

TESIS

**POTENSI *MYCOTOXIN BINDERS* TERHADAP JUMLAH
FOLIKEL, KORPUS LUTEUM, EKSPRESI CASPASE 9
OVARIUM DAN MORFOLOGI FETUS MENCIT
(*MUS MUSCULUS*) BUNTING YANG
TERPAPAR ZEARALENON**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



Oleh :

MUHAMMAD THOWAWI ELZIYAD PURNAMA
NIM 061214153010

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU BIOLOGI REPRODUKSI
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2014**

**POTENSI *MYCOTOXIN BINDERS* TERHADAP JUMLAH FOLIKEL,
KORPUS LUTEUM, EKSPRESI CASPASE 9 OVARIUM DAN
MORFOLOGI FETUS MENCIT (*Mus musculus*) BUNTING
YANG TERPAPAR ZEARALENON**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

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

MUHAMMAD THOHAWI ELZIYAD PURNAMA

NIM. 061214153010

**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU BIOLOGI REPRODUKSI
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2014**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul :

**Potensi *Mycotoxin Binders* terhadap Jumlah Folikel, Korpus Luteum,
Ekspresi Caspase 9 Ovarium dan Morfologi Fetus Mencit (*Mus musculus*)
Bunting yang terpapar Zearalenon**

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

Surabaya, 20 Maret 2014



Muhammad Thohawi Elziyad Purnama

NIM. 061214153010

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI

Tanggal 20 Maret 2014

Oleh :

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. H. Imam Mustofa, M.Kes., Drh

NIP. 19600427 198701 1 001

Pembimbing

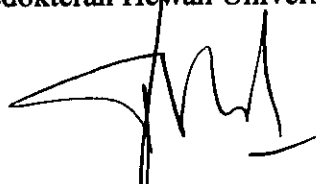


Dr. Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh

NIP. 19630401 199002 1 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Prof. Dr. Wurlina, MS., Drh

NIP. 19540918 198301 2 001

Tesis ini telah diuji dan dinilai pada

Tanggal 20 Maret 2014

KOMITE PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. Abdul Samik, M.Si., Drh

Anggota : 1. Prof. Dr. Pudji Srianto, M.Kes., Drh
2. Dr. Thomas V. Widijatno, M.Si., Drh
3. Prof. Dr. H. Imam Mustofa, M.Kes., Drh
4. Dr. Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh

Surabaya, 20 Maret 2014

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh.

NIP. 19531216 197806 2 001

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas limpahan rahmat, karunia, serta anugerah yang begitu Maha Agung sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul **“Potensi *Mycotoxin Binders* terhadap Jumlah Folikel, Korpus Luteum, Ekspresi Caspase 9 Ovarium dan Morfologi Fetus Mencit (*Mus musculus*) Bunting yang terpapar Zearalenon”**.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah banyak membantu baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penyusunan tesis ini, antara lain :

Ibu Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh. atas kasih sayangnya kepada penulis selama belajar di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Bapak Dr. Anwar Ma'ruf, M.Kes., Drh., selaku Wakil Dekan I, Prof. Dr. Pudji Srianto, M.Kes., Drh., selaku Wakil Dekan II, Dr. Suwarno, M.Si., Drh., selaku Wakil Dekan III, serta Ibu Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, M.Si., Drh., selaku Kepala Bagian Akademik atas bimbingannya kepada penulis selama menjalani pengabdian sebagai aktivis di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Bapak Prof. Dr. H. Imam Mustofa, M.Kes., Drh., selaku pembimbing utama dan Bapak Dr. Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh., selaku pembimbing kedua atas segala saran, kritik serta kesabaran dalam membimbing penulis dari

persiapan sampai akhir penelitian sehingga tujuan agar tesis ini terus bermanfaat dapat tertunaikan dengan baik.

Bapak Dr. Abdul Samik, M.Si., Drh., selaku ketua komisi penguji, Bapak Dr. Thomas V. Widijatno, M.Si., Drh., serta Bapak Prof. Dr. Pudji Sianto, M.Kes., Drh., selaku anggota penguji atas segala bimbingan, kritik, serta saran yang sangat bermanfaat dan banyak membantu penulis untuk menyempurnakan tesis ini.

Ibu Prof. Dr. Wurlina, MS., Drh., selaku dosen wali sekaligus ketua program studi Ilmu Biologi Reproduksi yang selama ini banyak meluangkan waktu kepada penulis serta memberikan bimbingan dan dukungan untuk terus dapat berprestasi dan bermanfaat baik dalam prestasi akademik, non akademik maupun berorganisasi.

Seluruh bapak dan ibu dosen pengajar atas wawasan keilmuan serta pengalaman belajar selama penulis mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Bapak dan Ibu staff kependidikan, Bagian Kemahasiswaan, Bagian Akademik, Bagian Keuangan, Bagian Tata Usaha dan Kerumahtanggaan serta Bagian Sistem Informasi yang telah banyak membantu selama penulis belajar di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Ayahanda, Drs. H. Abdul Adhim dan Ibunda, Hj. Umanah Titik Faridi yang telah memberikan dukungan, bimbingan, pengorbanan, serta kasih sayang bagi penulis dari kecil sampai saat ini yang tak terhingga dan senantiasa memberikan motivasi bagi penulis untuk terus bisa bermanfaat bagi sesama. Tak

lupa juga kepada adik, saudara serta sanak keluarga yang juga banyak memberikan dukungan bagi penulis.

Nowo Siswo Yuworo, Drh., Ragil Angga Prastiya, Drh., Amung Logam Saputro, Drh., Kartika Eka Paksi, Drh., yang telah menemani perjalanan penelitian dari awal sampai akhir.

Semua teman-teman angkatan 2008, alumni sejawat Dokter Hewan angkatan 151, para mahasiswa S2 IBR dan keluarga besar FKH Unair serta seluruh civitas akademika yang telah banyak memberikan dukungan kepada penulis.

Teman-teman seperjuangan keluarga mahasiswa, BLM, BEM, IMAKAHI, KMPV TB, KMPV UBUR, KMPV PW, JMV, SKK, SKP yang senantiasa harmonis dalam kebhinnekaan untuk tujuan memajukan kehidupan kampus veteriner yang selalu lebih baik dan menjadi yang terbaik.

Anton Sulistiono, Drh., Trianto Nur Abdullah, Drh., Wahyu Dharmawan, Drh., Raden Deny Jaya Triatma, Drh., Ilham Wahid, Dr., Helmi Adhitya, Drh., Saiful Amin, Drh., Taufik Hidayatullah, Drh., Adiarsa Nur Akbar, Drh., Dhadang Wida Putra, SKM., Bagus Syamsah Hattaka, Drh., Nanang Romadoni, S.Pd., MT., Agus Nanang, S.Kom., MT., Angga Pratomo Cahyadi, Drh., Faris Amsyari Khozin, Drh., M.Si., yang telah banyak menginspirasi lewat rumah legenda, kontrakan jenderal.

Semua pihak yang tidak disebutkan tetapi sangat membantu dalam proses pelaksanaan penelitian dan penyusunan tesis ini.

Penulis juga menyadari bahwa masih terdapat kesalahan dan kekurangan pada tesis ini, untuk itu mohon kritik dan saran yang membangun demi perbaikan di masa mendatang. Semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan semua pihak yang membutuhkan demi kemajuan dan perkembangan ilmu pengetahuan di bidang kedokteran hewan serta turut meningkatkan kualitas dan kuantitas ternak di Indonesia.

Surabaya, 20 Maret 2014

Penulis

RINGKASAN

RINGKASAN

**Potensi *Mycotoxin Binders* terhadap Jumlah Folikel, Korpus Luteum,
Ekspresi Caspase 9 Ovarium dan Morfologi Fetus Mencit (*Mus musculus*)
Bunting yang terpapar Zearalenon**

Jagung merupakan salah satu pakan berkualitas tinggi untuk memenuhi kebutuhan seiring bertambahnya laju populasi ternak di Indonesia. Namun, FAO memperkirakan bahwa 25% tanaman yang menjadi bahan pakan ternak di seluruh dunia terkontaminasi mikotoksin yang mengakibatkan kerugian ekonomi dan penurunan produktivitas ternak. Zearalenon diproduksi oleh jamur *Fusarium graminearum* yang biasanya terdapat pada jagung, sereal, oat, dan jerami. Zearalenon merupakan mikotoksin estrogen alami yang dapat menginduksi perubahan proses metabolik dan aktivitas sel dari organ uterus, hati, sumsum tulang belakang, otak, kelenjar mammae, dan sel granulosa organ ovarium. Zearalenon juga dapat memicu proliferasi sel yang tidak terkendali sehingga menginisiasi proses apoptosis jalur intrinsik. *Mycotoxin binders* mengandung bahan aktif antara lain, aluminosilikat, selulosa, polisakarida, peptidoglikan, dan polimer sintetis seperti cholestyramine, polivinilpirolidon beserta turunannya sehingga diharapkan dapat mengurangi efek zearalenon.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *mycotoxin binders* terhadap jumlah sel folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, folikel *de Graaf*, korpus luteum, ekspresi caspase 9 sel granulosa organ ovarium serta panjang, berat dan jumlah fetus mencit (*Mus musculus*) bunting yang terpapar zearalenon.

Hewan coba penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) yang telah dibuntingkan sebanyak 20 ekor yang kemudian dibagi menjadi lima perlakuan dengan masing-masing empat ulangan, yaitu (K+) tidak dipapar zearalenon dan *mycotoxin binders*, (K-) dipapar zearalenon dosis 0,1 mg/ekor/hari, (P1) dipapar zearalenon dosis 0,1 mg/ekor/hari dan *mycotoxin binders* dosis 0,5 mg/ekor/hari, (P2) dipapar zearalenon dosis 0,1 mg/ekor/hari dan *mycotoxin binders* dosis 1 mg/ekor/hari, (P3) dipapar zearalenon dosis 0,1 mg/ekor/hari dan *mycotoxin binders* dosis 2 mg/ekor/hari. Pemberian perlakuan diberikan secara peroral dengan sonde selama 10 hari. Organ ovarium yang telah difiksasi kemudian diperiksa dengan menggunakan pewarnaan hematoksilin eosin dan uji imunohistokimia. Pengukuran panjang dan penimbangan berat fetus dilakukan dengan perhitungan kuantitatif. Pengamatan dan skoring dilakukan secara mikroskopis dengan menggunakan mikroskop Olympus® CX-41 kemudian dianalisis statistik dengan uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov*. Jika terdistribusi normal akan dilakukan uji ANOVA. Apabila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji Fisher's LSD. Jika tidak terdistribusi normal akan

SUMMARY

Potential Mycotoxin Binders on Total Follicles, Corpus Luteum, Expression of Caspase 9 Ovary and Fetal Morphology in Pregnant Mice (*Mus musculus*) with Exposed Zearalenone

Corn was one of high quality feed to increase livestock production in Indonesia. However, the FAO estimates that 25% of plants into animal feed contaminated with mycotoxins worldwide resulting in economic losses and reduced productivity of livestock. Zearalenone produced by *Fusarium graminearum* is usually found on corn, cereals, oats, and hay. Zearalenone is a natural estrogen mycotoxins that can induce changes in metabolic processes and cell activity of the organs of the uterus, liver, bone marrow, brain, mammary gland, and granulose cells. Zearalenone also can trigger uncontrolled proliferation of cells that initiate the intrinsic pathway of apoptosis. Mycotoxin binders containing active ingredients, among others aluminosilicate, cellulose, polysaccharides, peptidoglycan, and synthetic polymers such as cholestyramine, polyvinylpyrrolidone and its derivatives that are expected to reduce the effect of zearalenone.

This study aims to determine the influence of mycotoxin binders on the number of cells of primary follicles, secondary follicles, tertiary follicles, follicle de Graaf, the corpus luteum, expression of caspase 9 ovarian granulose cells and length, weight and number of fetal pregnant mice (*Mus musculus*) with exposed zearalenone.

Animal research were pregnant mice (*Mus musculus*), which has as many as 20 mice which is then divided into five treatments with four replicates each, ie (K+) weren't exposed zearalenone and mycotoxin binders, (K-) exposed to a dose of zearalenone 0,1 mg/mice/day, (P1) exposed zearalenone dose of 0.1 mg/mice/day and mycotoxin binders dose of 0.5 mg/mice/day, (P2) zearalenone exposed dose of 0.1 mg/mice/day and mycotoxin binders dose of 1 mg/mice/day, (P3) is exposed to a dose of zearalenone 0.1 mg /mice/day and mycotoxin binders dose of 2 mg/mice/day. Provision of treatment administered orally for 10 days with the sonde. Ovarian organ that has been fixed and then examined using hematoxylin eosin staining and immunohistochemistry test. Measurement of fetal length and weighing is done by quantitative calculation. Observations and scoring is done microscopically using a microscope Olympus® CX-41 and then analyzed statistically with the Kolmogorov-Smirnov normality test. If normally distributed will be conducted with ANOVA test. If there is a real difference followed by Fisher's LSD test. If not normally distributed will be performed Kruskal-Wallis test. If there is a real difference followed by Mann-Whitney test.

Statistical test results showed that mycotoxin binders dose of 2 mg/mice/day of total tested zearalenone can eliminate the influence of the number

of follicles but had no effect on the amount of the corpus luteum. Decreased expression of caspase 9 was shown by all doses of mycotoxin binders. Mycotoxin binders dose of 1 mg/mice/day can eliminate the influence zearalenone to increase the length and weight of the fetus, but does not affect the number of fetuses.

Zearalenone was metabolized in the liver can result metabolite isomers α and β Zearalenol. Both of these isomers have resorcylic acid lactone structure that binds to the estrogen receptor (E_2) formed E_2 Receptor Complex Zearalenone ($ZEA-E_2R$). $ZEA-E_2R$ activate mRNA response that would impede the process of mitosis granulosa Cumulus Cells (GCs). GCs will evolve to form layers of granulosa cells mature and produce several cytokines such as Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), Fibroblastic Growth Factor Family-2 (FGF-2), and Stem Cell Factor (SCF). IGF-1 plays an important role in sending impulses to the anterior pituitary to release all follicles FSH as the initiator of proliferation. Influx of exogenous estrogen with endogenous estrogen levels will cause hiperestrogenisme conditions. Hiperestrogenisme would disrupt the consistency Permeability Transmissible Pore (PTP) in the mitochondrial membrane that initiates the intrinsic pathway of apoptosis. Caspase 9 acts as an initiator of apoptosis would trigger feedback dimerized by inhibiting the release of bcl 2 and binds procaspase 3 to activate caspase 3 to be fragmented DNA. The final result in the fragmentation of apoptotic bodies will be formed which will fagositosis by macrophages. Apoptosis that occurs in the inner cell and mast cell tropoblast during the blastocyst phase can result in malformations, low birth weight and cretinism in the fetus. Mechanism of action of mycotoxin binders to eliminate methyl group on the chemical structure zearalenone. Mycotoxin binders also contain feed additive compounds, charcoal, biotin, thiamine, aluminosilicate, and vitamins C and E, which are antioxidants to reduce the impact of exposure to residues of mycotoxins.

Based on the research that has been done, it can be concluded that the mycotoxin binders can increase the number of follicles, but had no effect on the amount of the corpus luteum. Mycotoxin binders can reduce the expression of caspase 9 organs ovaries of pregnant mice (*Mus musculus*) with exposed zearalenone. Mycotoxin binders can increase the length and weight of the fetus, but no effect on the number of fetal pregnant mice (*Mus musculus*) with exposed zearalenone.

Suggestions may be recommended in order to do research on potential mycotoxin binders on the physiology and pathology of testicular organs, dexter et sinister ovaries, placenta foetalis, testosterone, estrogen levels, and the levels of ROS both male and female animals exposed zearalenone. Research is also needed to further the potential of mycotoxin binders on the mycotoxins aflatoxin, deoksinivalenol, fumonisin, and ochratoxin.

**POTENTIAL MYCOTOXIN BINDERS ON TOTAL FOLLICLES,
CORPUS LUTEUM, EXPRESSION OF CASPASE 9 OVARY
AND FETAL MORPHOLOGY IN PREGNANT
MICE (*MUS MUSCULUS*) WITH
EXPOSED ZEARALENONE**

Muhammad Thohawi Elziyad Purnama

ABSTRACT

Zearalenone is a resorcylic acid lactone compound that is produced by fungal *Fusarium graminearum* infection of edible grains and is believed to influence reproduction by binding to estrogen receptors. This study examined the potential of mycotoxin binders to eliminate the effect of zearalenone on the total follicles, corpus luteum, expression of caspase 9 ovaries as well as the amount of length and weight of fetus in pregnant mice (*Mus musculus*). We analyzed 20 pregnant mice specimens randomly divided into 5 groups. All groups were given treatment per oral with sonde till 10 days. K+ as positive control weren't treated zearalenone and mycotoxin binders, K- as negative control were treated with zearalenone 0,1 mg/mice/day, P1 were treated with zearalenone 0,1 mg/mice/day and mycotoxin binders 0,5 mg/mice/day, P2 were treated with zearalenone 0,1 mg/mice/day and mycotoxin binders 1 mg/mice/day, P3 were treated with zearalenone 0,1 mg/mice/day and mycotoxin binders 2 mg/mice/day. The data was analyzed by ANOVA test. If there is a significant followed by Fisher's LSD test. The result showed that the amount of total follicles had a significant difference ($p < 0,05$) between K- with P3. The result of corpus luteum showed not significant difference ($p > 0,05$) between K+, K-, P1, and P2. The other result showed that the amount of caspase 9's expression had a significant difference ($p < 0,05$) between K- with K+, P1, P2, and P3. The result of length and weight had a significant difference ($p < 0,05$) between K- with P2, P3. The conclusion in this study, mycotoxin binders was effective to eliminate zearalenone exposure.

