

# TESIS

**EFEK ASAM RETINOAT YANG DIBERIKAN PADA INDUK  
MENCIT (*Mus musculus*) UMUR KEBUNTINGAN 10 HARI  
TERHADAP HASIL REPRODUKSI DAN KELAINAN  
BAWAAN EKSTERNAL JANIN**



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

kek  
kk  
Tlw. 23/11  
Pus  
e

**TERESIA RETNO PUSPITADEWI**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2008**

**Prasyarat Gelar**

**EFEK ASAM RETINOAT YANG DIBERIKAN PADA INDUK  
MENCIT (*Mus musculus*) UMUR KEBUNTINGAN 10 HARI  
TERHADAP HASIL REPRODUKSI DAN KELAINAN  
BAWAAN EKSTERNAL JANIN**

**TESIS**

**Untuk memperoleh Gelar Magister dalam Program Studi Ilmu Kesehatan  
Reproduksi pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

**Oleh :**

**TERESIA RETNO PUSPITADEWI**

**NIM : 090610296-M**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**Tanggal 5 AGUSTUS 2008**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**TESIS INI TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL : 5 AGUSTUS 2008**

**Oleh  
Pembimbing Ketua**



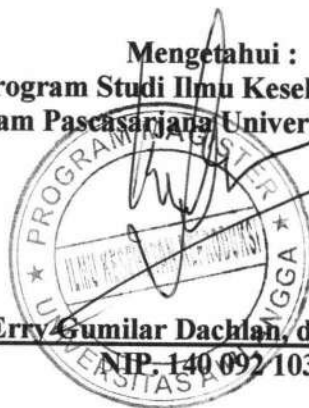
**Prof. Win Darmanto, Msi., Ph D.**  
NIP. 131 653 741

**Pembimbing**



**Dr. Bambang Poernomo S, drh., MS.**  
NIP. 130 701 131

**Mengetahui :  
Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga**



**Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., SpOG (K)**  
NIP. 140 092 103

**Tesis ini telah diujikan dan dinilai  
Oleh panitia penguji pada  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga  
Pada Tanggal 5 AGUSTUS 2008**

**PANITIA PENGUJI TESIS**

**Ketua : Prof. Dr. H. Agus Abadi, dr., SpOG (K).**

**Anggota : 1.Prof. Win Darmanto, MSi., Ph.D.**

**2.Dr. Bambang Poernomo S, drh., MS.**

**3.Dr. Paulus Liben, dr., MS.**

**4.Budiono, dr., M.Kes.**

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji Syukur Kehadirat Tuhan Yang Maha Esa, yang telah melimpahkan rahmat, berkat, dan karunia-Nya tak terhingga sehingga dapat terselesaikannya pendidikan Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga dengan penyusunan tesis ini. Penelitian dan penyusunan tesis ini dapat terlaksana dan terselesaikan berkat bantuan, dorongan, dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu dengan kerendahan hati dan ketulusan hati penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

Prof. Win Darmanto, MSi.,Ph.D, selaku Pembimbing Ketua yang penuh perhatian dan kesabaran telah meluangkan waktu dan tidak henti-hentinya memberi semangat, bimbingan, wejangan, masukan, saran dan nasehat dalam penelitian dan penyusunan tesis serta kemudahan dalam berkonsultasi ditengah kesibukan beliau yang sangat padat.

Dr. Bambang Poernomo S, Drh.,MS, selaku Pembimbing yang penuh perhatian dan kesabaran telah meluangkan waktu memberi semangat, bimbingan, masukan bukan hanya pada isi tulisan tetapi semua yang berkaitan dengan penyusunan tesis ini, saran dan nasehat serta kemudahan dalam berkonsultasi ditengah kesibukan beliau yang sangat padat.

Menteri Kesehatan R.I melalui Direktur Politeknik Kesehatan Surabaya, H. Moh. Muchson, M.Sc, dan Ketua Program studi Keperawatan Tuban, Setyaningsih, SST.,M.Pd., M.Kes, yang telah memberikan kesempatan dan bantuan dana melalui Beasiswa tugas belajar sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan pada Program Magister Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Prof. Dr. H. Agus Abadi, dr., SpOG (K), mantan Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Program Pascasarjana Universitas Airlangga dan sekaligus sebagai Ketua Penguji, yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan bimbingan, tuntunan, saran, dorongan, dan pengetahuan kepada saya sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., SpOG (K), selaku Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Program Pascasarjana Universitas Airlangga dan sekaligus sebagai pengajar yang telah memberikan kemudahan dalam penyelesaian tesis ini.

Dr. Paulus Liben, dr.,Ms, selaku penguji dan team pengajar Ilmu Kesehatan Reproduksi Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya atas bimbingan, saran, nasehat, pengarahan dalam penulisan proposal dan penulisan tesis ini.

Budiono, dr., M.Kes, selaku penguji dan konsultan statistik yang telah membantu dan memberikan bimbingan dalam melakukan analisis statistik dalam penyelesaian tesis ini.

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Fasich Lisan, Apt, Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Dr. Muhammad Amin, dr., Sp.P.(K) dan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Sri Hajati, SH., MS yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister ini.

Staf pengajar Departemen Ilmu Kesehatan Reproduksi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr., Prof A. Marlinata, dr., Prof. Samsulhadi, dr., SpOG(K), Prof. Laba Mahaputra, drh., M.Sc, Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr., MS, M. Cholil Munif, dr., Aucky Hinting, dr., Ph.D., Prof. R. Prajitno Prabowo, dr., SpOG., Prof. Doddy M. Soebandi, dr., SpBU., Sunarjo, dr., MS., MSc, Rina Yudiwati, dr., M.Kes, Prof. Hanafi yang telah memberikan dengan ikhlas dan penuh kesabaran ilmu, bimbingan, dorongan, semangat dan berbagi pengalaman selama studi

Dra. Yulia Irnidayanti, M.Si, yang telah mengikutsertakan saya dalam proyek penelitian ini sehingga penulis dapat memenuhi prasyarat kelulusan di Program Magister.

Teman seperjuangan Ida Prijatni, M Gatot Heri P, Nursaudah, Tri Ratna ningsih, Siti Sukarnah yang telah memberikan dorongan, semangat dan bantuan selama menjalankan studi.

Kawan-kawanku tersayang, Maruni Wiwin Diarti ,S.Si., Anita Joeliantina, Skep.,Ns.,M.Kes, dr. Nurhamidah, Sugeng R SKM, yang telah memberikan dorongan, masukan, kritikan dan bantuan kepada penulis selama menyelesaikan tesis ini.

Kepada bapak,ibu serta kakak dan adik tercinta yang selalu memberikan dorongan, motivasi, semangat, doa dalam menghadapi saat-saat sulit pada masa studi.

Kepada suamiku, anakku Kevin dan Ino, yang saya cintai terima kasih atas dukungan, kesabaran, dan doanya sehingga pendidikan saya dapat terselesaikan.

Kepada semua pihak yang penulis tidak dapat sebutkan satu persatu, penulis mengucapkan terima kasih atas segala bantuan yang diberikan sehingga penulisan tesis ini dapat terselesaikan.

Semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas budi baik Bapak, Ibu, saudara sekalian serta selalu melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada kita sekalian.

**RINGKASAN****Efek Asam Retinoat Yang Diberikan Pada Induk Mencit (*Mus musculus*) Umur Kebuntingan 10 Hari Terhadap Hasil Reproduksi Dan Kelainan Bawaan Eksternal Janin**

Masa organogenesis merupakan masa penting untuk perkembangan normal dari sebagian besar organ dan sistem organ. Apabila embrio yang sedang berkembang terpapar agensia toksik maka ada peluang proses perkembangannya menjadi terganggu. Asam Retinoat merupakan salah satu bentuk vitamin A yang larut lemak, masih banyak digunakan untuk pengobatan penyakit kulit. Asam retinoat ini bersifat teratogen karena sifat metabolisme vitamin larut lemak diekskresikan sangat lambat dari tubuh, terakumulasi dalam tubuh, ditimbun di jaringan sehingga meracuni tubuh, dan dosis berlebih menimbulkan efek toksik

Penggunaan asam retinoat berlebih pada ibu hamil trimester pertama bersifat *irreversibel*. Senyawa yang bersifat lipofilik cenderung berdifusi dengan mudah melintasi plasenta, masuk sirkulasi janin, dapat memberikan dampak negatif terhadap perkembangan bayi dalam kandungannya, berupa kegagalan kehamilan serta terjadinya kelainan organ dalam bentuk kelainan kongenital ringan, berat bahkan kematian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimen laboratoris yang menggunakan *the randomized posttest only control group design*. Hewan coba yang digunakan mencit betina (*Mus musculus*) galur BALB/C, setelah bunting diambil secara acak sebanyak 32 ekor terbagi dalam 2 kelompok dengan jumlah yang sama. Sebanyak 16 ekor mencit bunting kelompok perlakuan diinduksi asam retinoat dosis 60 mg/KgBB secara oral, 16 ekor mencit bunting kelompok kontrol diinduksi minyak wijen 1 ml/mencit. Semua kelompok hewan coba diinduksi pada umur kebuntingan hari ke-10, selanjutnya dikurbankan 1 hari sebelum melahirkan (UK hari ke-18). Unit analisis adalah implantasi plasenta, resorpsi, fetus hidup, fetus mati, berat badan fetus, dan kelainan eksternal pada fetus.

Hasil analisis deskriptif menunjukkan rata-rata berat badan fetus pada kelompok kontrol secara statistik Mean dan SD sebesar  $1,00 \pm 0,244$ , implantasi plasenta  $8,00 \pm 1,56$ , sedangkan untuk kelompok perlakuan rata-rata berat badan sebesar  $0,96 \pm 0,23$ , implantasi plasenta sebesar  $7,23 \pm 2,24$  data ini menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ). Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa hasil reproduksi induk

yang meliputi jumlah implantasi plasenta, rata-rata berat badan fetus berdistribusi normal ( $p > 0,05$ ), sedangkan data fetus hidup, fetus mati dan resorpsi menunjukkan tidak berdistribusi normal ( $p < 0,05$ ). Hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa jumlah implantasi plasenta dan rata-rata berat badan fetus memiliki varians yang homogen ( $p > 0,05$ ).

Hasil uji dengan menggunakan *t-test 2 sampel bebas* rata-rata implantasi plasenta diperoleh signifikansi sebesar 0,366 ( $p > 0,05$ ), rata-rata berat badan fetus diperoleh signifikansi sebesar 0,711 ( $p > 0,05$ ), hal ini berarti bahwa pemberian asam retinoat dosis 60 mg/Kg BB tidak memberikan perbedaan yang bermakna pada jumlah implantasi plasenta dan rata-rata berat badan mencit pada kelompok perlakuan.

Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara fetus mati dan resorpsi dengan nilai signifikansi sebesar 0,008 ( $p < 0,05$ ), demikian juga pada fetus hidup dengan nilai signifikansi sebesar 0,008 ( $p < 0,05$ ) setelah pemberian asam retinoat..

Hasil analisis persentase fetus mencit dengan kelainan bawaan eksternal untuk kelompok perlakuan sebesar 68 ekor fetus hidup (58,2 %) keseluruhan mengalami kelainan eksternal dan kelompok kontrol dengan minyak wijen sebesar 80 ekor fetus hidup (100 %) keseluruhan normal, persentase ini menunjukkan perbedaan antara kelompok kontrol dan perlakuan. Pengamatan kelainan eksternal yang muncul pada fetus hidup yaitu *palatoschysis*, *pocomelia*, *kinky tail*, *ectrodactyli*, *micromelia*, *agenesis tail*, *anotia*, *asimetris auricle*, *simpodia*, *sindactyli*, *talipes*, *teratoma*, *short tail*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemaparan bahan kimia yang bersifat teratogen dapat menghalangi pertumbuhan dan diferensiasi, menyebabkan terjadinya kelainan janin. Tingkat keparahan kelainan janin tergantung pada sifat teratogen dan tahap pertumbuhan embrio pada saat terkena teratogen. Apabila terkena pada tahap awal organogenesis, pengaruh yang hebat ditemukan pada pertumbuhan organ atau anggota tubuh/ekstremitas. Dengan demikian asam retinoat dosis 60 mg/KgBB yang diinduksikan pada mencit bunting UK-10 hari menyebabkan penurunan hasil reproduksi induk mencit berupa berkurangnya jumlah fetus hidup, meningkatnya jumlah fetus mati dan resorpsi, untuk implantasi plasenta serta berat badan fetus tidak berpengaruh sedangkan kelainan eksternal terjadi disemua fetus hidup yang dihasilkan.



## SUMMARY

### EFFECT OF RETINOIC ACID THAT ADMINISTERED TO PREGNANCY MICE (*Mus musculus*) AGE OF 10 DAYS ON REPRODUCTIVITY RESULT AND ABNORMALITIES CONGENITAL OF FETAL EXTERNAL

Mostly, organogenetic time is an important period for normal development of the organs and organ systems. If the developing embryo is exposed to toxic agents, of course there is a possibility that impairing the development. Retinoic acid, a form of lipid soluble vitamin A, is still used in the treatment of dermatologic diseases. Retinoic acid is teratogenous. Whether it has slowly metabolic characteristics excreted from the body, and it can be accumulated and collected in the tissues, will cause in body intoxication. Moreover, an excessive dose results in toxic effect. The excessive use of retinoic acid, particularly, in first trimester pregnancy women. Is irreversible lipophilic compound tends to diffuse through the placenta easily and enters the fetal circulation, to produce a negative effect on fetus, such as pregnancy failure, abnormalities organ in the form of mild and severe congenital abnormalities and even death.

This was a laboratory experimental study using randomized posttest only control group design. The animals were female BALB/C strain mice (*Mus musculus*). They got, 32 mice were taken randomly and divided into two groups, each in equal number. A number of 16 pregnant mice from treatment group were induced with retinoic acid in a dose of 60 mg/Kg BW per oral, and 16 pregnant mice in control group were induced with sesame oil 1 ml/head. All experimental animals were induced in pregnancy age of 10 days, and then sacrificed one day before delivery (pregnancy age of 18 days). The analysis units were placenta implantation, resorption, living fetus, dead fetus, fetal body weight, and fetal external abnormalities.

The result of descriptive analysis revealed that mean fetal bodyweight in control group had Mean and SD of  $1.00 \pm 0.244$ , and placenta implantation of  $8.00 \pm 1.56$ , while in treatment group the mean bodyweight was  $0.96 \pm 0.23$ , and placenta implantation was  $7.23 \pm 2.24$ . These data revealed no significant difference ( $p > 0.05$ ). The results of normality test indicated that mice reproductive outcome, including the number of placenta implantation, and mean fetal bodyweight, had normal distribution ( $p > 0.05$ ), while the data on living fetus, dead fetus, and resorbed embryo showed no normal distribution ( $p < 0.05$ ). The result of homogeneity test indicated that the number of placenta implantation and mean fetal bodyweight had homogeneous variance ( $p > 0.05$ ).

The result of independent 2 sample t-test showed that the mean of placenta implantation had significance of 0.366 ( $p > 0.05$ ), and the mean of fetal bodyweight had significance of 0.711 ( $p > 0.05$ ), indicating that the administration of retinoic acid in a dose of 60 mg/Kg BW provided no significant difference in the number of placenta implantation and mean mice bodyweight in treatment group.

The result of Mann-Whitney test indicated significant difference between resorbtion and dead fetus with significance value of 0,008 ( $p < 0.05$ ) and also indicated significant difference in living fetus with significance value of 0.008 ( $p < 0.05$ ), the administration of retinoic acid in a dose of 60 mg/Kg BW. The result of percentage analysis of mice fetus with external congenital abnormalities in treatment group showed that in 68 living fetus (58.2%) all had external abnormalities and in control group that received sesame oil, all 80 living fetuses (100%) were normal. This percentage indicated the difference between control and treatment group. External abnormalities observed in living fetus were palatoschysis, pocomelia, kinky tail, ectrodactyli, micromelia, agenesis tail, anotia, asymmetrical auricle, simpodia, sindactyli, talipes, teratoma, and short tail. The result of this study showed that teratogenous chemical exposure may impede fetal growth and differentiation, resulting in fetal abnormalities. The severity of abnormality depends on the teratogenic characteristics and embryonal growth stage during the exposure. If the exposure occurred at early stage of organogenesis, the remarkable effects will be found in the growth of organs or extremities.

In conclusion, retinoic acid in a dose of 60 mg/Kg BW that induced by pregnancy mice age of 10 days will decrease the reproductivity the number of living fetus, increasing dead fetus, and resorbtion. Placenta implantation and fetal body weight is not affected, while external abnormalities occurs in all living fetus.

## ABSTRAK

### **Efek Asam Retinoat Yang Diberikan Pada Induk Mencit (*Mus musculus*) Umur Kebuntingan 10 Hari Terhadap Hasil Reproduksi Dan Kelainan Bawaan Eksternal Janin**

Asam Retinoat salah satu bentuk vitamin A yang larut lemak. diekskresikan sangat lambat dari tubuh, sehingga dosis berlebih menimbulkan efek toksik, terutama pemakaian pada ibu hamil trimester pertama menyebabkan kelainan kongenital ringan, berat bahkan kematian pada janin yang dikandungnya. Tujuan penelitian ini untuk mengkaji efek pemberian asam retinoat dosis 60 mg/KgBB pada induk mencit bunting UK-10 hari pada hasil reproduksi induk dan kelainan bawaan eksternal fetus mencit.

Penelitian ini adalah penelitian eksperimen laboratoris menggunakan *the randomized posttest only control group design*. Hewan coba yang digunakan mencit betina (*Mus musculus*) galur BALB/C, sebanyak 16 ekor mencit bunting kelompok perlakuan diinduksi asam retinoat dosis 60 mg/KgBB secara oral, 16 ekor mencit bunting kelompok kontrol diinduksi minyak wijen 1 ml/mencit. Semua kelompok hewan coba diinduksi umur kebuntingan hari ke-10, selanjutnya dikurbankan 1 hari sebelum melahirkan (UK hari ke-18).

Hasil penelitian menunjukkan kelompok mencit yang diinduksi asam retinoat mengalami penurunan jumlah fetus hidup, peningkatan kematian intrauterus meliputi jumlah fetus mati, dan embrio teresorpsi berbeda secara nyata dengan signifikansi sebesar 0,008 ( $p < 0,05$ ) dibandingkan kelompok kontrol, untuk implantasi plasenta, berat badan fetus tidak berbeda secara nyata ( $p > 0,05$ ) dibandingkan kelompok kontrol ( $p = 0,366$ ,  $p = 0,711$ ).

Berdasarkan data persentase fetus hidup pada kelompok kontrol, sebesar 80 ekor fetus hidup (100 %) tidak mengalami kelainan berbeda jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan sebesar 68 ekor fetus hidup ( 58,2 %) keseluruhan mengalami kelainan.

Kesimpulan penelitian ini asam retinoat dosis 60 mg/KgBB yang diinduksikan pada mencit bunting UK-10 hari menyebabkan penurunan hasil reproduksi induk mencit berupa berkurangnya jumlah fetus hidup, meningkatnya jumlah fetus mati dan resorpsi, untuk implantasi plasenta serta berat badan fetus tidak berpengaruh, sedangkan kelainan bawaan eksternal terjadi disemua fetus yang dihasilkan.

**Kata Kunci : asam retinoat, mice, prenatal, kelainan eksternal.**

**ABSTRACT**

**EFFECT OF RETINOIC ACID THAT ADMINISTERED TO  
PREGNANCY MICE (*Mus musculus*) AGE OF 10 DAYS ON  
REPRODUCTIVITY RESULT  
AND ABNORMALITIES CONGENITAL OF FETAL EXTERNAL**

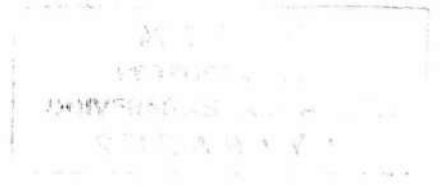
Retinoic acid is one form of lipid soluble vitamin A. It is excreted from the body slowly, so that an excessive dose will cause a toxic effect. In first trimester pregnant mothers, in particular, it may result abnormalities in mild and severe congenital, and even fetal death. The objective of this study was to investigate the effect of the administration of retinoic acid in a dose of 60 mg/KgBW in pregnancy age of 10 days on reproductivity outcome and the abnormalities congenital of fetal external.

This was a laboratory experimental study by reproductivity using randomized posttest only control group design. Experimental animals were female BALB/C strain mice (*Mus musculus*). A number of 16 pregnant mice from group treatment were induced by retinoic acid in a dose of 60 mg/Kg BW per oral, and 16 pregnant mice in control group were induced by sesame oil 1 ml/head. All experimental animals were induced in pregnancy age of 10 days, and then sacrificed within one day before delivery (pregnancy age of 18 days).

Results revealed that mice induced by retinoic acid is shown of decreasing number of living fetus, increasing intrauterine deaths, which was including the number of died fetuses and resorbed embryo, was significantly different from 0,08 ( $p < 0.05$ ) of those control group, while placenta implantation and fetal bodyweight was not significantly different ( $p > 0.05$ ) from control group ( $p = 0.366$ ,  $p = 0.711$ ). Based on the data on living fetal percentage in control group, 80 living fetus (100%) had no abnormalities, which were different from group treatment, in which all 68 living fetus (58.2%) had abnormalities.

In conclusion, retinoic acid in a dose of 60 mg/Kg BW that induced by pregnancy mice age of 10 days will decrease the reproductivity the number of living fetus, increasing dead fetus, and resorbtion. Placenta implantation and fetal body weight is not affected, while external abnormalities occurs in all living fetus.

**Keywords: retinoic acid, mice, prenatal, congenital malformation**



## DAFTAR ISI

### Halaman

Sampul Depan .....	i
Sampul Dalam .....	ii
Prasyarat Gelar .....	iii
Lembar pengesahan .....	iv
Penetapan Panitia Penguji .....	v
Ucapan Terima Kasih .....	vi
Ringkasan .....	viii
Summary .....	x
Abstrak .....	xii
Abstract .....	xiii
DAFTAR ISI .....	xiv
DAFTAR TABEL .....	xvii
DAFTAR GAMBAR .....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xix
DAFTAR SINGKATAN .....	xx
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.3.1 Tujuan umum .....	4
1.3.2 Tujuan khusus .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
1.4.1 Manfaat akademis .....	4
1.4.2 Manfaat terapan .....	4

BAB 2	TINJAUAN PUSTAKA .....	5
2.1	Asam Retinoat .....	5
2.1.1	Absorpsi,transportasi dan metabolisme asam retinoat.....	9
2.2	Organogenesis Dan Teratogenitas .....	18
2.2.1	Klasifikasi mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	18
2.2.2	Siklus birahi .....	19
2.2.3	Perkembangan normal mencit .....	20
2.2.4	Tingkat organogenesis pada perkembangan embrio mencit .....	23
2.2.5	Kelainan kongenital eksternal.....	26
2.2.6	Prinsip-prinsip teratogenitas .....	27
2.3	Hubungan Teratogenitas Asam Retinoat .....	31
2.3.1	Mekanisme teratogenitas vitamin A .....	36
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....	44
3.1	Kerangka Konseptual Penelitian .....	44
3.2	Dasar Teori .....	45
3.3	Hipotesis Penelitian .....	47
BAB 4	MATERI DAN METODE PENELITIAN .....	48
4.1	Rancangan Penelitian .....	48
4.2	Populasi Sampel Dan Besar Sampel.....	49
4.3	Variabel Penelitian .....	49
4.3.1	Klasifikasi variabel .....	49
4.3.2	Definisi operasional variabel .....	50
4.4	Bahan Penelitian .....	52
4.4.1	Hewan coba .....	52
4.4.2	Bahan penelitian .....	52
4.5	Alat Penelitian .....	53
4.5.1	Alat pemeliharaan mencit dan perlakuan .....	53
4.6	Prosedur Penelitian .....	54
4.6.1	Lokasi dan jadwal penelitian .....	54
4.6.2	Jadwal penelitian .....	54
4.7	Prosedur Pengambilan atau Pengumpulan Data.....	54
4.7.1	Tahap persiapan hewan coba.....	54
4.7.2	Proses penimbangan dan mengawinkan mencit. ....	55
4.7.3	Penentuan dosis. ....	57
4.7.4	Perlakuan dan pengelompokkan hewan percobaan. ....	58
4.7.5	Pembedahan.....	59
4.7.6	Pengamatan dan pengambilan janin mencit. ....	59
4.8	Cara Pengumpulan Dan Analisa Data .....	62
4.8.1	Pengumpulan data.....	62
4.8.2	Analisis data.....	62

BAB 5. HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN .....	63
5.1 Data Penelitian .....	63
5.2 Analisis Dan Hasil Penelitian .....	67
5.2.1 Hasil analisis uji normalitas.....	67
5.2.2 Hasil uji homogenitas .....	68
5.2.3 Hasil uji <i>t-test</i> 2 sampel bebas .....	68
5.2.4 Analisis hasil reproduksi .....	69
5.2.5 Kelainan bawaan eksternal .....	71
BAB 6. PEMBAHASAN .....	76
6.1 Hasil Penelitian setelah perlakuan .....	76
6.1.1 Pengaruh pemberian asam retinoat pada hasil reproduksi induk.....	76
6.1.2 Pengaruh pemberian asam retinoat pada morfologi fetus.....	78
BAB 7. PENUTUP .....	88
7.1 Kesimpulan .....	88
7.2 Saran .....	89
DAFTAR PUSTAKA.....	90
LAMPIRAN.....	95

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
Tabel 4.1 : Definisi operasional variabel.....	50
Tabel 4.2 : Jadwal penelitian .....	54
Tabel 5.1 : Data kasar hasil reproduksi kelompok kontrol.....	64
Tabel 5.2 : Data kasar hasil reproduksi kelompok perlakuan.....	65
Tabel 5.3 : Hasil uji normalitas data.....	67
Tabel 5.4 : Hasil uji homogenitas data.....	68
Tabel 5.5 : Hasil uji <i>t-test</i> 2 sampel bebas .....	69
Tabel 5.6 : Persentase hasil resorpsi, fetus mati dan fetus hidup .....	69
Tabel 5.7 : Hasil uji <i>Mann-Whitney</i> .....	59
Tabel 5.8 : persentase jumlah fetus dengan kelainan eksternal .....	71



## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1 : Struktur kimia vitamin A dan derivatnya .....	7
Gambar 2.2 : Aliran metabolisme dari retinol ke asam retinoat .....	15
Gambar 2.3 : Hubungan antara sintesis asam retinoat dalam tubuh .....	17
Gambar 2.4 : Skema kelainan bawaan pada fetus .....	31
Gambar 2.5 : Model aksi ganda asam retinoat .....	38
Gambar 3.1 : Bagan kerangka konseptual.....	44
Gambar 4.1 : Mencit dalam kandang.....	55
Gambar 4.2 : Mencit dalam timbangan.....	56
Gambar 4.3 : Pemberian perlakuan dengan <i>gavage</i> .....	59
Gambar 5.1 : Uterus induk mencit UK-18 hari .....	70
Gambar 5.2 : Bentuk palatum fetus mencit .....	72
Gambar 5.3 : Fetus dengan anggota normal.....	73
Gambar 5.4 : Fetus dengan kelainan anggota.....	74
Gambar 5.5 : Fetus dengan kelainan anggota.....	75
Gambar 5.6 : Fetus dengan kelainan eksternal.....	75

**DAFTAR LAMPIRAN**

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1 : Tabulasi Data .....	95
Lampiran 2 : Analisis Deskriptif.....	101
Lampiran 3 : Uji Normalitas .....	102
Lampiran 4 : Uji <i>t-test</i> 2 sampel. bebas.....	104
Lampiran 5 : Uji <i>Mann-Whitney</i> .....	105

## DARTAR SINGKATAN

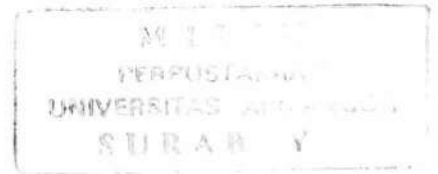
ADP	=	Adenosin Difosfat
AER	=	Apical Ectoderm Ridge
ARAT	=	Acyl-coenzyme retinol Acyl Transacylase
ATP	=	Adenosin Trifosfat
CRABP	=	Cellular Asam Retinoat Binding Protein
CRBP	=	Celluler Retinol Binding Protein
DNA	=	Deoxyribo Nucleic Acid
FGF4	=	Fibroblast Growth Factor 4
LRAT	=	Lecithin-Retinol Acyl-Transferase
NAD	=	Nicotinamide Adenine Dinucleotida
NADP	=	Nicotinamide Adenine Dinucleotida Phosphate
RAR	=	Receptors Asam Retinoat
RBP	=	Retinol Binding Protein
RNA	=	Ribo Nucleic Acid
RXR	=	Retinoid X Receptors
UK	=	Umur Kebuntingan

**BAB 1**

**PENDAHULUAN**

# BAB 1

## PENDAHULUAN



### 1.1 Latar Belakang

Vitamin merupakan senyawa organik yang dibutuhkan dalam jumlah kecil untuk berbagai fungsi biokimiawi yang umumnya tidak disintesis oleh tubuh sehingga harus dipasok dari makanan. Pemasokan vitamin yang larut dalam lemak ini memerlukan absorpsi lemak yang normal agar vitamin tersebut dapat diabsorpsi secara efisien. Begitu diabsorpsi molekul vitamin tersebut harus diangkut dalam darah yaitu oleh lipoprotein atau protein pengikat yang spesifik (Joyce, 1996).

