

**LAPORAN HASIL PENELITIAN
HIBAH PENELITIAN PASCASARJANA-HPPT
(HIBAH PASCA)**



PENENTUAN JENIS PROTEIN YANG BERPERAN DALAM *NEURAL TUBE DEFECT* (NTDs) AKIBAT INDUKSI *2-METHOXYETHANOL* (2-ME) DENGAN METODE SEKUEN ASAM AMINO

Oleh

Prof. Win Darmanto, M.Si., Ph.D.

Prof. Dr. H. Sarmanu, MS.

Drs Eko Prihiyantoro, M.Kes.

Dibiayai DIPA-DP2M Ditjen Dikti Depdiknas
Surat perjanjian No. 0145.0/023-24.0/-/2007

**DIREKTORAT JENDRAL PENDIDIKAN TINGGI
DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL**

Universitas Airlangga

Tahun 2008

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**LAPORAN HASIL PENELITIAN
HIBAH PENELITIAN PASCASARJANA-HPPT
(HIBAH PASCA)**

KFC
KK
LP. 237/10
Pen



PENENTUAN JENIS PROTEIN YANG BERPERAN DALAM *NEURAL TUBE DEFECT* (NTDs) AKIBAT INDUKSI 2-METHOXYETHANOL (2-ME) DENGAN METODE SEKUEN ASAM AMINO

Oleh

Prof. Win Darmanto, M.Si., Ph.D.

Prof. Dr. H. Sarmanu, MS.

Drs Eko Prihiyantoro, M.Kes.

Dibiayai DIPA-DP2M Ditjen Dikti Depdiknas
Surat perjanjian No. 0145.0/023-24.0/-/2007

**DIREKTORAT JENDRAL PENDIDIKAN TINGGI
DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL**

**Universitas Airlangga
Tahun 2008**



HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR

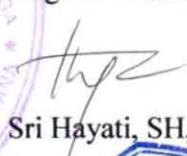
1. Judul Penelitian : Penentuan Jenis Protein Yang Berperan Dalam Neural Tube Defects (NTDs) Akibat Induksi 2-Methoxyethanol (2-ME) dengan Metode Sekuen Asam Amino
2. Peneliti Utama
- a. Nama Lengkap : Prof. Win Darmanto, M.Si. Ph.D.
 - b. Jenis Kelamin : Laki-Laki
 - c. NIP : 131 653 741
 - d. Jabatan Fungsional : Guru Besar
 - e. Jabatan Struktural : Wakil Dekan I FST
 - f. Bidang Keahlian : Biologi Molekuler
 - g. Jurusan : Biologi
3. Daftar Anggota Peneliti dan Mahasiswa

No	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas	PERGURUAN TINGGI
1.	Prof. Dr. H. Sarmanu, MS.	Imunohistokimia dan Statistika	Kedokteran Hewan	Universitas Airlangga
2.	Eko Prihiyantoro	Teratologi	Biologi	Universitas Gadjah Mada
3.	Yulia Irmidayanti, Dra., M.Si	Teratologi	Biologi	UNJ JKT
4.	Gatot, Ir	Perawatan Hewan	Perikanan	UNITOMO SBY
5.	Yulia Arum A. Ir., MSi	Biologi Molekuler	Pertanian	UNIBRAW

4. Pendanaan dan jangka waktu penelitian
- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 3 tahun
 - b. Jangka waktu yang sudah dijalani : 2 tahun
 - c. Biaya total yang diusulkan : Rp. 270.000.000,00
 - d. Biaya yang disetujui tahun II : Rp. 50.000.000,00

Surabaya, 24 Maret 2009
Peneliti Utama

Mengetahui,
Direktur Program Pascasarjana


Prof. Dr. Sri Hayati, SH, MS


Prof. Win Darmanto, M.Si., Ph.D.

Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian


Prof. Dr. Bambang Sektiari, Drh. DEA

PRAKATA

Penelitian Tim Hibah Pascasarjana dengan *judul Penentuan Jenis Protein yang berperan dalam Neural Tube Defects (NTDs) Akibat Induksi 2-Methoxyethanol (2-ME) dengan Metode Sekuen Asam Amino* pada tahun II telah selesai dilakukan. Diharapkan hasil penelitian ini dapat dijadikan acuan untuk penelitian teratologi yang lain, khususnya dijadikan acuan untuk pelaksanaan penelitian ini pada tahap berikutnya.

Ucapan terimakasih penulis ucapkan kepada :

1. Pemerintah Republik Indonesia dalam hal ini Menteri Pendidikan Nasional yang telah menyediakan dana penelitian melalui DIPA DP2M Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi.
2. Rektor Universitas Airlangga melalui Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan peneliti memperoleh dana penelitian ini.
3. Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga yang telah merekomendasikan usulan penelitian ini
4. Direktur Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada untuk kerjasamanya dengan memberikan rekomendasi kepada salah seorang mahasiswa S3 yang terlibat dalam penelitian ini
5. Dekan FSAINTEK Universitas Airlangga melalui Kepala Departemen Biologi yang telah menyediakan sarana dan fasilitas untuk pelaksanaan penelitian ini
6. Semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian tahun I dan II

Laporan hasil penelitian ini masih perlu penyempurnaan di sana-sini, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun dari pembaca sangat diperlukan untuk

menyempurnakannya. Akhirnya penulis berharap hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi pembaca khususnya sejawat peneliti dalam bidang kajian yang sama.

Besar harapan peneliti agar penelitian ini terus memperoleh dukungan dana dari pemerintah dalam hal ini Ditjen DIKTI sampai tahap yang berikutnya, sehingga penelitian ini dapat tuntas terlaksana dan membantu mempercepat penyelesaian studi lanjut bagi staf pengajar di perguruan tinggi dalam rangka peningkatan kualitas sumber daya pendidik di Indonesia.

RINGKASAN

Eksensefali merupakan jenis kelainan yang bersifat fatal, kelainan otak ini banyak muncul akibat pemberian senyawa 2-methoxyethanol (2-ME). Persentase terjadinya kelainan eksensefali akibat pemberian senyawa 2-ME pada mencit telah lama dibuktikan (Terry *et al.*, 1996; Darmanto *et al.*, 1994). Proses pembentukan sistem saraf dikenal dengan neurulasi. Pada hewan yang tergolong vertebrata proses neurulasi meliputi neurulasi primer dan neurulasi sekunder. Gangguan neurulasi primer menyebabkan terjadinya kelainan yang tergolong dalam *neural tube defects* (NTDs). Faktor yang menyebabkan terjadinya kelainan pembentukan *neural tube* bisa berasal dari dalam atau pun karena pengaruh bahan dari luar tubuh yang bersifat toksik atau teratogenik (Melvin *et al.*, 2000).

Salah satu bahan kimia polutan di lingkungan yang telah diketahui menyebabkan terjadinya kelainan eksensefali adalah 2-methoxyethanol (2-ME) (Terry *et al.*, 1996; Darmanto *et al.*, 1994). Senyawa tersebut merupakan bahan *plasticizer* yang diduga bersifat sitotoksik (Terry *et al.*, 1996; Ambroso *et al.*, 1999 ; Johanson, 2000).

Dari penelitian tahap I diperoleh hasil bahwa mekanisme eksensefali sebagai akibat 2-ME menyebabkan apoptosis pada *neuroepitelium*, maka menurunnya ekspresi fibronektin pada daerah *neuroepitelium* dan gangguan distribusi aktin yang menyebabkan gangguan kontriksi pada sel epitel daerah *dorso lateral hinge point* (DLHP).

Dalam usaha mencari jenis protein yang menjadi penentu terjadinya kelainan pembentukan *neural tube* akibat pemberian 2-ME, maka pada tahap kedua ini dengan cara pemberian bahan antagonis terhadap kerja fibronektin dan perbaikan terhadap kerusakan neuroepitelium yaitu dengan pemberian asam folat dan teofilin.

Dalam usaha untuk permasalahan tersebut, maka mencit betina umur kebuntingan 08:05 (delapan hari lima jam) disuntik dengan larutan 2-ME dengan dosis 7,5 mmol/ kg berat badan melalui intraperitoneal dikombinasi dengan folat maupun teofilin dengan dosis 10, 20, 30 mg gr / kg BB kemudian dibedah pada usia kebuntingan mencapai 8,5 hari, 9,5 hari, dan 18 hari. Sebagian embrio dan fetus difiksasi dalam larutan bouin untuk dibuat sayatan histologis dengan pewarnaan H&E.

Hasil pengamatan dan analisis statistik dari data yang terkumpul menunjukkan induksi 2-ME dosis 7,5 mmol/ kg berat badan pada umur kebuntingan 08:05 menyebabkan kelambatan fusi *neural fold* pada daerah pertemuan antara otak tengah dan otak depan. Sedangkan pemberian teofilin 30 mg/kg berat badan mampu menurunkan insiden eksensefali, menurunkan persentase kelainan perkembangan. namun tidak menunjukkan perbaikan pada penurunan berat badan fetus, penurunan fetus hidup maupun peningkatan kematian intrauterus. Dosis yang paling tepat dalam pencegahan kelaianan eksensefali adalah 30 mg/kg berat badan.

Hasil pemberian asam folat setelah induksi 2-ME menunjukkan asam folat tidak mampu mempertahankan kondisi induk mencit akibat induksi 2-ME, meliputi tidak mampu merunkan rata-rata angka insiden eksensefali akibat induksi 2-ME, namun asam folat mampu menurunkan insiden munculnya *neural tube defect* dan kelainan eksternal pada fetus , khususnya pada 0,5 mg/kg berat badan.

ABSTRACT

AMINO ACID SEQUENCE METHODE TO IDENTIFY PROTEIN IN THE NEURAL TUBE DEFECTS (NTDs) CAUSED BY 2-METHOXYETHANOL

Phthalate esters and glycol ethers are commonly used as plasticizers in the manufacture of flexible plastics and have become know as ubiquitous environmental pollutants. These research was designed to identify the protein which is responsible in the neural tube defects and inhibit its by using folic acid and theofilin. Pregnant female mice were housed in an air conditioned room, divided into eight groups. Groups number one were for control, group number two were treated with 7.5 mmol/kg body weight of 2-methoxyethanol (2-ME) on 08:05 day of pregnancy. Another groups number three to five of pregnant mice were treated with 2-ME and theofilin on dose of 10 mg/kg BW; 20 mg/kg BW; 30 mg/kg BW. Groups of six to eight were treated with 2-ME and Folic acid with dose of 0.5 mg/kg; 1.5 mg/kg; 2 mg/kg BW. Embryo were observed on gestation day of 8.5; 9 and 9.5 to study acute effects of 2-ME and follow up study of malformation. Fetus were observed on gestation day of 18 to observed the incidents of malformation. Induction of 2-ME in the development of neural tube caused the neural fold fusion were failed and develop to the neural tube defects when the embryo were observed on gestation day 8.5; 9 or 9.5 gestation, both morphologically or histologically. The inhibitory of teratogenic effects of theofilin and folic acid showed that theofilin dose 30 mg/kg BW caused decreased of incident of neural tube defects and exencephaly, decreased of percentage of malformation embryo. In another folic acid also caused decreased in the incident of exencephaly on fetus, however not for neural tube defects on embryo especially on dose of 0.5 mg/kg BW. We also observed the expression of some protein which is responsible for neural tube defects such as neural adhesion molecule (NCAM), neurofilamen, fibronectin, tenascin, GHPDH and vimentin. Fibronectin were decreased in expression caused by 2-ME.

Keyword : 2-Methoxyethanol, theophylline, folic acid, NCAM, fibronectin, tenascin mice, neural tube defects.

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	i
PRAKATA	ii
RINGKASAN	iii
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	6
 BAB II TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN II	
2.1. Tujuan Penelitian.....	8
2.2. Manfaat Penelitian.....	9
 BAB III TINJAUAN PUSTAKA	
3.1. Tinjauan Tentang <i>2-Methoxyethanol</i> (2-ME).....	10
3.2. Penggunaan Senyawa 2-ME	12
3.3. Mekanisme Toksisitas 2-ME.....	12
3.4. Pembentukan <i>Neural Tube</i>	13
3.5. Fusi <i>Neural Fold</i>	15
3.6. <i>Neural tube Defects</i> (NTDs)	16
3.7 Apoptosis.....	18

3.8. Tinjauan Tentang Teofilin	
3.8.1 Fosfodiesterase	21
3.8.2 Reseptor adrenergik terangkai dengan sistem adenilat siklase	21
3.9. Tinjauan tentang Asam Folat	
3.9.1 Struktur kimia asam folat	22
3.9.2 Metabolisme asam folat	24
3.9.3 Peranan asam folat untuk mencegah kelainan <i>neural tube</i>	26
3.10 Tinjauan tentang Fibronektin	27

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian	29
4.2. Bahan dan Alat Penelitian	
4.2.1. Bahan penelitian	29
a. hewan percobaan	29
b. bahan kimia	29
4.2.2. Alat penelitian	30
4.3. Cara Kerja	
4.3.1. Pemeliharaan hewan coba	30
4.3.2. Pembuatan larutan 2-ME, asam folat, teofilin.....	31
4.3.3. Perkawinan	31
4.3.4. Pemberian perlakuan	32
4.3.5. Pengamatan kemampuan reproduksi mencit.....	32
4.3.6. Perlakuan terhadap teofilin terhadap peran potensi	

anti-teratogenik.....	33
4.3.7. Perlakuan terhadap asam folat terhadap peran potensi	
anti-teratogenik.....	34
4.3.8. Pembedahan	35
4.4 Variabel Penelitian	36
4.5. Pengamatan	36
4.5.1 Kemampuan reproduksi induk mencit	36
4.5.2 Penentuan waktu pembentukan <i>neural tube</i>	37
4.5.4 Pemeriksaan pola distribusi protein aktin	36
4.6. Analisis Data	38
BAB V HASIL PENGAMATAN PEMBAHASAN.....	39
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	93
DAFTAR PUSTAKA	96

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
4.1.	Kelompok perlakuan mencit betina bunting	33
4.2.	Kelompok perlakuan untuk peran asam folat	34
5.1.	Rekapitulasi kemampuan reproduksi induk mencit setelah pemberian 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada UK 08:05	39
5.2.	Jenis kelainan eksternal yang muncul akibat pemberian 2-ME	40
5.3.	Rerata persentase sel mati pada embrio yang induknya diberi 2-ME pada masa kebuntingannya.....	48
5.4.	Kondisi induk mencit dan keadaan fetus mencit perlakuan kontrol; 2-ME; asam folat dan 2-ME+asam folat UK 09 :05	53
5.5.	Kelainan <i>neural tube</i> fetus mencit dengan perlakuan kontrol, 2-ME; asam folat dan 2-ME+asam folat UK 09:05	53
5.6.	Rekapitulasi kemampuan reproduksi induk	63
5.7.	Jenis dan persentase fetus yang mengalami kelainan	65
5.8.	Persentase angka insiden eksensefali pada mencit (<i>Mus musculus.L</i>) pada umur kebuntingan 18 hari	69
5.9.	Penampilan reproduksi induk mencit (<i>Mus musculus.L</i>)	70
5.10.	Jenis kelainan perkembangan pada mencit (<i>Mus musculus.L</i>) akibat pemberian 2-ME dan teofilin	71

DAFTAR GAMBAR

Tabel	Judul	Halaman
3.1.	Jalur metabolisme 2-ME	11
3.2.	Perubahan bentuk sel <i>neural tube</i>	14
3.3.	Struktur kimia xantin dan turunan xantin	20
3.4.	Struktur kimia asam folat dan dalam biosintesis dan reaksi metilasi	23
3.5.	Metabolisme asam folat	25
5.1.	<i>Neural tube</i> embrio mencit umur kebuntingan 8,5 hari	43
5.2.	Sayatan histologi embrio mencit UK 08:05 dengan pewarnaan H & E.....	44
5.3.	Calon otak Embrio mencit pada umur kebuntingan 9 hari.....	45
5.4.	Embrio mencit umur kebuntingan 9 hari.....	46
5.5.	Embrio mencit umur kebuntingan 9,5 hari.....	47
5.6.	Sayatan histologi dengan perbesaran 4X embrio UK 09:05	58
5.7.	Uji imunohistokimia embrio mencit umur kebuntingan 8,5 hari untuk mengamati peningkatan apoptosis sel neuroepitelium.....	50
5.8.	Uji imunohistokimia protein aktin pada embrio mencit umur kebuntingan 8,5 hari.....	51
5.9.	Grafik histogram rata-rata berat badan mencit UK 09:05.....	55
5.10.	Grafik garis jumlah implan mencit UK 09:05.....	56
5.11.	Grafik garis jumlah fetus mencit UK 09:05	57
5.12.	Grafik histogram jumlah <i>neural tube</i> yang terbuka fetus mencit UK 09:05	58

5.13. Grafik histogram persentase <i>neural tube</i> yang terbuka fetus mencit UK 09:05	60
5.14. Kondisi perkembangan embrio saat penutupan <i>neural tube</i>	61
5.15. Kelainan yang muncul pada fetus mencit dari induk yang diinduksi 2-ME pada UK 18 hari	66
5.16. Kelainan fetus akibat induksi asam folat 1,5 mg/ kg berat badan yang dikombinasikan dengan 2-ME	67
5.17. Kelainan fetus akibat induksi asam folat 2 mg/ kg berat badan yang dikombinasikan dengan 2-ME	67
5.18. Kelainan perkembangan akibat pemberian kombinasi teofilin dan 2-ME	72
5.19. Uji jenis DNA penyandi protein yang diperlukan dalam perkembangan otak	73
5.20. Skema penutupan <i>neural fold</i> pada mencit	77
5.21. Siklus metabolisme asam folat.....	83

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kelainan otak yang dominan muncul akibat pemberian senyawa *2-methoxyethanol* (2-ME) adalah eksensefali. Persentase terjadinya kelainan eksensefali akibat pemberian senyawa 2-ME ini mencapai 48 % dari fetus yang dilahirkan induknya (Terry et al, 1996; Prihiyantoro et al., 2003). Kelainan eksensefali yang muncul akibat induksi senyawa ini sebagai akibat terjadinya keterlambatan penutupan *neural tube* pada bagian anterior. Keterlambatan penutupan *neural tube* ini diduga disebabkan oleh terjadinya peningkatan kelainan proses *apical constriction* akibat kematian sel neuroepitelium yang diinduksi oleh pemberian senyawa 2-ME sebab kematian sel neuroepitelium akan menyebabkan terganggunya sintesis protein yang berperan dalam penutupan *neural tube*. Penutupan *neural tube* merupakan suatu proses yang bersifat multifaktorial dan merupakan rangkaian peristiwa yang tidak hanya ditentukan oleh sel neuroepitelium tetapi oleh sel lain yang memerlukan ekspresi protein tertentu yang dihasilkan oleh sel neuroepitelium atau sel lain di luar jaringan neural ektoderm. Jaringan mesoderm berperan penting dalam pembentukan *neural tube*, karena jaringan ini berdiferensiasi menjadi notokhord yang merupakan induktor primer neurulasi primer. Kerusakan notokhord akibat bahan kimia yang bersifat sitotoksik dapat menyebabkan kegagalan neurulasi primer (Schoenwolf and Smith, 1990).

Sistem saraf penting bagi makhluk hidup karena berfungsi mengkoordinasikan sistem organ lain. Oleh karena itu dalam perkembangannya dibentuk paling awal. Proses pembentukan sistem saraf dikenal dengan neurulasi. Pada hewan yang tergolong



vertebrata proses neurulasi meliputi neurulasi primer dan neurulasi sekunder. Hasil akhir neurulasi primer adalah terbentuknya *neural tube*, sedangkan neurulasi sekunder meliputi proses diferensiasi otak dan terbentuknya medula spinalis bagian posterior. Gangguan proses neurulasi akan menyebabkan kelainan yang berkaitan dengan sistem organ yang lain (Sakai, 1989; Schoenwolf and Smith, 1990; van der Put *et al.*, 2001).

Gangguan neurulasi primer menyebabkan terjadinya kelainan yang tergolong dalam *neural tube defects* (NTDs). Insiden NTDs di dunia cukup tinggi karena 3 diantara 1000 kelahiran mengalami kelainan ini (Juriloff and Harris, 2000; Melvin *et al.*, 2000). Faktor yang menyebabkan terjadinya kelainan pembentukan *neural tube* bisa berasal dari dalam ataupun karena pengaruh bahan dari luar tubuh yang bersifat toksik atau teratogenik (Melvin *et al.*, 2000). Salah satu bahan kimia yang berupa polutan di lingkungan yang telah diketahui menyebabkan terjadinya kelainan eksensefali adalah *2-methoxyethanol* (2-ME) (Terry *et al.*, 1996; Prihiyantoro *et al.*, 2002).

Senyawa 2-ME telah diketahui sebagai bahan yang bersifat teratogen karena telah terbukti menyebabkan kelainan pada janin apabila terdedah oleh bahan ini selama masa kehamilan. 2-ME adalah senyawa yang tidak berwarna, bau tidak menyengat, mudah larut dalam air maupun *ethanol*, mudah terbakar dan mudah menguap pada temperatur kamar. Oleh karena itu senyawa ini dimanfaatkan dalam industri. 2-ME biasa digunakan dalam industri cat, percetakan, bahan pembersih peralatan rumah tangga, anti beku bahan bakar jet, pelarut selulosa asetat dan resin, pengering pakaian, parfum, kosmetik, sabun cair, tinta, sebagai *plasticizer* dalam industri plastik pembungkus makanan, bahan aditif untuk larutan yang dapat mempercepat pengeringan vernis, cat kuku dan pembersihnya serta pewarna kayu (Dhalluin *et al.*, 1999; Johanson, 2000).

Kelainan otak yang disebabkan gangguan pembentukan *neural tube* adalah eksensefali, bila kegagalan pembentukan *neural tube* pada bagian anterior. Selain itu dikenal spina bifida yang diakibatkan gangguan pembentukan *neural tube* bagian posterior (Lakkis *et al.*, 1999; George *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2002).

Proses pembentukan *neural tube* meliputi proses induksi jaringan ektoderm yang pipih hingga terbentuk suatu tabung. Untuk dapat membentuk suatu tabung, maka jaringan yang semula berbentuk lembaran harus mengalami perubahan morfogenetik yang menyebabkan terjadinya perubahan bentuk sel penyusun jaringan dan interaksi dengan jaringan lain (Schoenwolf and Sheard, 1989; Schoenwolf and Smith, 1990; van der Put *et al.*, 2001).

Salah satu tahap yang penting dalam pembentukan *neural tube*, khususnya *neural tube* bagian anterior adalah pembentukan *dorso lateral hinge point* (DLHP). Keberhasilan pembentukan *neural tube* bagian anterior ditentukan oleh keberhasilan pembentukan DLHP (Schoenwolf and Smith, 1999; Ybot-Gonzales *et al.*, 2002). Peran DLHP dalam pembentukan *neural tube* adalah sebagai “engsel” pada calon *neural tube* bagian anterior yang diperlukan pada saat proses konvergensi dan fusi *neural fold* di bagian *dorsal midline* untuk membentuk atap *neural tube*.

Keberhasilan pembentukan DLHP ditentukan oleh dua proses morfogenetik yaitu *cell wedging* dan *neural plate anchoring*. *Cell wedging* adalah perubahan bentuk sel neuroepitelium di daerah sekitar DLHP dari bentuk kolumnar menjadi berbentuk baji, sedangkan *neural plate anchoring* adalah melekatnya *neural plate* pada jaringan di sekitarnya, sehingga kedudukannya menjadi stabil untuk proses pembentukan *neural tube* (Schoenwolf and Smith, 1990; George *et al.*, 1990).

Perubahan bentuk sel neuroepitelium menjadi bentuk baji terjadi melalui konstriksi apikal sel neuroepitelium. Konstriksi apikal ini terjadi karena akumulasi protein aktin pada bagian apikal sel neuroepitelium.

Gangguan konstriksi apikal menyebabkan tidak terbentuknya DLHP (Hildebrand and Soriano, 1999; Haigo and Hildebrand, 2003). Namun belum pernah dilakukan penelitian untuk membuktikan bahwa terjadinya kelainan pembentukan *neural tube* akibat pemberian 2-ME terjadi karena gangguan konstriksi apikal.

Anchoring neural plate terjadi diduga karena keberadaan fibronectin yang mendominasi matriks ekstra seluler yang mengisi celah antara *neural plate* dengan jaringan di sekitarnya (Schoenwolf and Smith, 1990).

Asam folat merupakan turunan dari vitamin B kompleks (B-9) yang disebut juga *folacine*, Pertama kali ditemukan pada daun bayam. Penelitian Berry *et al.*, di Cina (1999) menurunkan kelainan *neural tube* 85 persen dengan mengonsumsi asam folat 0.4 miligram sebelum dan awal kehamilan. Kebutuhan asam folat pada manusia sebesar 400 mg/kg, sedangkan kebutuhan mencit akan asam folat dalam makanan sebesar 7.5 (7.0 – 8.0) $\mu\text{g}/100\text{g}/\text{hari}$ (Antony, 2007).

Teofilin adalah turunan dari metilxantin yang sebagian besar terkandung dalam tanaman teh dan kopi. Senyawa ini mempunyai mekanisme kerja utamanya adalah menghambat fosfodiesterase (FDE) yang mengkatalis cAMP berubah menjadi 5'AMP sehingga menyebabkan protein kinase A yang semula tidak aktif menjadi aktif (Mutchler, 1991). Peningkatan kadar cAMP dan protein kinase A di dalam sel dapat menyebabkan meningkatnya reseptor bagi cAMP yaitu *Camp-Responsive Elemen* (CRE) yang menstimulasi sintesis fibronectin (Roman *et al.*, 2005).

