

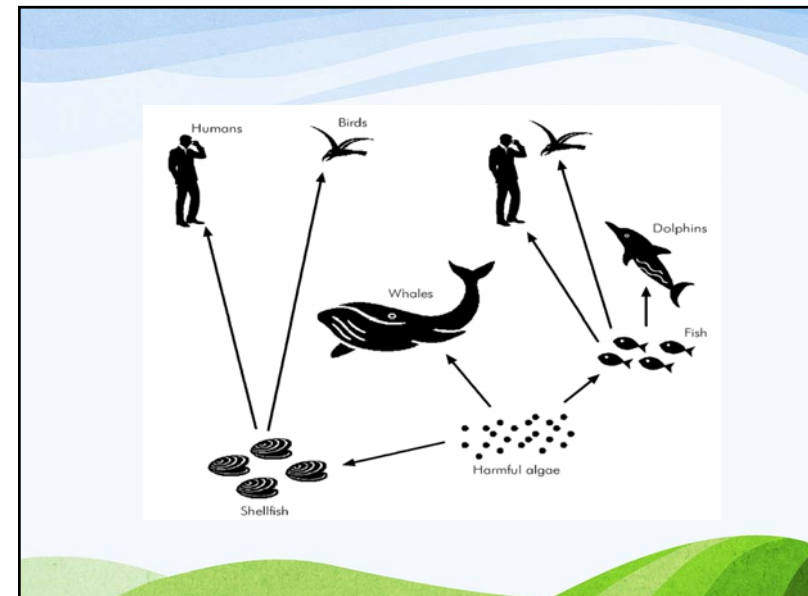


## PENDAHULUAN

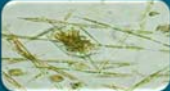



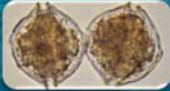
- Penyakit pada Hewan Air
- Lingkungan dan Kesehatan hewan
- Keamanan Pangan
  - Kontaminasi pada hewan laut : virus, bakteri, biotoxin

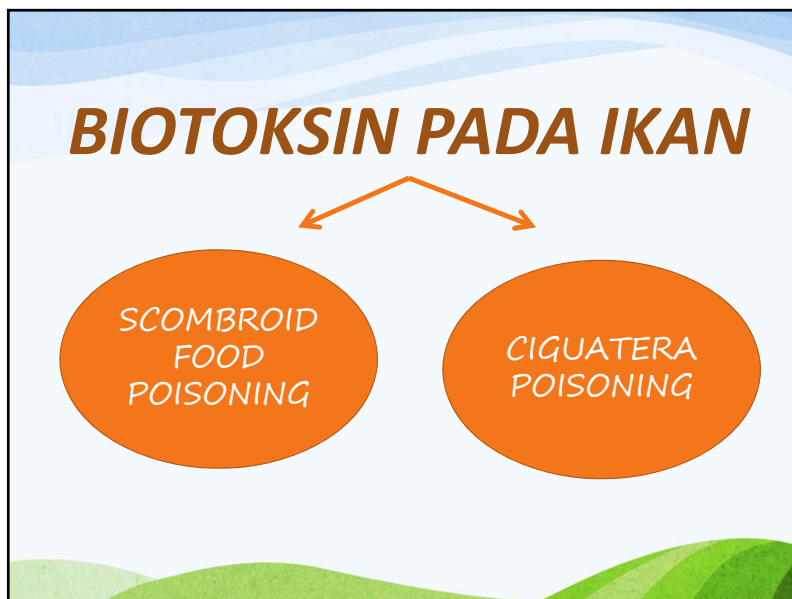
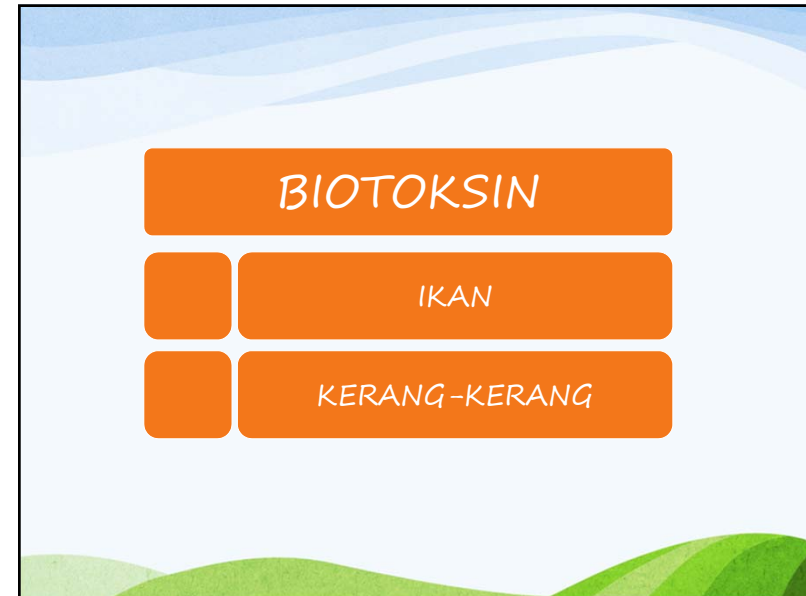
## PENDAHULUAN

