

- ANTIOXIDANTS
- GAMMA RAYS
- IRRADIATION

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

## TESIS

# **PENGARUH POLYSACCHARIDE KRESTINE (PSK) SEBAGAI ANTIOKSIDAN DALAM MENURUNKAN JUMLAH KEMATIAN SEL PADA JARINGAN PALATUM JANIN MENCIT (*Mus Musculus*) AKIBAT IRADIASI SINAR GAMMA COBALT<sup>60</sup>**



KKA  
KK  
TKD 17/07  
Miz  
P

Oleh :

**MUHAMMAD MIZFARUDDIN**  
090415331 M

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2007**



**PENGARUH POLYSACCHARIDE KRESTINE (PSK)  
SEBAGAI ANTIOKSIDAN DALAM MENURUNKAN JUMLAH  
KEMATIAN SEL PADA JARINGAN PALATUM  
JANIN MENCIT (*Mus Musculus*) AKIBAT IRADIASI SINAR  
GAMMA COBALT<sup>60</sup>**

**TESIS**

**Untuk memperoleh Gelar Magister  
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

**Oleh :**

**MUHAMMAD MIZFARUDDIN  
090415331 M**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2007**

**Lembar pengesahan**

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL, 26 FEBRUARI 2007

Oleh

Pembimbing Ketua



**Abdul Kamid Iskandar, dr, MS**  
NIP. 130 541 811

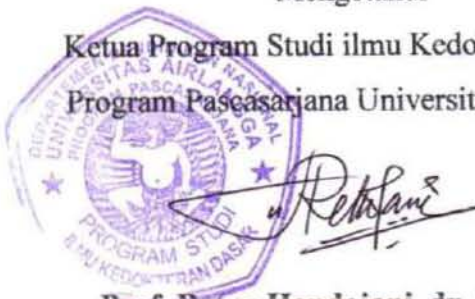
Pembimbing



**Win Darmanto, drs, MSI, Ph.D**  
NIP. 131 653 741

Mengetahui

Ketua Program Studi ilmu Kedokteran Dasar  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



**Prof. Retno Handajani, dr, MS, Ph.D**  
NIP. 130 541 984

Telah diuji pada

Tanggal 26 Februari 2007

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : H.Abdul Kamid Iskandar, dr, MS

Anggota : 1. Prof.Ari Gunawan, dr, MS, Ph.D

2. Win Darmanto, drs, MSi, Ph.D

3. M. Wirono Aman Santoso, dr, MS

4. Soebagjo, dr, MS

5. Chairul Anwar, drh, MS

## UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur Alhamdulillah Rahmat ALLAH SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang yang telah memberikan hidayah berupa kesehatan dan kesempatan sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tesis ini.

Ucapan terima kasih yang sedalamnya saya sampaikan kepada H. Abdui Kamid Iskandar, dr, MS sebagai pembimbing ketua yang di tengah kesibukannya beliau dengan penuh kesabaran selalu memberi dorongan dan semangat pasca musibah Tsunami serta bimbingan mulai dari penentuan judul hingga kesempurnaan penulisan yang tentunya tidak ternilai harganya selama penulisan tesis ini.

Ucapan terima kasih yang sedalamnya saya sampaikan kepada Win Darmanto, Drs, MSi, Ph.D sebagai pembimbing di tengah kesibukan beliau dengan penuh perhatian dan ketelitian banyak sekali memberikan pengetahuan, masukan, dan bimbingan yang sangat berharga serta berperan utama dalam penyediaan sarana dan prasarana penelitian serta ekstrak Polysaccharide Krestine selama pengerjaan penelitian dan penyempurnaan penyelesaian penulisan tesis ini.

Ucapan terima kasih yang sedalamnya saya sampaikan juga kepada M. Wirono Aman Santoso, dr, MS baik sebagai pembimbing di tengah kesibukan beliau ikut serta mengarahkan tujuan penulisan tesis maupun sebagai kepala jurusan ilmu anatomi yang memberikan banyak pengetahuan dan pengalaman pembacaan jurnal kepada penulis yang tentunya sangat berguna bagi penulisan tesis ini.

Ucapan terima kasih yang sedalamnya saya sampaikan juga kepada Prof. Ari Gunawan, dr, MS, Ph.D, Soebago, dr, MS, dan Chairul Anwar, Drh, MS sebagai pembimbing pendamping dan tim penguji di tengah kesibukan mereka dengan penuh ketelitian dan kesabaran ikut serta mengevaluasi kesempurnaan penulisan dan penyajian tesis ini.

Ucapan terima kasih yang sedalamnya saya sampaikan juga kepada Prof. Retno Handajani, dr, MS, Ph.D sebagai Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar yang telah banyak memberikan dorongan moril dan ketersediaan waktu beliau untuk mengarahkan untuk kesempurnaan tesis ini.

Menyadari bahwa tesis ini tidak mungkin terwujud tanpa bantuan dan peran berbagai pihak maka ucapan terima kasih yang setulusnya saya sampaikan kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga Prof. HM. Fasich, Direktur Program Studi Pascasarjana UNAIR Prof. DR. H. Muhammad Amin, dr, Sp.P, dan Dekan Fakultas Kedokteran UNAIR Prof. Wiyadi, dr, Sp.THT yang telah memberikan kesempatan penulis untuk menempuh pendidikan Program Magister ini.
2. Rektor Universitas Syiah Kuala DR. Darni M Daud, MA, Dekan Fakultas Kedokteran UNSYIAH Syahrul, dr, Sp.S, Pembantu Dekan I M. Yani, dr, M.Kes dan Istanul Badiri, dr, Sp.PA mantan dekan FK UNSYIAH yang telah memberikan izin bagi penulis untuk menempuh studi Pascasarjana di Universitas Airlangga dan mendorong semangat penulis untuk tetap melanjutkan studi pasca musibah Tsunami.

3. Seluruh staf pengajar dan karyawan di Bagian Ilmu Anatomi dan Histologi FK UNAIR yang telah banyak membantu sejak awal perkuliahan hingga penyelesaian tesis ini.
4. Kepala Lab/SMF Radiologi dan Kepala Unit Radioterapi di RSU Dr. Soetomo atas keizinan mereka dalam menggunakan fasilitas unit dan tenaga radioterapi untuk pengerjaan penelitian demi penyelesaian tesis ini.
5. Joni Susanto, dr, M.Kes dan karyawan di bagian histologi atas bantuan penggunaan laboratorium histologi dalam pembuatan, pengamatan dan perhitungan sediaan.
6. Dyah Herawatie, Ir, M.Si dari Jurusan Fisika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang telah banyak membantu dalam penyelesaian analisa statistika demi kesempurnaan penulisan tesis ini.
7. Adik-adik mahasiswa dari jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang banyak terlibat langsung dalam penelitian ini : Anas, Mega, Vika, Putri, Annisa, dan Andre yang telah banyak membantu dalam pengadaan, pemeliharaan dan pengerjaan terhadap hewan coba sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan mengerjakan penulisan tesis ini
8. Teman-teman S-2 Ilmu Anatomi dan Histologi yaitu Diah, dr khususnya dan seluruh teman-teman dari Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar yang telah memberi semangat bagi penulis untuk tetap melanjutkan studi pasca musibah Tsunami.
9. Hj. Zaida Araby, orang tua penulis yang selamat dari musibah Tsunami dan paling penulis sanjung, hormati dan kagumi, terutama atas do'a, restu dan

kesabarannya untuk terus bersama hati penulis walaupun jauh di Aceh sana. Demikian juga abang dan kakak kandung penulis yang selamat dari musibah Tsunami H. M. Zardan Araby, Ir, Adzniar Araby, Ir, dan Dzarnisa Araby, Ir, M.S.

10. Istri yang tercinta Ayu Susanti, dr, yang dengan setia dan penuh kesabaran tetap menemani penulis dalam menjalani proses pendidikan walau seluruh keluarganya meninggal akibat musibah Tsunami, ia tetap memberikan motivasi yang berarti sehingga penulis tetap bersemangat untuk sesegera mungkin menyelesaikan pendidikan dan melanjutkan hidup yang bermakna ini.
11. Anak penulis tersayang ananda Farsya Fijinan Ayuza yang terlahir saat penulis sedang menyelesaikan tesis ini yaitu sabtu 13 Januari 2007 untuk mengisi kesedihan hati penulis dan istri akibat berpulangnya keluarga terdekat penulis yaitu Alm. M. Nadzari, Drh, M.S (abang sekaligus staf pengajar Histologi FK UNSYIAH) dan keluarga, Almh Nudziar Sardjani, Dra (kakak) dan keluarga serta Alm. M. Shadiqan Zurraq (anak pertama) yang lebih dulu menghadap Ilahi karena musibah Tsunami di Aceh pada hari Minggu 26 Desember 2004. Mudah-mudahan semangat mereka tetap ada di hati penulis untuk menyelesaikan pendidikan dan melanjutkan hidup ini.
12. Budi Susanto, dr, Sp.OG (K) yang sudah banyak menolong dan memberi semangat terutama pasca musibah Tsunami sehingga penulis memiliki tekak kuat untuk menyelesaikan pendidikan.



13. DR. Mudatsir, drs, M.kes dan DR. Dasrul, Drh. MS yaitu teman penulis dari program S3 pascasarjana UNAIR yang ikut mendorong sehingga penulis tetap bisa mengikuti pendidikan ini hingga selesai.
14. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung selama masa pendidikan yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhirnya dengan segenap kerendahan hati, penulis sebagai manusia biasa mohon maaf atas segala kekurangan, serta mohon kritik dan saran demi kelengkapan penulisan tesis ini.

*“ Ya Allah, berikanlah kepadaku hikmah dan masukkanlah aku ke dalam golongan orang-orang yang saleh, dan jadikanlah aku (tesis ini) menjadi sumber pembicaraan orang-orang di kemudian hari. Dan jadikanlah aku termasuk orang-orang yang mewarisi surga yang penuh dengan kenikmatan ”*

*(Qs : Asy-Syu'araa: 83-5)*

Surabaya, Januari 2007

Penulis

## RINGKASAN

**Pengaruh Polysaccharide Krestine (PSK)  
Sebagai Antioksidan dalam Menurunkan Jumlah Kematian Sel  
pada Jaringan Palatum  
Janin Mencit (*Mus Musculus*) Akibat Iradiasi Sinar Gamma Cobalt<sup>60</sup>**

**Muhamad Mizfaruddin Araby**

Seperti diketahui bahwa paparan radiasi energi tinggi selama kehamilan dapat menyebabkan kerusakan jaringan tubuh termasuk jaringan palatum, yang meliputi kematian sel dan sejumlah pembentukan celah palatum. Kerusakan akibat radiasi terhadap sistem biologi umumnya akibat dari pelepasan molekul radikal bebas yang dibentuk selama peristiwa deposisi energi. Kerusakan akibat radiasi diketahui timbul dari reaksi terhadap molekul radikal bebas, yang memicu reaksi stres oksidatif pada sel dan jaringan.

Polysaccharide Krestine (PSK) merupakan senyawa dihasilkan oleh jamur *Coriolus versicolor*, banyak digunakan sebagai imunoterapi kanker atau sebagai antioksidan di sebahagian besar negara Asia. Polisakarida ini diketahui dapat mengurangi dampak reaksi oksidasi yang disebabkan oleh banyak faktor, salah satunya adalah akibat radiasi ionisasi.

Apoptosis atau *programmed cell death* merupakan respon fisiologis sejumlah sel termasuk sel pada jaringan palatum setelah iradiasi dengan Cobalt<sup>60</sup>.

Penelitian ini mencoba menjelaskan penggunaan PSK sebagai suatu zat antioksidan untuk mengurangi jumlah kematian sel atau bahkan mencegah kemungkinan kelainan palatum yang disebabkan oleh iradiasi sinar gamma pada janin mencit usia kebuntingan induk 13 hari. Prosedur pengamatan yaitu induk mencit bunting dibagi menjadi 3 kelompok percobaan: A) Kontrol negatif; B) Kontrol positif, yang diiradiasi dengan sinar gamma dosis tunggal 2 Gy, dan C) Kelompok perlakuan yang diberi PSK dengan dosis 200 mg/gr BB 1 jam setelah iradiasi.

Pada percobaan awal, dimana induksi kematian sel melalui iradiasi sinar gamma Co<sup>60</sup> dosis 2 Gy. Lalu diamati 1 hari setelah radiasi dengan menggunakan mikroskop cahaya dan jumlah sel yang mati dihitung dengan program *image tool*, ditemukan 17,57 % sel yang mati pada kelompok kontrol positif. Di sisi lain, pada kelompok perlakuan yang diberi PSK 1 jam setelah iradiasi ditemukan prosentase kematian sel sebesar 4,67 %. Jumlah ini mengalami penurunan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Tetapi tidak ditemukan adanya kejadian kelainan bawaan eksternal khususnya pembentukan celah palatum baik pada kelompok kontrol positif maupun kelompok perlakuan pada usia kebuntingan induk 13 hari.

Penelitian ini membuktikan bahwa Polysaccharide Krestine (PSK) dapat digunakan sebagai suatu antioksidan dalam menurunkan kematian sel akibat iradiasi.

## SUMMARY

### **The Potency of Antioxidant Polysaccharide Krestine (PSK) to Decrease Death Cells in Mice's Embryo (*Mus musculus*) Palatal Tissue Induced by Irradiated with Cobalt<sup>60</sup>**

*Muhamad Mizfaruddin Araby*

It is well known that during pregnancy exposure to high energy radiation can cause damage on body particularly palatal tissue including death cell and palatal cleft. Radiation damage in biological systems is initiated by the acute toxic, and free radical molecules formed during energy deposition events. Radiation damage is well known caused by the free radical and leading to oxidative stress in cells and tissue.

*Coriolus versicolor*, is a mushroom contain Polysaccharide Krestine (PSK) as the main component, that has been widely used for cancer immuno therapy or antioxidant in many Asian countries. This polysaccharide had been founded could reduce oxidative injury induced by many factor, one of them was ionization radiation effect's.

Apoptosis or programmed cell death is a physiologic response of variety cell types including cell in palatal tissue after irradiation with cobalt<sup>60</sup>.

This present study examines the use PSK as an antioxidant effect's on the structure of palatal tissue particularly to reduced death cells or might be palatal malformation induced by gamma-ray irradiation in mice's embryo on day 13 of gestation. To evaluated the potency of PSK, the pregnant mice on day 13 of gestation were divided at random into 3 groups : A) negative control; B) positive control that were irradiated with a single dosage 2 Gy of gamma ray, and C) experimental group, 1 hour after irradiation were gavage PSK 200 mg/g mice's body weight.

In the first experiments the induction of cell death was studied 1 day after irradiation with gamma-ray Co<sup>60</sup> with dosage 2 Gy. Death cells were identified using light microscopy and counted by *image tool* software and founded 17,57 % of death cells. Another, this studied observed 4,67 % death cells decrease in experimental group 1 hr after irradiated and given PSK. However, there was no external malformation incidence specially palatal cleft formation whether in the positive control group or in the experimental group on 13 day gestation age in this study.

This study had proved that PSK could be use as an antioxidant to reduced death cells induced by radiation.

## ABSTRACT

**The Potency of Antioxidant Polysaccharide Krestine (PSK) to Decrease Death Cells in Mice's Embryo (*Mus musculus*) Palatal Tissue Induced by Irradiated with Cobalt<sup>60</sup>**

*Muhamad Mizfaruddin Araby*

*Coriolus versicolor*, is a mushroom contain the Polysaccharide Krestine (PSK) as the main component, that has been widely used for cancer immuno therapy or antioxidant in many Asian countries. The aim of this study to examine the potency of protein-bound polysaccharide (PSK) on the structure of palatal tissue particularly death cells or might be palatal malformation induce by gamma-ray irradiation in mice's embryo on day 13 of gestation.

To evaluated this potency, The pregnant mice on day 13 of gestation were divided at random into 3 groups : A) negative control; B) positive control that were irradiated with a single dosage 2 Gy and C) experimental group that were 1 hour after irradiation, given PSK 200 mg/g mice's body weight. All of these groups examined their death cells histologically 1 day after irradiation and on day 18 of gestation to observed palatal malformation incidence.

The number of cell death was founded 1 day after irradiation. We found 17,57 % death cell increase in positive control group on day 13 of gestation. This number of death cells was higher than negative control group on this gestation day. In the other hand, we also found 4,67 % death cells decrease in experimental group with gavage 1 hour after irradiated on the same gestation day. However there was no palatal malformation incidence both positive control group and experimental group in this study.

Results and conclusions : PSK has an inhibitor effect against death cells induced by gamma-ray irradiation in mice's embryo palatal tissue but did not have any effect on palatal cleft induced by gamma-ray irradiation in mice's embryo on day 13 of gestation as a terminal stage of palatal development.

**Keyword :** *Polysaccharide Krestine (PSK), gamma-ray irradiation, death cells*

## DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan ... ..	iv
Penetapan Panitia Penguji .....	v
Ucapan Terima Kasih .....	vi
Ringkasan .....	xi
Summary.....	xii
Abstract .....	xiii
DAFTAR ISI .....	xiv
DAFTAR TABEL .....	xviii
DAFTAR GAMBAR .....	xix
DAFTAR LAMPIRAN .....	xxi
DAFTAR SINGKATAN .....	xxiii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar Belakang Masalah .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	5
1.3. Tujuan Penelitian .....	5
1.3.1. Tujuan umum .....	5
1.3.2. Tujuan khusus .....	6
1.4. Manfaat Penelitian .....	6
1.4.1. Manfaat akademis .....	6
1.4.2. Manfaat terapan .....	7
<b>BAB 2 TINJAUAN KEPUSTAKAAN</b>	
2.1. Struktur Sei Manusia .....	8
2.2. Kematian sel .....	9

2.3. Metode Pemeriksaan Apoptosis .....	15
2.4. Perkembangan Embrio.....	17
2.5. Perkembangan Wajah pada Masa Embrional.....	19
2.5.1. Serangkaian masa perkembangan wajah eksternal.....	20
2.5.2. Mekanisme merging dan fusi struktur wajah.....	25
2.5.3. Mekanise pembentukan palatum.....	27
2.6. Gangguan Pembentukan Wajah.....	29
2.7. Dampak Radiasi Pengion terhadap Jaringan Tubuh.....	30
2.7.1. Radiasi sinar gamma.....	33
2.7.2. Besaran dan satuan dosis radiasi.....	34
2.8. Tinjauan tentang Mekanisme Efek Radiasi.....	35
2.8.1 Fase fisika .....	35
2.8.2 Fase kimia .....	35
2.8.3 Fase biologi .....	37
2.9. Perubahan Seluler dan Ketahanan Hidup Sel.....	37
2.10. Efek Radiasi Sinar Gamma terhadap Perkembangan Embrio.....	39
2.11. Tinjauan tentang Polysaccharide Krestine (PSK) sebagai Antioksidan.....	39
2.12. Tinjauan tentang Mencit.....	41
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	
3.1. Kerangka Konseptual .....	43
3.2. Hipotesis Penelitian.....	46
<b>BAB 4 MATERI DAN METODOLOGI PENELITIAN</b>	
4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian .....	48
4.2. Populasi, Besar, dan Teknis Pengambilan Sampel.....	50
4.3. Variabel Penelitian .....	50
4.3.1. Klasifikasi Variabel .....	50
4.3.2. Defenisi Operasional .....	51
4.4. Bahan Penelitian .....	53
4.4.1. Hewan Coba .....	53

4.4.2. Bahan Perlakuan.....	53
4.5. Instrumen Penelitian.....	54
4.5.1. Alat Pemeliharaan Mencit dan Perlakuan.....	54
4.5.2. Alat untuk Pembuatan Histologi Palatum Janin Mencit.....	54
4.5.3. Alat untuk Pengamatan Janin Mencit dan Jaringan Palatumnya.....	55
4.6. Prosedur Penelitian.....	55
4.6.1. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	55
4.6.2. Prasyarat Etik Penelitian.....	55
4.7. Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data Penelitian.....	56
4.7.1. Persiapan.....	56
4.7.2. Proses Penimbangan dan Mengawinkan.....	56
4.7.3. Perlakuan dan Pengelompokan Hewan Percobaan.....	57
4.7.4. Pembedahan Hewan Percobaan .....	60
4.7.5. Pembedahan Hewan Percobaan .....	61
4.7.6. Pengamatan dan Pengambilan Janin Mencit.....	61
4.7.7. Pembuatan Sediaan Histologis dan Pewarnaan.....	63
4.7.8. Perhitungan Jumlah Kematian Sel pada Jaringan Palatum Janin Mencit.....	64
4.8. Analisa Data.....	66
BAB 5 ANALISA HASIL PENELITIAN	
5.1. Hasil Analisis Deskriptif.....	70
5.1.1. Hasil Analisis Deskriptif Kematian Sel pada masing- Masing Kelompok .....	70
5.1.2. Hasil Uji Normalitas Kematian Sel pada masing- Masing kelompok .....	72
5.1.3. Uji t Dua Sampel Independent Data Kelompok Kontrol Pada UK 13.....	72

5.1.4. Hasil analisis deskriptif kematian sel data respon perlakuan terhadap kelompok kontrol pada UK 13 hari .....	72
5.1.5. Hasil Uji Homogenitas kematian sel data respon perlakuan terhadap kelompok kontrol pada UK 13 hari .....	73
5.1.6. Hasil Analisis Annova kematian sel data respon perlakuan terhadap kelompok kontrol pada UK 13 hari .....	74
5.1.7. Hasil Analisis Deskriptif pembentukan celah palatum pada masing-masing kelompok .....	76
<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b>	
6.1. Iradiasi sinar gamma Co <sup>60</sup> dapat menyebabkan meningkatnya jumlah kematian sel pada jaringan palatum janin mencit pada usia kebuntingan induk 13 hari.....	83
6.2. PSK dapat menurunkan jumlah kematian sel pada jaringan palatum janin mencit yang diiradiasi dengan sinar gamma Co <sup>60</sup> pada usia kebuntingan induk 11 hari.....	87
<b>BAB 7 PENUTUP</b>	
7.1. Kesimpulan.....	89
7.2. Saran.....	89
DAFTAR PUSTAKA.....	91
LAMPIRAN.....	99



## DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 5.1.	: Hasil pengamatan kematian sei seluruh kelompok Percobaan.....	69
Tabel 5.2.	: Nilai rerata dan SD kematian sei pada seluruh Percobaan.....	70
Tabel 5.3.	: Hasil uji normalitas kematian sei pada seluruh kelompok Percobaan.....	72
Tabel 5.4.	: Statistik deskriptif respon perlakuan terhadap Kontrol.....	73
Tabel 5.5.	: Hasil pengamatan pembentukan celah palatum pada Seluruh kelompok percobaan.....	76

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. : Perbandingan gambaran morfologi antara nekrosis Dan apoptosis.....	14
Gambar 2.2. : Asai mula wajah dan mulut manusia.....	21
Gambar 2.3. : Regio fasialis pada janin dan anak-anak.....	22
Gambar 2.4. : Perkembangan wajah pada janin.....	23
Gambar 2.5. : Prosesus frontalis dan bakal rongga hidung.....	24
Gambar 2.6. : Proses merging prosesus fasialis.....	25
Gambar 2.7. : Proses Fusi palatum.....	27
Gambar 2.8. : Diagram pembentukan celah pada wajah.....	29
Gambar 2.9. : Diagram soft palatum dan hard palatum, penampakan Dari bawah.....	30
Gambar 2.10. : Kemampuan antioksidan PSK terhadap redaman Radikal bebas.....	41
Gambar 3.1. : Kerangka konseptual penelitian.....	45
Gambar 4.1. : Pengamatan masa estrus mencit betina.....	57
Gambar 4.2. : Pemisahan induk mencit bunting.....	57
Gambar 4.3. : Persiapan induk mencit untuk radiasi.....	58
Gambar 4.4. : Radiasi induk mencit bunting.....	59
Gambar 4.5. : Persiapan pembedahan induk mencit.....	61
Gambar 4.6. : Pembedahan induk mencit.....	62
Gambar 4.7. : Janin mencit usia 12 dan 14 hari.....	63

Gambar 4.8.	: Janin mencit usia 18 hari.....	63
Gambar 4.9.	: Perhitungan sel menggunakan program”image tool”.....	65
Gambar 4.10.	: Jaringan palatum mencit usia 13 hari.....	65
Gambar 4.11.	: Perhitungan jumlah kematian sel melalui mikroskop Pada pembesaran 4x100.....	66
Gambar 4.12.	: Skema alur kerja penelitian .....	67
Gambar 5.1.	: Individual plot data 1.....	71
Gambar 5.2.	: Individual plot data 2.....	74
Gambar 5.3.	: Mean plot data respon perlakuan terhadap kelompok Kontrol.....	75
Gambar 5.4.	: Gambaran histologis jaringan palatum janin mencit Usia 14 hari/Kontrol negatif 1/K(-)1.....	78
Gambar 5.5.	: Gambaran histologis jaringan palatum janin mencit Usia 14 hari/Kontrol positif 1/K(+1).....	78
Gambar 5.6.	: Gambaran histologis jaringan palatum janin mencit Usia 14 hari/ Perlakuan 1/ P1.....	79
Gambar 5.7.	: Gambaran makroskopis regio palatum janin mencit usia 14 hari/Kontrol negatif 2/K(-)2.....	79
Gambar 5.8.	: Gambaran makroskopis regio palatum janin mencit usia 14 hari/Kontrol positif 2/K(+2).....	80
Gambar 5.9.	: Gambaran makroskopis regio palatum janin mencit usia 12 hari/Perlakuan 2/P2.....	80
Gambar 6.1.	: Gambaran prosentase sel kultur embrio yang mengalami apoptosis Vs dosis radiasi.....	85
Gambar 6.2.	: Gambaran prosentase kultur sel embrional yang mengalami apoptosis pada ragam radiasi sinar-X dan dosis paparan radiasi.....	85

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. : Tahap Perkembangan Embrio.....	99
Lampiran 2 : Perbandingan usia embrio tikus dengan manusia .....	100
Lampiran 3. : Waktu perkembangan organ olfaktoria pada embrio Tikus.....	101
Lampiran 4. : Penampang cross sectional kranial embrio manusia.....	102
Lampiran 5. : Penampang janin mencit pada berbagai potongan Transversal.....	103
Lampiran 6. : Pembuatan sediaan histologis palatum.....	106
Lampiran 7. : Malformasi kongenital sistem-sistem tubuh.....	110
Lampiran 8. : Diferensial diagnosis nekrosis dan apoptosis.....	111
Lampiran 9. : Perbedaan struktur morfologi sel pada nekrosis dan Apoptosis.....	112
Lampiran 10. : Komposisi zat makanan dalam pakan BR-211 produksi PT.Comfeed Indonesia.....	113
Lampiran 11. : Unsur bahan radioaktif Cobalt dan spesifikasinya yang Umum digunakan di Rumah Sakit.....	114
Lampiran 12. : Dosis radiasi paling rendah yang menghasilkan efek Stokastik pada embrio dan fetus mamalia.....	115
Lampiran 13. : Skema induksi kematian sel akibat radiasi ionisasi.....	116
Lampiran 14. : Skema proses kematian sel akibat radiasi sinar - $\gamma$ Dan agen lain.....	117
Lampiran 15 : Pengaruh iradiasi sinar-X yang menyebabkan kelainan Bawaan pada embrio manusia dan tikus.....	118

Lampiran 16. : Hasil statistik deskriptif prosentase jumlah Kematian sel.....	119
Lampiran 17. : Hasil Uji Normalitas.....	120
Lampiran 18. : Hasil Uji t dua sampel independent untuk data hubungan Kelompok kontrol pada UK 13.....	121
Lampiran 19. : Hasil Uji t dua sampel independent untuk data hubungan Kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada UK 11.....	122
Lampiran 20. : Hasil statistik deskriptif respon kelompok perlakuan Terhadap kelompok kontrol.....	123
Lampiran 21. : Hasil Uji homegenitas varians respon kelompok Perlakuan terhadap kelompok kontrol.....	124
Lampiran 22. : Hasil Uji Normalitas residual kelompok perlakuan Terhadap kelompok kontrol.....	125
Lampiran 23. : Hasil analisis varians untuk data respon kelompok Perlakuan terhadap kelompok kontrol.....	126
Lampiran 24. : Pembentukan tepi platum dan penutupan palatum .....	127
Lampiran 25. : Penutupan palatum .....	128

## DAFTAR SINGKATAN

DNA	: Deoxy ribonucleic acid
GY	: Satuan unit radiasi Gray
Co <sup>60</sup>	: Cobalt <sup>60</sup>
PSK	: Polysaccharide Krestine
PCD	: Programmed Cell Death
TUNEL	: Terminal Deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated DNA fragment and Labelling assay atau Terminal transferase mediated dUTP Nick End Labeling
H-E	: Hematoxilin-Eosin
OH <sup>-</sup>	: gugus <i>hydroxyl</i>

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1. Latar Belakang Masalah

Saat ini radiasi dengan gelombang elektromagnetik berfrekuensi tinggi sudah dipergunakan dalam mengakkan diagnosa penyakit dan keperluan terapi karena dinilai lebih efektif. Namun metode tersebut juga berdampak negatif terhadap pekerja laboratorium dan pasien akibat energi radiasi elektromagnetik yang dihasilkan (Schwan *et al*, 1954; Green *et al*, 1997).

Efek radiasi pada manusia akan menyebabkan perubahan sel, kemudian terjadi kerusakan di tingkat jaringan yang dapat mengganggu struktur dan fungsi organ (Amsyari, 1989).

Pada prinsipnya apabila jaringan tubuh terpapar oleh sinar radioaktif atau partikelnnya maka akan terjadi berbagai reaksi ionisasi molekul air yang mengakibatkan terbentuknya radikal bebas di dalam sel sehingga menyebabkan kematian sel. Lintasan sinar juga menimbulkan kerusakan jaringan akibat rusaknya DNA yang diikuti kematian sel (Susworo, 2002).

Telah dibuktikan bahwa radiasi berpengaruh terhadap perkembangan embrional yang dapat menyebabkan mutasi germinal akibat paparan radiasi terhadap keienjar gonad. Di samping ditemukan pula *neoplasma post natali* (Kameyama, 1989).

Pada penelitian yang dilakukan terhadap sejumlah korban akibat paparan radiasi bom atom di Hiroshima dan Nagasaki atau pasien hamil yang



mendapatkan terapi radiasi sinar-X menunjukkan adanya keiainan janin berupa mikrosefali dan retardasi mental (Sun *et al*, 1996).

Penelitian lain membuktikan adanya perubahan kemampuan hidup sel tumor manusia secara kultur *in vitro* akibat paparan dosis tunggal radiasi atau karsinogen kimiawi yang menyebabkan perubahan struktur sel (O'Reilly *et al*, 1998).

Efek teratogen radiasi pengion telah diketahui sejak beberapa tahun yang lalu, dan penggunaan sinar-X atau radiasi dosis tinggi sebagai bagian dari terapi radiasi pada wanita hamil dapat menyebabkan mikrosefali, cacat tengkorak, spina bifida, kebutaan, pembentukan celah pada palatum, dan cacat anggota badan. Walaupun dosis aman terhadap janin manusia tidak diketahui, namun radiasi dengan dosis 0,05 Gy dapat merusak janin menciit. Jenis dan macam kelainan yang terjadi tergantung dosis radiasi dan tingkat perkembangan janin saat penyinaran (Sadler, 2000).

Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa pemberian radiasi sinar-X pada periode awal kehamilan (usia kehamilan 7 hari) dapat menyebabkan hidrosefalus (Aolad *et al*, 2000a), dan penggunaan *Polysaccharide Krestine* (PSK) setelah radiasi sinar-X mampu menurunkan angka insiden hidrosefalus, kerusakan jaringan otak dan menunda proses apoptosis serta ekspresi protein p53 (protein pemicu apoptosis) (Aolad *et al*, 2000b; Kagohashi *et al*, 2002).

