ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

- GLYCOLS
- BRAIN

EKSPRESI PROTEIN REELIN PADA FETUS MENCIT (*Mus musculus*) YANG TERINDUKSI 2-METHOXYETHANOL (2-ME) SAAT MASA ORGANOGENESIS OTAK

SKRIPSI

A-8 05.06
Kur
c

KURNIAWATI

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005

MILIK PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Judul : **EKSPRESI PROTEIN REELIN PADA FETUS MENCIT (*Mus musculus*) YANG TERINDUKSI 2-METHOXYETHANOL (2-ME) SAAT MASA ORGANOGENESIS OTAK**

Penyusun : **Kurniawati**

NIM : **080112288**

Tanggal Ujian: 10 Agustus 2005

Naskah skripsi ini telah diperbaiki sesuai dengan saran dalam forum ujian.

Disetujui oleh :

Pembimbing I	Pembimbing II
Drs. Win Darmanto M.Si, Ph.D	**Drs. I. B. Rai Pidada M.Si**
NIP. 131 653 741	**NIP. 130 531 824**

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi
FMIPA Universitas Airlangga

Dra. Kosmanida, M.Kes
NIP. 131 126 075

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia diperpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga. Diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi perpustakaan, tetapi pengutipan seijin penulis dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah.

Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.

Road of Ministry

As you travel this
special road of ministry;
may the Spirit of God
surround you

Always remember that
the Lord has promised to
be there, whether you are
in a valley, or on top of
a mountain

His hand will guide and
protect you from harm,
as long as you stay
close to His side

If you should get
ahead of Him,
He will humble you.
If you should falter,
He will encourage you

His grace will be sufficient
for you to carry out
the ministry He has anointed
you to walk in.
His blessings will
follow you wherever you go.

Kupersembahkan skripsi ini untuk:
Ayah Ibuku tercinta

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan atas kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala berkat dan rahmatNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini yang berjudul **"Ekspresi Protein Reelin Pada Fetus Mencit (*Mus musculus*) Yang Terinduksi 2-Methoxyethanol (2-ME) Saat Masa Organogenesis Otak"**.

Penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan beberapa pihak yang turut mendukung, mengoreksi dan memperbaiki skripsi ini. Rasa terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Drs. H. A. Latief Burhan, MS selaku Dekan FMIPA UA.
2. Dra. Rosmanida, M.Kes selaku Ketua Jurusan Biologi FMIPA UA
3. Drs. Win Darmanto M.Si, Ph.D dan Drs. I.B. Rai Pidada M.Si selaku dosen pembimbing I dan II atas ilmu, bimbingan, dukungan dan pengarahannya selama ini.
4. Sugiharto S.Si, M.Si dan Drs. Noer Moehammadi M. Kes selaku dosen penguji III dan IV yang telah memberikan saran dan kritikannya.
5. Drs. Eko Prihiyantoro M. Kes selaku mantan dosen wali yang sering memberikan saran dan motivasi.
6. Drs. Noer Moehammadi M.Kes selaku dosen wali yang sering memberikan dukungan dan bimbingannya.
7. Bapak dan Ibuku tercinta yang selalu memberikan dorongan, kepercayaan dan kasih sayang sehingga penulis mampu memyelesaikan penulisan skripsi ini.
8. Anti dan Amel yang selalu ada dan memberikan dorongan dalam penulisan ini.
9. Ana, Cece' dan Rinna , teman seperjuangan dan berbagi rasa yang indah saat di rumah hewan.
10. Teman-temanku Angkatan '01 yang selalu mensuport dan selalu berbagi rasa tentang segala hal terutama saat-saat menyenangkan dan kenangan tak terlupakan di Cangar.
11. Adik adik HIMBIO angkatan 2002, 2003 dan 2004.

12. Keluarga Besar S70, tak terasa sudah empat tahun telah bersama merasakan suka duka kehidupan dan telah mengajariku bagaimana belajar memahami karakter orang-orang.
13. Anak-anak KKNBK Tandes Kidul yang penuh warna dan ekspresi terutama Farid, Riska, Deny, Niken dan Ade.
14. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulis sadar bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan dan kesalahan yang perlu diperbaiki. Oleh karena itu, adanya saran dan kritik dari pembaca sangat penulis harapkan. Akhir kata, semoga penulisan ini memberikan manfaat dan menambah wawasan serta ilmu pengetahuan pembaca.

Surabaya, Agustus 2005

Penulis

Kurniawati. 2005. Ekspresi Protein Reelin pada Fetus Mencit (*Mus musculus*) Yang Terinduksi 2-Methoxyethanol (2-ME) Saat Masa Organogenesis Otak. Skripsi dibawah bimbingan Drs. Win Darmanto, M. Si, Ph.D dan Drs. I. B. Rai Pidada, M.Si. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Airlangga. Surabaya.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *2-Methoxyethanol* (2-ME) terhadap kematian sel, profil total protein dan ekspresi protein Reelin pada jaringan otak mencit (*Mus musculus*). 2-ME merupakan senyawa yang bersifat toksik terhadap jaringan embrional. Reelin yang merupakan protein ekstraseluler yang sangat penting terhadap migrasi sel saraf dalam proses pembentukan laminasi otak dan perkembangan otak secara keseluruhan.

Mencit bunting pada umur kebuntingan (UK) 10 hari diberi 2-ME melalui injeksi intraperitoneal, sedangkan pada kelompok kontrol diberi pelarut akuabides. Induk mencit dibunuh secara dislokasi servix pada 48, 72 dan 96 jam setelah perlakuan untuk diambil fetusnya. Otak fetus dibagi tiga macam pengamatan, yaitu digunakan untuk pengamatan kematian sel, profil total protein dan ekspresi protein Reelin. Data kematian sel dianalisis dengan *Wilcoxon sign rank test* sedangkan untuk profil total protein dan protein Reelin dianalisis secara deskriptif.

Hasil pengamatan kematian sel menunjukkan adanya peningkatan kematian sel pada kelompok perlakuan (44, 58%) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (15, 75%). Hasil pengamatan profil total protein yang diamati dengan SDS-PAGE dan selanjutnya densitas band diukur dengan densitometri menunjukkan adanya penurunan kandungan total protein meskipun pada band tertentu menunjukkan adanya peningkatan kandungan protein. Sedangkan pengamatan terhadap ekspresi protein Reelin dengan menggunakan antibodi CR-50 (metode *Western Blot*) dan selanjutnya densitas band diukur dengan densitometri, menunjukkan eskpresi protein Reelin menurun setelah 48 jam pemberian 2-ME dan meningkat lagi pada selang waktu 96 jam setelah pemberian 2-ME.

Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa dosis tunggal 2-ME 12,5 mmol/kg BB yang diberikan pada masa prenatal (UK 10 hari) menyebabkan kematian sel, mempengaruhi kandungan total protein dan tidak menyebabkan penurunan ekspresi protein Reelin pada saat terjadi perkembangan otak.

Kata kunci: *2-methoxyethanol* (2-ME), otak, protein Reelin, Western Blot.

Kurniawati, 2005, Expression of Reelin in Mice Fetuses (*Mus musculus*) Induced by 2-Methoxyethanol (2-ME) On The Stage of Brain Organogenesis. This Scription is Supervised by Drs. Win Darmanto M.Si, Ph.D And Drs. I. B. Rai Pidada M.Si, Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Airlangga University Surabaya.

ABSTRACT

The purposes this research are designed to evaluate the effects of 2-methoxyethanol (2-ME) to the cell death, the profile total of protein and the expression of Reelin in brain tissue of mice embryo. 2-ME is a toxic substance to embryonic tissue. Reelin is a extracellular protein that important for migrating neuron cell in brain layering process and brain development.

Pregnant mice on gestation day (GD) 10 were injected intraperitoneally and the controls were given aquabidest. The fetus was killed by cervix dislocation at 48, 72 and 96 hours after 2-ME administration. Brains of fetus were colelected and divided into three treatments, such as cell death, profile total of protein and Reelin expression. The data of cell death was analyzed with *Wilcoxon sign rank test*. Descriptive point of view was used to analyze the profile total of protein and Reelin expression.

The results of cell death show that the number when observed cell death was increase in the treatment groups (44, 58%) rather than control groups (15, 75%). The result of profile total of protein that observed with SDS-PAGE and the density band was measured by densitometry, showed that content of total protein was decreased although it in some band show increased. The expression of Reelin by antibody CR-50 (*Western Blot* method) and then density band was measured by densitometry, showed that Reelin expression decreased after 48 hours from 2-ME administration and increased after 96 hours 2-ME administration.

These results suggested that single dose of 2-ME 12,5 mmol/kg body weight that gave on prenatal (GD10) causes cell death, causes the profile of total protein were decreased and expression of Reelin in brain was not decreased.

Key words : brain, *2-methoxyethanol* (2-ME), protein Reelin, Western Blot.

DAFTAR ISI

Halaman

KATA PENGANTAR i
ABSTRAK iii
ABSTRACT iv
DAFTAR ISI v
DAFTAR GAMBAR vi
DAFTAR TABEL vii
DAFTAR LAMPIRAN viii

BAB I. PENDAHULUAN 1
1.1. Latar Belakang Masalah 1
1.2. Masalah Penelitian 4
1.3. Asumsi Penelitian 5
1.4. Hipotesis Penelitian 5
1.4.1. Hipotesis kerja 5
1.4.2. Hipotesis statistik 5
1.5. Tujuan Penelitian 6
1.6. Manfaat Penelitian 6

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA 7
2.1. Tinjauan Tentang 2-ME 7
2.2.1. Struktur dan metabolisme 2-ME 7
2.2.2. Toksisitas dan teratogenitas 2-ME 9
2.2. Tinjauan Tentang Mencit 10
2.2.1. Klasifikasi mencit 10
2.2.2. Sistem reproduksi jantan 10
2.2.3. Sistem reproduksi betina 11
2.2.4. Perkembangan otak Mencit 11
2.3. Tinjauan Tentang Kematian Sel 14
2.4. Tinjauan Tentang Protein Reelin 16
2.5. Tinjauan Tentang Western Blot 20

BAB III. METODE PENELITIAN 22
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian 22
3.2. Hewan Coba 22
3.3. Bahan dan Alat Penelitian 23
3.3.1 Bahan penelitian 23
3.3.2 Alat penelitian 23
3.4 Cara Kerja 24
3.4.1 Tahap persiapan hewan coba 24
3.4.2 Tahap perkawinan 24
3.4.3 Tahap perlakuan 24
3.4.3.1 Perlakuan kematian sel 24
3.4.3.2 Perlakuan profil protein 25
3.4.3.2.1 Kandungan total protein 25

3.4.3.2.2 Perlakuan protein Reelin 26
3.5 Rancangan Penelitian 26
3.6 Varibel Penelitian 27
3.7 Cara Pengambilan Data 27
3.7.1 Data kematian sel 27
3.7.2 Data profil protein 27
3.7.2.1 Kandungan total protein 27
3.7.2.2 Data protein Reelin 28
3.8 Analisis Data 28
3.8.1 Data kematian sel 28
3.8.2 Data profil protein 28
3.8.2.1 Kandungan total protein 28
3.8.2.2 Data protein Reelin 28

Bab IV. HASIL DAN PEMBAHASAN 29
4.1 Hasil Penelitian 29
4.1.1 Hasil penelitian kematian sel 29
4.1.2 Pengamatan profil protein 32
4.1.1 Profil total protein 32
4.1.2 Profil protein Reelin 34
4.2 Pembahasan 36
4.2.1 Pengaruh 2-ME terhadap kematian sel 36
4.2.2 Pengaruh 2-ME terhadap profil protein total dan ekspresi protein Reelin 41

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN 45
5.1 Kesimpulan 45
5.2 Saran 45

DAFTAR PUSTAKA 47

LAMPIRAN

DAFTAR GAMBAR

No	JUDUL	Halaman
Gambar 1.	Rumus bangun 2-ME	7
Gambar 2.	Perubahan 2-ME menjadi MAA	8
Gambar 3.	Model efek protein Reelin terhadap cerebrum mencit	20
Gambar 4.	Kematian sel pada sayatan histologi otak fetus UK 12 hari (48 jam setelah pemberian 2-ME) dengan pewarnaan HE	30
Gambar 5.	Histogram persentase sel otak yang mengalami kematian di *cerebral cortex* fetus mencit yang induknya diberi 2-ME dengan dosis 12,5 mmol/ kg BB pada UK 10 hari setelah selang waktu 48 jam penyuntikan	31
Gambar 6.	Profil protein yang ditunjukkan dengan hasil elektroforesis protein total dengan SDS-PAGE 10-20% tris-trisine	33
Gambar 7.	Pengamatan kadar protein Reelin dengan metode Western Blot yang menggunakan antibodi CR-50 (anti-Reelin)	34
Gambar 8.	Jalur radikal bebas yang dapat menyebabkan terjadinya apoptosis	38
Gambar 9.	Jalur apoptosis melalui sinyal intrinsik atau *mitochondrial pathway*	39
Gambar 10.	Jalur apoptosis melalui *death receptor Fas-Ligand* atau *death-domain-containing protein* (PIDD)	40
Gambar 11.	Jalur apoptosis melalui *Apoptosis-inducing Factor* (AIF)	40

DAFTAR TABEL

No	JUDUL	Halaman

Tabel 1. Rata-rata persentase sel otak yang mengalami kematian pada pembedahan 48 jam setelah pemberian 2-ME 12,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan 10 hari 31

Tabel 2. Hasil uji protein dengan metode Lowry 32

Tabel 3. Kandungan total protein yang diukur berdasarkan densitas band dengan menggunakan densitometri 33

Tabel 4. Kandungan protein Reelin yang diukur berdasarkan densitas band dengan menggunakan hasil densitometri 35

DAFTAR LAMPIRAN

No	JUDUL

Lampiran 1. Pembuatan larutan uji

Lampiran 2 Pembuatan preparat Histologi

Lampiran 3 Cara pembuatan larutan paraformaldehyde (PFA) 4%

Lampiran 4 Penentuan profil total protein dengan SDS-PAGE

Lampiran 5. Penentuan kadar protein Reelin dengan metode Western Blot

Lampiran 6. Pembuatan larutan Copper Tartrate / Carbonte (CTC) untuk metode Lowry

Lampiran 7. Data mentah penghitungan kematian sel saraf pada otak mencit

Lampiran 8. Hasil uji *Wilcoxon sign rank test*

Lampiran 9. Hasil densitometri

Lampiran 10. Dokumentasi selama penelitian

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Senyawa kimia *2-methoxyethanol* (2-ME) atau biasa dikenal dengan *ethylene glycol monomethyl ether* (EGME); *glycol monomethyl ether; methyl cellosolve; methyl oxitol; ektasolve; methoxyethanol; glycomethyl ether; methoxyhydroxyethanol* dan *monomethyl ether of ethylene glycol* (Brown *et al.*,1984; Anonimus[3], 2004; Miller *et al.*,1983) merupakan senyawa yang digunakan dalam industri cat, pewarna kuku dan pembersihnya, minyak cat, zat warna, vernis, bahan bakar pesawat, parfum, tinta dan perekat (Anonimus[1], 2004; Anonimus, 1994; Scott *et al.*, 1989). Senyawa 2-ME yang masuk ke dalam tubuh, pada hepar akan mengalami oksidasi menjadi *methoxyacetic acid* (MAA) (Brown *et al.*, 1984) atau disebut juga dengan *propylene glycol monomethyl ether* (PGME) dan *2-methoxyacetaldehid* (2-MALD) (Miller *et al.*, 1983).

Pemberian senyawa 2-ME dengan konsentrasi 2 mM atau lebih pada masa perkembangan organogenesis dapat menyebabkan perkembangan embrionik abnormal. Tikus yang diinjeksi 2-ME pada saat umur kebuntingan 14 hari memiliki sedikit kemampuan untuk memetabolisme *dimethoxy ethyl phatalat* (DMEP) menjadi MAA yang dikatalisis oleh *alkohol dehydrogenase* (ADH). Akibat MAA pada anak fetus mencit yang lahir dapat mengakibatkan terjadinya kelainan eksternal seperti *syndactyly*, *micromelia*, *ectrodactyly* dan

UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

hidrosefalus. Hal ini menunjukkan bahwa 2-ME dan metabolitnya merupakan bahan yang bersifat embriotosik dan teratogenik (Sax and Lewis, 1989 dalam Anonimus[1], 2004; Sleet *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1984).