Keywords : Mycotoxin binders, Zearalenone, Pregnant mice, Ovarian histology, Caspase 9.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL DALAM.....	ii
PRASYARAT GELAR.....	iii
PERNYATAAN.....	iv
PERSETUJUAN	v
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
RINGKASAN	xi
SUMMARY	xiii
ABSTRACT	xv
DAFTAR ISI	xvi
DAFTAR TABEL	xix
DAFTAR GAMBAR	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xxii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xxiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Permasalahan.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Hasil Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Teoritis	5
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 <i>Mycotoxin Binders</i>	6
2.2 Zearalenon	7
2.2.1 Sifat Fisik dan Kimia Zearalenon.....	7
2.2.2 Sumber Zearalenon.....	8
2.2.3 Pengaruh Paparan Zearalenon	9
2.3 Apoptosis	10
2.4 Ovarium.....	13
2.4.1 Anatomi dan Fisiologi Ovarium.....	13
2.4.2 Folikulogenesis.....	14
2.5 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	16
2.5.1 Taksonomi Mencit (<i>Mus musculus</i>)	16
2.5.2 Data Biologis Mencit (<i>Mus musculus</i>)	17
2.5.3 Sistem Reproduksi Mencit (<i>Mus musculus</i>)	18
2.5.4 Kebuntingan Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	20
2.6. Uji Imunohistokimia.....	21

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	23
3.1 Kerangka Konseptual	23
3.2 Hipotesis Penelitian	27
BAB 4 MATERI DAN METODE	28
4.1 Jenis Rancangan Penelitian	28
4.2 Populasi, Sampel dan Besar Sampel	28
4.2.1 Populasi	28
4.2.2 Sampel	29
4.2.3 Besar Sampel	29
4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel.....	30
4.3.1 Variabel Bebas (<i>Independent variable</i>).....	30
4.3.2 Variabel Tergantung (<i>Dependent variable</i>).....	30
4.3.3 Variabel Kendali.....	31
4.3.4 Definisi Operasional Variabel	31
4.4 Bahan Penelitian	33
4.5 Peralatan Penelitian	33
4.6 Waktu dan Tempat Penelitian	34
4.7 Prosedur Penelitian	34
4.7.1 Prosedur Induksi Birahi Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	34
4.7.2 Prosedur Pengawinan Mencit (<i>Mus musculus</i>)	35
4.7.3 Prosedur Pemberian <i>Mycotoxin Binders</i> dan Zearalenon..	35
4.7.4 Prosedur Pembedahan Hewan Coba dan Pengambilan Sampel	36
4.7.5 Identifikasi Ekspresi Caspase 9 dengan Uji Immunohistokimia.....	36
4.7.6 Pengamatan Gambaran Histologis Ovarium dengan Pewarnaan Hematoksin Eosin.....	37
4.7.7 Pengukuran Panjang, Penimbangan Berat Badan dan Perhitungan Jumlah Fetus	38
4.8 Analisis Data	38
4.9 Kerangka Operasional Penelitian	39
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	40
5.1 Jumlah Folikel	41
5.1.1 Folikel Primer.....	41
5.1.2 Folikel Sekunder.....	42
5.1.3 Folikel Tersier	43
5.1.4 Folikel <i>de Graaf</i>	43
5.1.5 Korpus Luteum.....	45
5.2 Ekspresi Caspase 9	47
5.3 Panjang Fetus.....	51
5.4 Berat Fetus.....	51
5.5 Jumlah Fetus.....	52
BAB 6 PEMBAHASAN	53

6.1 Jumlah Folikel	53
6.2 Ekspresi Caspase 9	57
6.3 Panjang, Berat dan Jumlah Fetus.....	58
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	62
7.1 Kesimpulan.....	62
7.2 Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN	71

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Data biologis mencit (<i>Mus musculus</i>).....	17
4.1 Metode skoring ekspresi caspase 9 dengan uji imunohistokimia	32
5.1 Rata-rata dan <i>standart deviasi</i> pengamatan jumlah folikel, korpus luteum dan caspase 9	40
5.2 Rata-rata dan <i>standart deviasi</i> pengamatan panjang, berat, dan jumlah fetus.....	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur kimia zearalenon	7
2.2 Jagung yang terinfeksi <i>Fusarium graminearum</i>	8
2.3 Mekanisme apoptosis jalur intrinsik dan ekstrinsik.....	11
2.4 Mekanisme apoptosis jalur ekstrinsik.....	12
2.5 Mekanisme apoptosis jalur intrinsik	13
2.6 Histologis ovarium.....	14
2.7 Histologis folikel <i>de Graaf</i>	15
2.8 Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	19
3.1 Kerangka konseptual penelitian.....	26
4.1 Kerangka operasional penelitian.....	39
5.1 Diagram batang jumlah folikel primer.....	42
5.2 Diagram batang jumlah folikel sekunder	42
5.3 Diagram batang jumlah folikel tersier	43
5.4 Diagram batang jumlah folikel <i>de Graaf</i>	44
5.5 Diagram batang jumlah korpus luteum.....	44
5.6.1 Gambaran histologis ovarium pada kontrol positif (K+).....	45
5.6.2 Gambaran histologis ovarium pada kontrol negatif (K-).....	45
5.6.3 Gambaran histologis ovarium pada perlakuan 1 (P1).....	46
5.6.4 Gambaran histologis ovarium pada perlakuan 2 (P2).....	46
5.6.5 Gambaran histologis ovarium pada perlakuan 3 (P3).....	47
5.7 Diagram batang ekspresi caspase 9.....	48

5.8.1 Ekspresi sel granulosa normal pada kontrol positif (K+)	48
5.8.2 Ekspresi caspase 9 pada kontrol negatif (K-)	49
5.8.3 Ekspresi caspase 9 pada perlakuan 1 (P1)	49
5.8.4 Ekspresi caspase 9 pada perlakuan 2 (P2)	50
5.8.5 Ekspresi caspase 9 pada perlakuan 3 (P3)	50
5.9.1 Diagram batang panjang fetus	51
5.9.2 Diagram batang berat fetus	52
5.9.3 Diagram batang jumlah fetus	52
6.1 Steroidogenesis	56
6.2 Periode blastosist	60

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Tabel konversi perhitungan dosis untuk manusia dan berbagai jenis hewan	71
2 Perhitungan dosis zearalenon	72
3 Hasil pengamatan dan perhitungan jumlah folikel primer	73
4 Hasil pengamatan dan perhitungan jumlah folikel sekunder.....	74
5 Hasil pengamatan dan perhitungan jumlah folikel tersier	75
6 Hasil pengamatan dan perhitungan jumlah folikel <i>de Graaf</i>	76
7 Hasil pengamatan dan perhitungan jumlah korpus luteum	77
8 Hasil pengamatan dan skoring ekspresi caspase 9	78
9 Hasil pengukuran panjang fetus	79
10 Hasil penimbangan berat badan fetus.....	80
11 Hasil analisis statistik jumlah folikel , korpus luteum, ekspresi caspase 9, panjang, berat dan jumlah fetus.....	81
12 Jadwal kegiatan penelitian.....	97
13 Sertifikat <i>ethical clearance</i>	98
14 Dokumentasi kegiatan penelitian.....	99

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

AIF	= <i>Apoptotic-Inducing Factor</i>
ANOVA	= <i>Analysis of Variance</i>
Apaf 1	= <i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i>
Apaf 2	= <i>Apoptotic Protease Activating Factor 2</i>
ATP	= <i>Adenosin triphosphate</i>
Bax	= <i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl 2	= <i>B-cell lymphoma 2</i>
Bid	= <i>Bcl 2 Interacting Protein Domain</i>
BSA	= <i>Bovine Serum Albumine</i>
C	= karbon
C ₁₈ H ₂₆ O ₅	= zearalenon
Ca ²⁺	= kalsium
Caspase	= <i>Cystein aspartyl-specific protease</i>
CDD	= <i>Cytoplasmic Death Domain</i>
CYP450arom	= aromatase
CYP450	= sitokrom p450
CYP450-17 α	= 17 α -hidroksilase
DAB	= <i>Diaminbenzidine</i>
DHEA	= dehidroepiandrosteron
DNA	= <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
E ₂	= estrogen
ELISA	= <i>Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
FADD	= <i>Fas-Associated Death Domain</i>
FAO	= <i>Food and Agriculture Organization</i>
FasL	= <i>Fas ligand</i>
FGF-2	= <i>Fibroblastic Growth Factor Family-2</i>
FSH	= <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GCs	= <i>Granulose Cumulus Cells</i>
H ₂ O	= air
H ₂ O ₂	= hidrogen peroksida
H	= hidrogen
HCG	= <i>Human Chorionic Gonadotropin</i>
HPLC	= <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IAP	= <i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
IGF-1	= <i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
IU	= <i>International Unit</i>
K+	= kontrol positif
K-	= kontrol negatif
Kg	= kilogram
LH	= <i>Luteinizing Hormon</i>
LSD	= <i>Least Significant Difference</i>
MDA	= <i>malondialdehyde</i>

mg	= miligram
mRNA	= <i>messenger Ribonucleic Acid</i>
n	= ulangan
NaCl	= <i>Sodium Chloride</i>
O	= oksigen
P1	= perlakuan pertama
P2	= perlakuan kedua
P3	= perlakuan ketiga
p53	= <i>Protein 53</i>
PAP	= Peroksidase-Anti Peroksidase
PBS	= <i>Phosphat Buffer Saline</i>
pH	= <i>Power of Hydrogen</i>
PMSG	= <i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin</i>
ppm	= <i>part per million</i>
RAL	= Rancangan Acak Lengkap
ROS	= <i>Reactive Oxygen Species</i>
SA-HRP	= <i>Streptavidin-Horse Radish Peroksidase</i>
SCF	= <i>Stem Cell Factor</i>
SD	= Standart Deviasi
Smac	= <i>Second Mitochondria-derived Activator of caspases</i>
SPSS	= <i>Statistical Product for Solution Service</i>
t	= perlakuan
TNF	= <i>Tumor Necrotic Factor</i>
TUNEL	= <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
ZEA-E ₂ R	= <i>Zearalenone E₂ Receptor Complex</i>
3 β -HSD	= 3 β -hidroksisteroid dehidrogenase
17 β -HSD	= 17 β -hidroksisteroid dehidrogenase
α	= alfa
β	= beta
%	= persen
>	= lebih dari
<	= kurang dari
\geq	= lebih dari sama dengan
\approx	= mendekati

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pertanian merupakan salah satu bidang yang mendominasi komoditas perekonomian global dan menyediakan bahan pakan berkualitas tinggi untuk memenuhi kebutuhan seiring bertambahnya laju populasi ternak di seluruh dunia. *Food and Agriculture Organization* (FAO) memperkirakan bahwa 25% tanaman yang menjadi bahan pakan ternak di seluruh dunia terkontaminasi mikotoksin yang mengakibatkan kerugian ekonomi dan penurunan produktivitas ternak (FAO, 2007).

Lardy (2013) menyebutkan bahwa jagung merupakan bahan pakan berenergi tinggi tetapi mengandung protein yang relatif rendah jika dibandingkan dengan biji-bijian pakan yang lain. Jagung mengandung kadar protein sekitar 8,6-9,0% dan serat kasar sekitar 1,20-2,93%. Protein jagung tidak difermentasi atau didegradasi oleh mikroorganisme rumen, melainkan dicerna dan diabsorpsi di usus halus sebagai *bypass protein*. Jagung dan bungkil jagung sering digunakan sebagai bahan pakan utama ternak sapi di Indonesia. Jagung mengandung nutrisi yang cukup bagus untuk meningkatkan produksi ternak dan mudah untuk didapatkan dalam jumlah yang besar. Namun, beberapa dari jamur dapat menginfeksi jagung sehingga mengandung mikotoksin yang membahayakan ternak. Zearalenon telah ditemukan sebagai mikotoksin agen penyebab menurunnya produksi ternak sapi di Indonesia (Nuryono *et al.*, 2003).

Zearalenon diproduksi oleh jamur *Fusarium graminearum* yang biasanya terdapat pada jagung, sereal, oat, dan jerami. *Fusarium graminearum* bersifat seperti *phytoestrogen* yang dapat meningkatkan kadar hormon estrogen sehingga memicu terjadinya gangguan siklus birahi. Konsentrasi zearalenon 5-20 ppm dalam diet pakan dapat meningkatkan kejadian infertilitas pada ternak sebesar 80%. Sapi bunting yang terpapar 20 ppm zearalenon dalam diet pakan dapat mengakibatkan abortus (Nikov *et al.*, 2000; Bridges *et al.*, 2008).

Hormon estrogen saat hewan bunting berfungsi untuk menjaga elastisitas dinding endometrium pasca implantasi dan mempengaruhi pertumbuhan sel-sel epitel kelenjar mammae sebagai persiapan masa laktasi. Ternak yang mengalami hiperestrogenisme karena pengaruh zearalenon justru akan menyebabkan gangguan kebuntingan. Kadar estrogen yang melebihi progesteron dapat meningkatkan vaskularisasi dan kontraksi endometrium sehingga memungkinkan terjadi abortus (Vihma, 2003).

Maresca dan Fantini (2010) menyebutkan bahwa zearalenon merupakan mikotoksin estrogen alami yang dapat menginduksi perubahan proses metabolik dan aktivitas sel dari organ ovarium, uterus, hati, sumsum tulang belakang, otak, kelenjar mammae, dan sel-sel epitel usus. Perubahan ini sesuai dengan pendapat GajECKA *et al.* (2004) yang menyatakan adanya indikasi biotransformasi setelah masuknya zearalenon secara peroral dapat mempengaruhi sel folikel pada ovarium hewan monogastrik.

Zearalenon dapat menginduksi terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan gangguan homeostasis intraseluler. Mikotoksin zearalenon juga dapat

memicu proliferasi sel yang tidak terkendali sehingga menginisiasi proses apoptosis jalur intrinsik (Gellerich *et al.*, 2010). Jalur intrinsik melibatkan fungsi mitokondria yang dipengaruhi stres oksidatif dengan melepaskan protein dan mengaktifkan caspase ke dalam sitosol. Stres oksidatif membuat sitokrom c dirilis keluar dari mitokondria dan akan mengikat *Apoptotic Protease Activating Factor 1* (Apaf 1) dan procaspase 9 untuk mengaktifkan caspase 9 (Kumar *et al.*, 2005).

Penambahan *mycotoxin binders* diharapkan dapat mengurangi efek mikotoksin zearalenon. *Mycotoxin binders* dapat mengikat dan mencegah interaksi mikotoksin zearalenon yang telah masuk melalui sistem pencernaan. *Mycotoxin binders* mengandung bahan aktif antara lain aluminosilikat, selulosa, polisakarida, peptidoglikan, dan polimer sintesis seperti cholestyramine, polivinilpirolidon beserta turunannya (Avantaggiato *et al.*, 2005).

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut di atas, maka dilakukan penelitian potensi *mycotoxin binders* terhadap jumlah folikel, korpus luteum, ekspresi caspase 9 ovarium dan morfologi fetus mencit (*Mus musculus*) bunting yang terpapar zearalenon.

1.2 Rumusan Permasalahan

1. Apakah *mycotoxin binders* dapat mempengaruhi gambaran histologis ovarium mencit (*Mus musculus*) bunting yang terpapar zearalenon?
2. Apakah *mycotoxin binders* dapat mempengaruhi ekspresi caspase 9 ovarium mencit (*Mus musculus*) bunting yang terpapar zearalenon?

3. Apakah *mycotoxin binders* dapat mempengaruhi morfologi fetus mencit (*Mus musculus*) bunting yang terpapar zearalenon?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk membuktikan potensi *mycotoxin binders* terhadap gambaran histologis dan ekspresi caspase 9 ovarium serta morfologi fetus mencit (*Mus musculus*) bunting yang terpapar zearalenon.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh *mycotoxin binders* terhadap jumlah sel folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, folikel *de Graaf*, korpus luteum mencit (*Mus musculus*) bunting yang terpapar zearalenon.
2. Untuk mengetahui pengaruh *mycotoxin binders* terhadap ekspresi caspase 9 sel granulosa organ ovarium mencit (*Mus musculus*) bunting yang terpapar zearalenon.
3. Untuk mengetahui pengaruh *mycotoxin binders* terhadap panjang, berat dan jumlah fetus mencit (*Mus musculus*) bunting yang terpapar zearalenon.

1.4 Manfaat Hasil Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini bermanfaat sebagai model pendahuluan untuk memberikan khazanah pengetahuan baru di bidang biologi reproduksi tentang potensi *mycotoxin binders* dalam mengeliminasi mikotoksin zearalenon.

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian tentang potensi *mycotoxin binders* ini diharapkan dapat diaplikasikan masyarakat dan menjadi solusi untuk mengatasi gangguan reproduksi ternak yang ditimbulkan oleh zearalenon serta dapat meningkatkan produktivitas ternak melalui pengendalian terhadap mikotoksin yang berasal dari pakan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Mycotoxin Binders*

Mycotoxin binders mengandung bahan aktif antara lain aluminosilikat, selulosa, polisakarida, peptidoglikan, dan polimer sintesis seperti cholestyramine, polivinilpirolidon beserta turunannya (Avantaggiato *et al.*, 2005).

Evaluasi mekanisme kerja *mycotoxin binders* telah dilakukan dengan metode *in vivo* maupun *in vitro*. Metode *in vitro* menunjukkan gambaran tentang afinitas ikatan dan kapasitas terhadap mikotoksin. Metode *in vitro* juga bertindak sebagai uji biologis untuk mengukur residu bahan kimia di jaringan serta mengetahui efektivitas ikatan *mycotoxin binders* (Bailey *et al.*, 1998).

Doll *et al.* (2004) menjelaskan mekanisme kerja *mycotoxin binders* dengan mengeliminasi gugus metil pada struktur kimia zearalenon. *Mycotoxin binders* juga mengandung bahan pakan tambahan seperti *charcoal*, biotin, tiamin, serta vitamin C dan E yang bersifat antioksidan untuk menurunkan dampak paparan dari residu mikotoksin sebelum dimetabolisme tubuh. *Mycotoxin binders* juga dilengkapi dengan bahan dekontaminan yang bermanfaat dalam memperbaiki kondisi hewan (Whitlow dan Hagler, 2005).