Pada penelitian ini, penggunaan radiasi sinar gamma hanya sebagai alat untuk menginduksi kerusakan jaringan embrional melalui proses kematian sel yang berkaitan dengan pembentukan calon organ. Mekanisme kematian sel embrionik akibat radiasi sinar gamma  $Co^{60}$ , apakah melalui proses nekrosis atau



melaui proses fragmentasi DNA yang sering disebut *apoptosis* juga masih belum banyak diteliti oleh para ahli (Darmanto, 2005). Di sisi lain telah banyak usaha penemuan bahan-bahan alam maupun sintetis yang dapat digunakan untuk mencegah kematian sel baik dalam bentuk nekrosis maupun apoptosis akibat bahan toksik atau radiasi sinar gamma  $Co^{60}$  (Darmanto, 2005).

Apoptosis merupakan proses biologi yang diikuti dengan proses perubahan sel, berupa rangkaian perubahan morfologi sel yaitu : kondensasi kromatin, membran bergelembung, fragmentasi sel menjadi potongan kecil atau badan *apoptotik*. Tidak seperti nekrosis, apoptosis diinduksi oleh perkembangan dan rangsangan lingkungan yang dikendalikan oleh sejumlah besar gen famili *bcl-2*, famili *caspase* (ICE yang berhubungan dengan enzim protease), beberapa protoonkogen dan sekelompok gen penekan tumor (Yang and Korsmeyer, 1996 dalam Darmanto, 2005).

Anomali kongenital merupakan kelainan yang umum dijumpai pada bayi disebabkan oleh gangguan pertumbuhan janin. Insiden kelainan ini sangat bervariasi jumlahnya di sejumlah bangsal anak rumah sakit propinsi di Indonesia, rerata 6-15 tiap seribu kelahiran. Kelainan kongenital yang paling banyak ditemukan adalah sistem muskuloskeletal (19,6%), sistem saraf (18,8%), sistem pencernaan (18,7%), sistem sirkulasi (12,9%), dan palatoschizis (18,8%) (Kadri *et al*, 1995).

Selama 20 tahun terakhir, telah didata sebanyak 2.250 bayi dengan anomali wajah dengan rasio 38,9 tiap 10.000 kelahiran hidup. Kelainan lainnya berupa terbentuknya telinga tambahan, labio-palatoschizis, kriptosia, dan mikrosia. Disebutkan pula bahwa jumlah palatoschizis adalah 985 bayi dan dengan insiden

rasio 17 tiap 10.000 kelahiran hidup, rasio ini konstan tiap tahunnya (Oka *et al*, 1995).

Seiring dengan ditemukan sejumlah senyawa teratogenik dan mekanisme terjadinya kelainan bawaan, sejumlah ilmuwan berusaha menemukan bahan anti teratogenik, seperti senyawa kafein yang mampu memperbaiki kerusakan pada janin tikus akibat induksi logam berat Cadmium, obat-obat anti nyeri, kemoterapi kanker, dan asam retinoid, serta mampu menekan munculnya kelainan akibat bahan teratogenik (Nomura *et al*, 1983; Gotoh *et al*, 1988; Kubota *et al*, 2000).

Manfaat kesehatan tanaman jamur teiah dibuktikan dalam sejarah pengobatan tradisional di Asia. Praktek kedokteran modern di Jepang, China, Korea, dan negara Asia lainnya teiah menggunakan derivat jamur sebagai bahan pengobatan berbagai jenis penyakit (Cui and Christi, 2003).

*Polysaccharide Krestine* (PSK) merupakan hasil ekstraksi *Miselia* jamur *Coriolus versicolor* kelas Basidiomycetes yang pertama kali diperkenalkan sebagai kelompok bahan pengobatan kanker (Tsukagoshi *et al*, 1984 dalam Kagohashi *et al*, 2002, Cui and Christi., 2003). Bahan ini mampu menekan munculnya kelainan anggota gerak pada mencit akibat induksi 5-azacytidine (Kurushita, 1990). PSK juga diketahui menekan proses apoptosis patologis dan kelainan pada mata akibat radiasi sinar-X (Matsui *et al*, 1995).

Penelitian ini mencoba meneliti lebih lanjut pengaruh pemberian ekstrak jamur/PSK sesudah iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  untuk membuktikan kemampuannya sebagai bahan anti oksidan dalam menurunkan jumlah kematian sel pada jaringan palatum yang diharapkan dapat mencegah gangguan pembentukan calon organ pada janin mencit di awai usia kebuntingan.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dapat meningkatkan jumlah kematian sel pada jaringan palatum janin mencit (*Mus musculus*) dengan usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13) ?
2. Apakah PSK mampu menurunkan jumlah kematian sel pada jaringan palatum janin mencit (*Mus musculus*) akibat iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  pada usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13) ?
3. Apakah iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  pada usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13) dapat menyebabkan gangguan penyatuan jaringan palatum (palatoschizis) pada janin mencit (*Mus musculus*) ?
4. Apakah PSK dapat mencegah gangguan penyatuan jaringan palatum (palatoschizis) pada janin mencit (*Mus musculus*) akibat iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  pada usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13) ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1. Tujuan Umum

Membuktikan bahwa paparan bahan radioaktif sinar gamma  $Co^{60}$  di usia kehamilan dini dapat meningkatkan jumlah kematian sel pada jaringan calon pembentukan organ yang akan berdampak pada penyempurnaan pembentukan organ terutama pada jaringan palatum.

Penelitian ini juga menunjukkan sumber daya alami yang bersifat antioksidan seperti PSK dapat melindungi jaringan embrional dari berbagai

kemungkinan kelainan bawaan janin akibat iradiasi bahan radioaktif terutama  $\text{Co}^{60}$

### 1.3.2. Tujuan Khusus

1. Membuktikan bahwa iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  dapat meningkatkan jumlah kematian sel pada jaringan palatum janin mencit (*Mus musculus*) dengan usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13)
2. Membuktikan bahwa PSK mampu menurunkan jumlah kematian sel pada jaringan palatum janin mencit (*Mus musculus*) akibat iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  pada usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13)
3. Membuktikan bahwa iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  pada usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13) dapat menyebabkan gangguan penyatuan jaringan palatum (palatoschizis) pada janin mencit (*Mus musculus*)
4. Membuktikan bahwa PSK dapat mencegah gangguan penyatuan jaringan palatum (palatoschizis) pada janin mencit (*Mus musculus*) akibat iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  pada usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13)

## 1.4. Manfaat Penelitian

### 1.4.1. Manfaat Akademis

Mengetahui adanya pengaruh iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  terhadap kemampuan hidup sel calon organ dan perkembangan jaringan palatum janin mencit (*Mus musculus*) pada awal periode kebuntingan induk (13 hari), disamping mengetahui pengaruh PSK dalam upaya menurunkan jumlah kematian sel sehingga mencegah gangguan pembentukan organ dan menurunkan insiden kelainan pada jaringan palatum khususnya

pembentukan celah palatum/palatoschisis pada masa embrional akibat iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$ .

#### 1.4.2. Manfaat Terapan

1. Sebagai bahan masukan dan bahan pertimbangan untuk kalangan praktisi klinis dalam mewaspadai efek teratogenik iradiasi sinar gamma yang dapat menyebabkan kelainan morfologis atau cacat bawaan janin pada wanita hamil terutama pada saat tindakan radiodiagnostik atau radioterapi.
2. Sebagai bahan masukan bagi lembaga penelitian dan para ilmuwan dalam upaya mengembangkan sumber daya alam, salah satunya adalah ekstrak jamur atau PSK sebagai antioksidan alami untuk mencegah kerusakan jaringan embrional akibat radikal bebas yang ditimbulkan oleh bahan teratogenik.

## BAB 2

## TINJAUAN KEPUSTAKAAN

## 2.1. Struktur Sel Manusia

Sel manusia pada dasarnya terdiri atas dua bagian besar yaitu : *nucleus* (inti) dan *cytoplasma* (plasma/cairan sel). Inti dilapisi oleh sebuah membran yang memiliki pori sehingga memberi peluang terjadinya perpindahan bahan dari dalam inti ke plasma atau sebaliknya. Lapisan yang membungkus inti dinamakan “*nuclear membrane*” (membran plasma) sedangkan porinya dinamakan “*nuclear pore*”. Plasma sel dilapisi oleh sebuah membran yang tipis sekali untuk memungkinkan adanya perbedaan bahan dari sel tersebut ke ruang antar sel, atau sebaliknya. Lapisan tipis ini juga memungkinkan perpindahan bahan dari satu sel ke sel lainnya (Amsyari, 1989; Yatim, 1992).

Bagian penting dari sel (*organella*) yang terdapat di dalam plasma sel adalah sebagai berikut (Amsyari, 1989; Yatim, 1992) :

- a. *Endoplasmic reticulum*, yaitu suatu jaringan yang terbuat dari membran sel atau lapisan luar sel yang berperan untuk menghubungkan sel tersebut dengan sel yang lain. Organ ini juga berfungsi dalam pembentukan bahan lemak, disamping itu juga berperan sebagai tempat mikrosom untuk menyimpan enzim yang diperlukan dalam proses metabolisme sel.
- b. *Ribosome*, merupakan organ sel yang digunakan sebagai tempat bagi pembentukan protein berdasarkan informasi dari khromosom.
- c. *Mitochondria*, sebagai tempat untuk memproduksi energi yang dibutuhkan oleh sel (*power house*).

Organ sel yang terdapat di dalam inti (Yatim, 1992) adalah :

- a. *Nucleolus*, organ di dalam inti yang terlihat jelas di dalam sel, namun peranannya belum diketahui dengan pasti, dicurigai kemungkinan berperan di dalam proses pembelahan sel (*mitosis*).
- b. *Chromosome*, organ sel yang sangat berperan sebagai tempat penyimpanan segala informasi yang berhubungan dengan masalah keturunan atau karakteristik dasar manusia ( bearers of hereditary information).

## 2.2. Kematian Sel

Di setiap detik perkembangan hidup manusia terdapat sekitar sejuta sel baru yang lahir dan sejuta sel tua yang rusak kemudian mati. Kematian sel dapat terjadi pada organisme melalui dua mekanisme, yaitu *nekrosis* dan *apoptosis*. Kedua mekanisme ini sesungguhnya merupakan fenomena morfologik dan bisa disebabkan oleh stres oksidatif sebagai pemicu awalnya (Baraas, 2007).

Nekrosis ("accidental" cell death) terjadi karena adanya faktor luar sel dimana merupakan bentuk kematian sel bersifat patologis yang terjadi setelah adanya rangsangan eksogen, stres iskemia, dan akibat trauma fisika atau kimia yang menyebabkan lesi pada membran sel. Keadaan ini terjadi sebagai manifestasi dari pembengkakan sel yang berat (*swelling*) atau ruptur sel, denaturasi dan koagulasi protein sitoplasma dan perubahan mitokhondria yang semula masih reversibel, lalu menjadi ireversibel serta selanjutnya terjadi pemecahan membran sel, sehingga seluruh isi sel berhamburan keluar dari sel (Lawen, 2003; Kumar *et al*, 2005; Wylie, 2005; Baraas, 2007).

Sedangkan apoptosis (“normal” or “*Programmed Cell Death*”) merupakan rangkaian proses fisiologis, dimana terjadi eliminasi sel yang tidak berguna atau tidak diinginkan (*useless*) selama perkembangan hidup atau selama terjadinya proses biologis di dalam suatu organisme. *Programmed Cell Death* (PCD) atau apoptosis merupakan jenis kematian sel mandiri (“*cell suicide*”) yang biasanya muncul secara alami dalam sistem saraf. Tidak seperti *necrosis*, kerusakan sel terjadi akibat trauma atau intoksikasi, dimana sel membengkak dan pecah dengan menumpahkan isi ke lingkungan sekitarnya, dan menimbulkan reaksi inflamasi. Apoptosis yang dihasilkan dari serangkaian proses reaksi kimia menunjukkan gambaran berbeda yaitu kerusakan sel yang terjadi tanpa merusak isinya dan tidak menyebabkan reaksi inflamasi. Proses ini diawali dengan terjadinya penciutan sel (*shrinkage*), benjolan pada membran (*blebbing*) dan pepadatan nukleus (kondensasi). Kemudian, diikuti fenomena fragmentasi kromatin dan isi sel lainnya menghasilkan badan apoptotik (*apoptotic bodies*) yang kecil-kecil, tanpa disertai pecahnya membran sel. Kerusakan membran sel baru terjadi pada fase akhir apoptosis, ketika sel-sel fagosit mulai menelan dan memfagositosis sisa badan apoptotik, sehingga tidak meninggalkan jejak sama sekali. Di sini terjadi program bunuh diri dengan kontrol internal melalui sekelompok produk gen dari sel itu sendiri (Lawen, 2003; Wyllie, 2005; Kumar *et al.*, 2005; Smith, 2005; Aswin, 2002; Baraas, 2007).

Apoptosis merupakan proses siklus hidup normal suatu organisme. Meskipun kematian sel sama pentingnya dengan proliferasi sel dalam membangun individu, apoptosis mengatur jumlah sel, eliminasi sel yang tidak diperlukan lagi, dan membuang sel yang telah selesai tugasnya. Sebagai contoh adalah



perkembangan jari manusia pada tahap embrionik yang membutuhkan perubahan sel menuju proses apoptosis, sehingga jari dapat terpisah satu sama lain. Proses ini menjadi landasan dalam memfasilitasi pembuangan bagian dari kelompok sel yang tidak dibutuhkan (Lawen, 2003; Aswin, 2002).

Istilah apoptosis sendiri muncul dalam literatur biomedik pada tahun 1972, yang berasal dari bahasa Yunani berarti *dropping off* atau *falling away* yaitu gugurnya kelopak mahkota bunga atau daun pohon, atau rambut kulit kepala. Kiasan ini menjelaskan gambaran struktur sel mati yang timbul karena respon kehilangan sel tanpa merusak jaringan lebih lanjut. Sejak tahun 1990-an, sejumlah penelitian tentang apoptosis menunjukkan hasil yang menakjubkan. Proses ini merupakan fenomena unik dalam khazanah ilmu biologi. Ketidakterpurnaan proses apoptosis dapat berdampak luas terhadap berbagai macam penyakit. Terlalu banyak apoptosis menyebabkan gangguan kehilangan sel, terlalu sedikit menyebabkan proliferasi sel yang tidak terkontrol atau disebut sebagai sel tumor. Jadi dengan ditemukannya gen spesifik yang menjadi media apoptosis, maka diketahui bahwa keadaan ini dapat terjadi baik pada baik proses fisiologis maupun patologis (Lawen, 2003; Kumar *et al*, 2005; Baraas, 2007).

Peran apoptosis pada masa embrional yaitu membantu memahat bentuk organ (*remodelling*) sebagai contoh adalah kehilangan selaput interdigital pada jari tangan dan kaki. Apoptosis juga merupakan determinan penting abnormalitas fetal. Sistem syaraf terbentuk melalui produksi sel berlebihan diikuti dengan kematian apoptotik sel yang gagal membentuk hubungan sinaptik fungsional atau spesifisitas antigen produktif (Utoro, 2002; Aswin, 2002).

Pada dasarnya apoptosis bertanggung jawab terhadap proses fisiologik dan patologik, apoptosis juga berperan penting pada proses destruksi selama embriogenesis misalnya implantasi, organogenesis dan tumbuh kembang. Juga pada peristiwa involusi yang melibatkan hormonal yaitu kematian sel endometrium pada menstruasi, folikel ovarium atresi pada menopause, dan regresi payudara sesudah menyapih (Utoro, 2002; Soesatyo, 2002).

Pada proses patologi, apoptosis berperan pada kematian sel tumor, kematian jaringan yang bersifat hormonal misalnya atrofi prostat sesudah kastrasi, kematian organ parenkhimai sesudah obstruksi duktus (pankreas, parotis, ginjal), kematian sel karena sel T sitotoksik (pada *graft rejection*), jejas sel pada penyakit virus seperti hepatitis, dan berbagai kematian sel karena agen penyebab nekrosis berdosisi rendah (Utoro, 2002).

Pada orang dewasa setiap hari 10 milyar sel mati hanya untuk menjaga keseimbangan terhadap sel baru yang timbul dari setiap jaringan tubuh setiap harinya. Homeostasis normal ini bukan hanya proses pasif, tetapi merupakan proses yang diatur melalui apoptosis. Sistem yang sama mereparasi sel rusak. Pada proses penuaan, peranan apoptosis terhadap kerusakan DNA tidak terialu nyata kontribusinya (Utoro, 2002., Aswin, 2002).

Paparan radiasi dan agen kemoterapi terhadap sel menginduksi apoptosis melalui mekanisme yang diinisiasi oleh kerusakan DNA (*genotoxic stress*) dan melibatkan gen supressor tumor p53. Gen ini terakumulasi ketika DNA rusak dan menghentikan siklus sel (pada fase G) untuk menambah waktu dalam mereparasi DNA, dimana bila proses reparasi gagal, p53 akan memicu apoptosis. Pada dasarnya p53 memicu apoptosis, tetapi bila terjadi mutasi atau tidak ada p53



(tampak pada beberapa jenis kanker) akan meningkatkan ketahanan hidup sel. Jadi p53 berperan sebagai switch “hidup-mati” dalam kasus stres genotoksik (Utoro, 2002).

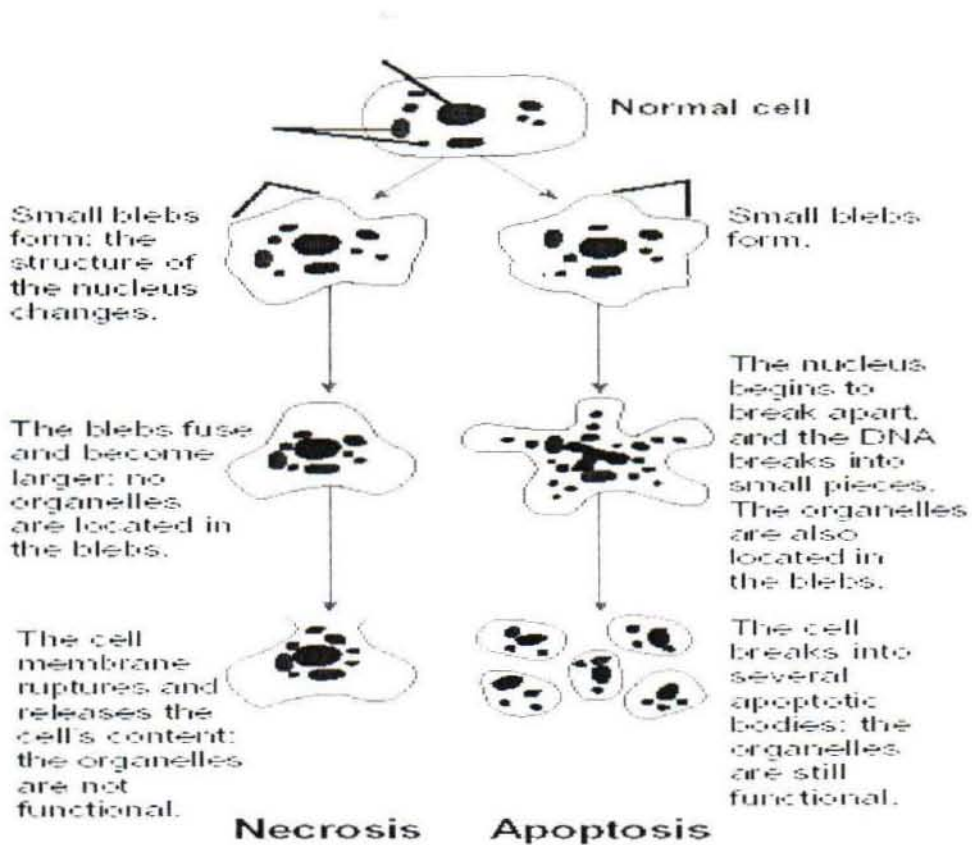
Ada pendekatan lain dalam menegakkan diagnosa apoptosis misalnya penggunaan pewarnaan fluoresen untuk inti yang terkondensasi atau fosfatidilserin permukaan sel, dan deteksi fragmen DNA melalui TUNEL (Terminal transferase mediated dUTP Nick End Labeling). Tingkat kematian sel dalam jaringan seringkali terekspresi sebagai indeks apoptosis. Penentuan ini mempunyai keterbatasan, karena ketidakpastian tentang lamanya apoptosis (yang mungkin kurang dari 6 jam), misalnya apoptosis dalam jumlah sedikit yang ditemukan pada analisis statis pada sel *celi turnover* (Utoro, 2002)

Adapun gambaran tahap perubahan morfologi sel pada proses apoptosis diujiaskan sebagai berikut (Albert *et al*, 1994) :

1. Sel menjadi lebih bundar (*circular*) karena struktur protein berbentuk kerangka sel dirangsang oleh peptidase yang disebut dengan *caspase* yang diaktifkan di dalam sel.
2. Kromatin (berupa DNA dan proteinnya) di dalam inti sel mengalami degradasi dan kondensasi dini.
3. Kromatin mengalami kondensasi berikutnya menjadi potongan yang lebih padat berlawanan dengan selubung inti. Pada tahap ini, membran ganda yang menyelubungi inti masih terlihat lengkap. Meskipun demikian, jumlah *caspase* meningkat pada saat proses degradasi protein di pori membran plasma dan mulai mengurangi jumlah lapisan yang menyelubungi inti. Kondensasi awal yang terjadi dianggap sebagai

bentukan *nonapoptotic* dari proses apoptosis, sedangkan tahap lanjut kondensasi ini disebut *pycnosis* yang dianggap sebagai tanda apoptosis.

4. Selubung inti menjadi terputus dan DNA mengalami fragmentasi, proses ini disebut *karyorhexis*. Inti terpecah menjadi beberapa bentuk badan kromatin atau unit nukleosom akibat degradasi DNA.
5. Sel mengalami fagositosis, atau
6. Sel pecah menjadi beberapa bagian vesikel yang disebut badan apoptotik atau *apoptotic bodies*.



**Gambar 2.1.** Perbandingan gambaran morfologi sel antara nekrosis dan apoptosis (Nandji and Susanne, 1997).

Gambaran tersebut menunjukkan bahwa pada apoptosis : (1) ukuran sel mengecil, sitoplasmanya memadat, dengan organel normal tetapi lebih sedikit rapat; (2) kondensasi kromatin (karakteristik apoptosis), berkumpul di tepi bawah inti. Inti sendiri pecah menghasilkan dua atau lebih fragmen; (3) pembentukan *bleb* sitoplasma (badan apoptotik) ; (4) fagositosis sel apoptotik atau badan apoptotik oleh sel sehat di sekitarnya, sel parenkhim atau makrofag. Badan apoptotik dihancurkan dalam lisosom dan sel yang berdekatan akan berpindah atau berproliferasi untuk mengganti ruang yang sebelumnya ditempati oleh sel apoptotik. Pada uji histologi, dimana jaringan diwarnai dengan Hematoxiin-Eosin (H-E) maka terlihat apoptosis terdiri dari sel-sel tunggal atau kelompok-kelompok kecil sel yang tampak sebagai massa bulat atau oval dengan sitoplasma eosinofilik dengan fragmen kromatin inti memadat (Kumar *et al*, 2005).

Sitotoksik merupakan agen pembunuh sel yang merupakan campuran bahan kimia (seperti makanan, kosmetik, atau obat-obatan) atau sel mediator (sel T sitotoksik). Namun istilah sitotoksik ini bukan mekanisme yang khas dalam membedakan antara nekrosis dan apoptosis (Wyllie, 2005).

### 2.3. Metode Pemeriksaan Apoptosis

Dikenal sejumlah metode pemeriksaan untuk mendeteksi keberadaan apoptosis, diantaranya adalah :

#### **Pengecatan H-E**

Prinsip metode ini adalah perbedaan warna antara inti yang lebih basofilik dengan afinitas yang lebih besar terhadap hematoxilin sedangkan sitoplasma

mempunyai afinitas yang lebih besar terhadap Eosin, sehingga memberikan warna merah muda sampai merah (Kumar *et al*, 2005).

#### **Pengamatan dengan mikroskop elektron**

Ultrastruktur sel terlihat seperti : (1) ukuran sel mengecil, sitoplasma memadat, dengan organel relatif normal tetapi sedikit rapat; (2) kromatin mengalami kondensasi, berkumpul di tepi di bawah inti. Inti sendiri akan pecah menghasilkan dua atau lebih fragmen; (3) pembentukan *bleb* sitoplasma (badan apoptotik) ; (4) fagositosis sel apoptosis atau badan apoptotik oleh sel sehat di sekitarnya, sel parenkim atau makrofag. Badan apoptotik akan dihancurkan dalam lisosom dan sel sekitarnya akan berpindah atau berproliferasi untuk mengganti ruang yang ditempati oleh sel apoptotik yang hilang tadi (Kumar *et al*, 2005).

#### **Pemeriksaan biokimia**

Menggunakan pewarnaan TUNEL, yang pertama kali diperkenalkan oleh Gavrieli dan kawan-kawan pada tahun 1992. Metode ini dipakai untuk mendeteksi fragmentasi DNA. Metode ini juga memberikan hasil yang positif pada sel-sel yang mengalami nekrosis dan autolisis (Kumar *et al*, 2005).

#### **ApopTag**

Dasar teknologi ApopTag adalah pemakaian TUNEL. Kerusakan strand DNA dideteksi dengan melabeli ujung bebas 3-OH secara enzimatik dengan nukleotida yang dimodifikasi. Ujung DNA yang terbentuk dari fragmentasi DNA ini terdapat pada inti sel yang mengalami apoptosis dan badan apoptotik (Anonymous, 2004).

### Pemeriksaan Imunohistokimia

Merupakan pemeriksaan imunologik menggunakan antibodi sebagai probe yang mempunyai sifat spesifik terhadap suatu antigen tertentu dari jaringan yang membentuk kompleks antigen antibodi yang telah dilabel dan tampak pada pemeriksaan mikroskop cahaya. Ada berbagai metode yang digunakan antara lain metode *Peroxydase Anti Peroxydase* (PAP) dan metode *Avidin Biotin Complex* (ABC) (Reid, 1994).

#### 2.4. Perkembangan Embrio

Individu baru terbentuk melalui proses fertilisasi antara sperma dan ovum. 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 5-6 hari. Fertilisasi terjadi di dalam oviduk, tepatnya sepertiga bagian sebelah atas oviduk (Rugh, 1967).

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 (Sadler, 2000). 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. Pada mamalia pembeihan terjadi secara holoblastis. Pembeihan pertama akan melalui bidang latitudinal yang terletak dibagian atas bidang ekuator.

Pembelahan kedua melalui bidang meridional, tetapi hanya pada blastomer kutub vegetal. Kemudian diikuti dengan pembelahan blastomer di kutub animal, sehingga terbentuk 4 blastomer. Pembelahan ketiga terjadi pada blastomer di kutub vegetal secara tidak serentak. Kemudian diikuti dengan pembelahan blastomer di kutub animal yang juga terjadi secara tidak bersamaan. Di akhir pembelahan ketiga akan terbentuk 8 blastomer. Selanjutnya terjadi pembelahan yang juga terjadi secara tidak beraturan (Yatim, 1992).

Rugh (1967) mengemukakan pembelahan sel yang pertama pada tikus maupun mencit terjadi 24 jam (1 hari) setelah pembuahan. Pembelahan 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. 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.

Sperber (1991) menyatakan bahwa di akhir tahap pembelahan akan terbentuk blastula. Blastula akan membentuk massa sel sebelah dalam (*inner cell mass/ICM*) dan trophoblast yang akan berkembang menjadi plasenta. ICM akan berkembang menjadi hipoblast dan epiblast, dimana epiblast akan berkembang menjadi embrio sedangkan hipoblast akan berkembang menjadi selaput ekstra embrio. Rugh (1967) menyebutkan bahwa blastomer akan terimplantasi pada hari ke 4 kehamilan dan berakhir pada hari ke 6 kehamilan. Kemudian diikuti dengan proses gastrulasi, yakni terjadinya perpindahan dan diferensiasi sel membentuk lapisan ektoderm, mesoderm dan endoderm. Akhir tahap perkembangan adalah



proses pembentukan organ dari lapisan ektoderm, mesoderm, endoderm dan derivat-derivatnya.

Pada awal kehamilan, dimana sel belum mengalami diferensiasi maka sel-sel tersebut masih bersifat totipotensi. Tahap pradiferensiasi adalah tahap dimana embrio tidak rentan terhadap zat teratogen, karena sel yang masih hidup akan menggantikan kerusakan tersebut dan membentuk embrio yang normal. Keadaan resisten ini berlangsung selama 5-9 hari tergantung dari species. Selanjutnya jika sel telah mengalami perpindahan dan diferensiasi, maka zat kimia yang masuk kedalam tubuh induk akan menimbulkan efek yang merugikan pada embrio tersebut (Lu, 1995).

Disebutkan bahwa tahap embrio merupakan tahap dimana sel secara intensif mengalami diferensiasi, mobilisasi dan organogenesis, akibatnya embrio sangat rentan terhadap efek teratogen. Periode ini biasanya berakhir pada hari ke 10-14 kehamilan bagi hewan pengerat, dan minggu ke-14 pada manusia. Namun tidak semua organ rentan pada saat yang sama dalam satu kehamilan. Sebagian besar embrio tikus mulai rentan pada hari ke 8 dan berakhir pada hari ke 12 kehamilan (Lu, 1995).

Janin merupakan tahap lanjut dari embriogenesis. Tahap ini ditandai dengan perkembangan dan pematangan fungsi, artinya selama tahap ini senyawa kimia tidak akan menyebabkan cacat namun dapat menyebabkan kelainan fungsi. Cacat luar umumnya mudah dideteksi pada saat kelahiran atau sesaat setelah kelahiran, tetapi kelainan fungsi tidak mungkin dapat didiagnosa segera setelah kelahiran (Lu, 1995; Olson *et al*, 1988).

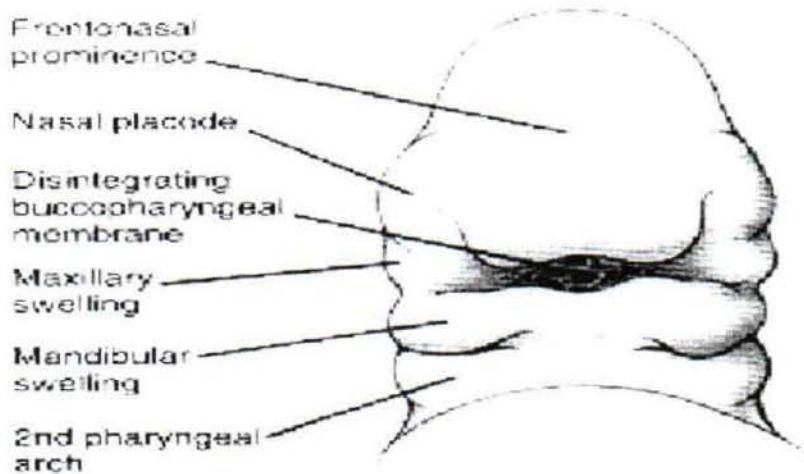
## 2.5. Perkembangan Wajah pada Masa Embrional

Wajah manusia mulai terbentuk pada usia empat minggu masa perkembangan janin. Pada minggu ke-6 wajah eksternal terbentuk lengkap. Jaringan palatum yang merupakan bagian dari rongga hidung dan mulut berkembang di antara minggu ke-6-8. Perkembangan ini berlanjut dengan lengkapnya jaringan *soft* palatum pada minggu ke-12. Terjadinya kelainan komplikasi dari proses perkembangan yang tidak dapat dihindari. Insiden malformasi kongenital pada wajah terjadi 1 dari 700 kelahiran. Jumlah ini meliputi baik kasus defek mayor yang menetap seumur hidup maupun defek minor yang dapat dikoreksi secara pembedahan. Masalah kongenital yang paling berat bila perubahan yang terjadi pada perkembangan wajah di usia awal kehamilan (minggu ke-4-8), namun relatif lebih ringan dibandingkan bila terjadi pada usia berikutnya (ke-8-12). Secara klinik, penting dalam penentuan perubahan jaringan yang terjadi di sekitar *forebrain*: yaitu *processus frontonasalis* yang berkembang terpisah dari jaringan lengkung faring pertama yaitu *processus mandibularis* dan *processus maxillaris*, masalah cenderung terjadi pada perkembangan satu atau lainnya tapi tidak pada kedua tempat tersebut (Robinson and Moss, 2003).