Berdasarkan latar belakang di atas, maka penelitian ini perlu dilakukan untuk menguji pengaruh asam folat dan teofilin terhadap sintesis fibronektin dalam proses neurulasi. Fibronektin adalah salah satu matrik ekstraseluler yang penting dalam proses neurulasi. Kekurangan fibronektin dapat menyebabkan kegagalan elevasi dan konvergensi *neural fold*. Fibronektin dalam proses neurulasi disintesis oleh sel pada daerah sekitar DLHP, sehingga kematian sel pada daerah sekitar DLHP dapat menurunkan sintesis fibronektin. Senyawa 2-ME adalah senyawa teratogen yang menyebabkan kematian sel pada daerah sekitar DLHP. Pemberian teofilin diharapkan mampu mempertahankan sintesis fibronektin pada sel daerah sekitar DLHP, sehingga dapat menurunkan angka insiden eksensefali akibat induksi 2-ME.

Berdasarkan sifat teratogenik 2-ME di atas, maka penelitian ini dirancang untuk mengungkapkan terjadinya eksensefali bila induk mencit umur kebuntingan (UK) 09:05 hari diinduksi oleh senyawa 2-ME dosis 7.5 mmol/kg berat badan dan mengungkapkan penurunan rata-rata angka insiden eksensefali dengan pemberian asam folat maupun teofilin dosis 2 mg/kg berat badan. Selain itu penelitian berharap dapat mengungkapkan mekanisme kelainan pembentukan *neural tube* akibat pemberian 2-ME melalui pengamatan pada keberhasilan proses pembentukan DLHP dan *anchoring neural plate*. Diharapkan hasil penelitian ini menjadi dasar untuk dapat menentukan jenis protein yang berperan utama dalam terjadinya NTDs akibat induksi bahan toksik dari luar.

1.2. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Berapa rata-rata persentase terjadinya kelainan eksensefali akibat induksi 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan delapan hari lima jam (08:05) ?
2. Apakah induksi 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan 08:05 menyebabkan terjadinya keterlambatan fusi *neural fold* ?
3. Apakah terjadi peningkatan apoptosis sel neuroepitelium di daerah pembentukan *neural tube* setelah induksi 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan 08:05 ?
4. Bagaimana pola distribusi protein aktin sel neuroepitelium di daerah pembentukan *neural tube* setelah induksi 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan 08:05 ?
5. Bagaimanakah kondisi induk dan fetus mencit setelah pemberian 2-ME, asam folat dan 2-ME + asam folat pada umur kebuntingan 09:05 ?
6. Apakah pemberian asam folat dapat meningkatkan kemampuan reproduksi induk dan menurunkan insiden eksensefali setelah diinduksi 2-ME pada umur kebuntingan 08:05?
7. Berapa dosis asam folat yang efektif untuk menurunkan insiden eksensefali secara intraperitoneal pada umur kebuntingan 08:05 ?
8. Apakah pemberian teofilin dapat meningkatkan kemampuan reproduksi induk dan menurunkan insiden eksensefali setelah diinduksi 2-ME pada umur kebuntingan 08:05 ?

9. Berapa dosis asam folat yang efektif untuk menurunkan insiden eksensefali secara intraperitoneal pada umur kebuntingan 08:05 ?
10. Bagaimanakah karakteristik protein yang berperan dalam perkembangan otak pada saat neurulasi ?

BAB II

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. Tujuan Penelitian

1. Untuk menentukan rata-rata persentase fetus yang mengalami kelainan eksensefali akibat induksi 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan 08:05
2. Untuk mempelajari terjadinya keterlambatan pembentukan *neural tube* akibat induksi 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan 08:05
3. Menentukan tingkat apoptosis sel neuroepitelium di daerah pembentukan *neural tube* setelah induksi 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan 08:05
4. Memperoleh bukti terjadinya perubahan pola distribusi protein aktin sel neuroepitelium di daerah sekitar pembentukan *neural tube* pada embrio yang induknya diinduksi 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan 08:05
5. Untuk mengetahui kondisi induk dan fetus mencit setelah pemberian 2-ME, asam folat dan 2-ME + asam folat pada umur kebuntingan 09:05
6. Mengevaluasi peran asam folat dalam meningkatkan kemampuan reproduksi induk setelah diinduksi 2-ME secara intraperitoneal pada umur kebuntingan 8,5 hari
7. Mengetahui dosis asam folat yang efektif untuk menurunkan insiden eksensefali secara intraperitoneal pada umur kebuntingan 8,5 hari
8. Mengevaluasi peran teofilin dalam meningkatkan kemampuan reproduksi induk setelah diinduksi 2-ME secara intraperitoneal pada umur kebuntingan 8,5 hari

9. Mengetahui dosis teofilin yang efektif untuk menurunkan insiden eksensefali secara intraperitoneal pada umur kebuntingan 8,5 hari
10. Mengetahui karakteristik protein yang berperan dalam perkembangan otak pada saat neurulasi

2.2. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian tahun I berupa informasi mengenai umur kebuntingan yang pertama kali dijumpai terjadinya keterlambatan neural fold dan hasil uji imunohistokimia diharapkan akan dapat dipakai sebagai dasar untuk melakukan ekstraksi protein pada tahap selanjutnya dalam upaya menentukan jenis protein yang berperan utama dalam terjadinya kelainan eksensefali akibat pemberian 2-ME pada induknya.

Hasil penelitian tahun II berupa informasi mengenai mekanisme dan peran beberapa senyawa anti teratogen (asam folat dan teofilin) dalam mencegah kelainan syaraf pusat pada fetus dan diharapkan akan dapat dipakai sebagai dasar untuk melakukan ekstraksi protein pada tahap selanjutnya dalam upaya menentukan jenis protein yang berperan utama dalam terjadinya kelainan eksensefali akibat pemberian 2-ME pada induknya.

Selain itu hasil penelitian ini diharapkan merupakan konfirmasi atas penelitian terdahulu mengenai toksisitas 2-ME, sehingga dapat dijadikan dasar pertimbangan untuk pengelolaan limbah dan penggunaan senyawa 2-ME dalam aktifitas industri.

BAB III TINJAUAN PUSTAKA

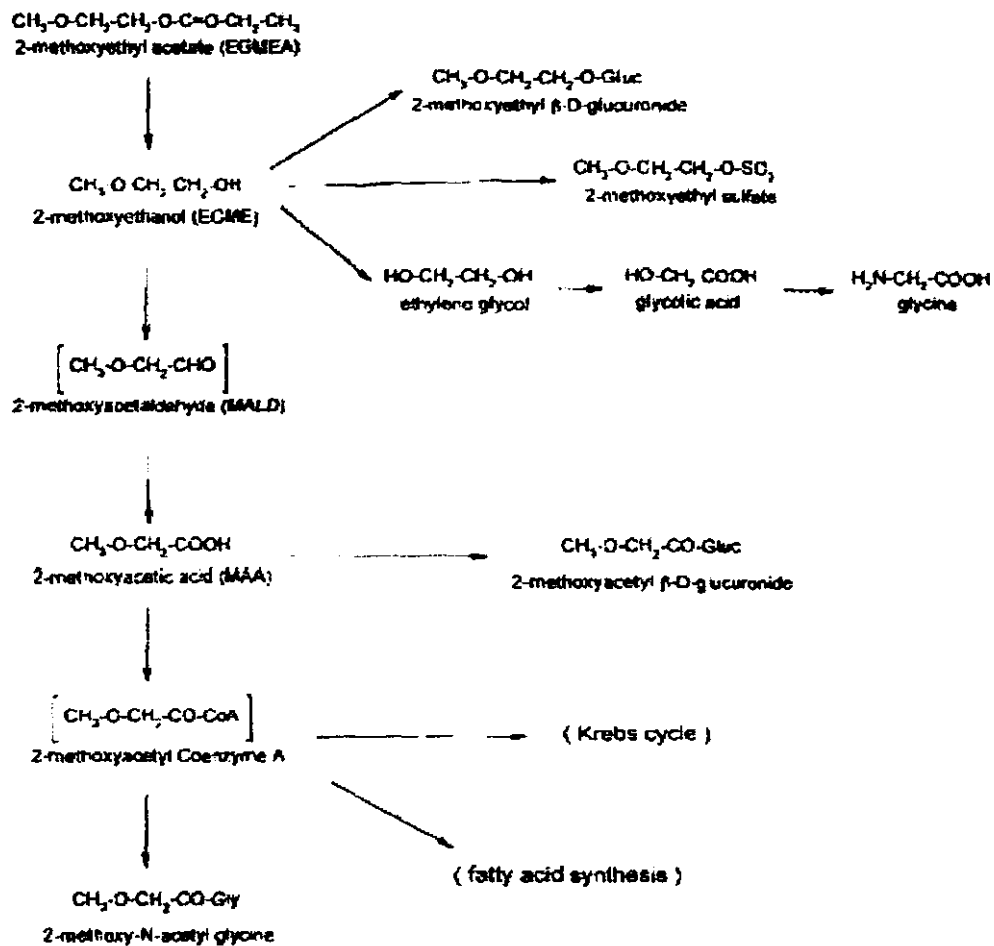
3.1. Tinjauan Tentang 2-Methoxyethanol (2-ME)

2-Methoxyethanol (2-ME) adalah golongan dari *glycol ethers* derivat dari diol seperti etilen dan propil glikol. Senyawa yang mempunyai nama lain *glycol monomethyl ether* ini tidak terbentuk secara alami tetapi melalui reaksi etilen oksida dengan metanol. Ciri-ciri yang dimiliki 2-ME diantaranya yaitu tidak berwarna, mudah terbakar, larut dalam air, mempunyai titik didih 124,6 °C dan titik beku -85,1 °C. Senyawa 2-ME dilaporkan banyak digunakan sebagai bahan campuran cat, tinta, laker, percetakan foto, zat anti beku yang ditambahkan pada bahan adiktif pompa hidrolik dan bahan bakar jet. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa senyawa 2-ME masuk ke dalam tubuh melalui kontak pada permukaan seluruh tubuh kemudian diserap melalui kulit (55%) dan melalui pernafasan (45%) (Johanson, 2000).

Senyawa 2-ME yang diserap ke dalam tubuh didistribusikan secara cepat dan merata ke dalam seluruh jaringan, kecuali pada jaringan lemak (Johanson, 2000). Hasil pengamatan dengan radioaktif pada mencit dengan cara melabel EGME dengan ¹⁴C, menunjukkan bahwa akumulasi 2-ME banyak terdapat pada jaringan hepar, vesica urinaria, ren, sumsum tulang dan jaringan epidermis (Ahmed *et al.*, 1994).

Di dalam tubuh senyawa 2-ME diubah menjadi *Methoxyacetic acid* (MAA) dengan bantuan katalisator alkohol dehidrogenase (ADH) melalui pembentukan senyawa antara berupa *Methoxyacetaldehyde* (MALD). Senyawa *methoxyacetaldehid* diubah menjadi MAA dengan bantuan katalisator enzim aldehyd dehidrogenase (ALDH) (Brown *et al.*, 1984; Moslen *et al.*, 1995).

Eliminasi 2-ME keluar dari tubuh yang paling dominan melalui urin, sedangkan sebagian kecil sisanya dieliminasi melalui saluran pernafasan, sehingga dapat diabaikan (Groeseneken *et al.*, 1989).



Gambar 3.1. Jalur metabolisme 2-ME (Johanson, 2000)

3.2. Penggunaan Senyawa 2-ME

EGME tidak ditemukan secara alamiah di lingkungan. Keberadaan senyawa ini sebagai polutan lingkungan karena penggunaannya oleh manusia di dalam aktivitas industri.

Sering dilaporkan bahwa senyawa ini digunakan sebagai bahan pencampur untuk pembuatan cat, laker, tinta, bahan-bahan pelapis logam, percetakan foto, digunakan dalam industri bahan-bahan semikonduktor, sebagai anti pembekuan yang ditambahkan pada bahan aditif untuk cairan pompa hidrolis dan bahan bakar jet serta bahan campuran untuk pembuatan plastik yang digunakan untuk pembungkusan makanan (Johanson, 2000, Horton *et al.*, 1985).

3.3. Mekanisme Toksisitas 2-ME

Toksisitas akibat masuknya 2-ME ke dalam tubuh disebabkan oleh metabolitnya berupa MAA. Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa penyebab terjadinya efek teratologis di dalam tubuh bekerja melalui gangguan pada protein yang berperan pada metabolisme tubuh. Sebagai contoh MAA mengganggu protein transport, protein sitoskeleton atau reseptor neurotransmitter (Lee *et al.*, 1993).

Toksisitas 2-ME dalam proses perkembangan dengan cara menghambat proliferasi sel. Terjadinya hambatan proliferasi sel akan menyebabkan gangguan serius pada proses perkembangan untuk menghasilkan organ, sehingga gangguan terhadap proliferasi sel dapat menyebabkan terjadinya malformasi (Mebus *et al.*, 1989).

3.4. Pembentukan *Neural Tube*

Neural tube adalah bumbung saraf yang dihasilkan melalui diferensiasi jaringan *neuroectoderm* dalam proses neurulasi. Neurulasi pada hewan mamalia yang bertujuan untuk membentuk sistem saraf dari jaringan *neuroectoderm*, tidak bisa dilepaskan dari peran korda mesoderm, karena merupakan induktor primer pembentukan *neural tube*.

Induksi jaringan *neuroectoderm* oleh korda mesoderm menyebabkan terbentuknya lempengan yang disebut *neural plate*. Sel *neural ectoderm* pada *neural plate* ini mengalami dua proses penting dalam rangka pembentukan *neural tube*, yaitu peningkatan kecepatan proliferasi sel dan perubahan bentuk sel. Perubahan bentuk sel terutama pada daerah yang nantinya akan membentuk *Dorso Lateral Hingepoints* (DLHPs) dan *Median Hinge Points* (MHPs). Kedua bentukan yang menyerupai engsel ini berfungsi mengarahkan fusi *neural fold* untuk membentuk atap *neural tube*. Bentukan yang menyerupai engsel ini disusun oleh sel neuroepitelium yang berbentuk baji. Sel neuroepitelium yang semula berbentuk kolumnar mengalami perubahan bentuk menjadi sel yang berbentuk baji (Ambroso *et al.*, 1999; Hildebrand dan Soriano., 1999; Wolpert, 2002; Haigo dan Hildebrand, 2003).

Perubahan bentuk sel neuroepitelium pada saat neurulasi primer terjadi melalui proses konstiksi apikal. Konstiksi apikal adalah terjadinya penyempitan pada bagian ujung sel neuroepitelium, khususnya yang menghadap suatu lumen akibat konstiksi pada bagian tersebut. Terjadinya konstiksi tersebut akibat akumulasi aktin selama masa neurulasi primer. Akumulasi protein aktin disebabkan oleh peningkatan produksi protein Shroom di daerah apikal sel neuroepitelium selama masa neurulasi (Haigo dan Hildebrand, 2003).

neuroepitelium ditentukan oleh distribusi sitoskeleton di dalam sitoplasma. Protein aktin yang berbentuk filamen adalah salah satu bentuk sitoskeleton, sehingga pola distribusi protein tersebut di dalam sitoplasma juga menentukan bentuk sel (Haigo dan Hildebrand, 2003; Lambrechts *et al.*, 2004).

3.5. Fusi *Neural Fold*

fusi *neural fold* membentuk *neural tube* penting bagi perkembangan embrio, karena kegagalan fusi tersebut menyebabkan kelainan morfologis yang serius bahkan bersifat lethal. Fusi *neural fold* pada beberapa jenis spesies diawali dari tempat yang berbeda di sepanjang calon *neural tube*. Pada manusia fusi *neural fold* terjadi pada minggu keempat kehamilan dan dimulai pada bagian *caudal rhombencephalon* atau pada bagian *cranial spinal cord* (Melvin *et al.*, 2000; Dias dan Partington, 2004; Nakatsu dan Shiota, 2000). Semula fusi *neural fold* diduga berjalan linier dari anterior ke posterior atau seperti *ritsluting*, namun belakangan diketahui bahwa sekurang-kurangnya ada 4-6 periode fusi *neural fold* pada manusia (Dias dan Partington, 2004).

Fusi *neural fold* mencit terletak pada beberapa titik di sepanjang calon *neural tube*. Titik awal fusi *neural fold* pada mencit berada pada daerah servik di antara somit ketiga dan somit keempat, sedangkan arah fusi berjalan dari *caudal* ke arah *rostral*. Fusi *neural fold* kedua terjadi pada daerah yang semula merupakan ujung *rostral neural plate*, sedangkan arah fusinya berjalan *rostradorsalis*. Fusi *neural fold* ketiga terjadi pada bagian *caudal diencephalon* dengan arah fusi baik ke arah *rostral* maupun *caudal*. Fusi *neural fold* keempat terjadi pada daerah yang semula merupakan ujung *caudal neural plate*

dengan arah fusi ke arah *rostral* (Sakai, 1989; Putz dan Morris-Kay, 1981; Jacobson dan Tam, 1982; Padmanabhan dan Shafiullah, 2003).

Proses konstiksi sel neuroepitelium dipengaruhi oleh protein Shroom yang bersifat mengikat protein aktin (*actin-binding protein*) (Haigo dan Hildebrand, 2003; Hildebrand dan Soriano., 1999). Protein Shroom disekresikan pada sel neuroepitelium, khususnya yang berada pada tempat pembentukan DLHPs (Haigo dan Hildebrand, 2003).

Pembentukan *neural tube* setidaknya merupakan interaksi dari tiga faktor yaitu terjadinya konstiksi apikal sel neural ektoderm, interkalasi sel *notoplate* yang berkembang dan memanjang menurut aksis anterior posterior serta dipengaruhi oleh induksi khorda mesoderm (Kalthof, 2001; Wolpert, 2002).

3.6. *Neural tube Defects* (NTDs)

Neural tube defects adalah kelainan perkembangan yang diakibatkan oleh kegagalan fusi *neural fold*. NTDs meliputi anensefali dan *meningomyelocele*, *encephalocele* dan *meningocele* (Fleming, 2001).

Kegagalan fusi *neural fold* posterior mengakibatkan kelainan *spina bifida*, sedangkan kegagalan fusi bagian anterior menyebabkan kelainan eksensefali, anensefali dan myelomeningocele (Sakai, 1989; Schoenwolf dan Smith 1990; Gunn *et al.*, 1995; Terry *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996; Lakkis *et al.*, 1999; Melvin *et al.*, 2000; Dias dan Partington, 2004; Prihiyantoro *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2002). Kelainan tersebut bersifat lethal dan biasanya menyebabkan kegagalan pembentukan organ lain. Kegagalan fusi *neural fold* pada kelainan eksensefali menyebabkan kegagalan pembentukan kranium, sehingga menyebabkan jaringan otak yang terbentuk terdedah keluar, namun

biasanya pada kelainan eksensefali, jaringan otak tidak terbentuk sempurna karena tidak terjadinya fusi *neural fold*. Kegagalan fusi tersebut menyebabkan tidak terjadinya proses neurulasi sekunder yang menghasilkan terbentuknya vesikel otak primer berupa prosencephalon, metencephalon dan rhombencephalon (Colas dan Schoenwolf., 2001).

Prevalensi terjadinya NTDs pada manusia tergolong tinggi karena mencapai angka 3 kali kejadian diantara 10.000 kelahiran hidup, sedangkan kelainan eksensefali dan anencephaly terjadi 1 dari 1000 kelahiran (Copp *et al.*, 1990; Lakkis *et al.*, 1999; Melvin *et al.*, 2000).

NTDs dapat disebabkan oleh faktor intrinsik berupa kelainan genetik maupun karena faktor metabolisme, selain itu juga dapat disebabkan oleh faktor ekstrinsik akibat penggunaan obat, terdedah oleh polutan yang bersifat teratogenik di lingkungan atau karena pengaruh temperatur yang tinggi (Melvin *et al.*, 2000; Fleming, 2001; Fazel dan Jalali, 2002; Wallingford dan Harland, 2002).

Bahan toksik yang berasal dari lingkungan dapat mengganggu proses neurulasi yang berakibat pada gangguan fusi *neural fold* mempengaruhi proses morfogenetik yang terlibat pada proses neurulasi. Proses morfogenetik tersebut meliputi proses intrinsik yang berkaitan dengan *neural plate* dan proses morfogenetik ekstrinsik yang berasal dari sel disekitar *neural fold*. Sebagai contoh adalah proses pemanjangan *neural plate* yang melalui pengaturan sel, perubahan bentuk sel, pembelahan sel, pertemuan *neural fold* ditengah. Faktor ekstrinsik yang mempengaruhi fusi *neural fold* adalah gaya tekanan statis pada sel neuroepitelium dari sel epidermis yang berada di sekitar *neural fold* dan induksi dari sel mesoderm yang berada di bawah sel neuroepitelium. Zat toksik yang

masuk ke dalam tubuh tersebut dapat menyebabkan kematian sel neuroepitelium (Terry *et al.*, 1996; Ambroso *et al.*, 1999; Wallingford dan Harland, 2002).

Untuk dapat menyingkapkan proses terjadinya NTDs perlu diikuti mulai dari perkembangan yang paling awal, mulai terbentuknya *neural plate* hingga terjadinya fusi *neural fold*. Dengan melakukan perbandingan secara morfologis dan histologis dapat ditentukan kelainan perkembangannya. Oleh karena itu untuk mempelajari kelainan ini harus dilakukan dengan menggunakan model hewan. Model hewan yang paling baik untuk mempelajari NTDs adalah mencit, karena kelainan ini mudah dihasilkan pada mencit melalui mutasi sejumlah gen atau melalui bahan toksik yang diberikan dari luar (Lakkis *et al.*, 1999; Jurilof dan Harris, 2000).

3.7. Apoptosis

Apoptosis merupakan proses biologi yang menyebabkan kematian sel melalui fragmentasi DNA atau disebut juga sebagai program kematian sel. Program kematian sel ini merupakan mekanisme yang penting selama perkembangan organisme multiseluler, yaitu untuk menghilangkan sel yang tidak diperlukan, sel yang rusak atau sel yang sudah tua (Haydar *et al.*, 1999).

Apoptosis berbeda dengan nekrosis pada distribusi dan reaksi jaringan sekitarnya. Apoptosis terjadi pada sel yang letaknya tidak berdekatan serta tidak disertai reaksi peradangan akut pada jaringan sekitarnya. Nekrosis terjadi pada sel yang letaknya berdekatan dan dengan disertai reaksi peradangan akut pada jaringan sekitarnya. Perbedaan lainnya adalah apoptosis dipengaruhi oleh rangsang dari lingkungan serta dari

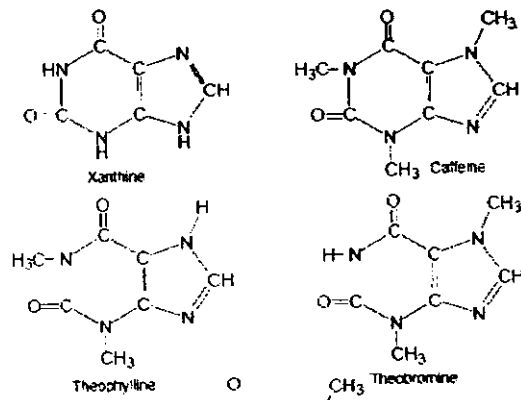
perkembangan, dan juga dikontrol oleh sejumlah besar gen dari famili *bcl-2*, yang merupakan proto-onkogen dan gen supressor tumor (Boldyrev, 2000; Kanduc, 2002).

Pada umumnya nekrosis ditandai dengan kerusakan membran plasma, hilangnya kontrol terhadap gradien ion, pembesaran organel sitoplasmik, pembebasan enzim lisosomal, aktivasi protease dan fosfolipase, penurunan sintesis protein serta pembelahan DNA menjadi fragmen-fragmen DNA. Sedangkan apoptosis meliputi peningkatan kadar ion Ca intraseluler, peningkatan ekspresi gen serta sintesis protein dan aktivasi endonuklease sehingga menyebabkan pembelahan DNA. Hal tersebut di atas merupakan perbedaan secara biokimiawi, adapun secara morfologi nekrosis ditandai dengan degradasi kromatin inti, sedangkan apoptosis ditandai dengan kondensasi kromatin inti serta pecahnya sel menjadi beberapa fragmen kecil atau *apoptotic bodies* (Dhalluin *et al.*, 1999). Akhir proses apoptosis ditandai dengan pemutusan rantai ganda DNA dan degradasi struktur DNA (Boldyrev, 2000; Kanduc, 2002).

Terjadinya kerusakan sel akibat pemaparan terhadap bahan toksik maupun teratogen akan mengaktifasi ekspresi protein p53 yang dapat menginduksi ekspresi molekul *Bax* (triger kematian sel) untuk mengubah permeabilitas atau membuka *gate* membran mitokondria. Hal ini menyebabkan sitokrom c (dalam mitokondria) keluar menuju sitosol dan bergabung dengan molekul *Apaf-1* dan *procaspase 9* (keduanya merupakan molekul proapoptosis) membentuk *apoptosome*, kemudian *apoptosome* akan mengaktifkan *caspase* yang merupakan protease intraseluler sehingga menyebabkan terjadinya aktifitas proteolitik yang mencerna proteinstruktur dalam sitoplasma, kondensasi kromatin dan degradasi DNA sehingga terjadi apoptosis (Brill *et al.*, 1999).

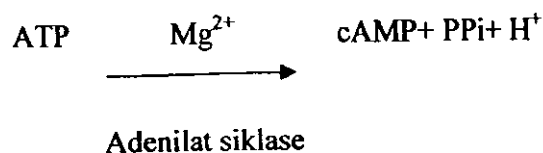
3.8 Tinjauan Tentang Teofilin

Teofilin (*1,3-dimethylxanthine*) adalah alkaloid yang ditemukan pada coklat dan teh. Senyawa yang terkandung dalam daun teh ini mempunyai ciri-ciri tidak berwarna, berbentuk serbuk kristal putih, larut dalam air 1 g/120 ml dan rasanya pahit. Secara struktur hampir mirip dengan kafein (*1,3,7-trimethylxanthine*) maupun teobromin (*3,7-dimethylxanthine*). Di dalam tubuh Teofilin dioksidasi dalam bentuk *1,3-dimethyluric acid* dan *1-methyluric acid*. Secara fisiologi, teofilin menghambat enzim yang mengkatalis cAMP menjadi *5'-adenylic acid* (AMP) (Anonimus, 1998).