Dalam penelitian Darmanto *et al.*, (1994) menyatakan bahwa pemberian 2-ME pada mencit yang bunting menyebabkan terjadinya peningkatan aborsi, lahir mati, hidrosephalus dan skeletal malformasi atau kelainan perkembangan seperti kelainan anggota tubuh.

Terjadinya keabnormalan anggota tubuh disebabkan oleh kematian sel pada jaringan *mesencym* dan di bagian ektoderm *lim bud* termasuk *Apical Ectoderm Ridge* (AER) (Rasjad *et al.*, 1991). Pada AER terjadi perubahan degeneratif struktur dan penyusutan yang lebih cepat sehingga banyak sel yang mengalami kematian. MAA juga menginduksi terjadinya penurunan ketersediaan purin serta pirimidin di dalam jaringan sehingga mengganggu proses proliferasi dan differensiasi sel pada embrio yang sedang aktif melakukan sintesis DNA maupun RNA. Sintesis protein atau RNA yang terhambat pada sel tertentu dapat mengakibatkan apoptosis (Umansky, 1996 dalam Ruyani *et al.*, 2001).

Toksisitas 2-ME juga dapat mengakibatkan kelainan perkembangan otak yaitu *exencephaly* karena terjadi kegagalan penutupan *neural tube* dan tidak mengalami pembukaan lagi. Terjadinya kegagalan tersebut dikarenakan adanya kematian sel yang teridentifikasi melalui semiquntitatif histopatologi dengan ciri karakter morfologinya mengalami kondensasi kromatin,

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

fragmentasi DNA dan kondensasi sitoplasma serta pengurangan sel di *superfacial paraxial mesoderm* dan neuroephitelium (Terry *et al.*, 1996).

Kelainan perkembangan otak yang serupa juga dapat disebabkan oleh radiasi sinar X yang dapat mempengaruhi sel granulosa di *external granular layer* (EGL) pada korteks *cerebellar.* Selama masa perkembangan sel granulosa mengalami proliferasi, migrasi, penempatan posisi dan pendewasaan (Kumoro *et al.*, 1998 dan Hatten *et al.*, 1993 dalam Darmanto, 2002). Akibat dari radiasi sinar X pada post natal 19-21 hari menyebabkan sel granulosa mengalami perubahan dimana pada *lobus anterior* lebih sensitif jika dibandingkan dengan *lobus posterior.* Pada *lobus anterior*, terjadi peningkatan kematian sel pada sel granulosa sehingga protein Reelin yang dihasilkan menurun. Hal ini mengakibatkan meningkatnya kelainan sel Purkinje heterotropik. Sedangkan pada *lobus posterior* terjadi kematian sel yang sedikit, sehingga sel granulosa mampu mensintesis protein Reelin dan dengan adanya protein Reelin yang masih melimpah mengakibatkan kelainan sel Purkinje heterotropik yang terjadi sangat sedikit. (Darmanto, 1999). Pada penelitian Darmanto (2004), menunjukkan bahwa protein Reelin yang di sintesis rendah oleh sel granulosa dari *cerebellum*, dan jika ini terjadi kematian sel granulosa, dapat mengakibatkan ekspresi protein Reelin akan menurun, selanjutnya mempengaruhi proses perkembangan otak khususnya pada saat proses laminasi jaringan otak.

Pada penelitian sebelumnya telah ditunjukkan bahwa 2-ME juga menyebabkan kelainan otak, baik pada *cerebrum* maupun

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

cerebellum yang mirip dengan kelainan yang disebabkan radiasi sinar X (Darmanto, 2004).

Pada umur kebuntingan (UK) 10 hari terjadi proses pembentukan laminasi pada otak dan sel aktif melakukan proliferasi. Sehingga pada penelitian ini ingin dibuktikan apakah 2-ME yang diinjeksikan pada UK 10 hari dapat menginduksi kelainan otak pada mencit sehingga mengakibatkan kematian sel dan mempengaruhi kandungan protein total dan kandungan protein Reelin. Disisi lain 2-ME juga telah diketahui mampu menyebabkan kematian sel pada sel saraf, khususnya yang masih bersifat proliferatif. Oleh karena itu pada penelitian ini juga ingin mengevaluasi dampak kematian sel terhadap profil protein secara keseluruhan pada otak dan pada protein Reelin secara khususnya.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah 2-ME yang bersifat toksik terhadap jaringan embrional mampu menyebabkan kematian sel pada otak fetus mencit (*Mus musculus*)?
2. Apakah 2-ME yang bersifat toksik terhadap jaringan embrional mampu mempengaruhi profil protein total pada otak fetus mencit (*Mus musculus*)?
3. Apakah 2-ME yang bersifat toksik terhadap jaringan embrional mampu mempengaruhi ekspresi protein Reelin pada otak fetus mencit (*Mus musculus*)?

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

1.3 Asumsi Penelitian

Senyawa 2-ME merupakan zat teratogen dan embriotoksik karena mampu menyebabkan perkembangan embrio abnormal seperti terjadi kelainan perkembangan anggota tubuh dan otak. Sifat toksisitas 2-ME mampu mengakibatkan kelainan pada perkembangan otak. Terjadinya keabnormalan pada embrio dan kelainan perkembangan otak diduga disebabkan adanya kematian sel sebagai efek toksik dari 2-ME.

Pada UK 10 hari terjadi proses proliferasi sel otak dan laminasi pada otak besar sehingga diasumsikan bahwa pemberian 2-ME pada saat UK 10 hari menyebabkan kematian sel dan berpengaruh terhadap profil protein total dan ekspresi protein Reelin sehingga mengganggu migrasi sel-sel neuron.

1.4 Hipotesis Penelitian

1.4.1 Hipotesis Kerja

Jika 2-ME bersifat toksik terhadap jaringan embrional maka induksi 2-ME dengan dosis 12 mmol/kg bb pada mencit betina (*Mus musculus*) pada umur kebuntingan 10 hari dapat menyebabkan kematian sel otak fetus.

1.4.2 Hipotesis Statistik

H_0 : Tidak ada perbedaan jumlah sel otak yang mengalami kematian sel pada fetus mencit UK 10 hari yang terinduksi 2-ME dan yang tidak terinduksi 2-ME.

1.5 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh 2-ME terhadap jaringan embrional sehingga mampu menyebabkan kematian sel pada otak fetus mencit (*Mus musculus*).
2. Untuk mengetahui pengaruh 2-ME terhadap jaringan embrional mampu mempengaruhi profil protein total pada otak fetus mencit (*Mus musculus*).
3. Untuk mengetahui pengaruh 2-ME terhadap jaringan embrional mampu mempengaruhi ekspresi protein Reelin pada otak fetus mencit (*Mus musculus*).

1.6 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat digunakan sebagai informasi ilmiah mengenai pengaruh 2-ME terhadap kematian sel, profil protein total dan ekspresi protein Reelin di jaringan otak fetus mencit (*Mus musculus*) sehingga kontak langsung dengan 2-ME perlu dicegah.

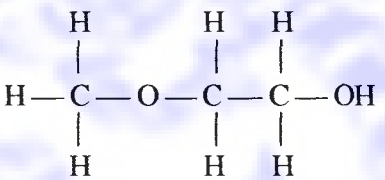
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang 2-ME

2.1.1 Struktur dan metabolisme 2-ME

Senyawa *2-methoxyethanol* (2-ME) merupakan salah satu komponen terbesar yang dapat dikatagorikan sebagai E-series (*ethylene glycol series*) atau P-series (*prophylene glycol ethers*). 2-ME sebagai E-series mempunyai rumus molekul $C_3H_8O_2$ dan berikut ini adalah gambar struktur dari 2-ME :



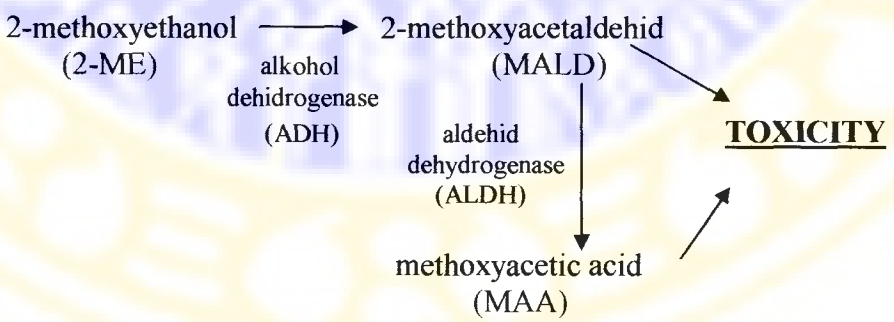
Gambar 1. Rumus bangun 2-ME (Sumber Anonimus, 2003).

Dari struktur 2-ME di atas, dapat diketahui bahwa 2-ME mempunyai dua gugus fungsi yaitu *hydroxyl* dan *ether* yang menyebabkan adanya keseimbangan antara *hydrofobik* dan *hydrofilik* sehingga 2-ME merupakan pelarut dan agen yang efektif (Anonimus, 2003).

Senyawa 2-ME tidak secara langsung disintesis di alam melainkan di industri yang bertujuan untuk memproduksi 2-ME, misalnya pada industri vernis, industri zat warna (cat), ataupun pada pesawat terbang yang digunakan sebagai pendingin pada bahan bakar pesawat. Dari hasil industri inilah 2-ME akan dibuang ke lingkungan (Anonimus[1], 2004;Anonimus[3], 2004).

Senyawa 2-ME merupakan suatu cairan yang tidak berwarna, mudah menguap, mudah terbakar, digunakan sebagai bahan pelarut organik dan sebagai bahan *plasticizier* (Brown *et al.*, 1984). 2-ME memiliki titik lebur -85,1°C, titik didih 124,6°C dan berat molekul 76,09 g/mol (Anonimus[3], 2004).

Sifat teratogenik 2-ME diketahui merupakan efek dari hasil metabolisme 2-ME menjadi *2-methoxyacetaldehid* (MALD) dengan bantuan enzim *alkohol dehidrogenase* (ADH), menyebabkan hilangnya 2 molekul hidrogen dan memakai oksigen bebas atau O_2 yang lepas dari sistem dan menjadi radikal bebas yaitu superoksida sebagai akseptornya sehingga membentuk hidrogen peroksida (H_2O_2). H_2O_2 kemudian akan diubah menjadi H_20 dan O_2 dengan bantuan katalase, yaitu enzim yang terdapat pada peroksisome (Dreosti, 1991 *dalam* Lunitasari, 2004). Penghancuran oleh enzim ini dihasilkan dalam pembentukan asetaldehid dari etanol. MALD kemudian akan teroksidasi lebih lanjut dengan enzim *aldehid dehidrogenase* (ALDH) menjadi *methoxyacetic acid* (MAA) (Darmanto, 1999) dengan melepaskan hidrogen dan menambah oksigen (Lieber C. S. *et al.*, 2003 *dalam* Lunitasari, 2004). Berikut ini adalah bagan metabolisme senyawa 2-ME:



Gambar 2. Perubahan 2-ME menjadi MAA (Sumber Moslen *et al.*,1995).

2.1.2 Toksisitas dan teratogenitas 2-ME

Pemanfaatan 2-ME dalam berbagai bidang perindustrian ternyata berpengaruh buruk terhadap kesehatan. Kontaminasi 2-ME dapat memasuki tubuh melalui air yang kita minum, udara yang kita hirup, tanah maupun makanan yang terkontaminasi. Selain itu, kontak langsung dengan kulit dapat menyebabkan masuknya 2-ME ke dalam tubuh (Anonimus[3], 2004).

Pada penelitian Scott *et al.*, (1989) dengan pemberian dosis 2-ME 0,16; 0,32; dan 0,47 mmol/kg secara gavage pada monyet (*Macaca fascicularis*) bunting masa organogenesis (umur kebuntingan 20 hari sampai 45 hari) dapat menyebabkan toksisitas maternal, penurunan berat badan induk serta kematian embrio sebelum lahir dan 2-ME terakumulasi dalam serum induk dan plasma embrio dengan pemberian dosis berulang setiap hari.

Uji teratogenitas senyawa metabolit yaitu MAA 1,0; 1,5 dan 2,0 mmol/kg berat badan yang diberikan pada mencit bunting dengan umur kebuntingan 9, 11 dan 13 hari melalui injeksi intraperitoneal, menyebabkan pada UK 18 hari fetus mengalami mati sebelum lahir, berat badan berkurang. Keabnormalan *limb bud* pada fetus disebabkan pemberian MAA pada saat UK 9 dan 13 hari. Pemberian MAA pada UK 11 hari menyebabkan fetus mengalami keabnormalan *limb bud* dan *hydronephrosis*. Perkembangan *limb bud* yang abnormal pada fetus akan mengalami *syndactily* dan *polydactily* (Darmanto *et al.*, 1994).

Pada penelitian sebelumnya, Rasjad *et al* (1991) yaitu dengan pemberian MAA secara oral pada mencit dengan dosis 10 mmol/ kg berat badan pada umur kebuntingan 10,5; 11 atau 11,5 hari menyebabkan

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

malformasi pada bagian ekstremitas anterior. Dengan pengamatan dibawah mikroskop cahaya dan mikroskop elektron pada jaringan mesencym *Apical Ectoderm Ridge* (AER) mengalami kematian sel. Dengan mikroskop elektron dapat terlihat keabnormalan pada ekstremitas anterior yang menjadi semakin kecil dan mengalami *hypoplasia.*

Dalam penelitian Triana (2002) menyatakan bahwa pemberian 2-ME dosis 10 mmol/kg berat badan pada mencit dengan umur kebuntingan 7 dan 13 hari menyebabkan penipisan pada dinding ventrikel dan pelebaran ventrikel I dan ventrikel II. Diduga 2-ME mengganggu proses proliferasi, migrasi dan agregasi dari sel penyusun jaringan otak.

2.2 Tinjauan Tentang Mencit

2.2.1 Klasifikasi mencit (Jordan dan Verma, 1980)

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Sub phylum	: Vertebrata
Classis	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: *Mus*
Spesies	: *Mus musculus*

2.2.2 Sistem reproduksi jantan

Sistem reproduksi jantan pada mencit terdiri atas testis sebagai tempat untuk menghasilkan spermatozoa; kantong skrotum untuk melindungi testis;

epididimis untuk tempat pematangan spermatozoa; vas deferens; saluran ekskretori untuk transport sperma; kelenjar aksesoris; uretra dan penis sebagai alat kopulasi (Rugh, 1968).

2.2.3 Sistem reproduksi betina

Sistem reproduksi betina pada mencit terdiri dari sepasang ovarium sebagai tempat untuk menghasilkan sel telur; oviduk sebagai saluran menuju ke uterus serta tempat terjadinya fertilisasi; uterus duplex; serviks uteri; vagina; kelenjar clitoral dan klitoris yang merupakan homolog dengan penis (Rugh, 1968).

2.2.4 Perkembangan otak mencit

Setelah terjadi fertilisasi, zigot akan berkembang dari morula sampai tahap gastrulasi dimana pada tahap gastrulasi zigot terdiri atas tiga lapisan yaitu lapisan ektoderm, endoderm dan mesoderm. Dari lapisan ektoderm inilah akan terbentuk lempeng saraf atau *neural plate*.

Perkembangan sistem saraf pada mencit dimulai pada umur kebuntingan 7,5 hari yang ditandainya dengan terjadinya pembentukan *neural plate* yang berasal dari induksi lapisan ektoderm oleh notokord (Rugh, 1968). *Neural plate* merupakan tanda awal neuralasi kemudian tepi *neural plate* melipat membentuk *neural fold*. Ujung *neural fold* mengadakan pelekukan membentuk *neural groove* sampai membentuk tabung yang lurus yang disebut *neural tube* (Adamstone, 1964). Sel ektoderm lainnya dari *neural plate* dan ektoderm epidermis akan membentuk *neural crest* yang akan menyusun *ganglia nerve craniales* dan spinales (Yatim, 1994).