### 2.5.1. Serangkaian masa perkembangan wajah eksternal

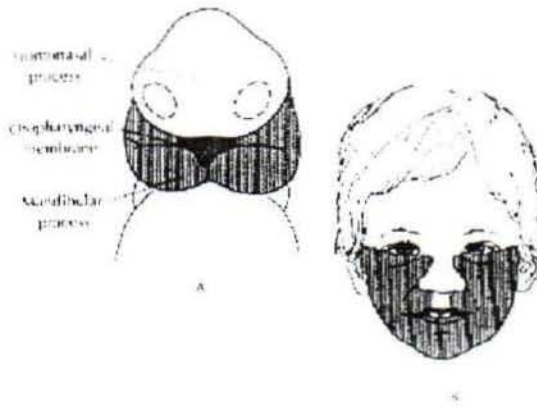
Selama minggu ke-tiga perkembangan wajah, membran orofaring (*buccopharyngeal*, atau *oral membrane*) merupakan bagian yang pertama terlihat pada sisi bentukan calon wajah, terletak di antara jantung primitif dan secara cepat melebar ke arah otak primitif ( Gambar 2.2). Bagian ini terdiri dari ektoderm di bagian luar dan endoderm di bagian dalam. Membran ini menyelubungi calon

saluran cerna dan rusak selama minggu ke-4 untuk penyesuaian selama pembentukan saluran antara calon rongga mulut (mulut primitif atau *stomodeum*) dan *foregut*. Membran orofaring menjadi rusak saat pertumbuhannya terhenti. Jaringan di sekitarnya meluas dengan cepat, sehingga sel non-proliferatif pada membran orofaring secara bertahap menarik bagiannya karena tidak mampu mengisi bagian yang makin meluas tersebut (Robinson and Moss, 2003).



**Gambar 2.2. Asal mula wajah dan mulut manusia.** Wajah berkembang dari lima tonjolan primordial yang muncul pada minggu ke-4 : tonjolan frontonasalis, dua tonjolan maksila, dan dua tonjolan mandibula. Membran buccopharyngeal menyebar ke bawah untuk membentuk rongga mulut (Robinson and Moss, 2003).

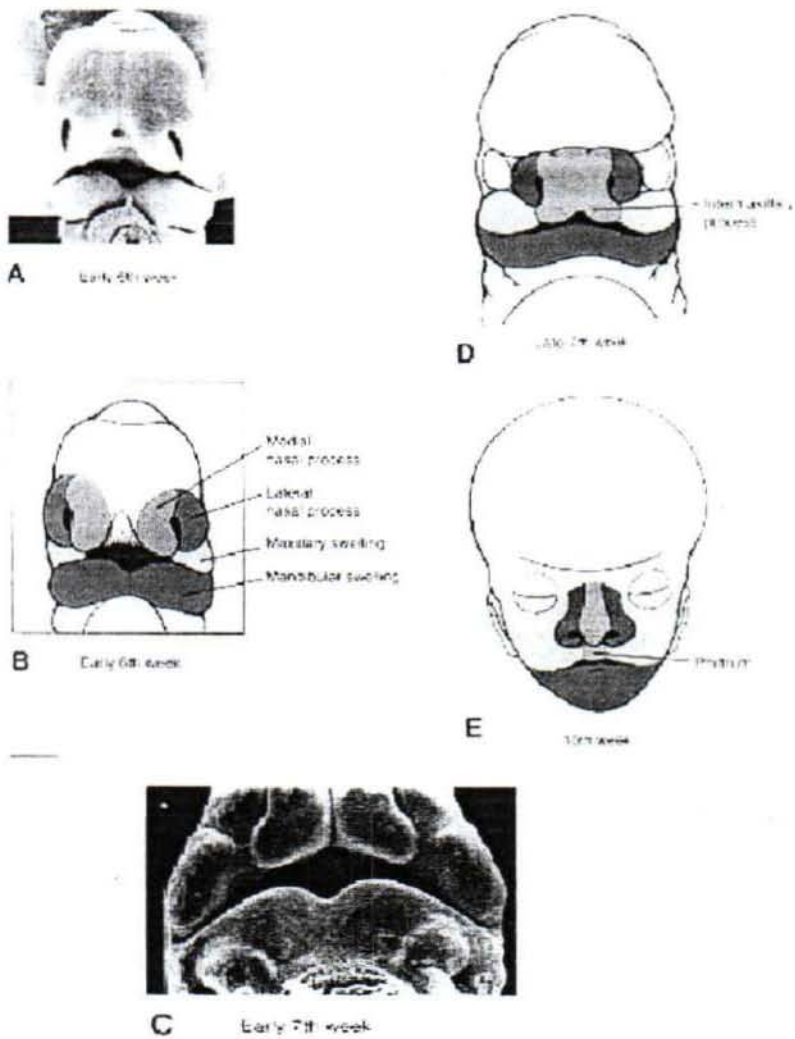
Wajah eksternal dibentuk dari dua sumber yang mengelilingi membran orofaring (Gambar 2.3) yaitu jaringan *processus frontonasalis* menutupi *forebrain* yang berasal dari krista neuralis, dan jaringan pada lengkung faring pertama (mandibula) yang berasal dari campuran antara mesoderm dan krista neuralis (Robinson and Moss, 2003).



**Gambar 2.3.** Regio fasialis pada janin manusia yang berusia empat minggu gambar **A**, dan pada anak-anak, gambar **B**, ditunjukkan dari arah depan. Garis terputus tebal jelas pada *processus frontonasalis* digambar **A**, nantinya akan membentuk kepala bagian depan, hidung dan daerah tengah bibir atas seperti yang ditunjukkan pada gambar **B**. Lengkung mandibula seperti yang diarsir gelap di gambar **A**, nantinya akan membentuk menjadi suatu bagian yang besar pada tengah wajah dan seluruh wajah bagian bawah, seperti yang ditunjukkan pada gambar **B**. (Robinson and Moss, 2003).

Deretan tonjolan yang timbul di berbagai tempat pada wajah dikenal sebagai *processus fascialis* (prominensia). Adapun *processus fascialis* yang disepakati (Gambar 2.4 dan 2.5) adalah :

a) *Processus frontonasalis* mempercabangkan tonjolan pada satu pasang *processus nasalis medialis* (yang nantinya berperan dalam membentuk suatu *processus globularis singularis/processus intermaxillaris*), dan satu pasang *processus nasalis lateralis*, yang juga mempercabangkan tonjolan pada satu pasang *processus mandibularis* (sesungguhnya merupakan lengkung faring itu sendiri), dan satu pasang yang merupakan perkembangan lengkung faring yaitu *processus maxillaris* (nantinya akan mempercabangkan tonjolan menjadi satu pasang *processus palatina*) (Robinson and Moss, 2003).



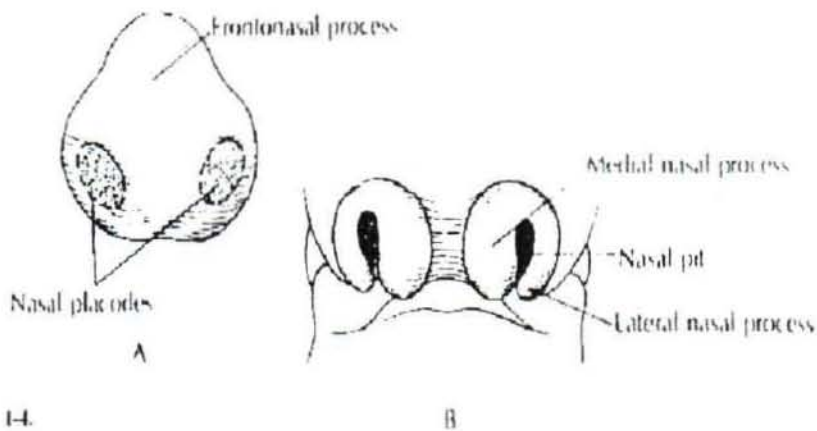
**Gambar 2.4.** Perkembangan wajah. Gambar **A, B**, janin berusia enam minggu, dimana plakoda nasalis dari prominensia frontonasalis mengalami invaginasi membentuk celah nasal (nasal pits) dan processus nasalis lateralis dan medialis. Gambar **C, D**, janin berusia tujuh minggu, Processus nasalis medialis bergabung di tengah membentuk processus intermaxillaris. Gambar **E**, janin berusia 10 minggu, dimana processus intermaxillaris membentuk philtrum pada bibir atas (A, C, Photos courtesy of Dr. Arnold Tamarin.) (Robinson and Moss, 2003).

Gambaran tahap awal perkembangan wajah menunjukkan kontribusi dari *processus fascialis*. Keadaan ini menyebabkan posisi tonjolan satu sama lain saling berhimpitan. Jika proses berjalan tidak normal selama perkembangan



organ, maka akan terjadi kelainan bentuk kongenital pada daerah tersebut yang dikenal sebagai pembentukan celah wajah atau *facial cleft*. Pada akhir minggu ke-4, dua penebalan ektoderm yaitu plakoda nasalis, muncul pada processus frontonasalis. Mereka menjadi prekursor epitel olfaktorik, yang merespon terhadap sensasi bau (Robinson and Moss, 2003; Sadler, 2000).

Selama minggu ke-5, *prominensia nasalis lateralis* dan *medialis* yang mengelilingi plakoda nasalis muncul pada processus frontonasalis. Keempat processus nasalis ini tumbuh ke depan, dimana plakoda nasalis masih dalam bentuk yang belum banyak berubah. Keadaan ini memberi kesan penekanan pada plakoda nasalis yang disebut "*invaginasi*". Sebelumnya berada di belakang lalu meneruskan diri pada calon *nasal pits*, yang dikelilingi oleh processus nasalis. Proses ini merupakan tahap awal perkembangan rongga hidung (Gambar 2.5) (Robinson and Moss, 2003).



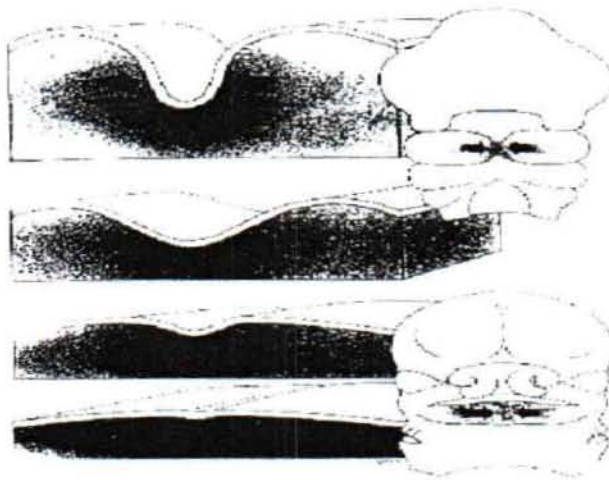
**Gambar 2.5.** Processus frontonasalis. Gambar A, dan B, Bakal rongga hidung (Robinson and Moss, 2003).

Secara bersamaan, pasangan processus maxillaris berkembang dekat dengan dasar lengkung faring pertama (lengkung mandibula). Mereka meluas dan tumbuh ke arah ventromedial, mengelilingi bakal rongga mulut. Processus

maxillaris tumbuh secara cepat, mula-mula bertemu pada *processus nasalis lateralis*, kemudian memanjang ke bawah pada *processus nasalis medialis*. Pemanjangan ke bawah ini dikenal sebagai *processus globularis* atau *intermaxillaris* yang seterusnya menjadi *philtrum* yang berupa struktur di tengah bibir atas. Perkembangan wajah yang sebenarnya tumbuh 10 lipatan dalam dimensi linear, yaitu saat kedua mata pada mulanya berlokasi di sisi kepala, wajah berada di depan pada usia 8 minggu. Pergerakan kedua mata sesuai dengan pertumbuhan wajah (Robinson and Moss, 2003; Sadler, 2000; Carlson, 1988).

### 2.5.2. Mekanisme merging dan fusi struktur wajah

Sebagian besar *processus fascialis* dimulai sebagai dua tonjolan yang terpisahkan oleh sebuah saluran. **Merging** merupakan proses pendangkalan saluran yang ada di antara dua tonjolan tersebut (Gambar 2.6) (Robinson and Moss, 2003).

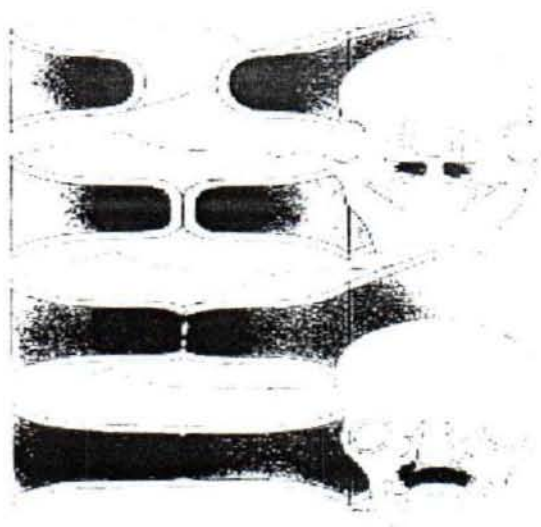


**Gambar 2.6.** Proses *merging* *processus fascialis* oleh pendangkalan suatu saluran yang ada di antara keduanya (Robinson and Moss, 2003).

Jaringan yang terdapat di dalam saluran tersebut mampu berproliferasi lebih cepat dibandingkan jaringan lain di sekitarnya. Keadaan ini menyebabkan saluran menjadi sangat dangkal hingga rata dan licin. Proses merging ini penting, karena tanpanya akan membentuk gelung yang dalam (suatu celah fasial) akibat tekanan sisa-sisa *processus fascialis*. Sebagai contoh proses ini adalah merging antara dua *processus mandibularis* (lengkung *mandibularis former*) pada pertengahan wajah, merging dua *processus nasalis* pada pertengahan wajah, dan merging antara *processus maxillaris* dan *mandibularis*. (Robinson and Moss, 2003).

**Fusion** merupakan proses dimana dua *processus fascialis* yang sebelumnya terpisah oleh suatu ruang tumbuh secara bersamaan (Gambar 2.7). Contoh suatu fusi adalah proses pembentukan *palatum sekunder*, dimana dua *processus fascialis* masing-masing tumbuh ke arah yang bersamaan, saling mendekati satu sama lain dan menyatu di garis tengah wajah. Berbeda dengan proses merging, di sini epitelnya mengalami kerusakan pada pertemuan kedua tonjolan (Robinson and Moss, 2003; Sadler, 2000).





**Gambar 2.7.** Proses *fusi* yang sebenarnya (sebagai contoh adalah proses pembentukan palatum sekunder). Setiap proses fusi menyebabkan kerusakan epitel permukaan (Robinson and Moss, 2003).

### 2.5.3. Mekanisme pembentukan palatum

Jaringan yang terletak di tengah antara rongga mulut dan rongga hidung dikenal sebagai palatum. Palatum primer atau *premaxilla* merupakan daerah segitiga terletak di depan *hard palatum* yang meluas mulai dari anterior *foramen incisivus* hingga ke arah sisi laterai gigi incisivus lateral. Meliputi ujung tonjolan alveolus tempat perlekatan empat gigi incisivus. Palatum sekunder meliputi sisa *hard palatum* dengan seluruh *soft palatum*. Palatum primer dibentuk selama minggu ke-4-7 usia kehamilan sebagai bagian *merging* dua tonjolan maksila dan *fus* dua tonjolan nasalis untuk membentuk segmen intermaksilaris (MoonDragons, 2006).

Segmen intermaksilaris ini terdiri atas satu komponen labial (yang membentuk *philtrum*), satu komponen maksila (membentuk alveolus dan empat gigi incisivus), dan komponen palatum (membentuk daerah segitiga palatum

primer). Palatum sekunder dibentuk selama minggu ke-6-9 usia kehamilan, yang terbentuk dari dua tonjolan palatum (berkembang dari *processus maxillaris*). Palatum primer dan sekunder, keduanya membentuk *palatum definitif* (Robinson and Moss, 2003; MoonDragon, 2006).

Keberhasilan perkembangan palatum sekunder tergantung banyak faktor, antara lain (Robinson and Moss, 2003; Sadler, 2000; Carlson, 1988) :

### **1. Faktor ekstrinsik**

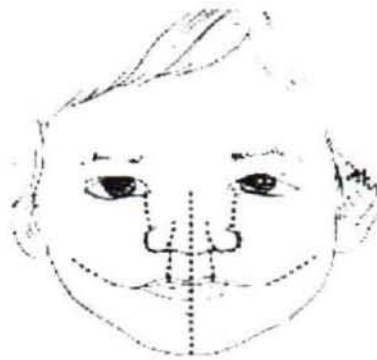
- a. Gerakan menarik lidah, berupa gerakan lidah keluar dari jalurnya di antara dua *processus palatum* dan berpeluang berpindah ke atas.
- b. Tersedianya banyak ruang di atas lidah untuk *processus palatina*, karena pertumbuhan rahang bawah dan lidah ke atas dan ke bawah sangat kompleks.
- c. Pertumbuhan massa neural yang menyebabkan basis kranii menjadi tegak lurus, proses ini menjadikan *processus palatina* secara mekanik membelok ke atas.

### **2. Faktor instrinsik**

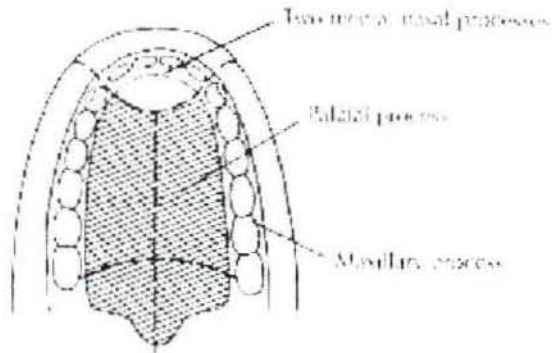
1. Proliferasi sel mesenkhim, menyebabkan peningkatan volume terhenti beberapa jam sebelum *processus palatina* membelok ke atas. Produksi matriks ekstraseluler juga meningkatkan volume hidrasi matriks ekstraseluler yang akhirnya meningkatkan volume dalam jumlah besar serta turgor tonjolan *palatina* sebelum membelok ke atas.
2. Epitel bagian medial atau *medial edge epithelium (MEE)* dapat menutup tonjolan yang bebas dari tonjolan *palatina*. Selain itu apoptosis dari sel permukaan MEE ini berperan penting dalam proses penyatuan dari perkembangan sementara lapisan yang terdiri atas glikoprotein yang melekat di antara sel MEE pada dua tonjolan *palatina* yang berlawanan.

## 2.6. Gangguan pembentukan wajah

Berbagai macam celah pada bibir dan palatum dijumpai secara klinis. Pembentukan celah yang sempurna menunjukkan derajat maksimum pembentukan celah pada sejumlah kelainan tertentu (contoh ; *Complete cleft* pada palatum sekunder, celah pada bibir, *processus alveolaris* dan palatum primer atau kombinasi dari keduanya). Celah *in complete* ditemukan pada keadaan dimana terjadi proses merging dan fusi selama fase perkembangan. Celah dapat terbentuk secara unilateral atau bilateral (Gambar 2.8 dan Gambar 2.9). Hal yang terpenting di dalam aspek klinis adalah tiap sisi yang mengalami proses merging dan fusi selama fase perkembangan wajah dan palatum merupakan lokasi yang berpotensi terbentuknya celah (*palatoschizis*) (Robinson and Moss, 2003).



**Gambar 2.8.** Pada diagram wajah ini, garis terputus menunjukkan kemungkinan lokasi pembentukan celah pada wajah. Daerah di antara garis putus-putus tersebut berhubungan dengan daerah yang dibentuk oleh dari *processus facialis* (Robinson and Moss, 2003).



**Gambar 2.9.** Sebuah diagram *hard* dan *soft* palatum, terlihat dari bawah. Daerah pada gigi depan berhubungan dengan palatum primitif, daerah itu meluas yang dibentuk juga oleh dua *processus medialis nasalis*. Bagian berwarna gelap pada palatum dibentuk oleh dua tonjolan palatina, dimana keduanya bersama-sama menyatu pada midline wajah. Kemungkinan pembentukan celah terdapat pada tanda garis tebal di antara *processus nasalis medialis* dan *processus palatina* serta pada midline antara dua *processus palatina* (Robinson and Moss, 2003).

## 2.7. Dampak Radiasi Pengion Terhadap Jaringan Tubuh

Radiasi ionisasi telah lama dikenal sebagai faktor yang bisa menyebabkan terjadinya mutasi di dalam sel. *Muller* adalah orang yang pertama kali mendemonstrasikan bahwa sinar-X adalah mutagen. Proses interaksi antara radiasi dan sel manusia yang menghasilkan mutasi di dalam sel ternyata tidak memerlukan proses biologis yang kompleks. Hal ini bisa dibandingkan dengan cara kerja mutagen lain, misalnya bahan-bahan kimiawi. Mutagen dalam bentuk bahan-bahan kimiawi biasanya mengakibatkan mutasi di dalam sel setelah bahan-bahan tersebut mengalami proses biologi yang panjang, antara lain proses penyerapan bahan kimiawi tersebut di dalam tubuh. Apabila tubuh manusia terkena sinar radiasi, maka partikel radiasi akan secara langsung mengadakan interaksi dengan bagian yang terkecil dari sel yaitu atom yang ada di dalam sel tubuh. Akibatnya dari interaksi ini maka terjadi proses ionisasi atau proses eksitasi

dari atom di dalam sel yang bisa menyebabkan pecahnya ikatan kimiawi di dalam molekul sel. Maka radiasi yang mengenai sel dapat menyebabkan perubahan struktur kimiawi molekul DNA, yang merupakan bahan paling penting bagi masalah hereditas (Amsyari, 1989).

Penelitian epidemiologis yang telah dilakukan menunjukkan adanya pengaruh radiasi terhadap organ dan atau janin yang berada di dalam tubuh wanita hamil (Amsyari, 1989). Pada penelitian teratologi eksperimental terhadap tikus dan kelinci, dosis radiasi terendah dapat menyebabkan manifestasi efek *stochastic*. Sebagai gambaran dampak variasi dosis (Kameyama, 1983) :

- Dosis 0,05 Gy dapat diserap oleh embrio preimplantasi.
- Dosis 0,05 – 0,1 Gy mempengaruhi perubahan sitologi secara akut seperti piknosis, degenerasi sitoplasmik, dan penundaan mitosis.
- Dosis 0,15 – 0,2 Gy mempengaruhi histogenetik, dan gangguan fungsional pada sistem saraf pusat.
- Dosis 0,2 – 0,25 Gy menyebabkan gangguan fertilitas.

Jaringan embrional merupakan jaringan muda yang bersifat proliferasif, sehingga sangat peka terhadap pengaruh lingkungan baik senyawa toksik maupun radiasi sinar gamma. Dampak radiasi sinar-X atau bahan toksik lainnya terhadap kematian sel embrional telah banyak diteliti (Inouye.,*et al*, 1992; Darmanto.,*et al*, 2000). Secara umum ada dua jalur kematian sel yaitu nekrosis dan apoptosis, yang keduanya dapat dibedakan dengan metode *immunohistokimia* yang mendeteksi ada tidaknya fragmentasi DNA (Darmanto, 2002).

Kerusakan sel atau asam nukleat pada dasarnya akibat radiasi ionisasi diperankan oleh adanya pengiriman energi menuju kulit elektron yang

mengalihkan energi dari suatu atom atau molekul, mengakibatkan elektron berpindah ke dalam orbit energi yang lebih tinggi. Akhirnya elektron lepas dari atom atau molekul tersebut menghasilkan elektron bebas dan sisa atom/molekul yang kekurangan elektron. Jenis atom yang kekurangan elektron ini disebut radikal bebas dan mengakibatkan kondisinya menjadi tidak stabil sehingga atom cepat bereaksi dengan lingkungan di sekitarnya (Darmanto, 2005).

Radikal yang paling penting dihasilkan oleh radiasi adalah ( $\text{OH}^\cdot$ ) yang merupakan yang merupakan hasil dari hidrolisis air menjadi ( $\text{OH}^\cdot$ ) dan ( $\text{H}^\cdot$ ), dan elektron. Elektron yang bebas dapat berikatan dengan molekul lain untuk membentuk tambahan radikal bebas. Dalam reaksi ikatan ini yang terpenting adalah reaksi dengan molekul oksigen untuk membentuk radikal *superoksida* ( $\text{O}_2^\cdot$ ) yang merupakan agen penyebab oksidasi yang kuat. Akibat serangan radikal bebas ini pada struktur yang berdekatan dapat menyebabkan beberapa kerusakan seperti kerusakan DNA dan peroksidasi lemak. Mekanisme dianggap menjadi dasar hubungannya proses kematian sel akibat radiasi atau yang sering digunakan sebagai radioterapi dalam membunuh sel tumor atau kanker (Darmanto, 2005).

Karena sedemikian besarnya kemungkinan terjadi kerusakan di dalam sel, apabila sel tersebut mengadakan interaksi dengan radiasi maka muncul konsep yang dinamakan sebagai efek stokastik (*stochastic effect*). Efek ini adalah sebagai suatu kelompok efek biologis akibat interaksi antara radiasi dan jaringan tubuh manusia, dimana kemungkinan terjadinya berbanding lurus dengan besarnya dosis radiasi yang mengenai jaringan tersebut tanpa adanya bentuk "*threshold*" apapun. (Amsyari, 1989).

Embrio terkenal peka sekali terhadap radiasi terutama pada fase awal perkembangannya, diperkirakan pada waktu embrio itu berumur sekitar 3–8 minggu. Pada umur tersebut embrio mengalami proses pembeian sel yang cepat sekali atau dinamakan sebagai fase diferensiasi atau proses pembagian tugas sel embrio tersebut (Amsyari, 1989).

Oleh karena fase diferensiasi awal merupakan fase yang peka radiasi, maka dosis radiasi yang kecil sekalipun akan mengalami kemungkinan terjadinya kerusakan sel yang menetap, bisa berbentuk kelainan sebagai mutasi titik atau kerusakan kromosom, gangguan pembeian sel, perubahan fungsi sel, atau gangguan terhadap proses enzim di dalam sel (Amsyari, 1989). Radiasi sinar-X juga diketahui menginduksi kematian sel embrional atau terjadi penyimpangan kromosom pada sel spermatozoa (Darmanto, 2002).

Segala akibat radiasi terhadap embrio dinamakan sebagai efek teratogenik (*teratogenic effect*) dan dapat diketahui dalam bentuk keguguran, lahir cacat, lahir mati maupun bermacam-macam gangguan lain baik kimiawi, struktural serta fungsi dalam tubuh anak yang dilahirkan nanti (Amsyari, 1989).

### 2.7.1. Radiasi Sinar Gamma

Sinar gamma pertama kali ditemukan oleh Paul Ulrich Villard, merupakan jenis sinar radioaktif yang tidak bermuatan, dan merupakan radiasi elektromagnetik monokromatis yang terpancar dari inti-inti atom yang mengalami aktifitas setelah transformasi radiasi. Sebagai suatu radiasi elektromagnetik, sinar gamma mempunyai panjang gelombang  $10^{-10} - 10^{-15}$  meter, dan mempunyai frekuensi antara  $10^{20} - 10^{25}$  Hz. Sinar gamma dihasilkan dari sinar kosmis dan dari perubahan-perubahan radioaktif (Muljani, 2003).

Daya tembus sinar gamma bergantung dari nomor atom, kepadatan serta ketebalan bahan yang ditembusnya (Mincler., *et al*, 1971). Selain itu sinar gamma memiliki kemampuan mengionkan materi yang dikenainya. Sinar gamma dapat mengeluarkan elektron dari suatu bahan yang dikenainya, hal ini dapat mengakibatkan atom yang semula netral akan menjadi bermuatan listrik. Mengingat bahwa ion lebih mudah bereaksi secara kimia dari pada atom netral, maka ion tersebut cenderung untuk mengikatkan diri pada atom atau molekul di sekitarnya. Dengan demikian maka molekul-molekul tersebut akan mengalami perubahan struktur. Apabila molekul tersebut terdapat pada sel makhluk hidup maka perubahan yang terjadi akan mengacaukan fungsi sel dalam kaitannya dengan proses kehidupan makhluk tersebut (Muljani, 2003).  $\text{Co}^{60}$  adalah suatu isotop pemancar gamma yang waktu paruhnya adalah 5,3 tahun, dipergunakan sebagai suatu sumber radiasi untuk meradiograf las pipa (Cember, 1983).

### 2.7.2. Besaran dan Satuan Dosis Radiasi

Untuk dapat membahas tingkat bahaya radiasi secara kuantitatif maka diperlukan adanya konsep dosis radiasi yang dikaitkan dengan banyaknya energi yang diserap oleh materi yang dilaluinya. Fraksi energi dalam suatu medan radiasi yang diserap tubuh bergantung kepada besaran energi radiasi, sehingga perlu untuk membedakan antara penyinaran radiasi dan dosis radiasi yang diserap. Berdasarkan hal tersebut, satuan energi dosis radiasi dinyatakan dengan energi yang diserap persatuan massa dalam jaringan. Satuan ini disebut dengan Gray (Gy) dan didefinisikan sebagai 1 Gy adalah dosis radiasi yang diserap dalam 1 Joule/Kg Berat Badan. 1 rad sama dengan 100 erg/gr, sedangkan 1 Gy sama dengan 100 rad (Wardhana, 1996).



## 2.8. Tinjauan Tentang Mekanisme Efek Radiasi

Pada saat radiasi melalui medium penyerap, seperti jaringan tubuh, energi radiasi memasuki sistem jaringan biologis. Interaksi awal adalah tumbukan antara foton dan elektron-elektron dalam tubuh. Proses tumbukan ini menghasilkan hamburan berupa radiasi dan gerak elektron yang dipercepat sehingga terjadi peristiwa ionisasi, eksitasi, pelepasan kalor, dan pemecahan ikatan molekul. Hal ini mengakibatkan kerusakan biologis pada jaringan yang terkena radiasi. Serangkaian proses yang terjadi pada jaringan yang terkena radiasi dapat dibagi menjadi tiga fase, yaitu : fase fisika, fase kimia, dan fase biologi.

### 2.8.1. Fase Fisika

Ketika radiasi diserap oleh jaringan biologis, terjadi proses eksitasi dan ionisasi. Eksitasi terjadi bila elektron orbital naik ke tingkat energi yang lebih tinggi tetapi masih dalam atom tersebut. Ionisasi terjadi bila elektron orbital terlempar keluar dari atomnya. Proses ionisasi dalam jaringan dapat terjadi melalui proses efek fotolistrik, hamburan *compton* atau produksi pasangan ion. Apabila peristiwa ini terjadi dalam molekul DNA, maka DNA dapat rusak. Energi yang dikeluarkan oleh peristiwa radiasi ionisasi kira-kira 33 ev. Energi ini cukup besar untuk memutuskan rantai kimia, sebagai contohnya adalah energi ikat atom karbon yang hanya 4,9 ev (Belli, 2002).

### 2.8.2. Fase Kimia

Sebagian besar susunan tubuh terdiri dari air ( $\pm 80\%$ ), maka sebagian besar efek langsung radiasi juga terjadi pada air. Hasil penyerapan energi oleh air ini ialah pembentukan radikal bebas yang sangat reaktif dalam air yang secara kimiawi bersifat racun (radikal bebas adalah fragmen suatu senyawa atau suatu

unsur yang mengandung satu elektron tidak berpasangan) dan yang mungkin mengeluarkan daya toksiknya terhadap molekul lainnya (Cember, 1983).