Gambar 3.3 Struktur kimia xantin dan turunan xantin (Andersson *et al.*, 2004)

cAMP merupakan *second messenger* yang dibentuk dari senyawa ATP oleh kerja enzim Adenilat Siklase dengan adanya Mg^{2+} yang membentuk suatu kompleks dengan ATP untuk bertindak sebagai substrat untuk reaksi (Indah, 2004)



Dalam sel eukariot, cAMP berikatan dengan Protein Kinase yaitu sebuah molekul heterotetramer terdiri atas 2 subunit regulasi dan 2 subunit katalitik.

3.8.1 Fosfodiesterase

Kerja yang ditimbulkan oleh hormon yang meningkatkan konsentrasi cAMP bisa diakhiri dengan sejumlah cara termasuk hidrolisis cAMP oleh fosfodiesterase. Enzim hidrolisis ini menjamin proses pergantian sinyal yang cepat dengan demikian juga penghentian proses biologik yang cepat begitu stimulus hormonal dihilangkan. Inhibitor fosfodiesterase, yang paling terkenal adalah derivat xantintermetilasi seperti kafein dan teofilin, akan meningkatkan cAMP intrasel, meniru atau memperpanjang kerja hormon (Indah, 2004).

3.8.2 Reseptor Adrenergik Terangkai dengan sistem Adenilat Siklase

Tiga sub kelompok reseptor adrenergik berhubungan dengan sistem adenilat siklase. Hormon yang terikat pada reseptor β_1 dan β_2 akan mengaktifkan enzim adenilat siklase, sedangkan hormon yang terikat pada reseptor α_2 akan menghambat enzim ini. Kerja hormon epineprin dapat meningkatkan kadar cAMP dalam sel otot melalui pengaktifan sistem β adrenergik ini yang melalui perangkaian reseptor pada Potein G. Kemudian protein G berikatan dengan GTP yang merangsang sintesis cAMP, sehingga cAMP yang terbentuk mampu mengaktifkan enzim fosforilase kinase yang mengaktifkan protein kinase di dalam inti sel (Indah, 2004).

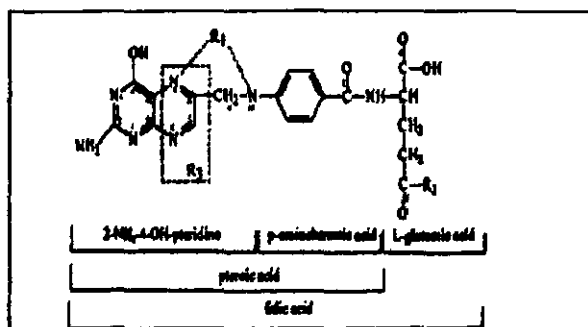
3.9. Tinjauan Tentang Asam Folat

3.9.1. Struktur kimia asam folat

Asam folat berasal dari bahasa latin yaitu *folium* yang berarti daun. Pertamakali diisolasi dari daun bayam pada tahun 1941, tetapi kemudian menunjukkan distribusi biologis yang amat luas. Zat dengan biopotensi asam folat terdapat banyak tersebar dalam berbagai bahan makanan, baik nabati maupun hewani. Sayur-mayur berwarna hijau, buah-buahan, dan hati hewan mempunyai kandungan asam folat yang tinggi. Pemasakan di dapur rumah tangga atau pengolahan teknologi pangan dapat merusak asam folat sampai 50-95% dari kadar total yang ada dalam bahan mentah asalnya (Craciunescu et al., 2004).

Asam folat memiliki beberapa nama yaitu *Acidum folicum*, *Folacin*, *Folynsyre* dan *Pteroylglutamic acid*. Untuk nama kimia dari asam folat yaitu N-[4-(2-amino-4-hydroxypteridin-6-methylamino)benzoyl]-glutamic acid. Karakteristik asam folat yaitu memiliki berat molekul 441.4, titik lebur 250° C, tidak berbau, sering ditemukan dalam serbuk kristal kuning kecoklatan, sukar larut dalam air, eter, kloroform dan aseton, tetapi larut dalam NaOH.

Asam folat adalah salah satu jenis vitamin yang diperlukan oleh tubuh. Asam folat diubah dalam tubuh menjadi bentuk aktif, yang akan berfungsi sebagai koenzim pada berbagai proses metabolisme termasuk sintesa purin dan pirimidin. Vitamin ini terdiri dari tiga komponen utama, yaitu: asam glutamat, asam p-aminobenzoat dan suatu turunan senyawa heterosiklik dengan cincin yang berdifusi, disebut pteridin.



Gambar. 3.4 Struktur kimia asam folat (Tamura and Picciano, 2006)

Defisiensi asam folat yang terjadi dari saat konsepsi sampai usia kehamilan dapat memunculkan komplikasi kehamilan berupa anemia, abortus spontan, lepasnya plasenta secara dini ataupun cacat bawaan seperti kelainan neural tube, jantung bawaan, serta bibir sumbing. Selain itu, dijelaskan pula, asam folat sangat bermanfaat dalam mencegah berbagai penyakit bukan bawaan yang berprevalensi tinggi seperti penyakit jantung koroner, stroke, alzheimer, skizofrenia, serta kanker (Tamura and Picciano, 2006). Asam folat wajib dikonsumsi oleh wanita hamil. Untuk terapi anemia megaloblastik, dosis per oral yang dianjurkan adalah 5 mg/hari selama 4 bulan sampai 15 mg pada keadaan malabsorpsi. Wanita hamil dengan resiko kelainan neural tube, dianjurkan mengkonsumsi 4-5 mg asam folat sebelum kehamilan dan berlanjut sampai trisemester pertama.

3.9.2. Metabolisme asam folat

Folat adalah bagian dari vitamin B-kompleks, terkait dengan asam pteroilglutamat (Pte-Glu) yang bertindak sebagai ko-faktor enzim yang mentransfer satu unit karbon di dalam berbagai jalur metabolik (*metabolic pathways*). Metabolisme satu-karbon yang dimediasi folat merupakan salah satu dari reaksi biokimia di dalam sel yang paling penting. Folat diperlukan untuk sintesis protein dalam asam nukleat dan mitokondria, serta metabolisme asam amino dan proses seluler lain yang melibatkan transfer satu unit-karbon. Folat dapat bertindak sebagai donor karbon atau dapat pula sebagai akseptor. Asam folat dalam organisme direduksi menjadi *asam 7,8-dihidrofolat* dengan perantaraan *dihidrofolat-dehidrogenase*. *Asam 7,8-dihidrofolat* oleh *tetrahidrofolat-dehidrogenase* direduksi menjadi *asam 5,6,7,8-tetrahidrofolat* (THF). Bentuk paling dominan dari folat yang beredar adalah *5methyltetrahyfolic acid* (*5-mTHF*). Vitamin B12 mengkonversi *5-mTHF* menjadi tetrahidrofolat (THF), suatu bentuk metabolik-aktif folat lain yang diperlukan dalam berbagai proses biokimia penting. Senyawa ini muncul sewaktu biosintesis metionin yang dikatalisis oleh enzim metionin-sintetase dan ko-faktor metilkobalamin. Selama pembentukan metionin, enzim metionin-sintetase menggunakan *5mTHF* sebagai sumber gugus metil. Kurangnya produksi THF oleh sel mengakibatkan sel tersebut terhambat dalam mensintesis asam amino purin dan timin untuk replikasi *DNA* dan terhambat memetabolisme histidin dan serin (Fleming, 2001).

3.9.3 Peranan asam folat untuk mencegah kelainan *neural tube*

Bouwer (1999) mengungkapkan bahwa kekurangan ko-enzim tetrahidrofolat menyebabkan terlambatnya metilasi homosistein menjadi metionin sehingga dapat menimbulkan hiperhomosisteinemia. Hiperhomosisteinemia dapat mengakibatkan terjadinya cacat kongenital, mempertinggi resiko penyakit kardio-vaskuler, stroke, demensia dan alzheimer. Defisiensi asam folat menyebabkan gangguan siklus metilasi-enzim yang diikuti dengan hiperhomosisteinemia, kerusakan DNA, gangguan sintesis protein dan penurunan kadar beberapa faktor pertumbuhan. Kesemuanya dapat mengganggu kondisi homeostatis, yang akhirnya juga melibatkan proses fisiologis apoptosis dan nekrosis. Gangguan itu mengakibatkan terjadinya kondisi yang disebut “kematian sel terprogram yang dipercepat” (*accelerated program cell death*), yang meningkatkan jumlah sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis (Poirier, 2002).

Pulikkunnel and Thomas (2005) mengatakan bahwa pemberian asam folat sebesar 4 mg pada hewan coba mencit mampu menurunkan munculnya kelainan *neural tube*. Pippenger (2003) dalam penelitiannya berhasil mengurangi 86 persen resiko terjadinya kelainan *neural tube* dengan pemberian asam folat sebesar 360 µg yang diberikan pada hewan coba sebelum masa kebuntingan. Berry *et al.*, (1999) melakukan penelitian pada para wanita di Cina bahwa dengan mengonsumsi asam folat 0.4 miligram sebelum dan awal kehamilan mampu menurunkan kelainan *neural tube* sebesar 85 persen. Kebutuhan asam folat sesuai standar Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), minimal 400 mikro gram per orang per hari dan wanita hamil minimal sebanyak 800 mikrogram per hari.

Jumlah asupan asam folat pada manusia yang diperoleh dari makanan sehari-hari sangat dipengaruhi oleh banyak hal, yaitu kandungan asam folat dalam bahan pangan,

kualitas absorpsi usus (Boddie *et al.*, 2000), ada tidaknya mual, muntah dan diare (Holving, 1993), kebutuhan relatif yang meningkat (hamil, menyusui, penyakit kronis), cara menyimpan, memasak dan menyajikan bahan pangan (McNulty *et al.*, 2000), kebiasaan (*habit*) individu dalam meramu komposisi bahan pangan, kecukupan vitamin lain (vitamin B12) untuk mengikat dan mengaktifkan aksi asam folat (Donosepoetro, 1998). Serta kecukupan reseptor folat (*folate receptor- α* , *FR- α*) dalam membran plasma sel agar folat dapat masuk sel dalam jaringan (Barber *et al.*, 1997).

3.10 Tinjauan Tentang Fibronektin

Fibronektin (FN) adalah suatu glikoprotein dimerik yang banyak ditemukan di permukaan sel, bermacam-macam cairan tubuh, jaringan ikat dan membran basalis. FN disintesis oleh bermacam-macam sel dan hubungannya erat dengan fibroblas, sel endotel, kondrosit, sel glial, sel amnion, miosit, trombosit, dan monosit. Peran utamanya adalah sebagai pelekut sel dengan matriks ekstraselular melalui reseptor integrin. Oleh karena itu peranannya sangat penting dalam pergerakan sel embrio, pertumbuhan fibroblas, pertahanan polaritas membrana basalis, adesi substrat sel, inflamasi dan penyembuhan luka, serta dapat berperan dalam opsonisasi (Dewi dan Rastini, 2007).

Menurut George *et al.*, (1993) fibronektin merupakan matrik ekstraseluler penting dalam embriogenesis. Kekurangan komponen ini dalam neurulasi dapat menyebabkan *neural tube* tidak terbentuk secara sempurna, terjadi pemendekan sumbu anterior sampai posterior tubuh embrio.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Reproduksi Universitas Airlangga mulai bulan Maret 2008 sampai dengan Desember 2008.

4.2. Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1. Bahan penelitian

a. Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit strain BALB/c (*Mus musculus*) betina bunting dengan umur kebuntingan 8 hari lima jam (08:05) dan umur kebuntingan 9 hari lima jam (09:05). Hewan percobaan diperoleh dari Pusat Veterina Farma (PUSVETMA) Surabaya kemudian dipelihara di rumah hewan Jurusan Biologi FMIPA Universitas Airlangga.

b. Bahan kimia

Bahan kimia yang akan digunakan antara lain meliputi

1. Bahan kimia untuk perlakuan adalah senyawa 2-ME dengan kemurnian 95% (*Wako Pure Chemical Industries, Japan*) dan akuabides.
2. Bahan kimia untuk pembuatan preparat histologi adalah larutan Bouin, buffer formalin, alkohol, xylol, parafin, zat pewarna Hematoksilin dan Eosin.

3. Bahan kimia untuk pemeriksaan apoptosis dengan menggunakan kit apoptosis (Apoptag[®] S7165).
4. Senyawa asam folat dan teofilin.

4.2.2. Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tempat pemeliharaan mencit, seperangkat alat bedah, seperangkat alat untuk pembuatan irisan histologi dan mikroskop stereo, mikroskop bedah.

4.3. Cara Kerja

4.3.1. Pemeliharaan hewan coba

Mencit dipelihara dalam kandang berupa bak plastik yang dialasi dengan sekam dan diberi penutup kawat. Pemeliharaan mencit jantan dan mencit betina ditempatkan pada kandang yang terpisah. Pakan berupa pelet "Par L" disediakan secara "*ad libitum*" yang ditempatkan di sebuah wadah yang terbuat dari kawat kasa dan diletakkan di atas kawat penutup. Minuman berupa air PDAM juga disediakan secara "*ad libitum*". Kandang mencit diletakkan pada rak di dalam rumah hewan.

4.3.2. Pembuatan larutan 2-ME, asam folat dan teofilin

Bahan uji yang diberikan pada penelitaian ini adalah larutan 2-ME dan teofilin, berupa cairan dengan kemurnian 99,0 % sebagai pelarut digunakan aquabidest steril. Dosis yang diberikan setiap bahan uji 2-ME yaitu 7,5 mmol/kg berat badan sedangkan teofilin 10, 20, 30 mg/kg berat badan. Asam folat dibuat dengan dosis 2 mg/ kg berat badan dilarutkan dalam aquadest steril.

4.3.3. Perkawinan

Mencit dikawinkan dengan cara mengumpulkan mencit betina dan mencit jantan dalam satu kandang pada pukul 17.00, kemudian diamati adanya sumbat vagina pada pukul 07.00 keesokan harinya. Adanya sumbat vagina menandakan telah terjadi kopulasi. Mencit betina yang ada sumbat vagina dianggap sedang bunting umur nol hari 5 jam (00:05). Berdasarkan hasil pengamatan Rugh (1968) ovulasi pada mencit terjadi pada

untuk 02.00, sehingga diasumsikan bahwa kopulasi terjadi bersamaan atau segera setelah terjadinya ovulasi.

4.3.4. Pemberian perlakuan 2-ME

Mencit betina bunting hasil perkawinan dibagi secara acak menjadi kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Masing-masing kelompok terdiri atas tiga ekor induk mencit bunting. Kelompok perlakuan dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok perlakuan 2-ME. Hewan coba kelompok perlakuan disuntik larutan 2-ME dengan dosis 7,5 mmol/kg berat badan melalui intraperitoneal pada umur kebuntingan 08:05 dan umur kebuntingan 09:05, sedangkan kelompok kontrol disuntik akuabides steril pada umur kebuntingan yang sama.

4.3.5. Pengamatan kemampuan reproduksi induk mencit

Pengaruh pemberian 2-ME dosis 7,5 mmol/kg berat badan pada induk mencit umur kebuntingan 08:05 hari terhadap kemampuan reproduksi induk mencit ditentukan melalui variabel jumlah implantasi, berat badan fetus, persentase kematian intrauterin dan persentase terjadinya kelainan eksternal pada fetusnya. Induk mencit yang sedang bunting 18 hari dibedah kemudian diambil fetusnya kemudian dilakukan pengamatan.

4.3.6. Perlakuan terhadap teofilin terhadap potensi anti-teratogenik

Perlakuan diberikan pada 25 ekor mencit betina bunting, yang terbagi atas 5 kelompok perlakuan. Pemberian perlakuan dengan penyuntikkan secara intra peritoneal dengan pembagian sesuai tabel berikut.

Tabel 4.1. Kelompok perlakuan mencit betina bunting

Kelompok perlakuan	Jumlah induk	Volume penyuntikan	Waktu pemberian perlakuan	Waktu pembedahan
Aquabidestilata steril	5 ekor	0,1 ml/10 g bb	UK 08:05	UK 08:05
Larutan 2-ME dosis 7,5 mmol/kg BERAT BADAN	5 ekor	0,1 ml/10 g bb	UK 08:05	UK 08:05
Larutan 2-ME 7,5 mmol/kg BERAT BADAN + larutan teofilin 10 gr/kg BERAT BADAN	5 ekor	0,1 ml/10 g bb	UK 08:05	UK 08:05
Larutan 2-ME 7,5 mmol/kg BERAT BADAN + larutan teofilin 20 gr/kg BERAT BADAN	5 ekor	0,1 ml/10 g bb	UK 08:05	UK 08:05
Larutan 2-ME 7,5 mmol/kg BERAT BADAN + larutan teofilin 30 gr/kg BERAT BADAN	5 ekor	0,1 ml/10 g bb	UK 08:05	UK 08:05

Keterangan : UK (umur kebuntingan), bb (berat badan)

4.3.7 Perlakuan terhadap peran asam folat terhadap potensi anti-teratogenik

Penelitian dibagi empat kelompok yaitu perlakuan P-1 (kontrol suntik aquabidestilata steril), P-2 (2-ME), P-3 (asam folat) dan P-4 (2-ME + asam folat). Masing-masing kelompok menggunakan lima ekor mencit. Sedangkan untuk pembagian kelompoknya adalah sebagai berikut :

Tabel 4.2. Kelompok perlakuan untuk peran asam folat

Kelompok	Keterangan
P-1	Kelompok kontrol diberi aquabidestilata steril 0.3 ml (bahan pelarut 2-ME dan asam folat) secara intraperitoneal pada uk 09:05 hari dan dibedah uk 9.11 hari.
P-2	Kelompok perlakuan diberi 2-ME dosis 7.5 mmol/kg berat badan 0.3 ml secara intraperitoneal pada uk 09:05 dan dibedah uk 9.11 hari.
P-3	Kelompok perlakuan diberi asam folat dosis 2 mg/ kg berat badan 0.3 ml secara intraperitoneal dilakukan tiga kali pada uk 0, 3, dan 9. Mencit dibedah uk 09:05 dan dibedah uk 9.11 hari.
P-4	Kelompok perlakuan kombinasi suntik 2-ME dosis 7.5 mmol/kg berat badan dan asam folat dosis 2 mg/ kg berat badan secara intraperitoneal masing-masing sebanyak 0.3 ml. Induksi asam folat dilakukan pada tiga kali yaitu uk 0, 3, dan 9. Induksi 2-ME dilakukan bersamaan dengan induksi asam folat ketiga yaitu uk 09:05 dan dibedah uk 9.11 hari.

Keterangan

UK 09:05 Hari ke sembilan, lima jam setelah kopulasi (kopulasi diasumsikan terjadi jam 02.00). Penyuntikan dilakukan jam 07.00.

UK 09:11 Hari ke sembilan, sebelas jam setelah kopulasi (kopulasi diasumsikan terjadi jam 02.00). Pembedahan dilakukan jam 13.00.

4.3.8. Pembedahan

Pembedahan dilakukan dengan tujuan memperoleh embrio dan fetus mencit untuk diamati perkembangan otaknya. Induk mencit yang telah diperlakukan pada umur kebuntingan 08:05 selanjutnya dibedah pada umur kebuntingan 08:12, 09:00, 09:12 dan 18:00.

Untuk memperoleh fetus mencit dari induk pada saat umur kebuntingan 18 hari, maka induk mencit dikorbankan dengan cara dislokasi serviks, kemudian dibuka pada bagian abdomen yang dilanjutkan dengan membuka uterus dan diambil fetusnya. Fetus mencit yang diperoleh selanjutnya ditimbang dan diamati adanya kelainan eksternal dengan menggunakan mikroskop bedah. Lima puluh persen fetus mencit yang diperoleh selanjutnya difiksasi dalam larutan Bouin, sedangkan sisanya difiksasi dengan larutan buffer formalin.

Induk mencit pada umur kebuntingan 08:12, 09:00; 09:12 diambil embrionya dengan cara memotong uterus pada ruas diantara dua vesikel yang berisi embrio. Selanjutnya potongan uterus yang berisi satu embrio tersebut ditekan dengan menggunakan pinset, sedemikian rupa sehingga terjadi peningkatan tekanan di dalam uterus. Tekanan yang tinggi di dalam uterus tersebut akan melontarkan embrio keluar kemudian ditampung di dalam cawan petri yang berisi garam fisiologis. Semua proses pengambilan embrio tersebut dilakukan di bawah mikroskop stereo.

Setengah bagian dari embrio mencit yang diperoleh difiksasi dengan larutan Bouin selama 2 jam selanjutnya disimpan dalam alkohol 70%, sedangkan 50% sisanya disimpan dalam larutan fiksatif buffer formalin. Embrio yang difiksasi dengan larutan Bouin digunakan untuk pengamatan kelainan internal.

4.4. Variabel Penelitian

Penelitian ini terdiri atas 3 variabel penelitian :

1. Variabel bebas (*independent variable*) dalam penelitian eksperimental adalah perlakuan, sehingga variabel bebas pada penelitian ini yaitu 2-ME dosis 7,5 mmol/kg berat badan, dosis teofilin dan dosis asam folat uk 9.11 hari.
2. Variabel tergantung (*dependent variable*) yaitu a) Kondisi induk mencit dengan sub variabel berat badan induk, jumlah fetus dan berat implan, berat badan rata-rata fetus mencit, jumlah implantasi fetus mencit, jumlah fetus yang mati, jumlah yang hidup, fetus mencit, jumlah resorpsi; b) Kelainan *neural tube* meliputi: jumlah *neural tube* terbuka dan persentase insiden *neural tube* terbuka, fetus dengan kelainan otak; c) Kelainan eksternal, kelainan internal; d) kondisi histologis *neural tube defect*, jumlah sel apoptosis; e) profil jenis protein ekstraselluler pada *neural tube defect*.

4.5 Pengamatan

4.5.1. Kemampuan reproduksi induk mencit

Pengaruh pemberian 2-ME dosis 7,5 mmol/kg berat badan pada induk mencit umur kebuntingan 08:05 hari terhadap kemampuan reproduksi induk mencit ditentukan melalui variabel jumlah implantasi, berat badan fetus, persentase kematian intrauterin dan persentase terjadinya kelainan eksternal pada fetusnya. Induk mencit yang sedang bunting 18 hari dibedah kemudian diambil fetusnya kemudian dilakukan pengamatan.

4.5.2. Penentuan waktu pembentukan *neural tube*

Penentuan waktu pembentukan *neural tube* dilakukan dengan pengamatan secara morfologi menggunakan mikroskop stereo dan pengamatan secara histologi dengan membuat preparat histologi.

4.5.3 Pemeriksaan persentase apoptosis sel neuroepitelium

Pemeriksaan apoptosis menggunakan ApopTag® Red *In Situ Apoptosis Detection KIT* (S7165). Pengamatan apoptosis dilakukan dengan menggunakan mikroskop stereo. Sel neuroepitelium yang mengalami apoptosis akan tampak berwarna coklat. Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel dalam satu lapang pandang dengan perbesaran lensa obyektif 40X. Setiap kelompok perlakuan terdiri atas tiga embrio dan setiap embrio diamati sepuluh lapang pandang. Selanjutnya dihitung rata-rata jumlah sel neuroepitelium perlapang pandang.

4.5.4 Pemeriksaan pola distribusi protein aktin

Protein aktin akan di dalam sitoplasma sel neuroepitelium akan terwarnai coklat. Oleh karena itu sel neuroepitelium yang teramati dengan warna coklat, khususnya pada sel yang menghadap lumen diasumsikan terdapat akumulasi protein di daerah apikal sel.

4.6. Analisis data

Persentase kelainan *neural tube* dilakukan melalui pengamatan morfologi, maupun kelainan fetus baik internal maupun eksternal, jumlah implantasi persen fetus hidup dan mati dianalisis dengan uji non paramaetrik menggunakan uji *Man Whitney*. Berat badan fetus dianalisis dengan uji t, Analisis data secara statistik dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *SPSS for Windows versi 11,5*.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Jenis Kelainan Akibat 2-ME

Kemampuan reproduksi induk mencit setelah perlakuan 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan 08:05 tercantum dalam tabel 5.1.

Tabel 5.1 Rekapitulasi kemampuan reproduksi induk mencit setelah pemberian 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada UK 08:05

No.	Perlakuan	Jumlah Induk	Jumlah Fetus	Rerata Jumlah Implantasi ($\bar{x} \pm SE$)	Rerata berat badan ($\bar{x} \pm SE$)	Rerata Persentase kematian Intrauterus	Rerata persentase Kelainan Eksternal
1.	Kontrol	3	19	6,33±0,67	1.0947	0	0
2.	2-ME	4	28	7,00±1,22	1.0964	0	46,43*

* berbeda nyata dengan kontrol pada tingkat kepercayaan 95%

Pada penelitian ini berat badan fetus mencit dan jumlah implantasi kelompok perlakuan yang disuntik 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan 08:05 hari tidak berbeda secara nyata dibandingkan dengan kontrolnya, namun terjadi perbedaan secara nyata persentase rata-rata fetus yang mengalami kelainan eksternal. Hal ini menunjukkan bahwa embriotoksisitas mencit kurang menonjol bila dibandingkan sifat teratogenitasnya.

Rincian jenis dan persentase kejadian kelainan eksternal akibat pemberian 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada induk mencit dengan umur kebuntingan 08:05 seperti tercantum dalam tabel 5.2.