Secara umum sistem saraf dibagi menjadi sistem saraf serebospinal dan sistem saraf otonom. Sistem saraf serebrospinal terdiri atas saraf pusat dan sistem saraf tepi. Sistem saraf pusat terdiri atas otak dan medula spinalis. Sistem saraf otonom terdiri atas sistem saraf simpatik dan sistem saraf parasimpatik.

Sistem saraf pusat berkembang dari *neural tube* dimana pada mulanya *neural tube* merupakan tabung lurus. Kemudian tabung tersebut mengalami penutupan lempeng saraf pada umur kebuntingan 8 hari (Rugh, 1968). Penutupan ini dimulai dari bagian anterior sampai ke bagian posterior. Setelah bagian anterior terbentuk *neural tube*, terjadi pembengkokan *neural tube* ke arah bawah dengan sudut 90° pada bagian yang akan menjadi otak tengah. Setelah *neural tube* terbentuk secara sempurna dapat dibagi menjadi tiga segmen yaitu *prosencephalon, mesencephalon* dan *rhombencephalon* (Adamstone, 1964). Pada umur kebuntingan 9 hari *anterior* dan *posterior neuropore* menutup, terbentuk *olfactory lobes* pada *telencephalon*, dan pada *diencephalon* serta *rhombencephalon* terbentuk *optic vesicle* dan *rathke's pocket*.

Pada umur kebuntingan 10 hari terbentuk *lamina terminalis* pada *telencephalon* dan *isthmus* pada *mesencephalon.* Dengan adanya pembentukan *lamina terminalis,* menyebabkan dinding otak terdiri atas tiga lapis. Lapisan terdalam adalah *ventricular* atau lapisan *ependymal* yang terdiri atas sel yang masih mengalami proses mitotik. Lapisan kedua adalah lapisan marginal yang terdiri atas sel-sel yang memiliki badan sel; lapisan ini akan berkembang menjadi *white matter* pada susunan sistem saraf pusat. Sedangkan lapisan

ketiga adalah lapisan mantel yang terdiri dari *neuroblast* yang mengalami postmitotik dan meninggalkan lapisan *inner ventricular* dan lapisan *intermediate* yang penuh dengan sel-sel. Lapisan mantel ini akan berkembang menjadi *grey matter* pada susunan sistem saraf pusat (Carlson, 1988).

Pada umur kebuntingan 11 hari terbentuk *aquaductus of Sylvii* pada *mesencephalon, infundibulum* pada *telencephalon,* terbentuk *cervical flexure* dan terbentuk *epiphysys* pada *diencephalon*. Pada umur kebuntingan 12 hari terbentuk *posterior choroids flexus* pada *myelencephalon*. Pada umur kebuntingan 13 hari terbentuk saraf cranial III sedangkan pada umur kebuntingan 14 hari terbentuk *pons varolli* pada *mesencephalon* dan *anterior choroids flexus* pada *telencephalon* (Rugh, 1968).

Neural tube bagian posterior akan berkembang menjadi medulla spinalis. Pada dinding medulla spinalis terdapat dua macam sel yaitu sel epitelial dan sel germinal. Setelah berdifferensiasi, sel epitelial akan berkembang menjadi sel ependymal yang tidak berfungsi sebagai sel saraf. Sel germinal terletak diantara sel epitelial dan akan membentuk *neuroblast* dan sel neuroglial. Sel neuroglial dan sel ependymal membentuk jaringan ikat dari medulla spinalis sedangkan *neuroblast* berdifferensiasi menjadi neuron (Adamstone, 1964).

Pada dinding medulla spinalis juga terdiri atas tiga lapis, yaitu lapisan ependymal, lapisan mantel dan lapisan marginal. Lapisan mantel terdiri dari banyak neuron sebagai hasil pembelahan dari *neuroblast* sehingga ia membentuk substansi abu-abu atau *grey matter*, sedangkan pada lapisan marginal terdapat juluran sel ependymal, sel *neuroglial* dan akson dari

sel-sel saraf. Karena adanya myelin pada akson, lapisan marginal disebut juga sebagai substansi putih atau *white matter* (Adamstone, 1964). Sehingga pada umur kebuntingan 15 hari semua bagian otak telah berkembang, khususnya dalam hal ukuran, *cerebellum* melipat sepanjang *mesencephalon, myelencephalon* dan *spinal chord*, sedangkan pada bagian ventral terdapat *optic chiasma* dan *infundibulum* (Rugh,1968).

2.3 Tinjauan Tentang Kematian Sel

Sel saraf dalam masa perkembangan mengalami proliferasi, migrasi, penempatan posisi, pendewasaan dan sebagian mengalami kematian (Komuro *et al* 1998 dalam Darmanto, 2002). Kematian tersebut dapat dikarenakan adanya agen yang melukai (seperti kerusakan mekanik dan pemberian bahan toksik) serta karena terjadi proses 'bunuh diri' sel. Karakteristik sel yang mengalami perlukaan diantaranya mengalami pembengkakan sel (termasuk organela seperti mitokondria), isi sel keluar semua dan terjadi peradangan di sekitar jaringan (Kimball's, 2004).

Kematian sel yang terprogram dapat terjadi melalui program yang direncanakan atau tidak. Kematian sel yang terprogram atau apoptosis merupakan kematian secara fisiologis dimana sel mati oleh suatu program yang direncanakan pada masa embrionik sehingga dapat memperbarui sel-sel yang tua atau rusak (Ma'aruf, 2002). Akan tetapi dengan adanya bahan toksik dan radiasi dapat menyebabkan peningkatan apoptosis (Darmanto, 2002).

Peristiwa apoptosis diikuti adanya perubahan sel berupa rangkaian perubahan secara morfologi yaitu kondensasi kromatin, membran

bergelembung, fragmentasi sel menjadi potongan-potongan kecil atau badan apoptotik (Darmanto, 2002). Proses biologi ini dikontrol oleh sejumlah perangkat penunjang seperti molekul sinyal (*death factor*), *death receptor*, molekul adaptor, molekul transduktor, aktivator, eksekutor dan inhibitor (Ma'aruf, 2002).

Ciri khas sel yang mengalami apoptosis adalah mengkerut, degradasi kromatin, *phospholipid phosphatidylserine* yang normalnya ada dalam membran plasma keluar ke permukaan sel, terjadi fraksinasi pada nukleus dan sel terpecah menjadi sejumlah *apoptotic bodies* yang berisi pecahan nukleus (Ma'aruf, 2002).

Menurut Kimball's (2004), sel memutuskan untuk melakukan proses apoptosis karena untuk memusnahkan sel yang keberadaannya merupakan ancaman bagi integritas suatu organisme dan untuk perkembangan selanjutnya dimana pada akhir suatu individu ternyata mengalami eliminasi dari sel-sel tertentu, misalnya berudu yang tumbuh menjadi katak harus melepaskan ekornya, penglupasan endometrium diawal menstruasi serta pembentukan jari tangan dan kaki pada masa fetus. Selain itu, sel juga memutuskan untuk melakukan apoptosis untuk menjaga keseimbangan antara sinyal positif yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidupnya dan sinyal negatif yang menbahayakan tubuh (Ma'ruf, 2002; Kimball's, 2004). Contoh sinyal positif adalah interleukin-2 (IL-2), sebagai faktor penting untuk mitosis limfosit, dan *growth factor* untuk neuron sedangkan contoh sinyal negatif adalah kerusakan DNA akibat sinar UV, X-Rays, obat kemoterapi serta suatu molekul yang

berikatan dengan reseptor spesifik di permukaan sel sebagai sinyal untuk melakukan apoptosis (Kimball's, 2004).

Bentuk kematian sel yang lain adalah nekrosis. Tetapi nekrosis merupakan proses kematian sel yang tidak terprogram. Nekrosis akan terjadi jika sel mengalami kerusakan karena kekurangan oksigen atau faktor fisik yang ekstrim seperti perubahan temperatur, tekanan osmolaritas, pH ataupun kerusakan selular yang akut akibat dari induksi oleh proses kimiawi seperti dosis superletal radiasi ionisasi, inhibitor metabolik atau substansi toksik lainnya (Plaetzer *et al.*, 2003). Ciri sel yang mengalami nekrosis adalah mengalami pembengkakan sel (Ma'aruf, 2002). Secara umum nekrosis diikuti oleh hilangnya integritas membran dan homeostatis metabolis karena terjadi disintegrasi seluler dan tidak adanya kontrol. Kematian secara nekrosis termasuk proses yang tidak reversibel. Nekrosis atau kematian sel secara pasif dapat dihubungkan dengan perubahan karekteristik termasuk pembengkakan sel dan terjadi pemecahan pada membran (Plaetzer *et al.*, 2003).

2.4 Tinjauan Tentang Protein Reelin

Perkembangan otak pada mamalia, neuron berkembang sepanjang ventrikel, bermigrasi secara radial (Kubo *et al.*, 2002). Dengan adanya aktifitas mitotik sel *neuroepithelium* yang terjadi pada zona ventrikular, mampu memproduksi sel Glial dan sel neuron dimana kedua sel ini akan bermigrasi melalui zona intermediate ke zona *cortical plate* sehingga terjadi proses perkembangan struktur layer *cerebral* korteks (Hill, 2005; Williams, 2003). Penempatan posisi neuron sangat penting bagi perkembangan otak

karena berhubungan dengan pembagian daerah otak seperti korteks *cerebral*, *hipocampus* dan *cerebellum* (Rice dan Curran, 2001).

Perkembangan pertama merupakan pembentukan dari *primordial layer, primary plate*, yang terdiri dari sel Glial dan generasi neuron awal yang memicu posisioning neuron lainnya (Williams, 2003). Sel Glial merupakan sel yang terspesialisasi menjadi penuntun bagi sel neuron lainnya selama proses migrasi neuron menuju bagian perifer otak (Carlson, 1988). Keberadaan sel Glial selama proses migrasi sangatlah mencolok dan sel ini hanya ada selama perkembangan neuronal dan akan berubah menjadi astrosit di korteks *cerebral* dan fiber Bergmann di *cerebellum* (Hatten, 1999 dalam Rice dan Curran, 2001). Badan sel Glial terletak di dekat lumen ventrikuler, tetapi proses migrasi sel dituntun oleh fiber Glial melalui radial glial, yaitu juluran sel Glial yang mampu mencapai permukaan otak (Carlson, 1988). Sedangkan sel neuron awal adalah sel neuron Cajal Retzius yang terbukti mampu mensintesis protein Reelin (Anonimus, 1997).

Perkembangan *primary plate* membentuk zona marginal (superficial), dimana terdapat neuron Cajal-Retzius, dan pada bagian dalam yaitu subplate yang berisi bentukan saraf. Neuron bermigrasi dari subplate cortical plate melalui sepanjang fiber dari sel Glial (Anonimus, 1997).

Dalam pembentukan multilayer pada bagian korteks otak, neuron terbesar bermigrasi pertama kali di lapisan terdalam. Sedangkan lapisan *grey matter* dibentuk oleh neuron yang lebih kecil bermigrasi melewati lapisan neuron pertama kali terbentuk dan kemudian membentuk lapisan baru di perifer sehingga berapapun jumlah lapisan pada kortikal *grey matter*, lapisan

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

terdalam merupakan lapisan pertama kali terbentuk dan lapisan terluar adalah yang terakhir (Angevine dan Sidman, 1961 dalam Carlson, 1988)

Reelin disekresi oleh sel Cajal-Retzius yang akan diekskresikan ke ekstraselular space dari otak. Pada bagian tengah dari *grey matter* yaitu pemukaan pyramidal dan neuron *intermediate* akan mengekspresikan reseptor reelin. Reseptor ini hampir serupa dengan reseptor kolesterol atau very low density lipoprotein reseptor (VLDR) dan apolipoprotein E reseptor 2 (ApoER2) (Anonimus, 1997; D'Arcangelo *et al.*, 2000; Pearlman and Sheppard, 1996; Shih, 2004; Strasser *et al.*, 2003). Kemungkinan Reelin bereaksi langsung pada saat migrasi sel saraf melalui reseptor yang tidak terkarakterisasi / Reelin-binding protein (Alcantara *et al.*, 1998 ; Alvarez *et al.*, 1999).

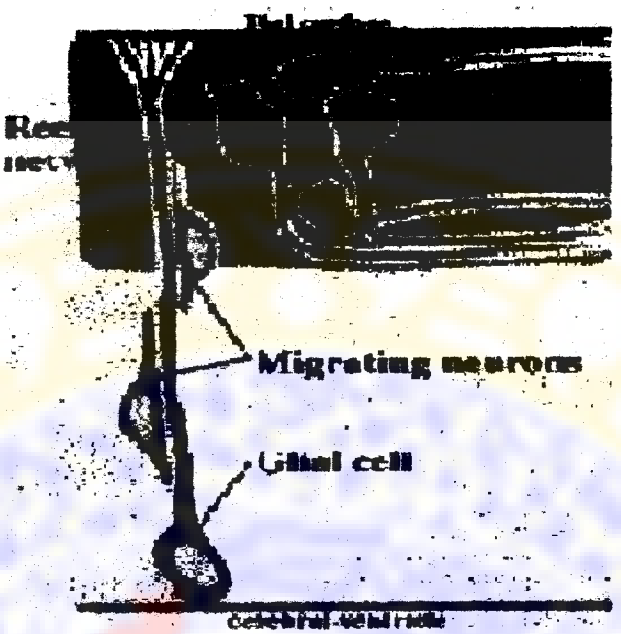
Reseptor Reelin (VLDR dan ApoER2) akan berikatan dengan intra seluler adaptor protein Disabled-1 (dab-1). Melalui daerah protein interaksi / phosphothyrosine-binding (PI/PTB) yang ada pada Dab-1 dan daerah dengan motif protein NpxY dari reseptor famili VLDR dan ApoER2 serta famili *amyloid precursor protein* (APP) (Alcantara, 1998; D'Arcangelo *et al.*, 1999; Rice and Curran, 2001) mengakibatkan transmisi sinyal Reelin akan berjalan. Hal ini menyebabkan Dab1 berubah menjadi *phosphorylated* yang diinduksi oleh *tyrosine phosphorylation* (Alvarez, 1999; D'Arcangelo *et al.*, 2000; Kubo *et al.*, 2002; Strasser *et al.*, 2003). Dengan adanya peningkatan *thyrosin phophorylation* mengakibatkan *downstream* sinyal transduksi *cascade* Reelin sehingga menyebabkan terjadinya posisioning sel pada saat perkembangan otak (D'Arcangelo *et al.*, 1999). Kejadian ini mengakibatkan adanya

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

perubahan secara morfologi dan formasi dari permukaan cortical sehingga pada perkembangan *neocortex* dewasa terdiri atas enam layer atau beberapa lapisan layer (Anonimus, 1997).

Protein Reelin merupakan suatu protein yang berfungsi untuk menentukan posisi dari migrasi sel-sel neuron dalam perkembangan struktur sistem saraf pusat dan berfungsi sebagai interaksi kelompok sel (Costagli *et al.*, 2002; Weeber, 2004). Dengan adanya protein ekstraseluler Reelin dan intraseluler adaptor protein Disabled-1 (dab-1) maka dapat membantu sel saraf untuk bermigrasi melalui sepanjang juluran fiber dari sel Glial (proses ini dapat terlihat secara visual pada gambar 3). Hal ini menyebabkan keberadaan protein Reelin sangat penting bagi perkembangan otak terutama dalam proses laminasi sebab jika tidak adanya protein Reelin atau berkurangnya jumlah Reelin maka Reelin akan bergerak di seputar *primary plate* dan pembentukan layering secara normal akan terganggu (Anonimus, 1997). Contoh lain dari perkembangan layering yang abnormal adalah pada tikus mutan yaitu *weaver*, tikus ini mempunyai karakter tingkah laku yang khusus dan berhubungan dengan keabnormalan fungsi *cerebellum*. Salah satu kerusakan dari jenis mutan ini adalah abnormalnya sel Glial dan sel neuron dalam proses migrasi; dimana kesesuaian kerjasama antara sel Glial dan sel neuron akan membentuk karakteristik lapisan pada korteks *cerebellar* (Rakic dan Sidmann, 1973 dalam Carlson, 1988). Menurut D'Arcangelo *et al.*, (1999), mencit yang kekurangan reseptor Reelin (VLDR dan ApoER2) dapat menyebabkan terjadinya *ataxia, cerebellum hypoplasia* dan abnormalnya laminasi pada *cortical plate*.

