

TESIS

**POTENSI ANTIOKSIDAN BUAH MERAH (*Pandanus  
conoideus Lam.*) TERHADAP EKSPRESI CASPASE-9  
DAN JUMLAH SEL TROPOBLAS PLASENTA  
MENCIT (*Mus musculus*) BUNTING SEBELUM  
TERPAPAR PLUMBUM**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**



Oleh

**PORTIA SUMARSONO**  
**NIM 061414153006**

**PROGRAM STUDI MAGISTER  
ILMU BIOLOGI REPRODUKSI  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2016**

TESIS

**POTENSI ANTIOKSIDAN BUAH MERAH (*Pandanus  
conoideus Lam.*) TERHADAP EKSPRESI CASPASE-9  
DAN JUMLAH SEL TROPOBLAS PLASENTA  
MENCIT (*Mus musculus*) BUNTING SEBELUM  
TERPAPAR PLUMBUM**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**



Oleh

**PORTIA SUMARSONO**  
**NIM 061414153006**

**PROGRAM STUDI MAGISTER  
ILMU BIOLOGI REPRODUKSI  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2016**

**POTENSI ANTIOKSIDAN BUAH MERAH (*Pandanus  
conoideus Lam.*) TERHADAP EKSPRESI CASPASE-9  
DAN JUMLAH SEL TROPOBLAS PLASENTA  
MENCIT (*Mus musculus*) BUNTING SEBELUM  
TERPAPAR PLUMBUM**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**

**TESIS**

**untuk memperoleh gelar Magister  
dalam Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi  
pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga  
Surabaya**

**PORTIA SUMARSONO  
NIM 061414153006**

**PROGRAM STUDI MAGISTER  
ILMU BIOLOGI REPRODUKSI  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2016**

**PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul:

**Potensi Antioksidan Buah Merah (*Pandanus conoideus Lam.*) Terhadap Ekspresi Caspase-9 dan Jumlah Sel Tropoblas Plasenta Mencit (*Mus musculus*) Bunting Sebelum Terpapar Plumbum**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 18 Februari 2016



**Portia Sumarsono**

NIM 061414153006

**Lembar Pengesahan**

TESIS INI TELAH DISETUJUI

Tanggal 16 Februari 2016

Oleh

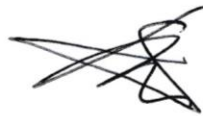
Pembimbing Ketua



Dr. Widjiati, drh., M.Si.

NIP. 196209151990022001

Pembimbing



Dr. Suherni Susilowati, drh, M.Kes.

NIP. 195906261987012001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Dr. Rimayanti, drh., M.Kes.

NIP. 196303121988032003



Usulan Penelitian Tesis ini Telah diuji dan dinilai pada

Tanggal : 18 Februari 2016

**PANITIA PENGUJI USULAN PENELITIAN TESIS**

Ketua : Prof. Dr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si.

Anggota : 1. Prof. Dr. Wurlina, drh., M.S.  
2. Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.  
3. Dr. Widjiati, drh., M.Si.  
4. Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes.

Surabaya, 18 Februari 2016

Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga  
Dekan



**Prof. Dr. Puji Srianto, drh., M.Kes.**  
NIP. 195601051986011001

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Tuhan YME. atas berkat dan karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan tesis dengan judul **“POTENSI ANTIOKSIDAN BUAH MERAH (*Pandanus conoideus Lam.*) TERHADAP EKSPRESI CASPASE-9 DAN JUMLAH SEL TROPOBLAS PLASENTA MENCIT (*Mus musculus*) BUNTING SEBELUM TERPAPAR PLUMBUM”**.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada : Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.

Dr. Widjiati, drh., M.Si. selaku pembimbing pertama sekaligus pembimbing penelitian yang telah banyak membantu serta memberi kesempatan pada penulis untuk mengikuti penelitian dan bimbingannya selama ini. Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes. selaku pembimbing kedua yang telah banyak menyempatkan waktu, membimbing, dan memberikan masukan pada penelitian sampai penyusunan tesis berakhir.