Aluminosilikat merupakan derivat dari senyawa silikat yang dapat mengeliminasi gugus metil zearalenon. Silikat juga mempunyai derivat lain yang bisa digunakan sebagai campuran bahan pakan pendegradasi mikotoksin, yakni neosilikat, sorosilikat, inosilikat, silosilikat, filosilikat, dan tektosilikat. Silikat lain yang dapat bersifat sebagai antioksidan, yakni zeolit, bentonit, montmorilonit dan

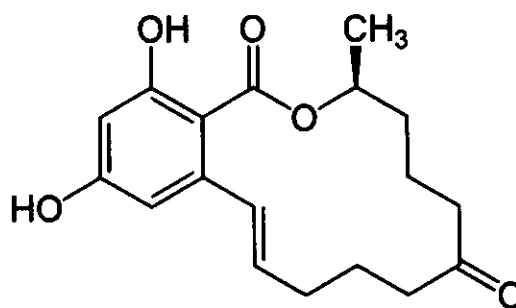
klinoptilolit telah dikembangkan menjadi bahan aktif *mycotoxin binders*. Zeolit diharapkan dapat mendegradasikan T-2 toksin, okratoksin, deoksinivalenol, dan aflatoksin (Abdel-Wahhab *et al.*, 2005).

Yiannikouris *et al.* (2004) menyebutkan bahwa *feed additive* dapat pula dicampurkan sebagai bahan penyusun *mycotoxin binders*, yakni β -D-glukan. β -D-glukan disintesis dari dinding sel *Saccharomyces cerevisiae* yang dapat bertindak sebagai absorben zearalenon. Dalam *mycotoxin binders* yang diproduksi oleh industri pakan ternak sering dijumpai kandungan asam amino lisin, aspartat dan propionat sebagai *feed additive*.

2.2 Zearalenon

2.2.1 Sifat Fisik dan Kimia Zearalenon

Zearalenon dikenal dengan nama kimia *(3S,11E)-14,16-dihydroxy-3-methyl-3, 4, 5, 6, 9, 10-hexahydro-1H-2-benzoxacyclotetradecine-1, 7(8H)-dione*. Nama kimia ini juga disebut dengan *6-(6, 10-dihydroxyundecyl)- β -resorcylic acid- μ -lacton*. Zearalenon memiliki rumus molekul $C_{18}H_{22}O_5$, berat molekul 322,40 Dalton dan molaritas 318,36 gram/mol (Baldwin *et al.*, 1983).



Gambar 2.1 Struktur kimia zearalenon
Sumber : Doric *et al.*, 2007

Ada enam senyawa yang berhubungan dengan zearalenon dan metabolitnya, yaitu zeranol, α zearalanon, β zearalanon (taleranol), α zearalenol, β zearalenol, dan mikotoksin zearalenon. Keenam senyawa metabolit ini sangat reaktif bila ikut kedalam proses metabolisme tubuh (Baldwin *et al.*, 1983; Leffers *et al.*, 2001; Malekinejad *et al.*, 2006).

Malekinejad *et al.* (2006) juga menjelaskan penempatan *active site* reseptor estrogen oleh zearalenon yaitu dengan cara yang mirip dengan estrogen, seperti cincin phenol yang menempati area yang sama dengan cincin metil yang berdekatan dengan cincin C18 dari estrogen.

2.2.2 Sumber Zearalenon

Zearalenon merupakan mikotoksin estrogen alami dan merupakan *resorcylic acid lactone* yang mempunyai efek estrogenik. Zearalenon adalah hasil metabolit dari *mycoestrogen* yang dikultur dari jamur *Fusarium graminearum* (Whitten *et al.*, 2002).



Gambar 2.2 Jagung yang terinfeksi *Fusarium graminearum*
Sumber : Nuryono *et al.*, 2003

Jamur *Fusarium graminearum* banyak ditemukan pada jagung, sereal, oat, dan jerami. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Nuryono *et al.* (2003) yang menyebutkan bahwa kandungan zearalenon pada jagung lebih besar dari 85,7% dengan uji *Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay* (ELISA) dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

2.2.3 Pengaruh Paparan Zearalenon

Fusarium graminearum bersifat *phytoestrogen* yang dapat meningkatkan kadar estrogen. Zearalenon dapat mengikat reseptor estrogen (E_2) secara *in vitro* dan memiliki dampak signifikan terhadap sistem reproduksi. Kelebihan kadar estrogen dalam tubuh dapat memicu aktivitas karsinogenik dan menginduksi limfositosis pada jaringan limfe kelenjar timus (Doric *et al.*, 2007).

Babi jantan yang mengalami hiperestrogenisme dapat menurunkan motilitas dan kapasitas sperma. Kondisi hiperestrogenisme juga dapat mengakibatkan siklus birahi yang abnormal dan hipertrofi ovarium pada babi betina. Gejala vaginitis, menurunnya angka konsepsi bahkan kejadian abortus juga sering ditemukan pada sapi yang mengalami hiperestrogenisme (Bridges *et al.*, 2008).

Secara molekuler kondisi hiperestrogenisme yang disebabkan oleh zearalenon dapat menghadirkan stres oksidatif dan menginduksi apoptosis jalur intrinsik dalam mitokondria. Kegagalan fungsi mitokondria dapat menjadi pemicu masuknya Ca^{2+} ekstrasel menuju ke intrasel yang diikuti hilangnya kemampuan transfer elektron dan sintesis ATP. Hambatan sintesis ATP secara sistemik akan

menurunkan daya *sodium potassium pump* yang mengakibatkan ketidakseimbangan elektrolit ekstrasel dan intrasel (Kiliańska dan Miśkiewicz, 2003; Maresca dan Fantini, 2010).

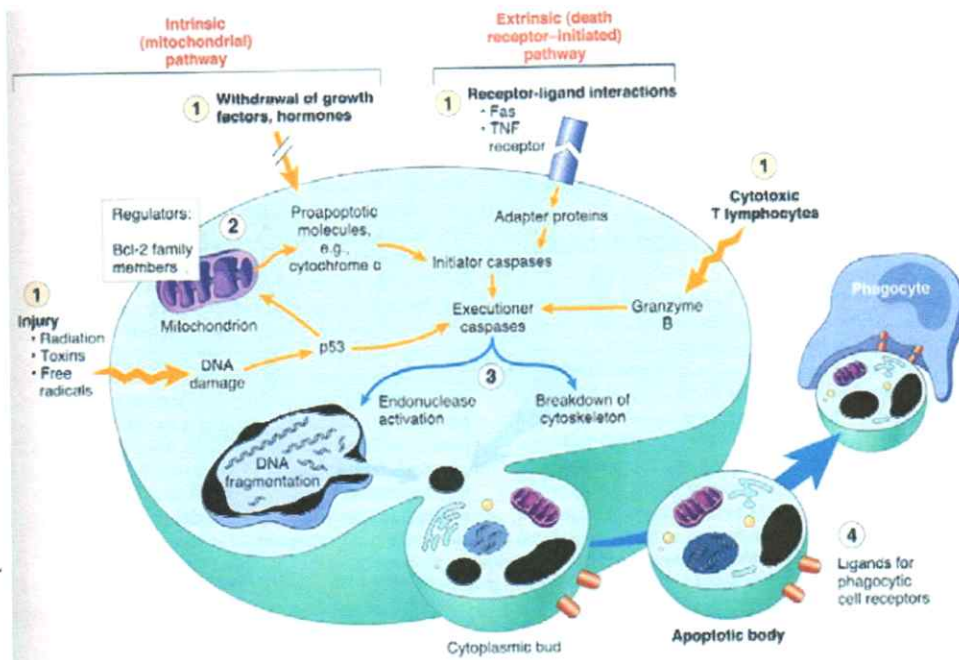
2.3 Apoptosis

Menurut Thompson (1995) apoptosis merupakan kematian sel terprogram yang dapat melalui mekanisme genetik dan dapat terjadi secara fisiologis maupun patologis. Pendapat tersebut didukung oleh Zhou dan Elledge (2000); Engelberg *et al.* (2006) yang menyebutkan bahwa apoptosis merupakan kematian sel terprogram yang terjadi baik pada organisme uniseluler maupun multiseluler dan bertujuan antara lain untuk menghilangkan sel yang rusak atau tidak memiliki fungsi fisiologis bagi tubuh.

Proses apoptosis dimulai dengan terjadinya pepadatan inti kromatin dan beragregasi ke perifer hingga mengalami kondensasi benang-benang kromatin. Perubahan bentuk DNA yang mengalami fragmentasi akan membentuk nukleosom melalui aktivitas endonuklease yang disebut *apoptotic bodies*. *Apoptotic bodies* berukuran kecil dan tanpa disertai gambaran pecahnya membran sel sehingga tidak dapat memicu proses inflamasi. *Apoptotic bodies* akan difagosit oleh makrofag secara cepat dan menghilang dari jaringan (Baraas, 2006; Kumar *et al.*, 2005).

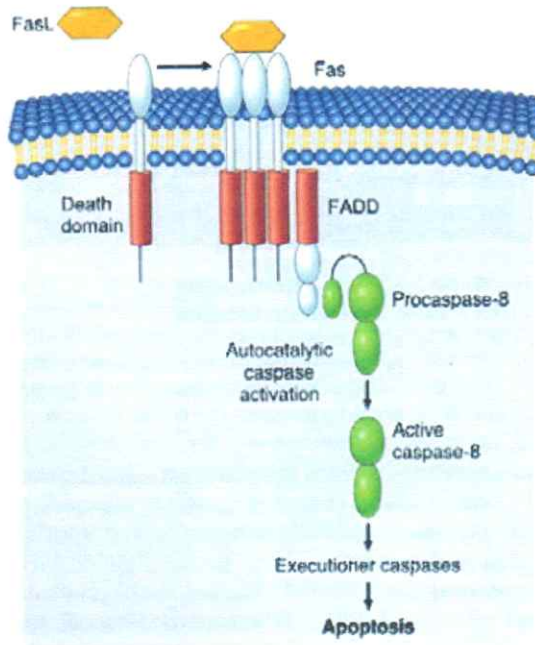
Apoptosis sel memberikan sinyal yang diperantarai oleh beberapa gen yang mengkode protein yakni enzim protease yang disebut caspase (*cystein aspartyl-specific protease*). Caspase diperlukan sebagai inisiator dan efektor

apoptosis serta terlibat dalam gambaran morfologi dan biokimia apoptosis. Apoptotik protein lain berupa molekul protein adaptor dan protein regulator yang bekerja efektif seperti bax dan bcl 2 (Kumar *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2008).



Gambar 2.3 Mekanisme apoptosis jalur intrinsik dan ekstrinsik
Sumber : Kumar *et al.*, 2005

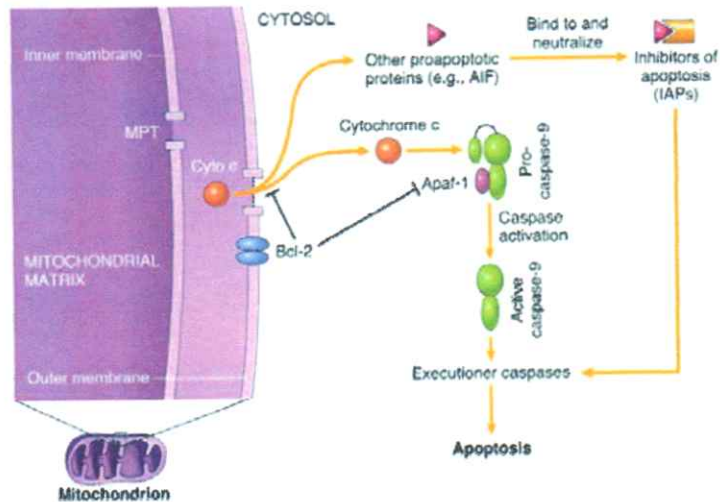
Apoptosis terjadi melalui dua jalur, yakni jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik. Jalur ekstrinsik diinisiasi oleh *death receptors* kelompok *Tumor Necrotic Factor* (TNF) yang terdiri dari domain sitoplasmik disebut *death domain*. *Death domain* akan mengirimkan sinyal apoptosis melalui *TNF receptor type 1* dan terhubung dengan sebuah protein Fas (CD95) yang akan berikatan dengan *Fas Ligand* (FasL). *Cytoplasmic Death Domain* (CDD) membentuk *binding site* sebagai adapter protein *Fas-Associated Death Domain* (FADD). Protein FADD akan berikatan dengan procaspase 8 untuk mengaktifkan caspase 8 (Kumar *et al.*, 2005; Lumongga, 2008).



Gambar 2.4 Mekanisme apoptosis jalur ekstrinsik
Sumber : Kumar *et al.*, 2005

Jalur intrinsik melibatkan fungsi mitokondria dengan melepaskan protein yang mengaktifkan caspase ke dalam sitosol. *Growth factor* dan sitokin dapat merangsang pembentukan protein bcl 2 yang berfungsi sebagai regulasi apoptosis. Pada saat terjadi stress, bcl 2 menurun dan digantikan proapoptotik protein seperti bax, bak, dan bim serta diikuti meningkatnya permeabilitas mitokondria. Proapoptotik protein lain seperti *Apoptotic-Inducing Factor* (AIF), *Second Mitochondria-derived Activator of caspases* (Smac) akan meningkatkan aktivasi caspase dengan mengikat *Inhibitor of Apoptosis Protein* (IAP). Caspase akan memecah bcl 2 *interacting protein domain* (Bid) menjadi Bid c, yang selanjutnya akan menuju mitokondria sebagai pemicu rilisnya sitokrom c. Rilisnya sitokrom c ke dalam sitosol akan mengikat *Apoptotic Protease Activating Factor 1* (Apaf 1) bersama dengan dATP dan procaspase 9 untuk mengaktifkan caspase 9. Kemudian caspase 9 melakukan pembelahan atau pemisahan yang akan mengikat

procaspase 3 untuk mengaktifkan caspase 3 (Kumar *et al.*, 2005; Lumongga, 2008).



Gambar 2.5 Mekanisme apoptosis jalur intrinsik
Sumber : Kumar *et al.*, 2005

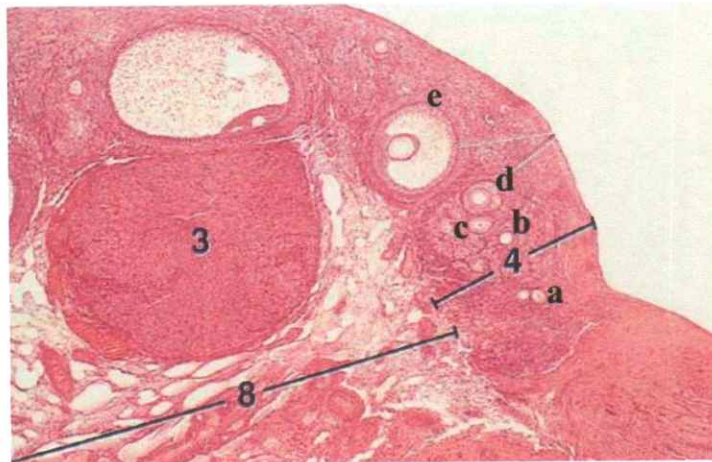
2.4 Ovarium

2.4.1 Anatomi dan Fisiologi Ovarium

Ovarium adalah organ reproduksi primer betina. Ovarium memiliki dua fungsi, yakni fungsi reproduksi untuk menghasilkan ovum dan fungsi endokrin untuk mensekresikan hormon-hormon kelamin betina seperti estrogen dan progesteron (Ismudiono dkk., 2010^a).

Ovarium pada mamalia berjumlah sepasang yang tergantung oleh mesovarium. Ovarium memiliki permukaan yang licin sebelum terjadinya ovulasi secara teratur dan mempunyai warna keabu-abuan sampai merah muda. Setelah mencapai pubertas, permukaan ovarium menjadi tidak rata karena terbentuk banyak folikel yang baru maupun folikel yang telah dewasa. Bentuk ovarium bervariasi tergantung spesies hewan. Pada golongan mamalia, ovarium terletak di

dalam rongga pelvis sehingga organ ini sangat terlindungi dari kemungkinan kerusakan yang disebabkan oleh faktor luar (Ismudiono dkk., 2010^a).



Gambar 2.6 Histologis ovarium

Keterangan : a. Folikel primordial, b. Folikel primer, c. Folikel sekunder, d. Folikel tersier, e. Folikel *de Graaf*, 3. Korpus luteum, 4. Korteks, 8. Medulla

Sumber : William dan Linda, 2000

Ovarium ini bisa berubah-ubah letaknya karena ada kebuntingan, penambahan umur, dan terdesak oleh organ tubuh sekitar. Ovarium terdiri dari bagian medulla yang mengandung banyak pembuluh darah, saraf, pembuluh limfe, dan jaringan ikat fibroblast. Sedangkan bagian korteks terdiri dari sel-sel folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, folikel *de Graaf*, korpus luteum, dan korpus albikan (Ismudiono dkk., 2010^a).

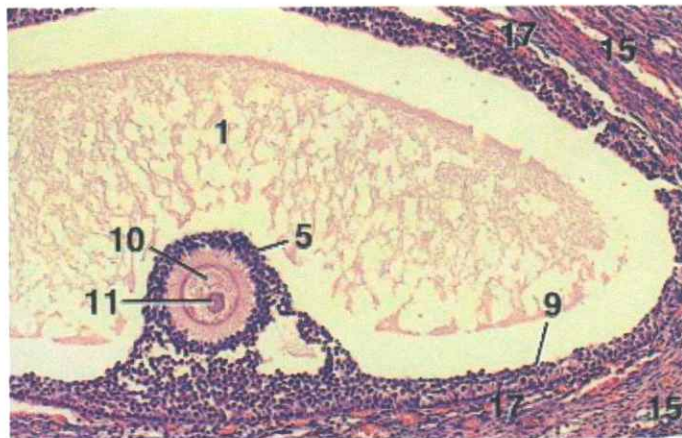
2.4.2 Folikulogenesis

Folikulogenesis merupakan proses pembentukan folikel. Jumlah folikel berkembang selama siklus birahi dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti spesies hewan, fase reproduksi, keadaan lingkungan, umur, induk, dan genetik. Folikulogenesis meliputi perubahan ukuran dan jumlah sel granulosa,

pertumbuhan sel teka, posisi telur yang dikelilingi sel kumulus oophorus dan peningkatan volume cairan rongga folikel (Ismudiono dkk., 2010^b).