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga



Gambar 3. Model efek protein Reelin terhadap *cerebrum* mencit.
(Sumber : Anonimus, 1997)

Dalam Darmanto *et al.,* (2000) telah dibuktikan bahwa kadar Reelin akan menurun apabila terjadi kematian sel-sel otak fetus akibat radiasi dan menyebabkan kelainan pada otak. Tidak adanya Reelin juga telah membuktikan adanya gangguan laminasi jaringan otak dan kelainan pada otak bagian *cerebellum*.

2.5 Tinjauan Tentang *Western Blot*

Pada SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*), protein dipisahkan di dalam medium *polyacrilamide gel* secara elektroforesis. SDS adalah suatu deterjen yang akan mendenaturasi protein dan mengikat molekul-molekul protein yang terurai malalui bagian *hidrofob* (Freifelder, 1987). Pengikatan oleh SDS ini akan memberikan muatan negatif (anion). SDS ($CH_3(CH_2)$) akan masuk ke bagian *hidrofob* dari protein sehingga protein mengalami denaturasi. Dengan elektroforesis maka

protein sehingga protein mengalami denaturasi. Dengan elektroforesis maka protein dapat bergerak sesuai dengan berat molekulnya melalui *gel polyacrilamide*. Hal ini menyebabkan protein yang berat molekulnya kecil bergerak dengan mudah dan lebih cepat daripada protein yang berat molekulnya besar. Protein yang terpisah tersebut akan terlihat seperti pita (Aini, 2004; Freifelder, 1987). Setelah terbentuk pita, maka protein yang terpisah dapat diwarnai dengan Coomasie Brilliant Blue atau dengan pewarnaan silver. Coomasie Brilliant Blue akan berikatan dengan residu lysine dari protein sehingga pergerakan protein dapat terwarnai (Freifelder, 1987).

Setelah hasil dari elektroforesis SDS-PAGE terlihat, maka untuk melanjutkan ke tahap *Western Blot* gel perlu ditransfer melalui elektroforesis dengan menggunakan membran *nitrocellulose* dan subsequen deteksi imunokimia. Setelah dielektroforesis, protein ditransfer ke membran *nitrocellulose* kemudian band ditambah dengan menggunakan enzym-labelled antibodi (antibody primer), yaitu CR-50, dan anti-LTB antibodi (antibodi sekunder) (Spangler, 2002) sehingga didapatkan protein yang lebih spesifik, misalnya protein Reelin yang ada di *cerebrum* dapat dikenali oleh CR-50 dimana CR-50 merupakan antibodi.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Biologi Reproduksi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga, rumah hewan Biologi FMIPA sebagai tempat pemeliharaan. Sedangkan tahap pengekstraksian otak, tahap elektroforesis untuk menentukan profil protein dan tahap *Western Blot* di lakukan di *Tropical Deseases Center* (TDC) Surabaya. Sedangkan pengukuran band dengan melakukan densitometri di lakukan di Lab Dasar Bersama Universitas Airlangga, Surabaya. Waktu penelitian ini adalah tujuh bulan (Januari sampai dengan Juli 2005).

3.2 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) strain BALB/C umur 8-9 minggu yang belum pernah kawin, dengan berat badan 25-30 gram. Mencit diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) Surabaya. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 12 ekor mencit, dengan rincian 8 ekor mencit betina dan 4 ekor mencit jantan.

3.3 Bahan dan Alat Penelitian

3.3.1 Bahan penelitian

Bahan yang diperlukan lainnya adalah: pakan ternak BR1 CPP 511-B (pakan ternak ayam Broiller) PT. Charoen Pokphand Indonesia; air minum mencit berupa air ledeng yang diberikan secara *ad libitum*; larutan 2-ME dari PT. Wako Chemical Industries, Ltd. Japan; *dry ice*; es batu; garam dapur; bahan untuk pembuatan SDS-PAGE; bahan untuk pembuatan Western Bloting.

3.3.2 Alat penelitian

Alat yang diperlukan adalah kandang mencit dari bak plastik berukuran 40-50 cm dengan kawat penutup; sekam padi; tempat makan dan minum; neraca analitik; alat-alat bedah (alat *dissecsing*); alat suntik (*dispossible syringe*); pada saat penyimpanan otak (tabung Eppendorf 1,5 ml; box *dry ice*, lemari pendingin dengan suhu dibawah -80°C); pembuatan ekstrak otak (Alat Ultrasonikasi Homogenizer, probe, tabung reaksi 5 ml, sentrifuge dingin, gelas beker, kertas label, pengaduk); alat untuk elektroforesis (perangkat elektroforesis Mini Protean II Cell-system Biorad lengkap dengan power supply, mikropipet, makropipet, peralatan gelas, magnetic stirer, dessicator, bak plastik untuk pewarnaan, shaker) dan perangkat fotografi.

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Tahap persiapan hewan coba

Mencit dipelihara di rumah hewan jurusan Biologi yang telah dilengkapi dengan ventilator dan rak-rak untuk tempat pemeliharaan. Perlakuan terhadap hewan coba akan diberikan setelah mengalami aklimasi selama 2 minggu.

3.4.2 Tahap perkawinan

Setelah mencit mengalami aklimasi selama dua minggu, mencit dikawinkan. Perkawinan dilakukan dengan cara menggabungkan 2-3 ekor mencit betina ke bak yang berisi 1 ekor mencit jantan. Setelah itu dibiarkan semalam dan keesokan harinya dilihat adanya sumbat vagina (*vaginal plug*) yang berarti telah terjadi kopulasi. Mencit betina yang ada vaginal plugnya dianggap sebagai umur kebuntingan 0 hari.

3.4.3 Tahap perlakuan

3.4.3.1 Perlakuan terhadap kematian sel

Mencit bunting dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (P). Masing-masing kelompok berjumlah 2 ekor mencit. Pada semua kelompok, mencit betina yang bunting pada umur kebuntingan 3, 6 dan 9 hari ditimbang untuk mengetahui berat badannya, selanjutnya diberi perlakuan sebagai berikut:

K :2 ekor mencit diberi perlakuan melalui injeksi intraperitoneal aquades 0,1 ml/ 10 gram BB pada UK 10 hari dan dibedah pada UK 12 hari.

P :2 ekor mencit diberi perlakuan melalui injeksi intraperitoneal 2-ME 12,5 mmol / kg berat badan pada UK 10 hari dan dibedah pada UK 12 hari.

Setelah dibedah pada UK 12 hari dari masing-masing kelompok diambil 4 fetus mencit untuk diambil otaknya yang kemudian digunakan sebagai preparat histologis. Setiap otak fetus dibuat beberapa preparat histologi melalui potongan melintang (*cross section*) yang telah difiksasi dengan larutan PFA 4% (proses pembuatan preparat histologi lihat lampiran 2) dan kemudian dipilih preparat histologis yang terbaik. Setelah dipilih preparat yang terbaik, kematian sel otak fetus diamati pada bagian *cerebrum* cortex.

3.4.3.2 Perlakuan terhadap protein

3.4.3.2.1 Perlakuan terhadap profil total protein

Mencit yang bunting dibagi menjadi empat kelompok, yaitu kelompok kontrol (K), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2) dan kelompok perlakuan 3 (P3). Masing-masing kelompok berjumlah 1 ekor mencit.

Pada semua kelompok, mencit betina bunting pada umur kebuntingan 3, 6 dan 9 hari ditimbang untuk mengetahui berat badannya, selanjutnya diberi perlakuan sebagai berikut:

K :1 ekor mencit diberi perlakuan melalui injeksi intraperitoneal aquades 0,1 ml/ 10 gram berat badan pada UK 10 hari dan dibedah pada UK 13 hari.

P1 :1ekor mencit diberi perlakuan melalui injeksi intraperitoneal 2-ME 12,5 mmol / kg berat badan pada UK 10 hari dan dibedah pada UK 12 hari.

P2 :1 ekor mencit diberi perlakuan melalui injeksi intraperitoneal 2-ME 12,5 mmol / kg berat badan pada UK 10 hari dan dibedah pada UK 13 hari.

P3 :1 ekor mencit diberi perlakuan melalui injeksi intraperitoneal 2-ME 12,5 mmol / kg berat badan pada UK 10 hari dan dibedah pada UK 14 hari.

Setelah dibedah pada UK 12, 13 dan 14 hari dari masing-masing kelompok diambil 4 fetus mencit untuk diambil otaknya yang kemudian digunakan sebagai bahan untuk diukur kadar protein total dengan menggunakan metode elektroforesisis SDS-PAGE (proses metode lihat lampiran 4).

3.4.3.2.2 Perlakuan terhadap protein Reelin

Untuk mendapatkan kandungan protein Reelin, maka hasil dari tahapan SDS-PAGE di transfer melalui membran *nitrocelulose* dan ditambahkan dengan *antibodi monoclonal* yaitu CR-50. Proses metode ini menggunakan metode *Western Blot* (proses metode *Western Blot* lihat lampiran 5).

3.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (Nazir, 1988).

3.6 Varibel Penelitian

Penelitian ini terdiri dari tiga variabel, yaitu:

1. Variabel bebas, yaitu dosis 2-ME
2. Variabel terikat, yaitu kelainan histologis berupa kematian sel otak fetus mencit, kadar protein total dan kadar protein Reelin.
3. Variabel kendali, yaitu strain, umur mencit, berat badan, pakan mencit (jenis pakan dan volume pakan), cara perlakuan, waktu perlakuan dan lingkungan rumah hewan dan kandang hewan dijaga kebersihannya.

3.7 Cara Pengambilan Data

3.7.1 Data kematian sel

Data untuk kematian sel diambil melalui pengamatan preparat histologis yaitu dengan menghitung jumlah sel pada lapang pandang. Penagamatan pada setiap preparat diambil 4 lapang pandang secara acak dan setiap lapang pandang dihitung jumlah sel yang mengalami kematian dan sel yang tidak mengalami kematian. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan perbesaran 1000x.

3.7.2 Data profil protein

3.7.2.1 Data protein total

Data untuk protein total didapat dengan metode elektroforesis SDS-PAGE melalui pengukuran ketebalan pita band dengan cara densitometri.

3.7.2.2 Data protein Reelin

Data untuk protein Reelin didapat dengan metode Western Blot melalui pengukuran ketebalan pita band dengan cara densitometri.

3.8 Analisis Data

3.8.1 Data kematian sel

Data yang diperoleh berupa persentase sel otak yang mengalami kematian sel maupun sel tidak mengalami kematian sel yang kemudian dianalisis dengan menggunakan metode WILCOXON Sign Rank Test.

3.8.2 Data profil protein

3.8.2.1 Data protein total

Penentuan kadar protein total pada fetus otak mencit dianalisis terlebih dahulu dengan metode Lowry untuk mengetahui kandungan protein dan kemudian dianalisis secara deskriptif.

3.8.2.2 Data protein Reelin

Penentuan kadar protein Reelin pada fetus otak mencit dianalisis secara deskriptif.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

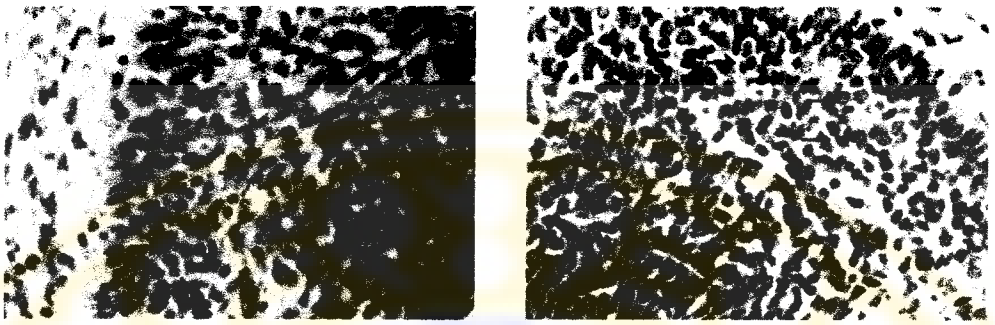
4.1.1 Hasil penelitian terhadap kematian sel

Induk dibedah pada UK 12 hari dan kemudian diambil otak fetusnya untuk pengamatan kematian sel. Otak fetus mencit disimpan dalam fiksatif dan dibuat preparat histologis serta diwarna dengan pewarnaan HE.

Pengamatan sel otak yang mengalami kematian dilakukan di bagian *cerebral cortex* dengan menggunakan mikroskop cahaya 400x untuk pengamatan histologis dan perbesaran 1000x untuk menghitung jumlah sel otak yang mati. Data hasil pengamatan sel yang mengalami kematian diuji statistik dengan menggunakan uji Wilcoxon Sign Rank test dengan taraf signifikansi $\alpha = 0,05$.

Pada hasil pengamatan preparat terhadap kematian sel dengan menggunakan mikroskop dapat terlihat sel yang mengalami kematian dan sel yang tidak mengalami kematian sel (dapat dilihat pada gambar 4). Berdasarkan gambar 4, terlihat bahwa sel yang mengalami kematian (baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan) memiliki ciri-ciri: mengalami pembengkakan sitoplasma, kondensasi kromatin sehingga warna nukleus lebih gelap daripada warna nukleus dari sel yang tidak mengalami kematian sel.

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga



Gambar 4. Kematian sel (anak panah) pada sayatan histologi otak fetus UK 12 hari (48 jam setelah pemberian 2-ME) dengan pewarnaan HE. (A) Kontrol; (B) Perlakuan 2-ME dosis 12,5 mmol / kg BB. Perbesaran 880 x.
Sel yang mengalami kematian sel, baik pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, tampak terjadi pembengkakan sel dan kondensasi kromatin sehingga warna nukleus lebih gelap daripada warna nukleus sel yang tidak mengalami kematian.

Setelah diketahui karakteristik sel yang mengalami kematian sel dengan yang tidak mengalami kematian sel, maka dapat dihitung prosentasenya (dapat dilihat pada tabel 1).

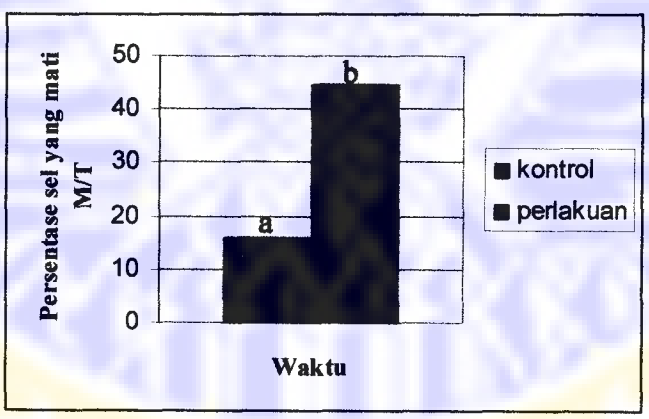
Dari tabel 1, dapat diketahui bahwa rata-rata persentase sel otak yang mengalami kematian pada kelompok perlakuan sebesar 44,58 % sedangkan pada kelompok kontrol sebesar 15,75%. Dengan uji statistik didapatkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Rata-rata persentase sel otak yang mengalami kematian pada pembedahan 48 jam setelah penyuntikan dapat dilihat dalam gambar 5.

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

Tabel 1. Rata-rata persentase sel otak yang mengalami kematian pada pembedahan 48 jam setelah pemberian 2-ME 12,5 mmol/kg BB pada umur kebuntingan 10 hari.