Vitamin A merupakan salah satu vitamin yang larut dalam lemak. Vitamin A terdapat dalam beberapa bentuk misalnya retinal, asam retinoat (*retinoin / all-trans-asam retinoat, isotretinoin / 13-cis asam retinoat*) dan retinol. Vitamin A diperlukan untuk banyak proses biokimiawi, membantu pembentukan pigmen penglihatan, untuk pertumbuhan dan perkembangan tulang (Murray, 2000).

Vitamin A mempunyai provitamin yaitu karoten. Pada sayuran vitamin A terdapat sebagai provitamin dalam bentuk pigmen berwarna kuning  $\beta$  karoten (Murray, 2000). Vitamin A telah dipakai untuk pengobatan penyakit kulit seperti jerawat, tetapi dosis yang berlebihan dapat bersifat toksik (Sulistia, 1995).

Kelebihan vitamin A selama kehamilan ( $> 6000$  IU) dapat menimbulkan efek teratogenik pada janin (Joyce, 1995). Kelebihan pemakaian vitamin A harus dihindari karena vitamin ini bersifat hanya larut dalam lemak, dan disimpan di dalam hati, serta lambat diekskresikan dari tubuh. Vitamin A diekskresikan melalui ginjal dan feses (Murray, 2000).

Pemakaian bahan kimia pada ibu hamil trimester pertama banyak menyebabkan kecacatan, dikarenakan dalam masa ini terjadi proses organogenesis, sehingga mengakibatkan embrio sangat rentan terhadap efek teratogenik, mengakibatkan kelainan tergantung pada organ yang paling peka terhadap zat teratogen yang diberikan (Lu, 1995).

Vitamin A yang berlebih akan terakumulasi dalam tubuh, karena vitamin A akan ditimbun dalam jaringan hingga dapat meracuni tubuh dan menimbulkan kelainan pada perkembangan anggota tubuh (Solihin, 2000 dalam Riami, 2005). Beberapa penelitian menggambarkan adanya kelainan pada fetus mencit yang induknya diinduksi vitamin A. Pemberian asam retinoat menyebabkan kelainan anggota seperti *polidactyly*, *micromelia*, *ectrodactyly*, *syndactyly*, *club foot* (Kwasigroch, 1991).

Asam retinoat yang diberikan pada umur kebuntingan 9,5 hari, menyebabkan *hipodactyly* yang mengarah pada gangguan pola asimetris jari, jari pertama panjang dan *polidactyly* yang asimetris (Niederreither, 2002). Pemberian asam retinoat pada dosis 75 dan 100 mg/kg berat badan tidak 100% berpengaruh terhadap perkembangan fetus mencit, karena ada beberapa yang mengalami kelainan (Yulia, 2004).

Pemberian asam retinoat pada mencit bunting umur kebuntingan 11 hari dengan dosis 30 mg/Kg berat badan terjadi kelainan ukuran tulang, sedangkan dampak maksimum dan total kecacatan janin adalah dosis 60 mg/Kg berat badan atau lebih tinggi. Insiden pada celah palatum meningkat yang disebabkan pemberian dosis maksimum 100 mg/Kg berat badan (Jerry, 2004), penelitian ini

menggunakan asam retinoat dengan dosis tunggal 60 mg/Kg berat badan, pada dosis tersebut di harapkan mampu memberikan efek teratogenik.

Umur kebuntingan hari ke-10, merupakan masa organogenesis atau morfogenesis yaitu merupakan masa paling penting untuk perkembangan normal dari sebagian besar organ dan sistem organ. Kebuntingan hari ke-10 merupakan masa kritis organogenesis dari anggota tubuh, skeletal dan mata (Rugh, 1968).

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek pemberian asam retinoat pada induk mencit (*Mus musculus*) UK-10 hari pada hasil reproduksi induk (Berat badan fetus, jumlah fetus hidup, jumlah fetus mati, embrio teresorbsi, jumlah implantasi plasenta) dan kelainan bawaan eksternal fetus mencit.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan di atas, maka dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah pemberian asam retinoat dosis 60 mg/Kg BB pada mencit (*Mus musculus*) dengan umur kebuntingan 10 hari menyebabkan penurunan hasil reproduksi induk mencit (Berat badan fetus hidup, jumlah fetus hidup, jumlah fetus mati, embrio teresorbsi, jumlah implantasi plasenta) ?
2. Apakah pemberian asam retinoat dosis 60 mg/Kg BB pada mencit (*Mus musculus*) dengan umur kebuntingan 10 hari dapat menyebabkan terjadinya kelainan bawaan eksternal pada fetus mencit ?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan umum**

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh asam retinoat terhadap fertilitas induk mencit, dengan membuktikan pemberian asam retinoat secara oral dosis 60 mg/Kg berat badan pada induk mencit umur kebuntingan 10 hari menyebabkan penurunan hasil reproduksi induk mencit dan terjadinya kelainan bawaan eksternal pada fetus mencit.

#### **1.3.2 Tujuan khusus**

1. Membuktikan pengaruh pemberian asam retinoat dosis 60 mg/Kg BB pada mencit (*Mus musculus*) dengan umur kebuntingan 10 hari menyebabkan penurunan hasil reproduksi induk mencit.
2. Membuktikan pengaruh asam retinoat dosis 60 mg/Kg berat badan pada mencit (*Mus musculus*) dengan umur kebuntingan 10 hari menyebabkan terjadinya kelainan bawaan eksternal pada fetus mencit.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

#### **1.4.1 Manfaat akademis**

Hasil penelitian ini dapat mengungkap bentuk kelainan pertumbuhan abnormal janin mencit secara komprehensif akibat paparan vitamin A yang berlebihan.

#### **1.4.2 Manfaat terapan**

Sebagai bahan masukan dan bahan pertimbangan untuk kalangan praktisi klinis dalam menginformasikan tentang efek teratogenik pada pemakaian vitamin A yang berlebihan dapat menyebabkan kelainan morfologis atau cacat bawaan janin pada wanita hamil.



## **BAB 2**

# **TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Asam Retinoat

Vitamin A adalah salah satu vitamin yang larut dalam lemak, merupakan suatu molekul apolar hidrofobik yaitu berupa senyawa *polyisoprenoid* yang mengandung cincin sikloheksional, hampir tidak berwarna, tidak larut dalam air, larut dalam lemak dan pelarut lemak. Molekul ini tidak dapat disintesis oleh tubuh dalam jumlah yang memadai sehingga harus dipasok dari makanan (Murray, 2000).

Pemasokan vitamin yang larut lemak memerlukan penyerapan lemak yang normal agar vitamin tersebut dapat diserap dengan efisien. Setelah diserap, molekul vitamin tersebut harus diangkut dalam darah seperti halnya lipid apolar yang lain, di dalam lipoprotein atau protein pengikat yang spesifik (Joyce, 1995).

Vitamin A bisa ditemukan sebagai alkohol (retinol), sebagai aldehid (retinal), dan sebagai *acid* (asam retinoat) pada bentuk bebas setelah mengalami esterifikasi dengan asam lemak contohnya sebagai vitamin A palmitat (Church, 1988).  $\beta$ -karoten merupakan provitamin A, yang dapat membentuk 2 molekul vitamin A, ditemukan pada semua bagian tanaman yang hijau dan sebagian besar berwarna kuning, terdapat dalam sejenis kol, bayam dan wortel (Mutschler, 1991).

Retinol yaitu alkohol primer 20 karbon yang terdapat pada berbagai bentuk isomer, sebagian besar berasal dari makanan terdapat dalam bentuk ester. Retinal berasal dari karotenoid yang diserap dari makanan atau ester-ester retinol dan memiliki aktivitas vitamin A.

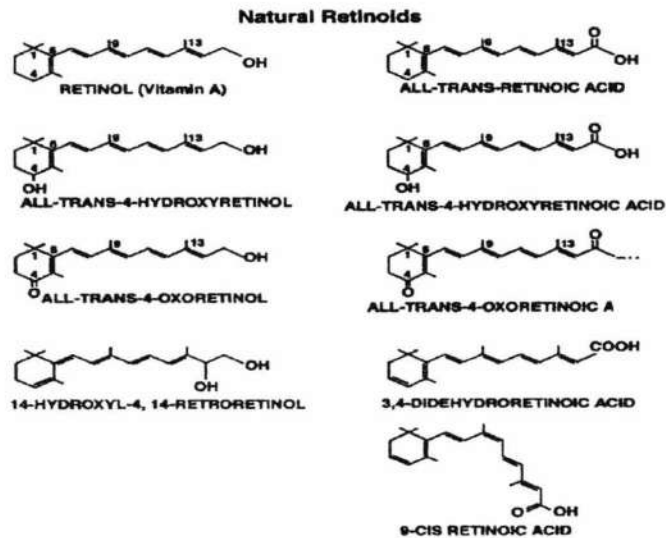
Asam retinoat, derivat oksidasi dari retinol yang dibentuk melalui karboksilasi terhadap gugus aldehid retinal, zat ini diyakini merupakan bentuk vitamin A yang berperan dalam perkembangan dan pertumbuhan tulang serta pemeliharaan struktur normal epitel (Almatzier, 2003).

Retinol dan retinal dapat saling berubah oleh perubahan *nicotinamide adenine dinucleotida* (NAD) atau *nicotinamide adenine dinucleotida phosphate* (NADP) dan membutuhkan *dehydrogenase* atau *reduktase*. Tetapi bentuk dari retinoid yaitu asam retinoat tidak dapat berubah kembali ke bentuk retinal atau retinol (Almatzier, 2003; Dorland, 2002).

Asam retinoat mempunyai beberapa macam struktur dengan kemampuan teratogenik yang berbeda-beda, dapat berupa asam retinoat alami maupun sintetik. Retinol setelah terikat dengan protein akan diangkut ke dalam sel dan terikat pada protein nukleus, retinol mungkin terlibat dalam pengendalian ekspresi gen tertentu. Sumber retinoid yang alami untuk jaringan embrionik adalah retinol maternal. Berdasarkan struktur kimianya terdapat enam tipe asam retinoat yang mengikat protein nukleus, yaitu tiga ikatan *all-trans* asam retinoat meliputi 4-hidroksi-retinol, 4-okso-retinol, dan 14-hidroksi-4, 14-retro-retinol dan tiga mengikat *9-cis* asam retinoat meliputi 4-hidroksi-RA, 4-okso-RA, 3,4-didehidro-RA (ddRA). Vitamin A merupakan reseptor kompleks termasuk *all-trans* asam retinoat merangsang transkripsi beberapa gen spesifik, dan rangsangan ini diperkuat oleh kompleks yang melibatkan *9-cis* asam retinoat. Pengikat alami bagi *all-trans* asam retinoat adalah *retinoic acid receptors* (RAR) dan *9-cis* asam retinoat adalah *retinoid X receptors* (RXR) (Ross, 2000).

Vitamin A juga menyebabkan perubahan dalam metabolisme pengaturan genetik. Perubahan ini melibatkan pembentukan glikoprotein (Broody, 1994 *dalam* Kiptiyah, 2002).

Struktur kimia Retinoid seperti gambar di bawah ini :



**Gambar 2.1** Struktur Kimia Vitamin A Dan Derivatnya (Ross, 2000)

Kebutuhan vitamin A, khususnya pada hewan coba mencit untuk makanan alam bahan formula adalah 15.000 IU/Kg BB, dari makanan murni 1.100 - 4.000 IU/Kg BB, dan dari serapan bahan kimia 1.730 IU/Kg BB (Jacoby, 1984 *dalam* Riami, 2005). Kebutuhan vitamin A sehari-hari pada manusia adalah 1.000 - 4.000 IU bagi anak-anak, 4.000 - 5.000 IU bagi orang dewasa, dan 5.000 - 6.000 IU pada wanita hamil dan laktasi. WHO menganjurkan maksimal 8.000 IU sehari bagi wanita hamil, jika dikonversi 20,8 IU/20g/hari angka konversi tersebut diperoleh dosis minimal asam retinoat untuk mencit (20) g = 0,0026, karena pada dosis tinggi (25.000 IU sehari atau lebih) dapat meningkatkan resiko teratogen atau cacat pada janin (Tjay, 2003 *dalam* Riami, 2005 ).

Toksisitas dari vitamin A tergantung pada umur pemberian, dosis, lama pemberian, walaupun toksisitas vitamin A tidak umum ditemukan terjadi pada orang dewasa yang mengkonsumsi < 30 mg/hr. Gejala toksisitas yang ringan dapat dideteksi pada orang dewasa yang mengkonsumsi 10 mg/hr selama 6 bulan. Terjadi toksisitas akut pada pemakaian  $\geq 500$  mg untuk orang dewasa,  $\geq 100$  mg pada anak,  $\geq 30$  mg pada bayi sering menimbulkan keracunan. Pada anak dan bayi pemakaian 20.000 IU atau 6 mg setiap hari selama 1-2 bulan menyebabkan toksis (Goodman, 2001).

Pemberian asam retinoat pada mencit bunting umur kebuntingan 11 hari dengan dosis 30 mg/Kg berat badan terjadi kelainan ukuran tulang, sedangkan dampak maksimum dan total kecacatan janin adalah dosis 60 mg/Kg berat badan atau lebih tinggi. Insiden pada pembelahan palatum meningkat yang disebabkan pemberian dosis maksimum 100 mg/Kg berat badan (Jerry, 2004).

Diketahui pula bahwa vitamin A berperan dalam sintesis beberapa hormon steroid. Terdapat sejumlah hormon steroid yang dipengaruhi vitamin A, khususnya pada masa kehamilan dan juga gangguan proses pengaturan keseimbangan garam dan cairan tubuh (Sediaoetama, 2000).

Asam retinoat yang berasal dari vitamin A, berfungsi seperti hormon steroid. Hormon steroid ini mendorong pertumbuhan dan diferensiasi jaringan epitel, mengoptimalkan pertumbuhan tulang, dan meningkatkan perkembangan janin. Oleh sebab itu, tubuh memerlukan asupan makanan yang mengandung vitamin A dari luar. Hal ini dikarenakan, tubuh tidak dapat memproduksi vitamin A secara langsung (Wendling, 2001).

Hormon steroid ini berikatan dengan reseptor di inti sel sasaran, dan kompleks reseptor asam retinoat berikatan dengan elemen respon di DNA kemudian mempengaruhi transkripsi gen (Coskun,1998). Reseptor bagi asam retinoat termasuk dalam reseptor steroid. Protein yang dihasilkan oleh ekspresi gen diaktifkan oleh asam retinoat dan berperan menimbulkan efek vitamin A pada pertumbuhan, differensiasi, reproduksi dan perkembangan janin (Marks, 1996). Pada penelitian ini menggunakan asam retinoat karena derivat vitamin A yang lain sudah banyak yang meneliti dan *all-trans* asam retinoat di duga memiliki potensi teratogen lebih besar di bandingkan dengan *13-cis* asam retinoat (Kochhar, 1995).

Asam retinoat ini merupakan metabolit normal vitamin A untuk menjaga kesehatan dan membantu pertumbuhan yang dibutuhkan dalam jumlah sedang pada pembentukkan bentuk aktif. Asam retinoat dalam tubuh manusia akan diekskresikan lebih banyak melalui empedu dari pada melalui urine. Sedangkan pada tikus, hanya sedikit sekali yang diekskresikan melalui empedu (Prakkasi, 1992).

### **2.1.1 Absorpsi, transportasi dan metabolisme asam retinoat**

Bentuk awal vitamin A dalam makanan adalah *retinil ester* yang dikeluarkan oleh sel mukosa usus pada inti hidrofobik dari partikel kilomikron, akan tetapi sebelum direabsorpsi *retinil ester* tersebut dihidrolisis dahulu menjadi bentuk alkohol. Retinol ini akan memasuki dinding usus untuk kemudian diubah lagi menjadi *retinil ester* sebelum memasuki pembuluh limfe dan disalurkan ke hepar untuk disimpan. Vitamin A dibawa ke hepar setelah melalui sirkulasi limfatik, dan akhirnya masuk ke plasma setelah melewati duktus toratikus. Vitamin A juga dapat diabsorpsi melalui jalan non limfatik (Combs, 1992).

Sementara retinol dan *retinil ester* ditranspor melalui sistem limfatik sebagai komponen kilomikron, asam Retinoat ditranspor ke dalam sirkulasi umum melalui vena porta, dalam bentuk anion karboksilat yang terikat pada serum albumin. Asam Retinoat yang terbentuk *in vivo* mengikuti jalur yang sama dengan asam Retinoat yang diberikan per oral. Asam retinoat di transportasikan dalam serum tikus terikat dengan serum albumin dan bukannya protein terikat retinol (RBP - *Retinol Binding Protein*). Ada kemungkinan bahwa analog Asam Retinoat ( $\alpha$ -Asam Retinoat, RO 8-7699) juga beredar terikat pada serum albumin (Jerry, 2004).

*Retinil ester* yang baru diabsorpsi segera dibawa memasuki hepar bergabung dengan sisa kilomikron oleh *receptor mediated* secara endositosis (pengambilan bahan dari lingkungan oleh sebuah sel melalui invaginasi membran plasmanya, proses ini mencakup fagositosis dan pinositosis) pada sel perenkim hepar. *Retinil ester* yang diterima terhidrolisis menghasilkan retinol. Retinol ini dapat ditransfer dari sel parenkim ke sel stelate dimana retinol mengalami reesterifikasi. Diperkirakan 90 – 95 % persediaan vitamin A dalam tubuh terdapat dalam bentuk *retinil ester* dalam sel Kupffer hepar. Ginjal, anak ginjal, testis dan payudara juga mengandung vitamin A (Pudjiadi, 2000).

Menurut Combs, 1992 vitamin A dalam tubuh 80 % disimpan di dalam sel stelata (sekitar 2 % dari total volume hati) dan dalam keadaan seimbang di dalam sel parenkim. Hampir semua vitamin A hepatic dalam bentuk rantai panjang *Retinil ester*, sedang yang bersifat predominan menjadi satu retinal palmitat.

Dalam hati, vitamin A disimpan dalam bentuk ester dalam liposit (sel stelata/perisinusoidal), yang mungkin sebagai suatu kompleks lipoglikoprotein (Murray, 2000).

Vitamin A dimobilisasi dari penyimpanannya di hepar sebagai ester pada sel liposit (*Perisinusoidal Stellate Cells*) mungkin sebagai lipoglikoprotein kompleks. Selama transportasi ke jaringan, *retinil ester* terhidrolisis dan retinol, kemudian dilepas ke dalam darah dengan terikat pada protein pengikat yaitu *Apo-retinol Binding Protein* (RBP), menghasilkan holo-RBP sebagai proses dalam Aparatus Golgi dan sisa dalam plasma. *Retinil ester* terbawa ke jaringan melalui reseptor yang terletak pada asam retinoat dan dibawa ke plasma setelah terikat pada albumin. RBP atau  $\alpha_1$ - globulin ini terdiri dari ikatan tunggal polipeptida, RBP memiliki tempat ikatan tunggal untuk retinol (Combs,1992). Bagian dalam sel ekstrahepatik retinol terikat oleh *Celluler Retinol Binding Protein* (CRBP) (Mayor, 2000).

Protein yang spesifik mengikat retinol seluler yaitu *cellular retinol-binding protein* (CRBP), Pada jaringan *Celluler retinol Binding Protein* (CRBP) mengikat retinol dan mengatur metabolisme vitamin A di dalam sel.

Fungsi CRBP adalah untuk mengkonsentrasi dan menyimpan retinol di tempat yang membutuhkan asam retinoat dalam konsentrasi yang relatif tinggi, sehingga retinol dapat diubah menjadi asam retinoat untuk proses morfogenetik. Sedangkan untuk asam retinoat membutuhkan *cellular retinoic acid binding protein* (CRABP) dengan afinitas yang tinggi (Ong dan Chytilo 1978), *Cellular retinoic acid binding protein* (CRABP), ditemukan di dalam sitoplasma fungsi dari protein sitoplasmik ini masih tidak jelas, dimana tidak didapatkan protein



yang serupa pada mekanisme kerja dari hormon steroid / thyroid, protein tersebut mungkin terlibat di dalam metabolisme retinoid yang diduga protein tersebut menunjukkan populasi sel yang responsif terhadap asam retinoat (Maden, 1991), dan mungkin bertanggungjawab di dalam pengaturan konsentrasi intrasel retinoid bebas, misalnya untuk menimbulkan gradien konsentrasi asam retinoat bebas (Smith, 1988).

Asam retinoat bebas yang terikat pada CRABP akan mempertahankan kadar asam retinoat aktif tetap pada kadar yang rendah, juga berguna untuk asam retinoat bebas yang terbentuk melalui pelepasan dari sel yang mengandung CRBP.

Kelch (1994) melaporkan bahwa sirkulasi RBP di dalam darah, transport retinol ke sel target tidak masuk ke jaringan. RBP ditemukan dalam 2 bentuk yaitu, Apo-RBP adalah bentuk bebas, dan Holo-RBP yang mengikat vitamin A, dan sirkulasi di dalam kompleks molar dengan prealbumin. Produk ini diambil oleh jaringan lewat reseptor sel permukaan. RBP dikatalisis dan diatur oleh ginjal setelah pengambilan retinol ke dalam sel. Retinol diatur melalui ekskresi fekal dan sejumlah kecil keluar melalui urine.

Asam retinoat diangkut di dalam plasma dalam keadaan terikat dengan albumin. Begitu berada di dalam sel ekstrahepatik, retinol akan terikat dengan protein pengikat retinol. Protein yang mengikat retinoid merupakan kelompok makromolekul yang mempunyai peranan sangat khusus bagi proses molekular dalam sel. Protein pengikat retinol merupakan polimer asam amino (polipeptida) yang mempunyai bermacam-macam fungsi, antara lain: sebagai katalisator reaksi biokimia dalam sel, pengangkut molekul-molekul kecil dan ion, berperan di dalam sistem pergerakan yang terkoordinasi, komponen sistem kekebalan tubuh,



feromon, penerus impuls saraf, komponen pendukung kekuatan-regang serta pengatur ekspresi genetik (Yuwono, 2005).

Transportasi vitamin A di dalam darah dan sel (Robert, 1994), terjadi sebagai berikut :

- a. Retinol dilepaskan dari hati kemudian berikatan dengan *retinol binding protein* (RBP). Pada plasma spesifik Zn dan pemberian protein yang cukup diperlukan untuk menghasilkan RBP. Retinol dan RBP bergabung dengan *Trans-Thyretin* (TTR, juga mengikat tiroksin) di dalam sirkulasi darah dengan perbandingan 1:1:1 kompleks trimolekuler.
- b. Pada kelompok plasma normal retinol dipertahankan hingga vitamin A yang disimpan di dalam hepar habis.
- c. Retinol RBP kompleks diambil oleh sel pada saat retinol berikatan dengan *Celluler retinol Binding Protein* (CRBP). Retinol dimasukkan ke dalam asam retinoat yang mengikat *Retinoic Acid Receptor* (dinamakan RAR dan RXR).

*Retinoic Acid Receptor* (RAR) mengikat asam retinoat dan mengatur ekspresi gen. Ikatan kompleks berinteraksi dengan DNA, dan mengatur transkripsi menjadi RNA. Asam retinoat telah melakukan feed back mekanisme, pada saat terjadi peningkatan kelompok-kelompok asam retinoat, sehingga aktivitas LRAT (*Lecithin Retinol Acyl Transferase*) meningkat, LRAT disimpan di dalam hati (Kelch, 1994).

Metabolisme vitamin larut lemak sangat lambat, sehingga dosis berlebihan dapat menimbulkan efek toksik (Dewoto, 2003). Metabolisme vitamin A terpusat disekitar transportasi dari retinol dengan berbagai cara konversi meliputi esterifikasi, konjugasi, oksidasi dan isomerasi. Retinol diesterifikasi pada sel usus

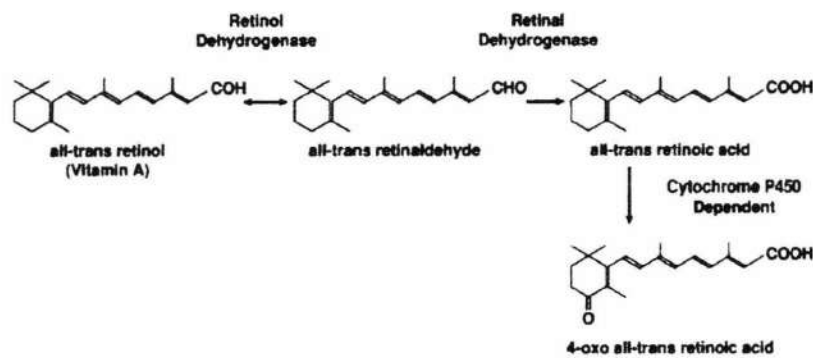
dan pada sebagian besar jaringan lainnya melalui enzim endoplasmik retikulum dengan menggunakan kelompok acyl dari fosfatidilkolin atau *Lecithin-Retinol Acyl-Transferase* (LRAT) atau *acyl-coenzym A Retinol Transacylase* (ARAT). Pada sistem ini terlihat tanda spesifik untuk asam lemak jenuh khususnya asam palmitat, yang kemudian menghasilkan retinil palmitat dalam jumlah yang banyak (Combs, 1992).