Pematangan folikel dimulai dari folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, dan folikel *de Graaf*. Folikel primer terdiri atas sel telur yang dikelilingi selapis sel granulosa. Pada folikel primer, ovum tidak terbungkus oleh membran vitelin (Ismudiono dkk., 2010^b).

Folikel sekunder bentuknya lebih besar dengan sel granulosa lebih banyak. Folikel ini sudah terbungkus oleh membran vitelin dan membran yang sangat tebal di lapisan luar yakni zona pellusida. Folikel tersier ditandai dengan banyaknya sel-sel granulosa sehingga tampak lebih besar dan terletak sedikit menjauhi korteks ovarium. Folikel tersier juga sudah terbentuk suatu ruangan yang disebut antrum dan berisi cairan folikuler atau liquor folikuli (Ismudiono dkk., 2010^b).



Gambar 2.7 Histologis folikel *de Graaf*

Keterangan : 1. Antrum, 5. Kumulus oophorus, 9. Membran granulosa, 10. Oosit, 11. Nukleus, 15. Teka eksterna, 17. Teka interna

Sumber : William dan Linda, 2000

Folikel *de Graaf* merupakan bentuk terakhir dari perkembangan folikel dan hanya terjadi beberapa saat menjelang estrus. Pada folikel *de Graaf* terlapis oleh massa sel kumulus oophorus. Ovum bersama dengan massa sel menonjol ke dalam ruang antrum yang penuh cairan folikuler. Massa sel granulosa yang membungkus dan terletak paling dekat oosit disebut korona radiata. Setelah sel-sel granulosa terdapat lapisan sel teka eksterna dan teka interna, serta selapis membrana basalis (William dan Linda, 2000; Ismudiono dkk., 2010^b).

Proses folikulogenesis membutuhkan hormon *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH). Sel granulosa mempunyai reseptor hormon FSH sedangkan sel teka memiliki reseptor LH. LH dapat mempengaruhi sel teka mensintesis hormon androgen dalam bentuk androstendion dan testosteron, sedangkan sintesis hormon estrogen terjadi dari proses aromatisasi hormon androgen di dalam sel granulosa dibawah pengaruh FSH. Reseptor FSH pada sel granulosa menandai akhir stadium folikel tersier. Banyak folikel yang telah berkembang menjadi folikel tersier mengalami atresia, kecuali bila di dalam darah terdapat kadar hormon gonadotropin, terutama LH yang cukup tinggi sehingga dapat mendorong folikel berkembang ke stadium preovulatori (Liben, 2003).

2.5 Mencit (*Mus musculus*)

2.5.1 Taksonomi Mencit (*Mus musculus*)

Klasifikasi mencit (*Mus musculus*) menurut Linnaeus (1758) adalah :

Kingdom : Animalia

Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Mammalia
Subclass	: Theria
Ordo	: Rodentia
Family	: Muridae
Genus	: <i>Mus</i>
Spesies	: <i>Mus musculus</i>

2.5.2 Data Biologis Mencit (*Mus musculus*)

Menurut Sarwono (2009), data biologis mencit dapat dilihat pada tabel 2.1 sebagai berikut :

Tabel 2.1 Data biologis mencit (*Mus musculus*)

Lama hidup	1-2 tahun, bisa sampai 3 tahun
Lama produksi ekonomis	9 bulan
Lama bunting	17-21 hari
Kawin sesudah beranak	1 sampai 24 jam
Umur disapih	21 hari
Umur dewasa	35 hari
Umur dikawinkan	8 minggu (jantan dan betina)
Siklus kelamin	Poliestrus
Siklus estrus (birahi)	4-5 hari
Lama estrus	12-14 jam
Perkawinan	Pada waktu estrus
Ovulasi	Dekat akhir periode estrus, spontan
Fertilisasi	2 jam sesudah kawin
Berat dewasa	20-40 gram jantan, 18-35 gram betina
Berat lahir	0,5-1,0 gram
Jumlah anak	Rata-rata 6, bisa 15
Perkawinan kelompok	4 betina dengan 1 jantan
Kecepatan tumbuh	1 gram/hari
Aktivitas	Nocturnal

2.5.3 Sistem Reproduksi Mencit (*Mus musculus*) Betina

Sistem reproduksi mencit betina terdiri dari sepasang ovarium sebagai tempat menghasilkan telur, oviduk sebagai tempat terjadinya fertilisasi, bentuk uterus dupleks, serviks uteri, vagina, vulva, kelenjar klitoris, dan lima pasang kelenjar mammae (Kusumawati, 2004).

Birahi adalah saat dimana hewan betina bersedia untuk menerima pejantan untuk berkopulasi. Kopulasi itu merupakan awal dari terjadinya proses fertilisasi *in vivo* yang dapat menghasilkan kebuntingan (Ismudiono dkk., 2010^c). Pada umumnya siklus birahi pada mencit dapat dibagi dalam empat fase yaitu, proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus. Perubahan-perubahan yang terjadi pada setiap fase dapat dilihat dari tingkah laku maupun dengan melihat perubahan vagina secara mikroskopis. Lama siklus birahi mencit antara 4-5 hari (Hafez, 2000^a).

Fase proestrus yang disebut fase persiapan ditandai dengan adanya penambahan jumlah folikel. Pada mencit fase proestrus berlangsung selama 12 jam. Pada fase ini terjadi perubahan tingkah laku secara umum yaitu hewan mau didekati meskipun belum mau kopulasi. Perubahan pada alat kelamin luar tampak mulai ada peningkatan vaskularisasi pembuluh darah (Hafez, 2000^a).

Fase estrus merupakan fase terpenting dalam siklus birahi karena dalam fase ini hewan mau menerima pejantan untuk kopulasi, hal ini disebabkan karena pengaruh estrogen yang berasal dari ovarium sehingga menunjukkan pola tingkah laku yang khas pada berbagai hewan. Folikel *de Graaf* mengalami perbesaran dan pematangan fase ini berlangsung selama kurang lebih 12 jam. Puncak fase estrus

ini dimulai tiga jam pertama dan akan terbentuk *vaginal plug* 16-48 jam setelah terjadi kopulasi (Hafez, 2000^a).

Fase metestrus merupakan fase yang terjadi setelah fase estrus selesai. Pada mencit biasanya berlangsung selama 21 jam. Pada ovarium akan membentuk korpus hemoragikum yang menunjukkan ovum telah keluar dari folikel *de Graaf*. Dinding endometrium menjadi lebih elastis dan menghasilkan cairan kental seperti gelatin untuk menyumbat serviks uteri (Hafez, 2000^a).

Fase diestrus merupakan periode terakhir dan paling lama dalam siklus birahi dengan ditandai tidak ada aktivitas kelamin dan hewan dalam kondisi tenang. Periode permulaan diestrus, korpus hemoragikum mengkerut dan membentuk korpus luteum yang kemudian menghasilkan progesteron. Fase ini berlangsung selama 56 jam (Hafez, 2000^a).

Mencit sangat mudah beradaptasi dengan perubahan yang dibuat manusia, bahkan jumlahnya yang cepat bertambah karena tingkat perkembangbiakannya yang tinggi. Mencit tergolong hewan yang mudah dipegang dan dikendalikan saat perlakuan tentunya dengan proses *handling and restrain* yang benar (Kusumawati, 2004).



Gambar 2.8 Mencit (*Mus musculus*)
Sumber : Maryanto, 2005

Sama halnya seperti tikus putih, mencit juga mempunyai ciri-ciri khas baik secara morfologi maupun fisiologisnya. Hewan ini terkenal agak buas, namun mudah ditangani, takut cahaya, dan aktif pada malam hari (*nocturnal*). Mencit kadang-kadang mempunyai sifat kanibalisme (Kusumawati, 2004).

2.5.4 Kebuntingan Mencit (*Mus musculus*)

Kebuntingan diawali dari proses fertilisasi spermatozoa dengan ovum pada ampula dari tuba falopii. Setelah mengalami masa kawin, mencit betina akan tampak bentukan *vaginal plug* yang menandakan bahwa telah terjadi fertilisasi. Kebuntingan mencit akan berlangsung selama 17-21 hari sampai fetus dilahirkan. Bentuk morfologi abdomen mencit akan tampak semakin membesar karena penambahan volume uterus selama kebuntingan disertai dengan meningkatnya viskositas cairan amnion dan alantois untuk melindungi fetus (Hafez, 2000^c).

Korpus luteum berperan penting dalam menghasilkan progesteron untuk memelihara proses kebuntingan. Keberadaan plasenta yang menghasilkan estrogen juga berpengaruh dalam menjaga elastisitas endometrium dan mempersiapkan pembelahan sel epitel kelenjar mammae hingga masa laktasi. Kadar estrogen akan meningkat seiring dengan pertumbuhan plasenta menjelang partus untuk menginduksi kontraksi uterus. Regresi korpus luteum akan terjadi menjelang partus sehingga menurunkan kadar progesteron (Hafez, 2000^b).

2.6 Uji Imunohistokimia

Uji imunohistokimia adalah suatu uji diagnostik yang spesifik dan saat ini telah banyak digunakan karena ketersediaan antibodi monoklonal dan dapat digunakan dalam berbagai penelitian. Uji imunohistokimia dapat digunakan pada tingkat jaringan dan sel. Uji imunohistokimia digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen seluler menggunakan prinsip ikatan antigen-antibodi yang ditandai dengan penanda atau *marker* yang dapat divisualisasikan dengan mikroskop cahaya (Nurhidayat, 2002; Rantam, 2003).

Antibodi yang baik digunakan dalam pemeriksaan imunohistokimia adalah antibodi monoklonal. Antibodi monoklonal merupakan antibodi murni yang mengandung satu jenis antibodi untuk satu sisi antigenik (epitop) yang khas dari antigen tersebut sehingga tidak memungkinkan adanya reaksi silang dengan antigen yang lain (Nurhidayat, 2002).

Uji imunohistokimia dapat dilakukan melalui metode *direct* dan *indirect*. Metode *direct* merupakan metode langsung menggunakan satu antibodi yang berlabel sedangkan metode *indirect* menggunakan dua antibodi (primer dan sekunder). Antibodi sekunder merupakan antibodi yang dilabel dengan penanda (*marker*) yang dapat memvisualisasikan keberadaan antigen (Rantam, 2003; Ramos-Vara, 2005).

Menurut Hsu *et al.* (1981) teknik yang digunakan dalam uji imunohistokimia secara umum adalah metode *avidin-biotin complex*. Teknik uji imunohistokimia menggunakan prinsip avidin atau streptavidin yang berafinitas

tinggi untuk biotin dan memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan teknik peroksidase-anti peroksidase (PAP).

Metode *avidin-biotin complex* adalah prosedur dimana antigen akan terikat dengan antibodi dalam dua tahap. Antibodi primer akan berikatan secara langsung dengan antigen, selanjutnya antibodi primer berikatan dengan antibodi sekunder yang telah mengalami biotinisasi. Pada setiap tangan antibodi sekunder telah terkonjugasi dengan biotin yang dapat berikatan dengan molekul avidin yang berfungsi sebagai penanda (*marker*) molekul berbiotin (Nurhidayat, 2002).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual

Zearalenon merupakan mikotoksin estrogen alami karena dibiosintesis oleh jamur *Fusarium graminearum* (Frizzell *et al.*, 2011). Zearalenon memiliki struktur *resorcyclic acid lactone* yang dapat menembus membran sel untuk mengikat reseptor estrogen (E_2) di dalam sitosol dan membentuk *Zearalenone E_2 Receptor Complex* (ZEA- E_2 R). Kompleks ini akan ditransfer menuju inti sel dan mengikat reseptor estrogen spesifik di inti sel yang akan mengaktifkan respon mRNA yang biasanya diperankan oleh reseptor estrogen (E_2) (Frizzell *et al.*, 2011).

Zearalenon juga dimetabolisme di hati dengan enzim dehidrogenase hidroksisteroid yang diubah menjadi dua isomer metabolit, yakni α Zearalenol dan β Zearalenol. Kedua isomer ini yang dapat bekerja mengikat reseptor estrogen (E_2) dan meningkatkan kadar estrogen disebut hiperestrogenisme. Keberadaan α Zearalenol dan β Zearalenol berlebihan dalam darah dapat berdampak proliferasi sel yang tidak terkendali sehingga memacu terjadi karsinogenik (Malekinejad *et al.*, 2005; Fink-Gremmels, 2008; Frizzell *et al.*, 2011).

Estrogen bersifat lipofilik sehingga dapat dengan mudah menembus lapisan lipid bilayer. Mitokondria bertindak sebagai organel utama dalam mengontrol sintesis hormon steroid sehingga akan mengalami gangguan homeostasis apabila terdapat perpindahan estrogen eksogen yang dibiosintesis dari mikotoksin zearalenon (Frizzell *et al.*, 2011).

Efek estrogen pada organ ovarium dapat meningkatkan pertumbuhan sel granulosa dan *cumulus oophorus* dalam mencapai maturasi sel folikel. Estrogen juga mempengaruhi tingkah laku seksual menjelang ovulasi yang ditandai dengan gejala birahi dalam siklus estrus (Hafez, 2000^b).

Selama masa kebuntingan, kadar estrogen relatif rendah dibandingkan dengan kadar progesteron. Estrogen selama kebuntingan berguna untuk menjaga elastisitas endometrium dan pembelahan sel epitel kelenjar mammae. Peningkatan kadar estrogen sebelum mendekati masa partus dapat memicu prostaglandin melisiskan korpus luteum dan diikuti menurunnya kadar progesteron. Penurunan progesteron dapat memicu timbulnya abortus dan fetus yang dilahirkan dalam kondisi abnormal, kerdil, dan cacat kongenital (Hafez, 2000^c; Vihma, 2003).

Kerusakan membran mitokondria yang disebabkan oleh hiperestrogenisme akan mengakibatkan aktifnya megachannel sehingga akan berdampak pada kegagalan transpor elektron. Aktifnya megachannel juga akan diikuti masuknya ion Ca^{2+} ekstrasel dan terakumulasi dengan ion Ca^{2+} intrasel yang terdapat pada mitokondria dan retikulum endoplasma. Kadar Ca^{2+} yang tinggi akan mengakibatkan peningkatan permeabilitas membran pada mitokondria serta akan diekspresikan sejumlah apoptotik protein seperti bax, bcl 2, bak yang akan membawa sinyal apoptosis jalur intrinsik (Kilianska dan Miśkiewicz, 2003; Maresca dan Fantini, 2010).

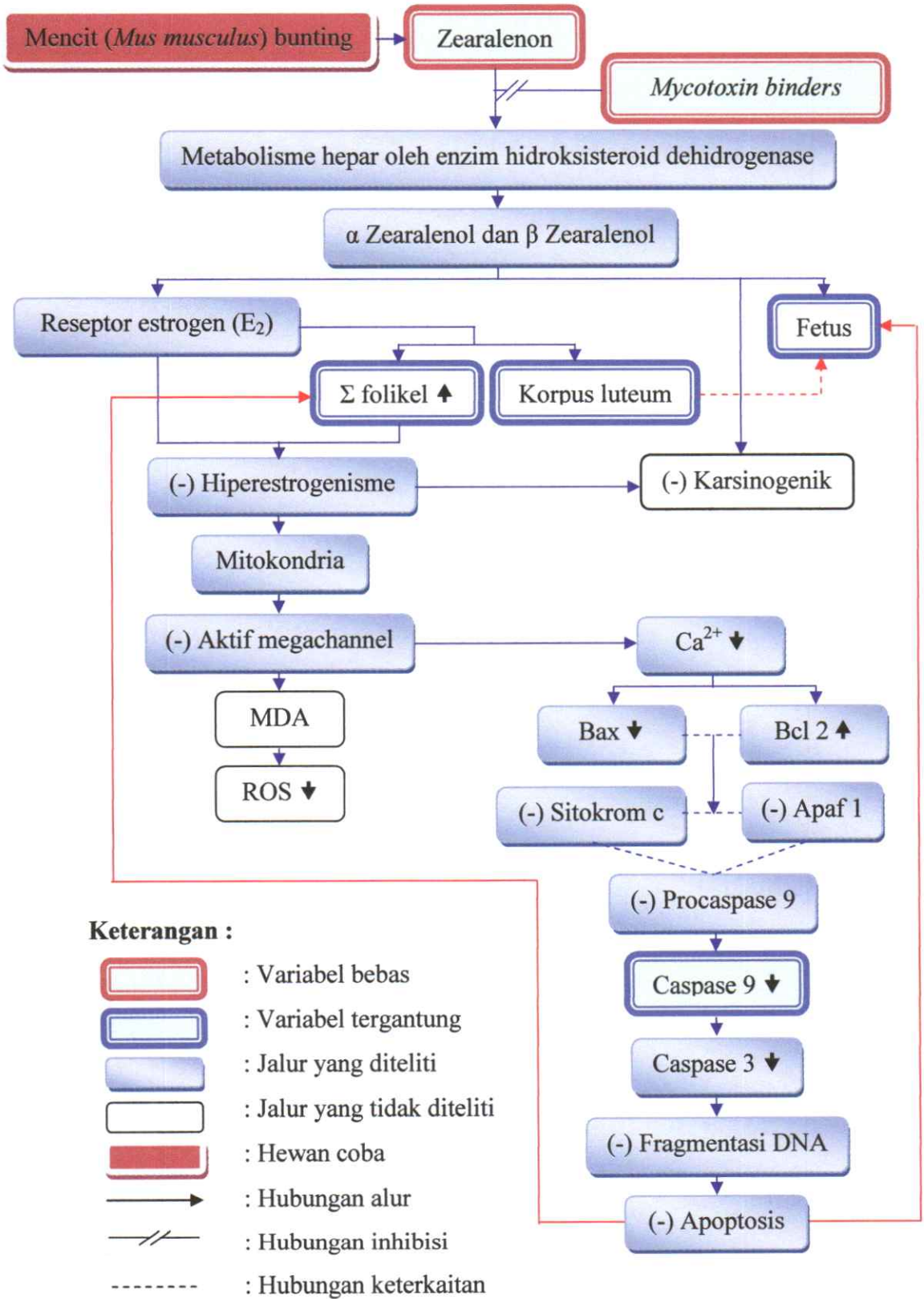
Eksresi bax yang berlebihan dalam sitosol akan merusak membran mitokondria dan meriliskan sitokrom c ke sitosol. Stres oksidatif membuat sitokrom c dirilis keluar dari mitokondria dan akan mengikat *Apoptotic Protease*

Activating Factor 1 (Apaf 1) sehingga disebut senyawa apoptosom. Senyawa apoptosom akan menginduksi procaspase 9 untuk mengaktifkan caspase 9 (Kumar *et al.*, 2005).