Preparat	Kontrol		Perlakuan	
	M/T	Persentase	M/T	Persentase
1	82/374	21.93	123/243	50.62
2	62/307	20.19	142/318	44.65
3	67/303	22.11	121/236	51.27
4	52/327	15.90	117/286	40.09
5	30/273	10.98	122/262	46.57
6	38/282	13.48	116/270	42.97
7	38/265	14.34	115/281	40.93
8	30/246	12.19	105/221	47.51
9	34/267	12.73	122/296	41.21
10	47/345	13.62	124/310	40.00
Rata-rata	48/2989	15.75[a]	1207/2723	44.58[b]
SD		4.15		4.25

Keterangan:
a dan b : notasi huruf yang menyatakan beda nyata
M : jumlah sel yang mati
SD: standard deviasi
T : jumlah sel total



Keterangan :
a dan b : notasi huruf yang menyatakan beda nyata
M : Jumlah sel yang mati
T : Jumlah sel total

Gambar 5. Histogram persentase sel otak yang mengalami kematian di *cerebral cortex* fetus mencit yang induknya diberi 2-ME dengan dosis 12,5 mmol/ kg BB pada UK 10 hari setelah selang waktu 48 jam penyuntikan.

4.1.2 Pengamatan profil protein

4.1.2.1 Profil total protein

Pada tahap pengestraksian sampel otak, sebelum sampel berada pada tahap elektroforesis, sampel otak diuji terlebih dahulu kadar protein dengan metode Lowry. Hasil dari uji Lowry dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji protein dengan metode Lowry

Kadar protein UK 13 (%)	Kadar protein (%)		
	UK 12	UK 13	UK 14
2,343	1,993	1,088	2,870

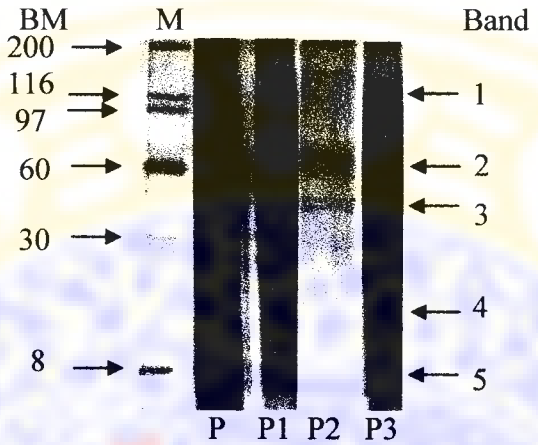
Dari hasil uji Lowry ini menandakan bahwa pada masing-masing sampel otak fetus mencit tersebut terdapat suatu protein sehingga dapat dilanjutkan pada tahap elektroforesis SDS-PAGE untuk mengetahui kandungan total protein dan protein Reelin dapat dipisahkan dari protein total dengan metode *Western Blot*.

Dari tahap elektroforesis dapat dipisahkan beberapa protein yang terkandung di dalamnya berdasarkan berat molekul yang dimiliki protein tersebut. Pemisahan protein berdasarkan pada berat molekul yang dilewatkan pada suatu pori-pori gel dan dengan bantuan adanya arus listrik. Hasil dari SDS-PAGE dapat dilihat pada gambar 6.

Berdasarkan gambar 6, terlihat ada beberapa band pita protein dan setelah dicocokkan dengan berat molekul markernya, didapatkan data bahwa pita tersebut memiliki kisaran berat molekul antara 8 sampai 200 kDa. Untuk mengetahui kadar protein yang terkandung di dalam pita tersebut, maka

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

dilakukan pengukuran secara densitometri. Data mengenai kandungan total pita band dapat dilihat pada tabel 3.



Gambar 6. Profil protein yang ditunjukkan dengan hasil elektroforesis protein total dengan SDS-PAGE 10-20% tris-trisine (M: Marker; P: kelompok kontrol UK 13 hari; P1: kelompok perlakuan UK12 hari; P2:kelompok perlakuan UK 13 hari; P3: kelompok perlakuan UK 14 hari).

Tabel 3. Kandungan total protein yang diukur berdasarkan densitas band dengan menggunakan densitometri.

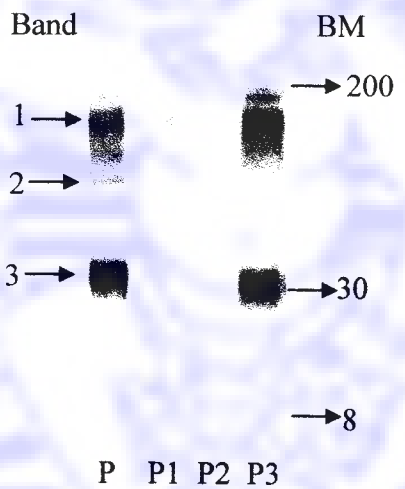
Band	Kadar protein (%)			
	Kontrol	Perlakuan		
	UK 13	UK 12	UK 13	UK 14
1	4.3	2.5	0.7	2.1
2	2.7	2.5	1.2	1.6
3	3.6	3.3	3.2	2.3
4	3.6	3.3	4.0	4.7
5	10.1	3.6	10.1	9.7
Total protein	24.3	15.2	19.2	20.4

Berdasarkan tabel diatas, menunjukkan bahwa adanya penurunan kandungan total protein pada beberapa pita band yaitu band ke-1, ke-2, ke-3 dan ke-5 sedangkan pada band ke-4 menunjukkan peningkatan kandungan total protein. Berdasarkan tabel diatas, juga dapat diketahui bahwa secara keseluruhan kandungan total protein menurun pada kelompok perlakuan jika dibandingkan dengan kontrol (pada kelompok kontrol kandungan total protein

sebesar 24,3%). Pada kelompok perlakuan terjadi penurunan kandungan total protein setelah 48 jam pemberian 2-ME (15,2 %) dan meningkat baik pada 72 jam dan 96 jam setelah pemberian 2-ME (19,2 % pada 72 jam dan 20,4 % pada 96 jam).

4.1.2.2 Profil protein Reelin

Pada metode Western Blot, hasil dari SDS-PAGE tersebut ditambahkan CR-50 (anti-Reelin) dan konjugat anti mouse yang berlabel enzim peroxidase sehingga didapatkan pita band yang menggambarkan ikatan antigen-antibodi yang menunjukkan adanya protein Reelin. Hasil dari *Western Blot* dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Pengamatan kadar protein Reelin dengan metode Western Blot yang menggunakan antibodi CR-50 (anti-Reelin) (P: kelompok kontrol UK 13 hari; P1: kelompok perlakuan UK12 hari; P2: kelompok perlakuan UK 13 hari; P3: kelompok perlakuan UK 14 hari).

Berdasarkan gambar diatas, tampak adanya tiga band yang dapat berikatan dengan CR-50 dan memiliki kisaran berat molekul 30 kDa sampai 200 kDa. Karena dihasilkan ada tiga band yang dapat berikatan dengan anti-Reelin (CR-50), hal ini diduga CR-50 tidak terlalu spesifik. Namun ketiga

band masih dapat digunakan untuk memprediksi kandungan protein Reelin. Salah satu dari ketiga band ini diduga merupakan protein Reelin. Kadar protein Reelin pada UK 13 hari (P2) dari kelompok perlakuan terlihat sangat tipis. Namun demikian, berdasarkan hasil metode Lowry dan elektroforesis SDS-PAGE menunjukkan adanya kandungan protein sehingga protein pada sampel UK 13 hari masih dapat digunakan. Untuk mengetahui kadar protein Reelin secara kuantitatif yang terkandung didalam pita tersebut, maka dilakukan pengukuran secara densitometri. Data mengenai kandungan protein Reelin dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Kandungan protein Reelin yang diukur berdasarkan densitas band dengan menggunakan hasil densitometri.

Band	Kadar protein (%)			
	Kontrol	Perlakuan		
	UK 13	UK 12	UK 13	UK 14
1	10.2	10.5	6.9	13.5
2	8.6	-	2.2	-
3	18.8	14.4	4.7	14.9
Total protein	37.6	24.9	13.8	28.4

Berdasarkan tabel diatas, menunjukan adanya tiga band yang dapat berikatan dengan CR-50 dan memiliki kandungan protein yang berbeda-beda. Pada band pertama, pada selang waktu 48 jam setelah pemberian 2-ME kandungan protein tetap jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (10,5 % pada kelompok perlakuan dan 10,2% pada kelompok kontrol) dan meningkat pada selang waktu 96 jam setelah pemberian 2-ME (13,5 %). Pada band kedua, 72 jam setelah pemberian 2-ME kandungan protein pada

kelompok kontrol adalah 8,6 % sedangkan pada kelompok perlakuan hanya tampak pada UK 13 hari (yaitu 2,2 %). Sedangkan pada band ketiga, pada selang waktu 48 jam dan 96 jam setelah pemberian 2-ME kandungan protein menurun jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (37,6% pada kelompok kontrol dan 12,4 % pada selang waktu 48 jam dan 14,2 % pada selang waktu 96 jam).

4.2 Pembahasan

4.2.1 Pengaruh 2-ME terhadap kematian sel

Bahan toksik atau radiasi yang mampu meningkatkan proses apoptosis, seperti pemberian *methylazoxymethanol* (MAM) acetat atau radiasi sinar X pada embrio tikus menyebabkan peningkatan apoptosis pada daerah *external granuler layer* (EGL) dari *cerebellum* (Ferrer I, 1996; Ferrer *et al.*, 1996 *dalam* Darmanto, 2002). EGL adalah bagian *cerebellum* yang sel-selnya aktif berproliferasi seperti halnya pada *cerebrum* bagian yang sensitif adalah sel neuron di *cerebral cortex*.

Pada penelitian ini, pengaruh pemberian 2-methoxyethanol (2-ME) menyebabkan kematian sel di daerah *cerebral* korteks, yaitu terlihat adanya pembengkakan sel dan kondensasi inti. Sel tersebut diduga adalah calon sel neuron yang sedang aktif berproliferasi. Kematian sel yang terlihat pada pembedahan 48 jam setelah penyuntikan diduga merupakan akibat dari efek toksik 2-ME yaitu MAA. Pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa sifat toksik 2-ME sebagai akibat dari hasil metabolitnya yaitu MAA (Sleet *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1984).

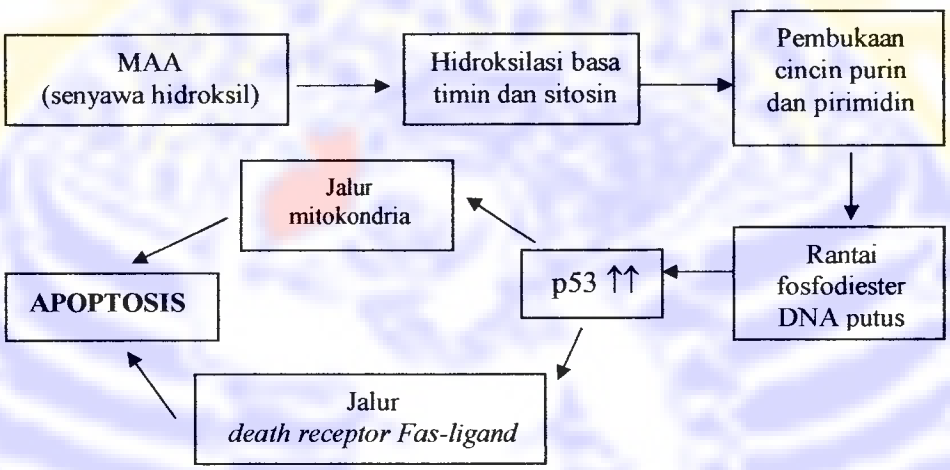
ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

Keberadaan MAA dalam jaringan embrio menyebabkan terhambatnya sintesis DNA dan RNA (Ku and Chapin, 1995 *dalam* Rumanta *et al.*, 2001). Bila keadaan ini terjadi pada sel tertentu dapat mengakibatkan apoptosis (Umansky, 1996 *dalam* Ruyani *et al.*, 2001). Menurut Rumanta *et al.*, 2001 perlakuan MAA pada tikus dapat menyebabkan fragmentasi DNA sebagai ciri khas apoptosis pada spermatosit pakhiten. Ciri khas lain sel yang mengalami apoptosis adalah terjadinya kondensasi inti (Ma'ruf, 2004; Darmanto, 2002; Kimball's, 2004). Pada penelitian ini, pengamatan preparat histologis menampakan adanya sel yang mengalami kondensasi inti sehingga diduga kematian sel yang terjadi pada penelitian ini adalah apoptosis. Namun sebagian juga menampakkan adanya pembengkakan sel yang merupakan ciri dari nekrosis.

Proses oksidasi 2-ME yang terjadi di mitokondria hepar menyebabkan 2-ME menjadi MAA dapat menghasilkan radikal bebas seperti $ClHC_3$-, HO^-, H_2O_2, OH, O_2 dan NO (Kim dan Smialowicz, 1997 dalam Lunitasari, 2004). Radikal bebas ini untuk memperoleh pasangan elektron dapat mengambil pasangan elektron dari DNA, membran sel, membran lisosom (bagian sel yang mengandung enzim hidrolitik), mitikondria, enzim-enzim, lemak, protein serta komponen jaringan lain (Anonimus 4, 2003 dalam Lunitasari, 2004). Radikal hidroksil (OH) adalah oksidan yang sangat reaktif dan tidak stabil (Dreosti, 1991 dalam Lunitasari, 2004) sehingga dapat menyerang membran sel dan DNA. Dampak dari hidroksil dapat menimbulkan perubahan DNA berupa hidroksilasi basa timin dan sitosin, pembukaan cincin purin dan pirimidin serta terputusnya rantai fosfodiester DNA (Lunitasari, 2004).

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

Dengan adanya penurunan ketersediaan purin dan pirimidin di dalam jaringan dapat mengganggu proses proliferasi dan differensiasi sel pada embrio yang aktif melakukan sintesis DNA maupun RNA (Mebus dan Welsch, 1989 *dalam* Ruyani *et al*, 2001). Dengan adanya gangguan sintesis DNA atau RNA dapat meningkatkan produksi p53 (Ma'ruf, 2002) dan mengakibatkan penurunan regulasi BCl-2 (Kuwabara *et al.*, 2003) dan dapatmengaktifkan jalur apoptosis lain yaitu jalur *death-receptor* via *gen death reseptor target* (DR-5 dan Fas) atau *death-domain-containing protein* (PIDD).

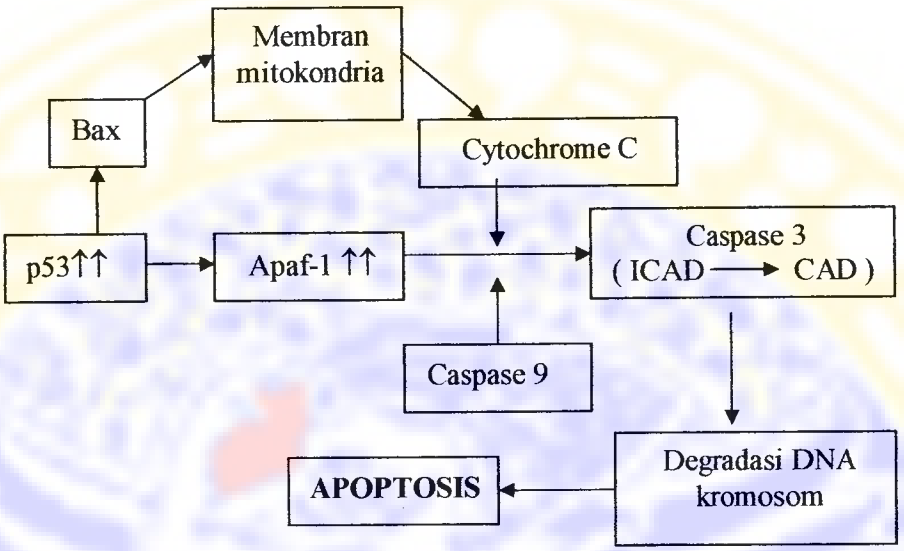


Gambar 8. Jalur radikal bebas yang dapat menyebabkan terjadinya apoptosis.