Retinol kemungkinan terkonjugasi dari salah satu cara ini, yaitu pertama melalui reaksi katalis oleh *Retinol-UDP-Glukonidase* yang ada dihati atau mungkin pada jaringan lain. Reaksi ini menghasilkan *retinil beta Glukorinida* yaitu suatu metabolit yang diekskresi dalam empedu. Kedua, melalui konjugasi ATP yang tergantung pada fosforilasi, menghasilkan *retinil phosphat* yang dikatalisis oleh *retinol-phosphorilase*. Pada konjugasi ini dihasilkan *guanosin diphosphomanose* yang telah diubah menjadi *glikosida retinil phosphomanose*, yang kemudian akan dibawa ke reseptor-reseptor glikoprotein. Retinol yang dihasilkan melalui fosforilase secara *in vivo* jumlahnya sedikit. Secara fisiologis, reaksi melalui jalur ini belum diketahui dengan jelas (Combs, 1992).

Retinol dioksidasi kembali oleh  $\text{NADH}^+$  atau NADPH menjadi retinal tergantung pada *retinol dehidrogenase*. Reaksi ini bisa terjadi pada jaringan lain tapi yang terbesar terjadi pada testis. Retinol bersifat *irreversibel* setelah mengalami oksidasi oleh *retinol oksidase* menghasilkan asam retinoat. Asam retinoat dioksidasi menjadi 4-oxo *all-trans* oleh enzim cytochrome P 450 dependent. Enzim ini sangat penting karena enzim ini yang bertanggung jawab atas aktivasi metabolik untuk zat prokarsinogen dan terdapat dalam retikulum endoplasma (Murray, 2000). Oksidasi retinol menjadi retinaldehida membutuhkan

$\text{NAD}^+$  dan bersifat bolak-balik, langkah berikutnya menjadi asam retinoat tidak *reversibel* dalam jaringan hewan. Oleh karena itu hanya konsumsi retinol dan retinal yang dapat menghasilkan penyimpanan vitamin (Linder, 1992).

Rentangan reaksi ini pada umumnya lebih besar pada *retinol dehidrogenase*, dengan rentangan reduksi retinal menjadi retinol yang sangat rendah (Combs, 1992).



**Gambar 2.2** Aliran Metabolisme Dari Retinol Ke Asam Retinoat Dan Oksidasinya. (Ross, 2000)

Retinol dan retinal dapat melakukan interkonversi dengan adanya enzim *dehidrogenase* atau reduktase yang memerlukan NAD atau NADP di dalam banyak jaringan. Namun demikian, begitu terbentuk dari retinal, asam retinoat tidak dapat diubah kembali menjadi retinal atau retinol. Jadi asam retinoat dapat mendukung pertumbuhan dan diferensiasi, tetapi tidak dapat menggantikan retinal dalam peranannya pada penglihatan ataupun retinol dalam dukungannya pada sistem reproduksi.

Asam retinoat meregulasi perkembangan dengan mengaktivasi transkripsi gen pada banyak lokasi yang berbeda dalam embrio. Suatu sel tertentu hanya akan merespons asam retinoat jika (Ross, 2000) :

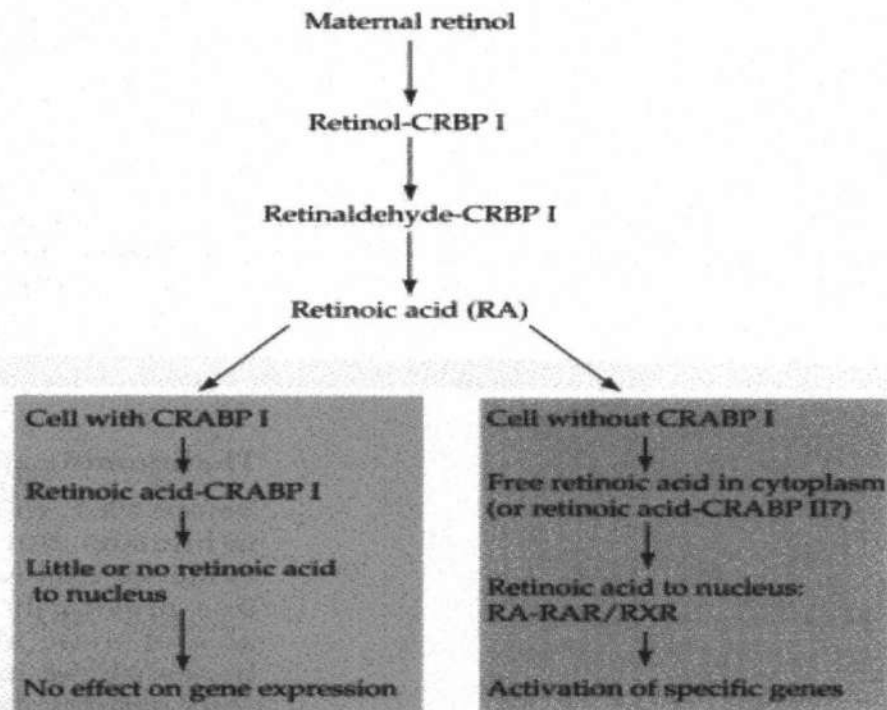
- 1) ia mengekspresikan reseptor asam retinoat.
- 2) konsentrasi asam retinoat berada dalam rentang yang sesuai bagi responsnya.

Ada dua model kerja asam retinoat dalam tubuh. Selain protein RAR yang berperan sebagai faktor transkripsi di inti sel, terdapat juga protein sitoplasmik yang mengikat retinoid. Salah satunya, *cellular retinol binding protein* (CRBP1) terdapat pada *yolk sac*, yang mengikat retinol dari sirkulasi ibu (Ruberte, 1991).

Mekanisme kerja asam retinoat bermula dari retinol yang berasal dari tubuh induknya, kemudian membentuk Retinol-CRBP1 yang dilanjutkan dengan membentuk Retinaldehyde-CRBP1 dan akhirnya protein tersebut membawa retinol ke jaringan. Retinol tersebut diubah menjadi asam retinoat, kemudian untuk model aksi yang pertama, sel yang mempunyai CRBP1, akan dapat mengikat asam retinoat yang terdapat dalam sitoplasmanya, sehingga tidak adanya asam retinoat yang menuju inti. Hal ini menyebabkan tidak terjadi pengekspresian gen.

Sedangkan untuk model aksi yang kedua, di dalam sel yang tidak terdapat CRBP1 akan menyebabkan asam retinoat bebas berada di sitoplasma, yang akan masuk ke inti dan berikatan dengan CRABP 2, menyebabkan pengekspresian gen spesifik (Desbois, 1991). Sel mempunyai dua bagian utama yaitu nukleus dan sitoplasma, nukleus merupakan pusat pengaturan sel dan mengatur reproduksi sel, nukleus mengandung sejumlah besar DNA yang disebut sebagai Gen (Guyton, 1997).

Asam retinoat eksogen sangat mungkin berperan sebagai teratogen pada jaringan yang memiliki RAR maupun protein CRABP1 yaitu: *sel neural crest kranial* dan *hindbrain*. Pada jaringan ini, asam retinoat eksogen mengelilingi blokade pertahanan CRABP dan bisa berikatan dengan RAR inti (Maden,1991; Morris, 1993).



**Gambar 2.3** Hubungan Antara Sintesis Asam Retinoat Dalam Tubuh (Morriss, 1993)

Skema hipotesis yang menjelaskan hubungan antara sintesis asam retinoat, asam retinoat terikat protein, dan reseptor pada embrio mamalia. Jika CRABP jenuh dengan suplai asam retinoat eksternal, asam retinoat akan mampu memasuki inti sel, berikatan dengan reseptornya dan mengubah pola normal ekspresi gen (Morris,1993).

## 2.2 Organogenesis Dan Teratogenitas

### 2.2.1 Klasifikasi mencit (*Mus musculus*)

Klasifikasi mencit (*Mus musculus*) menurut Storer dan Usinger (1957) :

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Sub Phylum	: Vertebrata
Classis	: Mamalia
Sub Class	: Theria
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: Mus
Spesies	: <i>Mus musculus</i>

Mencit memiliki kemampuan untuk hidup selama 2,5-3 tahun. Mencit tergolong hewan menyusui yang dapat dikawinkan pada umur 8 minggu dengan lama kebuntingan antara 18-20 hari. Masa reproduksinya antara 2-14 bulan dan memiliki masa estrus 4-5 hari (Rugh, 1968). Siklus estrus biasanya dimulai mencit umur 6-7 minggu (Taylor, 1986). Mencit rata-rata melahirkan pada umur kebuntingan 19 hari dengan rata-rata jumlah anak 10 ekor dan menyusui anaknya selama 21 hari (Rugh, 1968).

Anak mencit yang baru lahir pada tubuhnya belum mempunyai rambut dengan mata dan telinga masih dalam keadaan tertutup. Rambut terlihat setelah berumur 2-3 hari yang disertai dengan membukanya telinga, tetapi matanya baru terbuka setelah umur 14 hari. Mencit jantan lebih agresif dengan perawakan yang lebih besar dan *glandulla mammae* yang tidak berkembang, sedangkan pada mencit betina *glandulla mammae* berkembang dengan *papilla mammae* berjumlah 5 pasang yaitu 3 pasang pada dada dan 2 pasang pada abdominal (Rugh, 1968).

Mencit digunakan sebagai hewan coba pada penelitian ini karena mudah berkembang biak dengan masa kebuntingan yang relatif cepat, mempunyai jumlah anak yang cukup banyak, perawatan dan pemeliharaannya cukup mudah, dan mudah didapat dengan harga yang relatif murah (Kusumawati, 2004).

### 2.2.2 Siklus birahi

Siklus birahi pada mencit selesai dalam empat sampai enam hari, ini dipengaruhi oleh cahaya, suhu, status nutrisi dan hubungan sosial. Pada mencit ini siklus birahi memiliki waktu pendek, ovarium pada mencit mengandung folikel pada berbagai stadium pembentukan, demikian juga mengandung korpus luteum pada beberapa siklus sebelumnya (Bagnara, 1986).

Siklus ini dapat dibagi menjadi empat stadium :

1. Proestrus : Stadium ini menunjukkan datangnya awal proses birahi ditandai dengan involusi fungsional korpus luteum serta pembengkakan praovulasi folikel. Epithel berinti besar-bulat, berbentuk sel teratur (Partodiharjo, 1992).
2. Estrus : Stadium ini merupakan periode birahi dan kopulasi dimungkinkan hanya pada saat ini. Kondisi ini berakhir 9 sampai 15 jam. Pengaruh FSH menimbulkan folikel ovarium tumbuh dengan cepat. Periode ini juga merupakan periode sekresi estrogen. Selama masa estrus ovulasi terjadi ditandai dengan perubahan histologi yang menunjukkan adanya luteinisasi awal. Sel berkornifikasi penuh, bentuk tidak teratur, inti sel mengecil.



3. Metestrus : Stadium ini terjadi setelah ovulasi dan merupakan saat antara estrus dan diestrus. Periode ini berakhir 10 sampai 14 jam dan biasanya kopulasi tidak terjadi. Ovarium mengandung korpus luteum dan folikel kecil. Sel epitel kornifikasi, tampak adanya lekosit (Hunter, 1993).
4. Diestrus : Stadium ini berakhir 60 sampai 70 jam, Pada siklus ini mencit tidak bunting karena oosit tidak dibuahi oleh spermatozoa. Oosit ini mati dan diabsorpsi oleh endometrium. Banyak lekosit atau penuh.

### **2.2.3 Perkembangan normal mencit**

Individu baru terbentuk melalui fertilisasi antara ovum dan sperma. Pada mamalia, fertilisasi terjadi di dalam tubuh hewan betina. Mencit maupun tikus hanya akan kawin jika betina dalam keadaan estrus. Lamanya siklus estrus pada betina biasanya antara 4-5 hari (Rugh, 1971). Fertilisasi terjadi di dalam oviduk, tepatnya sepertiga bagian sebelah atas oviduk. Dalam hal ini sperma biasanya dapat mencapai ovum dikarenakan gerakan dari sperma itu sendiri atau karena gerakan menggelombang uterus dan oviduk (Rugh,1971). Tahap-tahap perkembangan individu baru dimulai dari gametogenesis, yakni dengan terbentuknya empat sperma pada jantan dan satu ovum pada betina. Gametogenesis terjadi pada individu dewasa, yang kemudian dilanjutkan dengan adanya fertilisasi yakni penggabungan antara material sperma dan material ovum (Langman, 1985).

Menurut Lu (1995) setelah terjadinya fertilisasi, dimana keberhasilannya ditandai dengan adanya kehamilan. Selama periode kehamilan akan terjadi serangkaian proses perkembangan embrio. Proses perkembangan embrio diawali dengan proses pembelahan, diferensiasi, perpindahan dan organogenesis. Proses pembelahan (*cleavage*) dimulai dengan *kariokinesis* (pembelahan inti) dan setelah itu diikuti dengan *sitokinesis* (pembelahan sitoplasma) pada mamalia pembelahan terjadi secara holoblastis. Hambatan pembelahan zigot maupun embrio pada pemberian bahan toksik disebabkan oleh beberapa faktor yang berpengaruh pada proses pembelahan sel embrio yaitu adanya hambatan aktivasi beberapa faktor yang menstimulasi terjadinya mitosis yang dikenal *mitosis promoting factor* (MPF) yang berperan dalam proses pembelahan inti sel embrio (*kariokinesis*) dan adanya hambatan pada fungsi signal transduksi yang melibatkan peran *guanilatsiklase* dan *adenilsiklase* yang dalam proses pembelahan sitoplasma (*sitokinesis*) (Rugh,1968).

Rugh (1971), mengemukakan pembelahan sel yang pertama pada tikus maupun mencit terjadi 24 jam (1 hari) setelah pembuahan menjadi 1-2 sel yang terjadi secara cepat di dalam oviduk dan berulang-ulang. Menjelang hari ke- 2 setelah pembuahan embrio sudah berbentuk morula 16 sel. Bersamaan dengan pembelahan, embrio bergulir menuju uterus dan sel ini akan melewati fase morula hingga umur kebuntingan 3 hari. Menjelang hari ke- 3 kehamilan embrio telah masuk ke dalam uterus, tetapi masih berkelompok-kelompok. Pada akhirnya embrio akan menyebar di sepanjang kandungan dengan jarak yang memadai untuk implantasi dengan ruang yang cukup selama masa pertumbuhan. Diakhir tahap pembelahan akan terbentuk blastula. Blastula akan membentuk massa sel

sebelah dalam (ICM) dan *trophectoderm* yang akan berkembang menjadi plasenta. ICM akan berkembang menjadi *hipoblasts* dan *epiblasts*, dimana *epiblasts* akan berkembang menjadi embrio sedangkan *hipoblasts* akan berkembang menjadi selaput ekstra embrio.

Menurut Rugh (1971), blastomer akan terimplantasi pada hari ke-4 kehamilan dan berakhir pada hari ke-6 kehamilan. Kemudian diikuti dengan proses gastrulasi, yakni adanya perpindahan sel dan diferensiasi untuk membentuk lapisan *ektoderm*, *mesoderm* dan *endoderm*. Akhir tahap perkembangan adalah proses pembentukan organ dari lapisan *ektoderm*, *mesoderm*, *endoderm* dan derivat-derivatnya.

Fase perkembangan embrio selanjutnya adalah gastrula yang dicirikan dengan adanya 3 lapisan embrional (*ektoderm*, *mesoderm*, dan *endoderm*). Sel-sel dalam gastrula akan mengalami pergeseran atau migrasi dari satu tempat ke tempat lainnya yang disebut dengan gerakan morfogenesis, karena akan menghasilkan bentukan baru sebagai dasar pembentukan bagi tubuh (Rugh, 1968).

Pembentukan otak terjadi pada umur kebuntingan 7 hari yang diawali dengan pembentukan *neural plate*. Pada umur kebuntingan 11 hari terjadi *evaginasi epifisis* dan *hipofisis* otak. Saat umur kebuntingan 13 hari terjadi *sefalisasi* pada embrio. Fetus akan lahir pada umur kebuntingan 18-20 hari (Rugh, 1968). Pada penelitian ini perlakuan diberikan pada umur kebuntingan 10 hari dengan asumsi untuk melihat cikal bakal perkembangan organ khususnya pengamatan terhadap kematian sel yang ditimbulkan.

#### 2.2.4 Tingkat organogenesis pada perkembangan embrio mencit

Menurut Timbrell (1994), setelah pembuahan sel telur akan berkembang menjadi zigot diikuti pembelahan pertama menjadi embrio yang selanjutnya mengalami proliferasi, diferensiasi, migrasi dan organogenesis. Rangkaian kejadian ini dikontrol oleh informasi yang ditranskripsi dan ditranslasi dari DNA dan RNA. Selanjutnya dijelaskan pula bahwa instruksi untuk serangkaian kejadian yang terdapat pada tingkat organogenesis kemungkinan dikode oleh DNA, dan sebagai akibat dari mutasi atau kerusakan DNA diduga akan menyebabkan abnormalitas jika informasi itu ditranskripsi dan ditranslasi.

Kusumawati (1993), juga menambahkan bahwa pada saat organogenesis kelainan kongenital akibat pemberian bahan teratogen dapat terdeteksi. Bahan teratogenik yang terpapar pada periode ini dapat menyebabkan kelainan kongenital ringan maupun berat dan bahkan dapat menimbulkan kematian embrio. Terjadinya *polidactyly* melibatkan proliferasi berlebih sel-sel di wilayah yang berdekatan dengan tunas anggota. Sel-sel tersebut adalah sel yang berasal dari bagian leher, sisi tubuh dan ekor, yang bermigrasi ke tunas anggota. Migrasi tersebut merupakan respon terhadap FGF4 (*fibroblast growth factor 4*), pada sel-sel yang merespon tampak berada di wilayah AER (*Apical Ectoderm Ridge*).

Periode ini pada hewan *Rhizetia* berakhir pada hari ke-10 sampai hari ke-14. Telah diketahui bahwa tidak semua organ rentan terhadap zat teratogen pada saat yang sama dalam suatu kebuntingan. Sebagian besar embrio tikus sangat rentan pada hari ke-8 sampai hari ke-12, sedangkan untuk pembentukan palatum dan organ urogenital rentan pada tahap berikutnya (Lu, 1995).

Tahap organogenesis mencit terjadi mulai umur kebuntingan 8-16 hari. Dalam tahap organogenesis sistem indera atau mata, pada mencit mulai berlangsung pada umur kebuntingan 8-12 hari yang diawali dengan terbentuknya vesikel optik pada sisi ventrolateral dari prosencephalon pada saat tabung syaraf baru terbentuk lengkap. Rongga dari vesikel optik disebut dengan *opticoel*. Pada bagian pangkal dari vesikel optik menyempit dan membentuk tangkai optik yang tumbuh ke arah lateral dan menyebabkan vesikel optik mendekati ektoderm. Selanjutnya vesikel optik mengalami invaginasi, sehingga terbentuk lekukan di bagian yang berdekatan dengan ektoderm dan disebut dengan *optic cup*.

Terjadinya invaginasi sel-sel di bagian ventral dari *optic cup* tidak sempurna sehingga terbentuk suatu celah yang disebut dengan *choroid fissure* yang berhubungan dengan tangkai optik. Sel dari lapisan retina berproliferasi dengan cepat membentuk beberapa lapis sel. Sel yang berhadapan dengan rongga optik berkembang membentuk neuron yang serabut syarafnya melalui *choroid fissure* dan sisi ventral tangkai optik. Pembuluh darah yang masuk ke retina juga melalui tangkai optik kemudian melalui *choroid fissure*. Pada perkembangan selanjutnya *choroid fissure* akan menghilang dan serabut syaraf serta pembuluh darah terbungkus di dalam tangkai optik dan di bagian *ventral optic cup* (Sadler, 1997).

Pada organogenesis telinga, dimana telinga vertebrata terdiri atas organ keseimbangan (vestibula) dan organ pendengaran (cochlea). Telinga dibagi menjadi tiga bagian, yaitu telinga luar, telinga tengah dan telinga dalam. Pada mamalia yang terbentuk pertama kali adalah telinga dalam. Telinga dalam berasal dari *auditory placode*. Pada mencit *auditory placode* tersebut terbentuk pada umur

kebuntingan 8 hari, kemudian berinvaginasi membentuk *auditory pit*. *Auditory pit* menutup, terlepas dari ektoderm dan membentuk *auditory vesicle*. Penutupan akhir *auditory pit* untuk membentuk *vesicle* terjadi pada umur kebuntingan 9 hari. *Vesicle* kemudian terbentuk *utricle*, *sacculus*, saluran semisirkular serta *cochlea*. Sedangkan telinga tengah berasal dari kantung *pharynx* pertama dan telinga luar berasal dari celah *pharynx* pertama (Sadler, 1997).

Pada tahap organogenesis hidung berawal dari perkembangan dari *sense plate* dari lapisan ektoderm. Pada *sense plate* atau tepatnya pada anterolateral dari *ektoderm* mengalami penebalan membentuk *olfactory placode*. Pada mencit pembentukan *olfactory placode* terjadi pada umur kebuntingan 9 hari, dan selanjutnya *olfactory placode* tumbuh ke dalam membentuk *olfactory pit* yang kemudian akan berinvaginasi membentuk *olfactory sacs*. Dari *olfactory sacs* akan terbentuk neuroblast. Pada sel *olfactory placode* berproliferasi ke arah *pharynx* membentuk lubang hidung posterior dan lubang hidung anterior (Sadler, 1997).

Pembentukan kuncup anggota terjadi pada umur kebuntingan 8-12 hari dan masa kritisnya terjadi pada umur kebuntingan 10 hari. Bakal atau tunas anggota tubuh eksternal dibentuk dari proliferasi sel mesoderm somatik yang terletak di bawah ektoderm, sehingga terbentuk suatu tonjolan yang terbentuk seperti dayung (pada mamalia, ayam, dan ikan). Permukaan tonjolan ditutupi oleh suatu penebalan ektoderm yang disebut pematang ektoderm apikal (*Apical Ektoderm Ridge, AER*). Penebalan ektoderm ini biasanya terjadi pada umur kebuntingan 9 hari. Tunas anggota tubuh kemudian berubah bentuk dimana dari bentuk awal yang seperti dayung akan menjadi bentuk anggota tubuh yang sebenarnya. Terdapat suatu ketergantungan antara AER dan mesoderm. Jika

mesoderm tidak ada maka AER tidak terbentuk. Mesoderm yang terdapat di daerah pembentukan anggota tubuh berasal dari 2 sumber yaitu: mesoderm somatik dan somit. Adanya *Fibroblast Growth Factor 8 (FGF8)* yang dihasilkan oleh intermediate mesoderm, merangsang mesoderm untuk berproliferasi. Sel somit akan berdiferensiasi menjadi otot. Bentuk ini dicapai karena terjadi pertumbuhan secara diferensial yang disertai dengan apoptosis. Morfologi anggota tubuh dicapai melalui terjadinya apoptosis sepanjang tepi anterior dan posterior dari mesoderm tubuh (Gilbert, 1997).

### 2.2.5 Kelainan kongenital eksternal

Kelainan kongenital eksternal adalah kelainan morfologi fetus yang dapat diamati dari luar, urutan pengamatan adalah sebagai berikut :

- a. Kepala meliputi; otak, letak mata dan telinga serta langit-langit bagian atas, dengan kaca pembesar.
- b. Badan: Gastroschisis, haemorage, spina bifida, dll.
- c. Jumlah organ ekstremitas, letak dan jumlah jarinya.
- d. Ekor, diamati panjang dan bentuk ekor.
- e. Organ genetalia, untuk membedakan jenis kelamin fetus dilakukan dengan cara mengamati jarak antara genital tuberkel dan anus ; Jarak genital tuberkel dan anus fetus jantan relatif lebih jauh dibandingkan fetus betina.

Beberapa kelainan kongenital yang umumnya terjadi pada eksternal tubuh :

- Amelia* : Ekstremitas tidak ada sama sekali.  
*Pocomelia* : Kaki dan tangan tidak berkembang.  
*Simpodia* : Anggota kanan dan kiri menyatu.  
*Polydactyli* : Jumlah jari melebihi dari jumlah jari normal.

- Syndactyli* : Jari menggabung, baik hanya jaringan lunak atau sampai jaringan tulang. *Syndactyli* yang sempurna menyebabkan *ektrodactyli*.
- Ektrodactyli* : Jari hilang atau jumlah jari berkurang.
- Brachidactyli* : Jari yang pendek, sebagai akibat sebagian ruas jari menghilang atau terjadi pemendekan semua ruas jari.
- Talipes* : Telapak tangan atau kaki bengkok (pengkor).
- Agenesis tail* : Ekor yang tidak terbentuk.
- Kinky tail* : Bentuk ekor yang aneh, bengkok, memendek, atau tumpul.
- Palatoschysis* : Palatum / langit-langit bercelah.
- Cleft palate* : Terbukanya bagian atas mulut.
- Microcephaly* : Ukuran kepala lebih kecil dan normal.
- Macrocephaly* : Ukuran kepala lebih besar dari normal.
- Anotia* : Telinga tidak terbentuk.
- Aglossostomia* : Mulut terbuka dan tidak terbentuk lidah.
- Astomia* : Mulut tidak terbentuk
- Atelostomia* : Perkembangan mulut yang tidak sempurna (Taylor, 1986).

### 2.2.6 Prinsip – prinsip teratogenitas

Pemaparan bahan kimia yang berbahaya atau teratogen dapat menghalangi pertumbuhan dan diferensiasi, menyebabkan terjadinya kelainan janin. Tingkat keparahan kelainan janin tergantung pada sifat teratogen dan tahap pertumbuhan embrio pada saat terkena teratogen. Apabila terkena pada tahap awal organogenesis, pengaruh yang hebat ditemukan pada pertumbuhan organ atau anggota tubuh/ekstrimitas (Underwood, 1999).



Teratogen bekerja melalui proses (Poernomo , 2004) :

- (1) Mengubah kecepatan proliferasi sel
- (2) Menghalangi sintesis enzim
- (3) Mengubah permukaan sel, sehingga terjadi agregasi secara tidak teratur
- (4) Mengubah matriks yang mengganggu perpindahan sel
- (5) Merusak organizer atau daya kompetisi yang berespon

Teratogen adalah suatu zat yang dapat menimbulkan kelainan pada janin apabila induk yang sedang hamil terpapar oleh zat tersebut.