Bilamana air murni mengalami radiasi, maka akan berlangsung proses :



Ion positif  $\text{H}_2\text{O}^+$  segera mengalami disosiasi sesuai dengan persamaan :



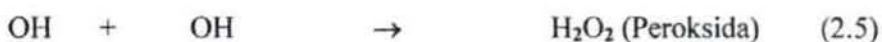
Sedangkan elektron ditangkap oleh molekul air



Seperti halnya ion positif, ion  $\text{H}_2\text{O}^-$  segera mengalami disosiasi menjadi :



Karena dalam cairan tubuh memang sudah banyak mengandung ion  $\text{H}^+$  dan  $\text{OH}^-$ , kedua ion ini tidak mengakibatkan sesuatupun, Sebaliknya radikal bebas H dan OH dapat bergabung dengan radikal sejenisnya, atau bereaksi dengan molekul lain dalam cairan tubuh. Kemungkinan terjadinya penggabungan tergantung kepada pengionan spesifik radiasi ionisasi yang menyinarinya. Dalam hal pengionan spesifik radiasi dalam cairan tubuh adalah berkadar tinggi, radikal bebas OH akan sangat berdekatan satu dengan yang lain, dan dapat menimbulkan peroksida hidrogen sesuai persamaan :



Radikal bebas dan peroksida, karena sifatnya yang reaktif, dapat merusak atau menyerang molekul-molekul penting yang ada di dalam materi biologi seperti enzim, DNA, RNA, kromosom dan lain sebagainya (Cember, 1983; Wiryosimin, 1995; Wardhana, 1996).

### 2.8.3. Fase Biologi

Fase ini mencakup semua proses yang terjadi setelah fase-fase tersebut di atas. Sebagian besar kerusakan DNA dapat diperbaiki, dan sebagian lagi tidak dapat diperbaiki sehingga mengakibatkan terdeposisinya molekul dalam tubuh dan secara tidak langsung melalui pembentukan radikal bebas dan hidrogen peroksida dalam air yang terdapat pada sebagian besar cairan tubuh (Wiryosimin, 1995).

Kepekaan jaringan hewan terhadap radiasi juga bergantung pada kandungan oksigen dalam jaringan. Selain itu kandungan kromosom dalam sel yang berbeda juga dapat menyebabkan ketidaksamaan respon ini (Danusupadmo., *et al*, 1984).

Eksperimen dengan menggunakan foton dan sinar yang bermuatan listrik telah menunjukkan bahwa inti sel jauh lebih peka terhadap suatu dosis tertentu daripada sitoplasma, karena piranti replikasi sebuah sel terutama terdapat di dalam inti (Ackerman, 1988 *dalam* Muljani, 2003).

### 2.9. Perubahan Seluler dan Ketahanan Hidup Sel

Masing-masing jaringan tubuh akan menunjukkan respon yang berbeda terhadap radiasi pengion. Perbedaan respon tersebut dipengaruhi oleh jenis selnya, karena setiap jenis sel mempunyai kepekaan yang berbeda-beda terhadap radiasi (Edward, 1984 *dalam* Muljani, 2003). Kepekaan sel terhadap radiasi tergantung dari tingkat diferensiasi sel-sel tersebut (Garner, 1967 *dalam* Muljani, 2003).

Sel yang aktif membelah umumnya lebih peka terhadap radiasi daripada sel yang tidak membelah. Sehingga semakin aktif suatu sel berproliferasi maka

semakin peka pula sel tersebut terhadap pengaruh radiasi. Penyinaran dengan radiasi pengion baik untuk tujuan terapi, diagnostik maupun aplikasi radiologi yang lain akan memberikan efek radiobiologi yang berbeda. Efek yang dihasilkan dapat berupa kerusakan bahkan sampai terjadinya kematian sel. Hal itu sangat dipengaruhi oleh jenis sumber sinar pengion yang digunakan, besaran energi, dosis radiasi, jenis organisme, jenis kelamin, usia, jenis organ yang terpapar, kadar air, dan kadar O<sub>2</sub> di dalam jaringan (Edward, 1984 *dalam* Muljani, 2003).

Kerusakan sel akibat interaksi dengan radiasi dapat bersifat menetap atau sementara, kerusakan sel dapat pulih melalui proses perbaikan sendiri (*cell repair*) yang dimiliki oleh setiap individu sel hidup, tetapi kemungkinan seperti itu terbatas dan selain tergantung pada jenis selnya juga tergantung pada besarnya dosis radiasi yang diterima. Kerusakan yang dapat pulih kembali disebut dengan kerusakan sementara, sedangkan kerusakan yang menetap dapat berupa kerusakan kromosom, DNA, gangguan pembelahan sel, perubahan fungsi sel atau gangguan terhadap proses enzim di dalam sel (Edward, 1984 *dalam* Muljani, 2003).

Efek langsung pada DNA terjadi berupa kerusakan pada pita DNA baik tunggal (*single strand brake*) atau pada pita ganda (*double strand brake*). Sedangkan efek tidak langsung terjadi akibat adanya perubahan pada molekul air di sekitar DNA. Molekul air yang berinteraksi dengan radiasi pengion akan menghasilkan radikal bebas sangat reaktif yang mampu menimbulkan perubahan kimiawi (Susworo, 2007).

## 2.10. Efek Radiasi Sinar Gamma terhadap Perkembangan Embrio

Radiasi sinar gamma atau pengion dapat menimbulkan kematian sel. PCD atau Apoptosis adalah gambaran yang jelas terjadi pada perkembangan sistem imun atau sistem saraf. Lebih dari itu peristiwa apoptosis merupakan kematian sel terprogram pada masa embrionik sehingga menjadi faktor penting yang mampu menyeleksi apakah sel tersebut pantas atau mampu berdiferensiasi secara lengkap pada masa post natal (Darmanto, 2005).

Selain akibat radiasi langsung pada janin, akibat tidak langsung terhadap sel-sel benih patut dipertimbangkan. Bahkan dosis radiasi yang relatif kecil pada mencit terbukti dapat menyebabkan mutasi, yang selanjutnya menimbulkan kelainan kongenital pada generasi berikutnya (Sadler, 2000).

Wanita hamil yang menjadi subjek paparan radiasi sangat berhubungan dengan potensi bahaya radiasi terhadap keturunan mereka di dalam rahim. Ditemukan bahwa ada kemungkinan terjadinya efek yang menjadi bahan pertimbangan setelah paparan *therapy-diagnostic* adalah dua efek stokastik yaitu karsinogenik dan mutagenik (Takeyama, 1983).

## 2.11. Tinjauan Tentang Polysaccharide Krestine (PSK) Sebagai Antioksidan

Ada berbagai macam bahan berkhasiat yang dapat diperoleh dari jamur, di antaranya adalah PSK yang tersusun oleh kombinasi asam amino dan beta-glucan yaitu pada ikatan  $\beta$ -1,4;  $\beta$ -1,3 dan  $\beta$ -1,6 melalui ikatan O- atau N- glycoside, struktur ini tidak berpengaruh pada proses pencernaan, sehingga sangat efektif ketika digunakan secara oral (Tsukagoshi., *et al*, 1984).

Dengan struktur seperti itu, polisakarida ini dapat turut berperan serta dalam fungsi biologis makhluk hidup yaitu dalam aktifitas imun tubuh seperti interaksi *lock and key* antara rantai cabang dengan reseptor berbagai macam sel imun. Reseptor dari beta-glucan telah ditemukan pada beberapa sel imun yaitu pada *natural killer cell*, neutrofil, monosit/makrofag, sel limfosit T dan B (Tsukagoshi., *et al*, 1984).

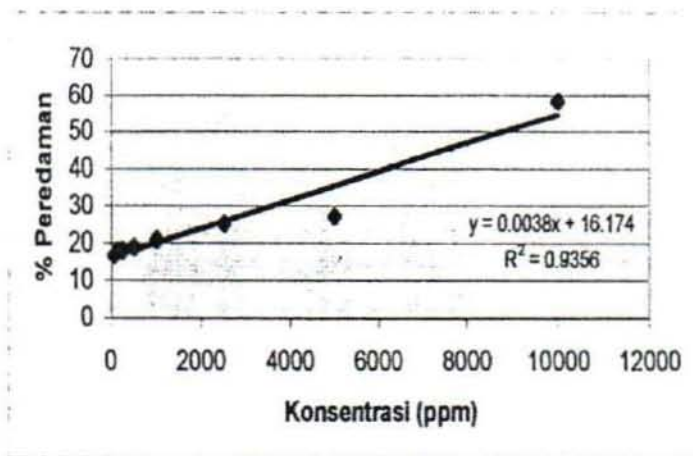
Zat ini terdapat pada jamur *Coriolus versicolor* dari kelas Basidiomycetes (Kobayashi., *et al*, 1995, Tsukagoshi., *et al*, 1984). Struktur tubuh dari jamur ini berupa kumpulan miselium yang membentuk tubuh buah sehingga disebut *mushroom*, dimana dinding sel dari miselium tersebut tersusun oleh kitin. Struktur kitin mirip dengan selulose yang terdapat pada tanaman tingkat tinggi, sehingga menyebabkan jamur ini memiliki struktur yang rigid. Pada kitinlah terdapat polisakarida yang merupakan komponen aktif. Kitin dapat dicerna oleh manusia, karena itu dapat digunakan pada manusia (Yang, 1993).

Selain PSK ada dua jenis polisakarida lain yang diekstrak dari miselium jamur tersebut, yaitu *small peptide of Coriolus versicolor* (SPCV) dan *Polysaccharide peptide* (PSP) (Yang., *et al*, 1992). Dan kedua zat tersebut telah dibuktikan mampu untuk melawan terbentuknya sel kanker atau sebagai anti kanker (Tsukagoshi., *et al*, 1984).

PSK memiliki karakteristik berupa serbuk atau bubuk berwarna coklat, larut dalam methanol, pyridine, chloroform, benzene, dan hexane, serta memiliki kelarutan yang sangat tinggi dengan air. Di dalam larutan yang menggunakan pelarut air, PSK, memiliki pH sekitar 7 atau pH netral. Berat molekul dari PSK adalah 9,4 KD. PSK terdiri atas protein yang tersusun atas asam-asam amino

seperti aspartat, asam glutamat, valin, leusin, lysine, arginin, dan lain-lain serta monosakarida, yaitu glukosa yang merupakan komponen penyusun yang terbesar (74,6 %), galaktosa, mannososa, xylosa, dan fruktosa (Tsukagoshi., *et al*, 1984).

Darmanto dkk (2005) telah melakukan penelitian yang membuktikan bahwa PSK memiliki kemampuan antioksidan, dimana melalui peredaman radikal bebas DPPH secara *in vitro* yang diamati dengan metode fluorescence (Gambar 2.10)



**Gambar 2.10.** Kemampuan (kadar) antioksidan larutan PSK terhadap peredaman radikal bebas DPPH secara *in vitro* yang diamati dengan metode fluorescence (Darmanto, 2005)

## 2.12. Tinjauan Tentang Mencit

Mencit yang digunakan termasuk dalam Kelas Mamalia, Ordo Rodentia, Familia Muridae, dan spesies *Mus musculus* (Jasin, 1984).

Mencit memiliki kemampuan hidup selama 2½ - 3 tahun. Mencit tergolong hewan menyusui yang dapat dikawinkan pada umur 8 minggu dengan lama kebuntingan 18 - 20 hari. Masa reproduksinya antara 2 -14 bulan dengan siklus birahi setiap 4 - 5 hari. Mencit rata-rata melahirkan pada umur kebuntingan

19 hari dengan rata-rata jumlah anak 10 ekor dan menyusui anaknya selama 21 hari (Rugh, 1968).

Perkembangan embrio mencit terjadi segera setelah fertilisasi yaitu setelah pertemuan ovum dan sperma yang akan membentuk pronuklei jantan dan betina. Kemudian pada umur kebuntingan 1 hari akan terjadi pembelahan menjadi 1 – 2 sel di dalam oviduk. Pada esok harinya, terjadi pembelahan lagi membentuk 2 – 16 sel dan akan bermigrasi dari oviduk menuju uterus. Pada umur kebuntingan 3 hari, sel ini akan mengalami fase morula. Kemudian pada umur 4 hari akan terbentuk blastula dan terjadi implantasi awal di dinding uterus (Rugh, 1968).

Pada umur kebuntingan 7 hari, mulai terjadi pembentukan otak yang diawali dengan terbentuknya *neural plate*. Pada umur kebuntingan 11 hari terjadi evaginasi epifisis, dan hipofisis otak. Sefalisasi terjadi pada embrio saat berumur 13 hari. Fetus mencit akan lahir pada umur kebuntingan 18 – 20 hari (Rugh, 1968).



## BAB 3

## KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

## 3.1. Kerangka Konseptual

Dampak radiasi sinar-X atau bahan toksik lainnya terhadap kematian sel embrional telah banyak diteliti (Inouye., *et al*, 1992; Darmanto.,*et al*, 2000). Radiasi sinar menyebabkan kematian sel, khususnya pada sel yang masih muda atau pada sel proliferasif umumnya,. Diketahui kerusakan yang terjadi akibat fragmentasi DNA atau peristiwa apoptosis (Darmanto.,*et al*, 2000; Darmanto, 2002). Radiasi sinar pengion juga telah diketahui menginduksi kematian sel embrional atau terjadinya penyimpangan kromosom pada sel spermatozoa (Darmanto, 2002; Akagi.,*et al*, 1993).

Kerusakan akibat radiasi di dalam sistem biologi diawali oleh toksin primer, perangsangan dan pembentukan unsur radikal bebas selama masa deposisi energi. Kerusakan akibat radiasi diketahui muncul bersamaan dengan lepasnya unsur radikal bebas, yang memicu proses stress oksidatif di dalam sel dan jaringan. (Hien., *et al*, 2002).

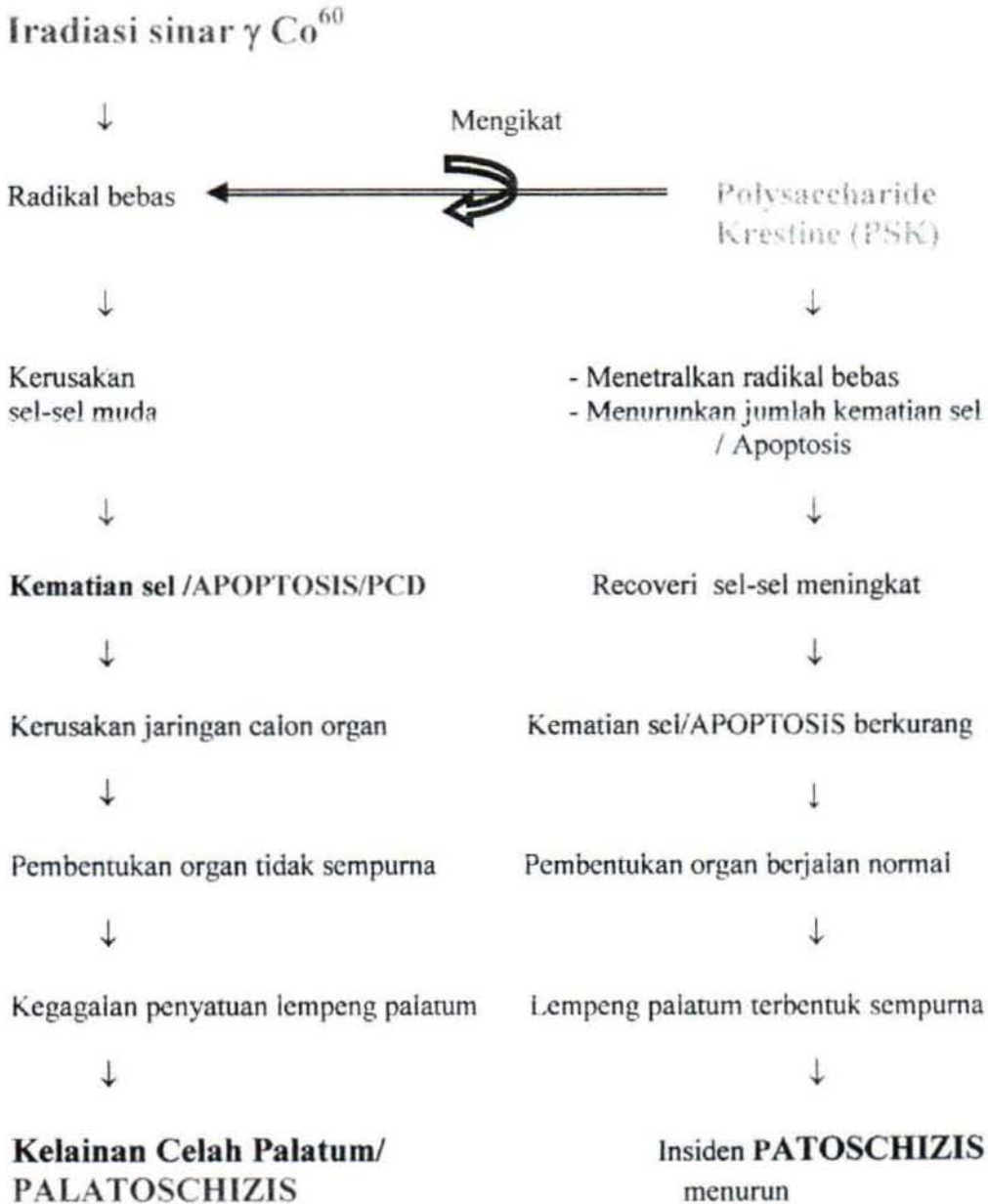
Sinar-X atau radiasi pengion bersifat *ultrasoft* dimana menunjukkan suatu elektronnya dosis ~ 7 nm akan menghasilkan elektron ionisasi ~ 10 nm, dosis ini cukup untuk menimbulkan kematian, perubahan atau lesi mutagen (Goodhead.,*et al*, 1993).

Dilaporkan bahwa adanya insiden kejadian tidak normal pada saat di antara paparan dan konsepsi yaitu oosit yang tidak matang sehingga sifatnya menjadi sangat radiosensitif. Hal ini menyimpulkan bahwa dapat terjadi kondisi

yang sangat rentan untuk *lethal*, mutasi gen, dan kromosom yang tidak normal (Kirk and Lyon, 1982).

Beberapa senyawa telah diketahui mampu menekan dan menunda proses apoptosis, di antaranya adalah *cyloheximide*, dan PSK. Senyawa-senyawa tersebut telah terbukti mampu menekan proses apoptosis akibat radiasi sinar-X. PSK adalah suatu jenis protein terkait polisakarida yang sering digunakan sebagai obat kanker dan telah dibuktikan mampu menunda proses apoptosis, maupun ekspresi protein p53 yang dianggap sebagai penginduksi kerusakan DNA atau apoptosis (Kagohashi., *et al*, 2002).

Kerangka konseptual dapat digambarkan dengan diagram di bawah ini :



Gambar 3.1. Kerangka konseptual penelitian

**Pengamatan :**

1. Prosentase jumlah kematian sel pada jaringan palatum janin mencit (*Mus musculus*) 24 jam setelah iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  pada usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13)
2. Prosentase jumlah kematian sel pada jaringan palatum janin mencit (*Mus musculus*) 24 jam setelah iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  disertai pemberian PSK 1 jam setelah iradiasi pada usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13).
3. Jumlah janin mencit (*Mus musculus*) yang mengalami pembentukan celah pada palatum (palatoschizis) dengan usia kebuntingan induk 18 hari (UK 18) setelah iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  pada usia kebuntingan induk (UK 13)
4. Jumlah janin mencit (*Mus musculus*) yang mengalami pembentukan celah pada palatum (palatoschizis) dengan usia kebuntingan induk 18 hari (UK 18) setelah iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  pada usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13) yang disertai pemberian PSK 1 jam setelah iradiasi.

**3.2. Hipotesis Penelitian**

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

1. Iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dapat menyebabkan kematian sel pada jaringan palatum janin mencit (*Mus musculus*) dengan usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13).

2. PSK dapat menurunkan jumlah kematian sei pada jaringan palatum janin mencit (*Mus musculus*) akibat iradiasi dengan sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  pada usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13).
3. Iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  pada usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13) dapat menyebabkan gangguan penyatuan lempeng palatum (palatoschizis) pada janin mencit (*Mus musculus*).
4. PSK dapat mencegah gangguan penyatuan lempeng palatum (palatoschizis) pada janin mencit (*Mus musculus*) akibat iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  pada usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13).

## BAB 4

## MATERI DAN METODE PENELITIAN

## 4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan penelitian *The Post Test Only Control Group Design*. Rancangan tersebut dimaksudkan untuk penelitian eksperimental yang diasumsikan bahwa di dalam suatu populasi tertentu, tiap unit populasi adalah “homogen”, itu artinya semua karakteristik antar unit populasi adalah sama. Maka pengukuran awal tidak dilakukan, oleh karena dianggap sama untuk semua kelompok, karena berasal dari satu populasi yang sama. Berdasarkan asumsi tersebut maka dikembangkan rancangan eksperimen tanpa ada pengukuran awal (pretest), tetapi hanya posttest saja (Zainuddin, 2000).

Rancangan penelitian ini disusun sebagai langkah untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pengaruh antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol setelah dilakukan iradiasi sinar gamma Cobalt<sup>60</sup> baik dengan atau tanpa pemberian PSK pada induk mencit (*Mus musculus*) di awal usia kebuntingan induk, yaitu usia kebuntingan 13 hari (UK 13).

**Rincian pembagian kelompok adalah sebagai berikut :**

- K (-)<sub>1</sub> : Kontrol negatif 1, janin mencit dari induk UK 13 hari, tanpa iradiasi sinar gamma Co<sup>60</sup> dan PSK, diamati pada usia janin 14 hari.
- K (-)<sub>2</sub> : Kontrol negatif 2, janin mencit tanpa iradiasi sinar gamma Co<sup>60</sup> dan PSK, diamati pada usia janin 18 hari.
- K (+)<sub>1</sub> : Kontrol positif 1, janin mencit dari induk UK 13 hari, dilakukan iradiasi sinar gamma Co<sup>60</sup> dosis 2 Gy tanpa pemberian PSK, diamati pada usia janin 14 hari.

- $K (+)_2$  : Kontrol positif 2, janin mencit dari induk UK 13 hari, dilakukan iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dosis 2 Gy tanpa pemberian PSK, diamati pada usia janin 18 hari.
- $P_1$  : Janin dari induk UK 13 hari yang diiradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dosis 2 Gy disertai pemberian PSK dosis 200 mg/gr BB, diamati pada usia janin 14 hari
- $P_2$  : Janin dari induk UK 13 hari yang diiradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dosis 2 Gy disertai pemberian PSK dosis 200 mg/gr BB, diamati pada usia janin 18 hari.
- $O_1$  : Data kelompok pada kontrol negatif 1
- $O_2$  : Data kelompok pada kontrol negatif 2
- $O_3$  : Data kelompok pada kontrol positif 1
- $O_4$  : Data kelompok pada kontrol positif 2
- $O_5$  : Data kelompok pada perlakuan 1
- $O_6$  : Data kelompok pada perlakuan 2

Secara diagram dapat dilihat sebagai berikut :

### Diamati

- |  |   |       |   |  |
|--|---|-------|---|--|
| Kontrol Negatif 1/<br>$K (-)_1$ UK 13 hari | → | UK 14 | → | Kematian Sel/ $(O_1)$                    |
| Kontrol Negatif 2/<br>$K (-)_2$            | → | UK 18 | → | Insiden Kelainan/palatoschizis ( $O_2$ ) |
| Kontrol Positif 1/<br>Radiasi UK 13 hari   | → | UK 14 | → | Kematian Sel/ apoptosis ( $O_3$ )        |
| Kontrol Positif 2/<br>Radiasi UK 13 hari   | → | UK 18 | → | Insiden Kelainan/palatoschizis ( $O_4$ ) |
| Perlakuan 1/<br>Radiasi + PSK UK 13 hari   | → | UK 14 | → | Kematian Sel/ apoptosis ( $O_5$ )        |
| Perlakuan 2/<br>Radiasi + PSK UK 13 hari   | → | UK 18 | → | Insiden Kelainan/palatoschizis ( $O_6$ ) |

## 4.2. Populasi , Besar, dan Teknis Pengambilan Sampel

Populasi penelitian adalah menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) betina strain BALB/C yang diperoleh dari pembiakan di laboratorium Biologi Fakultas MIPA Unair. Sampel penelitian berjumlah 40 ekor mencit betina berusia 2 – 5 bulan dan memiliki berat rata-rata 25 – 30 gram. Tiap mencit betina tersebut setelah dikawinkan dan yang dinyatakan positif bunting rata-rata akan menghasilkan 10-12 ekor janin. Besar sampel yang ditetapkan menurut rumus sebagai berikut (Steel and Torrie, 1991; Rosida, 2002) :

$$(k - 1) (r - 1) \geq 20$$

Dimana : k = Jumlah macam perlakuan

r = Jumlah sampel untuk tiap kelompok

Dihasilkan, k = 6 dan r = 5

Berdasarkan rumus tersebut, diperoleh besar sampel untuk tiap kelompok minimal 3-5 ekor induk. Karena selama menjalani perlakuan akan terdapat kemungkinan kegagalan dan kematian maka ditetapkan  $(f) \pm 10\%$ , sehingga besar sampel tersebut dikalikan dengan  $1 / (1 - f)$ . Jadi besar keseluruhan sampel adalah 4 ekor induk mencit perkelompok percobaan.

Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan cara random karena populasi pada penelitian ini dianggap homogen, maka cara random yang digunakan adalah *simple random sampling* (Zainuddin, 2000).

## 4.3. Variabel Penelitian

### 4.3.1. Klasifikasi Variabel

a. Variabel bebas (*independent*), meliputi : dosis radiasi sinar gamma  $CO^{60}$ ,



dan dosis PSK

- b. Variabel terikat (*dependent*), meliputi : kematian sel dan celah palatum (palatoschizis).
- c. Variabel kendali, meliputi : usia mencit, berat badan mencit, strain mencit, jenis keciamin mencit, pakan mencit, minuman mencit, kondisi dan iklim kandang (kelembaban dan temperatur), dan waktu penelitian.

#### 4.3.2. Definisi Operasional

Bahan dan parameter yang digunakan pada penelitian ini didefinisikan sebagai berikut :

1. Polysaccharide Krestine (PSK) adalah ekstrak jamur *Coriolus versicolor* yang diperoleh dari PT. Sankyo, Jepang. Ekstrak ini terdiri atas sejumlah asam-asam amino (asam aspartat, asam glutamat, valin, leusin, lysine, arginin, dan lain-lain serta monosakarida, yaitu glukosa yang merupakan komponen penyusun yang terbesar (74,6 %), galaktosa, mannososa, xylosa, dan fruktosa. Dosis yang digunakan adalah 200 mg/Kg BB secara perorane (Tsukagoshi., *et al*, 1984; Darmanto, 2005).
2. Sinar gamma Cobalt<sup>60</sup> (Co<sup>60</sup>) adalah sinar radioaktif yang tidak bermuatan, dan merupakan radiasi elektromagnetik monokromatis yang dihasilkan dari sinar kosmis dan dari perubahan-perubahan radioaktif serta mempunyai panjang gelombang  $10^{-10} - 10^{-15}$  meter, dan mempunyai frekuensi antara 1020 – 1025 Hz. Dosis yang digunakan adalah 2,5 Gy (Muljani, 2003; Darmanto, 2005).
3. Kelainan palatum atau Palatoschizis adalah cacat bawaan dimana terdapat celah pada palatum lunak dan keras, serta pada wajah (yaitu fissura

mediana, obliqua, dan laterai) disertai gambaran wajah yang tidak normal dan adanya gangguan bicara (Lindner, 1989; Sadler, 2000).

4. Kematian sel dalam bentuk apoptosis (*programmed cell death*) merupakan rangkaian proses fisiologis, dimana terjadi eliminasi sel yang tidak berguna atau tidak diinginkan selama perkembangan hidup atau selama terjadinya proses biologis di dalam organisme (Lawen, 2003; Wylie, 2005).
5. Jenis hewan coba adalah mencit (*Mus musculus*) betina strain BALB/C yang diperoleh dari pembiakan di laboratorium Biologi Fakultas MIPA Unair.
6. Umur hewan coba : 2-5 bulan
7. Berat badan hewan coba adalah 25-30 gram yang ditimbang dengan timbangan merk Ohaus yang mempunyai kapasitas 500 gram (neraca analitik).
8. Usia kebuntingan (UK) hewan coba saat perlakuan adalah 13 hari
9. Usia pengamatan dan pembedahan hewan coba adalah 24 jam setelah perlakuan dan pada usia kebuntingan 18 hari.
10. Keadaan fisik hewan coba : bunting dengan ditandai adanya sumbat vagina dan perubahan fisik abdomen, dianggap usia kebuntingan nol hari, gerakan menjadi kurang aktif, berat badan tidak turun selama proses aklimatisasi.

#### 4.4. Bahan Penelitian

##### 4.4.1. Hewan Coba

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) betina strain BALB/C yang berumur 2 – 5 bulan sebanyak 40 ekor dengan berat badan 25 – 30 gram. Mencit tersebut diperoleh dari pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) Surabaya. Pemeliharaan dan perawatan hewan coba dilakukan di rumah hewan Fakultas MIPA Universitas Airlangga kandang berukuran 6 x 7 m, dimana di dalamnya terdapat 6 buah rak penampungan 2 sisi. Tiap sisi rak ditempati oleh 6-8 boks plastik dengan tutup kawat kasa beralas sekam berukuran 20 x 15 cm dan tiap boks tersebut berisi 13-20 mencit. Setiap pagi diberi makan berupa pelet par L dan minum secara *ad libitum*.

##### 4.4.2. Bahan Perlakuan

Bahan yang dipergunakan pada hewan coba adalah :

- a. Pakan mencit berupa pellet Par L 511 dan 521
- b. Air minum
- c. *Aquadest* steril
- d. Larutan fiksatif
- e. Ekstrak Polysaccharida Krestine (PSK) dengan dosis 200 mg/KgBB dari PT. Sankyo, Jepang
- f. Bahan-bahan yang diperlukan selama pemeliharaan mencit, meliputi sekam padi.
- g. Bahan-bahan kimia untuk membuat sediaan pengamatan jaringan embrio mencit, yaitu : seri alkohol bertingkat (alkohol 70%, 80%, 96%, dan

alkohol absolut), xyolol, parafin, larutan pewarnaan Haematoxylin dan Eosin, serta Entelan

h. Chloroform sebagai bahan pembiusan

#### **4.5. Instrumen Penelitian**

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

- a. Kandang, terbuat dari plastik berukuran 60 x 45 cm dengan kawat kasa sebagai penutupnya.
- b. Botol sebagai tempat minum dari kaca yang dilengkapi penutup karet berpipa sepanjang 3 cm.
- c. Tempat pakan dari kawat.
- d. Seperangkat alat radiasi teleterapi  $Co^{60}$  Alcyon III lengkap dengan asesorisnya milik R.S.U.D dr.Sutomo.
- e. Timbangan merk Ohaus yang mempunyai kapasitas 500 gram (neraca analitik) untuk penimbangan berat badan mencit betina induk.
- f. Seperangkat alat bedah minor (minor dissecting set) yang meliputi gunting, pinset, skalpel/bisturi.
- g. Jarum pentul, bak seksi, dan silet
- h. LUP

##### **4.5.2. Alat untuk pembuatan histologi palatum janin mencit**

- a. Botol kecil dan tutup untuk fiksasi PFA dan jaringan palatum yang telah diambil.
- b. Kotak parafin, pinset, skalpel, jarum, seperangkat alat untuk dehidrasi-clearing, staining jaringan, mikrotom, holder, object glass, cover glass, bunsen, kertas

label, dan oven.