Tabel 5.2 Jenis kelainan eksternal yang muncul akibat pemberian 2-ME

No.	Jenis Kelainan	Jumlah Induk	Jumlah Fetus	Jumlah Fetus dengan kelainan	Persentase
1.	Eksensefali	4	28	11	39,29
2.	Ekor kecil	4	28	1	3,57
3.	Anus tidak ada	4	28	1	3,57
4.	Makroglosus	4	28	4	14,29
5.	Kelainan telinga	4	28	1	3,57
6.	<i>open eye lid</i>	4	28	1	3,57
7.	Talipes	4	28	1	3,57
8.	Makrophtalmia	4	28	1	3,57
9.	Anophtalmia	4	28	2	7,14
10.	<i>Kinky tail</i>	4	28	1	3,57
11.	<i>Palatoschysis</i>	4	28	1	3,57

Jenis kelainan eksternal yang paling banyak terjadi akibat pemberian 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan 08:05 adalah eksensefali (39,29%). Hal ini karena pada umur kebuntingan 8 hari bertepatan dengan dimulainya masa organogenesis sistem saraf, sehingga apabila terdedah senyawa teratogenik, maka akan menyebabkan malformasi organ tertentu yang dibentuk pada masa organogenesis tersebut. Umur kebuntingan 8,5 hari (08:12) bertepatan dengan neurulasi primer yang merupakan masa pembentukan *neural tube*, sehingga masuknya bahan teratogenik pada waktu tersebut akan menyebabkan terganggunya pembentukan *neural tube*. Gangguan pada pembentukan *neural tube*, khususnya bagian anterior menyebabkan terjadinya kelainan eksensefali.

Munculnya jenis kelainan yang lain akibat induksi senyawa 2-ME karena bersamaan dengan pembentukan *neural tube* juga terjadi pembentukan organ yang lain, namun persentase kejadiannya tidak setinggi eksensefali, karena pemberian perlakuan yang bertepatan dengan masa pembentukan *neural tube* bagian anterior.

Pembentukan *neural tube* adalah meliputi beberapa peristiwa morfogenesis yang berkaitan dengan ekspresi gen tertentu. Masuknya bahan toksik ke dalam tubuh induk pada saat kebuntingan dapat menyebabkan terjadinya kerusakan gen yang berakibat gangguan ekspresi protein. Beberapa gen yang diduga berkaitan erat dengan terjadinya NTDs adalah p190RhoGAP, Shroom, Abl/Arg, Mena, Vinculin dan Marcks/MacMarcks (Wu *et al.*, 1996; Hildebrand and Soriano 1999).

Pembentukan *neural tube* adalah meliputi beberapa peristiwa morfogenesis yang berkaitan dengan ekspresi gen tertentu. Masuknya bahan toksik ke dalam tubuh induk pada saat kebuntingan dapat menyebabkan terjadinya kerusakan gen yang berakibat gangguan ekspresi protein. Beberapa gen yang diduga berkaitan erat dengan terjadinya NTDs adalah p190RhoGAP, Shroom, Abl/Arg, Mena, Vinculin dan Marcks/MacMarcks (Wu *et al.*, 1996; Hildebrand and Soriano 1999).

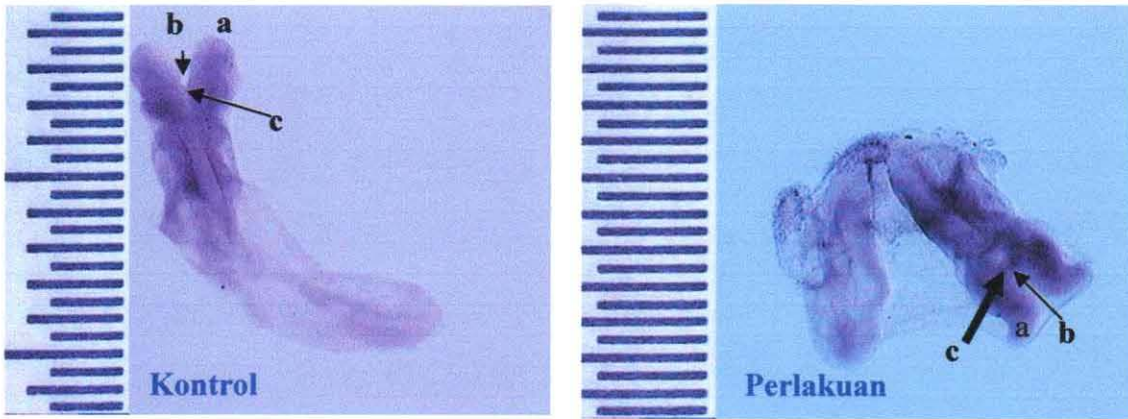
Senyawa 2-ME adalah senyawa toksik yang menyebabkan terjadinya fragmentasi DNA, sehingga menyebabkan terjadinya kematian sel dengan ciri yang sama dengan apoptosis (Ambroso *et al.*, 1999).

5.2 Keterlambatan fusi *neural fold*

Neural tube terbentuk setelah terjadinya konvergensi dan fusi *neural fold* di dorsal *mid line neur axis* membentuk atap. Proses tersebut meliputi proliferasi dan perubahan bentuk sel neuroepitelium, perlekatan *neural plate* dengan jaringan sekitarnya dan fusi sel neuroepitelium. Proses pembentukan *neural tube* yang sempurna melibatkan protein yang merupakan ekspresi gen. Oleh karena itu kerusakan gen akibat masuknya senyawa toksik akan menyebabkan terjadinya NTDs.

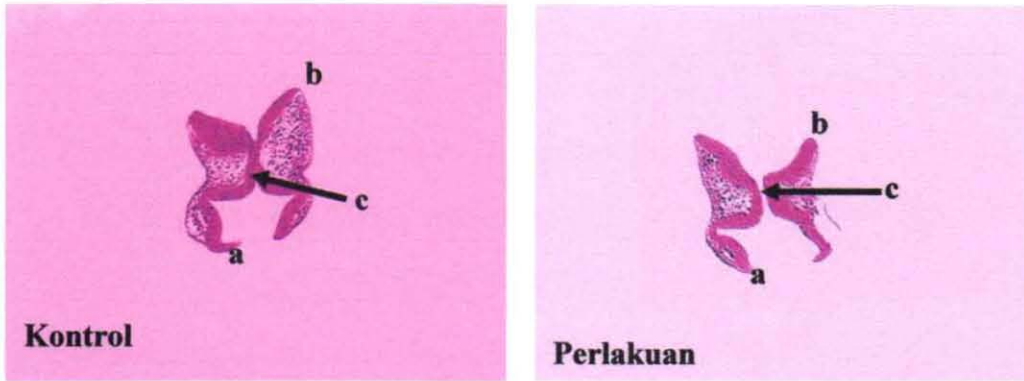
Atap *neural tube* dibentuk secara bertahap mulai dari umur kebuntingan 8 hari sampai dengan umur kebuntingan 10 hari. Pada penelitian ini diamati proses pembentukan *neural tube* pada umur kebuntingan 8,5, 9 dan 9,5 hari untuk mengetahui terjadinya keterlambatan pembentukan atap *neural tube* akibat pemberian 2-ME pada umur kebuntingan 08:05 hari. Dengan diketahuinya umur kebuntingan yang menunjukkan keterlambatan pembentukan atap *neural tube* dapat digunakan sebagai dasar untuk mengungkapkan jenis protein yang bertanggungjawab pada gangguan pembentukan atap *neural tube* yang mengakibatkan terjadinya NTDs atau eksensefali.

Fusi *neural fold* membentuk atap *neural tube* terjadi secara bertahap. Fusi pertama terjadi di daerah sambungan antara otak depan dan otak tengah yang segera diikuti dengan fusi *neural fold* pada bagian paling anterior otak depan (Kaufman, 1992; Kaufman dan Dubard, 1999). Pada penelitian ini embrio kelompok perlakuan tampak mengalami keterlambatan fusi *neural fold* pada daerah tersebut (Gambar 5.1).



Gambar 5.1 *Neural tube* embrio mencit umur kebuntingan 8,5 hari; a. *neural fold*; b. *neural groove*; c. titik fusi pertama pembentukan atap *neural tube*.

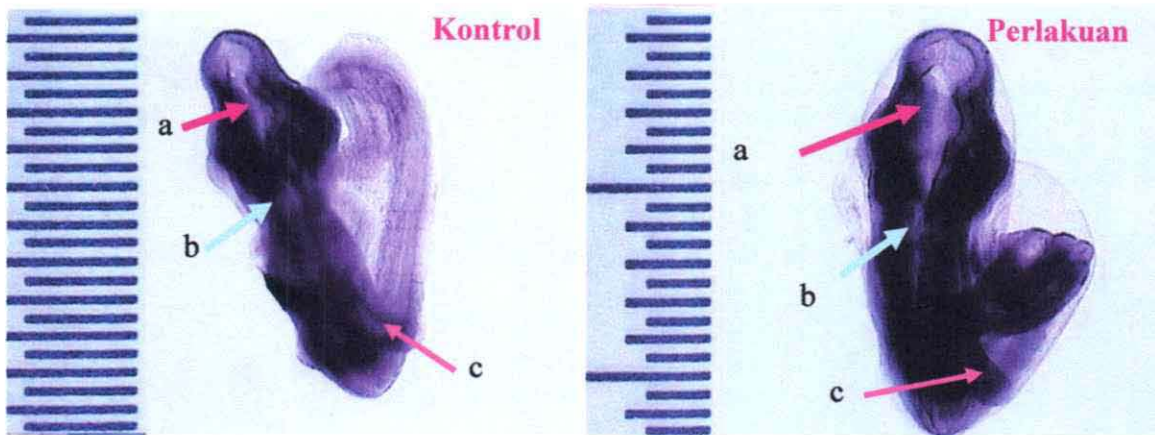
Hal ini menunjukkan bahwa delapan jam setelah pemberian 2-ME pada induknya telah menunjukkan pengaruh negatif pada proses pembentukan *neural tube* embrio. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Ambroso *et al.* (1999) bahwa enam jam setelah pemberian 2-ME pada induk mencit telah menyebabkan terjadinya peningkatan kematian sel neuroepitelium daerah pembentukan *neural tube*.



Gambar 5.2 Sayatan histologi *neural tube* embrio mencit UK 8,5 dengan pewarnaan H&E dan perbesaran 4X ; a. *neural fold* daerah calon otak depan b. *neural fold* daerah calon otak belakang; c. fusi *neural fold* yang pertama di daerah pertemuan antara otak tengah dan otak depan.

Hasil pengamatan *whole mount* (Gambar 5.2) juga menunjukkan terjadinya kelainan fusi *neural fold* pada daerah pertemuan antara otak depan dan otak tengah akibat pemberian 2-ME pada induknya. Keterlambatan fusi *neural fold* di daerah tersebut akan menutup kemudian atau mungkin proses fusi *neural fold* di daerah tersebut berhenti dan dilanjutkan fusi *neural fold* pada titik penutupan selanjutnya. Bila proses fusi *neural fold* titik berikutnya tidak terganggu, maka proses fusi *neural fold* antara satu titik dengan titik yang lain adalah peristiwa yang saling terpisah dan tidak berhubungan. Bila diamati pada fetus yang mengalami kelainan eksensefali menunjukkan bahwa daerah fusi *neural fold* yang lain tidak mengalami gangguan. Jaringan otak yang terdedah biasanya hanya terjadi di daerah pertemuan antara otak tengah dan otak depan. Jadi mungkin fusi *neural fold* pada beberapa titik penutupan bersifat independen.

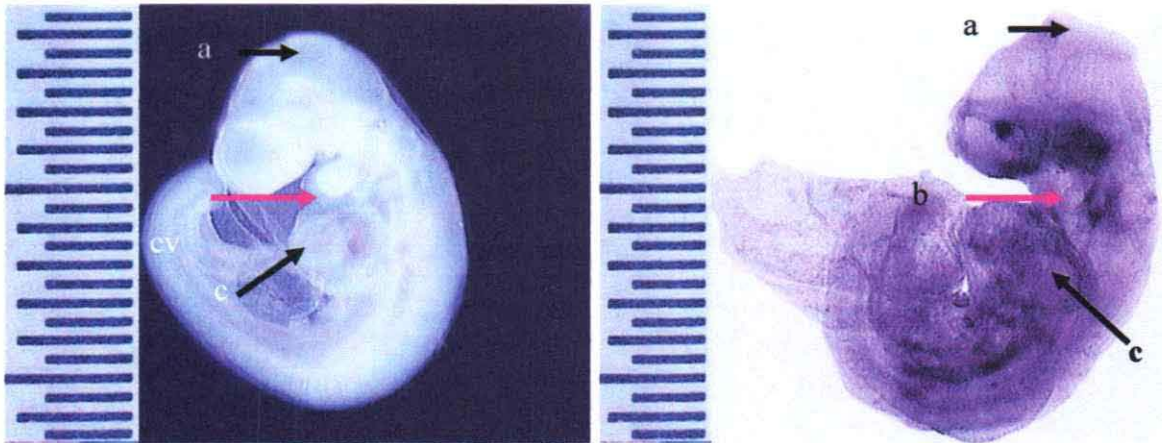
Pengamatan pada embrio umur kebuntingan 9 hari menunjukkan fakta yang sama bahwa pada titik fusi *neural fold* pertama menunjukkan perbedaan jarak *neural fold* yang semakin jelas. Selain itu daerah fusi *neural fold* yang lain tampak tidak terpengaruh dengan keterlambatan pada titik fusi yang pertama tersebut.



Gambar 5.3 Calon otak Embrio mencit pada umur kebuntingan 9 hari a. calon otak depan; b. calon korda spinalis; c. calon ektremitas depan

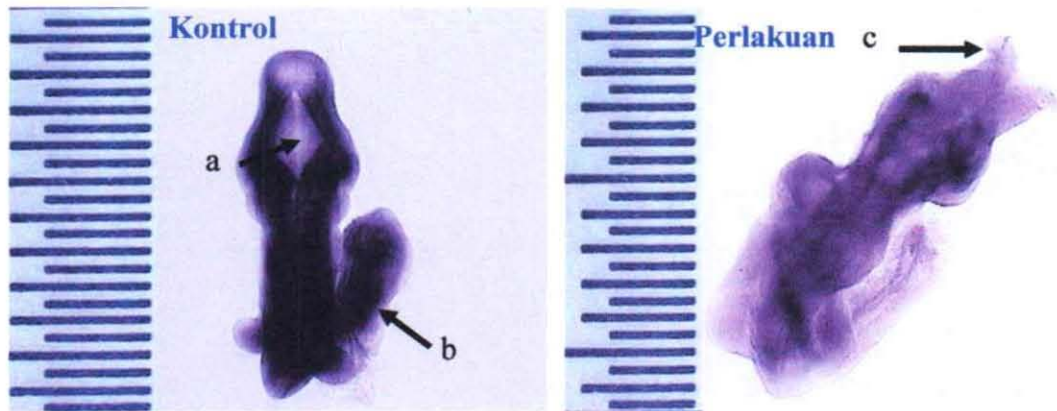
Pada saat umur kebuntingan 9 hari embrio mencit sedang mengalami penyempurnaan terbentuknya prosencephalon, mesencephalon dan rhombencephalon (Kaufman dan Dubard, 1999) dan pada saat yang bersamaan terjadi fusi *neural fold* di daerah serviks menuju ke arah anterior. Hasil pengamatan di atas menunjukkan terjadinya perbedaan antara embrio dalam kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Perbedaannya adalah jarak *neural fold* di daerah serviks antara kelompok kontrol dan perlakuan berbeda. Pada kelompok perlakuan jarak antara kedua *neural fold* relatif lebih lebar dibandingkan dengan kontrolnya (ditunjukkan oleh tanda panah berwarna merah).

Gangguan fusi *neural fold* ini lebih jelas tampak pada hasil pengamatan pada embrio umur kebuntingan 9,5 hari. Embrio kelompok kontrol yang diamati dari sisi lateral tampak telah terjadi pembentukan *neural tube* yang sempurna, sedangkan embrio pada kelompok perlakuan tampak adanya bentukan yang menonjol menyerupai fetus yang mengalami kelainan eksensefali. Bentukan tersebut sebenarnya adalah *neural fold* yang belum berfusi di daerah sambungan antara otak depan dan otak tengah.



Gambar 5.4 Embrio mencit umur kebuntingan 9,5 hari a. *neural fold* yang belum berfusi; b. archus mandibularis; c. organ visceral

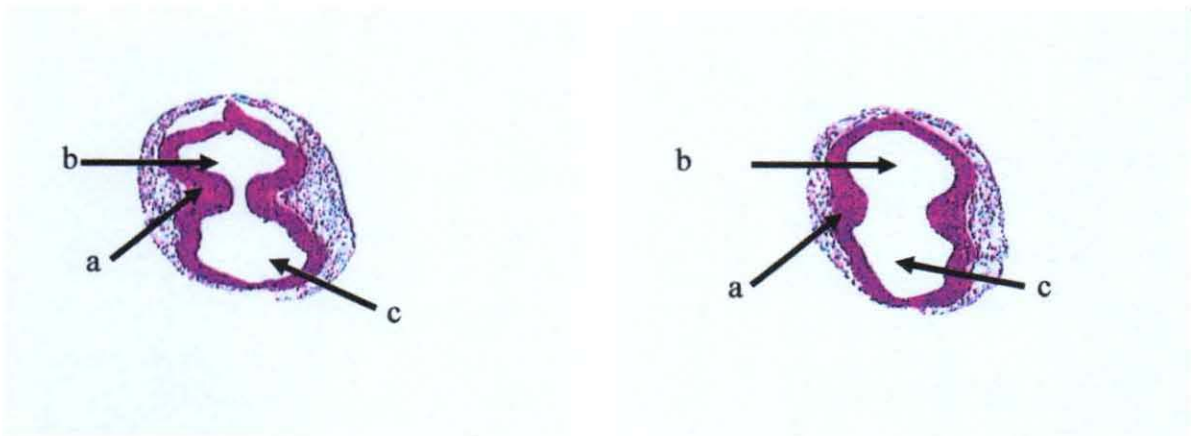
Pengamatan embrio mencit umur kebuntingan 9,5 hari dari arah ventral (Gambar 5.5.), khususnya embrio kelompok perlakuan, tampak bahwa *neural fold* mengarah ke lateral. Seharusnya fusi *neural fold* terjadi di daerah dorsal *mid line neural axis*. Hal ini mungkin berkaitan dengan kelainan sintesis fibronectin akibat peningkatan kematian sel neuroepitelium setelah pemberian 2-ME pada induknya.



Gambar 5.5. Embrio mencit umur kebuntingan 9,5 hari a. calon otak tengah; b. kuncup ekstremitas posterior; c. *neural fold* yang belum menutup dan tidak mengalami konvergensi ke daerah midline.

Fibronektin berperan dalam perlekatan DLHP calon *neural tube* pada jaringan di sekitarnya. Kelainan sintesis fibronektin mengakibatkan kedudukan calon *neural tube* tidak kokoh, sehingga pada saat fusi *neural fold* dimana pada saat itu terjadi juga regangan longitudinal berkaitan dengan perkembangan embrio. Akibat regangan yang kuat, sedangkan DLHP calon *neural tube* tidak kokoh kedudukannya maka *neural fold* yang seharusnya berfusi di daerah dorsal *mid line neural aksis* menjadi mengarah ke lateral.

Pengamatan secara histologi pada embrio umur kebuntingan 9,5 hari (Gambar 5.6) menunjukkan bahwa *neural fold* di daerah fusi pertama pada embrio kelompok perlakuan menunjukkan jarak yang lebih lebar dibandingkan dengan embrio pada kelompok kontrol.



Gambar 5.6 Sayatan histologis otak embrio mencit dengan pewarnaan histologis dengan perbesaran 4X embrio umur kebuntingan 9,5 hari. a. *neural fold*, b. calon otak tengah. c. calon otak depan.

5.3 Apoptosis Sel Neuroepitelium

Rekapitulasi rerata kematian sel neuroepitelium akibat pemberian senyawa 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada induk mencit umur kebuntingan 08:05 jam tercantum dalam tabel 4.3.

Tabel 4.3 Rerata persentase sel mati pada embrio yang induknya diberi 2-ME pada masa kebuntingannya.

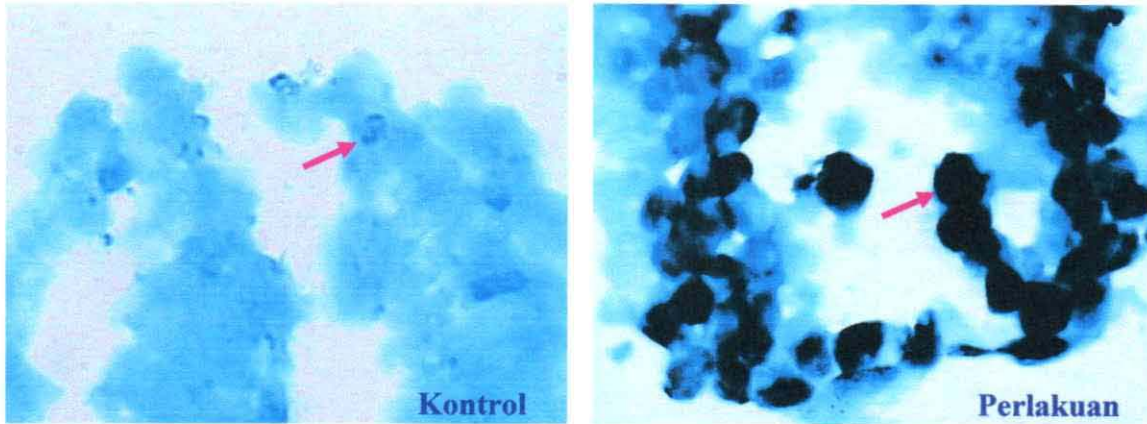
No.	Umur Kebuntingan (hari)	Kelompok Perlakuan	Jumlah embrio	Rerata persentase Sel mati (%)
1	8,5	Kontrol	3	0,5972 ^a
		2-ME	3	0,8558 ^{a*}
2	9,5	Kontrol	3	0,6031 ^b
		2-ME	3	0,6992 ^{b*}

- berbeda signifikan pada $\alpha = 0,05$ dibandingkan kontrolnya

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji t, menunjukkan bahwa rerata persentase sel neuroepitelium yang mati akibat pemberian 2-ME berbeda nyata baik pada embrio mencit umur kebuntingan 8,5 hari maupun embrio mencit umur kebuntingan 9,5 hari. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa 2-ME bersifat sitotoksik pada sel neuroepitelium. Hasil penelitian Terry *et al.*(1996) dan Ambroso *et al.* (1999) juga menyatakan hal yang sama bahwa terjadi peningkatan kematian sel neuroepitelium di daerah pembentukan *neural tube* secara nyata dibandingkan dengan kontrolnya.

Selisih rata-rata persentase kematian sel neuroepitelium pada embrio umur kebuntingan 8,5 hari antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan adalah 0,2586%, sedangkan pada embrio umur kebuntingan 9,5 hari selisih rata-rata persentase kematian sel neuroepitelium adalah 0,0961. Tampak bahwa selisih rata-rata persentase kematian selnya cenderung terjadi penurunan. Hal ini berarti terjadi upaya *recovery* kematian sel akibat pemberian 2-ME. Namun sekalipun terjadi upaya *recovery* kematian sel neuroepitelium kelainan eksensefali tetap terjadi. Hal ini mungkin kurang tingginya tingkat *recovery* atau hasil *recovery* tersebut mencegah terjadinya gangguan fusi *neural fold* berikutnya, sehingga bila diamati bagian lain dari pembentukan atap *neural tube* tidak mengalami gangguan.

Menurut Ambroso *et al.* (1999) dan Johanson (2000) kematian sel neuroepitelium akibat pemberian 2-ME mempunyai ciri yang sama dengan apoptosis yaitu terjadi fragmentasi DNA. Pada penelitian ini dilakukan uji imunohistokimia terhadap kematian sel neuroepitelium akibat pemberian 2-ME. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kematian sel neuroepitelium adalah apoptosis seperti tampak pada gambar 5.7.

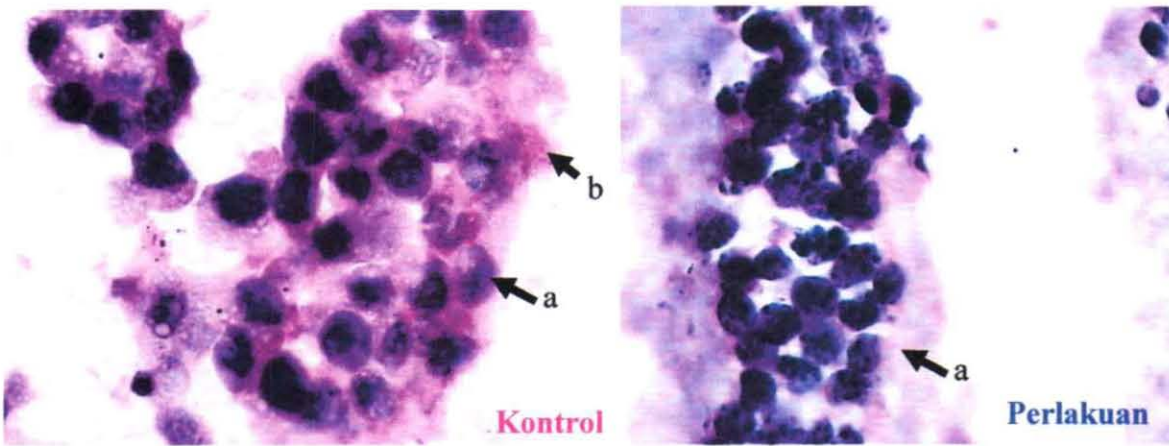


Gambar 5.7. Uji imunohistokimia embrio mencit umur kebuntingan 8,5 hari untuk mengamati peningkatan apoptosis sel neuroepitelium. Tanda panah menunjukkan sel neuroepitelium yang mengalami apoptosis. Perbesaran 100X.