Aktifnya megachannel karena gangguan pada mitokondria dan terjadinya reaksi apoptosis juga dapat meningkatkan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat tertranslokasi melewati darah menuju otak, limpa, hati, plasenta dan kelenjar mammae. Hasil dari proses fosforilasi oksidatif yang merupakan radikal bebas yang bersifat oksidator akan membentuk ROS. Radikal bebas pada sel hidup dapat terbentuk pada membran plasma dan organel seperti mitokondria, retikulum endoplasma dan sitosol melalui proses metabolisme (Hougaard *et al.*, 2011).

Mycotoxin binders mengandung bahan aktif antara lain aluminosilikat, selulosa, polisakarida, peptidoglikan, dan polimer sintesis seperti cholestyramine, polivinilpirolidon beserta turunannya (Avantaggiato *et al.*, 2005). Mekanisme kerja *mycotoxin binders* dengan mengeliminasi gugus metil pada struktur kimia zearalenon serta memunculkan senyawa *charcoal*. *Mycotoxin binders* mengandung *feed additive* seperti biotin, tiamin, serta vitamin C dan E yang bersifat antioksidan untuk menurunkan dampak paparan dari residu mikotoksin sebelum dimetabolisme tubuh (Doll *et al.*, 2004).

Skema Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konseptual di atas, maka dapat ditarik hipotesis dari penelitian ini adalah :

1. *Mycotoxin binders* dapat meningkatkan jumlah sel folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, folikel *de Graaf*, korpus luteum mencit (*Mus musculus*) bunting yang terpapar zearalenon.
2. *Mycotoxin binders* dapat menurunkan ekspresi caspase 9 sel granulosa organ ovarium mencit (*Mus musculus*) bunting yang terpapar zearalenon.
3. *Mycotoxin binders* dapat meningkatkan panjang, berat dan jumlah fetus mencit (*Mus musculus*) bunting yang terpapar zearalenon.

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB 4 MATERI DAN METODE

4.1 Jenis Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratories dengan asumsi semua populasi sama dan memiliki kriteria yang homogen serta karakteristik sama. Pengukuran awal tidak dilakukan karena asumsi semua kelompok berasal dari satu populasi dan objek yang diteliti adalah organ ovarium yang harus mengorbankan hewan coba.

Rancangan penelitian pada pelaksanaannya menggunakan Rancangan Acak Lengkap karena hanya ada satu sumber keragaman yakni perlakuan yang dibeda-bedakan di samping pengaruh acak (Kusriningrum, 2008).

4.2 Populasi, Sampel dan Besar Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) betina sebagai unit hewan coba laboratorium. Adapun kriteria subyek penelitian yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) betina yang sehat, umur 8 minggu dengan berat badan berkisar antara 18-35 gram dengan ciri-ciri bulu halus, mata bersinar, tidak pincang, tidak ada bekas luka dan belum pernah digunakan untuk penelitian lain lalu dikawinkan dengan mencit (*Mus musculus*) jantan yang sehat.

Pejantan yang digunakan sebanyak 20 ekor umur antara 8-9 minggu dengan berat berkisar antara 20-40 gram dan sudah dewasa kelamin.

4.2.2 Sampel

Sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini sebanyak 20 ekor mencit (*Mus musculus*) yang telah dibuntingkan dan diberi perlakuan sejak hari pertama sampai hari ke 10 usia kebuntingan dengan rincian perlakuan sebagai berikut : digunakan 4 ekor mencit yang telah dibuntingkan sebagai kelompok kontrol positif (K+) tidak dipapar zearalenon dan *mycotoxin binders*, 4 ekor mencit bunting sebagai kelompok kontrol negatif (K-) dipapar zearalenon dosis 0,1 mg/ekor/hari, 4 ekor mencit bunting sebagai kelompok perlakuan 1 (P1) dipapar zearalenon dosis 0,1 mg/ekor/hari dan *mycotoxin binders* dosis 0,5 mg/ekor/hari, 4 ekor mencit bunting sebagai kelompok perlakuan 2 (P2) dipapar zearalenon dosis 0,1 mg/ekor/hari dan *mycotoxin binders* dosis 1 mg/ekor/hari, 4 ekor mencit bunting sebagai kelompok perlakuan 3 (P3) dipapar zearalenon dosis 0,1 mg/ekor/hari dan *mycotoxin binders* dosis 2 mg/ekor/hari (cara perhitungan dosis dapat dilihat di lampiran 2) (Laurence dan Bacharach, 1993; Gajecka, 2012).

4.2.3 Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan faktor dosis *mycotoxin binders* (tanpa paparan (0 mg/ekor/hari), 0,5 mg/ekor/hari, 1 mg/ekor/hari, 2 mg/ekor/hari) serta dosis zearalenon 0,1 mg/ekor/hari, maka ulangan yang dibutuhkan sebanyak :

$$t(n - 1) \geq 15$$

$$5(n - 1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = perlakuan

n = ulangan/sampel

Jadi besar sampel minimal adalah 4 sampel tiap perlakuan (Kusriningrum, 2008). Dalam penelitian ini digunakan 5 sampel kelompok perlakuan, dengan jumlah sampel keseluruhan adalah 20 sampel.

4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *mycotoxin binders* yang diberikan secara peroral pada mencit yang sedang bunting dengan dosis 0 mg/ekor/hari, 0,5 mg/ekor/hari, 1 mg/ekor/hari, 2 mg/ekor/hari dengan masing-masing diberi paparan zearalenon dosis 0,1 mg/ekor/hari. Pemberian peroral dilakukan secara berulang sampai pada hari ke 10 sejak hari pertama perlakuan.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung adalah variabel sebagai akibat perlakuan dan yang akan diteliti dalam penelitian ini yakni gambaran histologis, ekspresi caspase 9 sel granulosa organ ovarium serta panjang, berat dan jumlah fetus mencit (*Mus musculus*) bunting.

4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah jenis hewan coba, jenis kelamin hewan coba, umur mencit, berat badan mencit, pakan dan minuman mencit, kesehatan mencit, karakteristik dan kondisi kandang, perawatan hewan coba, serta cara pemberian paparan.

4.3.4 Definisi Operasional Variabel

1. *Mycotoxin binders* mengandung bahan aktif aluminosilikat, selulosa, polisakarida, peptidoglikan, dan polimer sintesis seperti cholestyramine, polivinilpirolidon beserta turunannya yang memiliki prinsip kerja mengeliminasi gugus metil pada struktur kimia zearalenon. *Mycotoxin binders* mengandung *feed additive* seperti *charcoal*, biotin, tiamin, aluminosilikat, serta vitamin C dan E yang bersifat antioksidan untuk menurunkan dampak paparan dari residu mikotoksin sebelum dimetabolisme tubuh (Doll *et al.*, 2004; Avantaggiato *et al.*, 2005).
2. Zearalenon adalah senyawa sejenis *phytoestrogen* atau estrogen non-steroid yang dihasilkan oleh jamur *Fusarium graminearum*. Memiliki struktur kimia gugus metil, hidroksi dan hidrat yang dapat berikatan dengan reseptor estrogen (E₂) di sitosol. Zearalenon dapat meningkatkan biosintesis estrogen sehingga terjadi hiperestrogenisme (Frizzell *et al.*, 2011).

3. Histologis ovarium adalah jumlah sel folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, folikel *de Graaf*, dan korpus luteum yang dihitung masing-masing pada lima irisan.
- Folikel primer terdiri atas oosit yang dikelilingi selapis sel granulosa dan belum terbungkus membran vitelin
 - Folikel sekunder terdiri atas beberapa lapis sel granulos dan sudah dilapisi oleh membran vitelin serta mulai tampak zona pelusida
 - Folikel tersier ditandai dengan banyaknya sel granulosa dan mulai terbentuk antrum berisi cairan folikuler
 - Folikel *de Graaf* terlapisi oleh massa sel kumulus oophorus, ditemukan korona radiata, teka eksterna, teka interna dan membran basalis. Ovum bersama lapisan massa sel granulosa menonjol ke dalam ruangan antrum yang berisi cairan folikuler.
 - Korpus luteum merupakan bekas dari ovulasi yang menjadi korpus rubrum dan berkembang menjadi korpus luteum selama fase luteinisasi. Korpus luteum menghasilkan progesterone dan akan diregresi oleh prostaglandin jika tidak terjadi fertilisasi (Hafez, 2000^b).
4. Ekspresi caspase 9 adalah angka yang diperoleh dari perkalian intensitas dengan skoring lapang pandang berdasarkan metode Sinuhaji (2013), seperti pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Metode skoring ekspresi caspase 9 dengan uji imunohistokimia

Intensitas Lapang pandang	Skor			
	Normal 0%	Rendah 0 – 25%	Sedang 25 – 50%	Tinggi >50%

5. Pengukuran panjang fetus adalah angka yang didapat dari panjang kepala sampai ekor fetus setelah dijulurkan dalam cawan petri. Penimbangan berat fetus adalah angka yang didapat dari timbangan digital berskala gram yang telah ditera dalam cawan petri.

4.4 Bahan Penelitian

Bahan untuk pemeliharaan mencit berupa air minum (*ad libitum*) dan pakan hewan coba pakan ayam 511 berbentuk pellet (PT. Charoen Pokphand Surabaya). Bahan untuk superovulasi : hormon PMSG (*Folligon Intervet*) diberikan secara subkutan sebanyak 5 IU kemudian HCG (*Chorulon Intervet*) untuk superovulasinya diberikan sebanyak 5 IU 48 jam setelah pemberian PMSG (Mustofa dkk., 2013). Bahan untuk perlakuan *mycotoxin binders* dan zearalenon (Tocris Bioscience). Bahan untuk pembedahan : alcohol 70%. Bahan untuk fiksasi jaringan : larutan buffer formalin, alcohol 70%, 80%, dan 96%, xylene dan paraffin cair. Bahan kimia untuk ekspresi caspase 9 dengan teknik imunohistokimia : antibody caspase 9, PBS 10%, H₂O₂ 3%, antibodi sekunder berlabel biotin, *streptavidin*[®], *Diaminobenzidine* (DAB), *metal blue and green*, *blocking buffer ultra V block* (Sigma-Aldrich), eter, aquades, dan NaCl fisiologis,.

4.5 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan meliputi : jarum sonde lambung dan spuit Terumo syringe[®], termometer, gelas ukur, erlenmeyer, timbangan digital, pipet Vinmed[®], higrometer BG365[®], *Dissecting set* Onemed[®], papan seksi, *cotton buds*,

kandang hewan coba, tempat pakan dan minum, *object glass*, *cover glass*, mikroskop Olympus® CX-41. Termometer dan higrometer untuk memantau suhu dan kelembaban udara. *Dissecting set* dan papan seksi untuk pembedahan mencit. Timbangan digital dengan skala miligram untuk menimbang dosis *mycotoxin binders*, zearalenon dan berat mencit.

4.6 Waktu dan Tempat Penelitian

Pemeliharaan hewan coba, superovulasi, pengawinan, pemberian paparan zearalenon dan *mycotoxin binders* serta pembedahan dilakukan di kandang hewan coba dan laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Pembuatan preparat histologis ovarium dengan pewarnaan hematoksilin eosin, ekspresi caspase 9 dengan uji imunohistokimia dan pengamatan morfologi fetus dilakukan di laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Waktu penelitian dari bulan Desember 2013-Februari 2014.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Prosedur Superovulasi Mencit (*Mus musculus*) Betina

Mencit merupakan hewan poliestrus, artinya dalam satu siklus dapat beberapa kali mengalami birahi, kecuali dalam keadaan bunting. Penelitian ini menggunakan *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) dan *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG) untuk superovulasi. PMSG diberikan secara

subkutan sebanyak 5 IU kemudian HCG diberikan sebanyak 5 IU 48 jam setelah pemberian PMSG (Mustofa dkk., 2013).

4.7.2 Prosedur Pengawinan Mencit (*Mus musculus*)

Mencit dikawinkan sesuai kelompok perlakuan dengan cara dikumpulkan dengan satu mencit jantan dalam satu kandang (*personal mating*). Mencit betina yang sudah kawin bisa diketahui dengan memeriksa sumbat vagina (*vaginal plug*) pada 17 jam sesudah penyuntikan HCG. Sumbat vagina terdiri dari gelatin yang sudah menggumpal dan berfungsi agar spermatozoa tidak tumpah keluar. Apabila terdapat sumbat vagina maka dianggap kopulasi telah terjadi. Mencit yang bunting ini kemudian diberi nomor dengan cara pemberian zat warna pada bagian tubuh sesuai kelompok.

4.7.3 Prosedur Pemberian *Mycotoxin Binders* dan Zearalenon

Pemberian *mycotoxin binders* diberikan secara peroral pada mencit yang sedang bunting dengan dosis 0 mg/ekor/hari, 0,5 mg/ekor/hari, 1 mg/ekor/hari, 2 mg/ekor/hari dan masing-masing perlakuan ditambahkan zearalenon dosis 0,1 mg/ekor/hari. Pemberian dilakukan secara peroral dengan jarum sonde lambung dan dilakukan secara berulang sampai pada hari ke 10 sejak hari pertama perlakuan.

4.7.4 Prosedur Pembedahan Hewan Coba dan Pengambilan Sampel

Pembedahan dilaksanakan pada hari ke 15 yang terlebih dahulu dilakukan dislokasi os cervicalis. Desinfeksi dengan alkohol 70% kemudian dilakukan pembedahan dengan cepat untuk mengambil ovarium. Pembedahan dimulai dari vagina menuju ke arah perut menggunakan *scalpel*. Dilanjutkan dengan mencari organ ovarium dan dipisahkan dari jaringan di sekitarnya kemudian disimpan dalam larutan buffer formalin dengan komposisi larutan *phospate buffer saline* dan alkohol 10% untuk pembuatan preparat imunohistokimia dan pemeriksaan histologis.

4.7.5 Identifikasi Ekspresi Caspase 9 dengan Uji Imunohistokimia

Preparat ovarium yang telah dibuat pada *object glass* dicelup dalam xylool sebanyak dua kali, alcohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%, dan 30%) dan aquades secara berurutan. Selanjutnya dicuci dalam PBS dengan pH 7,4 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya direndam dalam hidrogen peroksidase (H_2O_2) 3% selama 5-10 menit. Direndam dalam 1% BSA dalam PBS selama 10-30 menit pada suhu ruangan. Ditambahkan antibodi primer anti caspase 9 IgG Biotin *labeled* selama 1 jam pada suhu ruangan. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Ditambahkan *Streptavidin-Horse Radish Peroksidase* (SA-HRP) selama 30x60 menit pada suhu ruangan. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Ditambahkan kromogen *3,3-Diaminbenzidine tetrahydrochloride* (DAB) selama 10-20 menit. Dicuci dengan aquades selama 3x5 menit pada suhu ruangan kemudian ditambahkan dengan *counterstain* (*Methylen blue/ Methylen*

green) selama 3 menit. Dilakukan mounting dengan entellan. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop Olympus® CX-41 perbesaran 400 dan 1000 kali. Penentuan ekspresi caspase 9 diperoleh dari perkalian intensitas dengan skoring lapang pandang berdasarkan metode Sinuhaji (2013), pada sel granulosa organ ovarium dibandingkan dengan kontrol.

4.7.6 Pengamatan Gambaran Histologis Ovarium dengan Pewarnaan Hematoksin Eosin

Organ ovarium mencit difiksasi dengan larutan buffer formalin. Selanjutnya dilakukan proses pewarnaan menggunakan hematoksin dan eosin. Pewarnaan diawali dengan perendaman *object glass* ke dalam xylol I dan xylol II masing-masing selama 2 menit, dilanjutkan perendaman dalam alkohol absolut (100%), 95%, 90%, 80%, 70% dan 50% masing-masing selama 2 menit. Kemudian *object glass* dimasukkan dalam pewarnaan hematoksin selama 7 menit dan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kelebihan zat warna yang tidak terserap. *Object glass* kembali direndam dalam pewarnaan eosin selama 3 menit dan dicuci kembali dengan akuades. Preparat kemudian direndam dalam alkohol 50%, 70%, 85%, 90%, 100%, 100%, xylol I, xylol II masing-masing selama 2 menit. Kemudian diperiksa jumlah folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, folikel *de Graaf*, dan korpus luteum pada lima irisan. Data yang diperoleh untuk masing-masing jumlah folikel didapat dari nilai rata-rata jumlah per folikel dari setiap irisan ulangan hewan coba.