Disisi lain dengan meningkatnya produksi p53 mengakibatkan penurunan regulasi BCl-2 (Kuwabara *et al.*, 2003) sehingga akan mengeluarkan Apaf-1 ("*apoptotic protease activating factor-1*"). Karena adanya kerusakan yang dimediasi oleh p53 maka Bax yang dihasilkan oleh gen *pro-survival* yang diinduksi secara transkripsional oleh sitokin tertentu (Ma'ruf, 2002) akan menekan membran mitokondria sehingga sitokrom C akan keluar. Sitokrom C dan Apaf-1 akan berikatan dengan caspase 9 (Kimball's, 2004). Caspase 9 ini akan menginduksi caspase 3 (Kuwabara *et al.*, 2003). Caspase 3 yang aktif akan memecah berbagai protein seluler termasuk ICAD (*inhibitor of the caspase-activated deocyribonuclease*)

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

menjadi CAD. CAD yang terlepas akan mengakibatkan terjadinya degradasi DNA kromosom (Ma'ruf, 2002). Proses apoptosis ini disebut juga apoptosis yang melalui jalur intrinsik atau *mitokondrial pathway* (Kimball's, 2004).



Gambar 9. Jalur apoptosis melalui sinyal intrinsik atau *mitochondrial pathway*.

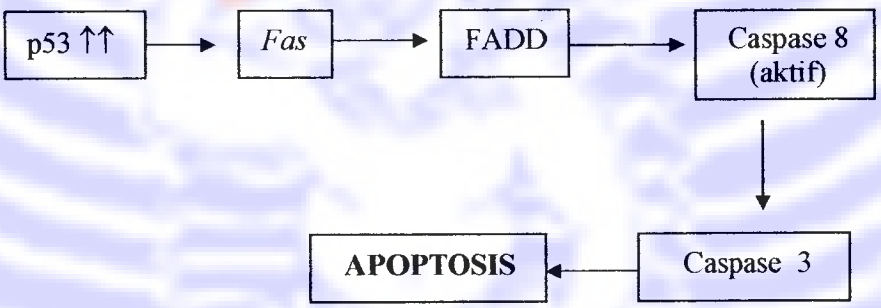
Pada jalur *death-receptor Fas-ligand*, yang merupakan perangsang apotosis, akan berikatan dengan reseptor *Fas* dan menyebabkan trimerisasi sehingga *Fas* bergabung dengan FADD / MORTI (*Fas-associating protein with death domain*), membentuk DISC (*death-inducing signaling compelx*) (Ma'ruf, 2002). Dengan adanya FADD maka dapat mengaktifkan caspase 8 (yang berfungsi sama seperti caspase 9) akan menginduksi caspase 3 sehingga terjadi apoptosis (Kuwabara *et al.*, 2003).

Menurut Krebs (1998) senyawa MAA juga dapat masuk ke dalam tubuh melalui mekanisme pompa ion kalsium. Dengan masuknya MAA ke dalam tubuh dapat meningkatkan permeabilitas membran sel yang mengakibatkan influks ion Ca^{2+} menjadi berlebih. Dengan melimpahnya ion Ca^{2+} di dalam sel akan menghambat fosforilasi oksidatif sehingga ATP yang

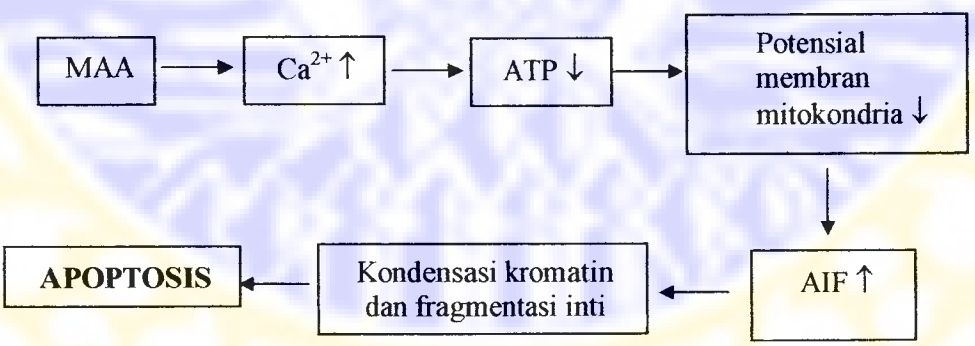
ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

dihasilkan berkurang karena digunakan untuk memompa ion Ca^{2+} yang berlebih.

Dengan hilangnya potensial membran mitokondria maka AIF akan dilepaskan oleh membran intermitokondria (Kluck *et al.*, 1997 *dalam* Darmanto, 2002; Kimball's, 2004). Keberadaan AIF merangsang kondensasi kromatin dan fragmentasi inti (Ma'ruf, 2002). Adanya fragmentasi inti dapat mengakibatkan putusnya rantai ganda DNA inti sebagai tanda terjadinya apoptosis / kematian sel (Duval and Wyllie, 1986 dalam Darmanto, 2002) sehingga menurut Kimball's, 2004, proses apoptosis ini disebut melalui jalur *Apoptosis Inducing Factor* (AIF).



Gambar 10. Jalur apoptosis melalui *death receptor Fas-Ligand* atau *death-domain-containing protein* (PIDD).



Gambar 11. Jalur apoptosis melalui *Apoptosis-inducing Factor* (AIF).

4.2.2 Pengaruh 2-ME terhadap profil total protein dan ekspresi protein Reelin

Dengan menggunakan metode Lowry, maka dapat diukur kandungan total protein dalam ekstrak otak fetus mencit. Pengaruh 2-ME terhadap kandungan total protein seperti terlihat pada tabel 3. Berdasarkan tabel 3 menunjukkan bahwa hampir pada semua pita band mengalami penurunan kandungan total protein (band ke-1, 2, 3, dan 5) kecuali pada band ke-4 yang mengalami peningkatan. Hal ini perlu adanya identifikasi lebih lanjut untuk mengetahui karakteristik masing-masing protein berkaitan dengan perbedaan pola dari beberapa band yang muncul.

Penurunan kandungan total protein (pada band ke-1, 2, 3 dan 5) terjadi setelah 48 jam pemberian 2-ME dan semakin menurun pada selang waktu 48 jam kemudian. Penurunan ini diduga sebagai akibat dari pengaruh MAA yang mempengaruhi tahap-tahap sintesis protein. Menurut Margrita, 1998 *dalam* Ruyani, (2001) MAA mempengaruhi beberapa tahapan sintesis protein, misalnya menurunkan tingkat replikasi DNA, atau menurunkan jumlah mRNA yang disintesis per satuan waktu, atau mempercepat terjadinya *turnover* mRNA, atau menghambat sintesis protein ribosom sehingga translasi berjalan lambat yang mengakibatkan translasi belum selesai berlangsung pada saat mRNA sudah mengalami *turnover*. Menurut Umansky, 1996 dalam Ruyani *et al.*, (2001) terganggunya sintesis protein dapat mengakibatkan kematian sel sehingga mengakibatkan penurunan kandungan protein.

Pada band ke-4, penurunan kandungan total protein terjadi pada 48 jam setelah pemberian 2-ME dan meningkat pada selang waktu 72 jam dan 96

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

jam setelah pemberian 2-ME. Penurunan kandungan total protein pada 48 jam setelah pemberian 2-ME diduga sebagai akibat dari MAA yang mengganggu proses sintesis protein sehingga terjadi kematian sel dan setelah 24 jam berikutnya diduga efek MAA mulai berkurang sehingga proses sintesis protein meningkat.

Pengaruh 2-ME terhadap kandungan total protein secara keseluruhan terjadi penurunan pada kelompok perlakuan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (24,3 %). Pada kelompok perlakuan, pada selang waktu 48 jam setelah pemberian 2-ME (UK 12 hari), yaitu sebesar 15,2 %, dan meningkat pada selang waktu 72 jam dan 96 jam setelah pemberian 2-ME (UK 13 hari , yaitu 19,2 %, dan UK 14 hari, yaitu 20,4 %). Hal ini diduga 2-ME mempengaruhi sintesis protein pada UK 12 hari sehingga kandungan protein yang dihasilkan menurun dan pada selang waktu antara UK 12 hari sampai UK 13 hari dan UK 14 hari diduga efek 2-ME berkurang sehingga protein yang disintesis meningkat.

Dampak 2-ME terhadap ekspresi protein Reelin diamati dengan menggunakan metode Western Blot, tampak adanya tiga band yang mampu berikatan dengan CR-50. CR-50 yang merupakan monoclonal antibodi (Anonimus[2], 2004) terhadap Reelin akan berikatan dengan protein Reelin secara spesifik (D'Arcangelo *et al.*, 1997 dalam Rice and Curran, 2001). CR-50 dapat mengenali Reelin karena CR-50 akan berikatan dengan epitopenya di bagian N-terminal dari Reelin sedangkan bagian C-terminal dari Reelin akan mengeluarkan sekresinya yang berupa glycoprotein (Curran and D"Arcangelo, 1998; Rice and Curran, 2001).

Ketiga band yang muncul pada hasil Western Blot dapat dibedakan berdasarkan dengan berat molekulnya sehingga dapat diduga bahwa salah satu band tersebut mengandung protein Reelin. Menurut D'Arcangelo *et al.*, (1999) terdapat tiga isoform Reelin yang dapat terdeteksi dengan metode Western Blot. Ketiga isoform tersebut memiliki berat molekul 400 kDa, 250 kDa dan 180 kDa. Pada penelitian ini, pita band ke-1 letaknya paling atas dan diduga memiliki BM 180 kDa sehingga pita band ke-1 inilah band yang diduga Reelin. Sedangkan untuk pita band ke-2 dan ke-3 diduga bukan Reelin sebab memiliki BM yang kurang dari 180 kDa.

Pada pita band ke-1, kandungan protein meningkat setelah 96 jam pemberian 2-ME (yaitu sebesar 13,5% pada UK 14 hari) meskipun pada selang waktu 48 jam setelah pemberian 2-ME tidak mengalami perubahan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (yaitu sebesar 10,2 % pada kelompok kontrol dan 10,5 % pada kelompok perlakuan). Hal ini diduga bahwa setelah 48 jam pemberian 2-ME sintesis protein tidak mengalami gangguan yang cukup berarti dan pada selang waktu 96 jam setelah pemberian 2-ME sintesis protein semakin meningkat diduga sebagai akibat proses pemulihan kerusakan yang berarti.

Penurunan pada kelompok perlakuan UK 13 hari jika dibandingkan dengan kelompok kontrol pada pita band ke-1 (kelompok kontrol 10,2 % dan kelompok perlakuan 6,9 %) diduga disebabkan MAA mempengaruhi sintesis protein sehingga mengakibatkan kematian sel dan mengakibatkan penurunan kandungan protein.

Pengaruh 2-ME dapat menyebabkan peningkatan kematian sel sehingga mempengaruhi kandungan protein yang terekspresi, khususnya protein Reelin. Dimana pada penelitian ini, 2-ME tidak menyebabkan penurunan kandungan protein Reelin karena kandungan protein Reelin tetap pada 48 jam setelah pemberian 2-ME dan kandungan protein meningkat setelah 96 jam setelah pemberian 2-ME. Dengan metode *Western Blot*, protein Reelin hanya dapat diketahui jumlah atau kadarnya saja sedangkan untuk mengetahui tempat protein tersebut disintesis atau lokalisasi protein diperlukan uji melalui kualitatif yaitu dengan imunohistokimia.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian 2-ME pada induk mencit bunting pada UK 10 hari dapat menyebabkan peningkatan kematian sel pada otak fetusnya yang dibedah pada UK 12 hari.
2. Pemberian 2-ME pada induk mencit bunting pada UK 10 hari dapat menurunkan kandungan total protein pada otak fetusnya yang dibedah pada UK 12, 13 dan 14 hari.
3. Pemberian 2-ME pada induk mencit bunting pada UK 10 hari tidak menyebabkan penurunan ekspresi protein Reelin pada otak fetusnya yang dibedah pada UK 12 dan UK 13 hari.

5.2 Saran

1. Dari hasil penelitian ini diperoleh 2-ME menyebabkan kematian sel otak fetus, sehingga para pekerja hamil yang beresiko tinggi kontak dengan senyawa kelompok *phtalat ester* perlu di cegah dengan cara menggunakan sarung tangan atau masker.
2. Perlu dilakukan penelitian yang lebih lanjut mengenai pengaruh 2-ME terhadap kematian sel pada otak fetus mencit (*Mus musculus*) dengan metode yang lebih spesifik, seperti menggunakan Apoptotic Kit Imunohistokimia.

3. Perlu dilakukan penelitian yang lebih lanjut mengenai pengaruh 2-ME terhadap kandungan total protein pada otak fetus dengan menggunakan imunohistomia untuk mengetahui lokalisasi protein.

DAFTAR PUSTAKA

Adamstone S.B. 1964. **Introduction to Vertebrae Embryology**. Fifth ed. John Wiley and Sons.Inc. New York.

Aini N. 2004. Teknik Sequencing DNA. **Pelatihan Pemanfataan Teknik dan Instrumentasi Biologi Molekuler**. Fakultas Kedokteran Hewan .Institut Pertanian Bogor.

Alcantara S., Ruiz M., D'Arcangelo G., Ezan F., de Lecca L., Curran T., Sotelo C. and Soriano E. 1998. Regional and Cellular Patterns of Reelin mRNAExpression in the Forebrainof The Developing and Adult Mouse. *The Journal of Neuroscience*

Alvarez D.M., Ruiz M., Del Rio J.A., Alcantara S., Burgaya F., Sheldon M., Nakajima K., Bernal J., Howell B.W., Curran T., Soriano E., and Munoz A. 1999. Thyroid Hormone Regulates *reelin* and *dab1* Expression During Brain development. *The Journal of Neuroscience* 19(16):6679-6993.

Anonimus. 1994. *Chemical In The Environment : 2-Methoxyethanol (CAS NO. 109-86-4).* OPPT Chemical Fact Sheet. Office of Pollution Prevention and Toxics. Environment Protection Agency. US.

Anonimus. 1997. **The Mouse Reeler Mutant: A Defect in Brain Lamination**. **http://zygote.swartmore.edu/ecto.5.html**.

Anonimus. 2003. **Current Use Patterns in Canada, Toxycology Profiles of Alternatives, and the Feasibility of Performing an Exposure Assessment Study**. Environment Canada's World Wide. **www.ec.gc.ca**

Anonimus[1]. 2004. **2-Methoxyethanol. http://www.epa.gov/opptintr/chemfct**.

Anonimus[2].2004. **Reelin antibody [G10] (ab18570) datasheet http://www.bcam.com/?pageconfig=datasheet&intAbID=18570**

Anonimus[3]. 2004. *2-Methoxyethanol.* Departement of Environment and Heritage. **http://www.npi.gov.au/database/substance-info/profiles/55.html**

Brown N.A., Hold D., and Webb M. 1984. The Teratogenicity of Methoxyacetic acid in The Rat.*Toxicology Letters* 22:93-100.

Carlson B.M. 1988. **Patten's Foundations of Embryology**. Fifth Edition. McGraw-Hill Book Company. New York.

Curran T and D'Arcangelo G. 1998. Role of Reelin in The Control of Brain Development. *Brain Research Reviews* Vol. 26 hal. 285-294

Costagli A., Kapsimali M., Wilson S. W., and Mione M. 2002. **Conserved and Divergent Patterns of Reelin Expression In The Zebrafish Central Nervous System.** J. Comp Neurol. August 12; Vol. 450(1) hal. 73-93. **http: // www.ncbi/nlm.nih.gov/entrez.**

D'Arcangelo G., Homayouni R., Keshova L., Rice D.S., Sheldon M., and Curran T. 1999. Reelin is a Ligand for Lipoprotein Reseptor. *Neuron*, vol. 24, hal. 471-479

D'Arcangelo G., Homayouni R., Keshova L., Rice D.S., Sheldon M., and Curran T. 2000. **Reelin Controls the Formation of Corticol Layers through a Signaling Pathway that Includes Members of the LDL Receptor Family**. **http://www.ncbi.org**

Darmanto W, Sudarwati S., dan Sutasurya L.A. 1994. Effects of Methoxyacetic acid on Prenatal Development of Mice. *Environmental Medicine.* 38:25-28.

Darmanto W, Inouye M., Hayasaka S., Takagishi Y., Aolad H.M., and MurataY. 1998. Dose Response relationship of disturbed migration of Purkinje cells in the cerebellum due to X-irradiation. *Environmental Medicine.* 42:46-50.