#### **4.5.3. Alat untuk pengamatan janin mencit dan jaringan palatumnya.**

- a. Mikroskop cahaya, mikrometer, dan hand couter
- b. Foto mikroskop

### **4.6. Prosedur Penelitian**

#### **4.6.1. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Biologi Reproduksi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) dan Laboratorium Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dalam dua tahap. Tahap pertama periode Januari 2006 sampai Juli 2006, sedangkan tahap kedua mulai Juli 2006 sampai Desember 2006. Datanya dinalisa mulai Januari 2007.

#### **4.6.2. Persyaratan Etik Penelitian**

Implikasi etik pada mencit (*Mus musculus*) betina sebagai hewan percobaan mengikuti aturan *animal ethic*. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain perawatan mencit dalam kandang, pemberian pakan, aliran udara ke dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, pengambilan unit analisis penelitian dan pemusnahannya. Menurut Soeparto (2002), etik penelitian pada hewan coba yaitu penggunaan hewan laboratorium hanya diizinkan bila perlu dan hanya dengan perlakuan yang baik.

#### 4.7. Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data Penelitian

##### 4.7.1. Persiapan

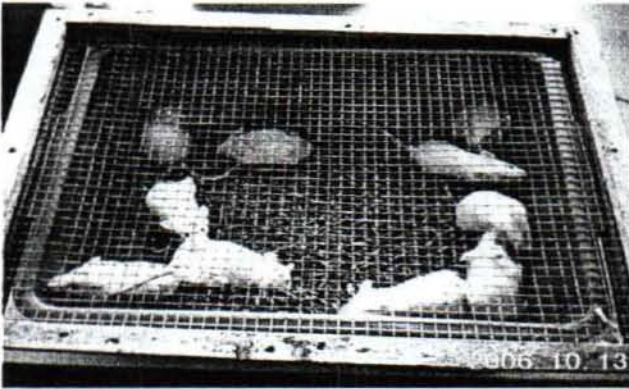
Mencit betina dara dan jantan yang diperoleh dari Pusat Veteriner Farma (PUSVETMA) Surabaya yang diaklimatisasi selama dua bulan sebelum digunakan sebagai hewan coba. Setiap pagi diberi makan berupa pelet Par L 511/521 dan diberi minum secara *ad libitum*. Mencit baru dikawinkan setelah berat badannya mencapai 20 gram atau lebih atau pada saat usia mencit mencapai 2-3 bulan maka ditempatkan dalam satu boks yaitu 2-3 mencit betina dengan 1 mencit jantan dengan harapan merangsang perkawinan.

##### 4.7.2. Proses Penimbangan dan Mengawinkan

Penimbangan mencit dilakukan pada pagi hari sebelum perlakuan pertama dilakukan yaitu dengan menggunakan timbangan neraca analitik merk **Ohaus**. Mencit yang telah mencapai berat badan minimal 20 gram ditempatkan dalam satu kandang dengan mencit jantan dengan perbandingan jumlah 1 berbanding 3, namun dipisahkan oleh sekat. Tujuan pemisahan ini adalah untuk menginduksi masa estrus betina. Setelah dilakukan pemisahan selama tiga hari, maka sekat dibuka untuk terjadinya proses perkawinan. Mencit dikatakan bunting usia 0 hari bila adanya sumbat vagina. Jika ternyata mencit dianggap bunting maka sebanyak 10-13 ekor mencit bunting ini dipisahkan dalam boks kontrol maupun perlakuan.



**Gambar 4.1.** Pengamatan masa estrus mencit betina dengan adanya sumbat vagina yang dianggap usia kebuntingan berusia 0 hari

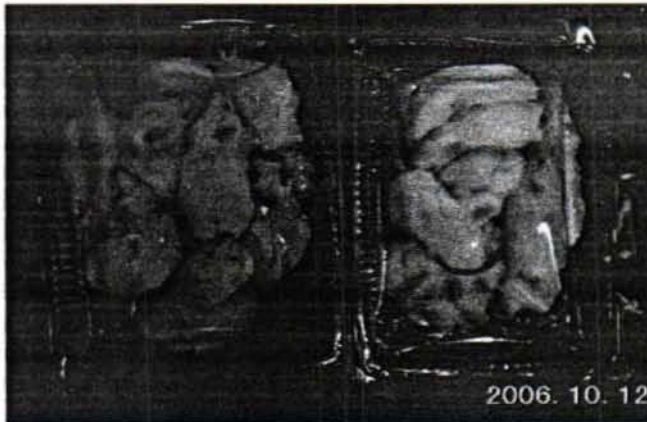


**Gambar 4.2.** Induk-induk mencit yang bunting ditempatkan di dalam boks yang disiapkan untuk perlakuan sesuai masan kebuntingannya (UK 14 dan 18 hari)

#### 4.7.3. Perlakuan dan Pengelompokan Hewan Percobaan

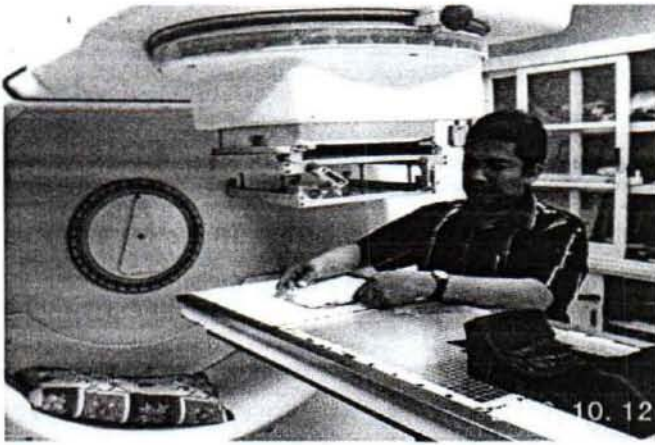
Mencit yang bunting di kumpulkan dalam berbagai boks untuk dilakukan radiasi sinar gamma  $Co^{60}$  di seluruh tubuhnya pada usia kebuntingan 13 hari dengan dosis radiasi sebesar 2 Gy. Dosis yang dikeluarkan oleh alat *teletherapy*  $Co^{60}$  sesuai dengan dikehendaki pada penelitian ini, disamping memenuhi berbagai kriteria berikut ini, yaitu :

- a. 8-10 ekor mencit dimasukkan ke dalam bak plastik transparan berukuran 25 x 25 cm, dengan ketebalan setebal tubuh mencit, hal ini untuk menghindari mencit bergerak bebas atau saling tumpang tindih yang nantinya akan mengurangi paparan radiasi yang tepat.
- b. Kedalaman dosis (depth dose) sebesar 2 cm.
- c. Laju penyinaran (exposure rate) adalah kira-kira 153,1641 cGy/m.
- d. Prosentase sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  yang diperoleh pada kedalaman dosis 3 cm adalah 94,500%. Data tersebut digunakan untuk menentukan dosis sesuai yang digunakan pada manusia.



**Gambar 4.3.** : Induk bunting di dalam bak plastik transparan disiapkan untuk iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  di Unit Radioterapi RSUD Dr.Sutomo Surabaya





**Gambar 4.4.** : Induk bunting sesuai dengan usia kebuntingan (UK 13) ditempatkan di dalam bak plastik transparan dalam persiapan iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dengan ketentuan jarak dan kedalaman dosis tertentu di Unit Radioterapi RSUD Dr.Sutomo Surabaya

Kelompok hewan percobaan dilakukan secara acak menjadi 6 kelompok percobaan, yaitu :

- a. Kelompok  $K0_1$  : Kelompok kontrol negatif pertama yang tidak dilakukan iradiasi maupun pemberian PSK, namun diamati kematian sel pada usia janin 14 hari.
- b. Kelompok  $K0_2$  : Kelompok kontrol negatif kedua yang tidak dilakukan iradiasi maupun pemberian PSK, namun diamati kelainan palatum pada usia janin 18 hari.
- c. Kelompok  $K_1$  : Kelompok kontrol positif pertama yaitu kelompok yang dilakukan iradiasi pada UK 13 hari tanpa pemberian PSK, namun diamati kematian sel pada usia janin 14 hari.
- d. Kelompok  $K_2$  : Kelompok kontrol positif kedua yaitu kelompok yang dilakukan iradiasi pada UK 13 tanpa pemberian PSK,

namun diamati kelainan palatum pada usia janin 18 hari.

- e. Kelompok KP<sub>1</sub> : Kelompok perlakuan pertama yaitu kelompok perlakuan yang dilakukan iradiasi pada UK 13 hari disertai pemberian PSK 1 jam setelah iradiasi, namun diamati kematian sei pada usia janin 14 hari.
- f. Kelompok KP<sub>2</sub> : Kelompok perlakuan kedua yaitu kelompok perlakuan yang dilakukan iradiasi pada UK 13 hari disertai pemberian PSK 1 jam setelah iradiasi, namun diamati kelainan palatum pada usia janin 18 hari.

Masing-masing kelompok terdiri dari 3-5 ekor induk mencit bunting yang berumur 3-4 bulan dengan berat badan rata-rata 25 – 30 gram yang diambil secara acak. Pemberian PSK pada kelompok perlakuan dilakukan 1 jam setelah induk mencit bunting tersebut diiradiasi dengan sinar gamma Co<sup>60</sup>. Pemberian dilakukan dengan cara sonde peroral menggunakan spuit 1 cc yang jarumnya dibuat bundar langsung ke dalam lambung mencit dengan dosis 200 mg/gr BB mencit, dan ditempatkan sesuai dengan kelompoknya untuk keperluan pengamatan.

#### 4.7.4. Pembiusan Hewan Percobaan

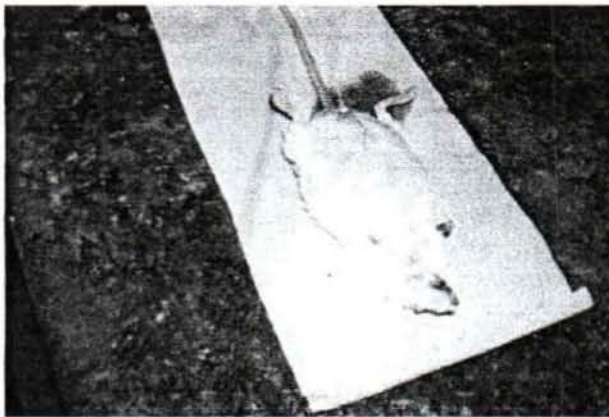
Pembiusan dilakukan pada seluruh hewan percobaan sebelum dilakukan tindakan pembedahan yaitu pada hewan coba yang dibutuhkan pengamatan jaringan palatum dan kelainan pembentukan palatum janin sebelum janin mencit lahir. Pengamatan ini terutama dilakukan pada seluruh kelompok hewan coba.

Pembiusan dilakukan dengan menggunakan chloroform kurang lebih 5 ml untuk setiap ekor, dituang ke kapas dan dimasukkan ke dalam stoples pembiusan

lalu ditutup dengan penutup plastik. Kurang lebih 1 menit mencit sudah tidak bernafas yang ditandai dengan mata meredup dan anggota badan tidak bergerak.

#### 4.7.5. Pembedahan Hewan Percobaan

Pada usia kebuntingan induk 14 hari dan 18 hari sesuai dengan keperluan pengamatan pada janin mencit, maka induk mencit dikorbankan melalui pembedahan yang dilakukan pada *linea mediana* atau garis tengah tubuh induk mencit setelah sebelumnya dipastikan bahwa mencit telah terbius dengan sempurna.



**Gambar 4.5.** : Persiapan pembedahan induk mencit pada usia kebuntingan 14 hari dan 18 hari (UK 14 dan 18).

#### 4.7.6. Pengamatan dan Pengambilan Janin Mencit

Mencit diletakkan di atas meja bedah dalam posisi anatomis dengan keempat anggota gerak difiksasi. Kemudian pada mencit dilakukan *sectio* pada *linea mediana* (garis tengah tubuh) dan dikuliti lapisan demi lapisan pada bagian perut untuk mencapai uterus mencit. Pada saat janin mencit sudah terlihat maka janin mencit tersebut dipisahkan secara hati-hati lalu dimasukkan ke dalam botol

kecil untuk diambil sayatan jaringan palatum dan pengamatan kelainan palatum secara makroskopis dengan menggunakan lup.

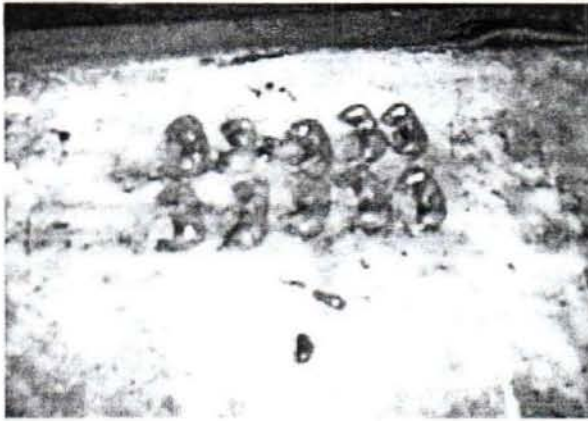


(A)

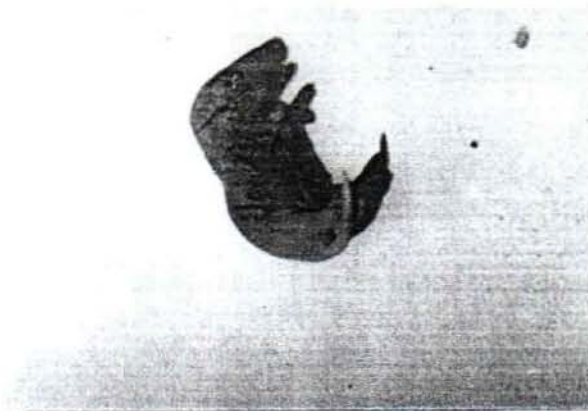


(B)

**Gambar 4.6. (A,B) :** Pembedahan induk mencit pada usia kebuntingan 14 hari dan 18 hari (UK 14 dan 18 hari) yang diambil janinnya untuk pengamatan histologis dan makroskopis.



**Gambar 4.7.** : Janin mencit usia 14 hari ( UK 14 hari) untuk keperluan pembuatan sediaan untuk mengamati kematian sel pada jaringan palatum.



**Gambar 4.8.** : Janin mencit usia 18 hari ( UK 18 hari) untuk keperluan pengamatan kelainan celah palatum

#### **4.7.7. Pembuatan Sediaan Histologis dan Pewarnaan**

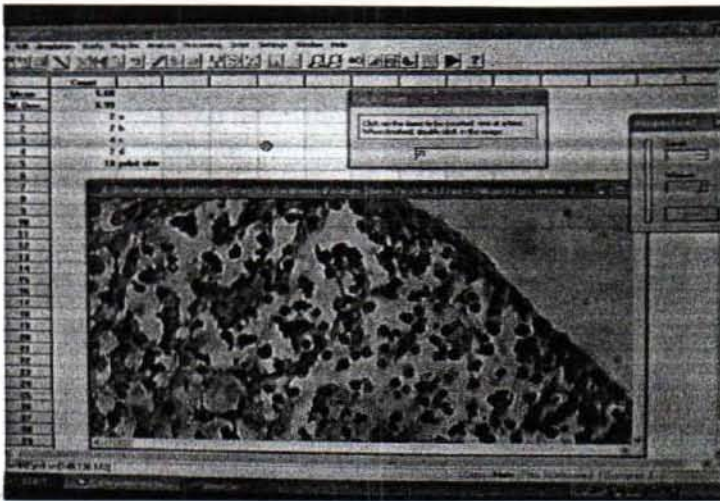
Setelah semua janin dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terkumpul, kemudian secara acak diambil satu janin dari masing-masing kelompok lalu difiksasi dengan larutan buffer formalin 10% sebanyak  $\pm 10$  cc, lalu dibuat sediaan histologis metode parafin dengan pewarnaan H-E untuk

mengamati jumlah kematian sel. Teknik pembuatan sediaan dicantumkan di dalam lampiran.

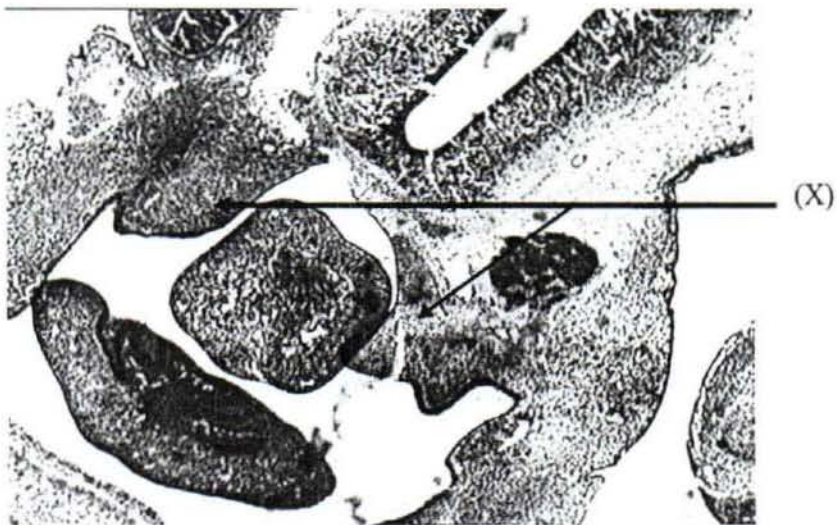
#### 4.7.8. Perhitungan jumlah kematian sel pada jaringan palatum janin mencit

Pengumpulan data terhadap kematian sel diperoleh dengan mengamati sayatan histologis janin mencit khususnya jaringan palatum. Selanjutnya masing-masing sediaan diamati di bawah mikroskop cahaya. Lokasi penghitungan ditentukan berdasarkan jumlah 100 sel perhitungan dalam 3-4 lapang pandang. Pengumpulan data dihitung jumlah sel yang mengalami kematian dalam 100 sel di jaringan palatum. Pengamatan dikhususkan pada struktur morfologis sel yang mengalami kematian di jaringan palatum janin mencit. Mikroskop cahaya digunakan dengan pembesaran 400 x. Data diambil sebanyak sebanyak 3 lapang pandang untuk setiap sampel, dan dari 3 lapang pandang ini, masing-masing dilakukan 3 kali replikasi.

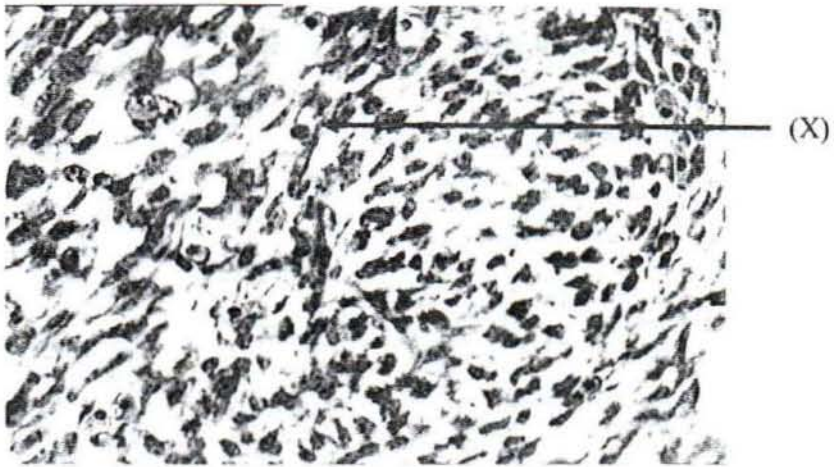
Perhitungan dilakukan pada foto yang diambil melalui kamera digital yang dipasang pada mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 x. Perhitungan jumlah sel menggunakan “count” pada program *image tool* dimana dapat menghitung langsung sel yang mati secara apoptosis hanya dengan mengklik perhitungannya. Setiap lapang pandang kita hitung seluruh sel sehingga mencapai 100 sel. Kemudian dipilih sel-sel yang mengalami kematian secara apoptosis untuk pengambilan data. Perhitungan diulangi sebanyak 3 x. Lalu lapang pandang digeser melalui mikroskop untuk mendapatkan perbandingan di sisi lapang pandang lain dan metode ini serupa dengan lapang pandang pertama



Gambar 4.9. : Perhitungan sel yang mengalami apoptosis menggunakan *count* melalui *soft ware image tool* pada satu lapang pandang terpilih.



Gambar 4.10. : Jaringan palatum janin mencit usia 13 hari (UK 13) melalui mikroskop pembesaran  $4 \times 10$  untuk mendapatkan lokasi pengamatan apoptosis dalam satu lapang pandang. (X) Lokasi tepi palatum (palatal shelve) tempat pengamatan.

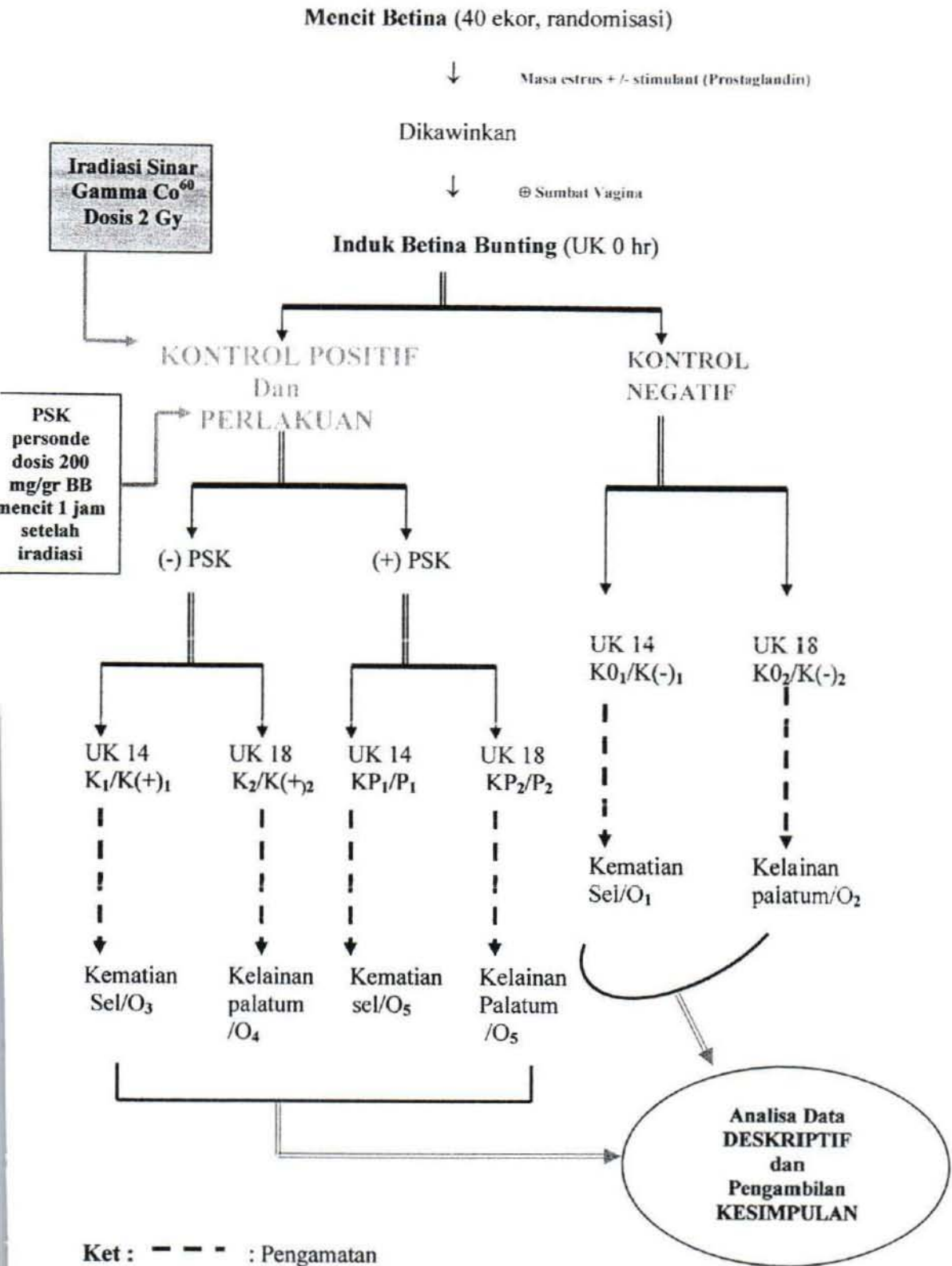


**Gambar 4.11.** : Perhitungan sel pada pembesaran 4 x 100 untuk mengamati mengalami apoptosis dalam satu lapang pandang. Sel mati yang bersifat apoptosis (X)

#### 4.8. Analisa Data

Data hasil penelitian ditabulasi dan dianalisis dengan : (1) Statistik deskriptif untuk mengetahui gambaran karakteristik variabel, (2) Uji normalitas distribusi untuk mengetahui apakah data yang diperoleh berasal dari populasi yang normal, (3) Uji t dua sampel independent untuk melihat ada tidaknya pengaruh perlakuan awal pada sampel, (4) Uji homogenitas untuk mengetahui kondisi sebelum perlakuan sama untuk seluruh kelompok, (5) Uji Annova untuk menganalisa perbedaan setiap variabel.





Gambar 4.12. : Skema Alur Kerja Penelitian

**BAB 5****ANALISA HASIL PENELITIAN**

Data yang didapat dari hasil penelitian adalah hanya variabel tergantung yaitu jumlah sel jaringan palatum janin mencit yang mati (satuan/100 sel), dan jumlah pembentukan ceiah palatum janin yang terjadi (jumlah sel perinduk). Berdasarkan data tersebut dilakukan uji normalitas distribusi, uji homogenitas, analisis deskriptif, analisis varian, dan uji t dua sampel independen dengan taraf signifikansi sebesar 5 %.

Pengamatan terhadap kematian sel dilakukan secara mikroskopik pada seluruh kelompok, baik kelompok kontrol negatif yaitu kelompok yang tidak diberi apapun tetapi dilakukan pengamatan pada usia tertentu yaitu usia kebuntingan induk 14 hari. Juga kelompok kontrol positif yang hanya dilakukan radiasi  $Co^{60}$  dosis 2 Gy pada usia kebuntingan 13 hari namun dilakukan pengamatan pada hari yang sama dengan kontrol negatif. Serta kelompok perlakuan yang dilakukan radiasi pada usia kebuntingan yang sama namun ditambahkan pemberian PSK dosis 200 mg/gr BB induk mencit satu jam setelah iradiasi.

Hasil pengamatan kematian sel pada seluruh kelompok dapat dilihat pada tabel 5.1. berikut ini :

**Tabel 5.1.** Hasil pengamatan kematian sel pada seluruh kelompok percobaan

No.	Perlakuan	Pengamatan kematian sel (satuan/100 sel LPB)								
		Induk A			Induk B			Induk C		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III
1.	K (-) 1	0	0	0	-	-	-	-	-	-
2.	K (-) 2	0	0	0	-	-	-	-	-	-
3.	K (+) 1	13	26	22	16	18	15	12	17	19
4.	P 1	3	1	2	0	4	1	13	11	7

**Keterangan :**

K (-) 1 : Kontrol negatif 1, janin mencit dari induk UK 11 hari, tanpa iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dan PSK

K (-) 2 : Kontrol negatif 2, janin mencit dari induk UK 13 hari, tanpa iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dan PSK

K (+) 1: Kontrol positif 1, janin mencit dari induk UK 13 hari, dilakukan iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dosis 2 Gy tanpa pemberian PSK

P 1 : Perlakuan 1, janin dari induk UK 13 hari yang diiradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dosis 2 Gy disertai pemberian PSK dosis 200 mg/gr BB

Pada tabel di atas terlihat bahwa pada kelompok kontrol positif satu/K (+) 1 yaitu janin mencit yang diambil dari induk yang diiradiasi dengan  $Co^{60}$  dosis 2 Gy dengan usia kebuntingan 13 hari ternyata menunjukkan hasil yang nyata bila dibandingkan dengan kontrol negatif dalam hal dampak kematian sel yang ditimbulkan. Demikian juga perbandingan antara hasil yang terlihat pada kelompok perlakuan 1 yaitu kelompok iradiasi disertai pemberian PSK 1 jam

setelahnya ternyata mengalami penurunan jumlah kematian sel jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif satu/K (+) 1.

## 5.1. Hasil Analisis Deskriptif

### 5.1.1. Hasil analisis deskriptif kematian sel pada masing-masing kelompok

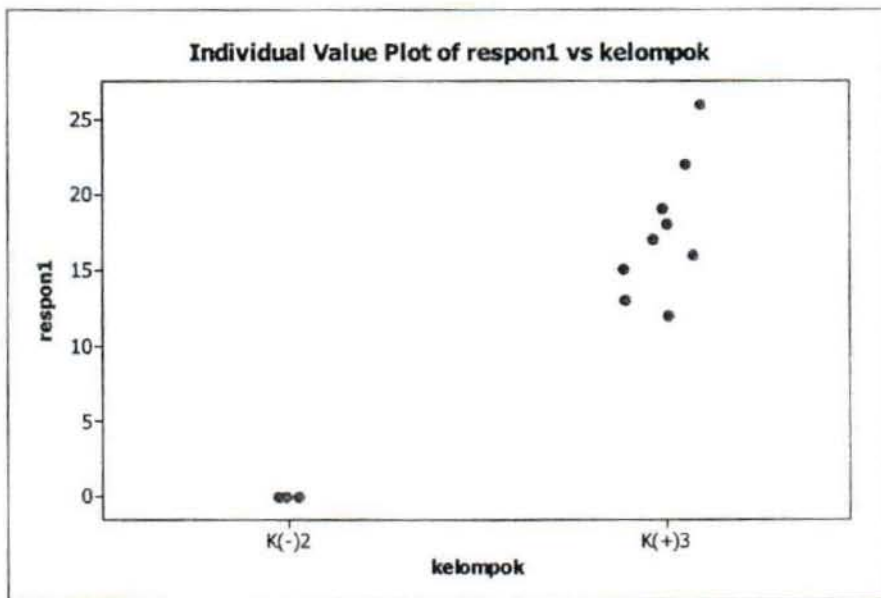
Hasil analisis deskriptif variabel tergantung yang berhubungan dengan kematian sel dapat dilihat pada tabel 5.2. sedangkan hasil analisis selengkapnya tercantum pada lampiran 14.

**Tabel 5.2.** Nilai rerata dan SD kematian sel pada seluruh kelompok percobaan

Kelompok	Variabel
	Persen kematian sel pada jaringan palatum janin mencit (satuan/100 sel LPBq)
Kontrol negatif-1 /K (-)1	0,00 ± 0,00
Kontrol positif-1 /K (+)1 (radiasi UK 13)	17,56 ± 4,39
Perlakuan-1 /P3 (radiasi + PSK UK 13)	4,67 ± 4,66

Statistik deskriptif dari prosentase banyaknya sel yang mati untuk kedua kelompok, yaitu K(-)1 dan K(+1) dapat dilihat pada lampiran 16. Dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa pada kelompok K(-)1, dari tiga pengamatan yang dilakukan tidak ditemukan adanya sel yang mati. Sedangkan untuk kelompok K(+1) dari 100 sel pada tiga lapang pandang berbeda yang diamati diperoleh rata-rata 17,57 persen sel mati dengan deviasi standart sebesar 4,39. Untuk mengetahui apakah iradiasi sinar gamma dapat meningkatkan jumlah kematian sel pada jaringan calon palatum janin mencit pada usia kebuntingan induk 13 hari, dilakukan pengujian hipotesis dengan uji t untuk dua sampel independen pada

Lampiran 18. Sebelum diuji dengan menggunakan uji t, diuji terlebih dahulu apakah keduanya mempunyai varians yang sama. Dari Levene's test (Lampiran 18) diperoleh nilai F sebesar 4,245 dengan nilai-p (sign.) sebesar 0,066, sehingga dapat disimpulkan bahwa keduanya mempunyai varians yang sama. Dari uji t (dengan asumsi kedua variansnya sama) diperoleh nilai-t sebesar 6,706 dengan nilai-p sebesar 0,000, sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat **perbedaan yang nyata** dalam rata-rata persentase jumlah kematian sel untuk kedua kelompok. Perbedaan ini tampak lebih jelas dengan melihat plot masing-masing data pengamatan untuk setiap kelompok pada gambar 5.1.