Senyawa Teratogen bersifat :

- a. Embriotoksik adalah zat yang bersifat toksik pada perkembangan embrio.  
Beberapa contoh yang bersifat embriotoksik adalah nikotin, 2-Methoxyethanol, MAA, Chromium Chloride.
- b. Antimitotic, umumnya digunakan sebagai pengobatan kanker, menghambat pembelahan sel-sel kanker. Sehingga dapat menyebabkan terjadinya hambatan pertumbuhan dan perkembangan.
- c. Sitotoksik, Zat yang dapat menyebabkan kematian sel, akan mampu menyebabkan terjadinya kelainan pada embrio.

Beberapa Prinsip-prinsip teratogenesis, menurut Poernomo (1999) sebagai berikut:

- (1) Kepekaan terhadap zat teratogen tergantung pada genotip dan pola teratogenesis ini berinteraksi dengan faktor-faktor lingkungan.
- (2) Kepekaan terhadap zat teratogenik tergantung pada fase kebuntingan saat terjadi pemaparan.

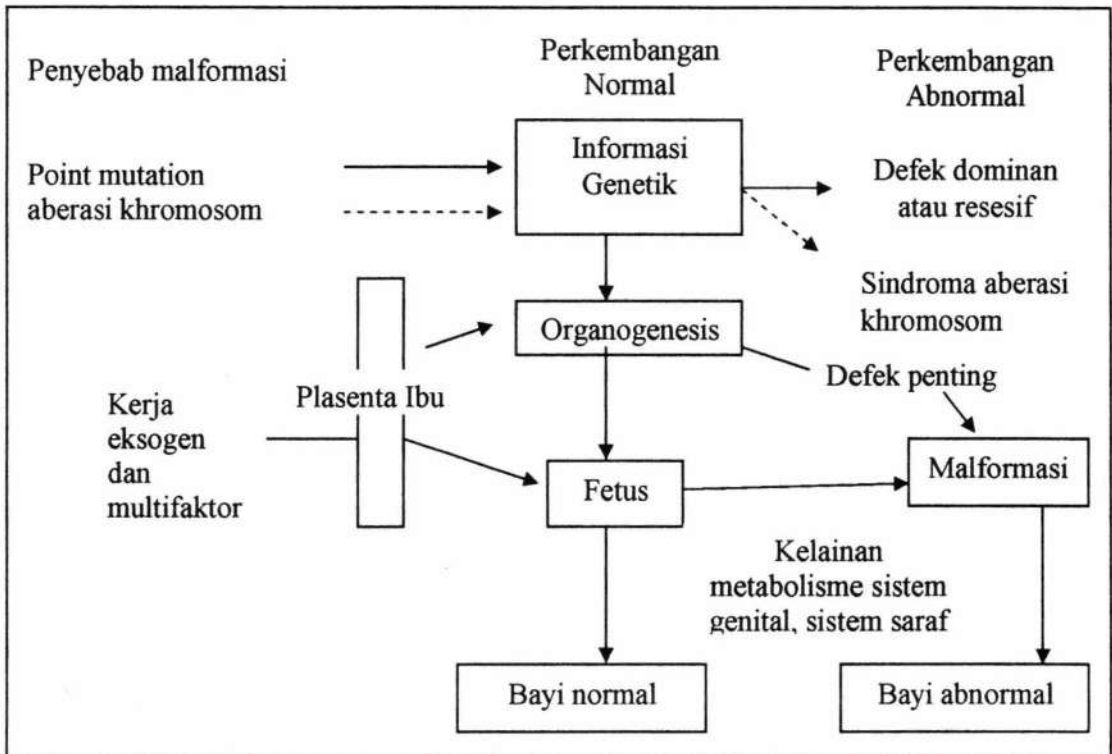
- (3) Setiap zat teratogenik mempunyai mekanisme tersendiri dalam mempengaruhi pertumbuhan sel dan jaringan untuk mengawali terjadinya embriogenesis yang abnormal.
- (4) Manifestasi akhir dari perkembangan yang abnormal adalah kematian, malformasi, lambatnya pertumbuhan dan gangguan fungsional. Kelambatan pertumbuhan terjadi jika pemaparan terjadi pada saat periode fetus. Efek tertentu dari gangguan fungsional dapat terlihat selama masa pertumbuhan dan masa kanak-kanak, sedangkan kematian organisme terjadi pada saat masih embrio. Ini terjadi jika malformasi parah, penghentian pertumbuhan secara keseluruhan atau kerusakan umum pada fungsi yang penting.
- (5) Pengaruh dari lingkungan yang merugikan atau mempengaruhi pertumbuhan jaringan tergantung dari sifat dasar pengaruh zat teratogenik tersebut. Bahan-bahan dari lingkungan dapat masuk dan mempengaruhi perkembangan jaringan di dalam uterus melalui 2 cara: yaitu secara langsung ditransfer dari tubuh maternal yaitu melalui plasenta atau tidak langsung. Produk kimia atau degradasinya biasanya mencapai embrio/ fetus dalam beberapa fraksi dari konsentrasinya dalam darah maternal.
- (6) Peningkatan kejadian pertumbuhan yang abnormal akan bertambah jika dosis makin tinggi. Pada prinsip ini, ditekankan efek dosis secara umum. Dalam kaitannya dengan teratogenik, kematian intrauterin dan malformasi merupakan kriteria untuk efek bahan teratogenik. Jika dosis melebihi ambang maka pertumbuhan yang abnormal mulai ditunjukkan. Pada saat dosis dalam rentangan yang rendah, tidak ada efek embrio toksik atau ada

efek embrio toksik dalam tipe yang berbeda meskipun oleh bahan yang sama.

Menurut Herman dan Mutiatikum (1990), Faktor biologis ibu yang menentukan antara lain usia, diet, kondisi lokal rahim, keseimbangan hormonal dan kondisi lingkungan. Percobaan menunjukkan bahwa resiko malformasi dan kematian post natal lebih tinggi pada ibu muda atau pada usia yang terlalu tua. Kebutuhan nutrisi sangat meningkat pada kehamilan, tak hanya zat-zat organik dan beberapa vitamin, tetapi juga terhadap unsur-unsur anorganik tertentu.

Kelebihan atau kekurangan nutrisi dapat mempengaruhi ekspresi gen dan mendukung efek berbahaya obat dengan akibat yang *irreversibel*. Meskipun peranan tepat vitamin terhadap reproduksi manusia belum jelas tetapi ibu hamil perlu mendapat sejumlah cukup vitamin essensial dalam makanan karena senyawa-senyawa ini terlibat dalam proses metabolisme dasar termasuk sintesa protein.

Status fisiologis ibu tidak hanya bergantung pada makanannya, tetapi juga pada status sosial, ekonomi, iklim dan variasi musim sebagian besar kelainan pada kelompok sosial ekonomi rendah terjadi biasanya karena malnutrisi, penyakit kronis. Faktor patologis seperti penyakit metabolik atau penyakit kronis tertentu dapat meningkatkan efek toksik bahan kimia dan frekuensi kerusakan fetus.



**Gambar 2.4** Skema Kelainan Bawaan Pada Fetus  
(Herman dan Mutiatikum, 1990)

### 2.3 Hubungan Teratogenitas Asam Retinoat Dengan Masa Organogenesis

Pengaruh buruk bahan kimia, termasuk obat terhadap janin didalam kandungan dapat terjadi melalui mekanisme langsung atau tidak langsung, melalui terjadinya gangguan fungsi pada plasenta, uterus atau perubahan-perubahan sistemik seperti keseimbangan hormon dan biokimiawi ibu. Tergantung pada sifat masing-masing senyawa asing dan umur kehamilannya, Pengaruh buruk yang terjadi dapat beragam sesuai dengan masing-masing fase.

Pada awal kehamilan, dimana sel-sel belum terdiferensiasi maka sel-sel tersebut masih bersifat totipotensi. Sehubungan dengan itu Lu (1995) menyatakan tahap pra differensiasi adalah tahap dimana embrio tidak rentan terhadap zat teratogen, karena sel yang masih hidup akan menggantikan kerusakan tersebut

dan membentuk embrio yang normal. Lamanya keadaan resisten ini berkisar antara 5-9 hari tergantung dari spesies. Selanjutnya jika sel telah mengalami perpindahan dan berdiferensiasi maka zat kimia yang masuk kedalam tubuh induk, yang tidak ataupun mencapai embrio akan menimbulkan efek yang merugikan pada embrio.

Dikatakan bahwa tahap embrio yakni pada umur kehamilan antara 3-8 minggu, merupakan tahap dimana sel secara intensif mengalami differensiasi, mobilisasi, dan organogenesis, akibatnya embrio sangat rentan terhadap efek teratogen. Periode ini biasanya berakhir pada hari ke 10-14 kehamilan pada hewan pengerat, dan pada minggu ke 14 pada manusia. Namun tidak semua organ rentan pada saat yang sama dalam satu kehamilan. Sebagian besar embrio pengerat mulai rentan pada hari ke 8 dan berakhir hari ke 12 kehamilan (Lu, 1995). Janin merupakan tahap lanjut dari embrio. Tahap ini ditandai dengan perkembangan dan pematangan fungsi, artinya selama tahap ini senyawa kimia tidak akan menyebabkan cacat tetapi mengakibatkan kelainan fungsi.

Cacat lahir umumnya mudah dideteksi pada saat kelahiran atau sesaat setelah kelahiran, tetapi kelainan fungsi tidak mungkin dapat didiagnosa segera setelah kelahiran (Lu,1995). Pengaruh buruk yang dapat terjadi pada fase ini :

- a. Pengaruh letal, dimana terjadinya kematian janin dan abortus
- b. Pengaruh subletal, dimana tidak terjadi kematian janin tetapi terjadi malformasi anatomik (struktur) pertumbuhan organ atau pengaruh teratogenik.
- c. Gangguan fungsional atau metabolik yang permanen yang baru nampak kemudian, artinya tidak langsung nampak atau timbul pada saat kelahiran.

Umumnya bahan kimia yang digunakan wanita hamil dapat menembus plasenta, tetapi hati janin masih belum mempunyai banyak enzim seperti ibunya. Hal ini yang menyebabkan zat-zat tertentu berdifusi kembali dalam bentuk tetap ke dalam sirkulasi ibu serta mempengaruhi janin yang tumbuh (Suryati, 1990).

Metabolisme vitamin larut lemak sangat lambat, sehingga dosis berlebihan dapat menimbulkan efek toksik (Dewoto, 2003). Asam retinoat yang merupakan vitamin larut lemak jika dikonsumsi berlebih selama masa kehamilan selain menyebabkan terjadinya cacat bawaan pada bayi juga dapat menyebabkan kegagalan kehamilan. Pernyataan ini berkaitan dengan periode rentan selama masa kehamilan. Terjadinya kegagalan kehamilan menurut Wilson (1973), tiap hari selama masa kehamilan memiliki arti penting terhadap perkembangan embrio, dimulai dari tahap pembelahan sampai dengan organogenesis. Demikian pula bahwa selama masa kehamilan, pada waktu pembentukan organ setiap organ memiliki waktu rentan yang berbeda-beda. Namun yang paling penting dalam masa kehamilan adalah awal kehamilan.

Gangguan yang berarti pada periode awal ini mengakibatkan terjadinya resiko yang sangat besar terhadap proses perkembangan selanjutnya. Gangguan yang berulang selama tahap awal kehamilan bahkan sampai setengah periode kehamilan atau dari awal kehamilan sampai tahap akhir periode kehamilan, dapat menyebabkan terganggunya proses pembelahan sel, kegagalan implantasi embrio akibat kerusakan uterus, rusaknya sel akibat pemberian asam retinoat

Kerusakan sel/jaringan ini mungkin akibat koagulasi, denaturasi protein protoplasma sel atau menyebabkan sel mengalami lisis, yakni dengan mengubah struktur membran sel sehingga mengakibatkan kebocoran isi sel.

Kegagalan dalam kehamilan akibat pemberian zat teratogenik pada induk hamil, dapat diketahui dengan adanya embrio mati pada awal kehamilan, sementara kemampuan totipotensi dari sel di awal kehamilan terhambat kerjanya akibat pengaruh dari luar yang diberikan, sehingga setiap memulai perbaikan selalu kembali terganggu oleh pengaruh dari luar. Mekanisme berbagai agensia teratogenik yang dapat menimbulkan cacat pada janin dalam rahim melalui beberapa mekanisme, (Herman, 1990) yaitu:

1. Efek teratogen langsung terhadap janin, dimana akses teratogen ke janin ditentukan oleh beberapa faktor seperti jumlah/kadar obat yang melewati sawar plasenta, struktur biokimiawi (sistem enzimatik) dari plasenta, dan struktur kimiawi dari bahan itu sendiri (berat molekul, terionisasi atau tidak, larut dalam lemak atau tidak, ikatan protein).
2. Efek teratogen terhadap fungsi plasenta, fungsi plasenta pada awal kehamilan untuk membantu kehidupan dan perkembangan dari janin sebelum terbentuknya organ-organ itu secara sempurna, dengan begitu masuknya suatu bahan yang dapat mengganggu fungsi plasenta tersebut juga mengakibatkan gangguan pada janin.
3. Efek teratogen terhadap metabolisme atau fungsi tubuh ibu.
4. Tahap perkembangan janin dalam rahim, artinya efek bahan toksik berbeda terhadap tahap-tahap perkembangan janin. Misalnya, pada kehamilan yang sangat dini (sebelum tahap diferensiasi), sel embrionik bersifat omnipotent

(berkembang menjadi berbagai bentuk organ) dan setiap gangguan pada tahap ini cenderung berefek "all or none", artinya terjadi kerusakan sel secara total atau justru tidak ada efek sama sekali karena sifat multipotent dari sel itu.

5. Kerentanan genetik atau genetic susceptibility, dimana masing-masing ras atau suku diketahui memiliki kecenderungan yang berbeda terhadap efek suatu teratogen.
6. Metabolisme dari substrat/teratogen yang telah dipahami melalui mekanisme yang cukup rumit. Contohnya, Cytochrome P450 diketahui memegang peranan penting dalam pembentukan serta perkembangan sel-sel maupun organ tubuh janin.

Terdapat dua mekanisme yang memberikan perlindungan janin dari bahan dalam sirkulasi darah maternal (Koren, 1998):

1. Plasenta berperan sebagai sawar semipermeabel dan tempat metabolisme beberapa obat yang melaluinya. Beberapa jenis reaksi oksidasi aromatik yang berbeda telah terjadi dalam jaringan plasenta. Sebaliknya mungkin bahwa kapasitas metabolik plasenta dapat menyebabkan pembentukan metabolit yang toksik dan karena itu plasenta meningkatkan toksisitas.
2. Bahan yang telah melewati plasenta masuk dalam sirkulasi janin melalui vena umbilikal. Kira-kira 40-60% aliran darah vena umbilikal masuk ke dalam hati janin sisanya tidak lewat hati dan masuk dalam sirkulasi umum janin. Bahan yang masuk hati sebagian dapat dimetabolisir sebelum masuk sirkulasi janin. Sebagai tambahan, sebagian besar bahan yang berada dalam arteri umbilikal (kembali ke plasenta) dapat masuk melalui plasenta kembali ke vena umbilikasi dan kembali ke hati lagi. Efek bahan kimia pada jaringan



reproduksi wanita hamil (payudara, uterus dan lain-lain), kadang-kadang diubah oleh lingkungan endokrin yang sesuai dengan tahap lingkungan.

### 2.3.1 Mekanisme teratogenitas vitamin A

Vitamin A di dalam makanan (*retinil ester*) sebagai contoh bahan teratogen apabila berlebih dapat menyebabkan akumulasi di dalam tubuh terutama di dalam hepar sebagai tempat penyimpanan cadangan vitamin A tubuh. Keadaan ini dimulai dengan kapasitas yang meningkat dan kejenuhan *retinil ester* (vitamin A yang telah di esterifikasi pada sel epitel lapisan dalam dari mukosa usus halus) lalu ditransfer dalam bentuk kilomikron melalui sistem biliaris aliran darah masuk ke sistem limfatik diteruskan ke hati di sintesis, dan berikatan dengan prekursor-RBP (*retinol binding protein*) masuk sirkulasi. *Retinil ester*, *retinol* dan *pre-RBP* yang ada di hati masuk sirkulasi dimana *retinil ester* diubah menjadi asam retinoat berikatan dengan albumin dan di tangkap oleh CRABP ke jaringan ekstrahepatik (Jerry, 2004).

*Retinil ester* di hidrolisis menjadi retinol berikatan dengan Apo-RBP, retinol yang sudah berikatan dengan Apo-RBP di sebut holo-RBP dan masuk ke jaringan ekstrahepatik akan di tangkap oleh CRBP (Ruberte,1991).

Retinol masuk ke jaringan di ubah menjadi asam retinoat dan masuk sirkulasi menuju ke organ target melalui reseptor. Retinol dan asam retinoat kemudian diikat oleh protein pengikat retinoid seluler spesifik, yang bermigrasi ke dalam nukleus, sel yang mempunyai CRABP1, akan dapat mengikat asam retinoat yang terdapat dalam sitoplasmanya, sehingga tidak adanya asam retinoat yang menuju inti. Hal ini menyebabkan tidak terjadi pengekspresian gen dan tidak terbentuknya organ. Di dalam sel yang tidak terdapat CRABP1 menyebabkan

asam retinoat bebas berada di sitoplasma, yang akan masuk ke inti dan berikatan dengan CRABP2, menyebabkan pengekspresian gen spesifik (Desbois, 1991).

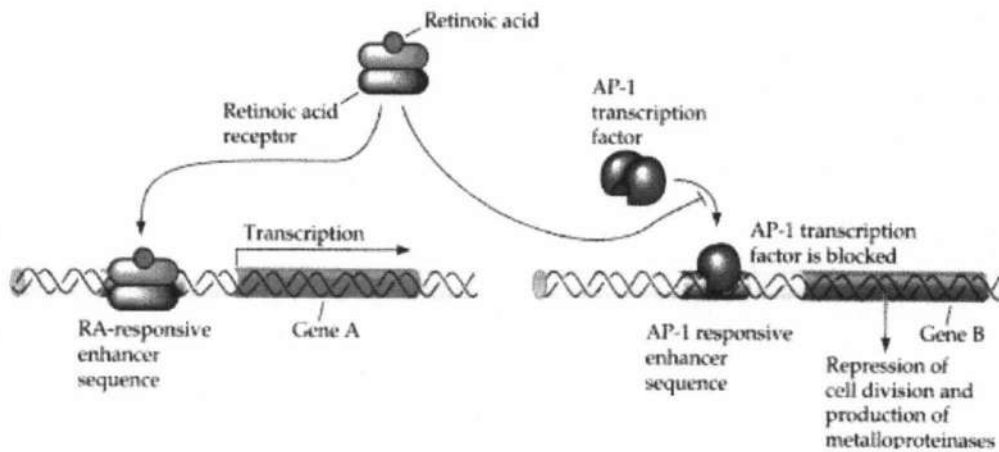
Sebagaimana jaringan dan sel yang lain, *holo*-RBP mengantarkan *all-trans* retinol melalui reseptor permukaan sel ke sitosol. Retinol kemudian dioksidasi melalui retinal lalu asam retinoat. Retinol dan asam retinoat kemudian diikat oleh protein pengikat retinoid seluler spesifik, yang bermigrasi ke dalam nukleus. Asam retinoat kemudian ditransfer ke reseptor asam retinoat nuklear, yang disebut RAR, yang meningkatkan ekspresi regio spesifik genom (Lawrence, 1991). Jika CRABP jenuh dengan suplai asam retinoat eksternal, asam retinoat akan mampu memasuki inti sel, berikatan dengan reseptornya, RAR diaktifkan dengan melepaskan asam retinoat dan mengubah pola normal ekspresi gen. (Morris, 1993).

Asam retinoat terikat RAR paling tidak memiliki 2 bentuk aksi. Pertama, Asam retinoat terikat RAR berikatan dengan sekuen *DNA enhancer* dan mengaktifkan gen tertentu yang lazimnya tidak aktif.

Gen ini meliputi gen *homeotik* tertentu yang menentukan posisi antero posterior sepanjang sumbu tubuh, dengan begitu terjadi transformasi *homeotik*, secara umum mengubah struktur anterior menjadi struktur yang lebih posterior. Sekelompok gen yang menyebabkan berbagai mutasi *homeotik* disebut *homeoboxgenes* yang terdapat pada vertebrata termasuk manusia. Gen yang serupa pada mamalia dibentuk sebagai *hox gens*; pada genom manusia gen ini dibentuk sebagai *pax (paired box)* genes. Gen yang mengandung *homeobox* merupakan pengatur transkripsional dan mempengaruhi morfogenesis. Gen yang mengandung *homeobox* dan gen lain yang mengatur embriogenesis, bekerja pada embrio pada tahap awal, sebelum struktur seperti anggota tubuh mulai dibentuk

(Underwood,1999). Gen menentukan karakteristik protein sel, termasuk enzim-enzim sitoplasma yang mengatur aktivitas sitoplasma (Guyton, 1997).

Aksi kedua, Asam retinoat terikat RAR menghambat gen-gen yang diaktifkan oleh faktor transkripsi terikat enhancer lain yang disebut AP-1. faktor ini berperan penting dalam pembelahan sel, dan asam retinoat mampu menghambat pembelahan sel yang normal dengan menghambat aktivitas AP-1 (Desbois., 1991).



**Gambar 2.5** Model Aksi Ganda Asam Retinoat Terikat RAR

Model aksi ganda asam retinoat terikat RAR, (1) asam retinoat terikat RAR mengaktifkan transkripsi gen *enhancer* memungkinkan RAR terikat. Beberapa gen tersebut adalah gen *homeotik* yang menentukan posisi sel sepanjang sumbu antero-posterior sehingga menyebabkan sel menunjukkan karakteristik yang berbeda (2) asam retinoat terikat RAR menekan aktivitas faktor transkripsi AP-1. faktor transkripsi ini berperan penting untuk mengaktifkan gen yang bertanggung jawab dalam pembelahan sel dan produksi metalloprotein yang seringkali memungkinkan adanya migrasi sel (Desbois, 1991).

Salah satu prinsip teratogenik asam retinoat adalah sintesis reseptor beta asam retinoat. Efek teratogenetik serius dari berbagai campuran retinoat tampaknya berhubungan dengan induksi reseptor ini (Soprano, 1993; 1994, Jiang, 1994).

Sekali reseptor ini terbentuk dalam jumlah banyak, asam retinoat yang terikat akan semakin banyak dan menyebabkan perubahan ekspresi gen pada promotor responsif asam retinoat yang berubah dengan peningkatan konsentrasi asam retinoat (Kanamori dan Brown, 1992).

Gen adalah unit hereditas suatu organisme hidup. Gen ini dikode dalam material genetik organisme, sebagai molekul DNA, dan RNA, ekspresinya dipengaruhi oleh lingkungan internal dan eksternal seperti perkembangan fisik atau perilaku dari organisme itu. Gen tersusun atas daerah urutan basa nukleotida baik yang mengkode suatu informasi genetik dan juga daerah yang tidak mengkode informasi genetik, hal ini penting untuk pembentukan suatu protein yang fungsinya diperlukan ditingkat sel, jaringan, organ atau organisme secara keseluruhan (Yuwono, 2002).

Molekul DNA membawa informasi hereditas terutama instruksi untuk membentuk protein dari sel, menentukan jenis protein yang harus disintesis, kapan, dalam tipe sel yang mana, dan seberapa banyak jumlah protein yang harus disintesis. DNA yang merupakan komponen protein dari kromosom mempunyai fungsi penting dalam pengemasan dan pengontrolan molekul DNA yang sangat panjang sehingga dapat muat didalam nucleus dan mudah diakses ketika dibutuhkan. Selama reproduksi, Jumlah kromosom yang haploid dan material genetik DNA hanya separoh dari masing-masing parental, dan disebut sebagai genom.

Protein adalah molekul makro yang berperan dalam hampir semua fungsi sel yaitu: sebagai bahan pembangun struktur sel dan membentuk enzim-enzim yang mengkatalisis reaksi-reaksi kimia di dalam sel; meregulasi ekspresi gen, memungkinkan sel untuk bergerak dan berkomunikasi antar sel. Di dalam sel, protein terdapat baik pada membran plasma maupun membran internal yang menyusun organel sel seperti mitokondria, retikulum endoplasma, nukleus dan badan golgi dengan fungsi yang berbeda tergantung pada tempatnya.

Protein yang terlibat dalam reaksi biokimiawi sebagian besar berupa enzim banyak terdapat di dalam sitoplasma dan sebagian terdapat pada kompartemen dari organel sel (Yuwono,2005). Proses sintesis protein terbagi atas transkripsi dan translasi. DNA sebagai media untuk proses transkripsi suatu gen berada dikromosom dan terikat oleh protein histon. Saat menjelang proses transkripsi berjalan, biasanya didahului signal dari luar akan kebutuhan suatu protein atau molekul lain yang dibutuhkan untuk proses pertumbuhan, perkembangan, metabolisme, dan fungsi lain di tingkat sel maupun jaringan.

Gen diaktifkan dan dimatikan untuk mengatur sintesis produk gen. Secara teoritis produk sintesis gen dapat diatur melalui beberapa tingkatan (Underwood,1999) :

1. Transkripsi : pengontrolan pembentukan mRNA
2. Transpor : pengontrolan pengiriman keluar mRNA dari inti ke ribosom dalam sitoplasma
3. Translasi : pengontrolan pembentukan produksi gen didalam ribosom.

Ekspresi gen suatu individu dalam genom mengalami modifikasi selama pertumbuhan oleh informasi posisi yang dibawa oleh sejumlah kecil produk gen

pengontrol, sehingga menyebabkan perubahan lokal pada pertumbuhan dan diferensiasi. Gen yang mengalami perubahan dapat menyebabkan berkurangnya sintesis enzim yang dapat menyebabkan penumpukan bahan pembuat enzim dan kegagalan membuat produk akhir dari reaksi yang dikatalisasi oleh enzim sehingga menghambat fungsi normal seluler. Kekurangan reseptor seluler tertentu menyebabkan tidak sensitifnya sel terhadap substansi tertentu.

Toksisitas dari bahan teratogenik yang sifat reaktivitasnya terhadap bagian nukleofilik dari asam amino dan DNA, akibatnya bisa terjadi perubahan struktur dari molekul protein dan DNA sehingga mengakibatkan protein kehilangan fungsi biologis dan pada DNA terjadi mutasi gen (Underwood,1999). Apabila sistem *proofreading* dari DNA untuk memperbaiki diri tidak berjalan dengan baik, maka hal ini akan berakibat pembacaan yang keliru dari *DNA template* pada saat replikasi maupun sintesis protein. Protein yang dihasilkan menjadi berubah fungsi atau bahkan menjadi *unfunctional protein* yang akan didegradasi oleh sistem dalam sel itu (Underwood,1999).

