena itu sisi utama tempat aksi saxitoxin pada manusia adalah kemungkinan besar pada persimpangan otot saraf. Hal ini sesuai dengan cepatnya serangan (kurang dari satu jam) dari gejala yang klasik untuk PSP termasuk perasaan geli dan mati rasa pada daerah-daerah perioral dan kaki tangan, kehilangan kontrol motorik, perasaan mengantuk, berbicara tidak jelas, dan pada kasus dengan dosis tinggi, terjadi kelumpuhan pernafasan (sulit bernapas). Dosis letal untuk manusia adalah 1 - 4 mg saxitoxin ekuivalen. Gejala klinis PSP terjadi bila kurang lebih 2000 MU (0,72 mg) termakan, dan kasus serius melibatkan

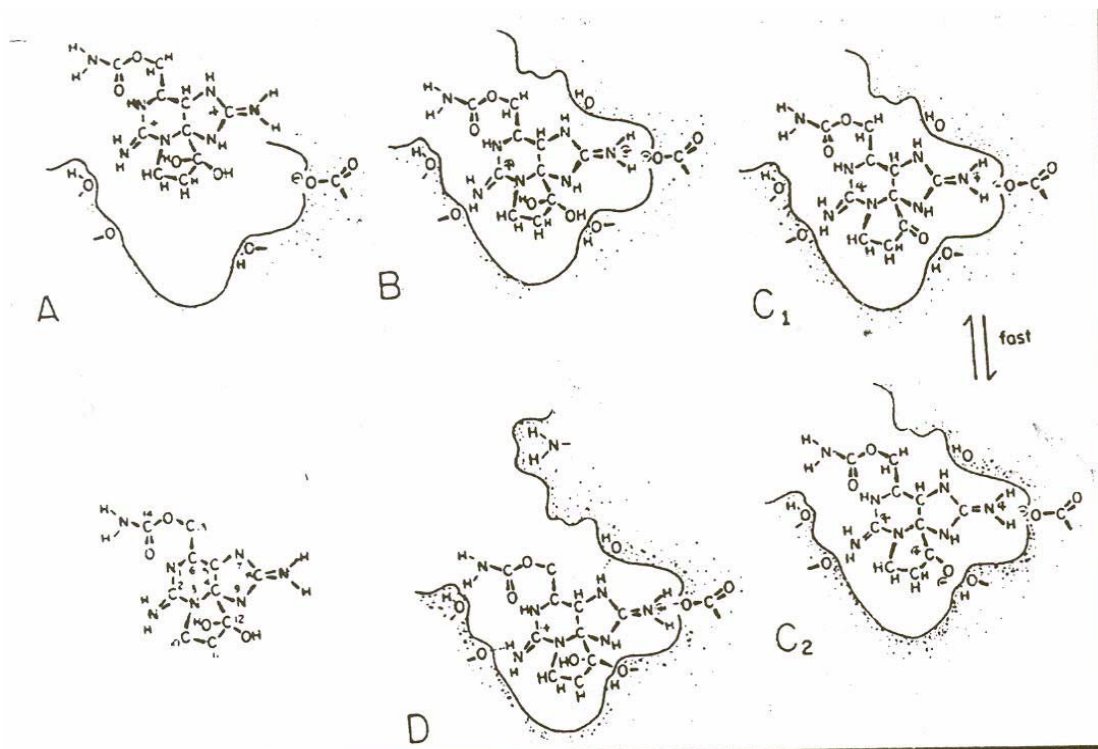
### KEPUSTAKAAN

1. Tucker BW. Overview of Current Seafood Nutritional Issues : Formation of Potentially Toxic Products. In : *Seafood safety, Processing, and Biotechnology*. Shahidi F, Jones Y, and DD. Kitts (eds). A Technomic Publishing Co. NY 1997
2. Takashi M. Recent Studies on Marine Toxins. Proceeding Fourth LIPI-JSPS Joint Seminar on marine Sciences. Jakarta 1994; Hal 183-193.
3. Hashimoto Y. *Marine Toxins and Other Bioactive Marine Metabolites*. Japan Scientific Societies Press. Tokyo 1977.
4. Van Dolah FM. Diversity of marine and Freshwater Algal Toxins. In *Seafood Toxicity*. L. Botana (ed). Marcel Dekker. NY (*in press*)
5. Lin, SJ. Chai, T.J. Jong SS. and Deng Fwu Hwang. Toxicity of the Puffer Takifugu Rubripes Cultured in Northern Taiwan. *Fisheries Science* 1998; 64 (5) : 766-770.
6. Kao YC and SR Levinson (eds). *Tetrodotoxin, Saxitoxin, and The Molecular Biology of The Sodium Channel*. The New York Academy of Sciences. NY 1999.
7. AOAC Official Methods of Analysis Supplement. Natural Toxins 1995. Chapter 49 : 46 B-48.
8. International Atomic Energy Agency. Regional Training Workshop on Receptor Binding Assay Techniques for Harmful Algal Bloom Toxins Quantification. Philippines 1999.