Prof. Dr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si. selaku ketua penguji, Prof. Dr. Wurlina, drh., M.S. selaku sekretaris penguji dan Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes. selaku anggota penguji.

Dr. Rimayanti, drh., M.Kes. selaku Ketua Program Studi S2 Ilmu Biologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga serta seluruh staf pengajar Program Studi S2 IBR Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan Magister.

Penulis menyampaikan terimakasih kepada seluruh staf Laboratorium Embriologi, Patologi, serta Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya atas bantuan teknis selama proses penelitian ini.

Ayahanda Paulus Sumarsono, S.P., Ibunda Tri Endah Utaming Tyas, dan Adikku Natasha Christanti yang telah memberi doa, dukungan, serta semangat sampai sekarang.

Kepada sahabatku sekaligus rekan penelitian Ika Wahyuni, drh. yang saling memberikan semangat dalam menjalani penelitian dan penyusunan tesis dalam suka maupun duka. Terimakasih penulis ucapkan kepada Dewita, Ronal Toga Sibarani, Agung Budianto, drh., M.Si dan teman-teman lainnya yang telah banyak membantu di laboratorium Embriologi. Kepada Jonathan Ivander Kurniawan, S.Si. yang telah mau mendengarkan, memberi pengertian, dan memotivasi selama proses penyusunan tesis ini. Serta terima kasih kepada seluruh sahabat dan teman-teman S2 yang tidak dapat ditulis satu persatu.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharap kritikan dan saran sebagai upaya penyempurnaan. Semoga penelitian ini dapat menjadi informasi yang berharga bagi khalayak umum dan kedokteran hewan. Akhir kata penulis mengucapkan terimakasih.

Surabaya, Februari 2016

Penulis



## RINGKASAN

**POTENSI ANTIOKSIDAN BUAH MERAH (*Pandanus conoideus Lam.*)  
TERHADAP EKSPRESI CASPASE-9 DAN JUMLAH SEL TROPOBLAS  
PLASENTA MENCIT (*Mus musculus*) BUNTING SEBELUM  
TERPAPAR PLUMBUM**

Plumbum merupakan salah satu logam berat yang dapat menurunkan kualitas hidup manusia. Keracunan plumbum pada hewan terjadi terutama setelah merumput di padang rumput yang terkontaminasi plumbum. Berbagai sistem organ yang dapat terkena dampak buruk akibat keracunan plumbum antara lain sistem saraf pusat, ginjal, hematopoetik, gastrointestinal, kardiovaskuler, endokrin, dan sistem reproduksi. Plumbum dapat melintasi membran *barrier* plasenta sehingga dapat mengganggu perkembangan fetus. Plumbum dapat menginduksi ROS dan meningkatkan kejadian apoptosis plasenta.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi pemberian antioksidan buah merah terhadap plasenta terhadap mencit bunting yang diberi paparan plumbum. Penelitian ini merupakan studi eksperimental laboratorik, dengan lima kelompok perlakuan dan empat kali ulangan yang menggunakan mencit (*Mus musculus*) betina bunting. Penelitian dimulai dengan mengawinkan mencit betina lalu kelompok P0 dipapar dengan plumbum dosis 0,011 mg/20 g BB mencit per hari dalam 0,1 ml aquades secara per oral mulai umur kebuntingan hari ke-6 s/d ke-15 (masa organogenesis). Namun pada kelompok perlakuan, sebelum dipapar dengan plumbum, mencit bunting diberi antioksidan buah merah dengan 0,3 ml/20 g BB, 0,8 ml/20 g BB, 0,9 ml/20 g BB per oral dan setelah satu jam dipapar dengan plumbum. Setelah semua diberikan perlakuan, tahap berikutnya adalah pembuatan sediaan preparat dengan pewarnaan HE untuk menghitung jumlah sel tropoblas yang masih normal dan pembuatan sediaan preparat untuk pemeriksaan ekspresi Caspase-9 pada sel tropoblas dengan metode pewarnaan Immunohistokimia.

Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Jumlah sel tropoblas yang normal diuji dengan analisis Univariant untuk melihat adanya interaksi antar faktor perlakuan. Setelah dilihat adanya interaksi, maka dilanjutkan dengan Analisis Varian (ANOVA) dan bila berbeda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan. Perhitungan ekspresi Caspase-9 dihitung dengan menggunakan *Indeks Skala Remmele* yang telah dimodifikasi. Data hasil perhitungan ekspresi Caspase-9 dilakukan analisis dengan Uji Kruskal-Wallis kemudian dilanjutkan dengan Uji Mann-Whitney untuk membandingkan antar kelompok perlakuan.

Hasil penelitian membuktikan bahwa pada kelompok perlakuan yang diberi antioksidan buah merah sebanyak 0,8 ml/20 g BB dan 0,9 ml/20 g BB menunjukkan peningkatan jumlah sel tropoblas yang normal dan penurunan ekspresi Caspase-9 dibandingkan dengan kelompok P0 yang tidak diberi antioksidan buah merah.

Kesimpulan penelitian ini adalah antioksidan buah merah dapat berpotensi meningkatkan jumlah sel tropoblas yang normal dan dapat menurunkan ekspresi Caspase-9 pada mencit bunting sebelum dipapar dengan plumbum.

## SUMMARY

### **ANTIOXIDANT POTENTIAL OF RED FRUIT (*Pandanus conoideus Lam.*) TOWARDS EXPRESSION OF CASPASE-9 AND NUMBER OF CELLS TROPOBLAS PLACENTA IN PREGNANT MICE (*Mus musculus*) BEFORE EXPOSED BY LEAD**

Lead is the one of heavy metal that can degrade the quality of human life. Lead poisoning in animals occur mainly after grazing on contaminated pasture of lead. Various organ systems can be affected by clinical manifestations of lead poisoning include central nervous system, kidney, hematopoietic, gastrointestinal, cardiovascular, endocrine, and reproductive systems. Lead can cross the placenta barrier membrane that can damage fetal development. Lead is an element that can induced ROS and increased apoptosis of placenta.

This research aims to determine the antioxidant potential of the red fruit to the placenta in pregnant mice before exposed by lead. This research was a laboratory experimental study, with five treatment groups and four replications were using mice (*Mus musculus*) females was pregnant. The research began by mating female mice and the P0 group of exposed by lead to a dose of 0,011 mg / 20 g BW per day mice in 0.1 ml of distilled water by oral start gestation day 6-15 (the period of organogenesis). However, the treatment group, pregnant mice were given red fruit with 0.3 ml/20 g BW, 0.8 ml/20 g BW, 0.9 ml/20 g BW by oral and after one hour exposed lead. After all the treatment given, the next stage is the preparation of HE staining to calculate the number of remaining normal trophoblast cells and examining Caspase-9 expression in trophoblast cells with immunohistochemistry staining method.

The design of this research used completely randomized design. The number of normal trophoblast cells was tested with univariate analysis to know the interaction between treatment factors. Having seen the interaction, then proceed with Analysis of Variant (ANOVA) and significantly different when followed by Duncan test. The expression of Caspase-9 was calculated by applying modified Remmele Scale Index. The data was analyzed with Kruskal-Wallis test and it was followed by Mann-Whitney test to compare among the treatment groups. The results indicated that the treatment group were given the antioxidants of red fruit of 0.8 ml / 20 g BW and 0.9 ml / 20 g BW showed increased cell count of normal trophoblast cells and decreased expression of Caspase-9 compared with a positive control group that did not given the antioxidants of red fruit.

The conclusion of this research is antioxidants of red fruit can potential to increase the number of normal trophoblast cells and decrease the expression of Caspase-9 in pregnant mice before exposed by lead.