Proses pembelahan sel embrio dapat terjadi melalui 3 mekanisme yaitu : melalui aktivasi *mitosis promoting faktor (MPF)*, adanya peran signal transduksi, serta adanya peran interaksi protein. Hambatan salah satu faktor di atas atau bahkan ketiga faktor tersebut akan menyebabkan penghambatan pada pembelahan zigot maupun embrio. Hambatan pembelahan mitosis embrio dalam stadium metafase dapat disebabkan oleh adanya hambatan sintesis mikrotubulus dan kerusakan mikrotubulus (Rugh,1968).

Berbagai proses metabolisme normal dalam tubuh dapat menghasilkan radikal bebas dalam jumlah kecil sebagai produk antara. Didalam sel hidup

radikal bebas terbentuk pada membran plasma dan organel-organel seperti mitokondria, peroksisom, retikulum endoplasmik dan sitosol; melalui reaksi enzimatik fisiologik yang berlangsung dalam proses metabolisme (Suyatna,1995). Radikal bebas bersifat sangat reaktif karena memiliki “elektron tidak berpasangan” pada orbital paling luar, substansi tersebut dapat menimbulkan perubahan kimiawi dan merusak berbagai komponen sel hidup seperti protein, gugus tiol non-protein, lipid, karbohidrat, nukleotida sehingga dapat berakibat terjadinya kerusakan bahkan kematian sel (Apoptosis) dan berbagai kelainan tubuh. Terhadap lipid, radikal bebas menyebabkan reaksi peroksida yang akan mencetuskan proses otokatalitik yang akan menjalar sampai jauh dari tempat asal reaksi semula.

Dalam keadaan normal tubuh kita memiliki mekanisme pertahanan terhadap pengrusakan oleh radikal bebas yang beragam, dan tersebar di berbagai tempat dalam sel. Menurut konsep radikal bebas, kerusakan sel akibat molekul radikal baru dapat terjadi bila kemampuan mekanisme pertahanan tubuh sudah dilampaui atau menurun (Suyatna,1995).

Mitokondria memegang peran kunci dalam metabolisme oksigen intraseluler yang diasumsikan bahwa defek gen mitokondria dari enzim yang dikodenya dapat mengakibatkan penumpukan oksigen radikal bebas yang mengakibatkan kerusakan, kerusakan ini dapat berupa rusaknya DNA inti.

Apoptosis merupakan kematian setiap sel yang mempunyai hubungan dengan pertumbuhan dan morfogenesis. Pengaturan apoptosis plasenta penting untuk kebuntingan normal secara fisiologis, selama implantasi, apoptosis untuk *remodeling* jaringan desidua maternal dan invasi trofoblas. Pada kebuntingan

normal, apoptosis terjadi sejalan dengan umur kebuntingan. Adanya peningkatan apoptosis trofoblas berpengaruh terhadap penurunan hasil kebuntingan mencit yang merupakan keadaan patologis serta merupakan ciri dari penolakan trofoblas yang dapat menyebabkan komplikasi kebuntingan, berupa abortus, lahir mati, berat lahir ringan (Underwood,1999).

Apoptosis dapat dipicu oleh faktor di dalam sel, dalam perkembangan atau pembentukan embrio dikenal sebagai apoptosis morfogenetik. Kegagalan apoptosis morfogenik di sel interdigital, di bagian dorsal tabung saraf selama proses penutupan neural tube atau kematian sel yang berakhir dengan pembuangan epitel yang tidak diperlukan saat fusi lempeng palatum, dapat menyebabkan terjadinya pertumbuhan *syndactyly*, *spina bifida*, *cleft palate* (Underwood,1999).

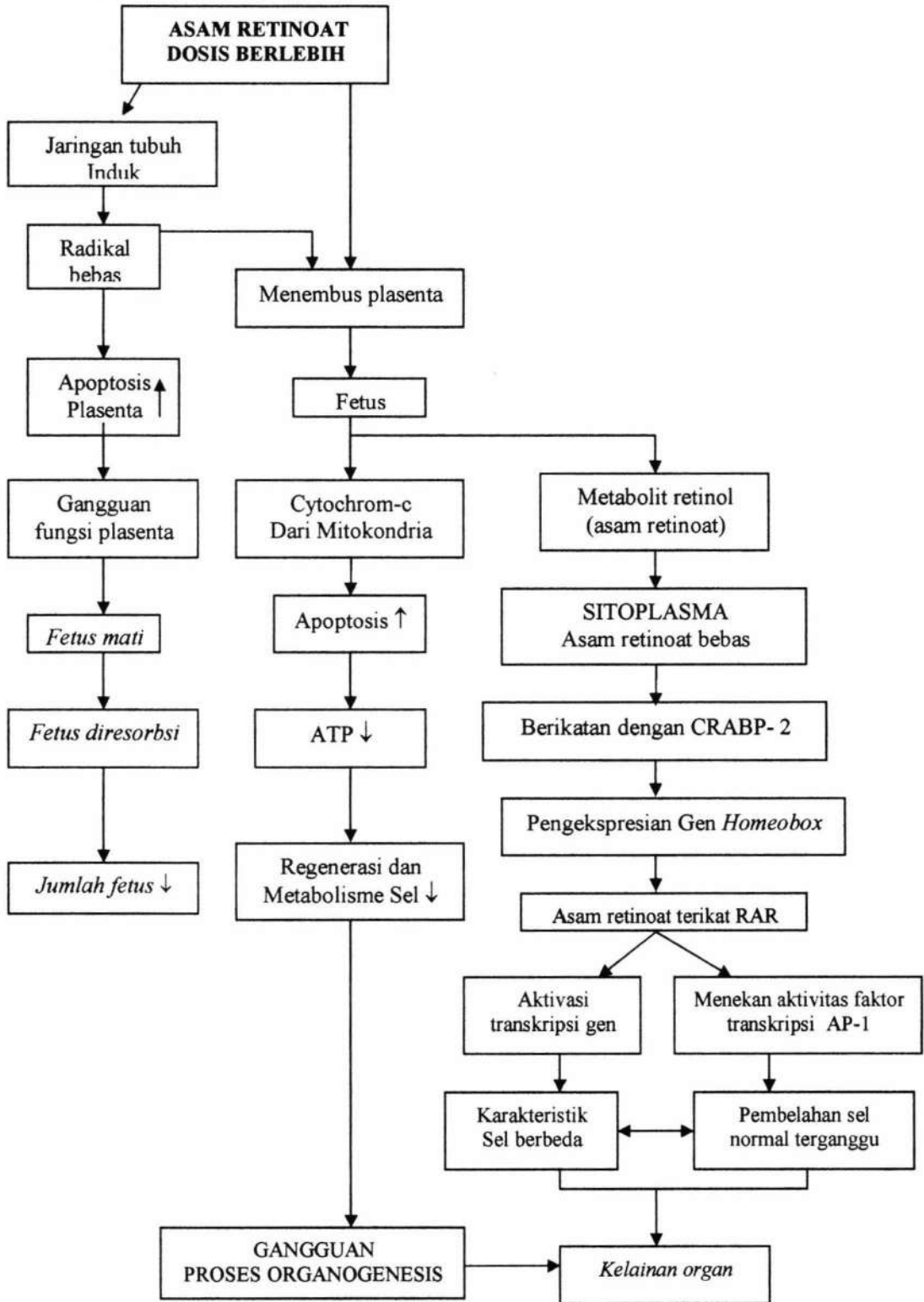


**BAB 3**

**KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual Pengaruh Asam Retinoat

### 3.2 Dasar Teori

Kehamilan, merupakan proses fisiologi yang harus dipersiapkan ibu agar dapat dilalui dengan aman. Selama kehamilan, ibu dan janin merupakan unit fungsi yang tak terpisahkan, kesehatan ibu hamil adalah persyaratan penting untuk fungsi optimal dan perkembangan kedua unit tersebut.

Pemakaian asam retinoat berlebih pada ibu hamil dapat meningkatkan produksi radikal bebas dalam bentuk peningkatan tekanan oksigen, yang dapat mempercepat tingkat kerusakan atau kematian sel. Apoptosis adalah kematian terprogram sel dalam rangka menjaga keseimbangan jaringan dan organ yang disusun oleh sel tersebut. Pengaturan apoptosis diplasenta penting untuk *remodeling* jaringan desidua maternal dan invasi trofoblas. Pada kehamilan normal, apoptosis terjadi sejalan dengan umur kehamilan, peningkatan apoptosis trofoblas merupakan keadaan patologis dan merupakan ciri dari penolakan trofoblas sehingga dapat menyebabkan komplikasi kebuntingan, berupa abortus, lahir mati dan berat lahir ringan (Underwood,1999).

Jika efek suatu agensia toksis menimpa embrio pada periode organogenesis embrio tidak dapat mentoleransi dapat menyebabkan cacat janin, karena sifat asam retinoat yang larut lemak memudahkan untuk menembus plasenta, memasuki tubuh janin (Herman,1990).

Retinal dalam partikel yang kecil teroksidasi menjadi asam retinoat, di dalam hati asam retinoat disimpan sebagai kompleks lipoglikoprotein. Untuk pengangkutan ke jaringan, asam retinoat dihidrolisis dan retinal yang terbentuk terikat dengan protein pengikat aporetinol. Holo- RBP yang dihasilkan diproses dalam Apparatus Golgi dan disekresikan ke dalam plasma, asam retinoat diangkut

dalam plasma dalam keadaan terikat dengan albumin. Begitu di dalam sel ekstrahepatik, retinal terikat dengan protein pengikat retinol seluler (CRBP) (Ruberte,1991). Toksisitas asam retinoat terjadi setelah kapasitas RBP dilampaui dan sel tersebut terpapar pada retinal yang terikat. Retinol setelah diambil oleh CRBP diangkut ke dalam sel dan terikat dengan protein nukleus di dalam nukleus inilah retinal terlibat dalam pengendalian ekspresi gen.

Gen terdapat dalam kromosom atau DNA yang mengandung kode genetik yang spesifik untuk suatu makhluk hidup dan mempunyai fungsi sendiri-sendiri. Perubahan kode genetik sel normal merupakan dasar dari kegagalan kelola, perubahan kode genetik ini dapat mengenai gen pengatur, penghambat, perbaikan DNA sebagai akibatnya, terjadi ekspresi gen berlebihan, mengakibatkan pertumbuhan sel yang tidak terkendali.

Gen yang telah mengalami kerusakan/ cacat atau mutasi ikut dalam siklus pembelahan sel, yang nanti hasil akhirnya berbeda dengan yang seharusnya terjadi. Seperti kita ketahui bahwa sel tubuh manusia adalah multiseluler, berasal dari satu sel telur yang telah difertilisasi oleh satu sel sperma, menjadi sel yang multipotent, menjadi bermacam-macam sistem organ. Sel itu mengadakan generasi dan regenerasi (tumbuh dan berkembang biak), berdiferensiasi membentuk sistem organ dan jaringan sampai terbentuk sel organ dewasa. Setelah dewasa, sel akan mengalami degenerasi dan berakhir dengan kematian. Di dalam tubuh, selamanya ada sel-sel baru yang timbul dan tumbuh untuk menggantikan dan memperbaiki sel-sel yang mati. Proses penggantian dan pertumbuhan sel ini diatur oleh gen yang terdapat di dalam inti sel (Underwood, 1999). Kelainan

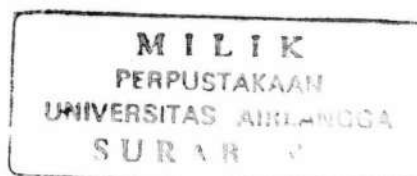
organ terjadi karena proses apoptosis yang berjalan tidak normal saat perkembangan embrio.

Cytochrome salah satu anggota rantai elektron transport mitokondria yang dibutuhkan untuk pembentukan ATP yang akan dipergunakan sel-sel tubuh. Bila komponen kunci rantai respirasi dalam mitokondria hilang atau rusak maka akan terjadi proses berkelanjutan yang tidak terkendali, yaitu ATP tidak terbentuk secara efisien dan sel kehilangan energi untuk melakukan fungsi normal. Cytochrome-c memediasi aktivasi jalan kematian sel akan terjadi bila cytochrome-c dilepaskan dari mitokondria kedalam sitoplasma. Didalam sitoplasma, pelepasan cytochrome-c dapat menimbulkan apoptosis (Suyatna, 1995).

### 3.3 Hipotesis Penelitian

Dari kerangka konseptual diatas, maka dapat dikemukakan hipotesis penelitian sebagai berikut :

1. Pemberian asam retinoat dosis 60 mg/Kg BB pada mencit (*Mus musculus*) dengan umur kebuntingan 10 hari dapat menyebabkan penurunan hasil reproduksi induk mencit (Berat badan fetus hidup, jumlah fetus hidup, jumlah fetus mati dan teresorpsi, jumlah implantasi plasenta).
2. Pemberian asam retinoat dosis 60 mg/Kg BB pada mencit (*Mus musculus*) dengan umur kebuntingan 10 hari dapat menyebabkan terjadinya kelainan bawaan eksternal pada fetus mencit.



**BAB 4**  
**MATERI DAN METODE PENELITIAN**

**BAB 4****MATERI DAN METODE PENELITIAN****4.1 Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan penelitian " *The randomized posttest only control group design*" (Zainuddin, 2000).

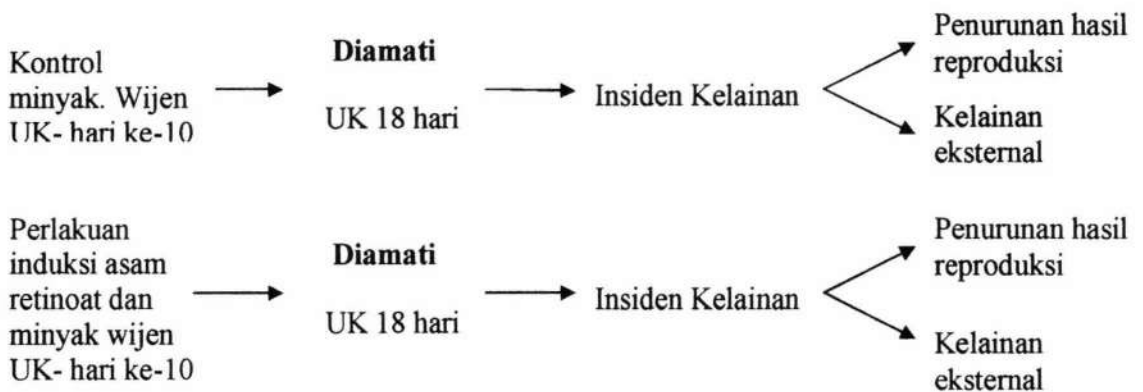
Rancangan penelitian ini untuk mengetahui ada tidaknya efek dari perlakuan..

Rincian pembagian kelompok adalah sebagai berikut :

**K** : Kontrol, hanya dengan pemberian minyak wijen dosis 1 ml/mencit pada UK-10 hari tanpa pemberian asam retinoat, diamati pada usia kebuntingan induk 18 hari

**P** : Perlakuan dengan pemberian induksi asam retinoat dosis 60 mg/Kg BB yang dilarutkan dalam minyak wijen pada UK-10 hari, diamati pada usia kebuntingan induk 18 hari.

Secara diagram dapat dilihat sebagai berikut :



## 4.2 Populasi Sampel Dan Besar Sampel

Populasi penelitian ini adalah mencit betina (*Mus musculus*) galur BALB/C dan betina dara, umur 8-10 minggu dengan berat badan sekitar 20-25 gram. Kriteria inklusi pada penelitian ini :

1. Umur hewan coba 8 – 10 minggu
2. Berat badan 20 – 25 gram
3. Belum pernah bunting
4. Siklus estrus teratur
5. Mencit harus sehat, ditandai dengan bulu halus (tidak berdiri), gerakannya cukup lincah dan tidak menunjukkan cacat fisik.

Untuk kriteria eksklusi adalah diluar kriteria inklusi dengan kematian induk mencit yang di ketemukan ditengah proses penelitian. Besar sampel minimal untuk pengujian hipotesis penelitian ditentukan berdasarkan rumus sebagai berikut (Federen, 1995):

$$(k - 1) (r - 1) \geq 15, \text{ dari rumus ini :}$$

k = Jumlah macam perlakuan

r = Jumlah sampel untuk tiap kelompok

Hasil, k = 2 dan r = 16

Berdasarkan hasil perhitungan didapatkan besar sampel penelitian 16 ekor mencit bunting per kelompok, untuk menghindari kekurangan sampel karena kemungkinan mati ( $f$ )  $\pm$  10%, maka besar sampel tersebut dikalikan  $1/(1-f)$ , sehingga besar sampel keseluruhan adalah 18 ekor mencit bunting, per kelompok.

## 4.3 Variabel Penelitian

### 4.3.1 Klasifikasi variabel

Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas (*independent Variable*) : asam retinoat
2. Variabel tergantung (*Dependent Variable*)



Variabel tergantung pada penelitian ini adalah:

1. Penurunan hasil reproduksi induk mencit (berat badan fetus hidup, jumlah fetus hidup, jumlah fetus mati, embrio teresorbsi, jumlah implantasi plasenta).
2. Kelainan bawaan eksternal fetus mencit (persentase kelainan dan jenis kelainan)
3. Variabel kendali: strain mencit, umur mencit, berat badan mencit, jenis makanan dan minuman.

#### 4.3.2 Definisi operasional variabel

Tabel 4.1 Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel penelitian	Definisi Operasional	Indikator	Alat pengukuran	Skala data
1.	Asam retinoat	Senyawa turunan vitamin A	Dikemas dalam botol yang tidak tembus cahaya, disimpan dalam freezer dengan suhu Minus 30 °C	Vitamin A dengan dosis 60 mg / Kg BB melalui <i>syringe</i> 1 cc, 5 cc secara oral dengan <i>gastric lavage</i> .	Nominal
2.	Berat badan fetus hidup	Berat badan masing-masing fetus yang dinyatakan dalam satuan gram pada hari ke – 18 masa kebuntingan	Berat badan fetus lahir, normal 1-3 gram	Menggunakan timbangan elektrik dan menghitung rata-rata berat badan fetus hidup per induk (gram).	Rasio
	Jumlah fetus hidup	Banyaknya fetus hidup yang dikandung selama satu periode kebuntingan	Adanya gerakan fetus apabila dilakukan stimulasi berupa sentuhan. Normal jumlah 10-11 ekor.	Menggunakan pinset dan menghitung persentase fetus hidup	Rasio

Jumlah fetus mati	Banyaknya fetus mati	Tidak ada tanda-tanda autolisis tetapi tidak merespon ketika disentuh	Menggunakan pinset dan menghitung persentase fetus mati	Rasio
Embrio teresorbsi	Embrio teresorbsi adalah embrio mati yang telah diresorbsi kembali.	Berupa sisa implantasi (implantation site) dengan warna kehitaman.	Menggunakan pinset dan menghitung Persentase resorbsi	Rasio
Jumlah implantasi plasenta	Banyaknya plasenta pada implantasi fetus, yang menunjukkan daya fertilitas mencit.	Jumlah plasenta sesuai fetusnya dan sisa resorbsi.	Menggunakan pinset dan menghitung persentase intra uterus (mati dan resorbsi)	Rasio
Kelainan bawaan eksternal fetus mencit	kelainan morfologi fetus yang dapat diamati dari luar.	Adanya kelainan eksternal meliputi: <i>Amelia,</i> <i>Pocomelia,</i> <i>Simpodia,</i> <i>Polydactyli,</i> <i>Syndactyli,</i> <i>Brachidactyli,</i> <i>Ectrodactyli,</i> <i>Talipes, Agenesis tail, Kinky tail,</i> <i>Palatoschysis,</i> <i>Cleft palate,</i> <i>Microcephaly,</i> <i>Macrocephaly,</i> <i>Anotia,</i> <i>Aglossostomia,</i> <i>Astomia,</i>	Mengamati keadaan morfologi fetus dengan mikroskop bedah. Urutan pengamatan mulai kepala, badan dan alat gerak, ekor, organ genitalia, dan menghitung persentase kelainan (cacat dan tidak cacat), jenis kelainan	Nominal

#### 4.4 Bahan Penelitian

##### 4.4.1 Hewan coba

Jenis Mencit : *Mus musculus*

Umur mencit : 8 - 10 minggu

Kesehatan mencit dapat diamati dari morfologi dan berat badannya:

a. Morfologi : gerakan cukup lincah, tidak lesu, kulit bersih dan tanpa luka, mata terang , tidak sayu.

b. Berat badan sekitar 20 – 25 gram

Jenis makanan : pellet "Par L"

Jenis minuman : Air PDAM

Perawatan mencit:

a. Pemberian makanan pellet 10 g/ekor/hari

b. Pemberian minuman secara *ad libitum* 1 liter/3 hari untuk 10 ekor.

c. Penggantian sekam untuk alas kandang 2 hari sekali.

Sanitasi kandang:

a. Dibersihkan tiap hari

b. Suhu sesuai suhu ruang

c. Cukup ventilasi dan sinar matahari

d. Tidak lembab

##### 4.4.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan pada hewan terdiri dari :

1. Pakan mencit berupa pellet "Par L"

2. Air minum dari PDAM

3. Vitamin A (asam retinoat)

4. Minyak wijen sebagai pengencernya karena minyak wijen memiliki keseimbangan yang tinggi dan ketahanan dari kerusakan dan oksidasi. Keuntungan dari minyak wijen yang lain, minyak ini pada temperature tinggi tidak terbakar secepat minyak lain, memiliki anti oksida yang disebut *Sesamol*, memiliki 87 % lemak tidak jenuh yang 41 %-nya merupakan asam linoleat.
5. Larutan formalin 10 % untuk fiksasi atau mengeraskan jaringan fetus.
6. Larutan Etanol 95 % untuk mengeluarkan cairan jaringan yang ada di dalam tubuh fetus.
7. Larutan NaCl fisiologis 0,9% untuk menstabilkan sel fetus supaya sel tidak rusak.

#### **4.5 Alat Penelitian**

##### **4.5.1 Alat pemeliharaan mencit dan perlakuan :**

1. Kandang dari bak plastik tempat pemeliharaan berukuran 23 cm × 17 cm × 9,5 cm dengan kawat kasa sebagai penutupnya, di lengkapi tempat pakan dari kawat dan botol kaca untuk tempat minuman dengan penutup karet berpipa sepanjang 3 cm, sekam sebagai alas kandang individual.
2. Timbangan elektrik (Ohaus®) yang mempunyai kapasitas 500 gram untuk penimbangan berat badan mencit betina induk.
3. *Syringe dispossable* ukuran 1 ml dengan *gastric lavage* untuk pemberian asam retinoat per oral.
4. Seperangkat alat bedah minor (*minor dissecting set*), papan seksi untuk memfiksasi mencit yang akan dibedah, Stoples / pot kecil dan tutupnya sebagai tempat penyimpanan organ.
5. Kaca pembesar

## 4.6 Prosedur Penelitian

### 4.6.1 Lokasi dan jadwal penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Reproduksi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) dan Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

### 4.6.2 Jadwal penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 9 bulan, mulai bulan Oktober 2007 sampai dengan akhir Juni 2008. Jadwal penelitian seperti terlihat pada Table 4.2

**Tabel 4.2** Jadwal Penelitian

No.	Kegiatan	Bulan Ke-									
		10	11	12	1	2	3	4	5	6	7
1.	Penelusuran kepustakaan	•	•	•							
2.	Penyusunan proposal penelitian		•	•	•	•	•				
3.	Ujian Proposal dan Perbaikan Proposal								•		
4.	Pelaksanaan Penelitian dan Pengambilan data	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
5.	Pengolahan dan Analisa Data Hasil penelitian								•	•	
6.	Penyusunan laporan Penelitian								•	•	
7.	Ujian tesis										•

## 4.7 Prosedur Pengambilan Atau Pengumpulan Data

### 4.7.1 Tahap persiapan hewan coba

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini Jenis Mencit : *Mus musculus* betina strain BALB/C dewasa sebanyak 32 ekor. Pada penelitian ini dibutuhkan 10 mencit jantan dan 32 ekor mencit betina untuk 2 kelompok, berumur 8-10 minggu, berat badan 20-25 gram. Mencit ini diperoleh dari Rumah Hewan Kampus C Universitas Airlangga Surabaya. Pemeliharaan hewan coba dilakukan secara terpisah untuk jantan dan betina pada bak plastik yang telah diberi alas sekam dan tutup kawat kasa.

Pakan mencit berupa pellet "Par L" ditempatkan di sebuah wadah terbuat dari kawat kasa dan diletakkan diatas kawat penutup, diberi minum air PDAM secara *ad libitum*. Penerangan dalam ruangan pemeliharaan diatur 12 jam terang dan 12 jam gelap sesuai dengan fotoperioditas daerah tropis. Penggantian sekam untuk alas tidur mencit 2 hari sekali. Sanitasi kandang; dibersihkan tiap hari, suhu sesuai suhu ruang, cukup ventilasi dan sinar matahari, tidak lembab.



**Gambar 4.1** Mencit Dalam Kandang

#### **4.7.2 Proses penimbangan dan mengawinkan mencit**

Penimbangan mencit dilakukan pada pagi hari sebelum perlakuan pertama kali dilakukan yaitu dengan menggunakan timbangan elektrik (Ohaus®) Mencit yang telah mencapai berat badan minimal 20 gram ditempatkan dalam satu kandang dengan mencit jantan, namun dipisahkan oleh sekat.



**Gambar 4.2** Mencit Dalam Timbangan

Tujuan pemisahan ini adalah untuk menginduksi masa estrus betina, untuk mengawinkan mencit betina dibutuhkan mencit jantan sehat yang tampak dari luar dengan rambut mengkilat, gerakan lincah, mata bersih dan bersinar, telah berhasil membuntingi mencit betina pada saat dilakukan uji fertilitas dengan mencit betina lain (bukan mencit betina yang digunakan untuk perlakuan). Perkawinan dilakukan dengan cara seekor mencit jantan diberi kesempatan mengadakan perkawinan yang kedua kali dengan mencit betina yang lain setelah melalui masa istirahat (tiga hari) dari perkawinan pertamanya.

Setelah dilakukan pemisahan selama tiga hari, sebelum dikawinkan mencit betina terlebih dahulu di amati vaginanya untuk mengetahui apakah mencit tersebut benar-benar dalam keadaan estrus atau tidak. Jika kondisi vagina terlihat bengkak dan berwarna kemerahan atau dengan apusan vagina akan tampak dominasi sel-sel yang mengalami kornifikasi maka mencit dalam keadaan estrus dan siap untuk dikawinkan. Mencit betina yang siap kawin ditempatkan dalam satu kandang dengan mencit jantan pada sore hari sekitar pukul 17.00 WIB dengan perbandingan mencit jantan dan betina 1:2-3, maksudnya satu mencit jantan dapat mengawini 2-3 mencit betina estrus. Kemudian keesokkan harinya

pada pagi hari sekitar pukul 05.00 – 07.00 WIB diamati adanya sumbat vagina (*vagina plug*) pada mencit betina. Jika terdapat sumbat vagina, maka keadaan tersebut menandakan bahwa mencit tersebut telah melakukan kopulasi, adanya sumbat vagina juga dianggap sebagai umur kebuntingan hari ke – 0.