Jumlah sel neuroepitelium yang mengalami apoptosis di daerah pembentukan *neural tube* pada kelompok perlakuan lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal yang akan diungkapkan lebih jauh dalam penelitian ini adalah terjadinya gangguan sintesis protein yang berperan pada proses fusi *neural fold* membentuk atap *neural fold* akibat peningkatan kematian sel tersebut. Pengamatan peningkatan apoptosis sel neuroepitelium merupakan dasar pemikiran terhadap terjadinya gangguan sintesis protein, karena apoptosis terjadi karena adanya fragmentasi DNA. Pada tingkat kerusakan yang parah akibat fragmentasi DNA akan menyebabkan kematian sel, namun bisa jadi pemberian 2-ME menyebabkan kerusakan DNA yang tidak terlalu parah sehingga tidak menyebabkan kematian sel neuroepitelium tetapi hanya mengalami kelainan pada DNA. Kelainan DNA inilah yang diduga menyebabkan gangguan sintesis protein tertentu yang berperan dalam fusi *neural fold* membentuk atap *neural tube*.

5.4 Pola distribusi protein aktin sel neuroepitelium di daerah pembentukan neural tube

Ada dua jenis protein yang diduga kuat mengalami gangguan sintesis akibat peningkatan kematian sel neuroepitelium tersebut yaitu Shroom dan fibronektin. Shroom adalah protein ekstraseluler yang bersifat *actin-binding protein* yang dihasilkan sel neuroepitelium pada masa neurulasi (Hildebrand dan Soriano., 1999). Protein Shroom yang disintesis tersebut mengakumulasi aktin di daerah apikal sel neuroepitelium, sehingga terjadi perubahan bentuk sel neuroepitelium dari kolumnar menjadi bentuk baji melalui konstiksi apikal (Kalthoff, 2001).



Gambar 5.8 Uji imunohistokimia protein aktin pada embrio mencit umur kebuntingan 8,5 hari dengan perbesaran 100X a. inti sel b. aktin yang terakumulasi

Pada gambar di atas tampak pada kelompok kontrol protein aktin yang terakumulasi di sitoplasma berwarna kecoklatan, sedangkan embrio kelompok perlakuan tidak dijumpai adanya akumulasi protein aktin karena tidak ada warna kecoklatan di sekitar inti. Mungkin aktin tersebar merata di seluruh sitoplasma atau mungkin sel neuroepitelium di daerah pembentukan banyak yang mati sehingga tidak dijumpai adanya akumulasi aktin. Akumulasi aktin pada daerah apikal sel berperan dalam perubahan

bentuk sel neuroepitelium dari kolumnar menjadi baji. Perubahan bentuk sel ini penting untuk pembentukan DLHP yang mengarahkan konvergensi *neural fold* ke *mid line neural axis*.

Fibronektin adalah matriks ekstraseluler yang berperan dalam perlekatan DLHP pada jaringan sekitarnya, sehingga kedudukannya menjadi kokoh untuk menjamin terjadinya fusi *neural fold* di daerah *mid line neural axis* (Schoenwolf dan Smith, 1990).

Dugaan tersebut diatas akan dibuktikan kebenarannya dalam penelitian ini melalui teknik proteomik. Teknik ini berusaha menemukan keberadaan kedua jenis protein tersebut melalui pembacaan sekuen asam amino pada saat diketahuinya terjadi gangguan fusi *neural fold*. Penentuan umur kebuntingan terjadinya keterlambatan fusi *neural fold* menjadi dasar penelitian berikutnya.

5.5 Kondisi induk mencit dan keadaan fetusnya dengan perlakuan kontrol; 2-ME; asam folat dan 2-ME + asam folat UK 09:05

5.5.1 Kemampuan reproduksi

Kondisi induk mencit pada penelitian ini dicerminkan melalui penambahan berat badan induk, jumlah fetus dan berat implan. Berat badan awal mencit diketahui bunting (H0) pada semua perlakuan adalah seragam yaitu 25 g. Hal ini sesuai dengan Wolpert (2002) mengatakan berat badan ideal tikus betina saat memasuki masa produktif reproduksi yaitu berkisar 25-30 g. Perhitungan berat badan akhir saat mencit akan dikorbankan juga diukur (H9.11). Perlakuan ini bertujuan untuk mengetahui apakah ada pengaruh terhadap berat badan induk mencit dari pemberian induksi 2-ME ataupun asam folat. Pemberian 2-ME dosis 7.5 mmol/kg BB pada umur kebuntingan (uk) 9.05 dalam

penelitian ini, umumnya menyebabkan penurunan rata-rata berat badan induk selama kebuntingan.

Tabel 5.4 Kondisi induk mencit dan keadaan fetusnya dengan perlakuan kontrol; 2-ME; asam folat dan 2-ME + asam folat UK 09:05

No	Perlakuan	Jumlah Induk	Jumlah Fetus	Berat Badan Induk (g) X ± SD	Berat implan (g) X ± SD
1	Kontrol (P-1)	5	21 ^{cd}	30.02±1.04 ^c	0.0881±0.004 ^c
2	2-ME (P-2)	5	14 ^d	21.94±0.66 ^d	0.0383±0.003
3	Asam folat (P-3)	5	27 ^a	30.50±0.99 ^a	0.0901±0.006 ^a
4	2-ME+Asam folat (P-4)	5	19 ^{ab}	22.70±0.36 ^b	0.0626±0.006

Keterangan : ^a : tidak berbeda nyata dari P1 pada $p > 0,05$

^b : tidak berbeda nyata dari P2 pada $p > 0,05$

^c : tidak berbeda nyata dari P3 pada $p > 0,05$

^d : tidak berbeda nyata dari P4 pada $p > 0,05$

Tabel 5.5 Kelainan *neural tube* fetus mencit dengan perlakuan kontrol; 2-ME; asam folat dan 2-ME + asam folat UK 09:05

No	Perlakuan	Jumlah Induk	Jumlah <i>neural tube</i> Terbuka	Persentase <i>neural tube</i> Terbuka (%)
1	Kontrol (P-1)	5	0 ^c	0 ^c
2	2-ME (P-2)	5	12 ^d	85 ^d
3	Asam folat (P-3)	5	0 ^a	0 ^a
4	2-ME+Asam folat (P-4)	5	9 ^b	49.66 ^c

Keterangan : ^a : tidak berbeda nyata dari P1 pada $p > 0,05$

^b : tidak berbeda nyata dari P2 pada $p > 0,05$

^c : tidak berbeda nyata dari P3 pada $p > 0,05$

^d : tidak berbeda nyata dari P4 pada $p > 0,05$

Hasil analisis varians satu jalur rata-rata berat badan induk setelah pemberian 2-ME dosis 7.5 mmol/kg BB pada UK 09:05 dapat dilihat pada Lampiran 8. Hasil uji *post hoc* LSD, menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata berat badan induk mencit yang signifikan (berbeda nyata) diantara uk 9.11 dengan $p < 0.05$. Pemberian asam folat dosis 2 mg/kg BB juga menunjukkan peningkatan rata-rata berat badan induk yang signifikan dengan $p < 0.05$ pada kelompok perlakuan.

Hasil uji BNT yang disajikan pada lampiran 5 terlihat bahwa rata-rata berat badan induk antara kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (berbeda nyata) pada $\alpha = 0.05$. Kelompok perlakuan P-2 (2-ME) menunjukkan penurunan rata-rata berat badan induk yang signifikan (berbeda nyata) $p < 0.05$ dengan semua kelompok perlakuan. Selanjutnya perlakuan P-4 (2-ME+asam folat) juga terjadi penurunan rata-rata berat badan induk yang signifikan (berbeda nyata) $p < 0.05$ dengan semua kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan P-3 (asam folat) menunjukkan peningkatan rata-rata berat badan induk yang signifikan (berbeda nyata) $p < 0.05$ dengan kelompok perlakuan P-2 (2-ME) dan P-4 (2-ME+asam folat). Kelompok perlakuan P-1 (kontrol) menunjukkan rata-rata berat badan induk yang bermakna (berbeda nyata) $p < 0.05$ dengan kelompok perlakuan P-2 (2-ME) dan P-4 (2-ME+asam folat).

Hal yang berbeda terjadi pada kelompok perlakuan P-1 (kontrol) dan P-3 (asam folat) menunjukkan tidak berbeda nyata ($p > 0.05$). Hasil yang sama juga diperlihatkan pada kelompok perlakuan P-2 (2-ME) dan P-4 (2-ME+asam folat) terjadi rata-rata berat badan yang tidak signifikan (tidak berbeda nyata). Hasil tersebut dapat dilihat dalam tabel 5.3 dan gambar 5.9



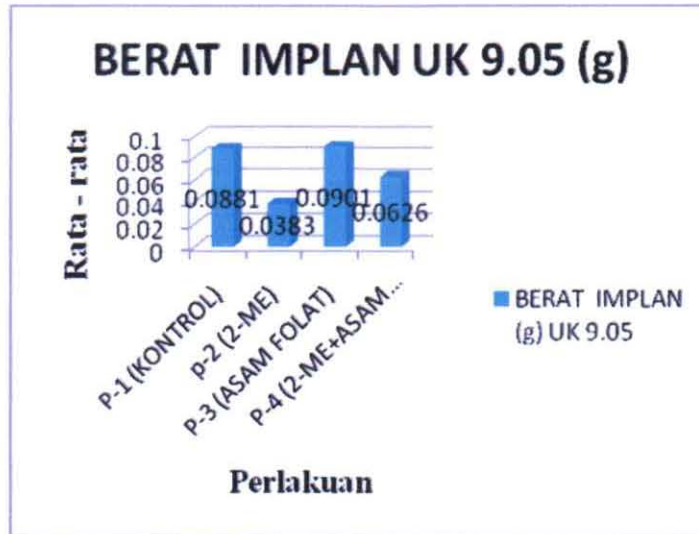
Gambar 5.9 Grafik histogram rata-rata berat badan induk mencit UK 09:05 (g)

Pemberian 2-ME dosis 7.5 mmol/kg BB pada UK 09:05 juga menyebabkan penurunan terhadap rata-rata berat implan. Hasil rata-rata tersebut dapat dilihat pada tabel 5.2 dan Gambar 5.6.

Hasil analisis varians satu jalur penurunan rata-rata berat implan mencit setelah pemberian 2-ME dosis 7.5 mmol/kg BB pada 9.05 dapat dilihat pada Lampiran 9. Hasil uji post hoc LSD, menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata berat implan yang signifikan (berbeda nyata) dengan $p < 0.05$. Hasil uji BNT yang disajikan pada lampiran 5 terlihat bahwa rata-rata berat implan antara kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (berbeda nyata) pada $\alpha = 0.05$. Kelompok perlakuan P-2 (2-ME) dan P-4 (2-ME+asam folat) menunjukkan bahwa terdapat penurunan rata-rata berat implan yang signifikan (berbeda nyata) dengan $p < 0.05$ terhadap semua perlakuan.

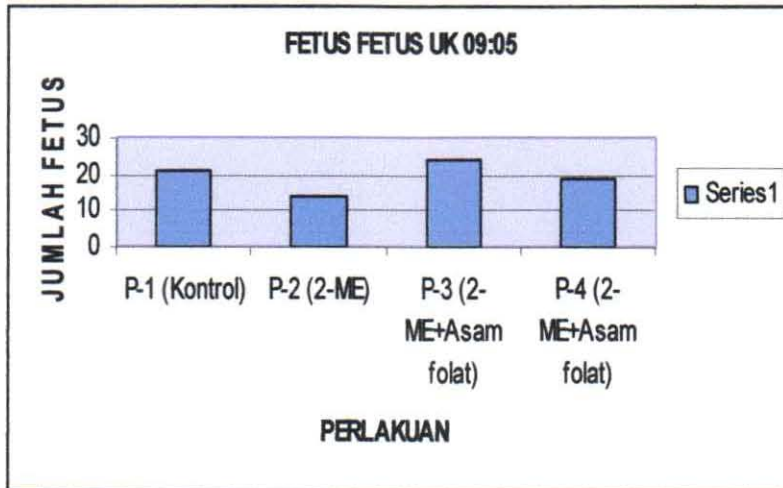
Kelompok perlakuan P-3 (asam folat) menunjukkan peningkatan rata-rata berat implan signifikan (berbeda nyata) dengan $p < 0.05$ dengan kelompok perlakuan P-2 (2-ME) dan P-4 (2-ME+asam folat). Hal yang berbeda ditunjukkan pada kelompok perlakuan P-3 (asam folat) yang mengalami rata-rata berat implan tidak signifikan

dengan perlakuan P-1 (kontrol). Hasil ini menunjukkan bahwa peningkatan rata-rata berat badan implan pada perlakuan P-3 (asam folat) tidak memberikan pengaruh terhadap P-1 (kontrol).



Gambar 5.10 Grafik histogram berat implan mencit UK 09:05

Hasil analisis varians satu jalur jumlah fetus mencit setelah pemberian 2-ME dosis 7.5 mmol/kg BB dan asam folat dosis 2 mg/kg BB pada UK 09:05 dapat dilihat pada Lampiran 10. Hasil uji post hoc LSD, menunjukkan bahwa terdapat perbedaan penurunan jumlah fetus yang signifikan (berbeda nyata) UK 09:05 dengan $p < 0.05$. Hasil jumlah fetus mencit dapat dilihat dalam tabel 5.2. dan Gambar 5.7.



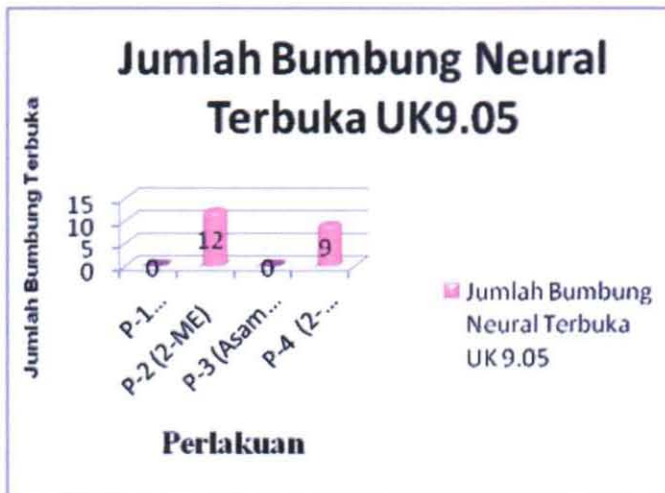
Gambar 5.11 Grafik garis jumlah fetus mencit UK 09:05

Hasil uji BNT yang disajikan pada lampiran 10 terlihat bahwa jumlah fetus antara kelompok perlakuan UK 09:05 menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (berbeda nyata) pada $\alpha = 0.05$. Kelompok perlakuan P-2 (2-ME) menunjukkan penurunan jumlah fetus yang signifikan (berbeda nyata) $p < 0.05$ dengan semua kelompok perlakuan, kecuali pada P-4 (2-ME+asam folat). Kelompok perlakuan P-3 (asam folat) menunjukkan peningkatan jumlah fetus yang signifikan (berbeda nyata) $p < 0.05$ dengan kelompok perlakuan P-2 (2-ME) dan P-4 (2-ME+asam folat).

Jumlah fetus tidak signifikan (berbeda nyata) $p > 0.05$ ditemui pada kelompok P-2 (2-ME) dan P-4 (2-ME+asam folat), serta P-1 (kontrol) dengan P-3 (asam folat) dan P-4 (2-ME+asam folat).

5.5.2 Kelainan neural tube fetus mencit setelah pemberian 2-ME, asam folat dan 2-ME + asam folat UK 09:05

Kelainan neural tube fetus mencit pada penelitian ini dicerminkan melalui insiden jumlah neural tube terbuka dan persentase insiden neural tube terbuka. Pemberian 2-ME dosis 7.5 mmol/kg BB pada umur kebuntingan (uk) 9.05 hari dalam penelitian ini secara umum menyebabkan neural tube terbuka selama kebuntingan. Hasil tersebut dapat dilihat dalam tabel 5.3; Gambar 5.8 dan 5.9.



Gambar 5.12 Grafik histogram jumlah neural tube terbuka pada fetus UK 09:05

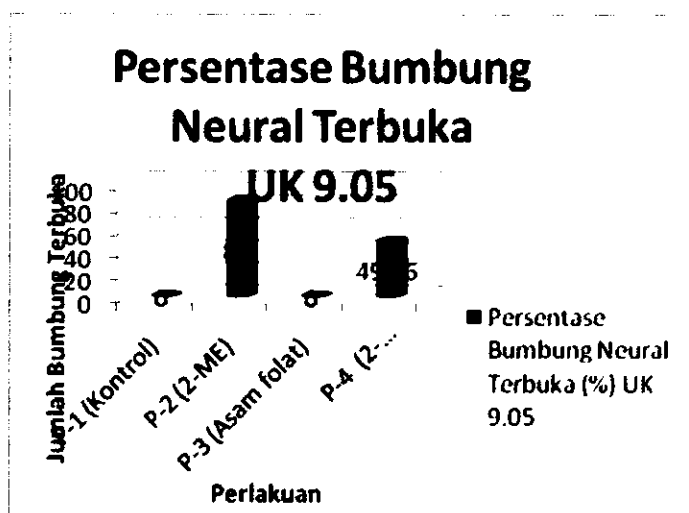
Hasil uji Kruskal Wallis membuktikan bahwa pengaruh pemberian 2-ME menunjukkan adanya kelainan neural tube terbuka yang berbeda secara nyata ($P < 0.05$) diantara kelompok perlakuan. Dari hasil uji Kruskal Wallis tersebut kemudian dilanjutkan uji dua sampel *independent* Mann Whitney untuk mengetahui dua kelompok perlakuan yang berbeda. Hasil uji Kruskal Wallis dan Man Whitney mengenai jumlah neural tube terbuka.

Perlakuan P-3 (asam folat) menunjukkan jumlah *neural tube* signifikan atau berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan perlakuan P-2 (2-ME) dan P-4 (2-ME+asam folat). Hasil berbeda ditemukan pada perlakuan P-3 (asam folat) dengan P-1 (kontrol) yang menunjukkan jumlah *neural tube* tidak berbeda nyata ($P > 0.05$). Perlakuan P-2 (2-ME) menunjukkan jumlah *neural tube* signifikan atau berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan perlakuan P-1 (kontrol) dan P-3 (asam folat). Hasil berbeda ditemukan pada perlakuan P-2 (2-ME) dengan P-4 (2-ME+asam folat) yang menunjukkan jumlah *neural tube* tidak berbeda nyata ($P > 0.05$).

Berdasarkan hasil analisis Kruskal Wallis persentase *neural tube* setelah pemberian induksi 2-ME dosis 7.5 mmol/kg BB menunjukkan bahwa terdapat perbedaan persentase *neural tube* terbuka yang signifikan pada UK 09:05 dengan $P < 0.05$. Langkah selanjutnya dilanjutkan uji dua sampel Mann Whitney untuk mengetahui dua kelompok perlakuan yang berbeda. Hasil uji Mann Whitney menunjukkan bahwa perlakuan P-2 (2-ME) menunjukkan persentase *neural tube* signifikan atau berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan perlakuan P-1 (kontrol) dan P-3 (asam folat). Hasil berbeda ditemukan pada perlakuan P-2 (2-ME) dengan P-4 (2-ME+asam folat) yang menunjukkan jumlah *neural tube* tidak berbeda nyata ($P > 0.05$).

Perlakuan P-3 (asam folat) menunjukkan jumlah *neural tube* signifikan atau berbeda nyata ($P < 0.05$) dengan perlakuan P-2 (2-ME) dan P-4 (2-ME+asam folat). Hasil berbeda ditemukan pada perlakuan P-3 (asam folat) dengan P-1 (kontrol) yang menunjukkan jumlah *neural tube* tidak berbeda nyata ($P > 0.05$). Hasil uji Kruskal Wallis dan Man Whitney terhadap persentase *neural tube* terbuka.

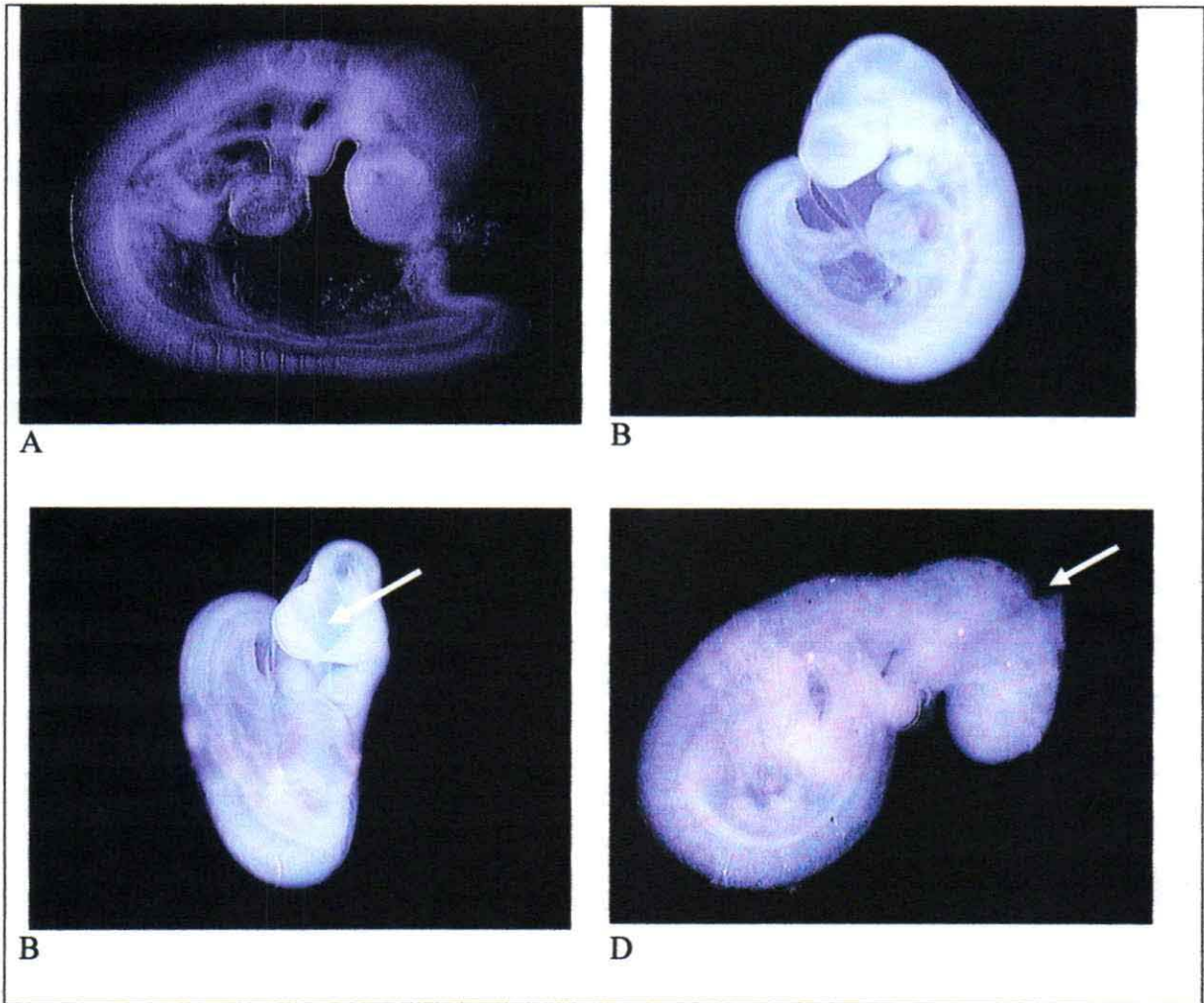
Persentase neural tube yang terbuka dipengaruhi oleh berapa jumlah neural tube yang terbuka, sehingga diantara dua variabel ini memiliki hubungan yang signifikan. Jika jumlah neural tube yang terbuka banyak maka kadar persentase kelainan neural tube terbuka juga besar. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yaitu pada perlakuan P-2 memiliki 12 jumlah neural tube terbuka, sedangkan pada perlakuan P-4 hanya 9. Hasil persentase pada perlakuan P-2 menunjukkan hasil terbesar yaitu 85% sedangkan P-4 hanya 49.66%.



Gambar 5.13 Grafik histogram persentase *neural tube* terbuka pada fetus UK 09:05

Morfologi Fetus Mencit

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi fetus mencit yang dibedah dari induknya saat pemberian 2-ME dosis 7.5 mmol/kg BB pada umur kebuntingan 9.05 hari menyebabkan kelainan neural tube yaitu eksensefali. Eksensefali ditandai dengan membukanya neural tube. Berbagai bentuk eksensefali dapat dilihat pada gambar 5.10 – 5.13.



Gambar 5.14. Kondisi perkembangan embrio saat penutupan *neural tube* UK 9,5 hari; A: P1 (kontrol); B: P2 (-ME); C: P3 (asam folat); D: P4 (2-ME + Asam Folat) Keterangan : tanda panah *neural tube* yang terbuka.

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi, fetus dengan perlakuan 2-ME (P-2) pada UK 09:05 mengalami keterlambatan penutupan *neural tube* yang ditandai dengan tanda panah menunjukkan lubang pada *neural tube* yang belum menutup. Lubang tersebut adalah bagian *neuropore* anterior membuka, tetapi pada bagian dorsal tidak membuka. Hasil berbeda tampak pada kelompok P-1 (kontrol) yang mengalami penutupan *neural tube*.

Efek pemberian asam folat 2 mg/kg BB secara intraperitoneal kepada induk mencit UK 09:05 yang telah terinduksi 2-ME terhadap penurunan angka insiden tidak terdapat perbedaan secara nyata pada semua kelompok perlakuan ($P > 0.05$), walaupun terdapat kecenderungan penurunan persentase angka insiden eksensefali akibat pemberian 2-ME bila dikombinasikan dengan asam folat.

5.6 Pengamatan Potensi Asam Folat Yang Diamati Pada Fetus Umur Kebuntingan 18 Hari

Data pengamatan meliputi kemampuan reproduksi induk dan insiden eksensefali pada fetus. Kemampuan reproduksi tersebut antara lain berat badan fetus, jumlah implantasi, kematian intrauterin, jumlah fetus hidup dan kelainan eksternal. Rekapitulasi kemampuan reproduksi tercantum pada tabel 5.6.