- Keracunan makanan pada manusia yang disebabkan oleh makanan yang berasal dari laut (*seafood*) terjadi karena adanya toksin yang dihasilkan oleh alga planktonik, bakteri, dan enzim (biasanya dinoflagellata)
- Toksin diakumulasi dan dimetabolisme oleh *seafood*.
- Dari sekian banyak spesies plankton, sekitar 80 diketahui menghasilkan toksin
- Akibat yang ditimbulkan dapat bermacam-macam tergantung pada jenis toksin yang ada.



### The Problem: Algal Biotoxins

ASP (Domoic/epi-domoic acid)	DSP (Lipophilic toxins include: OA, DTX, YTX, PTX and AZA groups)	PSP (Saxitoxin, GTX and C toxins)
<b>1989</b>	<b>1980s</b> <b>1995</b>	<b>1920s</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Nausea</li> <li>Diarrhoea</li> <li>Vomiting</li> <li>Confusion</li> <li>Memory loss (may be permanent)</li> <li>Can be fatal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nausea</li> <li>Abdominal pains</li> <li>Vomiting</li> <li>Diarrhoea</li> <li>May be tumourigenic</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Numbness/tingling</li> <li>Headaches</li> <li>Nausea, Vomiting</li> <li>Respiratory distress</li> <li>Paralysis</li> <li>Can be fatal</li> </ul>
<b>20 mg/kg</b>	<b>160 µg/kg</b> <b>3.75 mg/kg</b>	<b>800 µg/kg</b>
	  	
<small>Pseudo-nitzschia spp.</small>	<small>Prorocentrum lima    Dinophysis spp.    Alexandrium spp.</small>	<small>Alexandrium spp.</small>
<small>OVERALL - 20 algal species &amp; &gt;35 toxins all present in UK waters and requiring monitoring</small>		
<b>Cefas</b>		



## SCOMBROID FOOD POISONING

## SCOMBROID FOOD POISONING

- *Scombroid food poisoning* adalah keracunan makanan yang ditimbulkan karena tingginya kadar histamin dalam ikan yang telah rusak (busuk).
- Pertama kali dilaporkan tahun 1830 oleh Henderson
- Keracunan ini diakibatkan karena **tingginya kadar Histamin** dalam ikan (yang rusak) tersebut. Histamin tersebut berasal dari Histidin yang dikonversi oleh mikroba.

### Scombroid food poisoning

From Wikipedia, the free encyclopedia

**Scombroid food poisoning**, also known as simple **scombroid**, is a foodborne illness that typically results from eating spoiled fish.<sup>[1]</sup> Symptoms may include flushed skin, headache, itches, blurred vision, abdominal cramps, and diarrhea.<sup>[1]</sup> Onset of symptoms is typically 10 to 60 minutes after eating and can last for up to two days.<sup>[1]</sup> Rarely breathing problems or an irregular heart beat may occur.<sup>[1]</sup>

## SCOMBROID FOOD POISONING

- Di dalam tubuh kita, histamin memiliki efek *psikoaktif* dan *vasoaktif*.
- Efek *psikoaktif* menyerang sistem saraf transmitter manusia, sedangkan efek *vasoaktif*-nya menyerang sistem vaskular.
- Pada orang-orang yang peka, histamin dapat menyebabkan migren dan meningkatkan tekanan darah
- Terdapat senyawa-senyawa kimia lain yang berasosiasi dengan keracunan tersebut, namun belum diketahui dengan jelas.

## SCOMBROID FOOD POISONING

Ikan-ikan penyebab penyakit ini berasal dari famili *Scombridae* dan *Scomberesocidae*.

Contoh: ikan tuna dan makarel.