#### 4.7.3 Penentuan dosis

Digunakannya asam retinoat dengan dosis tunggal 60 mg/Kg berat badan karena pada dosis tersebut sudah memberikan efek teratogenik jika diinduksikan pada induk mencit dengan umur kebuntingan 10 hari. Perhitungan dosisnya; 60 mg asam retinoat = 1000 gram BB mencit, 6 mg asam retinoat = 100 gram BB mencit, 0,6 mg asam retinoat = 10 gram BB mencit.

Diketahui bahwa volume maksimal lambung mencit dengan berat badan 20-30 gram adalah 1 ml (Kusumawati,2004). Agar sediaan serbuk ini dapat diberikan secara oral pada hewan coba maka bentuk sediaan ini dibuat dalam bentuk emulsi. Pada penelitian ini hewan coba yang sudah bunting rata-rata berat badan 25 – 35 gram, untuk pembuatan emulsi dengan menggunakan berat badan terbesar (35 gram) sebagai contoh perhitungan:

1.  $35 \text{ gram BB mencit} = 35 \text{ gram} : 1000 \text{ gram} \times 60 \text{ mg/Kg BB} = 210 \text{ mg}$   
 $210 \text{ mg} : 100 \text{ gram} = 2,1 \text{ mg}$  , jadi untuk mencit BB 35 gram = 2,1 mg = 1 ml.
2.  $34 \text{ gram BB mencit} = 34 \text{ gram} : 35 \text{ gram} \times 2,1 \text{ mg} = 2,04 \text{ mg}$   
 $2,04 \text{ mg} : 2,1 \text{ mg} \times 1 \text{ ml} = 0,97 \text{ ml}$ . Cara perhitungan seperti diatas dapat digunakan untuk menentukan dosis asam retinoat yang diberikan kepada mencit betina dengan berat badan yang berbeda sebagai berikut:



Berat badan mencit (gram)	Berat asam retinoat (mg)	Volume asam retinoat (ml)
25 gram	1,50 mg	0,71 ml
26 gram	1,56 mg	0,74 ml
27 gram	1,62 mg	0,77 ml
28 gram	1,68 mg	0,80 ml
29 gram	1,74 mg	0,83 ml
30 gram	1,80 mg	0,86 ml
31 gram	1,86 mg	0,88 ml
32 gram	1,92 mg	0,91 ml
33 gram	1,98 mg	0,94 ml
34 gram	2,04 mg	0,97 ml
35 gram	2,1 mg	1 ml

#### 4.7.4 Perlakuan dan pengelompokkan hewan percobaan

Mencit yang telah bunting menjadi kelompok hewan percobaan yang dibagi 2 kelompok percobaan secara acak yaitu:

- a. Kelompok K : Kelompok kontrol yaitu kelompok yang diberi minyak wijen dosis 1 ml/mencit pada umur kebuntingan induk hari ke-10.
- b. Kelompok P : Kelompok perlakuan yaitu kelompok yang diberi asam retinoat dosis 60 mg/Kg BB dilarutkan dalam minyak wijen secara oral dengan *gastric lavage* pada umur kebuntingan hari ke – 10.

Masing-masing kelompok terdiri dari 16 ekor induk mencit bunting UK-10 hari yang berumur 8-10 minggu, berat badan 25-35 gram. Pemberian minyak wijen pada kelompok kontrol dan asam retinoat pada kelompok perlakuan secara oral dengan menggunakan *syringe* 1 ml yang jarumnya ditumpulkan ( *gastric lavage* ) dan langsung masuk ke dalam lambung mencit, kemudian tempatkan sesuai dengan kelompoknya untuk pengamatan.



**Gambar 4.3** Pemberian Perlakuan Dengan *Gavage*

#### 4.7.5 Pembedahan

Pada usia kebuntingan induk hari ke-18, mencit dikorbankan dengan cara *dislocasio os cervicalis*. Kemudian dilakukan pembedahan pada *linea mediana* atau garis tengah tubuh mencit .

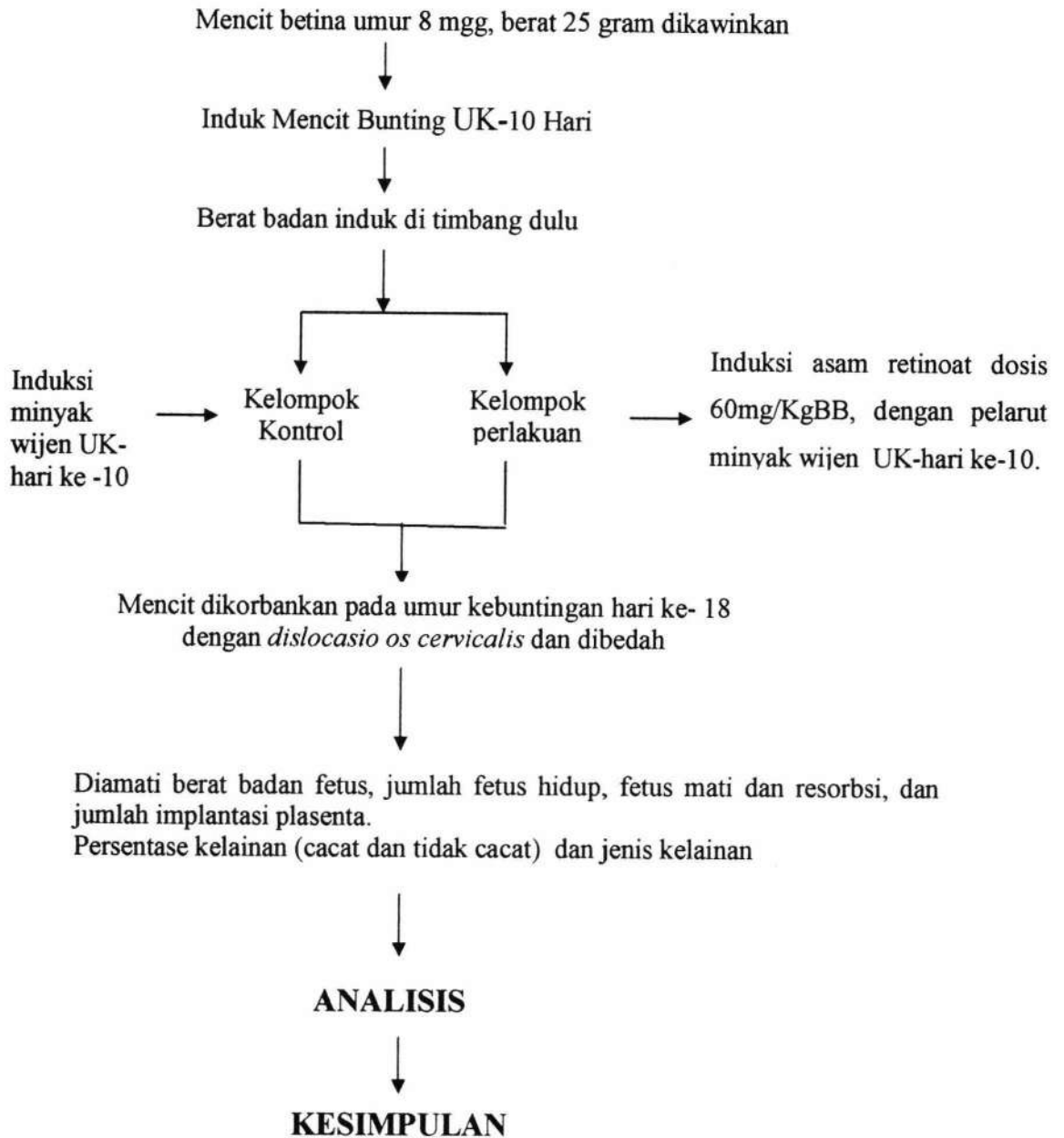
#### 4.7.6 Pengamatan dan pengambilan janin mencit

Pengamatan fetus dilakukan pada kebuntingan hari ke-18 dengan cara pembedahan pada bagian perut untuk mengeluarkan fetus dari uterus. Mencit diletakkan di atas meja bedah dalam posisi terlentang kemudian disectio pada *linea mediana* dan dikuliti lapisan demi lapisan pada bagian perut untuk mencapai uterus mencit.

Pengamatan dilakukan terhadap : (1) Hasil kebuntingan mencit, data yang diambil meliputi jumlah fetus hidup dari uterus kanan dan kiri, jumlah fetus mati dan resorpsi, jumlah implantasi plasenta, berat badan fetus. (2) Morfologi Fetus, malformasi diamati mulai dari daerah kepala, bentuk dan ukuran kepala, adanya

tanda-tanda gangguan penutupan. Di kepala harus terdapat 2 tonjolan mata (masih tertutup), 2 *nares*, 5 *papila fascialis*, 2 *pinnae*. Mulut dan bibir diamati ukuran, bentuk dan adanya gangguan perkembangan. Mulut dibuka untuk mengamati ada tidaknya celah dilangit-langit mulut. Kemudian aspek ventral dan dorsal tubuh diamati apakah ada *closure defect (spina bifida)*, dan dilanjutkan pengamatan tungkai. Pada tungkai diamati ukuran, kelengkapan ruas dan arah rotasi/fleksi bahu, siku, telapak dan jari. Jumlah jari kaki depan dan kaki belakang (masing-masing 5 kaki depan , 4 kaki belakang) dihitung dan adanya kelainan pada jumlah ukuran, fusi atau adanya selaput.

Ekor juga diamati keberadaan, ukuran dan pembengkokannya, selanjutnya ekor diangkat dan jarak antara bukaan anus dengan genitalia diperkirakan untuk penentuan jenis kelamin (jarak tersebut sangat dekat pada betina dan jauh pada jantan). Pengamatan menggunakan kaca pembesar. Penimbangan dilakukan dengan timbangan elektrik (Ohaus<sup>®</sup>) setelah fetus dibersihkan dari cairan amnion yang membungkusnya. Fetus dimasukkan ke dalam pot/botol yang berisi larutan NaCl 0,9 %.

**Operasional Penelitian :****Gambar 4.1** Kerangka Operasional Penelitian

## **4.8 Cara Pengumpulan Dan Analisis Data**

### **4.8.1 Pengumpulan data**

Data diperoleh dengan menghitung penurunan hasil reproduksi induk mencit (berat badan fetus hidup, jumlah fetus hidup, jumlah fetus mati dan teresorbsi, jumlah implantasi plasenta), persentase kelainan eksternal pada fetus dan jenis kelainan eksternal (*Amelia, Pocomelia, Simpodia, Polydactyli, Syndactyli, Brachidactyli, Ectrodactyli, Talipes, Agenesis tail, Kinky tail, Palatoschysis, Cleaft palate, Microcephaly, Macrocephaly, Anotia, Aglossostomia, Astomia, Atelostomia*).

### **4.8.2 Analisis data**

Data yang diperoleh kemudian diolah menggunakan program komputer dengan *uji t 2 sampel bebas* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pengaruh asam retinoat antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan untuk data berat badan fetus, jumlah implantasi plasenta, jumlah dan persentase kelainan eksternal, persentase fetus hidup, persentase fetus mati dan resorbsi.

*Uji Chi-square* untuk membandingkan kecacatan antara dua kelompok tersebut.

**BAB 5**  
**HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN**

## BAB 5

### HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian asam retinoat pada induk mencit (*Mus musculus*) dengan umur kebuntingan 10 hari terhadap penurunan hasil reproduksi induk mencit dan kelainan bawaan eksternal pada fetus mencit.

#### 5.1 Data Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan hewan coba mencit betina (*Mus musculus*) galur BALB/C, setelah bunting diambil secara acak sebanyak 32 ekor terbagi dalam 2 kelompok dengan jumlah yang sama sebanyak 16 ekor mencit bunting kelompok perlakuan diinduksi asam retinoat dosis 60 mg/KgBB secara oral, 16 ekor mencit bunting kelompok kontrol (kelompok normal) diinduksi minyak wijen 1 ml/mencit. Semua kelompok hewan coba diinduksi pada umur kebuntingan hari ke-10. Hewan coba dipelihara dengan baik selama kebuntingan, selanjutnya dikurbankan 1 hari sebelum melahirkan (UK hari ke-18). Data yang didapat dari hasil penelitian berupa hasil reproduksi induk mencit meliputi : berat badan fetus (gram), jumlah fetus hidup, jumlah fetus mati, jumlah implantasi plasenta, dan jumlah embrio teresorbsi.

Pada tabel 5.1 dapat dilihat hasil reproduksi induk mencit untuk kelompok kontrol, sebanyak 10 induk, dan 6 induk lainnya saat pembedahan didapatkan uterus dalam keadaan kosong (tidak ada fetus)

**Tabel 5.1** Data Kasar Hasil reproduksi Induk Mencit Kelompok Kontrol Setelah Diberi Minyak Wijen

Sampel	N0 Induk	Minyak wijen dosis 1 ml/mencit					Kelainan
		Implantasi	Resorbsi	Fetus Mati	Fetus Hidup	$\bar{x}$ BB fetus(g)	
Kontrol	1	7	0	0	7	0,849	–
							–
	2	6	0	0	6	0,837	–
							–
	3	8	0	0	8	0,565	–
							–
	4	11	0	0	11	0,898	–
							–
	5	9	0	0	9	0,910	–
							–
	6	7	0	0	7	1,277	–
							–
	7	7	0	0	7	1,276	–
							–
	8	7	0	0	7	1,297	–
							–
	9	8	0	0	8	1,177	–
							–
	10	10	0	0	10	0,916	–
							–
	Jumlah	80	0	0	80	–	–

Pada Tabel 5.1 menunjukkan implantasi sebesar 80, 80 ekor fetus hidup, fetus mati tidak ada (0), resorbsi tidak ada (0), serta kelainan eksternal dari fetus hidup yang dihasilkan semua dalam kondisi normal.

Pada Tabel 5.2 dapat dilihat hasil reproduksi untuk kelompok perlakuan, sampel sebanyak 16 induk, dari 3 induk yang ada mengalami resorbsi.



**Tabel 5.2** Data Kasar Hasil Reproduksi Induk Mencit Kelompok Perlakuan Setelah Diberi Asam Retinoat

Sampel	NO Induk	Asam retinoat dosis 60 mg/Kg BB					Kelainan Eksternal
		Implantasi	Resorbsi	Fetus Mati	Fetus Hidup	$\bar{x}$ BB fetus (g)	
Perlakuan	1	10	4	0	6	0,623	An,AT,P,Po,S,T,Tr,
	2	6	0	2	4	1,042	KT,P,
	3	7	7	0	0	0	-
	4	10	6	0	4	0,593	An,AsE,AT,P,S
	5	5	0	0	5	1,289	AsE,KT,P,T, XK,ST
	6	8	0	6	2	0,741	P,Po,Si,XK
	7	9	1	0	8	1,175	Ec,KT,P,Po,Si, XK
	8	9	4	0	5	1,207	Ec,KT,P,Po, Mm
	9	11	3	3	5	1,275	Ec,P,Po,Mm,T
	10	5	2	1	2	0,986	Ec,P,Po,Mm
	11	9	0	0	9	1,028	An,AsE,Ec,KT, P,Po,S,Si,T, XK
	12	7	0	0	7	0,864	An,AsE,AT,Ec, KT,P,Po,S,Si, X K
	13	5	0	0	5	0,892	Ec,KT,P,Po,Si, Mm,T,XK
	14	6	0	0	6	0,799	Ec,KT,P,Po,Si, Mm,T,XK
	15	5	5	0	0	0	-
	16	5	5	0	0	0	-
Jumlah		117	37	12	68	-	kelainan

**Keterangan singkatan :**

<i>Agenesis tail (AT)</i>	: Ekor yang tidak terbentuk.
<i>Anotia (An)</i>	: Telinga tidak terbentuk.
Asimetris Ear (AsE)	: Keadaan telinga yang tidak setangkup
<i>Ectrodactyli (Ec)</i>	: Jari hilang atau jumlah jari berkurang/ tidak lengkap.
<i>Kinky tail(KT)</i>	: Bentuk ekor yang aneh, bengkok, memendek, atau tumpul.
<i>Micromelia (Mm)</i>	: Anggota Kecil
<i>Palatoschysis(P)</i>	: Palatum / langit-langit bercelah.
<i>Pocomelia(Po)</i>	: Kaki dan tangan tidak berkembang.
<i>Simpodia(S)</i>	: Anggota kanan dan kiri menyatu.
<i>Syndactyli(Si)</i>	: Jari dempet
<i>Talipes(T)</i>	: Telapak tangan atau kaki bengkok (pengkor).
Teratoma (Tr)	: Tumor bawaan mengandung jaringan yang berasal dari ketiga lapisan mudigah
Extra kuncup (XK)	: Extra Kuncup

Pada Tabel 5.2 menunjukkan implantasi sebesar 117, 68 ekor fetus hidup, fetus mati sebesar 12 ekor, resorpsi 37 ekor, serta semua fetus mengalami kelainan eksternal. Pada Tabel 5.2 tampak rata-rata persentase fetus dengan kelainan bawaan eksternal dari induk setelah diberi asam retinoat secara oral selama masa organogenesis untuk kelompok perlakuan semua fetus hidup yang dihasilkan sebesar 68 ekor (58,2 %) menunjukkan kelainan dengan berbagai bentuk kelainan eksternal, sedangkan untuk kelompok kontrol yang diinduksi minyak wijen semua fetus hidup yang dihasilkan sebesar 80 ekor (100 %) dalam kondisi normal

## 5.2 Analisis Dan Hasil Penelitian

### 5.2.1 Hasil analisis uji normalitas

Uji normalitas data dilakukan untuk mengetahui apakah data penelitian yang diperoleh mengikuti atau mendekati distribusi normal, yakni distribusi data dengan bentuk lonceng (*bell shaped*). Data yang baik adalah data yang mempunyai pola distribusi normal. Uji normalitas data dilakukan dengan menggunakan *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* dengan taraf signifikansi 5%. Hasil uji normalitas data untuk hasil reproduksi induk mencit ditampilkan pada tabel 5.3 yang terdapat pada lampiran 3.

**Tabel 5.3** Hasil Uji Normalitas Distribusi Data (probabilitas)

Kelompok	Statistik	$\bar{x}$	% F. mati	%	$\bar{x}$
		Implantasi	dan Resorbsi	F.hidup	BB fetus
Kontrol dan Perlakuan	K-SZ	0,645	1,986	1,986	0,701
	Probabil	0,800	0,001	0,001	0,709

Pada Tabel 5.3 menunjukkan bahwa hasil reproduksi induk untuk implantasi plasenta, berat badan fetus berdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dengan nilai signifikansi 0,008 (implantasi plasenta) dan 0,709 (berat badan fetus, sedangkan persentase fetus hidup, fetus mati dan resorbsi menunjukkan tidak berdistribusi normal ( $p < 0,05$ ) dengan nilai signifikansi 0,001. Dengan demikian untuk rata-rata berat badan fetus dan Implantasi plasenta, diuji dengan uji parametrik yaitu *t-test* dua sampel bebas sedangkan untuk persentase fetus mati dan resorbsi, fetus hidup diuji dengan uji non parametrik yaitu *Mann-Whitney Test*.

### 5.2.2 Hasil uji homogenitas data

Uji homogenitas data pada prinsipnya adalah menguji apakah sebuah kelompok mempunyai varians yang sama di antara anggota kelompok tersebut. Pengujian homogenitas varians dilakukan dengan menggunakan *Levene Statistic Test*. Adapun hasil uji homogenitas diperlihatkan pada tabel 5.4 pada lampiran 4.

**Tabel 5.4** Hasil Uji Homogenitas Reproduksi Mencit

Hasil reproduksi	Levene Statistic	Signifikansi (p)	Makna
Implantasi	3,440	0,078	Homogen
Rata-rata BB	0,051	0,823	Homogen

Berdasarkan Tabel 5.4 menunjukkan bahwa jumlah implantasi plasenta dan rata-rata berat badan fetus memiliki varians yang homogen ( $p > 0,05$ ).

### 5.2.3 Hasil Uji *t-test* dua sampel bebas

Uji beda digunakan untuk mengetahui apakah pemberian asam retinoat dosis 60 mg/KgBB pada induk mencit umur kebuntingan 10 hari antar kelompok perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda terhadap jumlah hasil reproduksi induk mencit. Berdasarkan uji normalitas data maka dalam penelitian ini dilakukan uji parametrik yaitu *t-test* dua sampel bebas untuk jumlah implantasi plasenta dan rata-rata berat badan fetus, seperti yang terlihat pada Tabel 5.5 lampiran 4.

**Tabel 5.5** Hasil Uji *T- Test* Dua Sampel Bebas Setelah Pemberian Asam Retinoat

Variabel Independen	Kelompok		Sig.(p)	Makna
	Kontrol n = 10	Perlakuan n = 13		
Implantasi plasenta (Mean ± SD)	8,00 ± 1,56	7,23 ± 2,24	0,366	Tidak bermakna
Rerata BB fetus (Mean ± SD)	1,00 ± 0,244	0,96 ± 0,23	0,711	Tidak bermakna

Berdasarkan Tabel 5.5 pada uji *t-test* dua sampel bebas rata-rata implantasi plasenta diperoleh signifikansi sebesar 0,366 ( $p > 0,05$ ), dan rata-rata berat badan fetus menciit diperoleh signifikansi sebesar 0,711 ( $p > 0,05$ ). Hal ini berarti bahwa pemberian asam retinoat dosis 60 mg/KgBB tidak memberikan perbedaan yang bermakna pada jumlah implantasi plasenta dan rata-rata berat badan menciit pada kelompok perlakuan.

#### 5.2.4 Analisis hasil reproduksi

Analisis hasil reproduksi yaitu : fetus mati dan resorpsi, fetus hidup menurut kelompok dapat dilihat pada tabel 5.6.

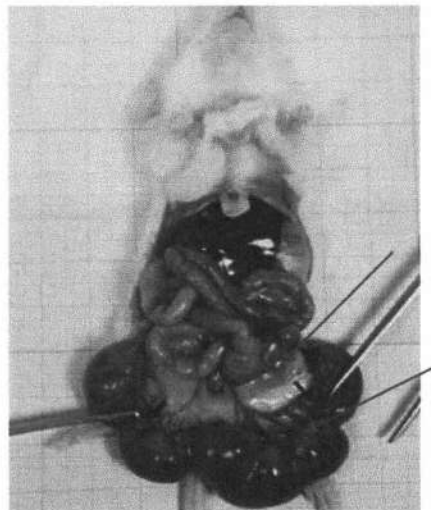
**Tabel 5.6** Persentase Resorpsi, Fetus Mati, Fetus Hidup Menurut Kelompok

Variabel Tergantung	Jumlah Implantasi	
	Kontrol n = 80	Perlakuan n = 117
Fetus hidup	80 (100)	68 (58,2)
Fetus mati dan resorpsi	0 (0)	49 (41,9)
Kelainan eksternal	0 (0)	68 (58,2)

**Tabel 5.7** Hasil Uji *Mann-Whitney* Setelah Pemberian Asam Retinoat.

Kelompok	Variabel Dependen	
	Fetus mati dan resorpsi	Fetus hidup
Kontrol dan Perlakuan	0,008	0,008

Berdasarkan Tabel 5.7, yang terdapat pada lampiran 5, menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) di antara fetus mati dan resorpsi dengan nilai signifikansi sebesar 0,008, pada fetus hidup dengan nilai signifikansi sebesar 0,008 setelah pemberian asam retinoat dosis 60 mg/KgBB. Kematian intra uterus dan fetus hidup dapat dilihat pada gambar 5.1

**Gambar 5.1** Uterus Induk Mencit UK- 18 Dengan Fetus Normal Dan Resorpsi. Setelah Pemberian Asam Retinoat

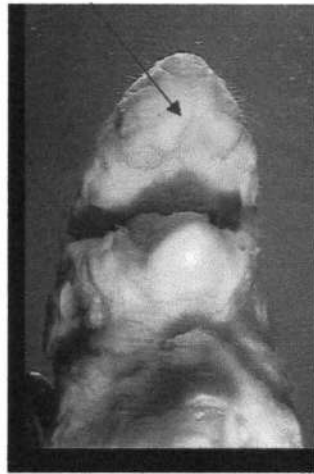
### 5.2.5 Kelainan bawaan eksternal

Jenis kelainan bawaan eksternal untuk kelompok perlakuan yang induknya diberi asam retinoat dosis 60 mg/KgBB secara oral menunjukkan semua fetus mengalami kelainan eksternal dalam bentuk *palatoschysis*, *pocomelia*, *kinky tail*, *ectrodactyli*, *micromelia*, *agenesis tail*, *anotia*, *asimetris auricle*, *simpodia*, *sindactyli*, *talipes*, *teratoma*, *short tai*, berbeda jika dibandingkan dengan kelompok kontrol yang induknya diberi minyak wijen dosis 1 ml/mencit, fetus yang dihasilkan semua dalam kondisi normal.