**ANTIOXIDANT POTENTIAL OF RED FRUIT (*Pandanus conoideus Lam.*)  
TOWARDS EXPRESSION OF CASPASE-9 AND NUMBER OF CELLS  
TROPOBLAS PLACENTA IN PREGNANT MICE (*Mus musculus*)  
BEFORE EXPOSED BY LEAD**

**PORTIA SUMARSONO**

**ABSTRACT**

Lead (Pb) poisoning in animals mainly occur after grazing on contaminated pasture of lead. Lead was able pass through placenta barrier membrane and damaging the fetal development which also could induced ROS and increased apoptosis of placenta. This research aims to determine of potential of antioxidant from red fruit towards placenta in pregnant mice before exposed by lead. This research was a laboratory experimental study using pregnant mice (*Mus musculus*) as animal research divide by five treatment groups and four replications each. The negative control group were not exposed by lead, P0 were exposed by lead 0,011 mg / 20 g BW each day mice dissolve in 0.1 ml of distilled water and given by oral in gestation day 6-15. However, the treatment group, pregnant mice were given red fruit with 0.3 ml/20 g BW, 0.8 ml/20 g BW, 0.9 ml/20 g BW by oral before exposed by lead. After exposure, the final step were the preparation of HE staining to calculate the number of remaining normal tropoblast cells and examining Caspase-9 expression in tropoblast cells with immunohistochemistry staining method. The results indicated that the treatment group were given the antioxidants of red fruit of 0.8 ml / 20 g BW and 0.9 ml / 20 g BW showed the increase of normal tropoblast cells and decreased expression of Caspase-9 compared with P0 which not given the antioxidants of red fruit. The antioxidants of red fruit can potential to increase the number of normal tropoblast cells and decrease the expression of Caspase-9 in pregnant mice before exposed by lead.

Key words : lead, red fruit, Caspase-9, tropoblast cells



## DAFTAR ISI

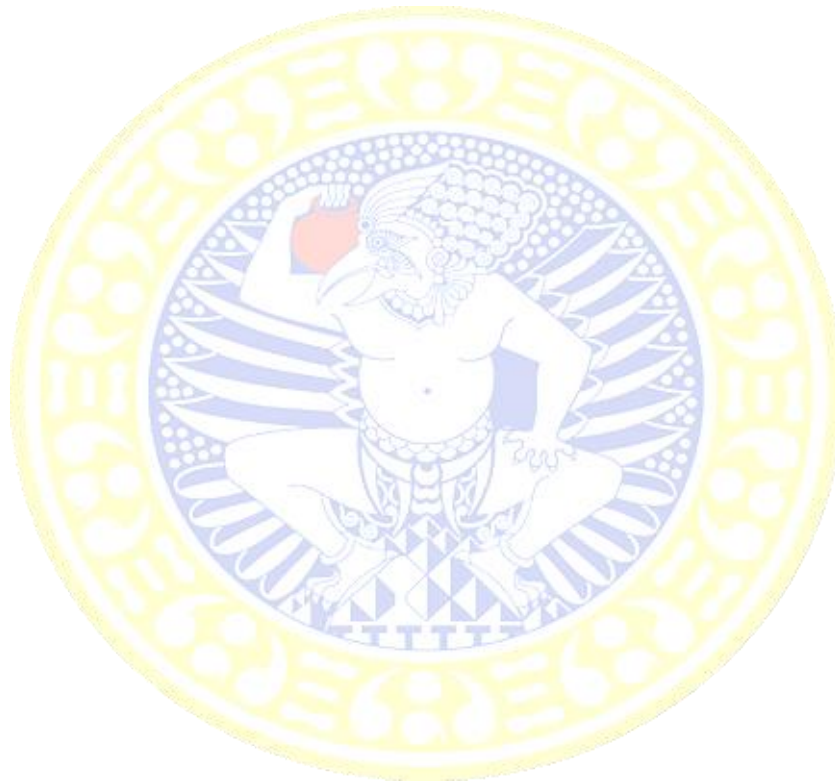
	Halaman
HALAMAN SAMPEL DALAM .....	ii
PRASYARAT GELAR.....	iii
PERNYATAAN.....	iv
PERSETUJUAN .....	v
PENETAPAN PANITIA PENGUJI .....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
RINGKASAN .....	ix
SUMMARY .....	x
ABSTRACT .....	xi
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR .....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
DAFTAR SINGKATAN .....	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	5
1.3. Tujuan Penelitian .....	5
1.3.1. Tujuan Umum .....	5
1.3.2. Tujuan Khusus .....	5
1.4. Manfaat Penelitian .....	6
1.4.1. Manfaat Teoritis .....	6
1.4.2. Manfaat Praktis .....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	7
2.1. Mencit ( <i>Mus musculus</i> ).....	7
2.1.1. Sistem Reproduksi Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	8
2.1.2. Plasentasi.....	9
2.2. Radikal Bebas .....	14
2.3. Plumbum .....	17
2.3.1. Sifat Fisika dan Kimia Plumbum .....	17
2.3.2. Metabolisme Plumbum dalam Tubuh.....	18
2.3.3. Efek Plumbum terhadap ROS dan Kebuntingan .....	19
2.4. Apoptosis .....	21
2.4.1. Caspase 9 .....	25
2.5. Tanaman Buah Merah ( <i>Pandanus conoideus Lam</i> ).....	27
2.5.1. Karotenoid.....	29
2.5.2. Tokoferol.....	30
2.5.3. Buah Merah Sebagai Antioksidan .....	32
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN....	34
3.1. Kerangka Konseptual.....	34
3.2. Hipotesis Penelitian .....	37
BAB 4 MATERI DAN METODE .....	39
4.1. Jenis Rancangan Penelitian.....	39
4.2. Populasi, Sampel, dan Besar Sampel .....	39
4.2.1. Populasi.....	39