## SCOMBROID FOOD POISONING

### Analisa Histamin

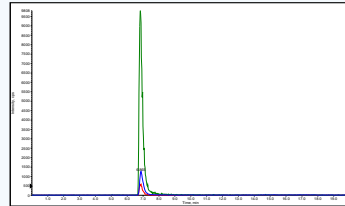
1. LC-MS/MS → Liquid liquid Extraction
2. HPLC-UV → Pre Column derivated Extraction



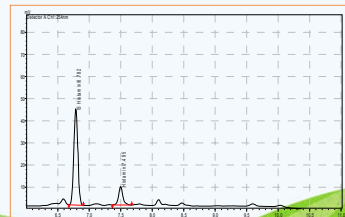
## SCOMBROID FOOD POISONING

### Contoh Kromatogram Histamin

- LC-MS/MS →



- HPLC-UV →



# CIGUATERA POISONING

## CIGUATERA POISONING

- *Ciguatera* merupakan keracunan yang disebabkan oleh konsumsi ikan yang mengandung oleh *ciguatoxin* → Fish-borne disease
- Ikan yang mengandung *ciguatoxin* umumnya merupakan ikan-ikan yang hidup pada ekosistem terumbu karang (coral reef), terutama *tropical reef*.
- *Ciguatoxin* akan mengalami akumulasi dari ikan kecil (pemakan plankton) → ikan dengan tingkatan trofik tinggi.
- *Ciguatoxin* dihasilkan oleh mikroba yang dikonsumsi ikan → dinoflagellata terutama dari jenis *Gambierdiscus toxicus*.

Ciguatera fish poisoning	
Synonyms	Ciguatera, ciguatera food poisoning
Chemical structure of ciguatera	
Symptoms	Diarrhea, vomiting, numbness, itches, sensitivity to hot and cold, dizziness, weakness <sup>[1]</sup>
Usual onset	30 min to 2 days <sup>[1]</sup>
Duration	Few weeks to months <sup>[1]</sup>
Cases	Ciguatera and maitotoxin within certain reef fish <sup>[1]</sup>
Risk factors	Barbaroids, groupers, moray eel, amberjack, sea bass, sturgeon <sup>[1]</sup>
Diagnostic method	Based on symptoms and recently eating fish <sup>[1]</sup>
Differential diagnosis	Paralytic shellfish poisoning, neurotoxic shellfish poisoning, scombroid food poisoning, scombroid poisoning <sup>[1]</sup>
Treatment	Mannitol, gabapentin, amitriptyline <sup>[1]</sup>
Prognosis	Risk of death = 0.1% <sup>[1]</sup>
Frequency	~50,000 per year <sup>[1]</sup>

## CIGUATERA POISONING

- Penghasil *ciguatera toxin* merupakan bakteri/mikroba lain yang berasosiasi dengan dinoflagellata (Wilson, 2000)
- Spesies ikan yang umum diketahui sebagai sumber *ciguatera poisoning* antara lain: sea bass, belut laut, barakuda, ikan makarel, dll.
- *Ciguatoxin* bersifat *heat stable* dan *lipid soluble*; *ciguatoxin* tidak terpengaruh oleh suhu, asam lambung, dan proses pemasakan.
- Keberadaan toksin pada ikan tidak memengaruhi rasa, bau, dan warna ikan.

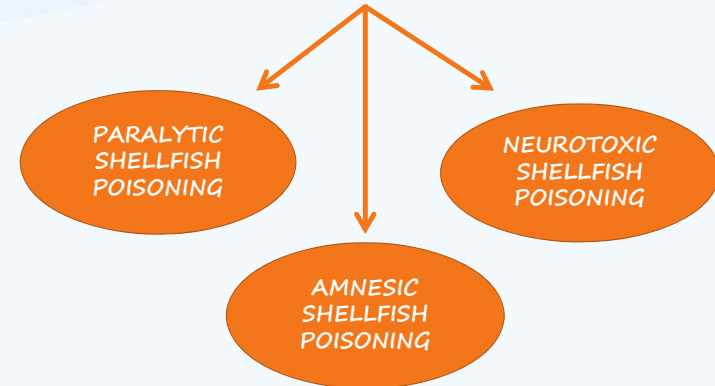
Ciguatera fish poisoning	
Synonyms	Ciguatera, ciguatera food poisoning
Chemical structure of ciguatera	
Symptoms	Diarrhea, vomiting, numbness, itches, sensitivity to hot and cold, dizziness, weakness <sup>[1]</sup>
Usual onset	30 min to 2 days <sup>[1]</sup>
Duration	Few weeks to months <sup>[1]</sup>
Cases	Ciguatera and maitotoxin within certain reef fish <sup>[1]</sup>
Risk factors	Barbaroids, groupers, moray eel, amberjack, sea bass, sturgeon <sup>[1]</sup>
Diagnostic method	Based on symptoms and recently eating fish <sup>[1]</sup>
Differential diagnosis	Paralytic shellfish poisoning, neurotoxic shellfish poisoning, scombroid food poisoning, scombroid poisoning <sup>[1]</sup>
Treatment	Mannitol, gabapentin, amitriptyline <sup>[1]</sup>
Prognosis	Risk of death = 0.1% <sup>[1]</sup>
Frequency	~50,000 per year <sup>[1]</sup>