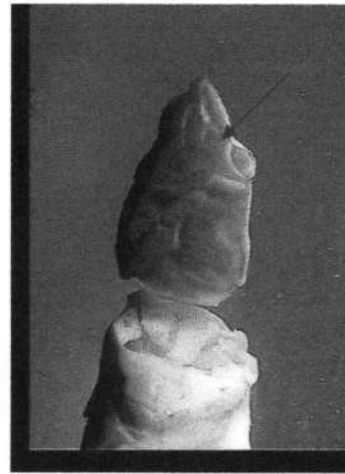
**Tabel 5.8** Persentase Jumlah Fetus Dengan Kelainan Bawaan Eksternal

Sampel	$\Sigma$ Induk	% Kelainan Eksternal								
		Palato schysis	Poco melia	Kinky Tail	Ectro dactyli	Micro melia	Ekstra Kuncup	Syndactyli	Agenesis Tail	Lain- lain
Kontrol	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perlakuan	13	79,4	60,1	45,6	32,4	22,1	22,1	20,6	17,6	47

Pada Tabel 5.8 Kelainan eksternal terbanyak pada kelompok perlakuan yaitu, 79,4 % (54 ekor) fetus mengalami *Palatoschysis*, pada kelompok kontrol 0 % fetus yang dihasilkan dapat dilihat pada gambar 5.2.



minyak wijen

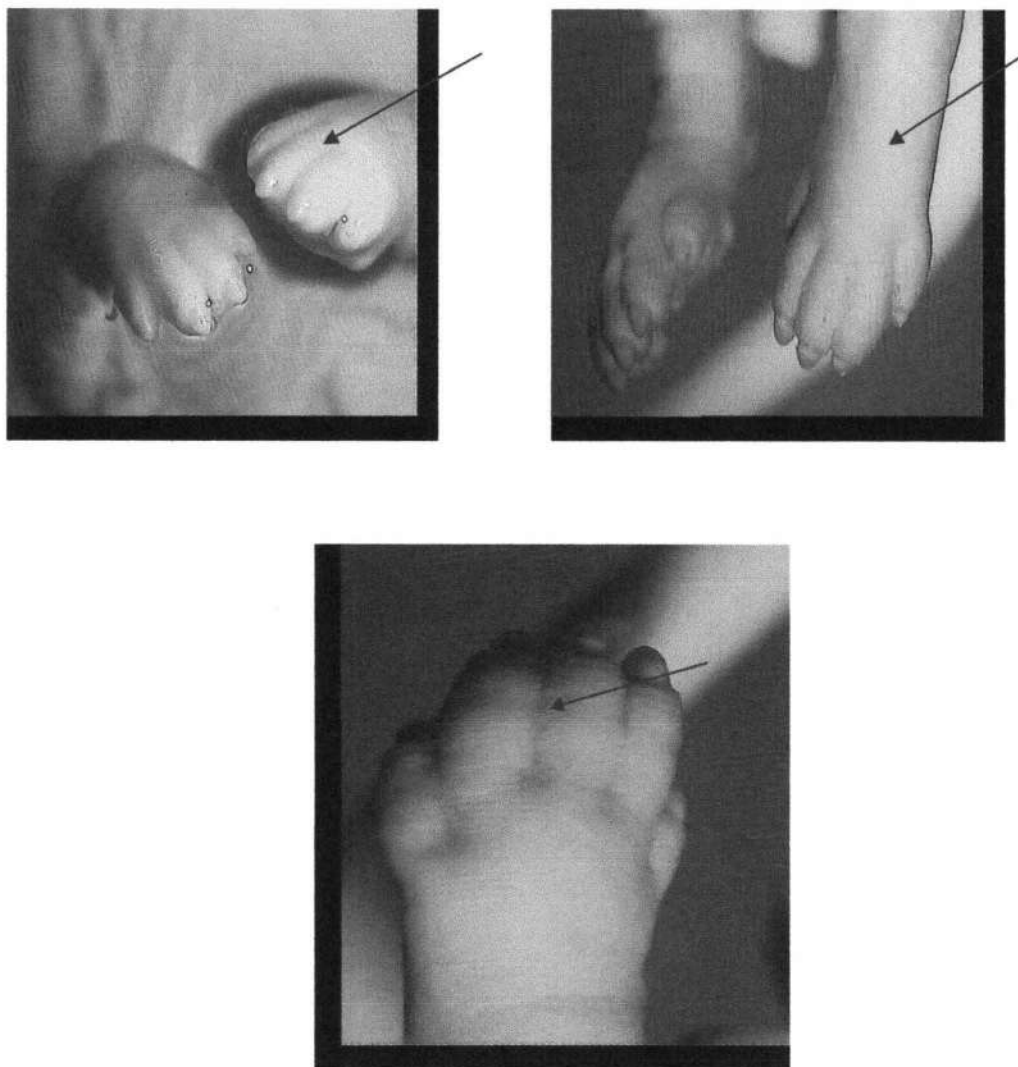


asam retinoat

**Gambar 5.2** Bentuk Palatum Fetus Mencit Kondisi Normal Dan Cacat

Pada kelainan anggota di dapatkan 60,1 % (41 ekor) fetus mengalami *Pocomelia*, 32,4 % (22 ekor) mengalami *Ectrodactyli*, 22,1 % (15 ekor) mengalami *Micromelia*, 22,1 % (15 ekor) mengalami *Ekstra kuncup* pada femur, 20,6 % (14 ekor) fetus mengalami *Sindactyli*, *simpodia* 11,7 % (8 ekor), *Talipes* 13,2 % (9 ekor), pada kelompok kontrol 0 % fetus yang dihasilkan dapat dilihat pada gambar 5.3 dan 5.4 berikut ini.





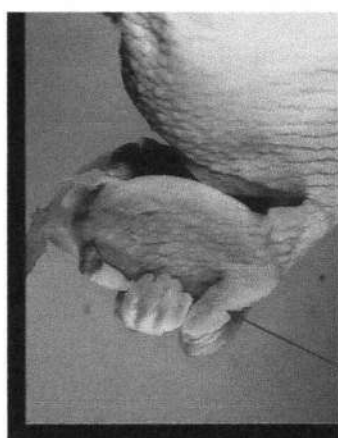
**Gambar 5.3** Fetus Mencit Dengan Anggota Normal



Syndactyli



Pocomelia



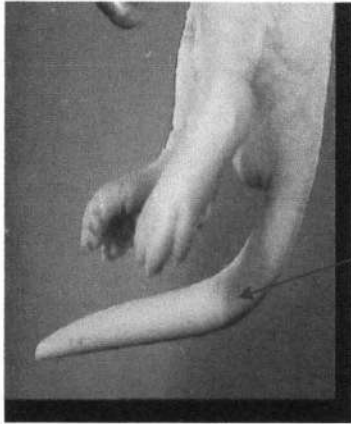
Simpodia



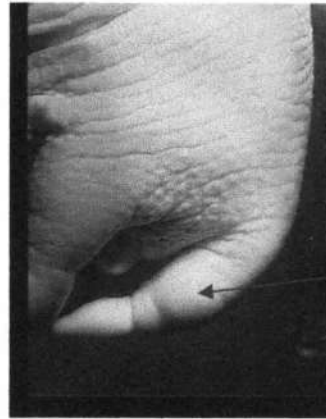
Talipes

**Gambar 5.4** Fetus Mencit Dengan Kelainan Anggota

Pada kelainan ekor didapatkan sebesar 45,6 % (31 ekor) mengalami *kinky tail*, 17,6 % (12 ekor) mengalami *Agenesis tail*, *Short tail* 1,47 % (1 ekor), pada kelompok kontrol 0 %, fetus yang dihasilkan tampak pada gambar 5.5



minyak wijen



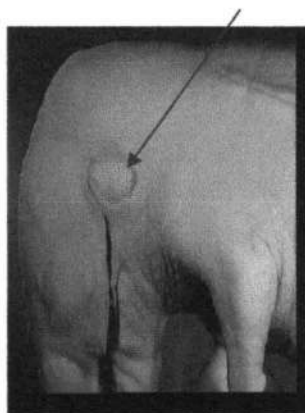
asam retinoat

**Gambar 5.5** Fetus mencit dengan bentuk ekor kondisi normal dan cacat

Kelainan bawaan eksternal lain yang ditemukan pada fetus mencit adalah *anotia* 13,2 % (9 ekor), *teratoma* 1,47 % (1 ekor), *asimetris ear* 5,9 % (4 ekor), sedangkan pada kelompok kontrol 0 %, fetus yang dihasilkan tampak pada gambar 5.6



Agenesis telinga



Asimetris kiri



Excensefali

**Gambar 5.6** Fetus Mencit Dengan Kelainan Eksternal

**BAB 6**  
**PEMBAHASAN**

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh asam retinoat dalam menghambat proses organogenesis induk mencit umur kebuntingan 10 hari. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris yang memenuhi kriteria sebagai eksperimen murni (*True Experiment*) yaitu adanya kriteria perlakuan, kelompok perlakuan, kelompok kontrol, replikasi dan randomisasi (Zainudin, 2000).

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *post test* dengan kelompok eksperimen dan kontrol (*post test only control group design*), karena penelitian dilakukan dengan membagi hewan coba yang sudah bunting menjadi dua kelompok dengan jumlah yang sama secara acak. Penentuan keadaan bunting ditetapkan hari kesepuluh, kelompok kontrol diberi minyak wijen secara oral dosis 1 ml/mencit, kelompok perlakuan diberi asam retinoat secara oral dosis 60 mg/Kg BB, pemberian perlakuan ini selama 1 hari kemudian diikuti sampai UK-18 hari. Penghitungan hasil reproduksi induk mencit meliputi jumlah implantasi plasenta, resorpsi, fetus mati, fetus hidup, berat badan fetus dan pengamatan kelainan eksternal fetus mencit.

#### **6. 1 Hasil Penelitian Setelah Perlakuan Minyak Wijen dan Asam Retinoat**

##### **6.1.1 Pengaruh pemberian asam retinoat terhadap hasil reproduksi induk mencit**

Uji analisis varians antar kelompok perlakuan terhadap kadar asam retinoat, rata-rata implantasi plasenta diperoleh signifikansi sebesar 0,366

( $p > 0,05$ ), hal ini berarti bahwa pemberian asam retinoat dosis 60 mg/KgBB tidak memberikan perbedaan yang bermakna pada jumlah implantasi plasenta. Hasil penelitian ini sejalan dengan pendapat Wilson (1973), bahwa periode perkembangan usia kebuntingan hari ke-10 hingga ke-13 pada mencit termasuk periode organogenesis, dan implantasi terjadi pada umur kebuntingan 4-5 hari (Rugh, 1968), sehingga penginduksian asam retinoat pada umur kebuntingan 10 hari tidak akan mempengaruhi jumlah implantasi, berbeda dengan periode sebelumnya (pradiferensiasi) yang rentan terhadap efek agensia toksis dan mengarah pada kematian, periode organogenesis lebih rentan terhadap gangguan agensia toksis dengan manifestasi berupa kelainan perkembangan.

Hasil uji analisis varians rata-rata berat badan fetus mencit diperoleh signifikansi sebesar 0,711 ( $p > 0,05$ ), hal ini berarti bahwa pemberian asam retinoat dosis 60 mg/Kg BB tidak memberikan perbedaan yang bermakna pada jumlah rata-rata berat badan mencit pada kelompok perlakuan. Hasil penelitian ini tidak sejalan dengan pendapat Wilson (1973), bahwa cacat bawaan dapat menyebabkan penurunan berat badan fetus, karena penurunan berat badan fetus merupakan perwujudan dari adanya abnormalitas pertumbuhan baik pada manusia maupun pada hewan percobaan. Penurunan berat badan fetus merupakan bentuk teringan dari efek agensia teratogenik dan merupakan parameter yang sensitif.

Hasil uji *Mann-Whitney*, menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) pada resorpsi dan fetus mati dengan nilai signifikansi sebesar 0,008, serta pada fetus hidup dengan nilai signifikansi sebesar 0,008, setelah pemberian asam retinoat dosis 60 mg/KgBB. Hasil penelitian ini sejalan dengan pendapat Poernomo (2004), pada fetus yang resorpsi maupun mati sejak dalam

kandungan belum selesai mengalami perkembangan dan menegaskan bahwa asam retinoat yang diberikan secara oral pada induk mencit akan masuk ke dalam janin melalui plasenta setelah dimetabolisme dalam hepar induk dan masuk dalam peredaran darah mempunyai efek embriotoksik. Efek embriotoksik asam retinoat pada penelitian ini berupa kematian fetus dan resorpsi fetus.

Resorpsi fetus yang ditemukan berupa kematian embrio sejak dini yang ditunjukkan dengan adanya sisa jaringan embrio dalam uterus. Kematian fetus dan resorpsi serta fetus yang hidup tidak terjadi pada setiap induk berhubungan dengan kemampuan yang berbeda-beda pada masing-masing induk dalam memetabolisme asam retinoat.

#### **6.1.2 Pengaruh Asam retinoat pada Morfologi Fetus Mencit**

Berdasarkan persentase fetus mencit dengan kelainan bawaan eksternal dari induk mencit umur kebuntingan 10 hari setelah diberi asam retinoat secara oral dosis 60 mg/Kg BB untuk kelompok perlakuan sebesar 68 ekor fetus hidup (58,2 %) keseluruhan mengalami kelainan eksternal, pada kelompok kontrol dengan minyak wijen dosis 1 ml/mencit sebesar 80 ekor fetus hidup (100 %) keseluruhan normal, persentase ini menunjukkan perbedaan. Hasil penelitian ini sejalan dengan pendapat Underwood (1999), Pemaparan bahan kimia yang berbahaya atau teratogen dapat menghalangi pertumbuhan dan diferensiasi, menyebabkan terjadinya kelainan janin. Tingkat keparahan kelainan janin tergantung pada sifat teratogen dan tahap pertumbuhan embrio pada saat terkena teratogen. Apabila terkena pada tahap awal organogenesis, pengaruh yang hebat ditemukan pada pertumbuhan organ atau anggota tubuh/ekstrimitas.

Hasil persentase data kelainan eksternal terbanyak pada kelompok perlakuan yaitu, 79,4 % (54 ekor) fetus mengalami *palatoschysis*. Umur kebuntingan 10 hari pada mencit (*Mus musculus*) merupakan periode kritis dari organogenesis, *palatum*, anggota dan organ indra (pembentukan mata, telinga, dan hidung) serta axial, skeleton (Rugh, 1968). Masuknya agensia yang bersifat teratogenik pada dosis dan waktu yang tepat dapat mengakibatkan gangguan pada embrio. Periode kritis organogenesis sistem organ memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap pemberian bahan teratogenik embrio, karena pada periode embriogenesis yang terjadi pada mencit dengan umur kebuntingan 9-12 hari merupakan periode perkembangan anggota apabila terkena bahan teratogen pengaruh yang hebat ditemukan pada pertumbuhan organ atau anggota tubuh/ekstrimitas.

*Palatoschysis*, disebabkan oleh perkembangan yang tidak sempurna dimana pada saat proses pemisahan antara rongga hidung dan rongga mulut untuk membentuk langit-langit atau fusi *palatum* ke arah horizontal diduga dihambat oleh asam retinoat sehingga migrasi, sel-sel yang bersangkutan akan terhenti dan tidak akan melanjutkan proses fusi *palatum* ke arah medial, maka menyebabkan terjadinya langit-langit bercelah atau *palatoschysis*.

*Palatum* pada mamalia adalah struktur langit-langit mulut yang membatasi rongga nasofaring dengan rongga mulut. Secara anatomi *palatum* dibedakan antara *palatum* keras (*palatum durum*) yang menempati wilayah anterior dan *palatum* lunak (*palatum mole*) yang menempati wilayah posterior langit-langit mulut. Sedangkan dari sudut perkembangannya *palatum* dibedakan antara *palatum* pertama (*primary palate*) dengan *palatum* kedua (*secondary palate*) (Rugh, 1968).



Pada hewan vertebrata dasar dari dinding skeleton kranium dibangun oleh neurokranium. Pada *chondri chtyes neurokranium* bagian ventral berfungsi ganda, yaitu sebagai lantai otak sekaligus sebagai atap rongga mulut. Mulai dari *teleostei neurokranium* yang menjadi lantai otak tersebut dilapisi wilayah ventralnya oleh tulang-tulang derivat palato kuadrat, struktur tulang ini disebut palatum pertama.

Proses menjadi atap rongga nasofaring pada hewan ini adalah palatum pertama. Pada tetrapoda sepasang tonjolan bilateral jaringan fibromuskuler tumbuh dari sisi dalam dinding maksila sebelah kiri dan kanan lain bertemu di daerah medial langit-langit mulut. Struktur baru ini disebut palatum kedua (*secondary palate*) yang membagi rongga oronasofaring menjadi rongga mulut dan rongga nasofaring. Pada manusia palatum pertama (premaksila) menempati wilayah langit-langit mulut anterior mulai dari foramen incisivus hingga batas lateral gigi taring, sedangkan palatum kedua adalah seluruh wilayah posteriornya (Rugh,1968). Dalam penelitian ini yang dimaksudkan sebagai perkembangan palatum (palatogenesis) adalah proses pembentukan palatum kedua. Hambatan asam retinoat terhadap penutupan langit-langit mulut embrio terjadi sejak awal proses palatogenesis adalah proses pembentukan palatum kedua.

Perkembangan palatum (palatogenesis) melibatkan koordinasi proses-proses dasar perkembangan, yang terdiri dari: pembelahan sel, migrasi sel, interaksi dan adesi sel, diferensiasi sel, dan kematian sel,(apoptosis). Ferguson (1988) membagi palatogenesis ke dalam 4 tahap, yaitu pertumbuhan awal keping palatum, pertumbuhan vertikal, pertumbuhan horizontal, dan fusi. Pada manusia seluruh kejadian tersebut berlangsung antara minggu ke-7 hingga ke-12 kehamilan, sedangkan pada mencit percobaan sekitar hari ke-9 hingga ke-15

kebuntingan. Pada mamalia pertumbuhan awal palatum dimulai dari terbentuknya tonjolan bilateral dari sisi dalam dinding maksila. Pada awalnya pertumbuhan bilah terjadi secara vertikal dengan kedua ujung bilah mengarah ke dasar mulut.

Pada tahap berikutnya ujung-ujung keping palatum akan tumbuh kearah vertikal menempatkan diri di atas punggung lidah yang sedang berkembang. Tahap ini diperkirakan sebagai tahap kritis palatogenesis, terdapat 2 puncak sintesis DNA sepanjang palatogenesis yaitu pada saat awal pertumbuhan keping dan pertengahan pembentukan keping. Kemampuan keping palatum tumbuh vertikal disebabkan oleh daya kemampuan tumbuh yang terbentuk di keping palatum oleh berbagai faktor terutama akumulasi hialuronan, yang membuat densitas sel menurun. Densitas sel yang lebih rendah mendorong pembelahan sel yang lebih cepat sehingga pertumbuhan aspek oral menjadi lebih cepat dibandingkan dengan pertumbuhan aspek nasal menyebabkan ujung-ujung keping menjadi tumbuh kearah vertikal. Setelah itu keping palatum yang kini sudah menempati posisi di atas lidah akan tumbuh saling mendekat secara horizontal dari kedua arah hingga terjadi kontak antara kedua ujungnya. Proses tumbuh horizontal melibatkan aktivitas pembelahan sel dan sintesis senyawa matriks ekstrasel. Kontak antara 2 ujung keping palatum memicu serangkaian proses yang diarahkan pada keberhasilan fusi palatum membentuk struktur penyambung yang kokoh menutup sempurna langit-langit mulut. Cacat celah langit-langit adalah manifestasi dari gangguan yang terjadi di salah satu tahap sepanjang proses palatogenesis.

Ferguson (1988) menyatakan bahwa terdapat 2 tahap dalam palatogenesis, yaitu keberhasilan keping palatum mengadakan pertumbuhan vertikal dan

keberhasilan transdiferensiasi epitel ke mesenkim pada tahap fusi palatum. Cacat celah telah dipastikan antara lain dapat diinduksi oleh tembakau (nikotin), kelebihan vitamin A, epilepsi dan obat-obatan antiepilepsi, pelarut organik, alkohol, dan bahan-bahan kimia pertanian.

Kelainan bawaan eksternal lain yang muncul pada kelompok perlakuan adalah *talipes* (tungkai belakang torsi) sebanyak 9 ekor (13,2 %), *kinky tail* (ekor bengkok) 31 ekor (45,6 %). Cacat berupa tungkai belakang torsi (*Talipes*) dan ekor bengkok (*Kinky Tail*) sejalan dengan pendapat Underwood (1999), bahwa cacat tersebut disebabkan oleh terhambatnya osteogenesis pada kedua organ, terutama terhambatnya mitosis pada sel-sel kartilago yang berperan dalam osteogenesis tungkai belakang dan ekor. Hambatan tersebut melalui mekanisme cAMP yang mengontrol mitosis.

Underwood (1999) menyatakan bahwa pertumbuhan sel berhubungan dengan konsentrasi cAMP di dalam sel tersebut. Adanya reduksi konsentrasi cAMP di dalam sel dan jaringan akan meningkatkan tingkat pertumbuhan sel, sebaliknya peningkatan konsentrasi cAMP di dalam sel dan jaringan akan menurunkan tingkat pertumbuhan sel, dan pada peningkatan konsentrasi cAMP yang tinggi dapat menyebabkan hambatan akselerasi pertumbuhan. Selain itu, asam retinoat mampu menghambat aktivitas enzim *fosfodiesterase* yang menghidrolisis cAMP, sehingga merusak cAMP tertunda yang akibatnya terjadi peningkatan konsentrasi cAMP di dalam sel dan jaringan. Diduga, peningkatan konsentrasi cAMP di dalam sel-sel yang berperan dalam osteogenesis tungkai belakang dan ekor akan menghambat osteogenesis pada kedua organ tersebut.

Terjadinya kelainan pada ekor seperti *kinky tail* atau *agenesis tail* pada fetus diduga disebabkan oleh kematian sel (apoptosis) secara berlebihan. Pada fetus yang mengalami *kinky tail*, diduga kelainan ini dimulai sejak awal pembentukan blastema vertebra. Menurut Sadler (1997) pembentukan vertebra telah dimulai sejak fetus usia kebuntingan 10 hari. Pada saat ini sel mesenkim dari sklerotom bermigrasi ke arah medial mengelilingi korda dorsalis dan selanjutnya berkembang menjadi blastema *centrum* dari satu vertebra. Tiap *centrum* dibangun oleh sel berasal dari somit yang berurutan. Apabila ada hambatan terhadap migrasi mesenkim dari salah satu arah, maka struktur *centrum* yang terbentuk dapat mengalami kelainan. Kelainan pada *centrum* berupa ukuran yang lebih kecil dan jarak saling berhimpitan. Kelainan tersebut menyebabkan *arcus* dan *processus* yang terletak dan merupakan tonjolan dari *centrum* terhambat pertumbuhannya. Terhambatnya pertumbuhan *centrum*, *arcus*, dan *processus* menyebabkan ukuran vertebra ekor menjadi kecil dan menurunnya ketegaran vertebra ekor sehingga dimungkinkan terjadinya pembengkokan yang berlebihan dari vertebra ekor. Asam retinoat kemungkinan menghambat pembentukan awal vertebra ekor sehingga menimbulkan kelainan.

Pada kelainan anggota jenis lain di dapatkan 60,1 % (41 ekor) fetus mengalami *pocomelia*, 32,4 % (22 ekor) mengalami *ectrodactyli*, 22,1 % (15 ekor) mengalami *micromelia*, 22,1 % (15 ekor) mengalami *ekstra kuncup* pada femur, 20,6 % (14 ekor) fetus mengalami *sindactyli*, *simpodia* 11,7 % (8 ekor) munculnya kelainan tersebut sejalan dengan pendapat Underwood (1999), akibat toksisitas dari asam retinoat, karena sifat reaktivitasnya terhadap bagian nukleofilik dari asam amino dan DNA. Akibatnya bisa terjadi perubahan struktur

dari molekul protein dan DNA sehingga mengakibatkan protein kehilangan fungsi biologis dan pada DNA terjadi mutasi gen.

Asam retinoat ini akan berikatan dengan protein kompleks yang ditranslokasikan ke inti yang bekerja pada kromatin untuk memproduksi protein baru melalui mRNA. Selanjutnya akan berikatan dengan reseptor asam retinoat (RAR) di inti sel sasaran, dan kompleks reseptor asam retinoat berikatan dengan elemen respon DNA yang kemudian akan merangsang transkripsi sel. Ikatan kapasitas reseptor asam retinoat terlampaui maka asam retinoat akan berada bebas dalam inti sehingga akan mempengaruhi proses transkripsi dan akan mengubah ekspresi gen, yang akan menyebabkan perubahan pola pembentukan jaringan anggota.

Proses terbentuknya anggota tubuh, dimulai dari kondensasi sel-sel pada lempeng mesoderm lateral somatik, hubungan antar sel hilang dan ditransformasi menjadi massa mesenkim, melepaskan diri dan migrasi ke daerah lateral. Sel somit pindah ke daerah bakal anggota, keduanya terakumulasi dan membentuk kuncup anggota. Kuncup anggota menginduksi *ektoderm* di depannya sehingga mengalami evaginasi dan selnya memanjang yg disebut *Apikal Ectoderm Ridge (AER)*. *AER* menyebabkan sel mesenkim berproliferasi dan memanjang. Setelah terbentuk jari, *AER* akan hilang anggota tubuh yang sempurna terbentuk melalui proses kematian sel yang terprogram (Apoptosis).

Apoptosis pd anggota tubuh, bukti ketergantungan antara *AER* dan *Mesoderm*. Daerah yg mengontrol perkembangan anggota tubuh ada 2 (Gilbert,1997) yaitu :

1. *Apical ectoderm ridge (AER)* mengontrol pertumbuhan sepanjang

axis proksimal sampai distal.

2. *Zone of Polarizing Activity (ZPA)* mengontrol pertumbuhan sepanjang axis anterior sampai posterior

Penambahan *ZPA* menyebabkan terbentuknya jari baru seperti bayangan cermin.

Induksi asam retinoat dosis 60 mg/kg berat badan menyebabkan kematian sel pada mesenkim kuncup anggota (Okuda, 1997). Masuknya suatu zat yang menginduksi kematian sel mesoderm kuncup anggota akan menyebabkan kegagalan sel mesoderm tersebut menerima sinyal dari Pematang Apikal Ektoderm (AER) yang mengakibatkan terganggunya pembentukan anggota tubuh sehingga dapat menimbulkan kelainan. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat suatu ketergantungan antara AER dengan mesoderm. Jika mesoderm tidak ada maka AER tidak terbentuk (Gilbert, 1997).

Kelainan bawaan eksternal lain yang ditemukan pada fetus mencit adalah *anotia* 13,2 % (9 ekor), *teratoma* 1,47 % (1 ekor), *asimetris ear* 5,9 % (4 ekor). Hasil penelitian ini sejalan dengan pendapat Rugh (1968), bahwa proses pembelahan sel embrio dapat terjadi melalui 3 mekanisme yaitu : melalui aktivasi *mitosis promoting factor (MPF)*, adanya peran signal transduksi, serta adanya peran interaksi protein. Hambatan salah satu faktor di atas atau bahkan ketiga faktor tersebut akan menyebabkan penghambatan pada pembelahan zigot maupun embrio. Hambatan pembelahan mitosis embrio dalam stadium metafase dapat disebabkan oleh adanya hambatan sintesis mikrotubulus dan kerusakan mikrotubulus.

Proses pembentukan sel baru dengan jalan mitosis, merupakan proses yang sangat kompleks dan melalui beberapa tahapan. Pertumbuhan sel normal diatur

oleh protein terlarut yang disebut faktor pertumbuhan. Faktor pertumbuhan menyampaikan sinyal kepada reseptor pertumbuhan. Reseptor pertumbuhan yang berada pada selaput sel menerima rangsang dari faktor pertumbuhan yang berasal dari luar sel, hal ini menimbulkan rangsangan dan diteruskan ke dalam sitoplasma.

Di dalam sitoplasma, signal rangsangan ini diterima dan mengaktifkan proses enzimatik yang sangat rumit dan merupakan signal transduksi yang akan diteruskan ke inti sel. Di dalam inti sel, signal rangsangan dari sitoplasma diterima, kemudian inti sel mengadakan transkripsi gen dalam DNA. Di dalam gen, setelah menerima signal tersebut, akan terjadi duplikasi DNA yang pada akhirnya menimbulkan mitosis dan proliferasi sel. Pengaturan pertumbuhan dilakukan dengan mengatur produksi hormon, faktor pertumbuhan, enzim dan lain-lain, semua itu diproduksi oleh protoonkogen dan atau gen supresor (anti onkogen).