### LAMPIRAN I. ANALISIS PSP DENGAN METODE BIOASSAY<sup>(7)</sup>

#### Bahan

1. Larutan standar induk PSP 100 µg/mL (dalam alkohol yang telah ditambah 20% asam), larutan ini stabil dalam tempat dingin (3-4°C).
2. Larutan standar kerja PSP 1 µg/mL, dibuat dengan cara melarutkan 1 mL larutan standar induk dalam 100 mL aquades, larutan stabil dalam beberapa minggu pada 3-4°C.
3. Mencit sehat berukuran 19-21 g. Jika ukuran mencit < 19 g atau > 21 g maka digunakan faktor koreksi untuk memperoleh waktu kematian yang benar.



Gambar 4. Tahapan Pengikatan Saxitoxin terhadap Saluran Natrium<sup>(6)</sup>

Pada analisis PSP mencit yang digunakan tidak boleh berukuran > 23 g, dan tidak boleh digunakan berulang.

#### Standarisasi Bioassay

1. Sepuluh (10) mL larutan standar 1 µg/mL diencerkan dengan masing-masing 10, 15, 20, 25, dan 30 mL aquades dan pH dikontrol antara 2-4. Masing-masing 1 mL larutan disuntikkan secara intraperitoneal ke beberapa ekor mencit dan kemudian dipilih larutan dengan konsentrasi yang memberikan waktu kematian (*death time*) antara 5-7 menit.
2. Dari larutan dengan konsentrasi yang terpilih, masing-masing dibuat 3 ulangan dan disuntikkan 1 mL larutan secara intraperitoneal ke masing-masing 10 ekor mencit dan dicatat *death time*-nya.
3. Apabila ketiga ulangan dari sebuah larutan dengan konsentrasi yang memberikan median *death time* lebih kecil dari 5 menit atau lebih besar 7 menit, maka hasil dari konsentrasi ini diabaikan. Sebaliknya, apabila salah satu atau lebih dari sebuah larutan dengan konsentrasi yang memberikan median *death time* antara 5 - 7 menit, maka hasil ini digunakan untuk perhitungan lebih lanjut termasuk ulangan yang mungkin memberikan median *death time* lebih kecil dari 5 menit atau lebih besar 7 menit.
4. Perhitungan nilai faktor koreksi (FK), nilai MU/ml ditentukan dari median *death time* konsentrasi terpilih dengan menggunakan Tabel Sommer yaitu hubungan antara *death time* terhadap MU untuk PSP (Lampiran 1). FK dihitung dengan cara membagi konsentrasi terpilih (µg/mL) dengan nilai MU/ml. Nilai rata-rata FK yang diperoleh digunakan sebagai FK dalam analisis sampel.

#### Persiapan Sampel

Bagian luar kerang-kerangan dicuci dengan air segar, kemudian dibuka dengan alat khusus pemotong kerang, selanjutnya bagian dalam dibersihkan dengan air bersih untuk menghilangkan pasir atau zat-zat asing lainnya. Bagian daging (100 -150 g) diambil dan dikumpulkan (hindari penggunaan pemanasan atau anestetik sebelum membuka kulit dan dilarang memotong atau merusak badan pada tahapan ini).

#### Ekstraksi Sampel

Sampel sebanyak 100 gram ditambah 100 mL 0,1 N HCl, diaduk dengan cepat dan diperiksa pH nya, jika perlu pH ditepatkan < 4. Campuran dipanaskan dan dididihkan selama 5 menit, kemudian didinginkan pada suhu kamar. Campuran yang sudah dingin ditepatkan pH nya pada pH 2 - 4 dengan penambahan 5 N HCl atau 0,1 N NaOH setetes demi setetes sambil tetap diaduk. Sampel ditepatkan di dalam gelas piala sampai homogen atau jika diperlukan sampel disentrifugasi selama 5 menit pada 3000 rpm kemudian disaring melalui kertas saring. Filtrat diambil untuk pengujian pada mencit.