## Biotoxin Detection Methods

Metode yang Dapat Digunakan Untuk Analisa  
**CIGUATOXIN**

1. LC-FLD → Derivated Extraction
2. LC-MS/MS → Liquid Extraction with Clean Up

## BIOTOKSIN PADA KERANG-KERANGAN



## NEUROTOXIC SHELLFISH POISONING (NSP)



## NEUROTOXIC SHELLFISH POISONING

- Komponen utama → Brevetoxin
- Sulit dideteksi pada makanan
- Akibat mengonsumsi kerang atau tiram
- Dihasilkan oleh *Ptychodiscus brevis* atau *Gymnodinium breve*
- Tingkat kematian sangat rendah

	Brevetoxin A <sup>21</sup>	Brevetoxin B <sup>21</sup>
chemical structure		
subtypes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brevetoxin-1 (PbTx-1) R = -CH<sub>2</sub>Cl-CH<sub>2</sub>CHO</li> <li>• Brevetoxin-7 (PbTx-7) R = -CH<sub>2</sub>Cl-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH</li> <li>• Brevetoxin-10 (PbTx-10) R = -CH<sub>2</sub>CH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brevetoxin-2 (PbTx-2) R = -CH<sub>2</sub>Cl-CH<sub>2</sub>CHO</li> <li>• Brevetoxin-3 (PbTx-3) R = -CH<sub>2</sub>Cl-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH</li> <li>• Brevetoxin-6 (PbTx-6) R = -CH<sub>2</sub>OOCH<sub>2</sub>Cl</li> <li>• Brevetoxin-9 (PbTx-9) R = -CH<sub>2</sub>OH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH</li> </ul>
Other Brevetoxins	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brevetoxin-5 (PbTx-5) like PbTx-3, but acetylated hydroxyl group in position 38.</li> <li>• Brevetoxin-6 (PbTx-6) like PbTx-2, but double bond 27-28 is epoxidized.</li> </ul>	

## NEUROTOXIC SHELLFISH POISONING

### GEJALA YANG DITIMBULKAN

- Mati rasa pada mulut
- Rasa gatal pada mulut, tangan, dan kaki
- Koordinasi yang buruk
- Keluhan sistem pencernaan
- Perasaan panas-dingin

## Biotoxin Detection Methods

### Metode yang Dapat Digunakan Untuk Analisa BREVETOXIN

1. Neuroblastoma Assay
2. LC-MS/MS → Liquid Extraction with Clean Up

## AMNESIC SHELLFISH POISONING (ASP)



## AMNESIC SHELLFISH POISONING

- *Amnesic shellfish poisoning* merupakan keracunan makanan yang disebabkan oleh toksin berupa asam domoat.
- Asam domoat yaitu asam amino neurotoksik yang dihasilkan oleh alga *Nitzhgia pungens*.
- Keracunan disebabkan karena memakan kerang atau ikan laut yang mengandung *Nitzhgia pungens*.

## AMNESIC SHELLFISH POISONING

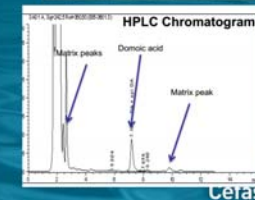
### GEJALA YANG DITIMBULKAN

- Kesulitan pencernaan termasuk muntah, kram, dan diare dalam waktu 24 jam.
- Pasien yang sangat rentan: timbul gejala neurologis seperti sakit kepala, pusing, gangguan koordinasi, dan kehilangan memori jangka pendek dalam waktu tiga hari.
- Dapat menyebabkan kerusakan otak dan kematian. Kerusakan otak yang ditimbulkan bersifat tidak dapat pulih (*irreversible*).