Tabel 5.6. Rekapitulasi kemampuan reproduksi induk

kemampuan reproduksi	^x Berat Badan Fetus (g)	^x Jumlah Implantasi	^x % Kematian intrauterin	^x % Fetus Hidup	^x % Kelainan Eksternal
Kontrol	1,314	10,2	0	100	0
2-ME	1,194	7 ^α	27,7 ^a	77,2 ^a	26,91 ^a
2-ME + asam folat 0,5 mg/kg berat badan	—	6,8 ^α	100 ^{ab}	0 ^{ab}	0 ^b
2-ME + asam folat 1,5 mg/kg berat badan	1,239	8,2	9,7	90,24	5,4
2-ME + asam folat 2 mg/kg berat badan	0,848 ^{αβ}	5,8 ^α	62,06 ^a	41,37 ^a	16,66

^a berbeda secara nyata jika dibandingkan dengan kontrol $\alpha > 0,05$ dengan menggunakan uji Mann Whitney

^b berbeda secara nyata jika dibandingkan dengan 2-ME $\alpha > 0,05$ dengan menggunakan uji Mann Whitney

^α berbeda secara nyata jika dibandingkan dengan kontrol $\alpha > 0,05$ dengan menggunakan uji ANOVA

^β berbeda secara nyata jika dibandingkan dengan 2-ME $\alpha > 0,05$ dengan menggunakan uji ANOVA

Berat badan fetus dari kelompok perlakuan 2-ME cenderung mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kontrol, tetapi setelah diuji secara statistik, berat badan fetus dari perlakuan 2-ME tidak menunjukkan hasil yang berbeda nyata bila

dibandingkan dengan kontrol. Pemberian asam folat dosis 1,5 mg/kg berat badan saat umur kebuntingan (uk) 0, 3 dan 8 hari mampu mempertahankan berat badan fetus dari induk yang telah diinduksi 2-ME pada uk 8 hari. Hal ini dibuktikan melalui uji Mann Whitney, yang menunjukkan bahwa pemberian asam folat dosis 1,5 mg/kg berat badan yang dikombinasi dengan 2-ME memberikan hasil yang tidak berbeda nyata dengan kontrol. Selain itu berat badan fetus dari kelompok perlakuan tersebut lebih tinggi daripada perlakuan 2-ME yang dikombinasi dengan asam folat dosis yang lain.

Rata-rata jumlah implantasi kelompok kontrol sebesar 10,2. Pemberian perlakuan asam folat dosis 1,5 mg/kg berat badan yang dikombinasi dengan 2-ME menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dibanding dengan kontrol dan cenderung mengalami peningkatan dibandingkan dengan perlakuan yang lain.

Fetus yang mati selama masa perkembangannya akan diresorpsi oleh induknya. Rata-rata persentase kematian intrauterin kelompok perlakuan asam folat dengan dosis 0,5 mg/kg berat badan yang dikombinasi dengan 2-ME sebesar 100 %. Hal tersebut berbeda nyata jika dibandingkan dengan kontrol dan perlakuan 2-ME. Rata-rata kematian intrauterin dari kelompok kontrol sebesar 0 % dan perlakuan 2-ME sebesar 27,7 %. Perlakuan asam folat dosis 1,5 mg/kg berat badan yang dikombinasi dengan 2-ME cenderung menurunkan insiden kematian intrauterin jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain.

Rata-rata persentase fetus hidup pada kelompok perlakuan 2-ME, kombinasi asam folat dosis 0,5 mg/kg berat badan dan 2-ME, kombinasi asam folat dosis 2 mg/kg berat badan dan 2-ME menunjukkan hasil yang berbeda nyata jika dibandingkan dengan kontrol. Perlakuan asam folat dengan dosis 1,5 mg/kg berat badan yang dikombinasi

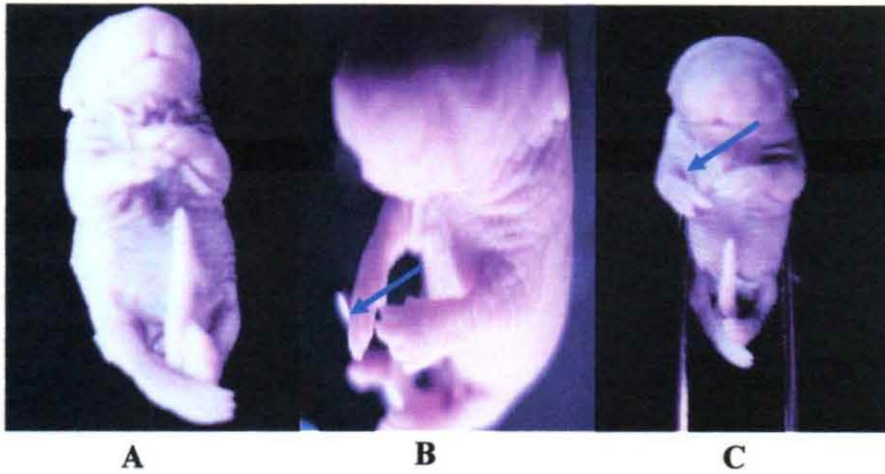
dengan 2-ME cenderung mampu meningkatkan rata-rata persentase fetus hidup jika dibandingkan dengan perlakuan 2-ME.

Kelainan eksternal yang muncul pada penelitian ini meliputi kelainan ekstremitas, kepala dan ekor. Tabel 5.5 menunjukkan jenis dan persentase kelainan eksternal fetus.

Tabel 5.7. Jenis dan persentase fetus yang mengalami kelainan

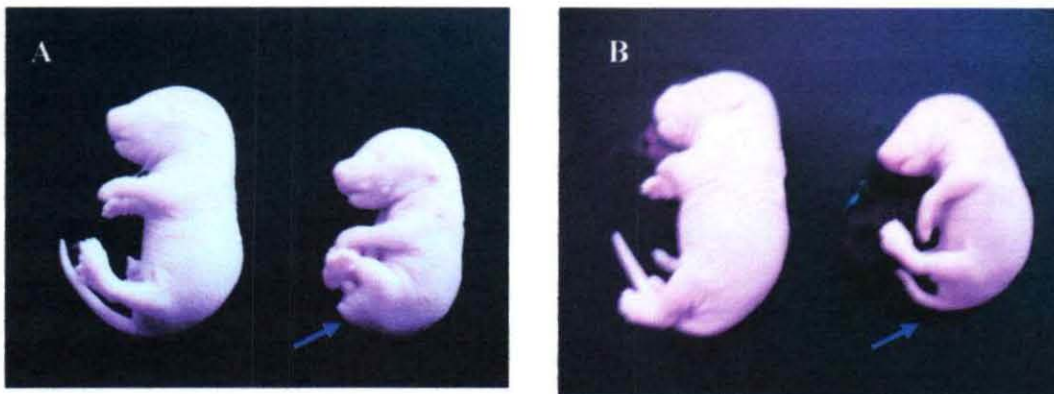
Perlakuan	Kelainan	Persentase
Kontrol	0	0
2-ME	eksensefali	15,38 %
	hematoma	7,69 %
	<i>cheiloschizis</i>	3,84 %
2-ME + asam folat 0,5 mg/kg berat badan	-	-
2-ME + asam folat 1,5 mg/kg berat badan	Sindaktili	2,7 %
	Brakhidaktili	2,7 %
2-ME + asam folat 2 mg/kg berat badan	Agenesis ekor	8,33 %
	<i>Kinky tail</i>	8,33 %

Kelompok kontrol tidak ditemukan adanya kelainan eksternal. Persentase kelainan eksternal paling tinggi terdapat pada induk yang diberi perlakuan 2-ME pada uk 8 hari. Jenis kelainan yang ditemukan antara lain 15,38 % fetus mengalami eksensefali, 7,69 % mengalami hematoma dan 3,84 % mengalami *cheiloschizis*.



Gambar 5.12 Kelainan fetus akibat induksi asam folat 1,5 mg/kg berat badan yang dikombinasikan dengan 2-ME. A. Normal; B. Sindaktili; C. Brakhidaktili

Kelainan fetus yang lain juga ditemukan dari induk yang disuntik asam folat dosis 2 mg/kg berat badan diikuti pemberian 2-ME. Pada perlakuan tersebut muncul agenesis ekor dan *kinky tail* masing-masing sebesar 8,33 %. Gambar 5.16 menunjukkan insiden kelainan agenesis ekor dan *kinky tail*



Gambar 5.13 Kelainan fetus akibat induksi asam folat dosis 2 mg/kg berat badan yang dikombinasi dengan 2-ME. A. Agenesis ekor; B. *Kinky tail*

Insiden kelainan eksternal kelompok perlakuan 2-ME memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan kontrol. Kelompok perlakuan asam folat dosis 1,5 dan 2 mg/kg berat badan yang dikombinasi dengan 2-ME tidak menunjukkan hasil yang berbeda nyata jika dibandingkan dengan kontrol. Perlakuan asam folat dosis 0,5 mg/kg berat badan yang dikombinasi dengan 2-ME menunjukkan hasil yang berbeda nyata jika dibandingkan dengan 2-ME. Insiden eksensefali hanya ditemukan pada induk yang diberi perlakuan 2-ME dengan dosis 7,5 mmol/kg berat badan pada uk 8 hari.

5.6 Potensi Teofilin Dalam Menurunkan Angka Insiden Kelainan Akibat Induksi 2-ME

Efek pemberian teofilin kepada induk mencit yang telah terinduksi 2-ME terhadap penurunan angka insiden tidak terdapat perbedaan secara nyata pada semua kelompok. Kemampuan reproduksi mencit akibat pemberian 2-ME dan teofilin ditampilkan dalam tabel 4.2. Uji *One-Way Anova* menunjukkan adanya perbedaan secara nyata rata-rata berat badan fetus, kemudian dilanjutkan dengan uji BNT untuk mengetahui 2 kelompok perlakuan yang mengalami perbedaan. Perlakuan 2-ME tidak terdapat perbedaan rata-rata berat badan yang berarti apabila dibandingkan dengan kontrol. Kelompok perlakuan 2-ME yang dikombinasikan dengan teofilin dosis 10 dan 20 mg/ kg BB tidak terdapat perbedaan rata-rata berat badan secara nyata apabila dibandingkan dengan perlakuan 2-ME, sedangkan perlakuan 2-ME yang kombinasikan dengan teofilin dosis 30 mg / kg BB terdapat perbedaan rata-rata berat badan secara nyata apabila dibandingkan dengan perlakuan 2-ME.

perlakuan ($P>0.05$). Namun, terdapat kecenderungan penurunan persentase angka insiden eksensefali akibat pemberian 2-ME bila dikombinasikan dengan teofilin dosis 20 dan 30 mg/kg BB.

Tabel 5.8 Persentase angka insiden eksensefali pada mencit (*Mus musculus L.*) pada umur kebuntingan 18 hari

Kelompok Hewan Percobaan	% Eksensefali
Kontrol	0
2-ME	7,5
2-ME + Teofilin 10 mg/kg BB	20
2-ME + Teofilin 20 mg/kg BB	6,8
2-ME + Teofilin 30 mg/kg BB	0

Kematian intrauterus adalah jumlah total rata-rata kematian fetus dan embrio yang diresorpsi. Efek pemberian 2-ME yang dikombinasikan dengan teofilin terhadap kematian intrauterus dengan uji *Kruskal Wallis* menunjukkan perbedaan secara nyata ($P<0.05$). Uji 2 sampel independen *Man Whitney U* menunjukkan perbedaan tersebut terdapat pada perlakuan 2 ME dan 2-ME kombinasi teofilin dosis 10 dan 30 mg/kg BB bila dibandingkan dengan kontrol. Namun, tidak terdapat perbedaan yang berarti efek perlakuan 2-ME kombinasi teofilin dosis 10, 20 dan 30 mg/kg BB bila dibandingkan dengan perlakuan 2-ME.

Tabel 5.9 Penampilan reproduksi induk mencit (*Mus musculus L.*)

Prk	Σ induk	Σ fetus hidup	\bar{x} Jumlah implantasi per induk $\bar{x} \pm SD$	Kematian intrauterus			\bar{x} Berat badan fetus $\bar{x} \pm SD$	Kelainan perkembangan (%)
				Embrio resorpsi (%)	Fetus mati (%)	Total (%)		
K	5	52	10,4 \pm 0,894	0	0	0	1,31 \pm 0,909	0
P1	5	31	8,2 \pm 1,923	29,612	5	34,612 ^a	1,194 \pm 0,241	42 ^a
P2	5	31	7,6 \pm 2,073	31,642	11,85	43,492 ^a	1,024 \pm 0,145 ^a	25 ^a
P3	5	31	7,8 \pm 2,049	7,5	10	17,5	1,082 \pm 0,144 ^a	11,97
P4	5	19	6,6 \pm 1,40	39,730	5,77	45,5 ^a	0,956 \pm 0,153 ^{ab}	0 ^{bc}

Keterangan : K : kontrol ; P1 : perlakuan 2-ME; P2 : perlakuan 2-ME + teofilin 10 mg/kg BB; P3 : perlakuan 2-ME + teofilin 20 mg/kg BB; P4 : perlakuan 2-ME + teofilin 30 mg/kg BB; Prk : perlakuan

^a : Berbeda nyata dari kontrol pada $p < 0,05$

^b : Berbeda nyata dari P1 pada $p < 0,05$

^c : Berbeda nyata dari P2 pada $p < 0,05$

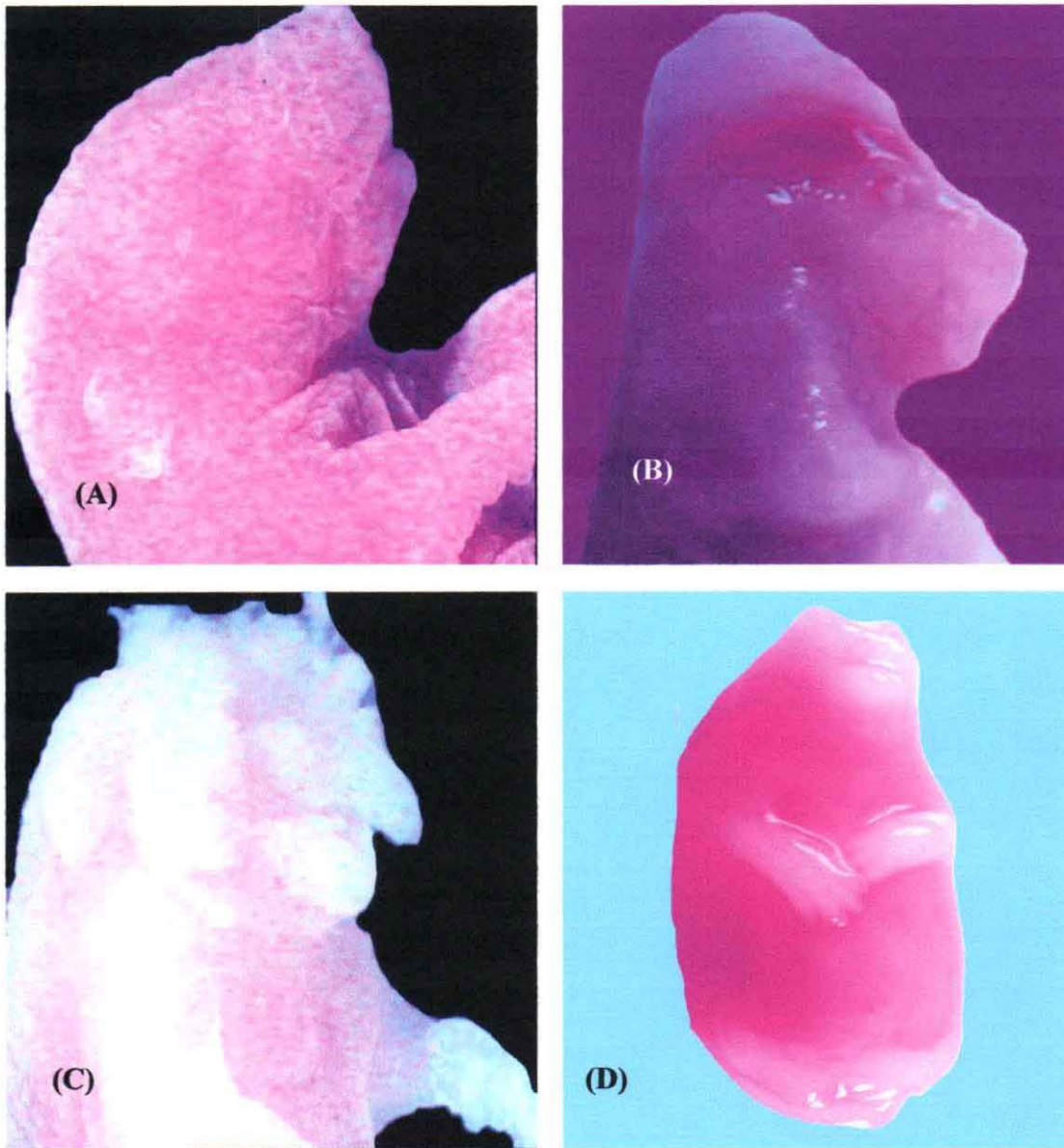
Bentuk dan persentase kelainan perkembangan tercantum dalam tabel 5.7 Hasil uji *Kruskal Wallis* menunjukkan adanya perbedaan kelainan perkembangan secara nyata ($P < 0.05$). Uji 2 sampel independen *Man Whitney U* menunjukkan bahwa perbedaan kelainan perkembangan terdapat pada perlakuan 2-ME dan 2-ME yang dikombinasikan teofilin dosis 10 mg/kg BB bila dibandingkan dengan kontrol. Perlakuan 2-ME kombinasi teofilin dosis 20 kg BB tidak ada perbedaan kelainan perkembangan secara nyata ($P > 0.05$) bila dibandingkan kelompok kontrol dan 2-ME. Pada perlakuan 2-ME

yang dikombinasikan dengan teofilin 30 mg/kg BB terdapat perbedaan secara nyata apabila dibandingkan dengan 2-ME.

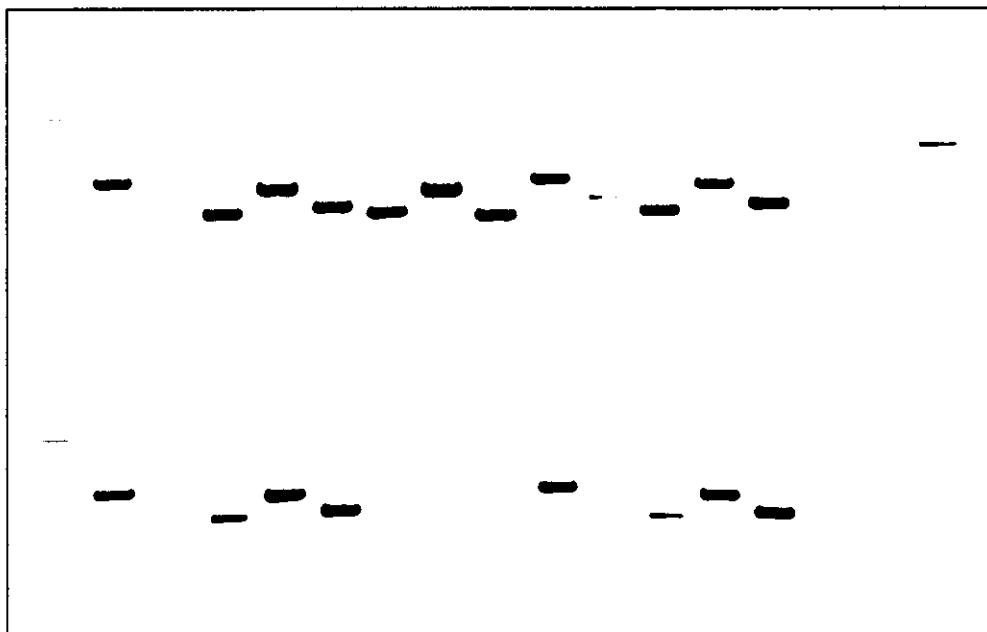
Beberapa kelainan perkembangan yang muncul akibat pemberian kombinasi 2-ME dengan teofilin antara lain hematoma, eksensefali, *cheilochizis*, *palatoschisis*, *Craniofacial*, makroglosus, *open eyelid* dll. Kelainan perkembangan dengan persentase insiden paling tinggi yaitu eksensefali dan *Cheilochizis*.

Tabel 5.10 Jenis kelainan perkembangan pada mencit (*Mus musculus* L.) akibat pemberian 2-ME dan teofilin.

Perlakuan	Jenis kelainan perkembangan						
	Eksensefali (%)	Hematoma (%)	<i>Cheilochizis</i> (%)	<i>Palatoschisis</i> (%)	Makroglosus (%)	<i>Open eyelid</i> (%)	<i>Craniofacial</i> (%)
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0
2-ME	7,5	4	20	0	0	2,5	0
2-ME + TEO 10	20	0	0	10	10	15	10
2-ME + TEO 20	6,8	0	2	3,33	0	2	0
2-ME + TEO 30	0	0	0	0	0	0	0



Gambar 5.14. Kelainan perkembangan akibat pemberian kombinasi teofilin dan 2-ME, A. Kontrol B. Eksensefali pada perlakuan 2-ME C. *Craniofacia* pada perlakuan 2-ME kombinasi teofilin 10 mg/kg BB D. Makroglosus, Hematoma pada perlakuan 2-ME kombinasi teofilin 10 mg/kg BB



Gambar : Uji jenis DNA penyandi protein yang diperlukan dalam perkembangan otak : Lane 1-9 : GAPDH, Fibronektin, Vimentin, Tenascin, NCAM, Neurofilament h, Neu m, Neu L.

5.5. PEMBAHASAN

Kondisi induk mencit dan keadaan fetusnya setelah pemberian 2-ME, asam folat dan 2-ME + Asam folat UK 09:05

Kondisi induk mencit ditandai dengan penambahan berat badan induk, jumlah fetus dan berat implan. Pemberian 2-ME dosis 7.5 mmol/kg BB pada UK 09:05 dalam penelitian ini umumnya menyebabkan penurunan rata-rata berat badan, berat implan dan jumlah fetus berbeda nyata pada $p < 0.05$. Hal ini membuktikan bahwa 2-ME dosis 7.5 mmol/kg BB bersifat toksik bila diberikan mencit bunting. Toksisitas senyawa 2-ME menyebabkan gangguan pada kecepatan pertumbuhan fetus. Gangguan pertumbuhan ini dapat diakibatkan oleh banyak faktor salah satunya yaitu kematian sel dan sintesis protein yang diperlukan dalam perkembangan fetus terganggu yang sehingga dapat mengganggu kecepatan metabolisme dan perkembangan fetus. Hal ini sesuai dengan pengamatan Johanson (2000) menyebutkan bahwa senyawa 2-ME dapat menyebabkan gangguan kecepatan metabolisme pada mencit.

Hasil rata-rata berat badan induk mencit pada perlakuan P-4 (2-ME + asam folat) lebih tinggi dari perlakuan P-2 (2-ME). Perbedaan berat badan induk ini diakibatkan pada perlakuan P-4 terdapat perlakuan kombinasi 2-ME dengan asam folat. Asam folat diduga membantu memperbaiki efek toksik yang dikeluarkan oleh 2-ME. Bahan toksik dari 2-ME dapat mengganggu metabolisme tubuh induk mencit sehingga menyebabkan induk menjadi kurang nafsu makan sehingga berat badan tubuh induk menjadi tidak optimal.

Pemberian asam folat dosis 2 mg/kg BB menunjukkan terjadinya peningkatan berat badan induk secara bermakna. Asam folat termasuk dalam kelompok vitamin B kompleks yang memiliki fungsi menambah nafsu makan bagi yang mengkonsumsinya, sehingga terjadi peningkatan nafsu makan pada induk mencit dan mengakibatkan

penambahan berat badan induk. Pada penelitian ini kelompok perlakuan P-3 (asam folat) menunjukkan peningkatan tertinggi berat badan induk, berat implan dan jumlah fetus secara bermakna pada semua kelompok perlakuan.

Pemberian 2-ME pada induk mencit ternyata tidak memberikan pengaruh yang berbeda secara nyata terhadap kondisi induk secara keseluruhan pada perlakuan kombinasi 2-ME dengan asam folat. Hal ini menunjukkan bahwa mekanisme kerja asam folat dalam menghambat kelainan *neural tube* perlu studi lebih lengkap.

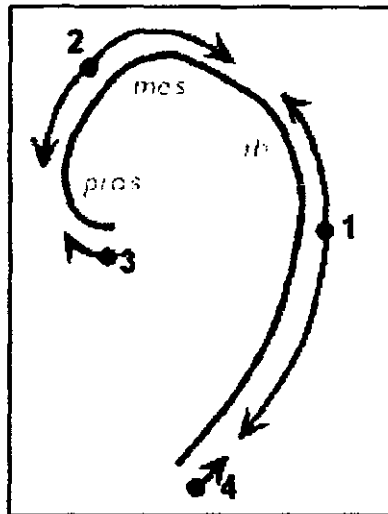
Kelainan *neural tube* fetus mencit setelah pemberian 2-ME, asam folat dan 2-ME + asam folat UK 09:05

Kelainan *neural tube* fetus mencit berupa jumlah *neural tube* yang terbuka dan insiden rata-rata persentase *neural tube* yang terbuka telah diamati pada empat kelompok perlakuan pada UK 09:05 hari. Pengamatan pada kelainan perkembangan *neural tube* yang terbuka ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh 2-ME pada kelainan eksensefali yang ditandai dengan keterlambatan penutupan *neural tube* saat proses neurulasi terjadi pada fetus mencit.

Proses penutupan *neural tube* pada beberapa jenis spesies diawali dari tempat yang berbeda-beda di sepanjang calon *neural tube*. Pada manusia penutupan *neural tube* terjadi pada minggu keempat kehamilan dan dimulai pada bagian *caudal rhombencephalon* atau pada bagian kranial *spinal cord* (Melvin *et al.*, 2000; Dias and Partington, 2004; Nakatsu and Shiota, 2000). Semula diduga penutupan *neural tube* seperti proses penutupan *neural tube* berjalan linier dari anterior ke posterior atau sebaliknya seperti *ritsluiting*, namun belakangan diketahui bahwa ada empat periode penutupan *neural tube* pada mencit (Dias and Partington, 2004).