#### Pengujian Mencit

Setiap mencit disuntik secara intraperitoneal dengan 1 mL ekstrak. Waktu suntikan dicatat dan mencit diamati dengan hati-hati untuk mengetahui *death time* nya yang ditunjukkan oleh hembusan nafas terakhir. Satu mencit boleh digunakan untuk penentuan awal, tetapi pengujian menggunakan 2 atau 3 mencit lebih baik. Jika *death time* dari beberapa mencit < 5 menit, maka perlu dibuat pengenceran sampel untuk memperoleh *death time* 5 - 7 menit. Jika *death time* dari 1 atau 2 mencit yang disuntik dengan sampel yang tidak diencerkan > 7 menit, maka paling sedikit 3 mencit harus disuntik untuk memastikan toksisitas dari sampel. Jika pengenceran besar diperlukan, maka pH sampel harus ditepatkan lagi antara 2 - 4. Sebanyak 3 mencit disuntik dengan larutan yang sudah diencerkan sampai memberikan *death time* 5 - 7 menit.

#### Penghitungan Toksisitas

Waktu *death time* ditentukan, termasuk yang selamat, dan dari Tabel Sommer ditentukan bilangan MU. Jika berat mencit yang diuji < 19 g atau > 21 g, maka dibuat FK untuk setiap mencit dengan mengalikan MU terhadap *death time* mencit. Nilai MU diubah ke µg racun/mL dengan mengalikan FK.

$$\mu\text{g racun}/100 \text{ g daging} = (\mu\text{g}/\text{mL}) \times \text{faktor pengenceran} \times 200$$

Nilai > 80 g/100 g merupakan indikasi bahwa sampel yang diuji sangat racun dan tidak aman untuk dikonsumsi.

#### ANALISIS PSP DENGAN METODE SAXITOXIN BERTANDA<sup>(8)</sup>

##### Peralatan

1. Mikropipet berukuran 1 – 1000 µL

2. Pipet multi *channel* berukuran 5 – 200 µL.
3. *Plate* mikrotiter dengan 96 lubang
4. Tabung sentrifugasi 15 dan 30 mL
5. *Vortex*

##### Bahan Kimia

1. [<sup>3</sup>H] STX diasetat
2. STX dihidroksi HCl  
(Lihat halaman berikutnya)

#### LAMPIRAN 2.

Tabel Sommer (AOAC,1995)

| DT   | MU   | DT   | MU   | DT   | MU   | DT    | MU    |
|------|------|------|------|------|------|-------|-------|
| 1.00 | 100  | 3.00 | 3.70 | 5.00 | 1,92 | 9.00  | 1,16  |
| 1.10 | 66,2 | 3.05 | 3,57 | 5.05 | 1,89 | 9.30  | 1,13  |
| 1.15 | 38,3 | 3.10 | 3,43 | 5.10 | 1,86 | 10.00 | 1,11  |
| 1.20 | 26,4 | 3.15 | 3,31 | 5.15 | 1,83 | 10.00 | 1,09  |
| 1.25 | 20,7 | 3.20 | 3,19 | 5.20 | 1,80 | 11.00 | 1,075 |
| 1.30 | 16,5 | 3.25 | 3,08 | 5.30 | 1,74 | 11.30 | 1,06  |
| 1.35 | 13,9 | 3.3e | 2,98 | 5.40 | 1,69 | 12.00 | 1,05  |
| 1.40 | 11,9 | 3.35 | 2,88 | 5.45 | 1,67 | 13.00 | 1,03  |
| 1.45 | 10,4 | 3 40 | 2,79 | 5.50 | 1,64 | 14.00 | 1,015 |
| 1.50 | 9,33 | 315  | 2,71 | 6.00 | 1,60 | 15.00 | 1,000 |
| 1.55 | 8,42 | 3.50 | 2,63 | 6.15 | 1,54 | 16.00 | 0,99  |
| 2.00 | 7,67 | 3.55 | 2,56 | 6.30 | 1,48 | 17.00 | 0,98  |
| 2.05 | 7,04 | 4.00 | 2,50 | 6.45 | 1,43 | 18.00 | 0,972 |
| 2.10 | 6,52 | 4.05 | 2,44 | 7.00 | 1,39 | 19.00 | 0,965 |
| 2.15 | 6,06 | 4.10 | 2,38 | 7.15 | 1,35 | 20.00 | 0,96  |
| 2.20 | 5,66 | 4.15 | 2,32 | 7.30 | 1,31 | 21.00 | 0,954 |
| 2.25 | 5,32 | 4.20 | 2,26 | 7.45 | 1,28 | 22.00 | 0,948 |
| 2.30 | 5,00 | 4.25 | 2,21 | 8.00 | 1,25 | 23.00 | 0,942 |
| 2.35 | 4,73 | 4.30 | 2,16 | 8.15 | 1,22 | 24.00 | 0,937 |
| 2.40 | 4,48 | 4.35 | 2,12 | 8.30 | 1,20 | 25.00 | 0,934 |
| 2.45 | 4,26 | 4.40 | 2,08 | 8.45 | 1,18 | 30.00 | 0,917 |
| 2.50 | 4,06 | 4.45 | 2,04 |      |      | 40.00 | 0,898 |
| 2.55 | 3,88 | 4.50 | 2,00 |      |      | 60.00 | 0,875 |
|      |      | 4.55 | 1,96 |      |      |       |       |