4.2.2. Sampel.....	40
4.2.3. Besar Sampel .....	41
4.2.4. Teknik Pengambilan Sampel .....	41
4.3. Variabel Penelitian.....	42
4.3.1. Variabel Bebas .....	42
4.3.2. Variabel Tergantung .....	42
4.3.3. Variabel Kendali .....	42
4.3.4. Definisi Operasional .....	42
4.4. Bahan Penelitian .....	43
4.5. Peralatan Penelitian.....	44
4.6. Waktu dan Tempat Penelitian .....	45
4.7. Prosedur Penelitian .....	45
4.7.1. Prosedur Sinkronisasi Mencit .....	45
4.7.2. Prosedur Pengawinan Mencit .....	45
4.7.3. Prosedur Pemberian Plumbum.....	46
4.7.4. Prosedur Terapi Antioksidan Buah Merah .....	46
4.7.5. Prosedur Pembedahan Hewan Coba dan Pengambilan Sampel .....	47
4.7.6. Pengamatan Ekspresi Caspase-9 dengan Metode Immunohistokimia.....	47
4.7.7. Pengamatan Gambaran Histopatologis Plasenta Mencit dengan Pewarnaan Hematoxilin-Eosin.....	47
4.8. Analisis Data .....	48
4.9. Kerangka Alur Penelitian.....	49
BAB 5. HASIL PENELITIAN .....	50
5.1. Ekspresi Caspase-9 .....	50
5.2. Jumlah Sel Tropoblas Plasenta .....	52
BAB 6. PEMBAHASAN .....	57
6.1. Ekspresi Caspase-9 .....	59
6.2. Jumlah Sel Tropoblas Plasenta .....	63
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN .....	69
DAFTAR PUSTAKA .....	70
LAMPIRAN.....	79