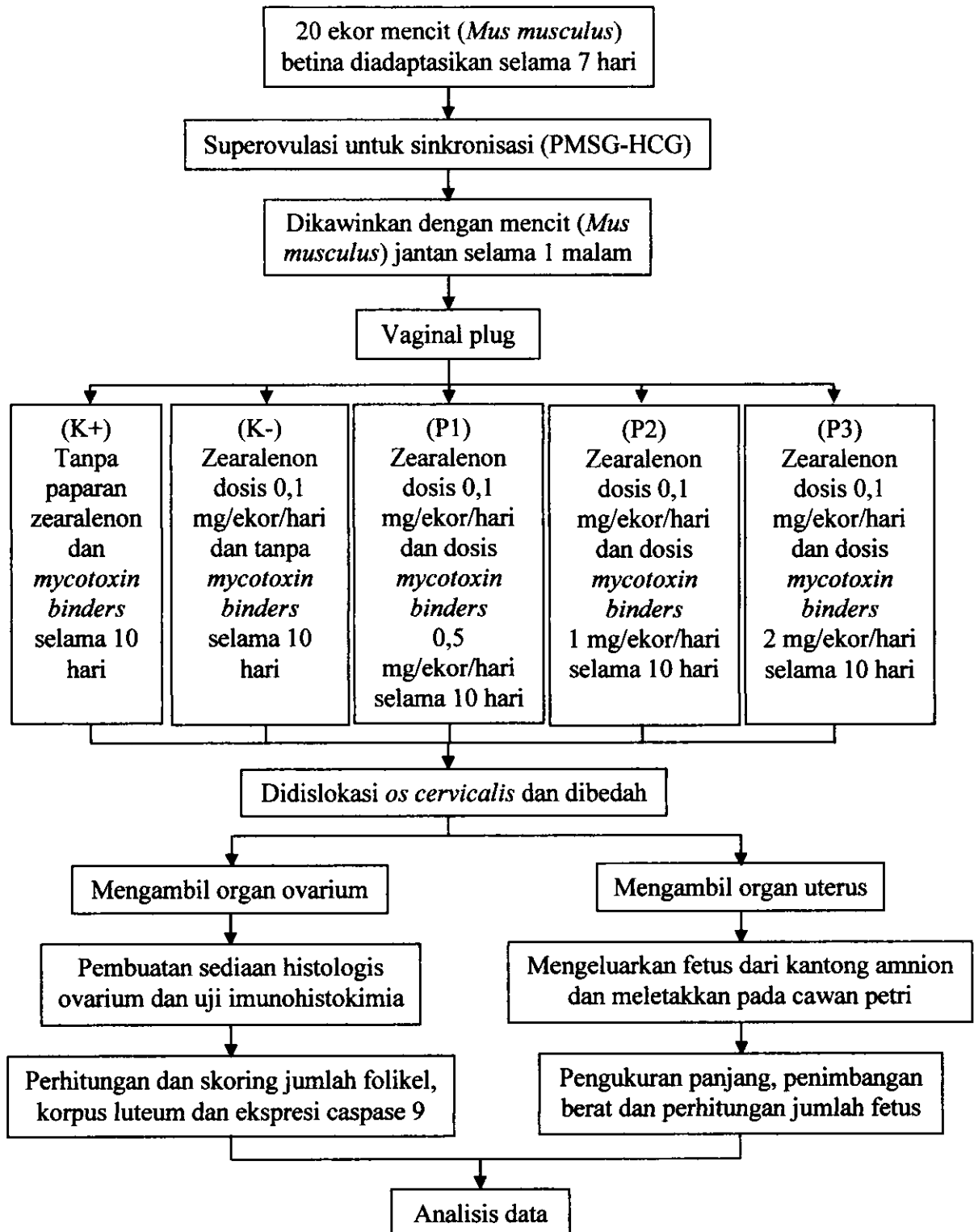
4.7.7 Pengukuran Panjang, Penimbangan Berat, dan Perhitungan Jumlah Fetus

Pembedahan dilakukan pada kebuntingan usia 10 hari dan diambil organ uterus tempat menempelnya kantong amnion. Fetus dikeluarkan dan dipisahkan dari plasenta foetalis. Fetus diletakkan pada cawan petri kemudian dilakukan pengukuran panjang dengan penggaris. Penimbangan berat badan fetus dilakukan dengan timbangan digital yang sebelumnya telah ditera pada cawan petri. Hasil panjang dan berat badan fetus didapat dari rata-rata semua fetus dalam satu induk.

4.8 Analisis Data

Hasil rata-rata jumlah per folikel, korpus luteum, skoring caspase 9 serta panjang, berat dan jumlah fetus dianggap sebagai data yang didapat dan diuji normalitas dengan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Jika data terdistribusi normal akan dilakukan analisis parametrik menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) satu arah atau *one way* ANOVA dan bila berbeda nyata ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan uji Fisher's LSD. Jika data tidak terdistribusi normal akan dilakukan analisis non parametrik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan bila berbeda nyata ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Seluruh proses analisis dikerjakan dengan program SPSS 20 for Windows (Kusriningrum, 2008).

4.9 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka operasional penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN

BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN

Pembacaan hasil gambaran histologis ovarium dilakukan pada seluruh preparat secara mikroskopis dengan metode perhitungan kuantitatif terhadap jumlah folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, folikel *de Graaf*, dan korpus luteum. Pembacaan hasil ekspresi caspase 9 organ ovarium dilakukan pada seluruh preparat secara mikroskopis dengan metode skoring (Sinuhaji, 2013). Hasil perhitungan dan skoring yang didapat selanjutnya dirata-rata kemudian diolah dengan program SPSS 20 *for windows*. Hasil rata-rata (*mean*) dan *standart deviasi* (SD) pengamatan jumlah folikel, korpus luteum dan caspase 9 disajikan seperti pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Rata-rata dan *standart deviasi* pengamatan jumlah folikel, korpus luteum dan caspase 9

P	Jumlah Folikel (X ± SD)				CL	Casp9
	F _P	F _S	F _T	F _{dG}	(X ± SD)	(X ± SD)
K+	14,2 ^d ±1,36	11,2 ^d ±0,28	6,5 ^b ±0,53	7,5 ^d ±0,74	2,3 ^a ±0,35	0,3 ^a ±0,60
K-	7,1 ^{ab} ±0,12	3,7 ^a ±1,17	3,8 ^a ±1,21	1,5 ^a ±0,62	2,3 ^a ±0,34	8,3 ^c ±0,90
P1	6,2 ^a ±0,16	5,2 ^b ±0,16	3,6 ^a ±0,16	2,6 ^b ±0,19	2,6 ^a ±0,10	3,6 ^b ±0,41
P2	7,8 ^{bc} ±0,28	5,8 ^b ±0,53	3,7 ^a ±0,26	2,7 ^b ±0,26	2,5 ^a ±0,10	3,3 ^b ±0,34
P3	8,4 ^c ±0,34	8,4 ^c ±0,34	4,6 ^a ±0,34	4,5 ^c ±1,01	3,4 ^b ±0,23	2,8 ^b ±0,28

Keterangan : F_P. Folikel primer; F_S. Folikel sekunder; F_T. Folikel tersier; F_{dG}. Folikel *de Graaf*; CL. Korpus luteum; Casp9. Caspase 9
Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan (p<0,05)

Pengukuran panjang, penimbangan berat badan dan perhitungan jumlah fetus dilakukan dengan alat ukur penggaris dan timbangan digital. Hasil pengamatan yang didapat selanjutnya dirata-rata kemudian diolah dengan program SPSS 20 for windows. Hasil rata-rata (*mean*) dan *standart deviasi* (SD) pengamatan panjang, berat dan jumlah fetus disajikan seperti pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Rata-rata dan *standart deviasi* pengamatan panjang, berat dan jumlah fetus

P	Fetus ($X \pm SD$)		
	Panjang	Berat	Jumlah
K+	2,2 ^a ±0,24	1,1 ^b ±0,01	6,3 ^a ±1,26
K-	2,1 ^a ±0,58	0,9 ^a ±0,58	6,6 ^a ±0,50
P1	2,0 ^a ±0,89	1,0 ^b ±0,01	7,0 ^a ±1,41
P2	2,7 ^b ±0,14	1,0 ^b ±0,08	6,8 ^a ±0,96
P3	2,9 ^b ±0,48	1,0 ^b ±0,01	6,0 ^a ±1,41

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

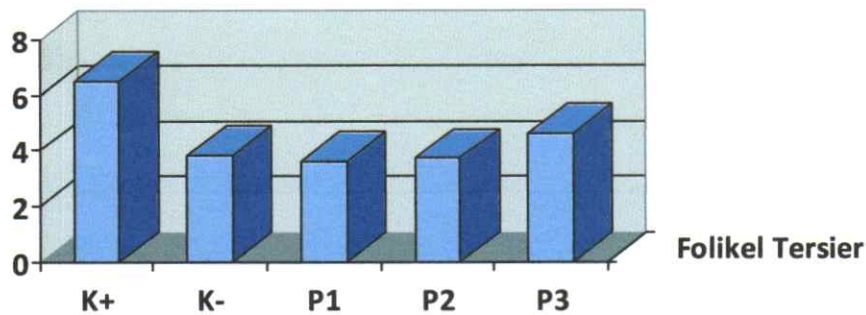
5.1 Jumlah Folikel

5.1.1 Folikel Primer

Berdasarkan uji *Kolmogorov-Smirnov* terhadap nilai rata-rata (*mean*) jumlah folikel primer menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$) sehingga dilakukan analisis parametrik menggunakan uji ANOVA. Uji ANOVA menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) pada masing-masing kelompok perlakuan sehingga analisis dilanjutkan dengan uji Fisher's LSD. Uji Fisher's

5.1.3 Folikel Tersier

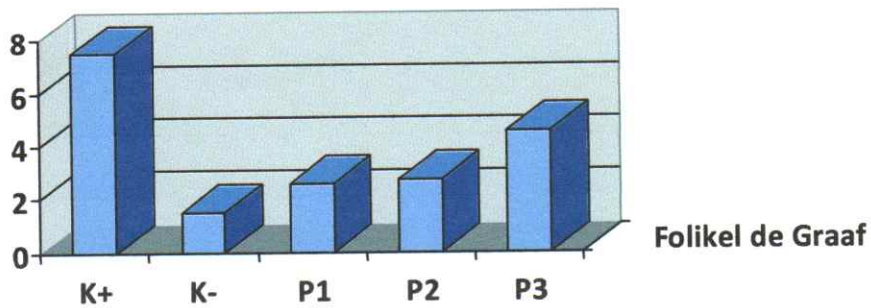
Berdasarkan uji *Kolmogorov-Smirnov* terhadap nilai rata-rata (*mean*) jumlah folikel tersier menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$) sehingga dilakukan analisis parametrik menggunakan uji ANOVA. Uji ANOVA menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) pada masing-masing kelompok perlakuan sehingga analisis dilanjutkan dengan uji Fisher's LSD. Uji Fisher's LSD didapatkan K- berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan K+. K- dengan P1, P2 dan P3 tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Diagram batang jumlah folikel tersier disajikan seperti pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3 Diagram batang jumlah folikel tersier

5.1.4 Folikel *de Graaf*

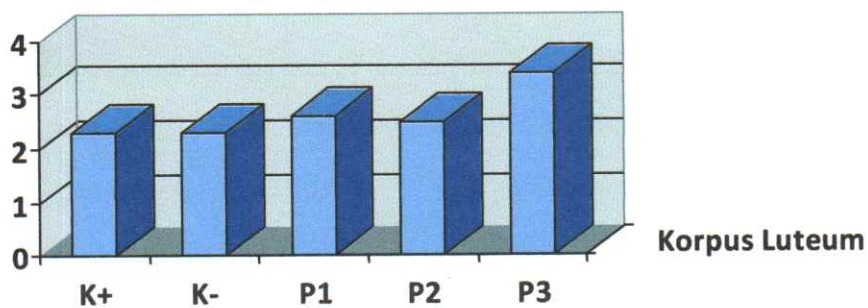
Berdasarkan uji *Kolmogorov-Smirnov* terhadap nilai rata-rata (*mean*) jumlah folikel *de Graaf* menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$) sehingga dilakukan analisis parametrik menggunakan uji ANOVA. Uji ANOVA menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) pada masing-masing kelompok perlakuan sehingga analisis dilanjutkan dengan uji Fisher's LSD. Uji Fisher's LSD didapatkan K- berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan K+, P1, P2 dan P3. P1 dengan P2 tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Diagram batang jumlah folikel *de Graaf* disajikan seperti pada Gambar 5.4.



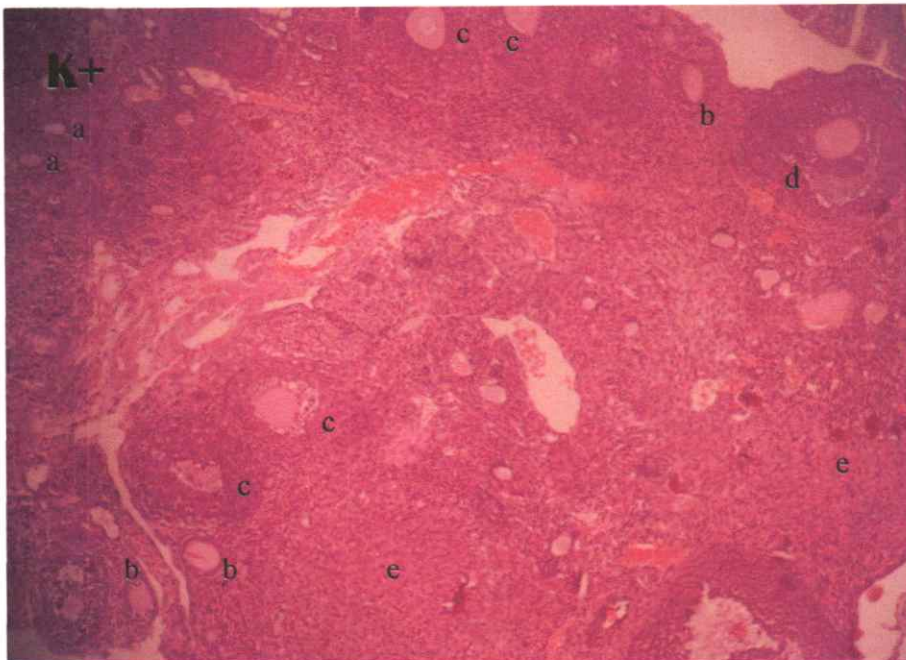
Gambar 5.4 Diagram batang jumlah folikel *de Graaf*

5.1.5 Korpus Luteum

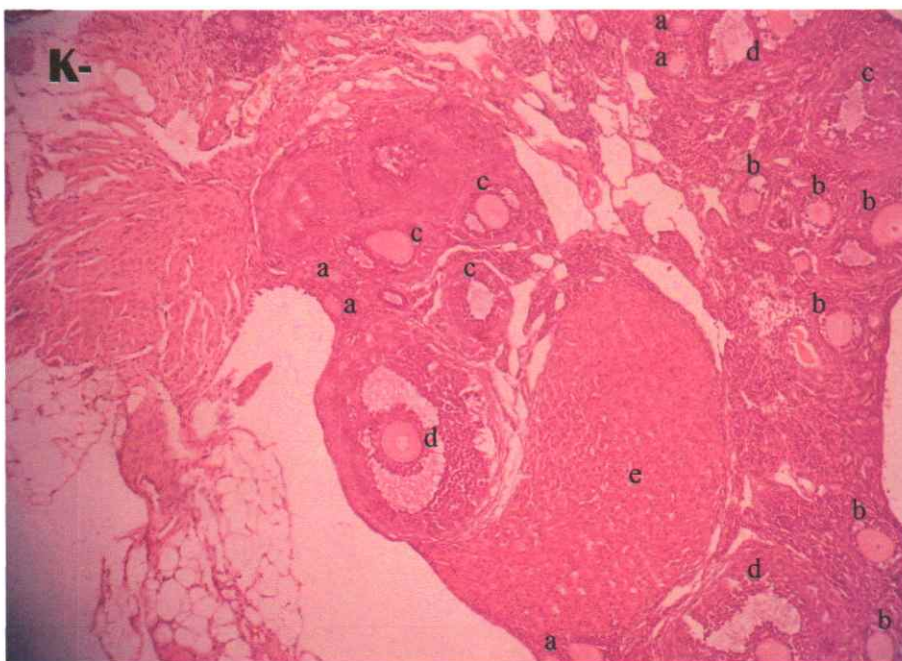
Berdasarkan uji *Kolmogorov-Smirnov* terhadap nilai rata-rata (*mean*) jumlah korpus luteum menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$) sehingga dilakukan analisis parametrik menggunakan uji ANOVA. Uji ANOVA menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) pada masing-masing kelompok perlakuan sehingga analisis dilanjutkan dengan uji Fisher's LSD. Uji Fisher's LSD didapatkan P3 berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan K+, K-, P1 dan P2. K+ dengan K-, P1 dan P2 tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Diagram batang jumlah korpus luteum disajikan seperti pada Gambar 5.5.