**Gambar 5.1.** : Individual plot data 1 (nilai rerata kematian sel pada seluruh kelompok percobaan)

Pada gambar 5.1. terlihat jelas bahwa jumlah kematian sel yang bersifat apoptosis ini secara signifikan meningkat pada sel-sel dari jaringan palatum yang diiradiasi dengan  $Co^{60}$  jika dibandingkan dengan jaringan tanpa iradiasi

### 5.1.2. Hasil uji normalitas kematian sel pada masing-masing kelompok

**Tabel 5.3.** Hasil uji normalitas kematian sel pada seluruh kelompok percobaan

Kelompok	Nilai Probabilitas Kolmogorov-Smirnov
	Persentase kematian sel pada jaringan palatum janin mencit
Kontrol negatif-1 /K (-)1	0
Kontrol positif-1 /K (+)1 (radiasi UK 13)	0,447
Perlakuan-3 /P3 (radiasi + PSK UK 13)	0,671

Hasil uji normalitas pada tiga kelompok kontrol menunjukkan harga  $p > 0,05$  yang menunjukkan bahwa distribusi ketiganya adalah normal. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 17.

### 5.1.3. Uji t dua sampel independent data kelompok kontrol pada UK 13

Dari hasil uji t diperoleh individual value plot data seperti yang digambarkan oleh gambar 5.1. Data ini dihasilkan dari hubungan antara data kelompok kontrol negatif satu / K (-)1 dan kelompok kontrol positif satu / K (+)1. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 19.

### 5.1.4. Hasil analisis deskriptif kematian sel data respon perlakuan terhadap kelompok kontrol pada UK 13 hari

Statistik deskriptif dari data diberikan pada tabel 5.4, yang mencantumkan rerata, deviasi standart, serta jumlah pengamatan untuk masing masing kelompok. Data ini dihasilkan dari respon Kelompok perlakuan perlakuan tiga/ P3 terhadap kelompok kontrol positif satu / K (+)1. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 20.

**Tabel 5.4.** Statistik deskriptif respon kematian sel kelompok perlakuan terhadap kontrol

Kelompok	Rerata	Std.Deviasi	Pengamatan
K(-)1	0	0	3
K(+)1	17,56	4,39	9
P1	4,67	4,66	9
Total	9.52	8.35	21

#### 5.1.5. Hasil Uji Homogenitas kematian sel data respon perlakuan terhadap kelompok kontrol pada UK 13 hari

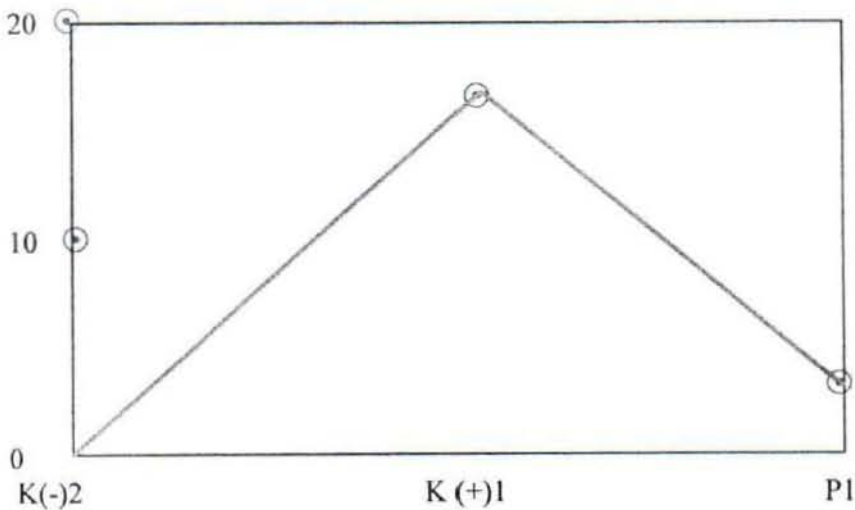
Untuk menguji apakah ketiga kelompok data pada tabel 5.4. mempunyai rata-rata persentase jumlah kematian sel yang sama, akan diuji dengan menggunakan analisis varians (anova) satu arah. Analisis ini menggunakan asumsi bahwa residualnya berdistribusi identik (variannya harus homogen), independent dan menyebar normal. Sehingga sebelum diuji dengan menggunakan anova, yang harus dilakukan terlebih dahulu adalah menguji apakah asumsi yang mendasarinya dipenuhi dulu.

Asumsi homogenitas varians diuji dengan menggunakan uji Levene. Seperti yang ditunjukkan pada lampiran 21. Dari uji ini diperoleh nilai-p sebesar 0,081, yang lebih besar dari taraf nyata yang digunakan (dalam hal ini sebesar 5%). Sehingga diputuskan bahwa masing-masing kelompok mempunyai varians yang homogen. Untuk menguji asumsi normalitas terhadap residual yang diperoleh dari analisis varians, diperoleh hasil seperti pada lampiran 22. Dari

nilai-p sebesar 0,574, diputuskan bahwa  $H_0$  (residual mempunyai distribusi normal) diterima.

#### 5.1.6. Hasil Analisis ANNOVA kematian sel data respon perlakuan terhadap kelompok kontrol pada UK 13 hari

Dari tabel analisis varians pada lampiran 23, terlihat bahwa ketiga kelompok mempunyai rata-rata persentase kematian jumlah sel yang berbeda, dengan  $F= 29,203$  dan nilai-p sebesar 0,000. Plot masing-masing pengamatan untuk setiap kelompok bisa dilihat pada gambar 5.2.

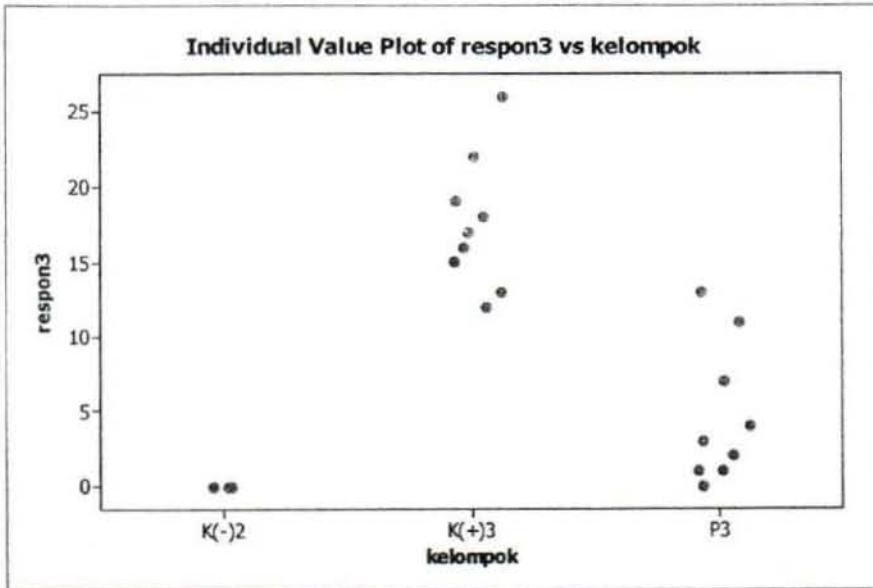


**Gambar 5.2.** Mean plot data respon kematian sel kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol

Pada hasil pengamatan terlihat bahwa radiasi yang dilakukan pada usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13) juga memberi gambaran adanya kematian sel yang bersifat apoptosis jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Gambar 5.3. menunjukkan kemampuan PSK dalam menurunkan jumlah kematian sel dan menekan jumlah apoptosis yang terjadi akibat iradiasi gamma  $Co^{60}$ . Pada



penelitian ini, PSK menekan jumlah kematian sel atau apoptosis 1 jam setelah iradiasi (kelompok perlakuan 1) terbukti secara signifikan menekan jumlah apoptosis yang sebelumnya terjadi pada kelompok kontrol positif i/K (+)1 seperti yang terlihat pada gambar 6.3.



**Gambar 5.3.** Individual plot data 5.4 (respon kematian sel kelompok perlakuan terhadap kontrol)

Untuk mengetahui kelompok mana yang secara statistik berbeda rata-ratanya, dilakukan uji lanjutan dengan menggunakan uji LSD (Least Significant Difference) yang bisa dilihat pada lampiran 23. Dari uji LSD, terlihat bahwa secara statistik yang mempunyai rata-rata berbeda adalah kelompok K(-)2 dengan K(+1), serta K(+1) dengan P1, dengan nilai-p untuk keduanya masing-masing sebesar 0,000. Sedangkan yang secara statistik mempunyai rata-rata sama adalah P1 dengan K(-)2 dengan nilai p sebesar 0,119. Jadi terlihat jelas perbedaan

pengaruh iradiasi terhadap kontrol negatif dan terjadi penurunan sei-sei yang mati secara signifikan pada kelompok perlakuan.

### 5.1.7. Hasil analisis deskriptif pembentukan celah palatum pada masing-masing kelompok

Pengamatan terhadap pembentukan celah pada janin dilakukan secara langsung dengan menggunakan *lup* yang sebelumnya dilakukan pembedahan melalui bidang transversal pada masing-masing *anguli oris* atau sudut mulut. seluruh kelompok, baik kelompok kontrol negatif yaitu kelompok yang tidak diberi apapun maupun kelompok kontrol positif dimana dilakukan iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dosis 2 Gy pada usia kebuntingan 13 hari dan kelompok perlakuan yang dilakukan radiasi pada usia kebuntingan yang sama dengan kontrol positif namun ditambahkan pemberian PSK dosis 200 mg/gr BB induk mencit. Seluruhnya dilakukan pengamatan pada hari yang sama yaitu usia 18 kebuntingan induk.

**Tabel 5.5.** Hasil pengamatan pembentukan celah palatum pada seluruh kelompok percobaan

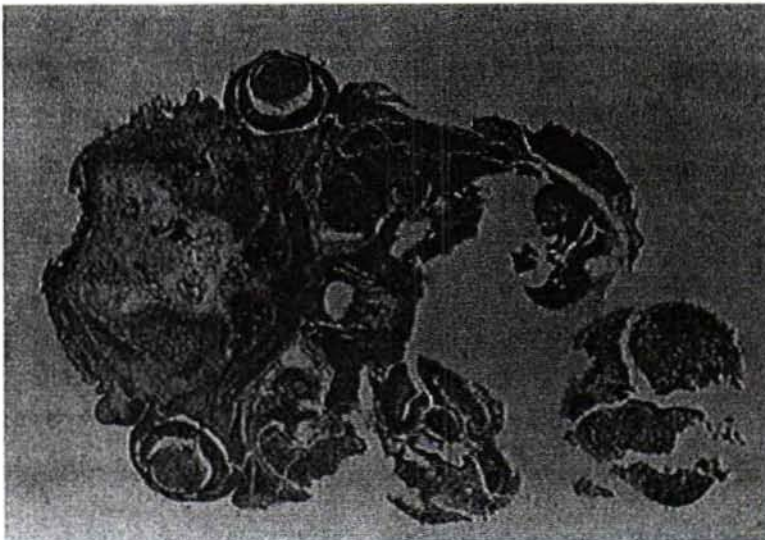
No.	Perlakuan	Persen pengamatan pembentukan celah palatum (satuan/jlh janin)		
		Induk A	Induk B	Induk C
1.	K (-) 2	0 / 7	0 / 9	0 / 7
2.	K (+) 2	0 / 8	0 / 9	0 / 8
3.	P 2	0 / 9	0 / 10	0 / 8

**Keterangan :**

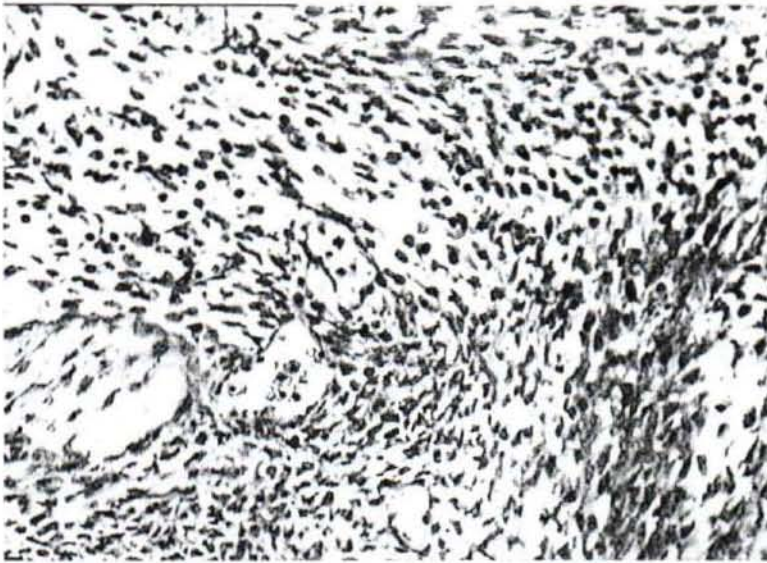
K (-) 2 : Kontrol negatif 2, janin mencit tanpa iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dan PSK dan diamati pada usia kebuntingan 18 hari.

- K (+) 2: Kontrol positif 2, janin mencit dari induk UK 13 hari, dilakukan iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dengan dosis 2 Gy tanpa pemberian PSK dan diamati pada usia kebuntingan 18 hari
- P 2 : Perlakuan 2, Janin dari induk UK 13 hari yang diiradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dengan dosis 2 Gy disertai pemberian PSK dosis 200 mg/gr BB serta diamati pada usia kebuntingan 18 hari

Dari data tersebut diperoleh hubungan antara kelompok perlakuan dua / P2 dengan kelompok kontrol positif dua / K(+), yaitu melihat hubungan antara PSK yang berkemampuan untuk mencegah pembentukan celah palatum (palatoschizis) pada janin mencit (*Mus musculus*) akibat iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  pada usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13). Hasilnya seperti yang terlihat pada tabel 5.5. dimana dari seluruh pengamatan tidak ditemukan kelainan yang berupa pembentukan celah akibat iradiasi  $Co^{60}$ .

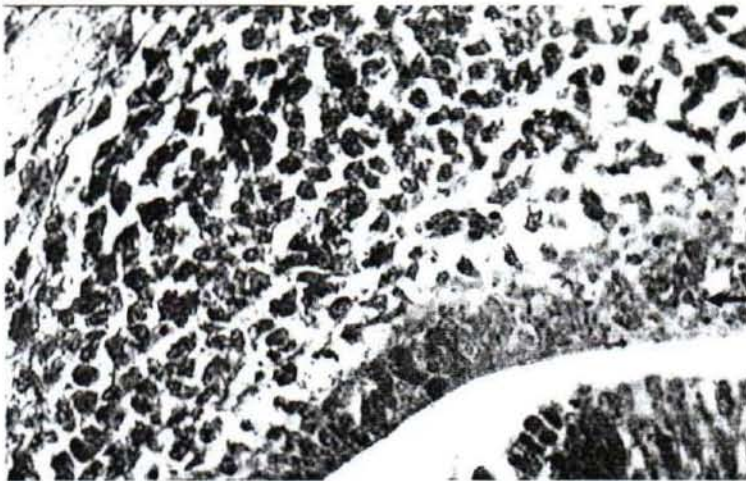


(A)



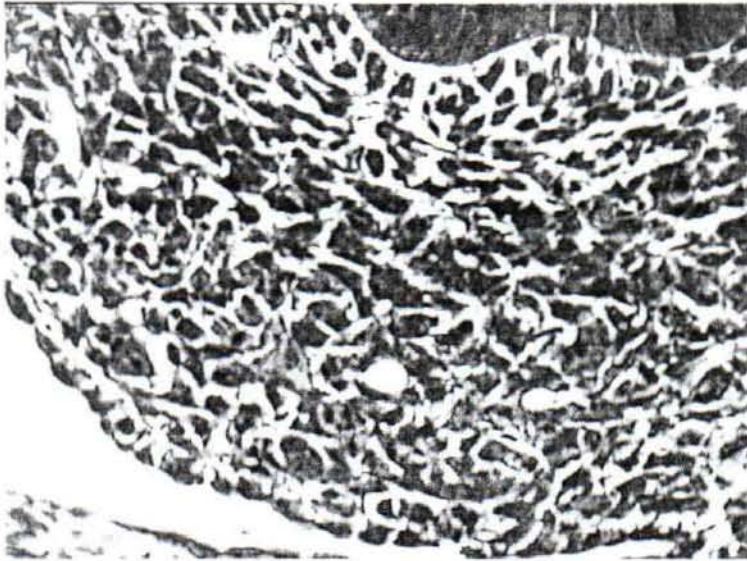
(B)

**Gambar 5.4.** Gambaran histologis jaringan palatum janin mencit pada usia 14 hari/Kontrol negatif 1/K(-)1 pada pembesaran 10 x 4 (A). Pembesaran 10 x 20 (B)



(X)

**Gambar 5.5.** Gambaran histologis jaringan palatum janin mencit pada usia 14 hari pada pembesaran 10 x 40 yang mengalami kematian sel akibat paparan radiasi dosis 2 Gy / Kontrol positif 1/K (+)1. (X) Sel yang mengalami kematian berjenis apoptosis.



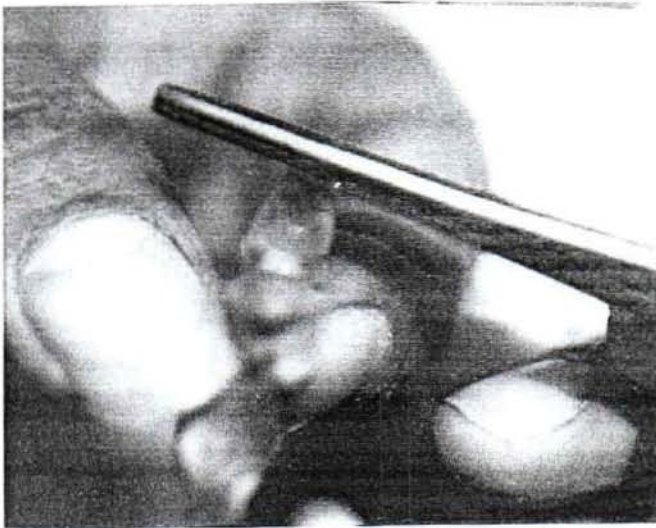
**Gambar 5.6.** Gambaran histologis jaringan palatum janin mencit pada usia 14 hari pada pembesaran 10 x 40 yang diberi paparan radiasi dosis 2 Gy disertai pemberian PSK dosis 200 mg/gr BB induk mencit / **Perlakuan 1 (P1)**



**Gambar 5.7.** Gambaran makroskopis regio palatum janin mencit pada usia 14 hari / **Kontrol negatif 2/K(-)2**



**Gambar 5.8.** Gambaran makroskopis regio palatum janin mencit pada usia hari yang diberi paparan radiasi dosis 2 Gy / **Kontrol positif 2 / K(+)**2



**Gambar 5.9.** Gambaran makroskopis regio palatum janin mencit pada usia 14 hari yang diberi paparan radiasi dosis 2 Gy disertai pemberian PSK dosis 200 mg/gr BB induk mencit/**Perlakuan 2 (P4)**

**BAB 6****PEMBAHASAN**

Pembentukan palatum sekunder pada janin mamalia melibatkan suatu rangkaian peristiwa perkembangan yang biasa terjadi. Tepi palatum bilateral yang saling berhadapan naik searah horizontal, tumbuh ke arah medial kemudian masing-masing tepi menyatu pada garis tengah. Pada saat kedua tepi tersebut saling melekat satu sama lain, epitel pada tepi medial tersebut membentuk lapisan epitel garis tengah lalu menipis dan menghilang untuk menyatu dengan jaringan mesenkhim palatum. Disebutkan bahwa kematian sel yang terjadi di sel-sel epitel medial terutama pada proses pertemuan dan penyatuan tepi palatum, dimana bila proses kematian sel ini tidak terjadi dapat menyebabkan terbentuknya celah palatum yang merupakan kelainan perkembangan paling sering terjadi pada manusia (Takahara *et al.*, 2004).

Meskipun demikian, terdapat selisih pendapat yang menyatakan apakah proses kematian sel pada sel-sel tepi medial sebelum atau sesudah pertemuan kedua tepi palatum. Perubahan sitologi menunjukkan adanya proses kematian sel seperti perubahan ultrastruktur organel sel, sintesa DNA yang terhenti dan peningkatan level lisosom terlihat terutama pada sel-sel epitel tepi medial pada saat penyatuan kedua tepi medial palatum (Shapiro and Sweney, 1969; Smiley, 1970; Hudson and Shapiro, 1973; Greene and Pratt, 1976). Di sisi lain, dengan menggunakan metode pelabelan fragmentasi DNA, diketahui adanya kematian sel yang bersifat apoptosis pada proses penipisan lapisan epitel medial palatum yaitu pada stadium akhir fase penyatuan tepi palatum, namun tidak ditemukan pada stadium awal palatogenesis (Mori *et al.*, 1994).

*Programmed cell death* (Apoptosis) atau dikenal dengan apoptosis memainkan peranan yang penting dalam proses embriogenesis dan dapat juga dirangsang dengan beragam kondisi seperti penghambatan *growth factor*, agen kimia, hipertermia, dan eksposisi sinar ultraviolet serta radiasi ionisasi. (Perez, *et al*, 2000).

Disamping kerusakan-kerusakan jaringan parenchymal maka radiasi dosis rendah atau ionisasi dapat memberi dampak pada jaringan embrional maupun jaringan gonad. Pengaruh radiasi dosis rendah terhadap suatu kehamilan pada mamalia atau ibu dapat dihubungkan dengan masalah efek radiasi ionisasi dalam embrio atau efek teratogenik dari radiasi tersebut. Embrio juga diketahui merupakan jaringan yang peka sekali terhadap radiasi terutama pada fase-fase awal diferensiasi, dimana pada fase-fase tersebut embrio mengalami proses pembelahan sel yang sangat cepat diiringi proses sintesis protein (Amsyari, 1989).

Semua dosis radiasi bisa berpengaruh terhadap jaringan tubuh atau sel. Pengaruh dosis hanya diasosiasikan dengan besarnya kemungkinan bahwa akan terjadi suatu perubahan di dalam suatu sel atau jaringan yang terkena radiasi tersebut. Efek stokastik biasanya menyebabkan suatu kelainan organ yang bersifat kronis dan umumnya berhubungan dengan adanya perubahan genetika di dalam sel tersebut (Amsyari, 1989).



### 6.1. Iradiasi sinar gamma $Co^{60}$ dapat menyebabkan meningkatnya jumlah kematian sel pada jaringan palatum janin mencit pada usia kebuntingan induk 13 hari.

Sebagaimana diketahui bahwa radiasi berpotensi menimbulkan efek yang tidak menguntungkan bagi sel, terutama DNA (Ferrer, *et al*, 1993). Kerusakan pada DNA lebih sering muncul pada fase pembelahan sel bila dibandingkan pada fase inaktif (Green, *et al*, 1997; Takeuchi, *et al*, 1986; Nakashima K, *et al*, 1991).

Apoptosis terutama terjadi berkaitan dengan jumlah DNA yang mengalami fragmentasi, serta cepat dan efektifnya mekanisme perbaikan DNA (Fritsch *et al*, 1994).

Kondisi ini menunjukkan bahwa radiasi sinar gamma atau pengion dapat menimbulkan kematian sel. Apoptosis atau *programmed cell death* adalah gambaran yang jelas terjadi pada perkembangan sistem saraf. Apoptosis akibat radiasi sinar gamma itu sendiri merupakan proses biologi yang diikuti adanya proses perubahan sel, berupa rangkaian perubahan secara morfologi yaitu : kondensasi kromatin, membran bergelembung, fragmentasi sel menjadi beberapa potongan kecil atau bahan apoptotik. Lebih dari itu peristiwa apoptosis merupakan kematian sel terprogram pada masa embrionik sehingga menjadi faktor penting yang mampu menyeleksi apakah sel tersebut pantas atau mampu berdiferensiasi secara lengkap pada masa post natal (Darmanto, 2005).

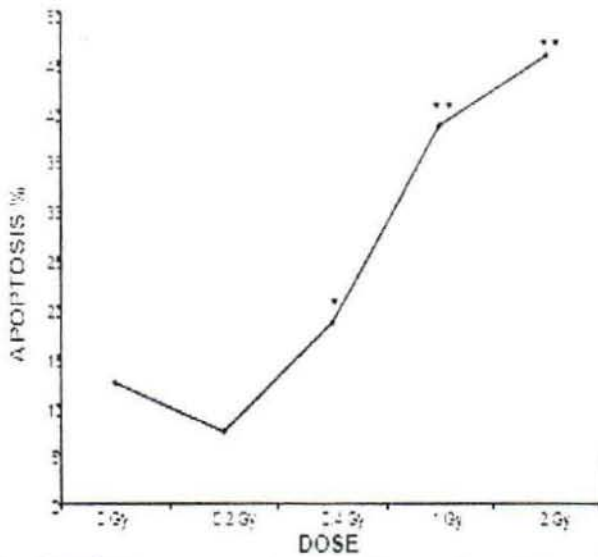
Sejumlah penelitian telah dilakukan tentang adanya hubungan radiasi ionisasi dengan dosis yang bervariasi terhadap kerusakan DNA sel-sel mamalia. Hubungan antara jumlah mitosis kematian sel, induksi lesi pada DNA dan aberasi khromosom yang merangsang terbentuknya kematian sel yang mungkin

dihasilkan oleh kegagalan sel untuk memperbaiki kerusakan DNA secara sempurna (Lampiran-14). Apoptosis merupakan suatu jenis kematian sel setelah paparan radiasi, jenis ini pula yang paling sering muncul tereksresi pada jaringan embrional dan haematopoesis, secara signifikan juga menginduksi level terendah dari jenis sel epitel. Radiasi dapat menginduksi apoptosis yang pada mulanya dianggap tidak terkait dengan pembelahan, dan oleh sebab itu dianggap sebagai suatu bentuk manifestasi kematian sel pada fase interfase (Goodhead, 1993; Ross, 1999).

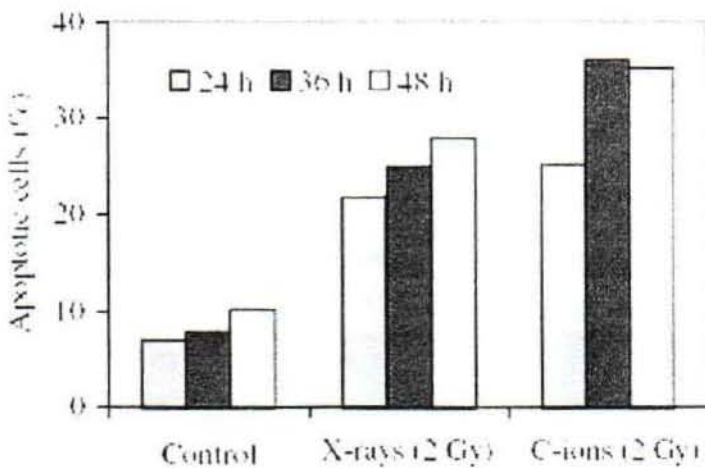
Mekanisme yang jelas tentang kematian sel yang disebabkan oleh radiasi masih sedang diteliti. Adanya suatu bukti pecahnya bagian dari DNA merupakan dampak yang paling penting dari radiasi. Perpecahan ini memicu kehilangan kemampuan pembelahan secara menyeluruh dari sel, sehingga sel dapat dikatakan mati. Radiasi juga mempengaruhi siklus sel terutama terhadap pertumbuhan sel, pepadatan sel, dan apoptosis (Schreiber, 2005)

Apoptosis merupakan tahap yang penting pada fase perkembangan embrio, pengendalian homeostasis pada jaringan yang normal, karsinogenesis, perkembangan tumor, dan pengobatan kanker. Apoptosis memiliki dua jalur pengaturan yang mendasar yang meliputi : (1) Instrinsik, yaitu kematian membran mitokhondria akibat trauma dan hambatan jalur perbaikan akibat kerusakan DNA, (2) Ekstrinsik, yaitu kematian jalur reseptor membran plasma. Proses ini ditandai oleh gambaran yang nyata dari pengeimbungan membran, kondensasi khromatin, dan fragmentasi DNA. Proses ini dapat terinduksi pada beragam jenis sel oleh akibat paparan panas seperti ultraviolet, radiasi ionisasi, and hiperthermia (Ling *et al*, 1995; Panduri *et al*, 2003).

Jika dibandingkan dengan jaringan tanpa iradiasi. Sanjurjo dan Perez (2000) serta Lee (2007) telah membuktikan hubungan antara dosis radiasi dengan insiden apoptosis. Mereka menyimpulkan bahwa makin tinggi dosis paparan radiasi terhadap suatu jaringan, makin tinggi pula prosentasi apoptosis yang timbul (Gambar 6.1. dan 6.2).



**Gambar 6.1.** Gambaran prosentase kultur sel embrional yang mengalami apoptosis vs dosis radiasi sinar-X(Gy) (Perez , 2000)



**Gambar 6.2.** Gambaran prosentase kultur sel embrional yang mengalami apoptosis pada ragam radiasi sinar-X dan dosis paparan radiasi (Lee, 2007)

Disebutkan bahwa palatum definitif (palatum sekunder) berkembang pada embrio manusia yang berusia antara 6 - 8 minggu kehidupan *intra-uterine* (Johnston and Sulik, 1990). Sedangkan menurut Rugh (1968) perkembangan palatum pada tikus dan mencit sempurna pembentukannya pada usia embrio 11-13 hari. Penyatuan palatum ini melibatkan perubahan dan transformasi sel pada epitel medial palatum (Takahara *et al*, 2004).

Hipotesis lama tentang apoptosis yang berperan penting dalam peristiwa penyatuan palatum telah bergeser. Hay dkk, (.) memperlihatkan adanya degenerasi sel pada penyatuan palatum yang sebenarnya merupakan sel peridermal yang terjebak di lapisan epitel medial palatum tetapi sel ini bukan sel epitel basal pada medial palatum dan sel pada epitel medial tidak pernah mati tetapi migrasi ke dalam jaringan mesenkhim palatum lalu bertransformasi menjadi sel mesenkhim ((Fitchett and Hay, 1989; Griffith and Hay, 1992). Carette and Ferguson (1992) telah menunjukkan bahawa sel epitel pada medial palatal bermigrasi di bagian nasal dan oral untuk bergabung masing-masing menjadi epitel oralis dan nasalis, tetapi tidak pernah ditemukan bukti adanya kematian sel dan transformasi epitel. Meskipun demikian, Cuervo dkk (2002) mendapati sejumlah besar sel yang mati di sepanjang medial penyatuan palatum, yang berbeda dengan hanya sejumlah kecil sel yang mengalami transformasi menjadi jaringan mesenkhim. Namun, Fitchett dan Hay (1989) serta Carette dan Ferguson (1992) tidak berhasil dalam mengidentifikasi kematian sel pada penyatuan palatum yang mestinya terdapat pada lapisan epitel medial setelah penyatuan tersebut dalam sejumlah stadium (Mori *et al.*, 1994; Cuervo *et al.*, 2002). Jadi, keberadaan apoptosis dalam proses perkembangan palatum hingga kini masih

dalam perdebatan dan dapat dijelaskan bahwa ada atau tidaknya kematian sel tetap sesuai dengan proses penyatuan palatum (Takahara *et al*, 2004).

Apoptosis merupakan suatu bentuk respon fisiologis dari beragam jenis sel setelah perlakuan pengobatan dengan zat kimia atau radiasi. (Lee *et al*, 2007).

Radiasi melepaskan sejumlah radikal bebas yang merupakan molekul yang tidak stabil yang dapat merusak sel dan DNA. Molekul tersebut mengandung elektron tidak berpasangan yang sangat reaktif dan dapat menyebabkan kerusakan yang bersifat oksidatif. Antioksidan merupakan molekul yang dapat menetralkan radikal bebas melalui mekanisme serah terima "accept-donate" satu elektron untuk menutupi kondisi elektron yang tidak berpasangan (Best, 2007).