Perubahan kode genetik ini dapat mengenai gen-gen tertentu seperti gen pengatur pertumbuhan, gen penghambat pertumbuhan, gen untuk perbaikan DNA. Akibat perubahan ini semua, ekspresi gen menjadi berlebihan dan mengakibatkan pertumbuhan sel yang tidak terkendali. Perubahan gen berupa mutasi gen atau bentuk lain, bila suatu sel normal gennya telah mengalami kerusakan karena suatu teratogen, dan tidak dapat diperbaiki oleh gen perbaikan maka menjadi cacat bersifat permanen, disinilah awal timbulnya gangguan pertumbuhan.

Gen yang telah mengalami kerusakan / cacat atau terjadi mutasi ikut dalam siklus pembelahan sel, mutasi sel ini menyebabkan gen tidak dapat dibaca/dikenal atau terkode untuk protein yang cacat dan hasil akhirnya berbeda dengan yang seharusnya terjadi berupa pembelahan sel yang tidak terkontrol, pertumbuhan sel

cepat membesar. Kegagalan migrasi sel dan pembentukan suatu organ ini dapat terjadi sepanjang proses embriogenesis disebut *agenesis* (Underwood,1999). Gangguan pertumbuhan ini apabila terjadi di bagian otak yang masih berkembang menimbulkan kelainan misalnya hidrosefalus diduga disebabkan oleh beberapa hal diantaranya penyumbatan aqueductus Sylvii, ketidakseimbangan antara sekresi cerebrospinal fluid dan absorpsi dari choroid plexus di dalam rongga ventrikel.



**BAB 7**  
**PENUTUP**

## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan pada hasil analisis dan pembahasan dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Pemberian asam retinoat secara oral dengan dosis 60 mg/Kg berat badan pada induk mencit umur kebuntingan hari ke-10, memberikan pengaruh terhadap penurunan hasil reproduksi induk mencit berupa tingginya jumlah kematian intra uterus (fetus mati dan resorpsi), namun tidak berpengaruh pada berat badan fetus.
2. Pemberian asam retinoat secara oral dengan dosis 60 mg/Kg berat badan pada induk mencit umur kebuntingan hari ke-10, memunculkan kelainan bawaan eksternal di semua fetus mencit. Jenis kelainan eksternal terbanyak adalah: *palatoschysis*, *pocomelia*, *kinky tail*, *ectrodactyli*, *micromelia*, *ekstra kuncup*, *sindactyli*, *agenesis tail*. Sedangkan kelainan eksternal lain yang muncul pada beberapa fetus dalam jumlah yang relatif sedikit yaitu *asimetris auricle*, *simpodia*, *talipes*.

## 7.2 Saran

1. Perlu sosialisasi dari hasil penelitian ini dalam kaitannya dengan pengaruh pemakaian asam retinoat pada ibu hamil trimester pertama.
2. Kepada Institusi yang berwenang, hasil ini dapat digunakan di kemudian hari, sebagai bahan pertimbangan bahwa asam retinoat yang diberikan pada ibu hamil trimester pertama untuk pengobatan dapat menimbulkan pengaruh buruk yang sifatnya menetap pada perkembangan embrio.
3. Perlu penelitian lebih lanjut mencari bahan yang dapat menghambat munculnya kelainan akibat asam retinoat

**DAFTAR PUSTAKA**

## DAFTAR PUSTAKA

- Almatzier dan Sunita, 2003. *Vitamin dan Vitamin Larut Lemak Dalam Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Edisi 3, PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, hlm, 158-167.
- Arthur G and Hall, 1997. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran* Cetakan I, EGC, Jakarta, hlm 33-50.
- Bagnara T, 1988. *Endokrinologi Umum Edisi Keenam*, Airlangga University, Surabaya, hal, 564-595.
- Brody T, 1994. *Nutritional Biochemistry*, Academic Press Inc, San Diego, pp ,406.
- Churh DC., and Pond WG., 1988. *Fat Soluble Vitamins* (In Basic Animal Nutrition And Feeding), pp; 224.
- Combs GF, 1992. *Vitamins A In The Vitamins Fundamental aspects in Nutrition and Health*, San Diego, Academic Press, Inc, New York, pp, 123-135.
- Coskun T, 1998. Binding and Immunocompromising Malnutrition : Vitamin A Deficiency, *IPA Journal International Child Health* 9: 1-17.
- Desbois C., Aubert D., Legrand C., Pain B and samarut J, 1991. A Novel Mechanism of Action for v-Erb A: Abrogation of Inactivation factor AP-1 by Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptors. *Cell*. 67:731-740.
- Dewoto HR dan Wardini BPS, 2003. *Vitamin dan mineral Dalam Farmakologi dan Terapi*, Edisi 4. Gaya Baru, Jakarta, hlm, 724-727.
- Ferguson M.Q.J, 1988. *Palate Development*. IRL Press. Oxford, Washington DC.
- Goodman and Gilman' s , 2001. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, edisi 10, chapter 64, Fat-Soluble vitamins,Mc Graw-hill NewYork,1773-1791.
- Herman M J dan Mutiatikum D, 1990. Efek Teratogenik-dismorfogenik masalah akibat penggunaan obat dalam kehamilan. *CDK*, Jakarta, hal, 65: 34-35.
- Hunter RHF, 1993. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. ITB Pers, Bandung.
- Irnidayanti Y, 2004. Efek Teratogenik Asam Retinoat Terhadap Perkembangan Fetus Mencit (*Mus Musculus*) Swiss Webster, *tesis*, Pasca Sarjana Institut Tehnologi Bandung.

- Jerry L., Campbell Jr., and Mary Alice Smith., 2004. *Dose response for retinoic acid – induced forelimb malformations and cleft palate*, Departemen of Environmental Health Science, University of Georgia
- Jiang H., Gyda III., M. Harnish., D.C Chandraratna., R.A Soprano., and K.J Kochhar, 1994. Teratogenesis by retinoic acid analogs positively correlates with elevation of retinoic acid receptor beta-2 mRNA levels in treated embryos. *Teratology* 50: 38-43.
- Joyce L. Kee, 1995. *Farmakologi pendekatan Proses Keperawatan*, EGC, Jakarta, hlm; 169-171.
- Kanamori A. and Brown D, 1992. The regulation of thyroid hormone receptor beta genes by thyroid hormone in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 267: 739-745
- Kelch E, 1994. The vitamin A and the renal patient controversy. *Renal Forum Newsletter for Renal Dietitians* 2: 2.
- Kiptiyah 2002. Efek Teratogenik Vitamin A Pada Mencit (*Mus musculus*) Betina, *Tesis*, Universitas Airlangga, Surabaya, hlm; 66-67.
- Kochhar D. M, 1995. *Retinoids and Retinoid Receptors in Teratogenesis*. Departement of Pathology, Anatomy and Cell Biology, Thomas Jefferson University, Johnson City.
- Koren G., and Cohen M.S., 1998. *Aspek khusus dari Farmakologi Perinatal dan Pediatrik dalam Farmakologi dasar dan klinik edisi VI*, EGC, Jakarta.
- Kusumawati D, 1993. Pengaruh pemberian steviosida terhadap reproduksi dan perkembangan embrio tikus putih, *Disertasi*, Universitas Airlangga, Surabaya, hlm 43.
- Kusumawati D, 2004. *Bersahabat Dengan Hewan Coba*, Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Kwasigroch T.E and Bullen M, 1991. *Effects of Isotretinoin (13-Cis-Retinoic Acid) on the Development of Mouse Limbs In Vivo and In Vitro*. James Quillen College of Medicine, Departement of Anatomy, East Tennessee State University, Johnson City. Tennessee.
- Lameschow S., DW Hosmer jr., and J Klar., 1990. *Adequacy of Sample Size In Health, Studies*, WHO, Jhon Wiley and Sons.
- Langman, J. 1985. *Embriologi Kedokteran*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.

- Lawrence J. Machhlin, 1991. *HandBook of Vitamins edisi 10*, New York, Marcel Dekker, New York, 10-20
- Linder MC, 1992. *Biokimia nutrisi dan metabolisme*, Jakarta: Universitas Indonesia Press, hlm ;183-191.
- Lu, FC, 1995. *Toksikologi dasar, asas organ sasaran, dan penilaian resiko*. Jakarta: Universitas Indonesia press, hlm; 156-157.
- Maden M., Hunt P., Eriksson U., Kuroiwa A., Krumlauf R and Summerbell D, 1991. Retinoic acid-binding protein, rhombomeres, and the neural crest. *Development* 111: 35-44.
- Marks D. B, 1996. *Biokimia Kedokteran Dasar Sebuah Pendekatan Klinis*, Jakarta, EGC.
- Mayor PA, 2000. *Structur and Function of the Lipid – Solouble Vitamin. In Harper's Biochemistry, 25<sup>th</sup> edition*. Toronto, USA: Pleton dan Lange, pp 642-652.
- Morriss-Kay G, 1993. *Retinoic acid and Craniofacial Development: Molecules and Morphogenesis*. Bio Essays 15:9-15.
- Murray RK., Granner DK.,Mayes PA.,and Rodwel VW, 2000. *Harper's Biochemistry, 25<sup>th</sup> edition*. Mc Graw Hill Book Company, Amerika, pp 642-643.
- Mustchler, 1991. *Vitamin Dalam Dinamika Obat. Buku Ajar Farmakologi dan Toksikologi*. Edisi 5. ITB, Bandung, hlm 596-597.
- Niederreither K., Vermot J., Schuhbaur B., Chambon P and Dolle P, 2002. Embryonic retinoic synthesis is required for forelimb and anteroposterior patterning in the mouse. *Development*. 129: 3563-3574.
- Ong D. E. and Chytil F., 1978. Cellular retinoic acid binding protein from rat testis. *Journal. Biol. Chem.* 253, 4551-4554.
- Parakkasi A., 1992. *Biokimia Nutrisi dan Metabolisme dengan Pemakaian secara Klinis*. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Partodihardjo S, 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Penerbit Mutiara, Jakarta, hlm 43-52; 105-108; 173-181.
- Poernomo Bambang S., Maslichah M., Widjiati., Epy M ., Endang D., dan Akhmad Taufiq, 2004. *Penuntun Embriologi*. Surabaya: Pustaka Melati, hlm;139.

- Poernomo S, 1999. *Teratology high light*. Post Graduate Programme. Airlangga University, Surabaya, pp 1-7.
- Pudjiadi., Solihin., 2000. *Vitamin Dalam Ilmu Gizi Anak*, Edisi 4. Balai Penerbit FKUI, Jakarta, hlm 157-159.
- Riami, 2005. Pengaruh Hipervitaminosis A pada Pertumbuhan Tulang Femur Anak Mencit (*Mus musculus*) Jantan. *Tesis*, Surabaya, Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Robert, 1994. *Toxicology of Retinoid*. In (Googman Dewitts). *The Retinoid : Biology, chemistry and Medicine*. 2<sup>nd</sup> edition. New York Raven Press, pp 545-572.
- Ross, S. A., Peter J. McCaffery., Ursula C. Drager. and Luigi M. De Luca. 2000. Retinoid in Embryonal Development. *Physiological Reviews*. 80, 3 pp 1921-1054.
- Ruberte, E., Dollz, P., Chambon, P and Morris Kay, G. M. 1991. Retinoic Receptors and Celluler Retinoid Binding Proteins II. Their Differensial Pattern of Transcription during Morphogenesis in Mouse Embryos. *Development*. 115:973-989.
- Rugh, R, 1968. "The Mouse" *It's Reproduction and Development*. Burgess Publishing Company, Minneapolis.
- Rugh, R. 1971. *A Guide to Vertebrate Development*. 6<sup>th</sup>. Burgess Publishing Co, Minneapolis.
- Sadler, T. W. 1997. *Embriologi Kedokteran Langman*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Smith BJ and Mangkoewidjojo S, 1988. *Pemeliharaan dan Penggunaan Hewan Coba di Daerah Tropis*. Universitas Indonesia Press, Jakarta hlm 14.
- Soedioetama AD, 2000. *Vitamin A dalam Ilmu Gizi*. Dian Raya press, Jakarta, hlm 116.
- Storer T. I and Usinger R. L. 1957. *General Zoology*. Third edition. Mc Graw-Hill Companies Inc. Minneapolis.
- Sulistia G., Setiabudi R., dan Suyatna FD.,1995. *Farmakologi dan Terapi*, FKUI, Jakarta, hlm724-727.
- Suryati S., Dwiprahasto I., dan Santoso B., 1990. Kumpulan Makalah Seminar Pemakaian Obat Pada Kehamilan , Laboratorium farmakologik Klinik FK UGM, Yogyakarta.



- Taylor P, 1986. *Practical Teratology*. Academic Press Inc. London
- Timbrell JA, 1994. *Principles of biochemical toxicology*. 2<sup>nd</sup> Edition. Basingtoke: Burgess sciece press, pp 237-239.
- Tjay TH., dan Raharja K, 2002. *Obat-obat Penting ; Khasiat, Penggunaan, dan efek-efek sampingnya*. Edisi ke 5. Media Komputindo, Jakarta, hlm 801.
- Underwood J.C.E,1999. *Patologi edisi I*, Jakarta: EGC ,hlm 55-125.
- Wendling O., Norbert B., Ghyselinck., Pierre C and Manuel M, 2001. Roles of Retinoic Acid Receptors in Early Embryonic Morphogenesis and Hind Brain Patterning. *Development*. 128:2031-2038. The Company of Biologists Limited
- Wilson, J.G, 1973. *Environment and Birth Defects*. Academic Press. New York.
- Yuwono T,2005. *Biologi Molekuler*, Erlangga, Yogyakarta,hlm 152
- Zainuddin, 2000. *Metodologi Penelitian*, Surabaya: Universitas Airlangga Surabaya, PP 38-57.

# LAMPIRAN

**Lampiran 1 : TABULASI DATA****DATA AWAL HASIL PENGAMATAN**

Sampel	No Induk	Implantasi	Resorpsi	Fetus Mati	Fetus Hidup	No Fetus	Berat Badan	Kelainan
Kontrol	1	7	0	0	7	1	0.787	-
						2	0.901	-
						3	0.859	-
						4	0.872	-
						5	0.756	-
						6	0.892	-
						7	0.879	-
	2	6	0	0	6	1	0.796	-
						2	0.850	-
						3	0.842	-
						4	0.800	-
						5	0.886	-
						6	0.851	-
	3	8	0	0	8	1	0.58	-
						2	0.56	-
						3	0.575	-
						4	0.580	-
						5	0.589	-
						6	0.521	-
						7	0.606	-
						8	0.510	-
	4	11	0	0	11	1	0.857	-
						2	0.829	-
						3	0.831	-
						4	0.934	-
						5	0.906	-
						6	0.960	-
						7	0.965	-
						8	0.886	-
						9	0.896	-
						10	0.916	-
						11	0.896	-
	5	9	0	0	9	1	0.985	-
						2	0.938	-
						3	0.892	-
						4	0.831	-
						5	0.945	-
						6	0.824	-
						7	0.944	-

Sampel	No Induk	Implantasi	Resorbsi	Fetus Mati	Fetus Hidup	No Fetus	Berat Badan	Kelainan
						8	0.936	
						9	0.896	-
	6	7	0	0	7	1	1.195	-
						2	1.360	-
						3	1.334	-
						4	1.249	-
						5	1.369	-
						6	1.199	-
						7	1.233	-
	7	7	0	0	7	1	1.339	-
						2	1.371	-
						3	1.241	-
						4	1.209	-
						5	1.267	-
						6	1.224	-
						7	1.285	-
	8	7	0	0	7	1	1.401	-
						2	1.280	-
						3	1.267	-
						4	1.271	-
						5	1.249	-
						6	1.274	-
						7	1.341	-
	9	8	0	0	8	1	1.086	-
						2	1.210	-
						3	1.158	-
						4	1.353	-
						5	1.058	-
						6	1.306	-
						7	1.124	-
						8	1.130	-
						9	1.098	-
						10	1.250	-
	10	10	0	0	10	1	0.853	-
						2	0.8426	-
						3	0.9578	-
						4	0.976	-
						5	0.943	-

Sampel	No Induk	Implantasi	Resorpsi	Fetus Mati	Fetus Hidup	No Fetus	Berat Badan	Kelainan
						6	0,878	-
						7	0,865	-
						8	0,972	-
						9	0,960	-
						10	0,909	-
Jumlah		80	0	0	80			

**Keterangan singkatan:**

- Agenesis tail(AT)* : Ekor yang tidak terbentuk.
- Anotia(An)* : Telinga tidak terbentuk.
- Asimetris Ear (AsE)* : Keadaan telinga yang tidak setangkup
- Ectrodactyli(Ec)* : Jari hilang atau jumlah jari berkurang/ tidak lengkap.
- Kinky tail(KT)* : Bentuk ekor yang aneh, bengkok, memendek, atau tumpul.
- Micromelia (Mm)* : Anggota Kecil
- Palatochysis(P)* : Palatum / langit-langit bercelah.
- Pocomelia(Po)* : Kaki dan tangan tidak berkembang.
- Simpodia(S)* : Anggota kanan dan kiri menyatu.
- Syndactyli (Si)* : Jari dempet
- Talipes(T)* : Telapak tangan atau kaki bengkok (pengkor).
- Teratoma (Tr)* : Tumor bawaan yang mengandung jaringan yang berasal dari ke tiga lapisan benih mudigah
- Extra Kuncup (XK)* : Extra Kuncup

## DATA AWAL HASIL PENGAMATAN

Sampel	N0 Induk	Implantasi	Resorpsi	Fetus Mati	Fetus Hidup	N0 Fetus	Berat Badan	Kelainan
Perlakuan	1	10	4	0	6	1	0,659	P,AT
						2	0,663	P,S,AT
						3	0,559	P,T,AT
						4	0,603	An,T,AT
						5	0,697	TR,An,P,Po,AT
						6	0,559	An,S,AT
	2	6	0	2	4	1	0,989	P,KT
						2	1,041	P,KT
						3	1.121	KT
						4	1,014	KT
	3	7	7	0	0	-	-	-
	4	10	6	0	4	1	0.612	P,S,AT
						2	0.598	An,P,S,AT
						3	0.602	AsE,AT
						4	0.559	An,AT
	5	5	0	0	5	1	1.414	XK,P,KT
						2	1.211	KT
						3	1.315	AsE,P
						4	1.325	KT
						5	1.182	T,ST
	6	8	0	6	2	1	1.197	P,Po,Si,XK
						2	0.285	P,Po,Si
	7	9	1	0	8	1	1.273	P,Po,Si
						2	1.184	P,Po,Ec
						3	1.087	Po,P,Si,XK,KT
						4	1.185	Po,P,Si,Ec
						5	1.101	Po,P
						6	1.124	P,Po,Si
						7	1.170	P,Po,XK,KT
						8	1.279	P,Po,Si
	8	9	4	0	5	1	1.424	P,KT,Po,Ec,Mm
						2	1.317	P,KT,Po,Ec,Mm
						3	1.510	P,KT,Po,Ec,Mm

Sampel	N0 Induk	Implantasi	Resorbsi	Fetus Mati	Fetus Hidup	N0 Fetus	Berat Badan	Kelainan
						4	0.415	KT,Po,Ec,Mm
						5	1.368	P,KT,Po,Ec,Mm
	9	11	3	3	5	1	1.352	P,Po,Ec,Mm
						2	1.221	P,Po,T,Ec,Mm
						3	1.238	Po,T,Ec,Mm
						4	1.226	Po,T,Ec,Mm
						5	1.340	P,Po,T,Ec,Mm
	10	5	2	1	2	1	0.994	P,Ec,Mm,Po
						2	0.979	P,Ec,Mm,Po
	11	9	0	0	9	1	1.02	An,AsE,KT,P
						2	1.175	An,KT,XK,S
						3	1.097	T,XK,P,KT
						4	1.1	P,KT,S,XK
						5	1.114	P,KT,Po,Ec
						6	1.139	P,Po,Si
						7	0,978	P,Po,XK,KT
						8	1,078	P,Po,XK,KT
						9	0.553	P,KT,An
	12	7	0	0	7	1	0.908	P,Po,XK,KT
						2	0.958	P,Po,Si,XK
						3	0.895	P,Po,Si,Ec
						4	1.173	P,Po,Ec,XK
						5	0.685	P,S,AT
						6	0.698	AsE,AT,P
						7	0,73	KT, An, S
	13	5	0	0	5	1	1.153	P,KT,Po,Ec
						2	0.785	P,KT,Mm,T
						3	0.578	P,Po,Si,XK,KT
						4	0,947	P,Po,Si,Ec
						5	0.998	P,Po,Si,KT
	14	6	0	0	6	1	0,725	P,KT,Po,Ec
						2	0,853	P,KT,Po,Mm
						3	0.686	P,Po,T,Ec,Mm
						4	0.943	P,Po,XK,KT
						5	0.783	P,Po,Ec,XK
						6	0.808	P,Po,Si,T

Sampel	N0 Induk	Implantasi	Resorbsi	Fetus Mati	Fetus Hidup	N0 Fetus	Berat Badan	Kelainan
	15	5	5	Resorbsi all				
	16	5	5	Resorbsi all				
		117	37	12	68			

**Keterangan :**

- Agenesis tail(AT)* : Ekor yang tidak terbentuk.
- Anotia(An)* : Telinga tidak terbentuk.
- Asimetris Ear (AsE)* : Keadaan telinga yang tidak setangkup
- Ectrodactyli(Ec)* : Jari hilang atau jumlah jari berkurang/ tidak lengkap.
- Kinky tail(KT)* : Bentuk ekor yang aneh, bengkok, memendek, atau tumpul.
- Micromelia (Mm)* : Anggota Kecil
- Palatoschysis(P)* : Palatum / langit-langit bercelah.
- Pocomelia(Po)* : Kaki dan tangan tidak berkembang.
- Simpodia(S)* : Anggota kanan dan kiri menyatu.
- Syndactyli (Si)* : Jari dempet
- Talipes(T)* : Telapak tangan atau kaki bengkok (pengkor).
- Teratoma (Tr)* : Tumor bawaan yang mengandung jaringan yang berasal dari ke tiga lapisan benih mudigah
- Extra Kuncup (XK)* : Extra Kuncup



**KELAINAN EKSTERNAL**

Sampel	NO Ink	$\Sigma$ FH	Macam Kelainan Eksternal													
			An	AsE	AT	Ec	KT	P	Po	S	Si	Mm	T	Tr	XK	ST
Perlak	1	6	3	-	6	-	-	4	1	2	-	-	2	1	-	-
	2	4	-	-	-	-	4	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	4	2	1	4	-	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-
	5	5	-	1	-	-	3	2	-	-	-	-	1	-	1	1
	6	2	-	-	-	-	-	2	2	-	2	-	-	-	1	-
	7	8	-	-	-	2	2	8	8	-	5	-	-	-	2	-
	8	5	-	-	-	5	5	4	5	-	-	5	-	-	-	-
	9	5	-	-	-	5	-	3	5	-	-	5	4	-	-	-
	10	2	-	-	-	2	-	2	2	-	-	2	-	-	-	-
	11	9	3	1	-	1	8	8	4	2	1	-	1	-	5	-
	12	7	1	1	2	2	2	6	4	2	2	-	-	-	3	-
	13	5	-	-	-	2	4	5	4	-	3	1	1	-	1	-
	14	6	-	-	-	3	3	6	6	-	1	2	2	-	2	-
	15	0	RESORBSI ALL													
	16	0	RESORBSI ALL													
Jumlah Total		68	9	4	12	22	31	54	41	8	14	15	9	1	15	1
Persentase			13,2	5,9	17,6	32,4	45,6	79,4	60,1	11,7	20,6	22,1	13,2	1,47	22,1	1,47

## Lampiran 2 :

**HASIL ANALISIS DESKRIPTIF****Descriptives**

Rerata BB

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Kontrol	10	.000460	.244378	.73E-02	.5650	1.2980
Perlakuan	13	.962692	.234908	.52E-02	.5930	1.2890
Total	23	.979113	.234300	.89E-02	.5650	1.2980

**Descriptives**

implantasi

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Kontrol	10	8.0000	1.5635	.4944	6.00	11.00
Perlakuan	13	7.2308	2.2418	.6218	4.00	11.00
Total	23	7.5652	1.9731	.4114	4.00	11.00

**Statistics**

		%hidup	%(mati+resorpsi)
N	Valid	13	13
	Missing	0	0
Mean		75.5051	24.4949
Median		88.8889	11.1111
Std. Deviation		27.7039	27.7039
Minimum		25.00	.00
Maximum		100.00	75.00

**Lampiran 3:  
NPar Tests**

**HASIL UJI NORMALITAS**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

			Rerata BB
N			23
Normal Parameters	a,b	Mean	.979113
		Std. Deviation	.234300
Most Extreme Differences		Absolute	.146
		Positive	.129
		Negative	-.146
Kolmogorov-Smirnov Z			.701
Asymp. Sig. (2-tailed)			.709

- a. Test distribution is Normal.  
b. Calculated from data.

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

			implantasi
N			23
Normal Parameters	a,b	Mean	7.5652
		Std. Deviation	1.9731
Most Extreme Differences		Absolute	.134
		Positive	.134
		Negative	-.114
Kolmogorov-Smirnov Z			.645
Asymp. Sig. (2-tailed)			.800

- a. Test distribution is Normal.  
b. Calculated from data.

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		%hidup	%(mati+resorbsi)
N		23	23
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	86.1550	13.8450
	Std. Deviation	23.9330	23.9330
Most Extreme Differences	Absolute	.414	.414
	Positive	.281	.414
	Negative	-.414	-.281
Kolmogorov-Smirnov Z		1.986	1.986
Asymp. Sig. (2-tailed)		.001	.001

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Lampiran 4 :

T-Test

**HASIL UJI BEDA T-test Dua sampel bebas Variabel Tergantung**

**Group Statistics**

GRUP	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Rerata BB Kontrol	10	1.000460	.244378	7.72792E-02
Perlakuan	13	.962692	.234908	6.51516E-02

**Independent Samples Test**

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Rerata BB	.051	.823	.376	21	.711	3.777E-02	.100534	-.171304	.246839
Equal variances assumed			.374	19.103	.713	3.777E-02	.101078	-.173715	.249250
Equal variances not assumed									

**Group Statistics**

GRUP	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
implantasi Kontrol	10	8.0000	1.5635	.4944
Perlakuan	13	7.2308	2.2418	.6218

**Independent Samples Test**

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
implantasi	3.440	.078	.924	21	.366	.7692	.8327	-.9625	2.5010
Equal variance assumed			.968	20.855	.344	.7692	.7944	-.8835	2.4219
Equal variance not assumed									

**Lampiran 5 :****NPar Tests****HASIL UJI Mann-Whitney Test  
Variabel Tergantung****Ranks**

	GRUP	N	Mean Rank	Sum of Ranks
%hidup	Kontrol	10	15.50	155.00
	Perlakuan	13	9.31	121.00
	Total	23		
% (mati+resorpsi)	Kontrol	10	8.50	85.00
	Perlakuan	13	14.69	191.00
	Total	23		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	%hidup	% (mati+resorpsi)
Mann-Whitney U	30.000	30.000
Wilcoxon W	121.000	85.000
Z	-2.664	-2.664
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.030 <sup>a</sup>	.030 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: GRUP