Darmanto W. 1999. **Gangguan Perkembangan Mencit Preimplantasi Akibat Induksi Senyawa Methoxyacetic Acid (MAA)**. Indonesian Student Association in Japan. Hal. 173-176

Darmanto W, Inouye M., Takagishi Y., Ogawa M., Mikoshiba K., and Murata Y. 1997. Sensetivity Difference Between Anterior and Posterior Lobes of Rat Cerebellum To Prenatal Exposure To 2,5 By X-irradiation: A Histological Study. *Environmental Medicine* 41:93-96.

Darmanto W, Inouye M., Takagishi Y., Ogawa M., Mikoshiba K., and Murata Y. 2000. Derangement of Purkinje Cells in the Rat Cerebellum Following Prenatal Exposure to X-irradiation : Decreased Reelin Level is a Posibble Cause. *Journal of Neuropathology and Experimental.* Neurology 59:251-262.

Darmanto W. 2002. Apoptosis pada sel granulosa cerebellum tikus akibat radiasi sinar X: deteksi apoptosis dengan metode *TACS* ™ *In Situ Apoptosis Detection Kit. Jurnal Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam* Vol.7 hal. 133-139.

Darmanto W. 2004. Tingkat Kelainan Sel Purkinje Heterotropik Hubungannya dengan Perbedaan Sensivitas antara Lobus Anterior dan Posterior dari Cerebellum Tikus terhadap Radiasi Sinar X. *Journal of Biological Researches* Vol. 9 hal. 93-98.

Freifelder D. 1987. **Molecular Biology**. Second ed. Jones and Bartlett Publishers.London, England. Page: 134-135.

Humason G.L. 1967. **Animal Tissue Technique**. W.H.Freeman and Company. San Fransisco.

Hill M. 2005. **Neural System Development Stage 22 Brain**. **http://embryology.med.unsw.edu.au/Notes/neuron5.htm**

Indriana K. 2004. Presentase kelainan pada mencit akibat induksi 2-ME pada masa organogenesis anggota. **Skripsi**. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Airlangga. Surabaya.

Insani M.D. 2004. Pengaruh 2-Methoxyethanol pada masa awal organogenesis terhadap perkembangan otak mencit Prenatal. **Skripsi**. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Airlangga. Surabaya.

Jordan E.L dan P.S. Verma. 1980. **Chordate Zoologi**. S. Chand and Company Ltd. Ram Nagar. New Delhi. Hal: 76-89.

Kimball's J. W. 2004. **APOPTOSIS**. **http://users.ren.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Apoptosis. html**

Krebs, J. 1998. The Role of Calcium in Apoptosis. *Biometals*, 1998, vol. 11 hal. 375-382.

Kubo K., Mikoshiba K., and Nakajima K. 2002. **Secreted Reelin Molecules form Homodimers**. **http://www.entrez**.

Kuwabara M., Takahashi K., and Inanami O. 2003. **Induction of Apoptosis Through The Activation if SAPK/JNK Followed by The Expression if Deatg Receptor Fas in X-iiradiated Cells.** *J. Radjat. RES.* Vol. 44 hal. 203-209 http://jrr.jstage. Jst.90.jp

Lunitasari Y. 2004. Kandungan Antioksidan Darah Pada Mencit (*Mus musculus*) Akibat Pemberian 2-metoksietanol Dan Usaha Pencegahan Dengan PSK (Polisakarida Krestin). **SKRIPSI**. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Airlangga. Surabaya.

Ma'aruf A. 2002. Fisiologi Kematian Sel. *Majalah Ilmu Faal Indonesia.* Vol.1 Hal. 12-28

Miller R.R., Langvardt P.W., Hermann E.A., McKenna M.J., and Schwetz B.A. 1983. Comparative metabolism and disposition of ethylene glycol monomethyl ether or propylene glycol monomethyl ether in male rats. *Teratology and applied Pharmachology* vol.67 hal. 229-237.

Moslen M.T., Kaphalia L., Balasubramanian H., Yin Yong-Mei, and Au M.W. 1995. Species differences in testicular and hepatic biotransformation of 2-methoxyethanol. *Toxicology* vol.96 hal.217-224.

Nazir M. 1998. **Metodologi Penelitian**. Ghalia Indonesia. Jakarta.

Nelson B.K., Conover D.L., Brightwell W.S., Shaw P.B., Warren D., Edwards R.M., and Lary J.M. 1991. Marked Increase in the Teratogenicity of the Combined Administration of the Industrial Solvent 2-methoxyethanol and Radiofrequency Radiation in Rats. *Teratology.* Vol. 43 hal. 621-634.

Pearlman A.L and Sheppard A. M. 1996. Extracellular Matrix in Early Cortical Dvelopmant . *Progress in Brain Research.* Vol. 108 hal. 119-130

Plaetzeer K., Kiesslich T., Verwanger T., and Krammer B. 2003. **The Modes of Cell Death Induced by PDT: an overview.** **http://www.urbanfischer.de/journals/lasermed.**

Rasjad C., Yamashita K., Datu A. R., and Yasuda M. 1991. Pathogenesis of limb Malformation in Mice Induced by methoxyacetic acid. *Hiroshima Journal Medicine Seri.* Vol. 40 hal. 101-107.

Rice D.S dan Curran T. 2001. Role of The Reelin Signaling Pathway in Central Neuron System Development. *Annual Reviewers Neuroscience* vol. 24 hal. 1005-039

Rugh, R. 1968. **The Mouse, its reproduction and development**. Burgess Publishing Comp. Minneapolis.

Rumanta M., Tien W. S. dan Sri S. 2001. Pengaruh Asam Metoksiasetat Terhadap Organ Reproduksi Mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster Jantan. *Prosiding ITB*. Vol 33. ITB, Bandung.

Ruyani A., Sudarwati S., dan Sutasurya L.A. 2001. **Perubahan Profil Protein Tunas Anggota Tubuh Depan Mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster Akibat perlakuan dengan Methoxyacetic acid.** ITB. Bandung. http://www.tempo.co.id/medika/arsip/062001/index-isi.asp?file=art-3

Scott W.J., Fradkin R., Wittfoht W., and Nau H. 1989. Teratogenic Potential of 2-methoxyethanol and tranplacental distribution of its metabolite, 2-methoxyacetic acid in non-human primates. *Teratology* vol. 39 hal. 363-373.

Shih M. 2004. **Reelin signaling Pathways.** http://www.biocharta.com/pathfiles/mreelinPathway.asp.

Sleet R.B., Welsch F., Myesr C.B., and Marr M.C. 1996. Developmental Phase specificity and Dose-respons Effects of 2-methoxyethanol in Rats. *Fundamental and Applied Toxicology*. Vol. 29 hal. 131-139.

Spangler, B.D. 2002. **Methods in Molecular Biology and protein Chemistry**. John Wiley and Sons Ltd.

Strasser V., Fasching D., Hauser C., Mayer H., Back H. H., Hiesberger T., Herz J., Weeber E. J., Sweatt J. D., Pramatarava A., Howell B., Schneider W. J. and Nimpf J. 2003. **Receptor Clustering Is Involved In The Reelin Signaling. http://mcb.asm.org/cgi/content/full/24/3/1378**

Terry K.K., Stedmann D.B., Bolon B., and Welsch F. 1996. Effects of 2-methoxyethanol on Mouse. *Neurulation Teratology*. Vol. 54 hal. 219-229.

Triana. 2002. Industri 2-methoxyethanol terhadap perkembangan otak besar (*cerebrum*) mencit (*Mus musculus*) prenatal. **Skripsi**. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Surabaya.

Weeber E. Ph.D. 2004. **Reelin Hypothesis of The Development of Schizophrenia. http://www.pubmed**

Williams, L. 2003. **Embryonic Brain Protein Has Dual Role. Loriw@bcm.tmi.edu.**

Yatim W. 1994. **Embriology**. Tarsito. Bandung.

Lampiran 1

CARA PEMBUATAN LARUTAN UJI

Pembuatan larutan 2-ME 12,5 mmol/kg berat badan :

Diketahui: Mr 2-ME = 76,1

Massa jenis = 0,96

Induksi dilakukan secara intraperitoneal sebesar 1,0 ml / 10 gram bb atau 10 ml/ kg bb.

Ini berarti bahwa 10 ml / kg bb harus mengandung 12,5 mol

10 ml / kg mengandung 12,5 mmol / kg bb atau 12,5 mmol / 10 ml = 1,25 molar.

1,25 molar = 1,25 mol 2-ME / 1 liter pelarut

1,25 mol 2-ME = X gram / 76,1

X gram 2-ME = 1,25 x 76,1 gr / lt = 95,125 gr

Jadi: 95,125 gr 2-ME = 95,125 / 0,96 = 99,09 ml dalam 1 liter pelarut.

Catatan : Pelarut akuabidestilata steril (Ikapharmindho Putramas, Indonesia).

2-ME dari PT. Wako Chemical Industries, Ltd. Japan

Lampiran 2

PEMBUATAN PREPARAT HISTOLOGI

Prosedur pembuatan preparat histologi menurut Humason (1967) adalah sebagai berikut:

1. Organ dicuci dengan air mengalir selama satu malam.
2. *Dehidrasi*
   - Dehidrasi organ dengan etanol 70 % (diganti 4 kali masing-masing selama 30 menit).
   - Dehidrasi organ dengan etanol 80 %(2 kali masing-masing selama 30 menit).
   - Dehidrasi organ dengan etanol 96 % (1 kali selama 30 menit).
   - Dehidrasi organ dengan etanol absolut (1 kali selama 30 menit).
3. Organ dicelupkan dalam xylol bekas selama 15 menit dan selanjutnya dimasukkan dalam xylol murni sepanjang malam.
4. Organ diangkat dari xylol dan dicelupkan dalam xylol parafin selama 30 menit.
5. Organ dimasukkan dalam parafin I, parafin II dan parafin III masinh-masing selama 1 jam.
6. *Embedding* (membenamkan organ ke dalam parafin).
7. *Sectioning* (memotong organ dengan mikrotom).
8. *Affixing* (penempelan coupes / irisan organ ke glass objek).
9. *Staining* dengan pewarna HE.
   - *Deparafinisasi*, sayatan jaringan yang telah kering secara berturut-turut dimasukkan dalam xylol selama 2 x 2 sampai 5 menit.
   - *Hidrasi,* sayatan jaringan dimasukkan dalam etanol absolut, etanol 90 %, 80 %, 70 % dan air masing-masing selama 5 menit.
   - Sayatan dimasukkan dalam Hematoksilin selama 5 – 10 menit.
   - Sayatan dicuci dengan air mengalir selama 5 menit, lalu direndam dalam akuades selama 5 menit.
   - Sayatan dimasukkan dalam etanol 70 % yang mengandung 0,1 % HCl selama 30 detik.

- Sayatan dimasukkan dalam Eosin selama 5 menit kemudian dicuci dengan air.
- *Dehidrasi,* sayatan jaringan dimasukkan dalam etanol bertingkat (etanol 70 % hingga etanol absolut) masing-masing selama 5 menit.
- Memindahkan sayatan jaringan ke dalam campuran xilol – etanol absolut dengan perbandingan 1 : 1 selama 5 menit dan ke dalam xilol murni salama 2 x 10 menit.

10. Mengamati sayatan organ (preparat) di bawah mikroskop.
11. *Mounting* (menutup *obyek glass* dengan *cover glass* dengan menggunakan entelan)

Lampiran 3

CARA PEMBUATAN LARUTAN FIKSATIF PARAFORMALDEHYDE (PFA) 4 %

Pembuatan larutan fiksatif PFA 4 % (stok) volume 100 cc :

1. 20 gram PFA serbuk dan ± 70 cc akuabidestilata steril dicampur.
2. Campuran dipanaskan dan dihomogenkan dengan menggunakan stirer (± 70 °C) atau tidak sampai mendidih.
3. NaOH 2N ± 2 tetes ditambahkan dalam campuran (1 tetes terlebih dahulu, jika masih keruh dapat ditambahkan lagi 1 tetes lagi hingga jernih).
4. Akuabidestilata steril ditambahkan dalam campuran hingga volume 100 cc.
5. Larutan disimpan dalam refrigerator.

Pembuatan pelarut PBS 10x (Metode Dulbecco's) :

NaCl	=	8,0 gram
KCl	=	0,2 gram
$Na_2HPO_4.12H2O$	=	2,9 gram
KH_2PO_4	=	0,2 gram

Akuabidestilata steril ditambahkan sampai volume mencapai 100 cc dan pH mencapai 7,4 jika kurang asam atau basa dapat ditambahkan dengan HCl atau NaOH/KOH.

Pembuatan larutan fiksatif PFA 4 % dalam pelarut PBS 10x volume 100 cc :

PFA 20 % (stok)	=	20 cc
PBS 10x	=	10 cc
Akuabidestilata steril	=	70 cc +
		100 cc

Catatan : PFA dalam bentuk serbuk (Merck, Jerman)

Pelarut akuabidestilata steril (Ikapharmindo Putramas, Indonesia)

Lampiran 4

PENENTUAN PROFIL TOTAL PROTEIN DENGAN SDS-PAGE

Setelah induk mencit diberi perlakuan 2-ME pada UK 10 hari dan dibedah pada UK 12, 13 dan 14 hari maka pada fetusnya akan diambil otaknya. Fetus kemudian diletakkan di *dry ice* sehingga fetus memadat lalu dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf yang telah didinginkan terlebih dahulu dan dilabelisasi. Setelah itu diletakkan di box yang berisi *dry ice*. Akan tetapi pada fetus mencit yang diambil pada umur kehamilan 14 hari, setelah diletakkan di *dry ice* bagian otaknya dipotong. Setelah semua otak fetus mencit didapat maka cara penyimpanannya dapat dilakukan dengan menyimpan di lemari pendingin yang bersuhu -80°C sehingga tahan sampai beberapa waktu lamanya. Kemudian sebelum di Western Blot, dilakukan beberapa cara yaitu:

1. Tahap pengekstraksian otak

Otak yang disimpan dalam tabung Eppendorf dipindahkan ke dalam tabung reaksi 5 ml dan diberi 2 ml PBS 1 kali lalu diaduk menggunakan ujung pengaduk yang tumpul. Setelah bagian otak itu hancur, dimasukkan ke dalam Sonikasi Homogenizer dimana ujung probe dimasukkan sampai 2 ml dasar tabung dan gelas beaker yang berisi es batu dan garam, dipasang dibawah tabung reaksi sehingga tabung masuk ke dalam gelas beaker. Sonikasi ini berjalan selama 4 menit dan satu menit dihentikan, hal ini terus berlangsung sampai lima sampai enam kali. Pada saat disonikasi, kecepatan getaran dijaga sekitar 30 kHz. Setelah disonikasi, otak dipindahkan ke tabung Eppendorf lalu

disentrifuge dingin dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya. Setelah itu, disentrifuge dingin kembali dengan kecepatan 16.000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya. Supernatan tersebut akan ditambah dengan akuadest 0,5 ml atau PBS 1 kali untuk dicuci setelah itu diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry.

Beberapa tahapan dalam metode Lowry adalah:

a. Tambahkan BSA (10, 20, 30 dan 40 μL) ke dalam tabung mikrosentrifuge. Lalu tambahkan air ke dalam masing-masing tabung sampai 200 μL. Siapkan 2 tabung kosong yang hanya terdiri atas 200 μL.
b. Tambahkan 20 μL 0,15 % Sodium deoxycholate ke masing-masing tabung lalu vortex. Diamkan selama 10 menit pada suhu kamar.
c. Tambahkan 20 μL 72 % Trichloroacetic acid (TCA) ke masing-masing tabung lalu vortex. Lalu di mikrosentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm dan buang supernatannya.
d. *Dissolve* protein pellet di 200 μL air. Tambahkan 200 μL air ke tabung kosong.
e. Tambahkan 200 μL larutan Copper tartrate / carbonate (CTC) (lampiran 6) dan vortex. Diamkan selama 10 menit pada suhu kamar.
f. Tambahkan 100 μL 20 % Falin-Ciocatleu reagent dan segera vortex. Diamkan selama 30 menit pada suhu kamar.
g. Mengukur perbandingan absorbansi standart (panjang gelombang (A) = 595) di dalam mikrocuvet dengan absorbansi protein yang diukur dengan panjang gelombang (A) 750.