## **6.2. PSK dapat menurunkan jumlah kematian sel pada jaringan palatum janin mencit (*Mus musculus*) yang diiradiasi dengan sinar gamma $Co^{60}$ usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13)**

Darmanto dkk (2005) telah melakukan penelitian yang membuktikan bahwa PSK memiliki kemampuan antioksidan dan mampu menekan efek radiasi sinar-X dan mengubah mitosis dan atau apoptosis pada 6 dan 12 jam setelah radiasi. PSK mampu mempercepat perbaikan kerusakan jaringan setelah 72 jam radiasi yang telah diteliti sebelumnya oleh Matsui dkk (1995). Pada temuan yang lain perbaikan efek PSK pada level sel telah terlihat setelah 24 jam radiasi (Kagohashi *et al*, 2002).

Sebagaimana diketahui bahwa radiasi atau agen kimia dapat menimbulkan reaksi oksidatif dari unsur radikal bebas yang dihasilkannya. PSK menginduksi

sejumlah enzim yang dapat mengikat radikal bebas dan menghambat kerusakan akibat reaksi oksidatif (Chu *et al*, 2002).

Dari hasil pengamatan diperoleh informasi bahwa radiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  dengan dosis 2 Gy yang diberikan pada usia kebuntingan induk 13 hari tidak mampu menginduksi kelainan pembentukan celah pada palatum atau palatoschizis, sehingga potensi PSK dalam mencegah munculnya kelainan palatosisis tidak bisa dianalisis.

## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1. Kesimpulan

1. Iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  dapat menyebabkan meningkatnya jumlah kematian sel pada jaringan calon palatum (palatum primer) janin mencit pada usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13).
2. PSK dapat menurunkan jumlah kematian sel pada jaringan calon palatum (palatum primer) janin mencit yang diiradiasi dengan sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13).
3. Iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  tidak mampu menginduksi pembentukan celah pada jaringan palatum janin mencit (*Mus musculus*) dengan usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13).
4. Kemampuan PSK dalam menghambat pembentukan celah pada palatum janin mencit (*Mus musculus*) yang mendapatkan iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  pada usia kebuntingan induk 13 hari (UK 13) tidak dapat dianalisis karena iradiasi sinar gamma pada usia tersebut tidak mampu menginduksi palatoschisis.

#### 7.2. Saran

1. Perlu penentuan usia kebuntingan yang lebih awal bagi perlakuan efek radiasi agar mampu menginduksi pembentukan celah (palatoschisis) pada palatum janin mencit.
2. Perlu adanya kajian lebih lanjut tentang pengaruh variasi dosis radiasi  $\text{Co}^{60}$  terhadap kemungkinan kelainan bawaan pada janin mencit khususnya pembentukan celah pada palatum (palatoschisis).

3. Perlu adanya kajian lebih lanjut tentang pengaruh zat-zat antioksidan lain selain PSK yang bersifat natural sebagai pemanfaatan sumber daya alami bagi kemajuan penelitian kesehatan yang berorientasikan kesehatan lingkungan.



## DAFTAR PUSTAKA

- Aiberts and Lodish, 2005. Principles of Molecular & Cell Biology. New York: McGrawHill, pp 1010-26.
- Amsyari F, 1989, Radiasi dosis rendah dan pengaruhnya terhadap kesehatan (Suatu pengantar terhadap upaya proteksi radiasi), Cetakan I, Surabaya: Airlangga University Press, hlm 70-5.
- Anonimous, 2003, Apoptosis: Overall scheme. Apoptosis.  
<http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mother/apoptosis/.htm.25>  
Juli 2006
- Anonimous, 2004, p53 (FL-393) K : sc-6243 K ImmunoCruz Staining System. Santa Cruz Biotechnology, Inc. www.scbt.com.
- Aolad HMD, Inouye M, Darmanto W, Hayasaka S, and Murata Y, 2000a. Hydrocephalus in mice following X-irradiation at early gestational stage: Possible due to persistent deceleration of cell proliferation. *J Radiat. Res.* 41: 213-26.
- Aolad HMD, Inouye M, Darmanto W, Hayasaka S, and Murata Y, 2000b. Effects of PSK, a biological response modifier, on X-ray-induced congenital hydrocephalus in mice. *J Cong. Anom.* 40: 204-5.
- Aoyagi H, Lino Y, Takeo T, Haorii Ymorishita Y, and Horiuchi R, 1997. Effects of OK-432 (picibanil) on the estrogen receptors of MCF-7 cells and potentiation of antiproliferative effects of tamoxifen in combination with OK-432. *Oncology.* 54: 414-23.
- Aswin S, 2002. Biologi molekuler kematian sel terprogram. Asdie AH dan Broto R. Ed., Naskah lengkap pertemuan ilmiah tahunan 2002 ilmu penyakit dalam fakultas kedokteran UGM. Yogyakarta: Penerbit Medika FK UGM, hlm 16-22.
- Baraas F, 2007. Programmed cell survival sampai programmed cell death. *J.Eth.Dig.* 36: 60-2.
- Belli M, Sapora A, and Tabocchini MA, 2002. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. *J.Radiat. Res.* 43: 13-19.
- Best B, 2007. General antioxidant actions.  
<http://www.ratical.org/radiation/CNR/RIC/> .Februari 2007

- Carette, M.J. and Ferguson, M.W. (1992). The fate of medial edge epithelial cells during palatal fusion in vitro: an analysis by Dil labelling and confocal microscopy. *Development*. 114: 379-388.
- Carlson BM, 1988. Pattern's fondation of embryology, 5<sup>th</sup> ed. New York: McGrawHill Book Company, pp 487-94.
- Cember H, 1993. Introduction to health physics. Terjemahan Tukiman A, Semarang: IKIP Semarang Press, hlm 20-5.
- Cuervo R, Valencia C, Chandraratna R.A. and Covarrubias L, (2002). Programmed cell death is required for palate shelf fusion and is regulated by retinoic acid. *Dev. Biol.* 245: 145-56.
- Chu KKW, Ho SSS, and Chow AHL., 2002. *Coriolus versicolor*, a medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. *J.Cli.Pharmacol.* 42: 976-84.
- Cui J, and Christi Y, 2003. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: Physiological activity, uses, and production. *J. Bio. Advances.* 21: 109-22.
- Darmanto W, Inouye M, Hayasaka S, and Murata Y, 2000. Derangement of Purkinje cells in the rat cerebellum following prenatal exposure to X-Irradiation: Decreased reelin level is possible cause. *J.Neuropath. and Exp.Neurobio.* 59: 245-56.
- Darmanto W, 2002. Apoptosis pada sel granulos cerebellum tikus akibat radiasi sinar-X: Deteksi apoptosis dengan metode TACS<sup>TM</sup> insitu apoptosis detection kit. *J.Matemath. and Sci.* 7 (3): 133-40.
- Darmanto W, Pidada IBR, dan Prihyantoro E, 2005. Ekstrak jamur (Krestine) Sebagai penghambat apoptosis dan gangguan otak akibat radiasi sinar gamma: Suatu model pencegahan penyakit degeneratif. Surabaya: Penelitian Hibah Bersaing Universitas Airlangga, hlm 1-2, 6-13, 18-21.
- Ferrer I, Serrano T, Alcantara S, tortosa A, and Graus F, 1993. X-Ray induced cell death in the developing hippocampal complex involves neurons and requires protein synthesis. *J.Neuropath. & Exp.NeuroRadiat.Bio.* 52 (4): 370-8.
- Fitchett, JE, and Hay, ED, (1989). Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Dev. Biol.* 131: 455-74.
- Fritsch P, Naour HRL, Denis S, and Menetrier F, 1994. Kinetics of radiation-induced apoptosis in the cerebellum of 14-day-old rats after acute or during continuous exposure. *J.Radiat.Bio.* 66 (1): 111-17.

- Goodhead DT, Thacker J, and Cox R, 1993. Effect of radiation of different Qualities on cells: Molecular mechanism of damage and repair. *J.Radiat.Bio.* 5 (3): 545-50.
- Gotoh H, Nomura T, Nakajima H, Hasegawa C, and Sakamoto Y, 1988. Inhibiting effects of nicotinamide on urethane-induced malformations and tumors in mice. *J.Mutat.Res.* 1999: 55-63.
- Grant, 2006. Apoptosis: Overall scheme. Apoptosis. <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mother/apoptosis/.htm.25>  
Juli 2006
- Greene RM and Pratt RM, 1976. Developmental aspects of secondary palate formation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 36: 225-45.
- Green LM, Dodds L, Miller AB, Tomkins DJ, Li J, and Escobar M, 1997. Risk of congenital anomalies in children of parents occupationally exposed to low level ionizing radiation. *Occupat, and Environ.Med.* 54: 629.
- Griffith, CM, and Hay, ED, (1992). Epithelial-mesenchymal transformation during palatal fusion: carboxyfluorescein traces cells at light and electron microscopic levels. *Development.* 116: 1087-1099.
- Hien VT, Huong NB, Pung PM, and Baduc N, 2002. Radioprotective effects of Vitexina for breast cancer patients undergoing radiotherapy with cobalt-60 Integrative cancer therapies. 1 (1) : 38-43.
- Hudson CD, and Shapiro BL, 1973. A radioautographic study of deoxyribonucleic acid synthesis in embryonic rat palatal shelf epithelium with reference to the concept of programmed cell death. *Arch. Oral Biol.* 18: 77-84
- Inouye M, Tamarus M, and Kameyama Y, 1992. Effects of cyclohexamide and actinomycin D on radiation-induced apoptotic cell death in the developing mouse cerebellum. *J.Rad.Bio.* 62: 669-74
- Jasin M, 1984. Sistematis hewan (invertebrata dan vertebrata). Surabaya: Sinar Jaya, hlm 60-5.
- Johnston MC, and Sulik KK (1990). In: Bhaskar SN (ed). *Oral Histology and Embryology*. Mosby, London, pp 12-16.
- Kagohashi Y, Naora H, and Otani H, 2002. PSK, a biological response modifier, modifier p53 expression, mitosis and apoptosis in X-ray irradiated mouse embryos: Possible cellular mechanism of the anti teratogenic effect. *J.Cong.Anom.*42: 15-20.
- Kameyama Y, Tamaki Y, and Hashino K, 1989. Avoidance learning deficits in prenatally gamma-ray irradiated rats. *J.Cong.Anom.* 4(29): 295-308.

- Kaufmann M H, 2004. The Atlas of mouse development. UK : Department of anatomy, University of Edinburgh. Academic Press, pp 137-434.
- Kadri N, Ismaei S, Raid N, Surjono A, Harianto A, and Mustadjab i, 1995. Congenital malformation and deformations in in Provinsial Hospitals in Indonesia. *J.Cong. Anom.* 35: 411-23.
- Kobayashi H, Matsunaga K, and Oguchi Y, 1995. Antimetastatic effects of PSK (Krestine), a protein-bound polysaccharide obtained from basidiomycetes: An overview. *Cancer Epi., Biomark & Prev.* 4: 275-81.
- Kumar V, Abbas AK, and Fausto N, 2005. Celluler adaptations, cell injury, and Cell death : Robbins and Cotran Pathologic Basic of Disease. 7<sup>th</sup> ed. New York : W.B. Saunders Co, pp 33-46.
- Kubota Y, Shimatoke T, and Iwai N, 2000. Congenital anomalies in mice induced By etretinate. *Eur. J.Pediat. Surg.* 10: 248-51.
- Kurushita A, 1990. Suppressive effects of two bioresponse modifiers, Krestine and Levamisole, on 5-Azacytidine-induced digital effects in rats. *Teratogenesis, Cars. Mut.*10: 409-15.
- Lawen, A., 2003. Apoptosis ? an introduction. BioEssays 25<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co, pp 888-96.
- Lee R, Sander P, Fournier C, Scholz M, Meijer A, and Ritter S, 2007. Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes. <http://www.ihcworld.com/apoptosis.htm> Februari 2007.
- Ling CC, Guo M, Chen CH, and Deloherey T, 1995. Radiation-induced Apoptosis : Effects of cell age and dose fractionation. *J.Cancer. Res.* 55: 5207-12.
- Lindner HH, 1989. Clinically anatomy. California: a Lange Medical Book, pp 55-8.
- Lu FC, 1995. Toksikologi dasar, asas, organ sasaran dan penilaian resiko. Jakarta: UI Press, pp 44-7.
- Martini FH, Timmons MJ, Tallitsch RB., *et al*, 2003. Human anatomy. 4<sup>th</sup> ed. New Jersey : Pearson Education, Inc, Pp 156-7.
- Matsui H, Setogawa T, Naora H, and Tanaka O, 1995. The effects of PSK, a biological response modifier, on congenital ocular abnormalities induced by X-ray irradiation. *J.Histol. Histopathol.* 10: 47-54.

- Mincler A, Guo M, Chen C, Vidair C, Marino C, Dewey W, and Ling W.C, 1997  
Characterization of radiation-induced apoptosis in rodent cell lines  
*Radiation Research* 147 295-303.
- Mori C, Nakamura N, Okamoto Y, Osawa M, and Shiota K, 1994. Cytochemical  
identification of programmed cell death in the fusing fetal mouse palate  
by specific labelling of DNA fragmentation. *Anat. Embryol. (Berl)*.  
190:21-28.
- Morley M, 1973. Cleft palate and speech. 7<sup>th</sup> ed. London : Churhill Livingstone,  
Inc, Pp 3-21.
- MoonDragon, 2006. Cleft lip and palate, An Overview.  
<http://www.moondragon.org/obgyn/pediatric/cleft.html>. Juli 2006
- Moore KL, 1974. The developing human, clinically oriented embryology.  
Philadelphia: W.B. Saunders Company, pp 487-94.
- Muljani SWM, 2003. Peran radiasi pengion dosis tunggal terhadap peroksidasi  
lipid dan kualitas sperma kelinci jantan (*Lepus negricollis*). Surabaya:  
Thesis Pascasarjana Universitas Airlangga, hlm 31-32.
- Nakashima K, Kawamata A, Fujiki I, and Fujiki Y, 1991. The individual and  
combined effects os X-irradiation and hyperthermia on early somite mouse  
embryos in culture. *Teratology*. 44: 635-39.
- Nandji A, and Susanne HS, 1997. Apoptosis and necrosis: two types of cell death  
in alcoholic liver disease. *J.Alcohol Health & Res. World*. 4(21): 325-30.
- Netter FH, 2003. Atlas of human anatomy. 3<sup>th</sup> ed. New Jersey : MediMedia USA,  
Inc, pp 40-6.
- Nomura T, Enomoto T, Shibata K, Kanzaki T, Tanaka H, and Hata S, 1983.  
Antiteratogenic effects of tumor inhibitors, cafein, antipain, and retinoid  
acid in mice. *J.Cancer. Res*. 43: 5156-62.
- Olson RE, Harry PB, Chiester CO., *et al*, 1988. Pengetahuan gizi mutakhir.  
Gizi untuk kebutuhan fisiologi khusus. Jakarta : Penerbit PT Gramedia;  
hlm 135-42
- Oka I, Natsui M, Goto T., *et al*, 1995. Incidence and familial occurrence of the  
congenital anomalies of the face, hand, and foot. *J.Cong.Anom*.  
35: 425-34.
- O'Reilly S, Walicka M, Kohler SK, Dunstan R, Maker VM, and Mc Cormick JJ,  
1998. Dose-dependent transformation of cells of human fibroblast cell  
Strain MSU-1.1 by Cobalt-60 gamma radiation and characterization of the  
transformed cells. *J Radiat. Res*. 150: 577-84.

- Panduri V, Weitzman A, Chandel N, and Kamp DW, 2003. The mitochondria-regulated death pathway mediated asbestos-induced alveolar Epithelial Cell Apoptosis. *American.J.Resp.Cell.Mol.Bio.28*: 241-8.
- Pérez M. del R, Gisone PA, Dubner DL, Michelin SC, and Sanjurjo, J. 2000. Characterization of radiation-induced apoptosis in developing central nervous system. Presentado en 10th International Congress of the International Radiation Protection Association – IRPA, Hiroshima, Japan.
- Reid AH, 1994. Polymerase chain reaction in advanced laboratory methods in histopatology and pathology. American Registry of Pathology Washington DC: pp 77 – 110
- Robinson ES, Moss L, and Salentinj DDS, 2003. Facial and palatal development : Larsen embriology. 3<sup>nd</sup> ed. NewYork : W.B. Saunders Co, pp 352: pp 365-71; pp 398-404.
- Ross GM, 1999. Induction of cell death by radiotherapy. *J.Endocrine related cancro. 6*: 41-4.
- Rugh R, 1967. The mouse: its reproduction and development. 1<sup>st</sup> ed, Minneapolis: Burgess Publising Company, pp 303-9.
- Sadier TW, 2000. Langman’s medical embryology. Terjemahan Suyono J, Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, hlm 122-27, 133, 331-7.
- Shapiro BL, and Swency LR, 1969. Electron microscopic and histochemical examination of oral epithelial-mesenchymal interaction (programmed cell death). *J. Dent. Res. 48*: 652-660.
- Schwan HP, and Piersol GM, 1954. The absorption of electromagnetic energy in body tissues. In (Osepchuk JM, eds). Biological effect of electromagnetic radiation, 1<sup>st</sup> ed. New York: IEEE Press, pp 6-9.
- Schreiber G.J, 2005. Radiation Therapy, General Principles. <http://www.emedicine.com/ent/topic247.htm> Februari 2007
- Smiley GR, 1970. Fine structure of mouse embryonic palatal epithelium prior to and after midline fusion. *Arch. Oral Biol. 15*: 287-296.
- Smith D, 2005. Programmed cell death. *Fundamental Neuroscience*. Academic Press. <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mother/apoptosis/.htm.25> Juli 2006.
- Sperber GH, 1991. Embriologi kraniofasial. 4<sup>th</sup> ed. Jakarta : Penerbit Hipokrates, him 23-8.

- Soesatyo MHNE, 2002. Apoptosis pada sistem imun. Asdie AH dan Broto R. Ed., Naskah lengkap pertemuan ilmiah tahunan 2002 ilmu penyakit dalam fakultas kedokteran UGM. Yogyakarta: Penerbit Medika FK UGM, hlm 24-7.
- Sun XZ, Inouye M, Fukui Y., *et al*, 1997. An Immunohistochemical study of radial glial cells in the mouse brain prenatally exposed to  $\gamma$ -irradiation. *J.Neuropath.Exp Neuro.* 56: 1339-48.
- Susworo R, 2002. Peran radioterapi pada pengobatan kanker. Kompas Ed. Minggu, 06 Januari 2002.
- Susworo R, 2007. Radioterapi, dasar-dasar radioterapi dan tatalaksana radioterapi penyakit kanker. Jakarta : Penerbit Universitas Indonesia; hlm 16-34.
- Takeuchi IK, and Takeuchi YK, 1986. Congenital hydrocephalus following X-irradiation of pregnant rat on an early gestational day. *Neurobehav.Tox. & Tera.* 8: 143-50.
- Takahara S, Takigawa T, and Shiota K, 2004. Programmed cell death is not necessary prerequisite for fusion of the fetal mouse palate. *Int.J.Dev..Biol.* 48: 39-46.
- Tortora GJ, 2005. Principles of human anatomy. 10<sup>th</sup> ed. New Jersey: Jonh Wiley & Sons, Inc, pp 94-111 and 624-5.
- Tsukagoshi S, Hashimoto Y, Fujii G, Kobayashi H, Nomoto K, and Orita K, 1984. Krestine (PSK). *Cancer Treatment Review.* 11: pp 131-55.
- Utoro T, 2002. Kematian sel terprogram (*apoptosis*). Asdie AH dan Broto R. Ed., Naskah lengkap pertemuan ilmiah tahunan 2002 ilmu penyakit dalam fakultas kedokteran UGM. Yogyakarta: Penerbit Medika FK UGM, hlm 28-31.
- Wyllie AH, 2005. Apoptosis, cell death, and cell proliferation Manual. 3<sup>rd</sup> ed. California: Roche Applied Science, pp 2-3.
- Yang MMP, Chen Z, and Kwok JSL, 1992. The antitumor effect of a small polypeptide from *Coriolus versicolor* (SPCV). *Cancer Epi. Biomark. Prev.* 4(3): pp 275-81.
- Yang Q, 1993. The comparative analysis of the extracts of the mycelia and the fruit bodies of *Yun Zhi* (*Coriolus versicolor*). *PSP International Symposium.* P 41-55.
- Yatim W, 1992. Biologi sci lanjut. Bandung : Penerbit Tarsito, hlm 1-15.

Ying W, Alano CC, Garnier P, and Swanson RA, 2005. NAD<sup>+</sup> as a metabolic link between DNA damage and cell death. *J.Neurosci.Res.* 79: 216-23.




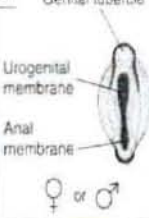
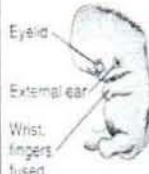

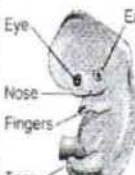

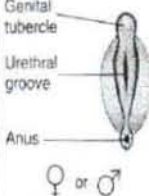
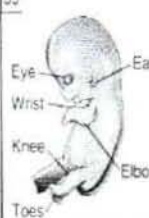

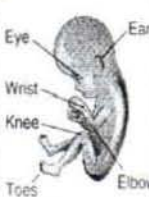

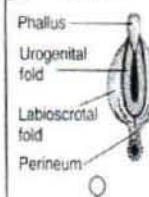

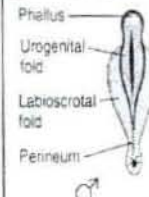



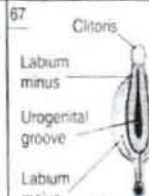
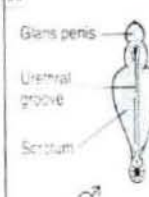

Zainuddin M, 2000. Metodologi penelitian. Surabaya: University Press, him 53-4



Lampiran 1

Tahap Perkembangan Embrio (Netter, 2003)

TIMETABLE OF HUMAN PRENATAL DEVELOPMENT  
7 to 38 weeks

43 Actual size  CRL: 16 mm	44 Stage 18 begins  Eyelids beginning	45 Head large but chin poorly formed. Grooves between digital rays indicate fingers.	46  Wall of uterus Amniotic sac Uterine cavity Smooth chorion	47 Genital tubercle  Urogenital membrane Anal membrane ♀ or ♂	48 Stage 19 begins  Eyelid External ear Wrist, fingers fused	49 Actual size  CRL: 18 mm
50 Upper limbs longer and bent at elbows. Fingers distinct but webbed.	51  Eye Ear Nose Fingers Toes	52 Stage 21 begins  Large forehead	53 Stage 21 External genitalia still in sexless state but have begun to differentiate.	54 Stage 22 begins  Genital tubercle Urethral groove Anus ♀ or ♂	55  Eye Ear Wrist Knee Elbow Toes	56 Stage 23  CRL: 30 mm
57 Beginning of fetal period.	58  Eye Ear Wrist Knee Toes Elbow	59 Placenta 	60 Genitalia  Phallus Urogenital fold Labioscrotal fold Perineum ♀	61  CRL: 45 mm	62 Genitalia  Phallus Urogenital fold Labioscrotal fold Perineum ♂	63  CRL: 50 mm
64 Face has human profile. Note growth of chin compared to day 44.	65 	66  Ears still lower than normal.	67 Clitoris  Labium minus Urogenital groove Labium majus ♀	68 Genitalia have ♀ or ♂ characteristics but still not fully formed.	69  Glans penis Urethral groove Scrotum ♂	70  CRL: 61 mm

1. Continued

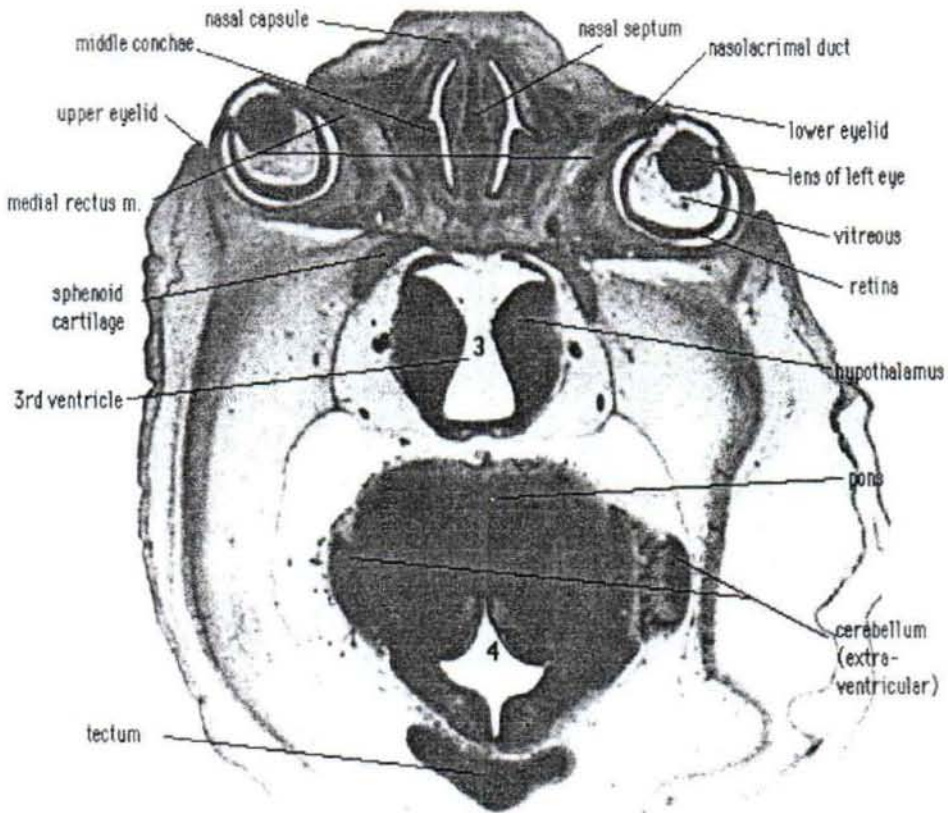
**Lampiran 2 : Perbandingan usia embrio tikus dengan manusia  
(Rugh, 1968) :**

Usia embrio tikus (hari)	Usia embrio manusia (hari)
0	1
1	2
2	3
4	4
5	5-6
5½	7-8
6	9-10
6½	11-13
7	14-17
7½	18-20
8	20½
8 1/3	21
8½	22
8 2/3 - 8 ¾	23
8 4/5	24 1/3
9	25 ½
9 ½ - 9 2/3	26
10	27
10 ½	28 ½
11	30 ¾
11 ½	33 ½
12	36
12 1/3	36 ½
13 - 13 ½	38
14 ½	47
15 ½	65
16 ½	84½

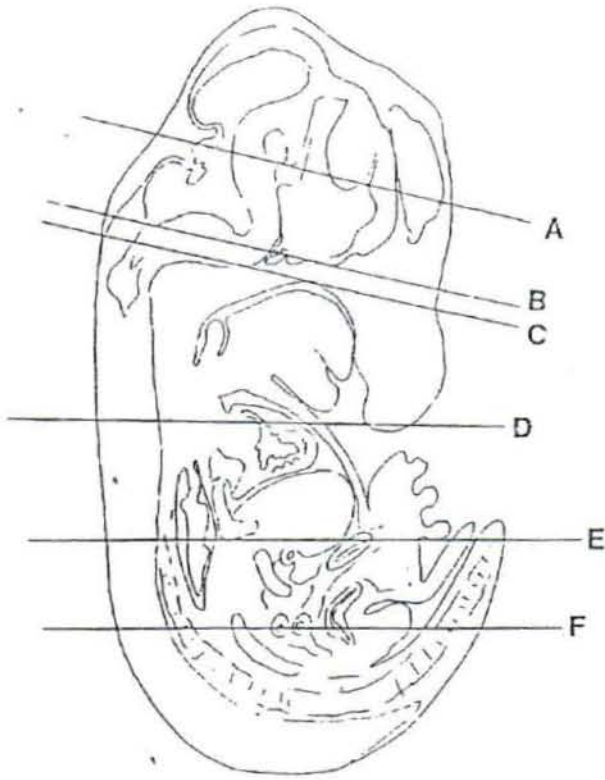
**Lampiran 3 : Waktu perkembangan organ olfaktorika pada embrio tikus  
(Rugh, 1968) :**

Organ olfaktorika	Usia Kebuntingan (hari)												
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Plakoda			√										
Nasal pit				√									
Nasal sinus						√							
Duct.Naso-lakrimalis								√					
Choana posterior									√				
Septum nasalis								√					
Duct.naso-pharyngeal									√				
Organ vomeronasal						√							
Palatum										√			
Meatus naso-pharyngeal										√			
Gdl.Mucous Nasal lateralis											√		
Nares externus													√

**Lampiran 4 : Penampang Cross Sectional Kranial Embrio Manusia (UNSW, 2006)**

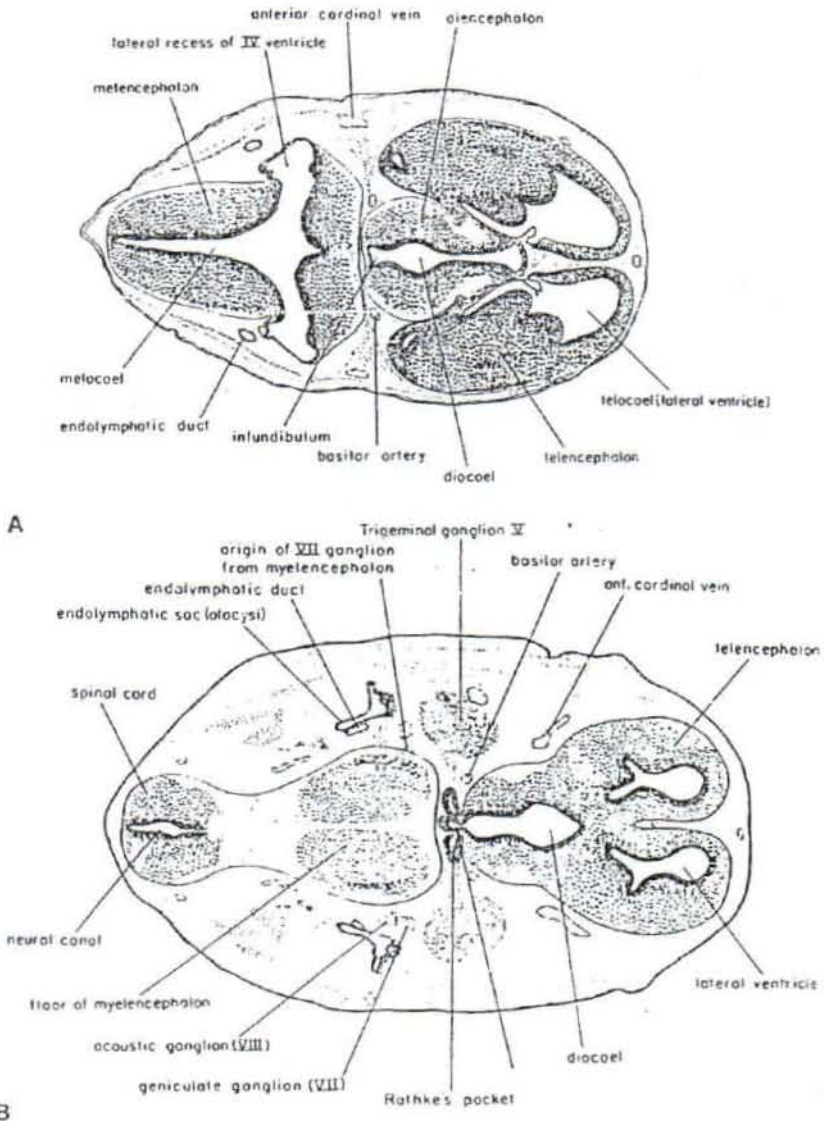


**Lampiran 5 : Penampang janin mencit pada berbagai potongan transversal (Rugh, 1968) :**



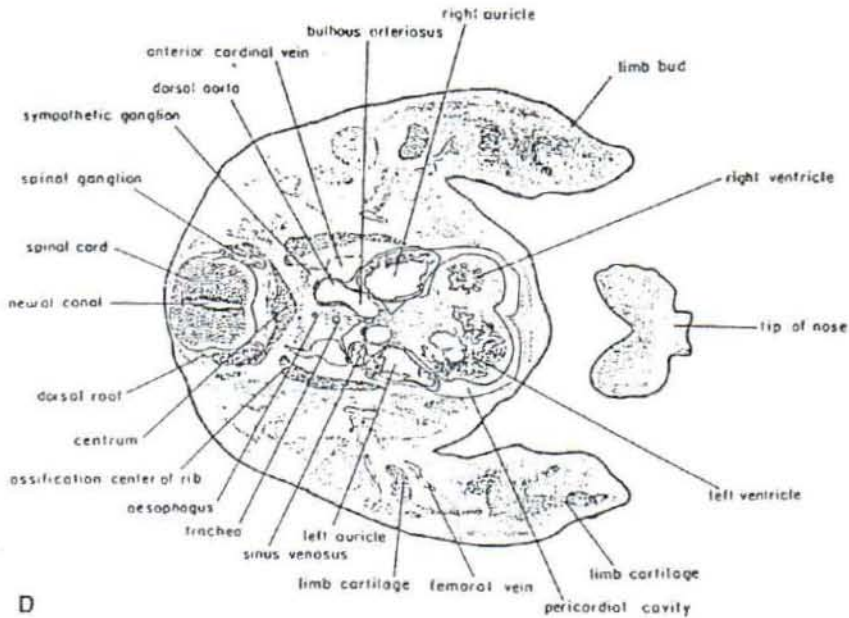
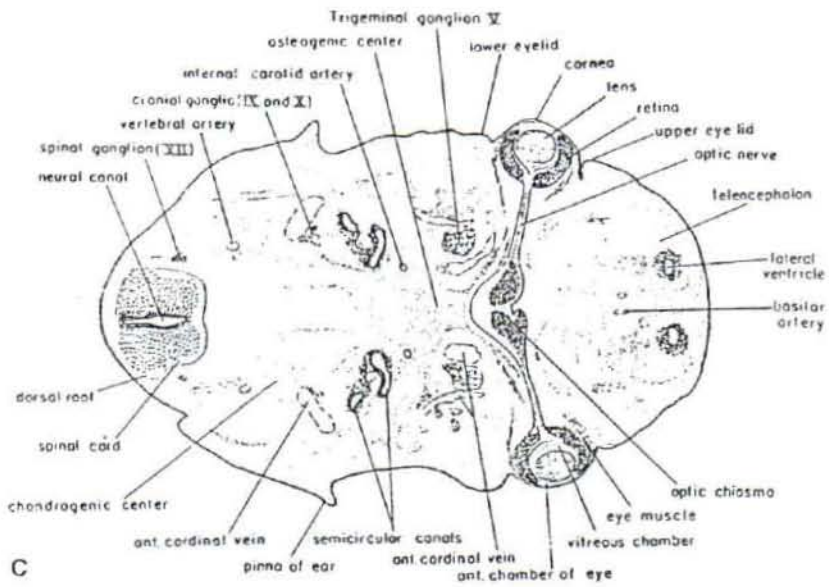
Lanjutan lampiran 5

Penampang embrio tikus usia 13,5 hari pada berbagai potongan transversal Rugh, 1968) :



Lanjutan lampiran 5

Penampang embrio tikus usia 13,5 hari pada berbagai potongan transversal Rugh, 1968) :



## Lampiran 6 : Pembuatan Sediaan Histologis Palatum

Langkah-langkah teknik pembuatan sediaan histologi palatum dengan teknik paraffin adalah sebagai berikut :

### 1. Fiksasi

Dilakukan dengan menggunakan larutan *buffer formalin* 10 % dengan tujuan agar mudah dilakukan proses pemotongan, mempertahankan struktur dan komponen sel, menampilkan perbedaan refraksi komponen jaringan serta untuk mencegah proses pembusukan dan pertumbuhan bakteri dan jamur.