Keterangan :

DT : *death time* dalam mencit

MU : mouse unit

#### LAMPIRAN 3.

Tabel Sommer (AOAC, 1995)

| WM   | MU    | WM   | MU    |
|------|-------|------|-------|
| 10   | 0,50  | 17   | 0,88  |
| 10,5 | 0,53  | 17,5 | 0,905 |
| 11   | 0,56  | 18   | 0,93  |
| 11,5 | 0,59  | 18,5 | 0,95  |
| 12.  | 0,62  | 19   | 0,97  |
| 12,5 | 0,65  | 19,5 | 0,985 |
| 13   | 0,675 | 20   | 1,000 |
| 13,5 | 0,70  | 20,5 | 1,015 |
| 14   | 0,73  | 21   | 1,03  |
| 14,5 | 0,76  | 21,5 | 1,04  |
| 15   | 0,785 | 22   | 1,05  |
| 15,5 | 0,81  | 22,5 | 1,06  |
| 16   | 0,84  | 23   | 1,07  |
| 16,5 | 0,86  | -    | -     |

Keterangan :

WM : berat mencit (gram)

MU : mouse unit

**(Lanjutan Lampiran 1)**

3. STX binding buffer = 75 mM HEPES + 140 mM NaCl buffer pH 7,5
4. *Rat brain synaptosome*

**Cara Kerja**

1. Pengenceran larutan baku [<sup>3</sup>H] STX dalam tabung 15 mL, 3 μL [<sup>3</sup>H] STX 3,8 mL STX binding buffer, 35 μL [<sup>3</sup>H] STX yang telah diencerkan dimasukkan dalam vial dengan *scintillant* dan di-counting dengan alat *scintillation counter* untuk memperoleh *total count* (cpm).
2. Persiapan kurva standar STX menggunakan STX dihidroksi HCl dalam tabung dengan berbagai konsentrasi, yaitu  $6 \times 10^{-6}$ ;  $6 \times 10^{-7}$ ;  $6 \times 10^{-8}$ ;  $6 \times 10^{-9}$ ;  $6 \times 10^{-10}$  M.
3. Pengenceran *rat brain synaptosome* murni dalam *STX binding bufer*. Jaringan dalam larutan 2 mL diencerkan dengan perbandingan 2 : 10 (2 mL jaringan + 18 mL buffer) dalam tabung sentrifugasi 50 mL, sampai didapatkan konsentrasi akhir 0,5 – 1,0 mg/mL.
4. Ekstrak sampel kerang yang diduga terkontaminasi STX diencerkan dengan *binding buffer*.
5. Masing-masing sebanyak 35 μL sampel dan standar STX dimasukkan ke dalam *plate* mikrotiter, ditambah dengan 35 μL [<sup>3</sup>H] STX dan 140 μL *rat brain sinaptosome* yang telah diencerkan. Campuran ditutup dan diinkubasi

pada 4°C selama 1 jam. Toksin yang tidak terikat oleh jaringan dihilangkan dengan cara pencucian menggunakan buffer yang dilanjutkan dengan aseton, kemudian disaring.

6. Masing-masing residu dimasukkan ke dalam vial yang telah berisi 1 mL larutan *scintillator* dan di-count, dengan alat *scintillator counter* untuk memperoleh *total count* (cpm).

**Cara Perhitungan**

*Total count* dari larutan standar STX dibuat kurva kalibrasi, log STX terhadap *total count* (cpm). Dengan mengetahui nilai *total count* sampel, maka konsentrasi STX dalam sampel dapat dihitung. Konsentrasi sampel dihitung dalam μg STX equivalen/100 *shellfish*, menggunakan rumus sebagai berikut :

nM equiv STX dalam ekstrak = nM equiv STX x pengenceran sampel x (V total/ 35 μL)

μg STX equivalen/mL = nM equiv STX dalam ekstrak x (1 L/1000 mL) x (372 ng/mmol) x 1 μg / 1000 ng)

μg STX equivalen/100 g *shellfish* = μg STX eqaivalen/mL x (mL ekstrak / g *shellfish*) x 100