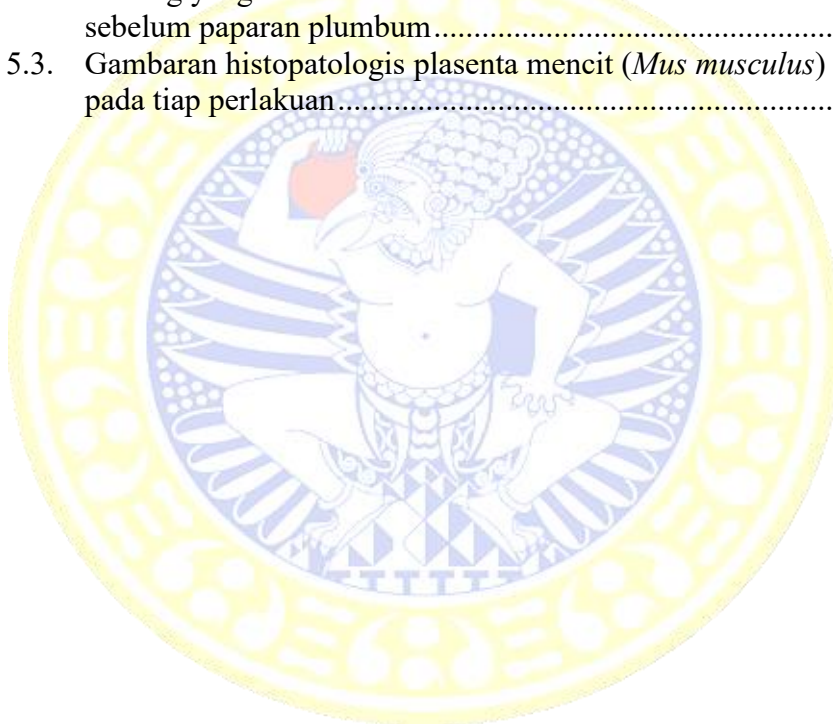
## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
Tabel 2.1. Klasifikasi mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	7
Tabel 2.2. Kandungan senyawa aktif dalam antioksidan buah merah .....	28
Tabel 2.3. Komposisi zat gizi per 100 gram buah merah.....	29
Tabel 5.1. Hasil uji Mann Whitney ekspresi Caspase-9 setelah intoksikasi plumbum dan pemberian antioksidan buah merah....	50
Tabel 5.2. Rataan dan simpangan baku jumlah sel tropoblas plasenta yang normal setelah intoksikasi plumbum dan pemberian antioksidan buah merah.....	53



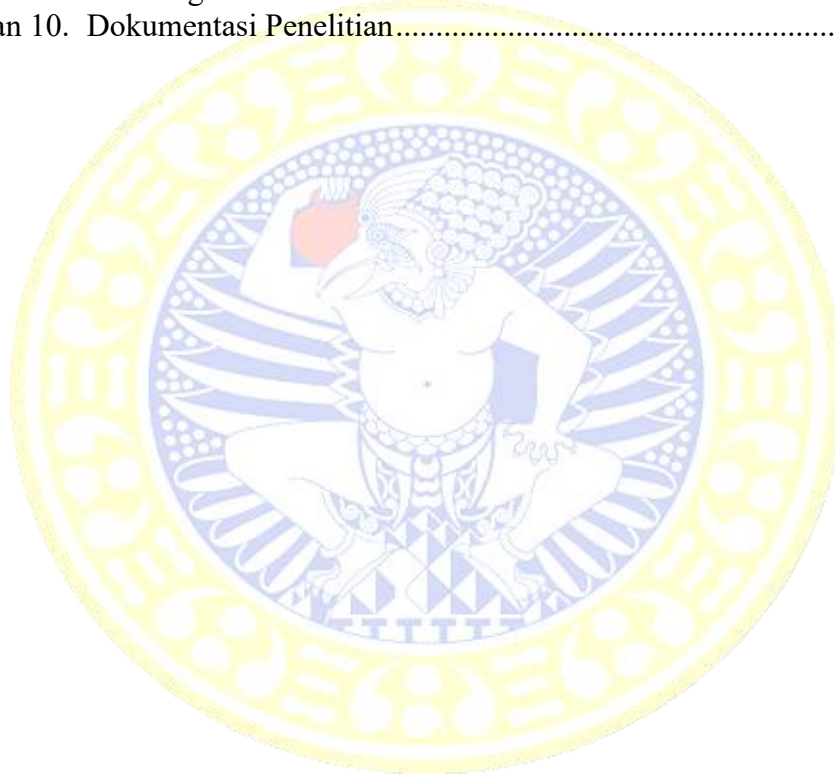
## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1. Struktur kimia plumbum.....	18
Gambar 2.2. Logam berat dan antioksidan.....	21
Gambar 2.3. Apoptosis jalur intrinsik .....	23
Gambar 2.4. Skematik <i>caspase-dependent apoptotic pathway</i> .....	24
Gambar 2.5. Buah merah ( <i>Pandanus conoideus Lam</i> ).....	27
Gambar 2.6. Struktur karotenoid .....	30
Gambar 2.7. Struktur tokoferol .....	31
Gambar 5.1. Ekspresi Caspase-9 pada plasenta mencit ( <i>Mus musculus</i> ) pada tiap kelompok perlakuan.....	52
Gambar 5.2. Grafik jumlah sel tropoblas yang normal pada mencit bunting yang diberi antioksidan buah merah sebelum paparan plumbum.....	54
Gambar 5.3. Gambaran histopatologis plasenta mencit ( <i>Mus musculus</i> ) pada tiap perlakuan.....	55