Di dalam fetus, *neural tube* terbentuk pada usia kebuntingan 8-10 hari. pembentukan *neural tube* membutuhkan beberapa peristiwa morfogenetik meliputi elevasi *neural fold*, *neural plate bending* dan *konvergen extention*. *neural tube* terbentuk secara normal apabila kedua jaringan dari *neural fold* berkonvergensi dan berfusi satu sama lain di dorsal *midline*.

Proses pembentukan *neural tube* masih menjadi obyek perdebatan dalam menentukan awal tempat penutupan dan jumlah penutupan *neural fold* sepanjang rostral sampai kaudal. Awalnya fusi *neural fold* digambarkan sebagai titik tunggal penutupan *neural fold* yang berjalan dari rostral sampai akhir caudal *neuropore*. Namun 20 tahun kemudian muncul sebuah hipotesis yang menyatakan bahwa terdapat banyak titik penutupan *neural fold* pada hewan model dan manusia. Terdapat empat titik penutupan yang telah diidentifikasi pada hewan coba, titik penutupan pertama terletak pada daerah servik diantara somit ke III dan IV pada *caudal hindbrain* dan berjalan ke arah rostral menutup *rhombencephalon* kemudian berjalan ke daerah kaudal. Penutupan *neural fold* kedua terjadi pada daerah *prosencephalon-mesencephalon*, sedangkan arah penutupannya berjalan rostrorodorsal. Titik penutupan ke tiga dimulai dari kaudal sampai rostral *neural plate*. Penutupan terakhir terlihat pada daerah kaudal akhir dari *neural plate* menutup sampai bertemu dengan penutupan pertama (Sakai, 1989; Detraid *et al*, 2005).



Gambar 5.15 Skema penutupan *neural fold* pada tikus; *pros*, prosensefalon; *mes*, mesensefalon; *rh*, rhombensefalon (Detraid *et al*, 2005).

Gambaran morfologi (Gambar 5.7) yang diperoleh dari hasil penelitian tampak bahwa perlakuan P-2 yang diberi induksi 2-ME pada UK 09:05, mengalami kegagalan penutupan *neural tube* sehingga daerah kepala fetus menjadi berlubang dan fetus tersebut mengalami eksensefali. Hal ini disebabkan karena keterlambatan penutupan di daerah *neuropore anterior*. Menurut Kaufman (2002), Usia 9 hari fetus mencit memiliki 15 – 20 pasang somite dan *neuropore anterior* dan kaudal mulai terbentuk dan mulai menutup saat jumlah somite sebanyak 30-35 saat usia 9.5 hari. *2-Methoxyethanol* menyebabkan kegagalan penutupan *neuropore anterior* dan keterlambatan penutupan *neural fold* terjadi pada daerah *prosenchephalon-mesenephalon*.

Kelainan *neural tube* dapat disebabkan oleh banyak faktor yaitu faktor intrinsik berupa kelainan genetik maupun karena faktor metabolisme dan faktor ekstrinsik akibat penggunaan obat, terdedah oleh polutan yang bersifat teratogenik di lingkungan atau karena pengaruh temperatur yang tinggi (Melvin *et al.*, 2000; Fleming *et al.*, 2001; Fazel dan Jalali, 2002; Wallingford and Harland, 2002).

Bahan toksik yang berasal dari lingkungan dapat mengganggu proses neurulasi yang berakibat pada gangguan penutupan *neural tube* mempengaruhi proses morfogenetik yang terlibat pada proses neurulasi. Proses morfogenetik tersebut meliputi proses intrinsik yang berkaitan dengan *neural plate* dan proses morfogenetik ekstrinsik yang berasal dari sel disekitar *neural fold*. Sebagai contoh adalah proses pemanjangan *neural plate* yang melalui pengaturan sel, perubahan bentuk sel, pembelahan sel, pertemuan *neural fold* ditengah. Faktor ekstrinsik yang mempengaruhi penutupan *neural tube* adalah gaya tekanan statis pada sel neuroepitelium dari sel epidermis yang berada di sekitar *neural fold* dan induksi dari sel mesoderm yang berada dibawah sel neuroepitelium. Zat toksik yang masuk ke dalam tubuh tersebut dapat menyebabkan kematian sel neuroepitelium (Wallingford *et al.*, 2002; Ambroso *et al.*, 1999; Terry *et al.*, 1996).

Suatu zat yang bersifat toksik atau teratogenik akan menyebabkan terjadinya kelainan perkembangan apabila masuk pada saat masa kritis perkembangan organ. Terpaparnya jaringan yang akan berkembang menjadi calon otak ini oleh bahan toksik akan menyebabkan kegagalan proses neurulasi. Fetus yang mengalami kegagalan neurulasi tidak memiliki *neural tube* yang sempurna, karena calon *neural tube* yang berasal dari *neural plate* yang berupa lempengan kemudian berfusi pada bagian mid dorsal untuk membentuk tabung (Dias and Partington, 2004). Pernyataan di atas sesuai dengan hasil pengamatan morfologi fetus mencit uk 9.11 hari yang diberi bahan teratogen 2-ME UK 09:05 mengalami kelambatan penutupan *neural tube*.

Perlakuan pada penelitian ini mulai diberikan pada umur kebuntingan 9.05 hari karena diduga mulai terjadinya proses akhir penutupan *neural tube*. Hal ini sesuai dengan

Colas and Schoenwolf (2001) menyatakan bahwa pembentukan otak mencit dimulai pada uk 7 hari yang diawali dengan pembentukan *neural plate* (keeping otak), pada uk 08:05-9 hari *neural tube* dan *neurophore* bagian anterior menutup, kemudian uk 9.5 proses akhir penutupan *neural tube* terjadi.

Umur 9.05 hari merupakan masa kritis pembentukan neurulasi pada mencit. Penutupan *neural tube* membentuk bumbung saraf penting bagi perkembangan fetus mencit, karena kegagalan penutupan tersebut menyebabkan kelainan morfologis yang serius bahkan bersifat lethal. Kegagalan penutupan *neural tube* posterior mengakibatkan kelainan *spina bifida*, sedangkan kegagalan penutupan bagian anterior menyebabkan kelainan eksensefali, anencephali dan meningocele (Sakai, 1989; Schoenwolf and Smith, Terry *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996; Lakkis *et al.*, 1999; Melvin *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2002; Prihiyantoro *et al.*, 2002; Gunn *et al.*, 2003; Dias and Partington, 2004). Kegagalan penutupan *neural tube* pada kelainan eksensefali menyebabkan kegagalan pembentukan kranium sehingga menyebabkan jaringan otak yang terbentuk terdedah keluar, namun biasanya pada kelainan eksensefali, jaringan otak tidak terbentuk sempurna karena tidak terjadinya penutupan *neural tube*. Kegagalan penutupan tersebut menyebabkan tidak terjadinya proses neurulasi sekunder yang menghasilkan terbentuknya vesikel otak primer berupa prosencephalon, metencephalon dan rhombencephalon (Colas and Schoenwolf., 2001).

Kerusakan penutupan *neural tube* pada UK 09:05 disebabkan daya toksisitas 2-ME mampu menyebabkan *neural tube* rusak atau membuka kembali sehingga ditemukan jumlah persentase *neural tube* yang terbuka pada kelompok P-2 (2-ME) lebih banyak yaitu 85 % dibandingkan P-4 (2-ME+asam folat) hanya 49.66 %. Fenomena ini dapat

diyakini karena masa pemberian 2-ME terjadi (UK 09:05) merupakan akhir penutupan neural tube. Penutupan *neural tube* diawali pada uk 8 hari dan selesai sempurna penutupannya pada uk 9.5 hari (Rugh, 1968; Kaufman, 1992).

Pada hasil pengamatan morfologi, fetus dengan perlakuan P-2 (2-ME) mengalami keterlambatan penutupan *neural tube* yang ditandai dengan bagian *neuropore* bagian anterior membuka, tetapi pada bagian dorsal tidak membuka. Hal ini disebabkan *neural tube* bagian posterior menutup paling akhir. Proses penutupan neural tube, khususnya pada bagian anterior diawali dengan pembentukan *Dorso Lateral Hinge Point* (DLHP). Kegagalan pembentukan DLHP akan berakibat kegagalan penutupan neural tube.

Untuk terjadinya pembentukan DLHP yang sempurna melalui proses dua morfogenetik yang penting yaitu *cell wedging* dan *neural plate anchoring*. Kedua proses morfogenetik ini dikendalikan oleh protein yang dihasilkan oleh sel neuroepitelium, maupun sel penyusun jaringan mesoderm yang ada disekitar *neural tube* (George *et al.*, 1993; Wallingford and Harland, 2002; van der Put *et al.*, 2001).

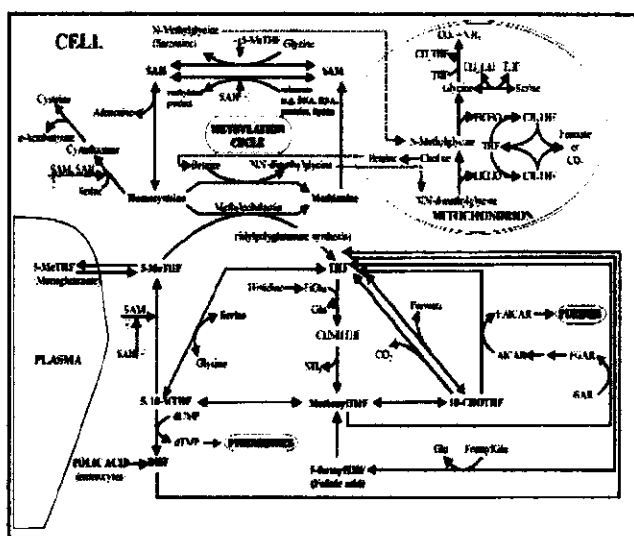
Toksitas akibat masuknya 2-ME ke dalam tubuh disebabkan oleh metabolitnya berupa MAA (*methoxyacetic acid*). MAA dapat menyebabkan kelainan pada anggota, tulang vertebrae dan rusuk (Horton *et al.*, 1985; Darmanto *et al.*, 1994a) serta bersifat fetustoksik baik pada masa organogenesis maupun saat fetus praimplantasi (Darmanto *et al.*, 1994b; Darmanto *et al.*, 1994c). MAA juga menyebabkan terjadinya efek teratologis di dalam tubuh bekerja melalui gangguan pada protein yang berperan pada metabolisme tubuh. MAA mengganggu protein transport, protein sitoskeleton dan reseptor neurotransmitter (Lee *et al.*, 1993). Salah satu jenis protein yang berperan pada proses penutupan *neural tube* pada mamalia adalah protein Shroom yang dikode oleh gen *shrm*.

Protein Shroom bersifat mengikat protein aktin (*aktin-binding protein*) yang membentuk sitoskeleton (Haigo *et al.*, 2003; Hildebrand and Doriano, 1999). Protein Shroom disekresikan pada sel neuroepitelium, khususnya pada sel neuroepitelium yang berada pada tempat pembentukan DLHPs. Terbentuknya DLHPs ini penting untuk penutupan *neural tube* sebab kegagalan pembentukan DLHPs menyebabkan kegagalan penutupan *neural tube* (Haigo *et al.*, 2003).

Keberadaan MAA dalam jaringan fetus menyebabkan terhambatnya sintesis DNA dan RNA. 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 . Radikal bebas ini untuk memperoleh pasangan elektron dari DNA, membran sel, membran lisosom, mitokondria, enzim-enzim, lemak, protein serta komponen jaringan lain. Radikal hidroksil (OH) adalah oksidan yang sangat reaktif dan tidak stabil sehingga 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 (Kurniawati, 2005). Dengan adanya penurunan ketersediaan purin dan pirimidin di dalam jaringan dapat mengganggu proses proliferasi dan diferensiasi sel pada fetus yang aktif melakukan sintesis DNA maupun RNA (Rumanta *et al.*, 2001).

Berdasarkan hasil penelitian juga dibuktikan bahwa asam folat tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pencegahan kerusakan jaringan otak akibat pemberian 2-ME, namun terdapat kecenderungan penurunan persentase angka insiden eksensefali akibat pemberian 2-ME bila dikombinasikan dengan asam folat. Asam folat sering digunakan sebagai bahan antiteratogenik melalui mekanisme mencegah terjadinya

gangguan pada sintesis DNA saat proses neurulasi berlangsung. Fenomena ini dapat dibuktikan melalui perlakuan P-4 (2-ME+asam folat) terjadi penurunan persentase *neural tube* yang terbuka yaitu 49.66 % , P-2 (2-ME) sebesar 85 %, sedangkan pada perlakuan P-3 (asam folat) disemua umur kebuntingan tidak dijumpai kelainan neural tube. Asam folat diperlukan pada perkembangan fetus sebagai faktor pemicu bagi perkembangan zigot ke tahap pre-implantasi fetus. Kekurangan asam folat akan berakibat buruk bagi pertumbuhan dan perkembangan janin seperti menyebabkan gangguan dalam proses migasi, implantasi, fetusgenesis dan organogenesis janin pasca konsepsi. Masalah pokok dalam perkembangan fetus adalah pemerataan pembelahan sel. Dalam masalah ini, asam folat mempunyai posisi sentral yang sangat penting karena peranannya dalam sintesis asam nukleat. Asupan asam folat yang rendah selama kehamilan akan mengganggu pertumbuhan dan replikasi sel dalam fetus dan plasenta. Selama kebuntingan, ketiadaan kadar asam folat dalam bahan pakan berkaitan dengan tingginya resiko persalinan preterm, berat implan yang ringan dan retardasi pertumbuhan fetal.



Gambar 5.16 Siklus metabolisme asam folat (van der Put *et al.*, 2001)

Defisiensi asam folat dapat menyebabkan perubahan metabolik mengarah paling tidak pada tiga masalah, yaitu hiperhomosisteinemia, mutasi genetik dan gangguan sintesis protein, yang ketiganya didasari oleh gangguan dalam siklus metilasi. Hiperhomosisteinemia dapat mengganggu proses fetogenesis bahkan dapat mengakibatkan abortus karena kegagalan proses migrasi dan implantasi fetus, kelahiran preterm, solusio (pelepasan dini) plasenta dan rendahnya berat badan bayi (Margawati, 1999; Johnson, 2000). Sewaktu masa pertumbuhan fetus, sintesis asam nukleat dan protein berada pada posisi puncak dan selama masa ini kebutuhan folat maternal meningkat tajam. Bila folat tidak mencukupi, sintesis asam nukleat terhambat dan sel-sel tidak mampu memfasilitasi DNA untuk mitosis. Terhambatnya siklus metilasi mengakibatkan ketidakmampuan DNA untuk mensintesis protein, lipid dan mielin (Acuna *et al.*, 2002). Hiperhomosisteinemia juga menyebabkan peningkatan radikal bebas oksigen (RBO), kemudian kenaikan peroksidasi lipid, diikuti kerusakan membran sel dan berakhir dengan kematian sel. Sintesis protein dan kerusakan DNA saling

berkaitan dan mempengaruhi, keduanya dapat menimbulkan gangguan dalam sintesis *growth factor* dan akhirnya memicu “kematian sel terprogram dipercepat” yaitu apoptosis yang terjadi lebih awal dan jumlah yang lebih banyak.

Asam folat dalam organisme direduksi menjadi *asam 7,8-dihidrofolat* dengan perantaraan *dihidrofolat-dehidrogenase*. *Asam 7,8-dihidrofolat* oleh *tetrahidrofolat-dehidrogenase* direduksi menjadi *asam 5,6,7,8-tetrahidrofolat* (THF). Bentuk paling dominan dari folat yang beredar adalah *5-methyltetrahydrofolic acid (5-mTHF)*. Vitamin B12 mengkonversi *5-mTHF* menjadi tetrahidrofolat (THF), suatu bentuk metabolik-aktif folat lain yang diperlukan dalam berbagai proses biokimia penting. Senyawa ini muncul sewaktu biosintesis metionin yang dikatalisis oleh enzim metionin-sintetase dan ko-faktor metilkobalamin. Selama pembentukan metionin, enzim metionin-sintetase menggunakan *5mTHF* sebagai sumber gugus metil. Kurangnya produksi THF oleh sel mengakibatkan sel tersebut terhambat dalam mensintesis asam amino purin dan timin untuk replikasi DNA dan terhambat memetabolisme histidin dan serin (Tamura and Picciano, 2006).

Bouwer (1999) mengungkap bahwa kekurangan ko-enzim tetrahidrofolat menyebabkan terlambatnya metilasi homosistein menjadi metionin sehingga dapat menimbulkan hiperhomosisteinemia. Hiperhomosisteinemia dapat mengakibatkan terjadinya cacat kongenital, mempertinggi resiko penyakit kardio-vaskuler, stroke, demensia dan alzheimer. Defisiensi folat menyebabkan gangguan siklus metilasi-enzim yang diikuti dengan hiperhomosisteinemia, kerusakan DNA, gangguan sintesis protein dan penurunan kadar beberapa faktor pertumbuhan. Kesemuanya dapat mengganggu

kondisi homeostatis, yang akhirnya juga melibatkan proses fisiologis apoptosis dan nekrosis. Gangguan itu mengakibatkan terjadinya kondisi yang disebut “kematian sel terprogram yang dipercepat” (*accelerated program cell death*), yang meningkatkan jumlah sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis (Poirier, 2002).

Kenaikan kadar homosistein terdeteksi dalam darah dan cairan amnion para ibu yang mengandung bayi dengan kelainan neural tube. Untuk mengendalikan hiperhomosisteinemi ada beberapa cara antara lain menggunakan *methionine-synthetase* (MS), suatu enzim yang berkaitan dengan vitamin B12, berfungsi mengkatalisasi konversi *5-methyltetrahydrofolate* dan homosistein menjadi metionin dan tetrahidrofolat. Penurunan MTHFR menyebabkan kenaikan kadar homosistein dan mengganggu pasokan donasi gugus metal ke makro molekul lewat siklus folat homosistein. Metaanalisis menyebutkan bahwa varian termolabil dari MTHFR secara bermakna mempunyai korelasi dengan berbagai kasus kelainan *neural tube* (Acuna *et al.*, 2002).

Pulikkunnel and Thomas (2005) mengatakan bahwa pemberian asam folat sebesar 4 mg pada hewan coba mencit mampu menurunkan munculnya kelainan neural tube. Pippenger (2003) dalam penelitiannya berhasil mengurangi 86 persen resiko terjadinya kelainan *neural tube* dengan pemberian asam folat sebesar 360 µg yang diberikan pada hewan coba sebelum masa kebuntingan. Berry *et al.*, (1999) melakukan penelitian pada para wanita di Cina bahwa dengan mengonsumsi asam folat 0,4 miligram sebelum dan awal kehamilan mampu menurunkan kelainan *neural tube* sebesar 85 persen.

Menurut Santoso (2005), ada tiga cara menambah asupan asam folat pada manusia, yaitu dengan : 1) memperbanyak konsumsi bahan pakan alami yang tinggi kandungan asam folat, 2) suplementasi tablet asam folat 3-5 mg/hari dan 3) fortifikasi

asam folat dalam bahan baku pangan (misalnya tepung gandum) dengan takaran 400-600 $\mu\text{g}/\text{hari}$. Dari ketiga cara tersebut, fortifikasi merupakan pilihan paling baik. Kandungan asam folat dalam bahan pangan alami tidak stabil, dipengaruhi oleh proses penyimpanan, cara memasak dan menyajikan. Suplementasi dengan tablet zat sintetik asam folat bersifat lebih stabil dan efektif, tetapi dari segi strategi kurang menguntungkan karena *compliance* (ketaatan) masyarakat yang rendah.

McNulty *et al.* (2000); Kongins *et al.* (2001) serta Quinlivan dan Gegory (2003) menganjurkan fortifikasi asam folat dalam tepung gandum sebagai pilihan utama penambah asupan asam folat bagi penduduk dalam upaya pencegahan cacat bawaan kelainan neural tube. Program fortifikasi asam folat di Indonesia, bila disetujui menurut Santoso (2005) sebaiknya menggunakan garam dapur karena bahan pangan ini sehari-hari dikonsumsi oleh masyarakat luas.

Dengan demikian tidak seluruh hipotesis penelitian ini secara umum dapat dibuktikan. Data penelitian menunjukkan bahwa asam folat 2 mg/kg BB kurang membantu dalam mempertahankan kondisi induk mencit bunting yang terkontaminasi 2-ME 7.5 mmol/kg BB. Asam folat juga tidak mampu menurunkan rata-rata angka insiden eksensefali akibat induksi 2-ME. Hasil penelitian ini dapat menambah kejelasan tentang terjadinya eksensefali, dikaitkan dengan korelasi induksi 2-ME dan asam folat. Secara ekstrapolatif dapat dikatakan bahwa defisiensi asam folat dapat menyebabkan terjadinya eksensefali.

Peran Asam Folat Dalam Menurunkan Insiden Kelainan Pada Fetus Umur Kehamilan 18 Hari

Berdasarkan data yang ada, pemberian asam folat sebesar 1,5 mg/kg berat badan yang dikombinasikan dengan 2-ME lebih mampu meningkatkan dan mempertahankan berat badan fetus daripada perlakuan yang lain. Kemampuan untuk mempertahankan dan meningkatkan berat badan fetus ini diduga karena suplementasi asam folat dengan dosis 1,5 mg/kg berat badan terserap oleh tubuh sehingga dapat meningkatkan dan menjaga keseimbangan metabolisme tubuh. Asam folat dalam bentuk poliglutamat diubah menjadi monoglutamat di jejunum. Bentuk monoglutamat ini berupa *5-Methylenetetrahydrofolate* (5-MTHF) sehingga mampu melewati plasenta (Van der Put *et al.*, 2001).

Sirkulasi asam folat antara induk dan fetusnya di dalam sel diatur oleh *folate receptor* (FR) yang terdapat di plasenta. Ada 2 jenis FR yang dikenal yaitu FR α dan FR β . Sirkulasi asam folat dari induk ke fetusnya melalui 2 tahap yaitu terikatnya 5-MTHF pada FR α di permukaan korion selanjutnya FR β mengikat asam folat untuk masuk ke peredaran darah fetus (Van der Put *et al.*, 2001).

Transportasi asam folat pada dosis tinggi terjadi melalui *carrier-mediated* atau *reduced folate carrier* (RFC). Pada sistem ini mengakibatkan terakumulasinya *methotrexate* dan antifolat yang lain (Van der Put *et al.*, 2001). Menurut Fleming (2001), antifolat mengurangi konsentrasi asam folat dalam tubuh sehingga dapat berpengaruh pada perkembangan fetus dan berpotensi untuk mengakibatkan kelainan tubuh. Hal inilah yang diduga mengakibatkan fetus dari perlakuan asam folat dengan dosis 2 mg/kg berat badan yang dikombinasi 2-ME mengalami penurunan berat badan.

Pada masa awal perkembangan embrio terjadi peningkatan sintesis DNA. Asam folat diperlukan sebagai donor metil dalam sintesis timidin dan purin yang digunakan

untuk replikasi DNA. Aktifitas 2-ME yang bersifat teratogenik dan embriotoksik ini dihambat oleh *tetrahydrofolate* (THF) yang merupakan bentuk aktif dari asam folat dalam sel. (Neill, 1998 ; Van der Put *et al.*, 2001).

Fetus pada perlakuan asam folat dosis 0,5 mg/kg berat badan yang dikombinasi dengan 2-ME mengalami kematian intrauterin dan tidak terdapat fetus yang mampu bertahan hidup. Kematian intrauterin pada kelompok perlakuan ini lebih tinggi daripada perlakuan 2-ME. Kematian pada perlakuan 2-ME disebabkan karena senyawa ini memiliki potensi embriotoksik dan teratogenik akibat aktifitas MAA yang merupakan hasil metabolisme 2-ME (Lee *et al.*, 1993). Senyawa MAA ini diduga dapat meningkatkan konsentrasi *homocystein* sehingga dapat mengganggu metabolisme kelompok metil dan metilasi DNA yang memegang peran penting dalam ekspresi gen (McKay *et al.*, 2004).

Pada induk yang diberi perlakuan asam folat 1,5 mg/kg berat badan yang dikombinasi dengan 2-ME mampu mempertahankan jumlah fetus yang hidup dan mengurangi kematian intrauterin. Hal ini dikarenakan tubuh dapat menyerap asam folat sehingga kebutuhan sel akan *tetrahydrofolate* (THF) untuk melaksanakan reaksi metilasi yang mengubah metionin menjadi *homocystein* dapat terpenuhi.

Insiden eksensefali hanya ditemukan pada perlakuan 2-ME dan tidak ditemukan pada perlakuan kombinasi dosis asam folat dengan 2-ME. Hal ini mengindikasikan bahwa pemberian dosis asam folat sebesar 1,5 dan 2 mg/kg berat badan mampu mencegah insiden eksensefali yang disebabkan oleh 2-ME. Menurut Pulikkunnel & Thomas (2005), kurangnya asupan asam folat dapat menyebabkan gangguan pada enzim yang digunakan dalam metabolisme asam folat (MTHFR, MS, dan lain-lain),

polimorfisme pembawa asam folat dan gangguan pada reseptor folat dalam sel sehingga dapat memicu timbulnya eksensefali.

Gangguan atau rusaknya enzim yang dibutuhkan dalam metabolisme asam folat mengakibatkan konsentrasi *homocystein* meningkat. *Homocystein* ini berperan sebagai N-methyl-D-Aspartate (NMDA) yang memiliki efek neurotoksik dan eksitotoksik. Dampak *homocystein* pada sel neural antara lain menyebabkan apoptosis sel, gangguan pada mitokondria dan perubahan ekspresi gen selama perkembangan. *Folate receptor* (FR) penting untuk asimilasi dan distribusi folat. Pada mencit peran FR ini homolog dengan *folate binding protein* (FBP) (Lutz, 2008). Fetus mencit yang memiliki gangguan pada FBP memiliki kecenderungan untuk mengalami eksensefali (Pulikkunnel & Thomas, 2005).