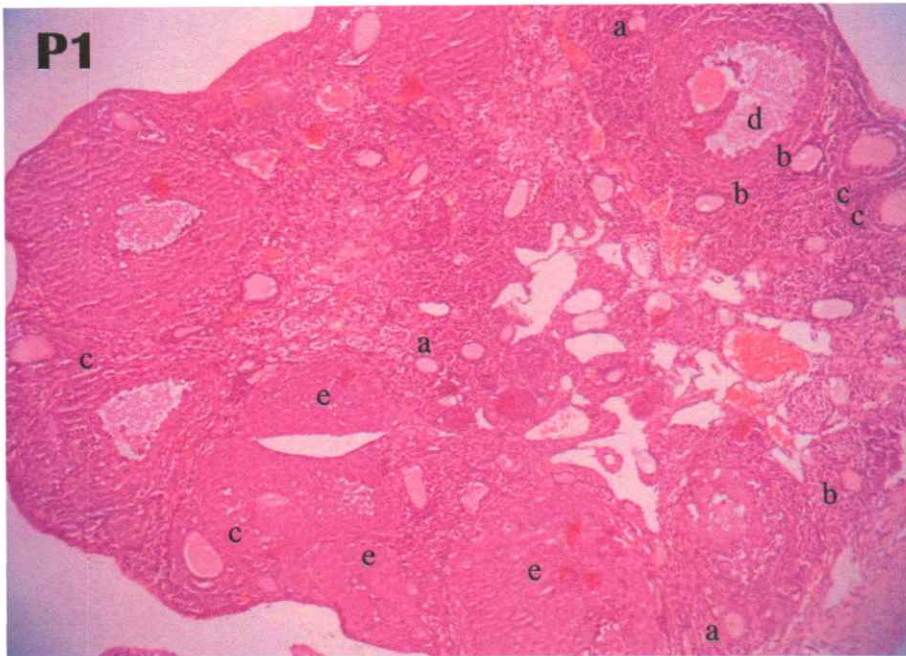
Gambar 5.5 Diagram batang jumlah korpus luteum



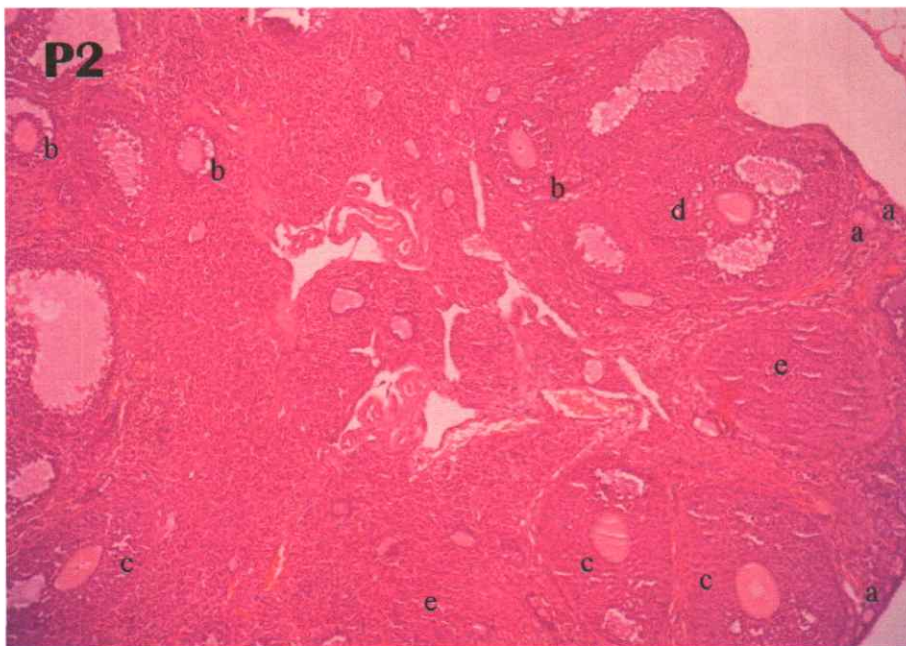
Gambar 5.6.1 Gambaran histologis ovarium pada kontrol positif (K+) a. Folikel primer; b. Folikel sekunder; c. Folikel tersier; d. Folikel *de Graaf*; e. Korpus luteum (Pewarnaan HE; Perbesaran 100x; Mikroskop Olympus® CX-41).



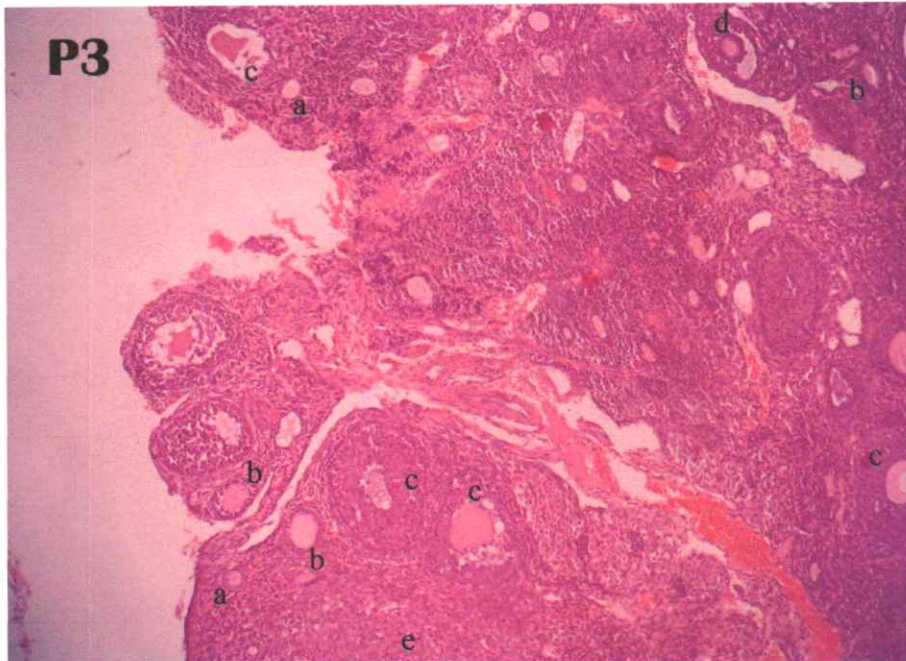
Gambar 5.6.2 Gambaran histologis ovarium pada kontrol negatif (K-) a. Folikel primer; b. Folikel sekunder; c. Folikel tersier; d. Folikel *de Graaf*; e. Korpus luteum (Pewarnaan HE; Perbesaran 100x; Mikroskop Olympus® CX-41).



Gambar 5.6.3 Gambaran histologis ovarium pada perlakuan 1 (P1)
 a. Folikel primer; b. Folikel sekunder; c. Folikel tersier;
 d. Folikel *de Graaf*; e. Korpus luteum
 (Pewarnaan HE; Perbesaran 100x; Mikroskop Olympus® CX-41).



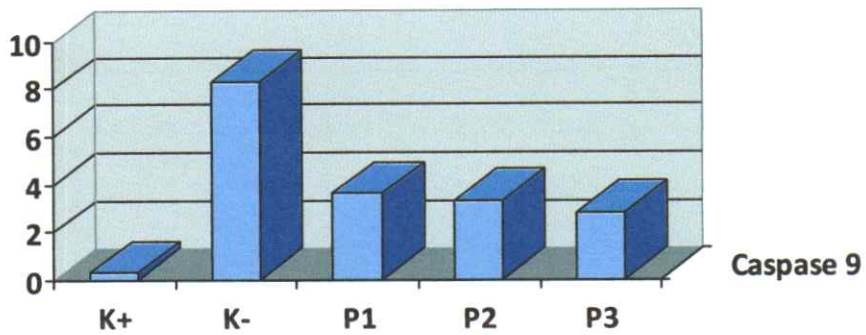
Gambar 5.6.4 Gambaran histologis ovarium pada perlakuan 2 (P2)
 a. Folikel primer; b. Folikel sekunder; c. Folikel tersier;
 d. Folikel *de Graaf*; e. Korpus luteum
 (Pewarnaan HE; Perbesaran 100x; Mikroskop Olympus® CX-41).



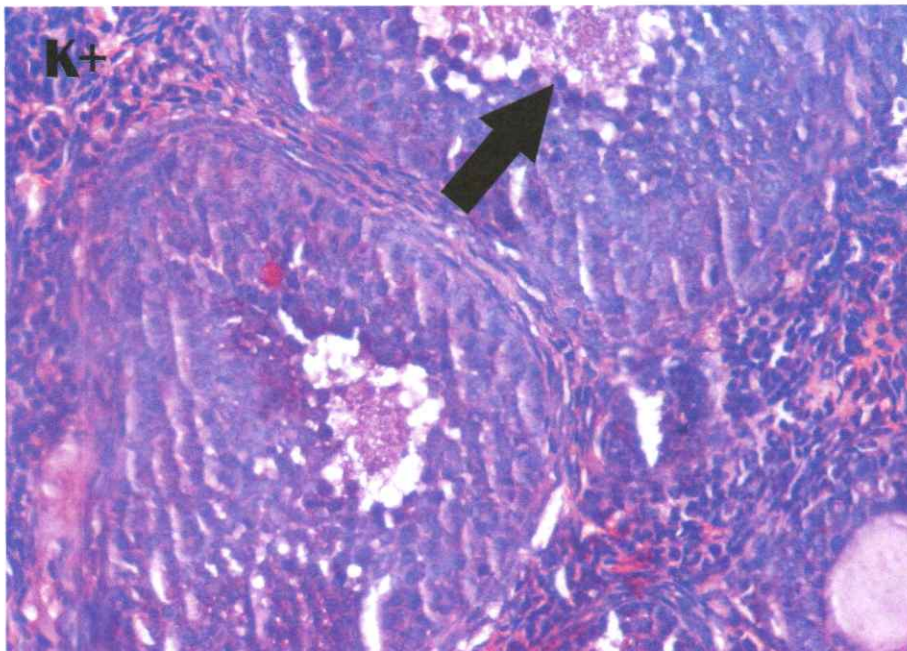
Gambar 5.6.5 Gambaran histologis ovarium pada perlakuan 3 (P3)
 a. Folikel primer; b. Folikel sekunder; c. Folikel tersier;
 d. Folikel *de Graaf*; e. Korpus luteum
 (Pewarnaan HE; Perbesaran 100x; Mikroskop Olympus® CX-41).

5.2 Ekspresi Caspase 9

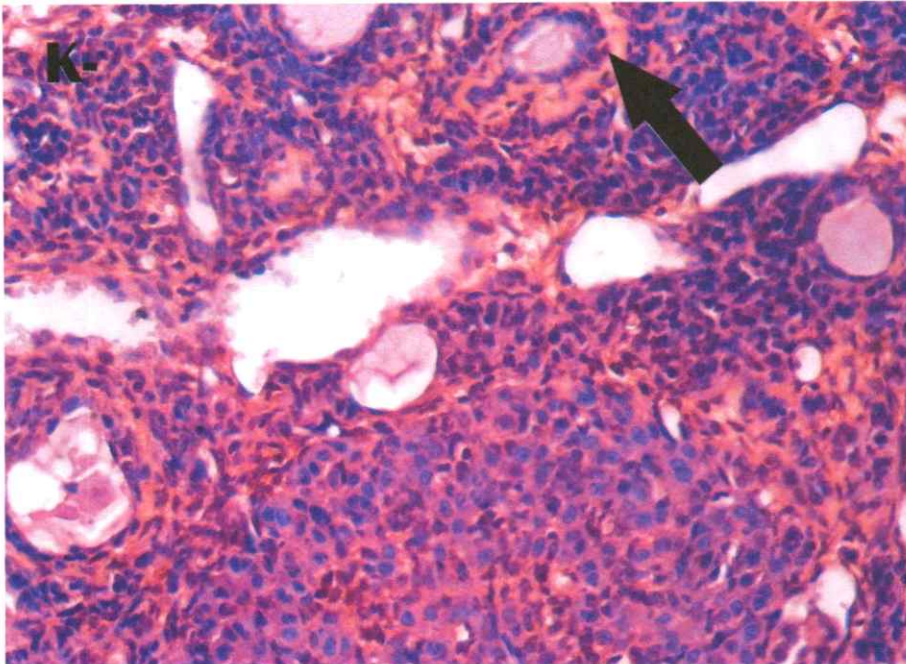
Berdasarkan uji *Kolmogorov-Smirnov* terhadap nilai rata-rata (*mean*) skoring caspase 9 menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$) sehingga dilakukan analisis parametrik menggunakan uji ANOVA. Uji ANOVA menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) pada masing-masing kelompok perlakuan sehingga analisis dilanjutkan dengan uji Fisher's LSD. Uji Fisher's LSD didapatkan K- berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan K+, P1, P2 dan P3. P1 dengan P2 dan P3 tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Diagram batang ekspresi caspase 9 disajikan seperti pada Gambar 5.7.



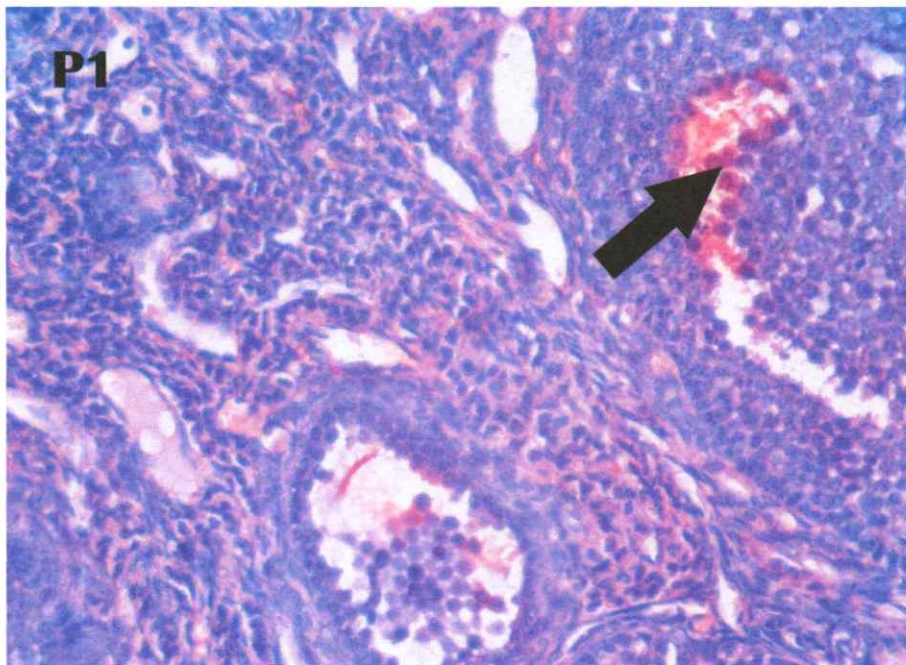
Gambar 5.7 Diagram batang ekspresi caspase 9



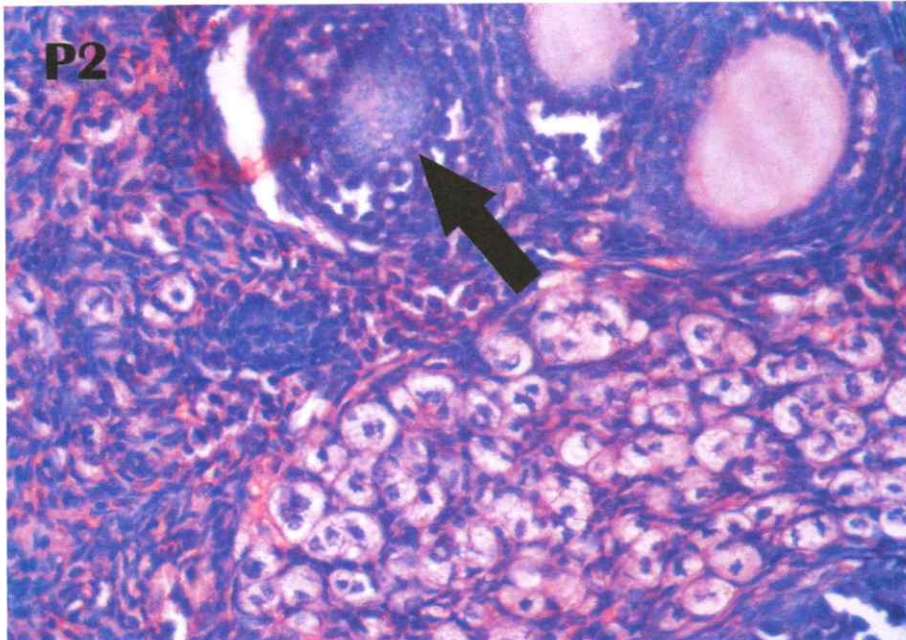
Gambar 5.8.1 Ekspresi sel granulosa normal pada kontrol positif (K+) (Pewarnaan Imunohistokimia; Perbesaran 400x; Mikroskop Olympus® CX-41).



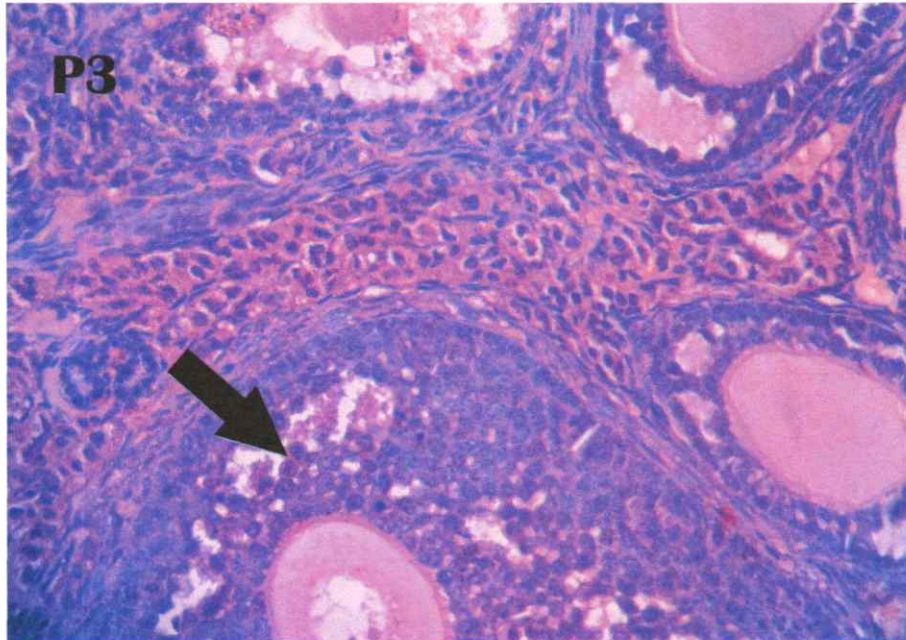
Gambar 5.8.2 Ekspresi caspase 9 pada kontrol negatif (K-) (Pewarnaan Imunohistokimia; Perbesaran 400x; Mikroskop Olympus® CX-41).