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>		<b>Halaman</b>
Lampiran 1.	Perhitungan Dosis Plumbum dan Antioksidan buah merah ....	79
Lampiran 2.	Skala Semikuantitatif <i>Indeks Skala Remmele</i> .....	80
Lampiran 3.	Prosedur Pembuatan Preparat Pewarnaan Hematoksin-Eosin .....	80
Lampiran 4.	Prosedur Pembuatan Preparat Imunohistokimia Caspase-9 ...	83
Lampiran 5.	Jumlah Sel Tropoblas yang Normal .....	86
Lampiran 6.	<i>Scoring</i> Ekspresi Caspase-9 .....	87
Lampiran 7.	Pengujian Data Jumlah Sel Tropoblas yang Normal.....	88
Lampiran 8.	Pengujian Data Ekspresi Caspase-9 .....	94
Lampiran 9.	Keterangan Kelaikan Etik.....	100
Lampiran 10.	Dokumentasi Penelitian.....	101





## DAFTAR SINGKATAN

ANOVA	= <i>Analysis of Variance</i>
<i>Apaf-1</i>	= <i>Apoptosis activating factor-1</i>
BA	= Berat Atom
Bak	= Bcl-2 Homologous Antagonist Killer
Bax	= Bcl-2-Associated X Protein
Bcl-2	= B-cell Lymphoma-2
BHA	= Butil Hidroksi Anilin
BHT	= Butil Hidroksi Toluene
Caspase	= <i>Cystein aspartyl-specific protease</i>
CCl <sub>4</sub>	= <i>Tetracloride Carbon</i>
DHA	= <i>decoxahexanoid</i>
DNA	= Deoxyribose Nucleic Acid
FADD	= Fas-Associated Death Domain
FasL	= <i>Fas Ligand</i>
FSH	= <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
HCG	= <i>Human Chorionic Gonadotropin</i>
IL-1 $\beta$	= Interleukin -1 $\beta$
IL-6	= Interleukin - 6
IU	= <i>International Unit</i>
IUGR	= <i>Intra Uterine Growth Retardation</i>
MDA	= Malondealdehid
mg/kg BB	= miligram per kilogram berat badan
ml	= mililiter
MT	= <i>Metrial Triangel</i>
NA	= Nomor Atom
Pb	= Plumbum
PMSG	= <i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin</i>
PTP	= <i>Permeability Transition Pore</i>
PUFA	= <i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
RAL	= Rancangan Acak Lengkap
ROI	= <i>Reactive Oxygen Intermediate</i>
ROS	= <i>Reactive Oxygen Species</i>
SOD	= <i>Superoksida Dismutase</i>
TEL	= <i>Tetra Ethyl Lead</i>
TGC	= <i>Tropoblast Giant Cell</i>
TML	= <i>Tetra Metyhl Lead</i>
TNF	= <i>Tumor Necrosis Factor</i>