Kelainan lain yang ditemukan pada penelitian ini yaitu hematoma, sindaktili, brakhidaktili, *cheiloschizis*, agenesis ekor dan *kinky tail*. Hematoma disebabkan oleh peningkatan permeabilitas pembuluh darah (Taylor, 1986), sedangkan agenesis ekor terjadi karena gangguan saat pembentukan somit daerah ekor sehingga tidak terbentuk sampai ekor (Rugh, 1968).

Peran Teofilin Dalam Menghambat Efek 2-Methoxyethanol

Efek pemberian teofilin pada induk mencit (*Mus musculus L.*) terhadap rata-rata angka insiden eksensefali akibat induksi 2-ME

Rata-rata angka insiden eksensefali akibat pemberian kombinasi teofilin dengan 2-ME tidak ada perbedaan secara nyata. Pemberian teofilin pada dosis 30 mg/kg berat badan terjadi kecenderungan penurunan angka insiden eksensefali.

Pada penelitian ini induksi 2-ME pada induk mencit betina pada usia kebuntingan 08:05 hari menyebabkan hasil metabolisme 2-ME yaitu MAA terdistribusi ke dalam jaringan embrio mencit. Akumulasi MAA dalam jaringan embrio menyebabkan meningkatnya kematian sel neuroepitelium, sehingga pemberian 2-ME dapat mengganggu proses neurulasi (Darmanto *et al.*, 2007). Tergangunya proses neurulasi akibat perkembangan toksisitas 2-ME menimbulkan beberapa dampak kelainan seperti eksensefali atau spina bifida. Beberapa hal yang dimungkinkan yaitu terganggunya aktifitas seluler yang tidak normal sehingga mewujudkan bentukan sel yang tidak normal dan struktur jaringan tidak sempurna.

Teofilin di dalam sitoplasma mempunyai peranan dalam pengaktifan protein kinase melalui mekanisme penghambatan enzim fosfodiesterase. Pengaktifan protein kinase ini akan meningkatkan faktor transkripsi CRE (*cAMP respon element*) yang menstimulasi transkripsi gen di dalam inti sel diantaranya fibronectin (Roman *et al.*, 2005).

Kemampuan reproduksi induk mencit (*Mus musculus* L.) akibat induksi 2-ME dan Teofilin

Efek pemberian teofilin pada induk mencit yang telah diinduksi 2-ME secara intraperitoneal pada tahap organogenesis telah menghambat perkembangan fetus. Selain itu, efek pemberian 2-ME kombinasi teofilin mengalami kecenderungan penurunan rata-rata jumlah implantasi, penurunan rata-rata berat badan fetus dan peningkatan persentase kematian intrauterus secara nyata apabila dibandingkan dengan kontrol. Namun, pemberian kombinasi 2-ME dan teofilin pada dosis 20 dan 30 mg/kg BB tidak berbeda nyata terhadap kelainan perkembangan apabila dibanding dengan kontrol.

Pertambahan berat badan fetus terjadi karena hasil pertambahan protein dan lemak yang berasal dari induk. Penurunan berat badan pada fetus mempunyai kaitan yang erat dengan *intrauterin growth restriction* (IUGR). Terdapat banyak faktor yang mempengaruhi terjadinya IUGR diantaranya yaitu malnutrisi, disfungsi plasenta, kelainan perkembangan, gangguan metabolisme induk, gangguan kromosom, zat toksik dan obat-obatan (Diderholm, 2005).

Selain itu MAA juga dapat meningkatkan permeabilitas membran yang menyebabkan influk Ca^{2+} berlebih. Melimpahnya ion Ca^{2+} di dalam sel akan menghambat fosforilasi oksidatif dalam proses respirasi sel, sehingga perolehan ATP berkurang karena dipakai untuk memompa ion Ca^{2+} yang berlebih. Di samping itu melimpahnya Ca^{2+} juga akan mengaktifkan enzim protease dan fosfolipase yang dapat mendegradasi protein sitoskeleton yang digunakan untuk membangunstruktur sel, karena ion Ca^{2+} juga sebagai mediator terjadinya apoptosis (Rumanta *et al.*, 2001).

Darmanto (2006) mengungkapkan, bahwa pemberian 2-ME pada hewan coba menyebabkan timbulnya beberapa kelainan eksternal. Timbulnya berbagai kelainan

tersebut disebabkan tingginya kematian sel dan menurunnya tingkat ekspresi protein neurofilamen selama proses organogeneis.

Menurut Schardein (1985), awal mula efek teratogenik suatu bahan kimia mungkin bisa melalui kematian sel dan perubahan siklus pertumbuhan sel, akan tetapi proses tersebut merupakan awal berbagai kerusakan yang ditampilkan diantaranya kegagalan proses morfogenetik, kegagalan interaksi jaringan bahkan malformasi dan kematian fetus. Kematian intrauterus atau kehilangan implantasi adalah manifestasi dari hubungan temporal perkembangan bahan toksik. Apabila perkembangan intoksikasi di awal kebuntingan, embrio akan di resorpsi sedangkan perkembangan intoksikasi terjadi pada akhir kebuntingan maka akan terjadi kematian fetus.

Kelainan perkembangan akibat pemberian 2-ME yang dikombinasikan dengan teofilin tidak berbeda nyata dengan kontrol pada dosis teofilin 20 dan 30 mg/kg BB. Teofilin adalah senyawa turunan metilxantin bersifat inhibitor non spesifik enzim fosfodiesterase yang menyebabkan meningkatnya kadar cAMP dalam sitoplasma. Di dalam sitoplasma cAMP sebagai *second messenger* yang mempunyai variasi respon seluler seperti pengaktifan hormon peptida dan neurotransmitter. cAMP dapat berikatan dengan protein kinase A (PKA) memfosforilasi faktor transkripsi protein atau yang biasa disebut *cAMP respon binding protein* (CREB). CREB diidentifikasi sebagai faktor yang berikatan dengan DNA dan sebagai efektor pada banyak sinyal yang aktif merespon faktor perkembangan atau *growth factor* (Sundaram, 2003).

DAFTAR PUSTAKA

- Acuna, J., Yoo, P., and Erickson, D., 2000. The prevention of neural tube defect with folic acid. *Pan Am Health*.15 : 1-17.
- Ahmed, A.E., Jacobs, S., and Au, W.W., 1994. Quantitative whole body autoradiographic disposition of glycol ether in mice; effect of route of administration, *Fundam Appl Toxicol*, 22(2), 266-276,
- Ambroso, J.F., Stedman, D. B., Elswick, B. A., and Welsch, F., 1999. Characterization of cell death induced by 2-methoxyethanol in CD-1 mouse embryos on gestation day 8. *Teratology*. 58. 231-240.
- Antony, A. C., 2007. In utero physiology: role of folic acid in nutrient delivery and fetal. Development. *Am J Clin Nutr*. 85(suppl):598-- 603.
- Bailey, L. B., and J. F. Gegory., 1999. Folate metabolism and requirements. *J Nutr*. 129(3): 779-782.
- Berry, R. J., Z. Li., D. Erickson., S. Li., C. A. Moore., H. Wang., J. Mulinare., P. Zhao., L. Y. C. Wong., J. Gindler., S.X. Hong., and A. Correa., 1999. Prevention of neural tube defects with folic acid in China. *N Engl J Med*. 341 (20): 1485-1490.
- Bouwer, I. A., 1999. Folic acid folat and homocystein : Human intervention studies. *Cur Op in Neurol*. 11 : 97-102.
- Boldyrev, A.A. 2000. Discrimination between apoptosis and necrosis of neurons under oxidative stress. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 65, No. 7, 2000. pp.834-842.
- Botto, L. D., C. A. Moore., M. J. Khoury., and J. D. Erickson., 1999. Neural Tube defects. *N Engl J Med*. 341 (20) : 1509 – 1518. Available at: [Web site:<http://www. Nejm.org.on>]. Diakses tanggal 10 Mei 2008.
- Brill, A., Torchinsky, A., Carp, H. and Toder, V. 1999. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *Journal of Assisted Reproduction*. Vol. 16. No.10..
- Brown, N. A., Holt, D., and Weberat B. M., 1984. The teratogenicity of methoxyacetic acid in the rat. *Toxic Lettr*. 22 : 93-100.
- Chandraratna1, D., N. Lawrence1., D. P. Welchman., and B. Sanson., 2007. An in vivo model of apoptosis: linking cell behaviours and caspase substrates in embryos lacking DIAP1. *J Cell Sci*. 120: 2594-2608.
- Colas, J. F., and Schoenwolf G. C., 2001. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyamc*. 221 : 117-145.

- Copp, A.J., Brook, F.A., Estibeiro, JP., Shum, ASW, Cockroft, DL.1990. The embryonic development of mammalian neural tube defect. *Prog. Neurobiol* 1990;35:363-403.
- Craciunescu, C. N., E. C. Brown., Mei-Heng M., and C. D. Albright., 2004. Folic Acid Deficiency During Late Gestation Decrease Progenitor Cell Proliferation. *J Nur.* 132 (1): 162-166.
- Darmanto, W., Saudarwati S., and Sutasurya, L. A., 1994a. Effects of Methoxyacetic acid on prenatal development of mice. *Envir Med.* 38 : 25-28.
- Darmanto, W., Kabir N., Inouye M., Takagishi Y., and Yamamura H., 1994b. Effects of 2-methoxyethanol and methoxyacetic acid on preimplantation mouse embryos in vivo. *Envir Med.* 38 : 29-32.
- Darmanto, W., Kabir N., Inouye M., Takagishi Y., and Yamamura H., 1994c. Effects of 2-methoxyethanol and methoxyacetic acid on preimplantation mouse embryos in vitro. *Envir Med.* 38 : 33-36.
- Detrait, E.R., George. T.M., Etchevers. H.C., Gilbert. J.R., Vekemans. M., and Speer. M.C., 2005. Review article human neural tube defects : developmental biology, epidemiology, and genetics. *Neurotoxi and Ter* 27: 515-524.
- Dhalluin, S., Z. Elias., O. Poirot., I. Gate., H. Pages., H. Tapiero., P. Vasseur., and G. Nguyen Ba., 1999. Apoptosis inhibition and early epigenetic events in morphological transformation of Syrian hamster embryo cells exposed to 2-methoxyacetaldehyde, a metabolite of 2-methoxyethanol. *Toxic Lettr.* 105 : 163 - 175.
- dias, M.S., and Partington, M., 2004. Embryology of myelomeningocele and anencephaly. *Neurosurg Focus.* 16 (2).
- Donosepoetro, M., 1998. Folic acid and homocystein : the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk.* 5:233-227.
- Driscoll, C. D., Valentine, R., Staples, R. E., Chromey, N. C., and Kennedy, G.L., 1998. Development toxicity of diglyme by inhalation in the rat. *Drug Chem Toxicol.* 21:119-136.
- Fazel, A., and Jalali, M., 2002. Experimentally-induced exencephally and spina bifida in mice. *Arch Iranian Med.* 5 (3): 179-183.
- Fleming, A., 2001. The role in the prevention of neural tube defects : human and animal studies. *Nutr Rev.* (59): 8. (2001).

- Geisel, J., 2003. Folic acid and neural tube defects in pregnancy: A review. **J Perntl and Neo Nurs.** 17 (4): 268-279.
- George E. L., Georges-Labouesse E., N., Patel-King R. S., Rayburn H., and Hynes R., 1993. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. **Development.** 119: 1079-1091.
- George Elizabeth L., Georges-Labouesse Elisabeth, N., Patel-King Ramila, S., Rayburn Helen and Hynes Richard, O. 1993. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119, 1079-1091.
- Groeseneken, D., Veulemans, H., Masschelein, R., and van Vlem, E. 1989. Experimental human exposure to ethylene glycol monomethyl ether, *Int. Arch Occup Environ Health*, 61, 243-247
- Gilbert, S. F., 1985. **Development Biology.** Sinauer Publisher. Massachusetts.
- Gunn, T. M., Juriloff, D. M., Harland, R. M., and Wallingford, J.B., 2003. Shroom induces apical constriction and is required for hingepoint formation during neural tube closure. **Curt Bio.** 13: 2125 – 2137.
- Haigo, S.L., Hildebrand J.D., Harland, R.M., and Wallingford, J.B. 2003. Shroom induces apical constriction and is required for hingepoint formation during neural tube closure. **Current Biology.**, vol 13. 2125-2137, December 16. Elsevier Science Ltd.
- Hafez, ESE., 2000. **Reproduction and Breeding Technique for Laboratory Animals.** 3th Ed. Philadelphia. Pp 305.
- Haydar, T.F., Kuan, Chia-Yi, Flavell, R.A., and Rakic P. 1999. The role of cell death in regulating the size and shape of the mammalian forebrain. **Cerebral Cortex** Sep. 1999;9:621-626
- Hildebrand, J.D., and Soriano P. 1999. Shroom, a PDZ domain-contacting actin-binding protein, is required for neural tube morphogenesis in mice. **Cell** 99, 485-497.
- Herman M. J., dan Mutiatikum D., 1990. Efek teratogenik-dismorfogenik masalah akibat penggunaan obat dalam kehamilan. **Cermin Dunia Kedokteran.** 65: 34-35.
- Hildebrand, J. D., and Doriano P., 1999. Shroom, A PDZ domain-contacting actin-binding protein, is required for neural tube morphogenesis in mice. **Cell.** 99: 485 – 497.

- Horton VL, Sleet RB, Greene JA and Welsch F. 1985. Developmental phase-specific and dose-related teratogenic effects of ethylene glycol monomethyl ether in CD-1 mice. **Toxicol Appl Pharmacol.** 80: 108-118.
- Ikhwan., 1997. Pengaruh Ekstrak Biji Kapas (*Gosypium hissutum*) Terhadap Fertilitas dan Perkembangan Fetus Mencit (*Mus musculus*) Betina. **Tesis.** Universitas Airlangga. Surabaya.
- Jacobson, A.G., and Tam , P.P.L. 1982. Cephalic neurulation in the mouse embryo analyzed by SEM and morphometry. **Anat. Rec.**, 203:375-396.
- Johanson, G., 2000. Toxicity review of Ethylene Glycol Monomethyl Ether and its Acetate Ester. **Critical Review in Toxicology.** 30 (3): 307-345. Available at: [Web site: www.niwl.se/ah/]. Diakses tanggal 19 Februari 2008.
- Juriloff, D. M., and Harris M.J., 2000. Mouse model for neural tube closure defects. **Human Mol Gen.** Vol 9. No.6.
- Jasin, M., 1984. **Sistematik Hewan (Invertebrata dan Vertebrata).** Sinar Jaya. Surabaya.
- Kalthoff, K., 2001. **Analysis of Biological Development 2nd.** The Mc Gaw Hill Companies Inc.
- Kanduc, A., Mttelman, A., Serpivo, R., Sinigaglia, E., Sinha, A.A., Natale, C., Santacroce, R., Di Corcia, M. G., Lucchese, A., Dini, L., Pani, P., Santacroce, S., Simone, S., Bucci, R., and Farber, E., 2002. Cell death : apoptosis versus necrosis (Review). **Int J Onco.** 21 : 165 – 170.
- Kaufman, M. H., 1992. **The Atlas of Mouse Development.** Academic Press. Harcourt Brace and Company Publisher. London.
- Kaufman, M. H., J.B.L., and Bard., 1999. **The Anatomical Basis of Mouse Development.** Academic Press. Harcourt Brace and Company Publisher. London.
- Kim, B. S and Smialowicz, R.J., 1997. The Role of Metabolism In 2-Methoxyethanol Induced Suppression of In Vitro Polyclonal Antibody Responses by Rat and Mouse Lymphocytes. **Toxicology.** 123:227-239.
- Knobil EJD, Neil LL, Ewing GS, Geenwald CL, Maarket., and DW Pfaff., 1988. **Physiology of Reproduction Volume 2.** Raven Press. New York.
- Kurniawati., 2006. Ekspresi Protein Reelin Pada Fetus Mencit Yang Terinduksi 2-Methoxyethanol Saat Masa Organogenesis Otak. **Skripsi.** Universitas Asirlangga. Surabaya.

- Kusumawati D., 1993. Pengaruh Stevoisida Terhadap Reproduksi dan Perkembangan Fetus Tikus Putih. **Disertasi**. Universitas Airlangga Surabaya. Surabaya.
- Lakkis, M. M., Golden, J. A., O'Shea S., and Epstein J. A., 1999. Neurofibromin deficiency in mice causes exencephaly and is a modifier for splotch neural tube defects. **Dev Bio**. 212. 80-92.
- Lambrechts A., Van Troys M., and Ampe C., 2004. The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. **Intr J Biochem and Cell Bio**. 36 : 1809 – 1909.
- Langman J., 2002. **Medical Embryology**. The Wiliams and Wilkins Co. Bultimore. New York. Pp 25-104.
- Lee, J., Trad, C. H., and Butterfield, D. A., 1993. Electron paramagnetic resonance studies of the effects of methoxyacetic acid, a teratologic toxin, on human erythrocyte membranes, **Toxicology**. 83 : 131 – 148.
- Margawati, E.T., 1999. The effectivity of growth factor on in vitro embryo development. **Media Veteriner**. 6(3):27-34.
- Ma'ruf, A., 2002. Fisiologi kematian sel. **Majalah Ilmu Faal Indonesia**. 01(2).
- Marrieb, E. N dan Mallatt, J., 2001. **Human Anatomy 3rd ed**. Pearson Education Inc. New York. Pp.52.
- Marty, M.S., and R. Loch-Caruso., 1998. 2-Methoxyethanol Inhibits Gab Junction Communication in rat myometrial myocytes. **Cell bio and toxicol**. 14 : 199-210.
- Maslachah, L., Sukmanadi, M., dan Sugihartuti, R., 2003. **Pengaruh Pemberian Antisterilitas Alpha Tocopherol Terhadap Spermatogenesis Tikus Yang Menerima Sensor**. Laporan Penelitian. FKH. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Matsumoto, A., Hatta, T., Moriyama, K., and Otani, H., 2002. Sequential observation of exencephaly and subsequent morphological changes by mouse exo utero development sistem : analysis of the mechanism of transformation from exencephaly. **Anatm Embryol**. 205 : 7-18.
- Mebus, C. A., Welsch, F., and Working, P. K., 1989. Attenuation of 2-methoxyethanol-induced testicular toxicity in the rat by simple physiological compounds. **Toxicol Appl Pharmacol**. 99 : 110-121.
- Melvin, E. C., George T. M., Worley, G., and Franklyn, A., 2000. Genetic studies in neural tube defects. **Pediatr Neurosurg**. 32 : 1-9.

- Moslen, M.T., Kaphalia, I., Balasubramanian, H., Yin, Y. M., and Au, W. W., 1995. Species differences in testicular and hepatic biotransformation of 2-methoxyethanol. **Toxicology**. 96: 217-224.
- Nagano, K., Nakayama, E., Oobayashi, H., Yamada, T., Adachi, H., Nichizawa, T., Ozawa, H., Nakaichi, M., Okuda, H.M., Minami K., and Yamazaki, K., 1981. Embryotoxic effects of ethylene glycol monomethyl eter in mice. **Toxicology**. 20:335-343.
- Nakatsu, T and Shiota, K., 2000. Neurulation in the human embryo revisited. **Kongen Anmal**. 40 : 93-96.
- Padmanabhan, R., and Shfiullah, M. M., 2003. Amelioration of sodium valproate-induced neural tube defects in mouse fetuses by maternal folic acid supplementation during gestation. **Kongen Anmal**. 43 : 29 - 40.
- Partodiharjo, S., 1992. **Ilmu Reproduksi Hewan**. Cetakan Ke Tiga. Mutiara Sumber Widya. Jakarta.
- Pippenger, C. E., 2003. Pharmacology of neural tube defects. **Int J Biochem**. 44(3): 24-32.
- Plaetzer, K., Kiesslich, T., Verwanger, T., and Krammer, B., 2003. The modes of cell death induced by PDT : An Overview. **Med Lasr Appl**. 18: 7-19.
- Poernomo, B., 1999. **Teratology High Light. Post Gaudate Progamme**. Airlangga University. Surabaya.pp 1-7.
- Poirier, I. A., 2002. The effects of diet, genetics and chemicals on toxicity and aberrant DNA methylation : an introduction. **J Nutr**. 132 (8): 2336-2339.
- Prihiyantoro, E., Darmanto, W, Pindada I. B., dan Soepriandono, H., 2002. Gangguan Migrasi dan Perkembangan Sel Saraf pada Cerebrum dan Cerebelum Mencit Akibat Induksi 2-Methoxyethanol: Sebagai Model Mekanisme Kelainan Otak. **Laporan Penelitian Hibah Bersaing X/1**.
- Prihiyantoro, E., Darmanto, W, Pindada I. B., dan Soepriandono, H., 2003. Gangguan Migasi dan Perkembangan Sel Saraf pada Cerebrum dan Cerebelum Mencit Akibat Induksi 2-Methoxyethanol: Sebagai Model Mekanisme Kelainan Otak. **Laporan Penelitian Hibah Bersaing X/2**.
- Pulikkunnel, S. T., and S. V Thomas., 2005. Neural Tube Defects : Pathogenesis and Folate Metabolism. **JAPI**. 53 : 127 – 135.. Available at: [Web site: www.japi.org]. Diakses tanggal 25 Juni 2008.

- Putz, B., and Morris-Kay, G., 1981. Abnormal neural fold development in trisomy 12 and trisomy 14 mouse embryos. I, scanning electron microscopy. **J. Embryol.Exp.Morphol**, 66:141-158.
- Rasjad, C., Yamashita K., Datu A. R., and Yasuda, M., 1991. Phatogenesis in limb Malformation in mice induced by methoxyaceticacid. **Hirosh J Med Ser**. 40 : 101-107
- Ritter, E. J., Scott, W. J, and Randallm J. L., 1985. Teratogenicity of dimethoxyethyl phthalate and its metabolites methoxyethanol and methoxyacetic acid in the rat. **Teratology**. 33 : 25 – 31.
- Rugh, R., 1968. **The mouse. Its reproduction and development**. Burgess Publishing Company. Mineapolis.
- Rumanta, M., Tien, W.S., dan Sri, S., 2001. Pengaruh Asam Metoksi Asetat terhadap organ Reproduksi Mencit (*Mus musculus* L) Swiss Webster Jantan, **Prosiding ITB**, Vol.33 No.2., ITB Bandung.
- Sadler, TW., 2000. **Embriologi Kedokteran Langman**. Edisi ke-7. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. Hlm 280-281.
- Sakai, Y., 1989. Neurulation in the mouse : manner and timing of neural tube closure. **Anatoml Record**. 223 : 194-203.
- Santoso, M. I. E., 2005. Korelasi Defisiensi Asam Folat dengan Kadar transforming GFB-1 dan ILGF-1 dalam Serum Induk dan Tulang Kepala Janin Tikus. **Disertasi**. Universitas Asirlangga. Surabaya.
- Schoenwolf, D., and J. L. Smith., 1990. Mechanisms of Neurulation. Traditional Viewpoint and Recent Advences. **J Dev**. 109 : 243 – 270.
- Scoot, W. J, Fradkin R., and Wittfoht W., 1989. Teartologic potential of 2-methoxyethanol and transplacental distribution of its metabolite 2-methoxyacetic acid, in non-human primates. **Teratology**. 39 : 363-373.
- Smith JB., dan Mangkoewidjojo S., 1988. **Pemeliharaan Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan Daerah Tropis**. Jakarta. UI Press, hlm 10-57.
- Smith, A. D., Y.I. Kim., and H. Refsum., 2008. Is folic acid good for everyone, **Am J Clin Nutr**. 87:517–533.
- Sudigdo Sastroasmoro., dan Sofyan Ismael., 1995. **Dasar-dasar Metodologi Penelitian Klinis**. Binarupa Aksara. Jakarta.
- Susanto, I., 1985. **Embriologi Kedokteran**. Edisi 5. Penerbit EGC Buku Kedokteran. Jakarta.

- Sweeney., 2001. Proposed Occupational Exposure Limits for Select Ethylene Ethers Using PBPK Models and Monte Carlo Simulation. **Toxicol Sci.**
- Tamura, T., and M. F Picciano., 2006. Folate and human reproduction. **Am J Clin Nutr.** 83:993–1016.
- Terry, K. K., Stedman, D. B., Bolon, B., and Welsch, F., 1996. Effects of 2-Methoxyethanol on Mouse Neurulation. **Teratology.** 54: 219 – 229.
- Turner, C. D., dan J. T Bagnara., 1988. **Endokrinologi Umum.** Edisi ke-6. Airlangga University Press. Surabaya. Hal 564-607.
- Van der Put, N., M. J., Van Straaten H. W. M. , Trijbels. F. J. M., and Blom H. J., 2001. Minireview : Folate homocystein and neural tube defects : an overview. **Exp Bio Med.** Vol. 226 (4) : 243 – 270.
- Wallingford, J. B., and Harland, R. M., 2005. Neural tube closure requires Dishevelled-dependent convergent extension of the midline. **J Dev.** 129 : 5815 – 5825.
- Wolpert, L., 2002. **Principles of Development** 2nd Ed. Oxford University Press. London.
- Wu, M., Chen D. F., Sasaoka, T., and Tonegawa, S., 1996. Neural tube defects and abnormal and brain development in F52-Deficient Mice. **Proc Natl Acad Sci** 93:2110 -2115.
- Yatim W., 1990. **Reproduksi dan Embriologi.** Tarsito. Bandung.
- Ybot-Gonzalez, P., Cogram, P., Gerrelli, D., Copp Andrew, J. 2002. Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. **Development** 129, 2507-2517.
- Zainuddin, M., 2000. **Metodologi Penelitian.** Airlangga University Press. Surabaya