## Biotoxin Detection Methods

### ASP

- Domoic acid & epi-domoic acid – total content of whole shellfish or edible part alone
- EU reference method: HPLC-UV
- Shellfish + 50% Methanol extraction
- With or without SPE clean-up
- Very simple, reproducible – no major issues



## PARALYTIC SHELLFISH POISONING (PSP)



## PARALYTIC SHELLFISH POISONING

- PSP adalah penyakit serius yang bersifat neurotoksik, diakibatkan oleh kerang yang terkontaminasi dengan alga beracun.
- PSP disebabkan oleh alga dari golongan Dinoflagellata dan Diatom, serta dari cyanobacteria.
- Racun yang dihasilkan berupa saxitoxin ( $C_{10}H_{17}N_7O_3 \cdot 2HCl$ ).



## PARALYTIC SHELLFISH POISONING

### GEJALA YANG DITIMBULKAN

- Ketebalan pada wajah, bibir, dan jari-jari tangan
- Gatal-gatal
- Kejang mulut
- Pening
- Paralisis
- Serangan jantung
- Kegagalan sistem pernapasan

## PSP toxins

- Saxitoxins (>55 analogues)
- Sodium channel blocker
- Highly potent neurotoxin\*
  - Mice LD<sub>50</sub> ~ 10 µg/kg (I.P injection) for STX
  - Acute oral tox of STX in mice 209-588 µg/kg
  - Severe illness in human reported at 5.6 – 2,058 µg/kg STX eq
- Listed in Chemical Weapons Convention
- Majority are hydrophilic – but analogues also exist with hydrophobic substituents
- Stable in weakly acidic solutions
- MPL = 800 µg STX eq/kg shellfish tissue

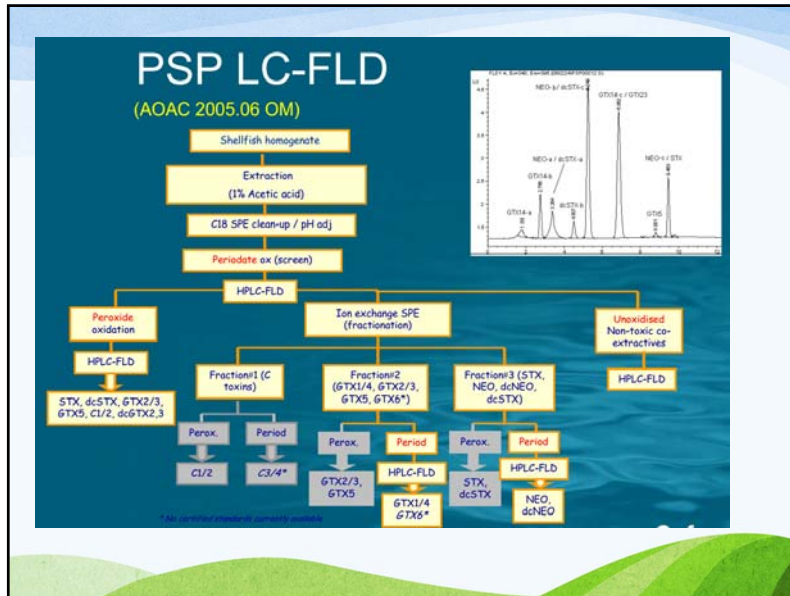
## PSP Methods

1. AOAC 959.08 MBA (Ref method)
2. Alternative methods authorised in EU under reg. 2074/2005:
  - Includes: "Lawrence method" - HPLC (AOAC 2005.06 method)
3. Other methods authorised in US/Canada:
  - PCOX LC-FLD (AOAC 2011.02)
  - Receptor Binding Assay (AOAC 2011.27)
4. Until recently no validated LC-MS method
  - None authorised in EU or US legislation

## 1. PSP MBA

- Until Oct 2006 – all PSP testing conducted by MBA
- Shellfish homogenised & extracted (HCl)
- Injected into multiple mice
- Death time gives PSP toxicity
- Assay calibrated using STX solution bimonthly
- LOD: ~330 µg STX eq./kg flesh (<1/2 regulatory limit)
- Negative samples – no death – mice still euthanised
- Many thousands mice required for routine testing





### 3. Method PSP lainnya

AOAC 2011.02 – Post column oxidation LC-FLD

- Tidak masuk dalam undang-undang EU
- Butuh 2 kolom untuk running tiap sampel
- Menggunakan Ion-pairing kromatografi
- Lifetime kolom sangat pendek
- Rentan terhadap matrik effect

### 4. LC-MS/MS options?

a) Sensitivity & run-time

b) In-source fragmentation mitigation

### HILIC separation

- Waters BEH Amide HILIC
- +/- switching
- Full separation of critical pairs, including epimers
- Total cycle time of 8.5 min for all PSTs