### 2. Dekalsifikasi

Jaringan dimasukkan ke dalam larutan asam nitrat 5-10% selama 4 hari dengan penggantian larutan asam nitrat setiap hari. Jaringan lalu dibilas pada air yang mengalir selama 24 jam kemudian ditambahkan sedikit formalin untuk mengurangi kerusakan jaringan. Bahan dibilas lagi pada air mengalir selama 24-48 jam.

### 3. Dehidrasi

Merendam jaringan ke dalam larutan alkohol dengan konsentrasi yang ditingkatkan mulai dari 70%, 80%, 90%, 95% sampai absolut. Proses ini bertujuan untuk menghilangkan sisa air dalam jaringan supaya paraffin dapat masuk merata ke dalam jaringan.

### 4. Clearing

Jaringan direndam di dalam larutan *xylol* yang bertujuan agar jaringan yang akan diblok dengan paraffin akan menjadi transparan.



## Lanjutan lampiran 6

### 5. Impregnasi

Jaringan dimasukkan ke dalam campuran parafin cair dan xyolol dengan perbandingan 1 : 1, pada suhu 65<sup>0</sup>C selama 30 menit. Jaringan kemudian dimasukkan ke dalam parafin murni yang bersuhu 55-58<sup>0</sup>C sebanyak 3 kali masing-masing selama 30 menit supaya konsistensi jaringan sama dengan blok

### 6. Ebedding

Merupakan proses infiltrasi jaringan dengan parafin cair. Parafin cair dituang, jaringan dimasukkan ke dalamnya dengan posisi tertentu, kemudian dianginkan hingga parafin beku. Proses ini bertujuan untuk memberikan suatu penyangga agar jaringan dapat dipotong dengan mikrotom tanpa menimbulkan distorsi yang berarti pada susunannya.

### 7. Sectioning

Jaringan yang telah diblok dengan parafin dipotong sejajar bidang coronal palatum menggunakan mikrotom dengan ketebalan irisan 6 mikron.

### 8. Mounting I

Hasil irisan yang disebut *ribbon* dimasukkan ke dalam water bath bersuhu 56<sup>0</sup>C sehingga berkembang, kemudian dilekatkan pada gelas objek yang dilapisi albumin telur, kemudian dikeringkan dan dilakukan pengecatan.

Langkah teknik pengecatan sediaan dengan Hematoxyline dan Eosine adalah sebagai berikut :

## Lanjutan lampiran 6

### 1. Deparafinisasi

Bertujuan untuk menghilangkan parafin dari jaringan. Dilakukan dengan memasukkan jaringan ke dalam 3 tabung berisi *xylol* masing-masing selama 2 menit secara berurutan. Jaringan lalu dimasukkan ke dalam alkohol absouit selama 1 menit untuk menarik *xylol*, kemudian dicuci dengan air yang mengalir beberapa kali cucian.

### 2. Pengecatan

Jaringan dicat dengan larutan hematoxyline selama 15 menit untuk mengecat inti, kemudian dicuci dengan air mengalir beberapa kali cucian. Dilakukan diferensiasi dengan larutan alkohol asam 1% beberapa kali celupan sampai intensitas warna inti seperti yang dikehendaki, kemudian dibilas dengan air yang mengalir. Setelah intensitas warna inti cukup, dilakukan pengecatan sitoplasma dengan menggunakan eosine selama 1-2 menit.

### 3. Dehidrasi

Proses ini dilakukan awalnya dengan menggunakan alkohol 95% melalui beberapa celupan, kemudian digunakan alkohol absolut I dan absolut II masing-masing selama 1 menit.

### 4. Clearing

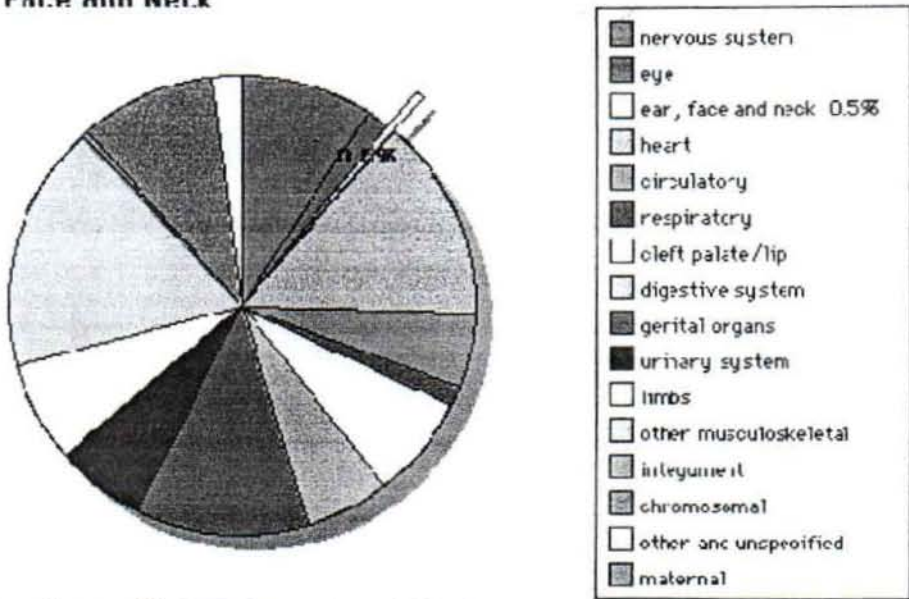
Proses ini menggunakan 3 tabung berisi *xylol*, jaringan dimasukkan ke dalamnya masing-masing selama 2 menit untuk menghilangkan alkohol.

## 5. Mounting II

Sediaan ditutup dengan gelas penutup yang telah diolesi balsam Canada, kemudian dibiarkan kering dalam suhu kamar.

### Lampiran 7 : Maformasi Kongenital Sistem-sistem tubuh

**Congenital Malformations by System 81-92**  
**Ear, Face and Neck**



Data source: Congenital Malformations Australia 1981-92

**Lampiran 8 : Diferensial Diagnosis Nekrosis dan Apoptosis  
(Wyllie, 2005) :**

Necrosis	Apoptosis
<p><b>Morphological features</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Loss of membrane integrity</li> <li>● Begins with swelling of cytoplasm and mitochondria</li> <li>● Ends with total cell lysis</li> <li>● No vesicle formation, complete lysis</li> <li>● Disintegration (swelling) of organelles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Membrane blebbing, but no loss of integrity</li> <li>● Aggregation of chromatin at the nuclear membrane</li> <li>● Begins with shrinking of cytoplasm and condensation of nucleus</li> <li>● Ends with fragmentation of cell into smaller bodies</li> <li>● Formation of membrane bound vesicles (apoptotic bodies)</li> <li>● Mitochondria become leaky due to pore formation involving proteins of the bcl-2 family.</li> </ul>
<p><b>Biochemical features</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Loss of regulation of ion homeostasis</li> <li>● No energy requirement (passive process, also occurs at 4 C)</li> <li>● Random digestion of DNA (smear of DNA after agarose gel electrophoresis)</li> <li>● Postlytic DNA fragmentation (= late event of death)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Tightly regulated process involving activation and enzymatic steps</li> <li>● Energy (ATP)-dependent (active process, does not occur at 4 C)</li> <li>● Non-random mono- and oligonucleosomal length fragmentation of DNA (Ladder pattern after agarose gel electrophoresis)</li> <li>● Prelytic DNA fragmentation</li> <li>● Release of various factors (cytochrome C, AIF) into cytoplasm by mitochondria</li> <li>● Activation of caspase cascade</li> <li>● Alterations in membrane asymmetry (i.e., translocation of phosphatidylserine from the cytoplasmic to the extracellular side of the membrane)</li> </ul>
<p><b>Physiological significance</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Affects groups of contiguous cells</li> <li>● Evoked by non-physiological disturbances (complement attack, lytic viruses, hypothermia, hypoxia, ischemia, metabolic poisons)</li> <li>● Phagocytosis by macrophages</li> <li>● Significant inflammatory response</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Affects individual cells</li> <li>● Induced by physiological stimuli (lack of growth factors, changes in hormonal environment)</li> <li>● Phagocytosis by adjacent cells or macrophages</li> <li>● No inflammatory response</li> </ul>

**Lampiran 9 : Perbedaan struktur morfologi sel pada nekrosis dan aptosis**  
(Anonimous, 2003)

	<b>Proses Apoptosis</b>	<b>Proses Nekrosis</b>
<b>Pattern of death</b>	Sel-sel tunggal	Sekelompok sel-sel yang berdekatan saling berdekatan
<b>Ukuran sel</b>	- Mengerut - Fragmentasi	Membengkak
<b>Membran plasma</b>	- Utuh dan tidak lisis - Tidak rata - Phosphatidylserine pada permukaan	Halus dan licin Lisis lebih awal
<b>Mitokondria</b>	- Permeabilitas membran meningkat - Kandungannya lepas kedalam sitoplasma sitokrom - Structure relatively preserved	- Membengkak - Struktur rusak
<b>Bentuk Organel</b>	- Mengerut - ⊕ Badan apoptosis	- Membengkak - Rusak
<b>Nukleus</b>	- Chromatin : mengelompok dan fragmentasi	Membrane rusak
<b>Degradasi DNA</b>	- Fragmentasi : "cleavage" antar nukleosom 3 akhirnya lepas Terdapat jalur pd elektroforesis	Merata dan acak
<b>Degradasi Sel</b>	- Mengalami fagositosis - (-) proses peradangan	- Invasi makrofag - ⊕ proses peradangan

**Lampiran 10 : Komposisi zat makanan dalam pakan BR-211 produksi PT.Comfeed Indonesia**

<b>Jenis zat</b>	<b>Kandungan nutrisi (%)</b>
Protein	21 - 22
Lemak	4 - 8
Serat kasar	3 - 5
Abu	5 - 7
Kalsium (Ca)	0,9 – 1,1
Pospor (P)	0,7 – 0,9

**Lampiran 11 : Unsur bahan radioaktif Cobalt dan spesifikasinya yang umum digunakan di rumah sakit (Amsyari, 2000) :**

Nomor Atom	Tanda Atom	Massa Atom (MA)	Waktu Paruh	Radiasi Utama	Energi Radiasi (E max in MeV)
27	Co	57	270.0 d	e <sup>-</sup> γ	0,129 0,122 (87%), 0,136 (11%), 0,692 (0,14%)
27	Co	60	5,3 y	β <sup>-</sup> γ	0,314 1,173 (100%), 1,332 (100%)

**Keterangan :**

d = day

y = year

e<sup>-</sup> = Elektron capture

γ = γ-ray

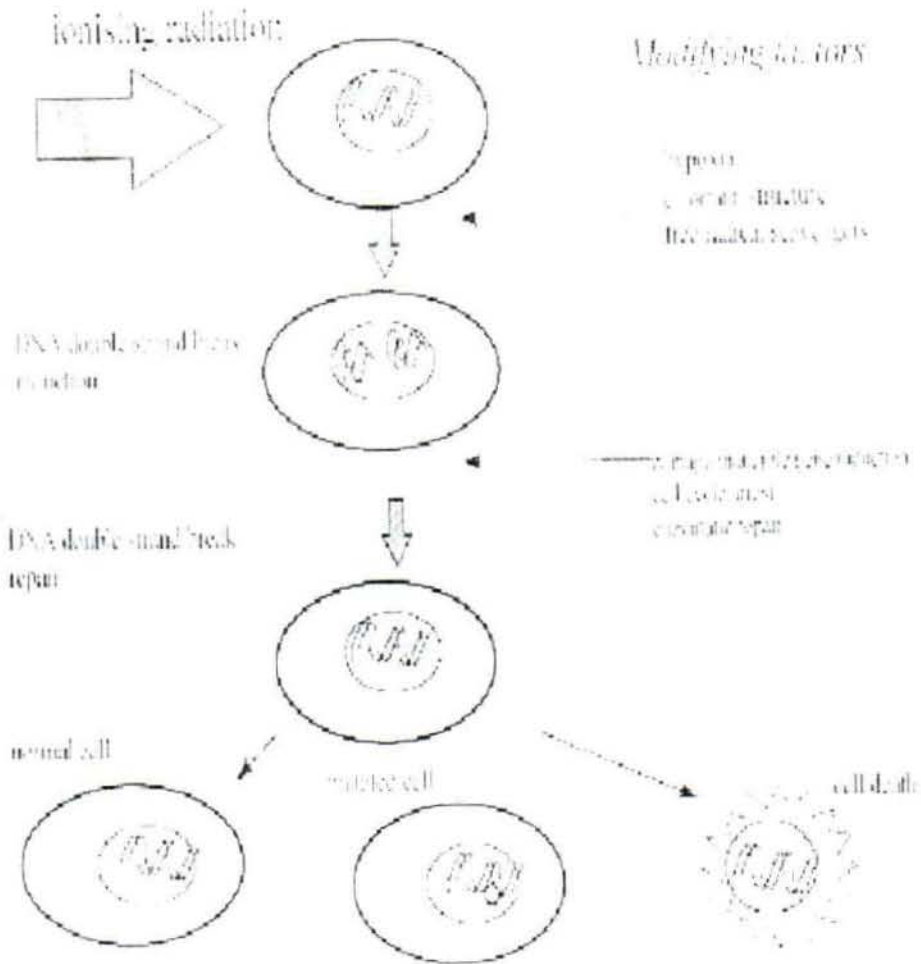
β<sup>-</sup> = Beta particle (partikel beta)



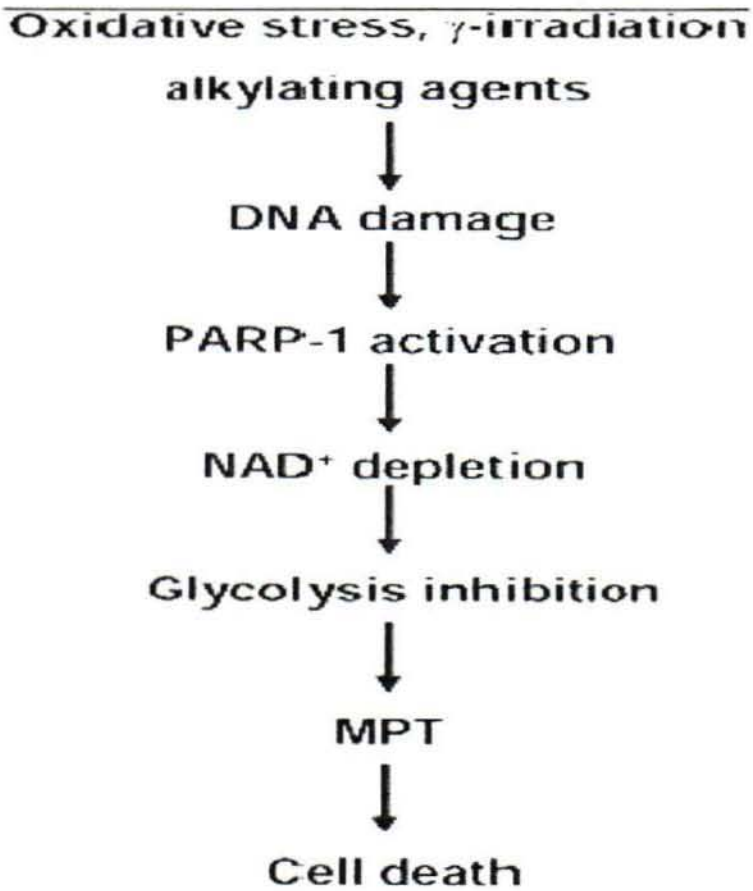
**Lampiran 12 : Dosis radiasi paling rendah yang menghasilkan efek stokastik pada embrio dan fetus mamalia (Kameyama, 1983) :**

Besar Dosis (Gray/Gy)	Kelainan perkembangan pada janin/fetus mamalia
0,05	Kematian embriogenik dini
0,05	Perubahan sitologi akut
0,05	Anomali ringan pada tulang
0,1 – 0,2	Kerusakan histogenik pada otak
0,15 – 0,2	Malformasi
0,2 – 0,25	Gangguan fungsional sistem saraf pusat
0,2 – 0,25	Gangguan fertilitas

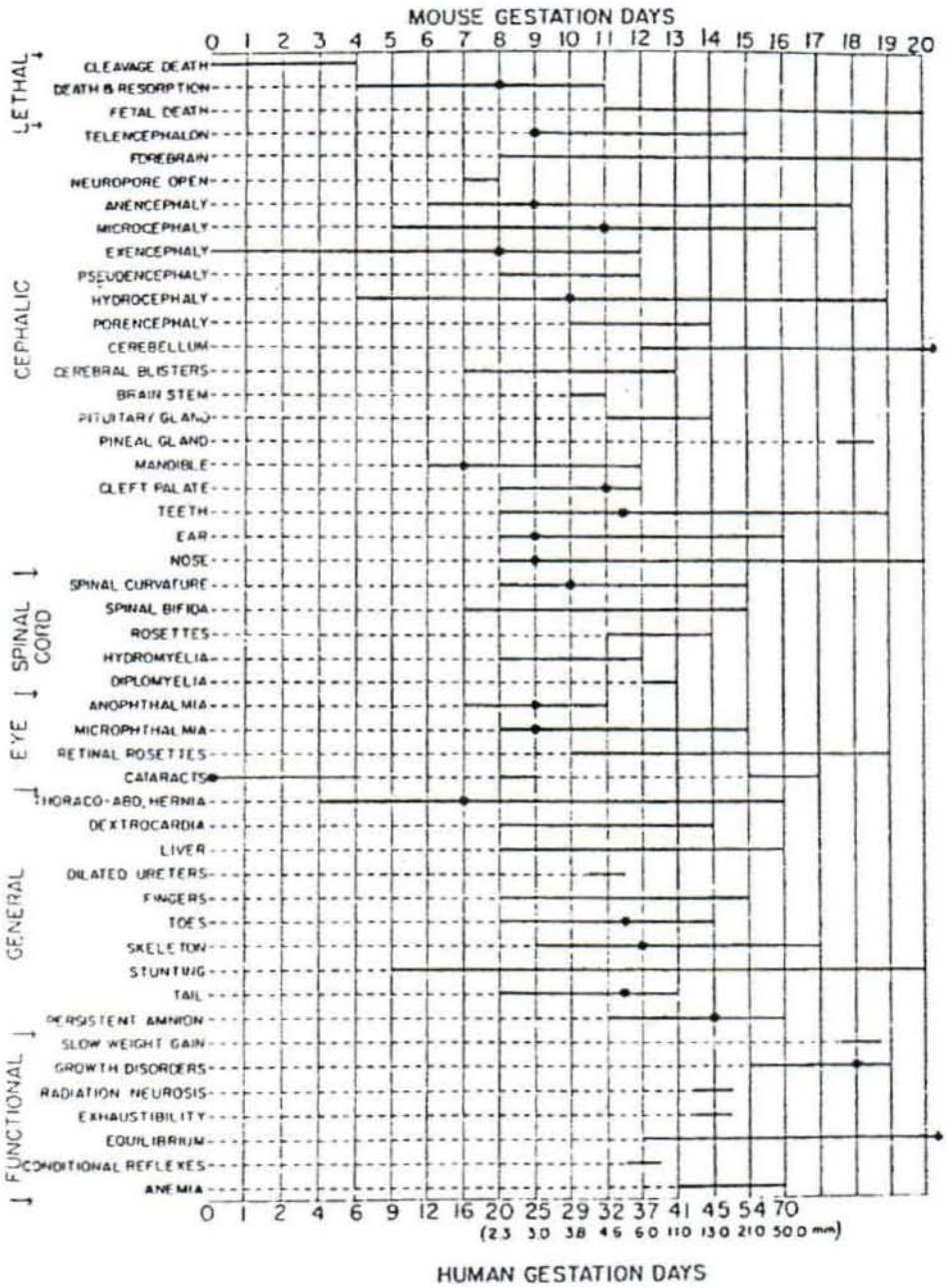
**Lampiran 13 : Skema Induksi Kematian Sel akibat Radiasi Ionisasi (Ross, 1999) :**



**Lampiran 14 : Skema Proses Kematian Sel akibat Radiasi sinar- $\gamma$  dan Agen lain (Ying, dkk; 2005) :**



Lampiran 15 : Pengaruh iradiasi sinar - X yang menyebabkan kelainan Bawaan pada embrio manusia dan tikus (Rugh, 1968) :



**Lampiran 16 : Hasil Statistik deskriptif prosentase jumlah kematian sel****Descriptive Statistics**

	N	Range	Minimum	Maximum	Mean	Std.Deviation
K (-) 1	3	0	0	0	.00	.00
K (+) 1	9	14	12	26	17,56	4,39
P 1	9	13	0	13	4,67	4,66

**Lampiran 17 : Hasil Uji normalitas****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

	K(-) 2	K(+) 1	P3
N	3	9	9
Normal parameters ab Mean	.00	17,56	4,67
Std Deviation	.00	4,39	4,66
Most Extreme Absolute		.149	.224
Differences Positive		.149	.224
Negative		-.103	-.159
Kolmogorov-Smirnov Z		.447	.671
Asymp. Sig. (2-tailed)		.988	.760

- a. Test distribution is normal
- b. Calculated from data
- c. The distribution has no variance for this variable.  
One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test cannot be performed
- d. The distribution has no variance for this variable.  
One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test cannot be performed

**Lampiran 18 : Hasil Uji t dua sampel independent untuk data hubungan kelompok kontrol pada UK 13**

Kelompok	N	Mean	Std.Deviation	Std.Error Mean
Responl	9	17,56	4,39	1,46
K (+) l K (-) i	3	.00	.00	.00

**Independent Samples Test**

	Levene's Test for equality of Variance		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
RESPON	4.245	.066	6.706	10	.000	17.56	2.62	11.72	23.39
Equal varian assumed									
Equal varian not assumed			11.995	8.000	.000	17.56	1.46	14.18	20.93

**Lampiran 19 : Hasil Uji t dua sampel independent untuk data hubungan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada UK 11**

Kelompok		N	Mean	Std.Deviation	Std.Error Mean
Respon2	P 1	9	4,44	1,13	0,38
	K (-) 1	3	.00	.00	.00

**independent Samples Test**

	Levene's Test for Equality of Variance		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
RESPO Equal variance assumed	8.616	.015	6.594	10	.000	4.44	.67	2.94	5.95
RESPO Equal variance not assumed			11.795	8.000	.000	4.44	.38	3.58	5.31



**Lampiran 20 : Hasil Statistik deskriptif respon kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol****Descriptive Statistics**

Dependent Variable: RESPON3

GROUP	Mean	Std. Deviation	N
1	.00	.00	3
2	17.56	4.39	9
3	4.67	4.66	9
Total	9.52	8.35	21

**Lampiran 21 : Hasil Uji homogenitas varians respon kelompok perlakuan  
Terhadap kelompok kontrol****Test of Homogeneity of Variances**

RESPON3

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.905	2	18	.081

**Lampiran 22 : Hasil Uji normalitas residual respon kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Residual for RESPON3
N		21
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	2.129E-08
	Std. Deviation	4.0511
Most Extreme Differences	Absolute	.171
	Positive	.171
	Negative	-.085
Kolmogorov-Smirnov Z		.782
Asymp. Sig. (2-tailed)		.574

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

**Lampiran 23 : Hasil analisis varians untuk data respon kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol**

**ANOVA**

**RESPON3**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	065.016	2	532.508	29.203	.000
Within Groups	328.222	18	18.235		
Total	393.238	20			

**Multiple Comparisons**

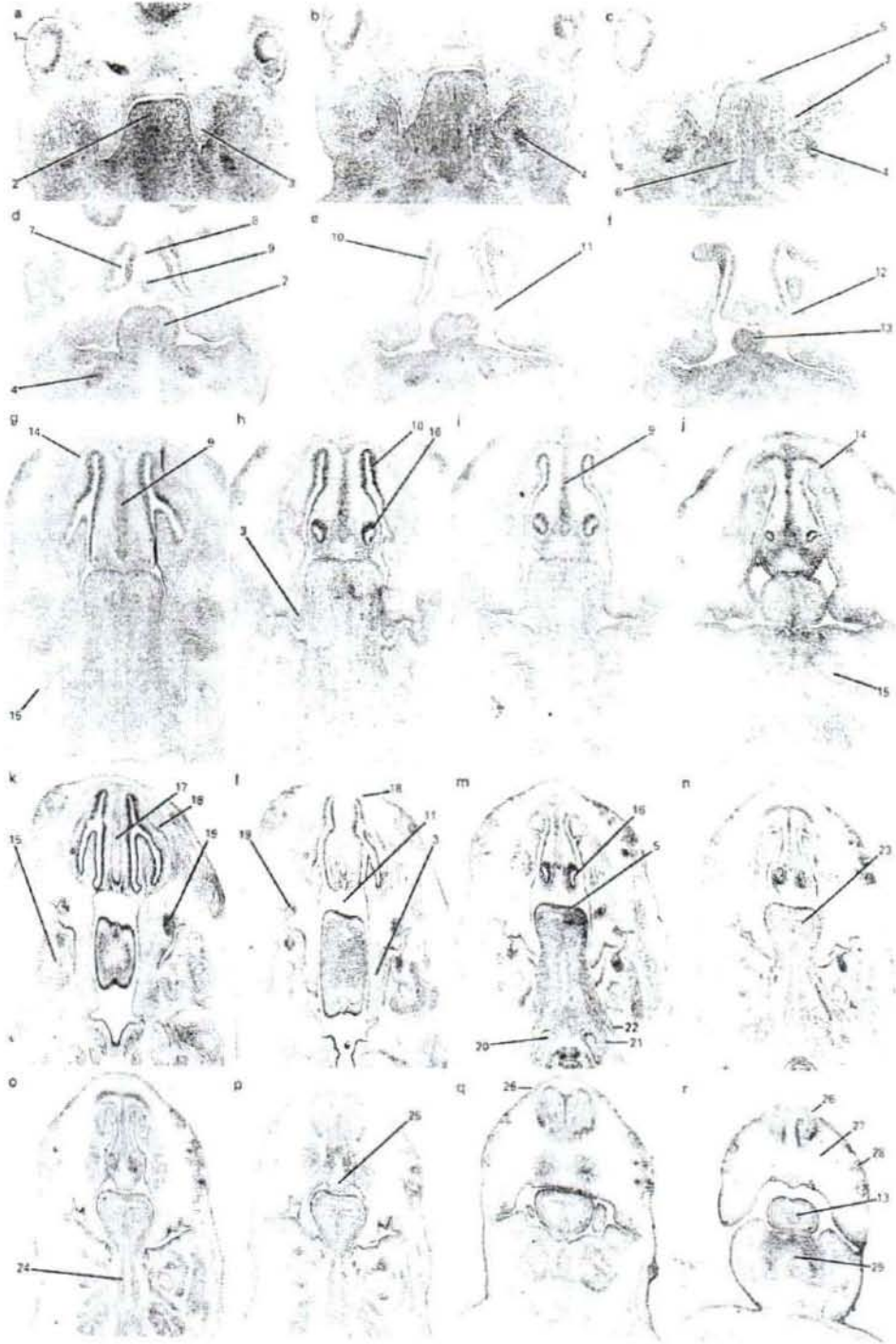
Dependent Variable: RESPON3

LSD

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K(-)2	K(+ )3	-17.56*	2.85	.000	-23.54	-11.57
	P3	-4.67	2.85	.119	-10.65	1.31
K(+ )3	K(-)2	17.56*	2.85	.000	11.57	23.54
	P3	12.89*	2.01	.000	8.66	17.12
P3	K(-)2	4.67	2.85	.119	-1.31	10.65
	K(+ )3	-12.89*	2.01	.000	-17.12	-8.66

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

**Lampiran 24 : Pembentukan tepi platium dan penutupan palatum**  
(kaufmann, 2004)



Lampiran 25 : Penutupan palatum (kaufmann, 2004)