2. Tahap SDS-PAGE

Setelah kadar protein dalam otak diketahui dengan metode Lowry maka dilakukan tahap SDS-Page untuk memisahkan protein dari komponen sel lainnya. Beberapa tahapan dalam SDS-PAGE antara lain:

a. Mencetak Separating gel 10%

Pembuatan separating gel dengan cara mencampurkan bahan-bahan untuk separating gel yaitu akrilamid 2,08 ml; Tris HCl pH 8,8 sebanyak 1,2 ml; SDS 5% sebanyak 1,2 ml; akuadest 1,1 ml; TEMED 5,0 μL, APS 30 μL. Setiap memasukan reagen harus diaduk sehingga homogen lalu dimasukkan ke dalam gelas plate yang telah bersekat dan melakukan fiksasi. Setelah difiksasi, ditambahkan butanol 5% diatas bagian separating gel untuk meratakan bagian atas separating gel. Kemudian diinkubasi pada suhu kamar 25 °C. Lalu butanol 5% dibuang dan mencuci separating gel dengan menggunakan elektroforesis buffer yang telah diencerkan 10x. Dengan kertas filter, separating gel dibersihkan dan dikeringkan.

b. Mencetak Stacking gel 10%

Pembuatan stacking gel dengan mencampurkan bahan-bahan stacking gel sampai homogen yaitu akrilamid 0,825 ml; Tris HCl pH 6,8 sebanyak 0,8 ml; SDS 5% sebanyak 0,8 ml; aquades 0,8 ml; TEMED 0,4 μL; APS 10% sebanyak 20 μL. Bahan stacking gel dimasukkan ke dalam stacking gel dan diinkubasi pada suhu kamar 25°C sampai stacking gel memadat. Comb dilepaskan dan dibersihkan. Stacking gel dicuci 1x dengan elektroforesis buffer.

c. Menyiapkan Sampel

Suspensi sampel (ekstraksi otak) sebanyak 20 μL dimasukan ke dalam tabung Eppendorf yang tutupnya sudah berlubang dan dicampur dengan Laemli Buffer (indikator warna) sebanyak 10 μL. tabung Eppendorf yang telah berisi campuran dipanaskan dalam suhu 100°C selama lima menit.

d. Elektroforesis

Gelas plate yanng berisi gel dimasukkan ke dalam Bio-Rad dan dituangi dengan elektroforesis buffer sebanyak 800 ml. Marker dan sampel dimasukkan ke dalam lubang sel. Dengan menggunakan listrik 125 V, 40 mA sampai marker dan sampel turun. Setelah turun, listrik dimatikan gel dilepas secara perlahan-lahan dan dimasukkan ke dalam petridish yang sudah berisi larutan pencucian.

e. Pencucian

Pencucian yang dilakukan ada empat tahap dengan larutan yang berbeda. Pencucian pertama menggunakan campuran dari methanol 2,5 ml; acetic acid 3,75 ml dan aquades 71,25 ml. Petridish yang berisi gel dan larutan pencuci digoyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit. Larutan pencuci dibuang dan diganti dengan larutan pencuci kedua yaitu campuran dari methanol 2,5 ml; acetic acid 3,75 ml dan akuades 93,75 ml. Setelah itu digoyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit. Pencucian ketuga dengan menggunakan larutan Glutaraldehid 10% yaitu 10 ml Glutaraldehid dengan 90 ml akuades. Kemudian digoyang dengan

kecepatan 42 selama 30 menit. Pencucian terakhir dengan akuades 100 ml selama 30 menit dan pencucian ini dilakukan 3x.

f. Pewarnaan

$AgNO_3$ ditimbang sebanyak 0,8 gram dan dicampur dengan 4 ml destilated water. Kemudian campuran tersebut dimasukkan ke dalam larutan yang terdidi dari NaOH 0,36 % sebanyak 21 ml; NH_3 sebanyak 1,4 ml dan akuades sebanyak 73,5 ml. Larutan dimasukkan ke dalam petridish dan digoyang dengan kecepatan 42 selama 15 menit. Kemudian dibuang dan dicuci dengan 100 ml akuades selama 2 menit sebanyak dua kali diatas shaker.

g. Stop Reaksi

Pengembang warna yang terdiri dari formaldehid 3,7 % sebanyak 50 μL; Zitronensaure 5% sebanyak 100 μL dan 100 ml akuades dimasukkan ke dalam petridish yang berisi gel, selama loma menit digoyang diatas shaker dengan kecepatan 42. stop reaksi dimasukkan bersama dengan acetic acid 10%, setelah itu dicuci dengan 100 ml akuades selama dua menit sebanyak dua kali; kemudian dibuang dan diganti oleh larutan yang terdiri dari Gliserol 10 ml dan akuades 90 ml agar tidak rusak.

h. Membaca hasil SDS-PAGE

Hasil dari SDS-PAGE dapat dibaca dengan menghitung nilai Rf (Retardation factor). Sehingga dapat diketahui berat molekul suatu protein. Pengukuran Rf dapat dilakukan dengan cara:

$$Rf = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Lampiran 5

PENENTUAN KADAR PROTEIN REELIN DENGAN METODE WESTERN BLOT

Beberapa tahapan dalam Western Blot adalah:

a. Hasil dari SDS-PAGE dimasukkan pada anode elektroblotting transfer apparatus secara berturut-turut. Lima kertas absorban (Whitman no.1) yang sudah dicelupkan di transfer buffer; 1 lembar membran nitroselulose; gel SDS-PAGE; 5 kertas absorban yang sudah dicelupkan transfer buffer.
b. Menyalakan alat 5 V; 45 mA; 60 menit/100 V, 200 mA selama 2 jam.
c. Mengambil membran nitroselulose yang dibloking dengan bloking serum (5 gram susu tanpa lemak; 1 cc 10% Tween; 10 cc PBS 10X; MQ sampai 100 cc) selama 20 menit dan dicuci 2x dengan PBS Tween masing-masing selama 5 menit.
d. Menambahkan antibodi poliklonal CR 50 (1:1000) selama 3 jam.
e. Mencuci blot sebanyak 4x dengan PBS Tween, masing-masing selama 5 menit.
f. Menambahkan konjugat anti mouse yang berlabel enzim peroxidase (1:250) selama 1 jam dalam PBS 1x / BSA 1%.
g. Mencuci blot dengan PBS Tween sebanyak 3x, masing-masing selama 3 menit.
h. Melakukan pewarnaan fast red dengan cara mencampurkan Guffer substrat (200 mM Tris HCl pH 8,0; 2 mM $MgCl_2$ dan 12 mg/ml fast red) dan Car. Substrat (0,8mg/ml p_NPP dalam 500 ml akuades). Perbandingan antara Guffer substrat dengan Car. Substrat adalah 1:1.

i. Mencuci blot dengan PBS selama 5 menit serta ditambah diaminobenzidine (DAB) sebagai pewarna lalu mengeringkannya.

j. Dengan menggunakan marker standard BM 200 kDa.

Lampiran 6

PEMBUATAN

LARUTAN COPPER TARTRATE / CARBONATE (CTC)

UNTUK METODE LOWRY

✓ Pembuatan Larutan Copper Tartrate / Carbonate (CTC)

Larutan stok Copper Tartrate / Carbonate terdiri atas 50 ml larutan 0,2 % (w/v) CuSO4.5H20 dan 0,2 % (w/v) potasium tartrate, campurkan kedua bahan tersebut perlahan-lahan lalu di shiring. Pada saat di shiring tambahkan larutan 20% sodium karbonate. Kemudian simpan pada suhu kamar dan bertahan selama 8 minggu.

Larutan CTC yang akan digunakan dicampur terlebih dahulu dengan 0,8 M NaOH, 10% (w/v) SDS dan akuabides. Simpan dalam suhu kamar dan dapat berhaan sampai 1-2 minggu.

Lampiran 7

Data Penghitungan Kematian Sel Saraf pada Otak

1. Hasil pengamatan jumlah sel pada kelompok kontrol

Lapang Pandang	Σ sel mati	Σ sel hidup	Σ sel total	Prosentase
1	82	252	374	21.93
2	62	245	307	20.19
3	67	236	303	22.11
4	52	275	327	15.90
5	30	243	273	10.98
6	38	244	282	13.48
7	38	227	265	14.34
8	30	216	246	12.19
9	34	233	267	12.73
10	47	298	345	13.62

2. Hasil pengamatan jumlah sel pada kelompok perlakuan

Lapang Pandang	Σ sel mati	Σ sel hidup	Σ sel total	Prosentase
1	123	120	243	50.62
2	142	176	218	44.65
3	121	115	236	51.27
4	117	169	286	40.09
5	122	140	262	46.57
6	116	154	270	42.97
7	115	166	281	40.93
8	105	116	221	47.51
9	122	174	296	41.21
10	124	186	310	40.00

Keterangan: pengamatan preparat histologis dilihat dengan pebesaran 1000x.

Lampiran 8

Hasil uji Wlicoxon sign rank test rata-rata persentase sel otak yang mengalami kematian pada pembedahan 48 jam setelah pemberian 2-ME 12,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan 10 hari secara injeksi intraperitoneal.

NPar Tests

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
P - K	Negative Ranks	0[a]	.00	.00
	Positive Ranks	10[b]	5.50	55.00
	Ties	0[c]		
	Total	10		

a. P < K

b. P > K

c. K = P

Test Statistics[b]

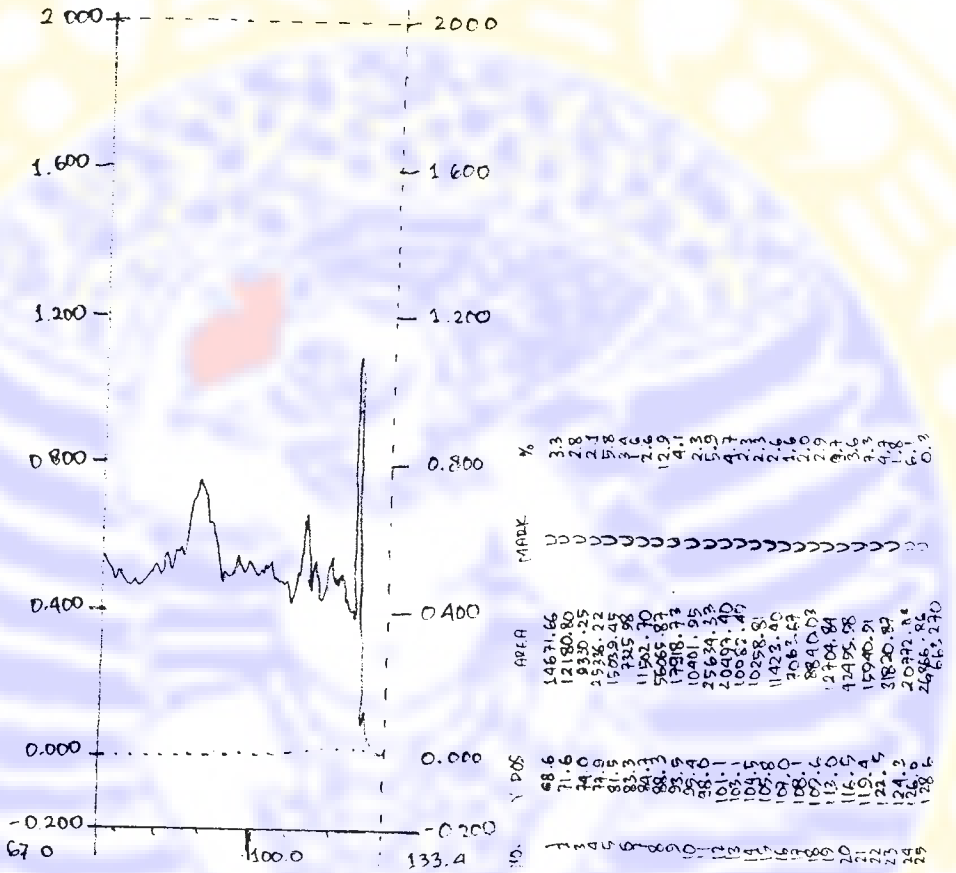
	P - K
Z	-2.803[a]
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Lampiran 9

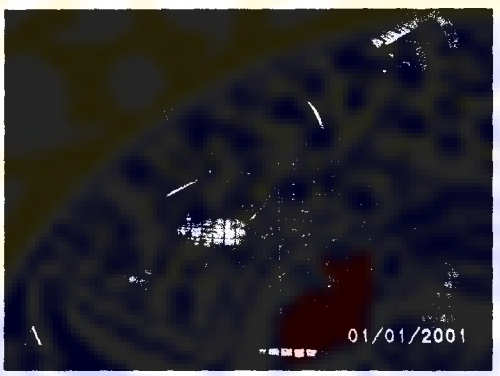
HASIL DENSITOMETRI

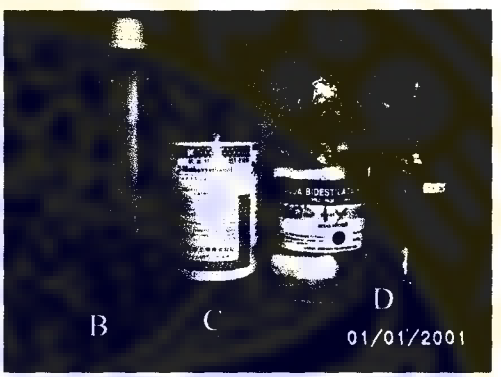


Lampiran 10

DOKUMENTASI SELAMA PENELITIAN

1. Foto Bahan Penelitian





Keterangan :

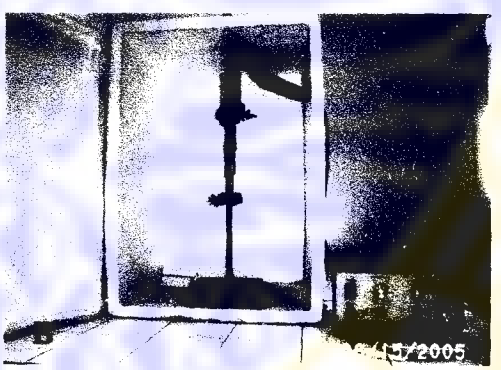
A : Hewan coba mencit (*Mus musculus*)

B : Alkohol 70 %

C : Larutan *2-methoxyethanol* (2-ME)

D : Larutan PBS

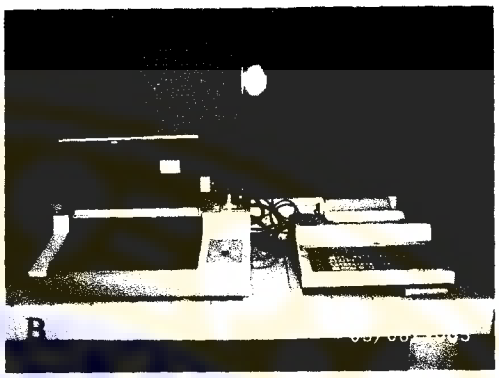
2. Foto Peralatan Penelitian



Keterangan :

A : Alat bedah

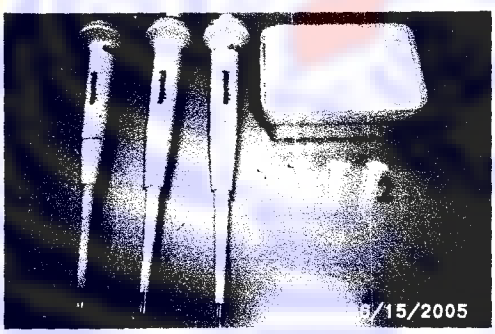
B : Alat sonikasi homogenizer



Keterangan :

A : Alat sentrifuge

B : Alat densitometri



Keterangan:

1. Mikropipet
2. Tabung Eppendorf
3. Alat spektrofotometer

Keterangan:

A. Seperangkat Jar untuk *embedding*

B. Mikrotom

Alat elektroforesis

Alat sentrifuge dingin