Gambar 5.8.3 Ekspresi caspase 9 pada perlakuan 1 (P1) (Pewarnaan Imunohistokimia; Perbesaran 400x; Mikroskop Olympus® CX-41).



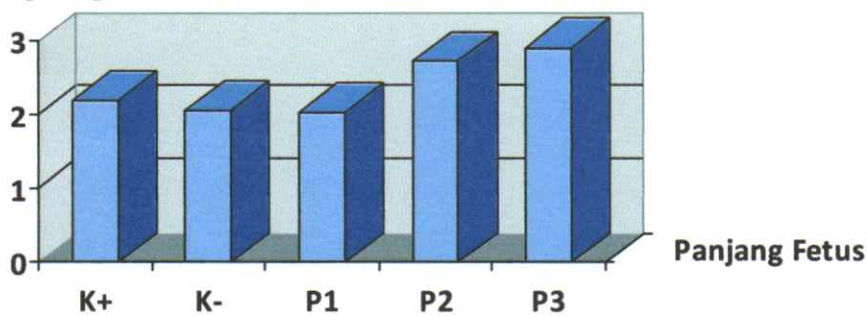
Gambar 5.8.4 Ekspresi caspase 9 pada perlakuan 2 (P2)
(Pewarnaan Imunohistokimia; Perbesaran 400x; Mikroskop Olympus® CX-41).



Gambar 5.8.5 Ekspresi caspase 9 pada perlakuan 3 (P3)
(Pewarnaan Imunohistokimia; Perbesaran 400x; Mikroskop Olympus® CX-41).

5.3 Panjang Fetus

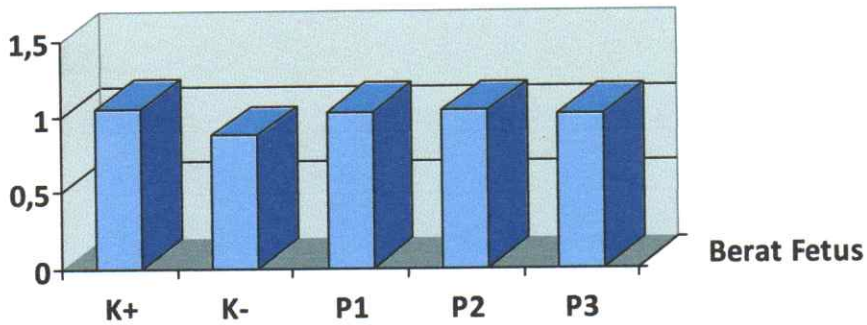
Berdasarkan uji *Kolmogorov-Smirnov* terhadap nilai rata-rata (*mean*) panjang fetus menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p>0,05$) sehingga dilakukan analisis parametrik menggunakan uji ANOVA. Uji ANOVA menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p<0,05$) pada masing-masing kelompok perlakuan sehingga analisis dilanjutkan dengan uji Fisher's LSD. Uji Fisher's LSD didapatkan K+, K-, P1 berbeda nyata ($p<0,05$) dengan P2 dan P3. K+ dengan K- dan P1 tidak berbeda nyata ($p>0,05$). Diagram batang panjang fetus disajikan seperti pada Gambar 5.9.1.



Gambar 5.9.1 Diagram batang panjang fetus

5.4 Berat Fetus

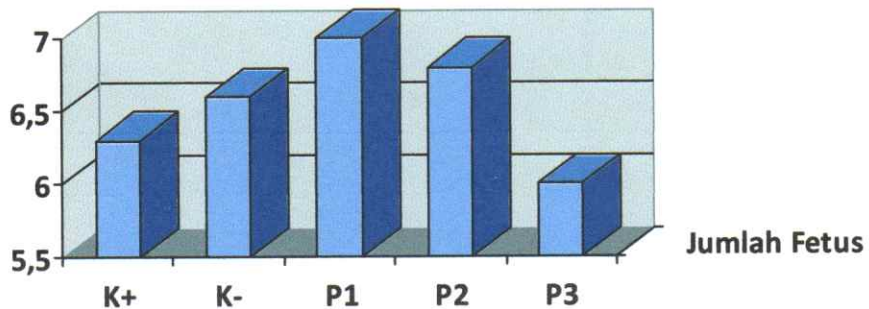
Berdasarkan uji *Kolmogorov-Smirnov* terhadap nilai rata-rata (*mean*) berat fetus menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p>0,05$) sehingga dilakukan analisis parametrik menggunakan uji ANOVA. Uji ANOVA menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p<0,05$) pada masing-masing kelompok perlakuan sehingga analisis dilanjutkan dengan uji Fisher's LSD. Uji Fisher's LSD didapatkan K+, P1, P2, P3 berbeda nyata ($p<0,05$) dengan K-. K+ dengan P1, P2, P3 tidak berbeda nyata ($p>0,05$). Diagram batang berat fetus disajikan seperti pada Gambar 5.9.2.



Gambar 5.9.2 Diagram batang berat fetus

5.5 Jumlah Fetus

Berdasarkan uji *Kolmogorov-Smirnov* terhadap nilai rata-rata (*mean*) jumlah fetus menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$) sehingga dilakukan analisis parametrik menggunakan uji ANOVA. Uji ANOVA menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) pada masing-masing kelompok perlakuan sehingga analisis tidak dilanjutkan dengan uji Fisher's LSD. Diagram batang jumlah fetus disajikan seperti pada Gambar 5.9.3.



Gambar 5.9.3 Diagram batang jumlah fetus

BAB 6

PEMBAHASAN

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Jumlah Folikel

Hasil uji statistik terhadap jumlah folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, dan folikel *de Graaf* menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara K- dengan P3 yang artinya bahwa dosis *mycotoxin binders* 2 mg/ekor/hari merupakan dosis minimal yang dapat mengurangi efek yang ditimbulkan oleh zearalenon. Jumlah korpus luteum menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) antara K- dengan K+, P1, dan P2 yang artinya bahwa *mycotoxin binders* tidak dapat mengurangi efek yang ditimbulkan oleh zearalenon terhadap jumlah korpus luteum.

Gajecka (2013) menyebutkan dalam hasil penelitiannya bahwa zearalenon dapat menekan aktivitas proliferasi sel-sel folikel yang terdapat di korteks ovarium. Penurunan jumlah sel-sel folikel tidak diikuti proses maturasi oosit dan influks liquor folikuli yang secara fisiologis mengisi ruangan antrum pada folikel *de Graaf* sebelum terjadi proses ovulasi. Liquor folikuli identik dengan hormon estrogen endogen dan jika terkumpul dengan estrogen eksogen dapat mengakibatkan hiperestrogenisme.

Zearalenon dimetabolisme di hati dengan enzim hidroksisteroid dehidrogenase menjadi dua isomer metabolit, yakni α Zearalenol dan β Zearalenol. Kedua isomer tersebut memiliki struktur *resorcylic acid lactone* yang dapat menembus membran sel epitel selapis kubus penyusun sel granulosa untuk mengikat reseptor estrogen (E_2) di dalam sitosol. Ikatan kompleks berupa

Zearalenone E₂ Receptor Complex (ZEA-E₂R) akan ditransfer menuju inti sel dan mengikat reseptor estrogen spesifik di inti sel yang akan mengaktifkan respon mRNA yang biasanya diperankan oleh reseptor estrogen (E₂) (Malekinejad *et al.*, 2005; Frizzell *et al.*, 2011).

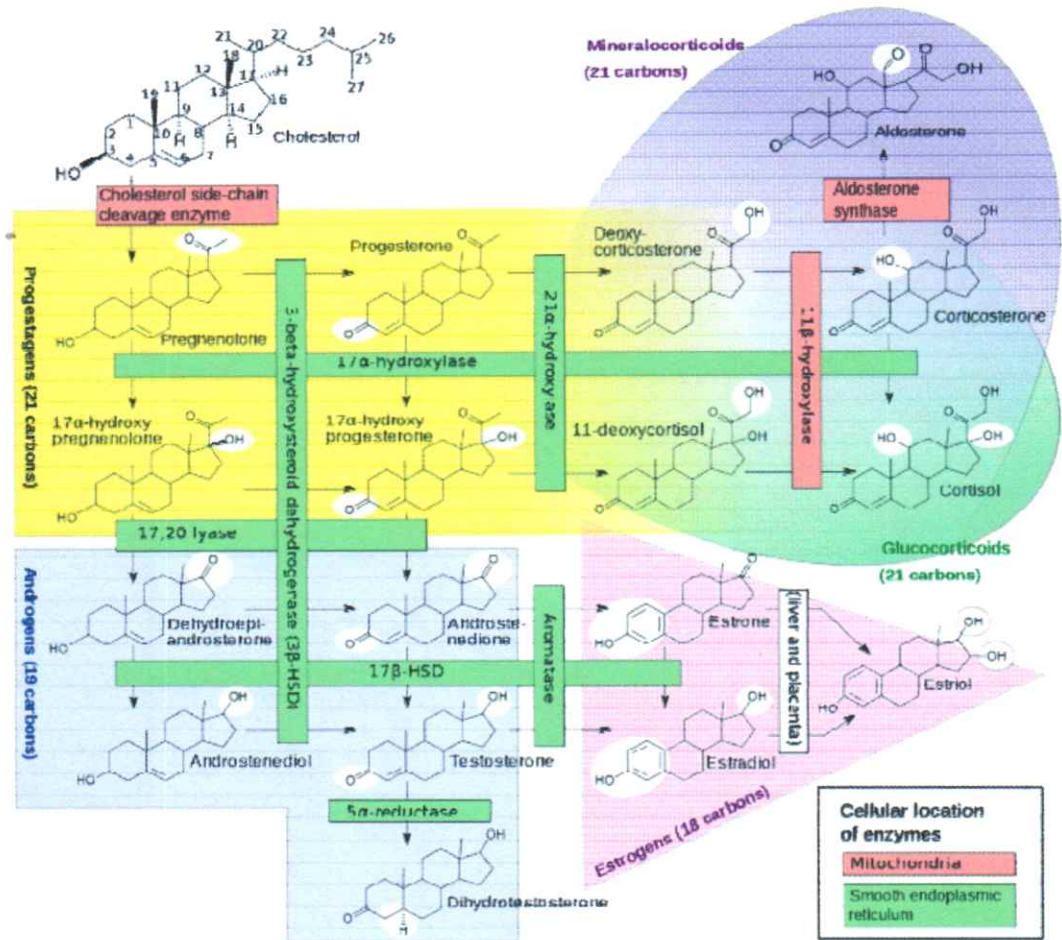
ZEA-E₂R yang telah mengaktifkan respon mRNA akan menghambat proses mitosis *Granulose Cumulus Cells (GCs)* pada folikel primer. *Granulose Cumulus Cells (GCs)* akan berkembang membentuk lapisan-lapisan sel granulosa mature dan memproduksi beberapa sitokin seperti, *Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)*, *Fibroblastic Growth Factor Family-2 (FGF-2)*, dan *Stem Cell Factor (SCF)*. *Stem Cell Factor (SCF)* akan menginisiasi perkembangan oosit pada folikel primer dan menstimulasi mitosis sel teka. *Fibroblastic Growth Factor Family-2 (FGF-2)* akan menekan apoptosis GCs dan membantu SCF dalam mematurasi oosit. *Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)* berperan penting dalam mengirimkan impuls menuju hipofisa anterior untuk meriliskan FSH sebagai inisiator proliferasi folikel. *Follicle Stimulating Hormone (FSH)* selanjutnya akan diterima oleh reseptor yang terletak di sel granulosa dan akan mengatur perkembangan folikel primer hingga menjadi folikel *de Graaf* (Tiemann *et al.*, 2003; Johnson, 2007^a; Ranzenigo *et al.*, 2008).

Yusuf *et al.* (1993) dan Ndossi *et al.* (2012) menyimpulkan dalam penelitiannya bahwa hasil evaluasi pengaruh dosis tinggi zearalenon dapat menghambat GCs dalam memunculkan IGF-1 sehingga produksi FSH menurun. Induksi superovulasi yang menggunakan derivat hormon PMSG dapat

mempercepat perkembangan folikel dan peningkatan jumlah folikel *de Graaf* stadium preovulatori.

Hasil penelitian ini didukung oleh pendapat Motea dan Berdis (2010) serta Moreira *et al.* (2011) yang menyebutkan bahwa senyawa metabolit zearalenon dapat merusak asam nukleat sel oosit anjing betina pra pubertas. Tampak gambaran apoptosis pada sel oosit dengan pewarnaan TUNEL *Assay*.

Kolesterol sebagai sumber utama sintesis hormon steroid akan dipecah menjadi pregnenolon oleh enzim sitokrom p450 (CYP450) di inner membran mitokondria. Pregnenolon akan diubah menjadi progesteron oleh enzim 3 β -hidroksisteroid dehidrogenase (3 β -HSD) setelah berdifusi menuju retikulum endoplasma dan menjadi dehidroepiandrosteron (DHEA) oleh enzim 17 α -hidroksilase (CYP450-17 α). 3 β -HSD dan CYP450-17 α akan mengkatalisis DHEA dan progesteron menjadi androstendion. Androstendion akan dikatalisis oleh enzim 17 β -hidroksisteroid dehidrogenase (17 β -HSD) menjadi testosterone di sel teka dan akan berdifusi menuju sel granulosa. Testosteron dan estron di sel granulosa akan diubah menjadi 17 β -estradiol oleh enzim aromatase (CYP450arom). Akumulasi 17 β -estradiol secara berlebihan ditambah dengan influks estrogen eksogen akan menyebabkan hiperestrogenisme (Boron dan Boulpaep, 2003; Tsuchiya *et al.*, 2005).



Gambar 6.1 Steroidogenesis

Sumber : Boron dan Boulpaep, 2003

Perhitungan jumlah folikel dan korpus luteum akan mendekati tingkat ketelitian jika pengamatan dilakukan pada ovarium *dexter et sinister*. Jumlah fetus juga dapat diperkirakan melalui perhitungan korpus luteum pada ovarium *dexter et sinister*. *Mycotoxin binders* tidak dapat mengurangi efek yang ditimbulkan oleh zearalenon terhadap jumlah korpus luteum. Zearalenon hanya memberikan efek pada GCs sampai stadium preovulatori. Korpus luteum yang terjadi pada stadium postovulatori akan dipengaruhi oleh banyak atau tidaknya kadar *LH surge* yang ditangkap oleh reseptor LH pada sel teka folikel *de Graaf*. Oosit yang telah

diovulasikan dari folikel *de Graaf* akan menimbulkan bekas yang disebut korpus rubrum dan berkembang menjadi korpus luteum (Hafez, 2000^b; Johnson, 2007^a).

6.2 Ekspresi Caspase 9

Hasil uji statistik menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara K- dengan K+, P1, P2, dan P3 yang artinya bahwa dosis *mycotoxin binders* 0,5 mg/ekor/hari merupakan dosis minimal yang dapat mengurangi efek yang ditimbulkan zearalenon terhadap ekspresi caspase 9. Hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) tampak antara P1 dengan P2 dan P3 yang artinya bahwa semua dosis *mycotoxin binders* dapat mengeliminasi pengaruh zearalenon terhadap ekspresi caspase 9.

Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Zhu *et al.* (2012) yang menyebutkan bahwa zearalenon dapat menginisiasi proses apoptosis pada sel-sel granulosa. Proses molekuler apoptosis terjadi melalui jalur intrinsik pada mitokondria dengan caspase 9 sebagai inisiator dan caspase 3 sebagai eksekutor. Zearalenon dinyatakan sebagai agen sitotoksik pemicu hiperestrogenisme pada sistem reproduksi karena dapat menginduksi apoptosis yang bersifat masif.

Hiperestrogenisme akan mengganggu konsistensi *Permeability Transmissible Pore* (PTP) pada membran mitokondria. Kerusakan PTP akan mengakibatkan aktifnya megachannel sehingga akan berdampak pada kegagalan transpor elektron. Aktifnya megachannel juga akan diikuti masuknya ion Ca^{2+} ekstrasel dan terakumulasi dengan ion Ca^{2+} intrasel yang terdapat pada

mitokondria dan retikulum endoplasma. Kadar Ca^{2+} yang tinggi akan meningkatkan ekspresi bax dan menurunkan bcl 2 (Maresca dan Fantini, 2010).

Proapoptotik protein lain seperti *Apoptotic-Inducing Factor* (AIF), *Second Mitochondria-derived Activator of caspases* (Smac) akan meningkatkan aktivasi caspase dengan menghambat *Inhibitor of Apoptosis Protein* (IAP). Caspase dan cascade akan memecah bcl 2 *interacting protein domain* (Bid) menjadi Bid c, yang selanjutnya akan menuju mitokondria sebagai pemicu rilisnya sitokrom c. Rilisnya sitokrom c ke dalam sitosol akan mengikat *Apoptotic Protease Activating Factor 1* (Apaf 1) bersama dengan dATP dan procaspase 9 untuk mengaktifkan caspase 9 (Kumar *et al.*, 2005).

Caspase 9 bertindak sebagai inisiator apoptosis akan terdimerisasi memicu umpan balik dengan menghambat rilis bcl 2 dan mengikat procaspase 3 untuk mengaktifkan caspase 3. Caspase 3 bertindak sebagai eksekutor akan membantu aktivasi endonuklease dan protease sitoplasmik yang akan memfragmentasi DNA nukleus dan mendegradasikan protein sitosol. Hasil akhir pada proses fragmentasi akan terbentuk *apoptotic bodies* yang mengandung organel intrasel dan mengekspresikan fosfatidilserin yang akan memicu proses fagositosis (Kumar *et al.*, 2005; Guerrero *et al.*, 2012).

6.3 Panjang, Berat dan Jumlah Fetus

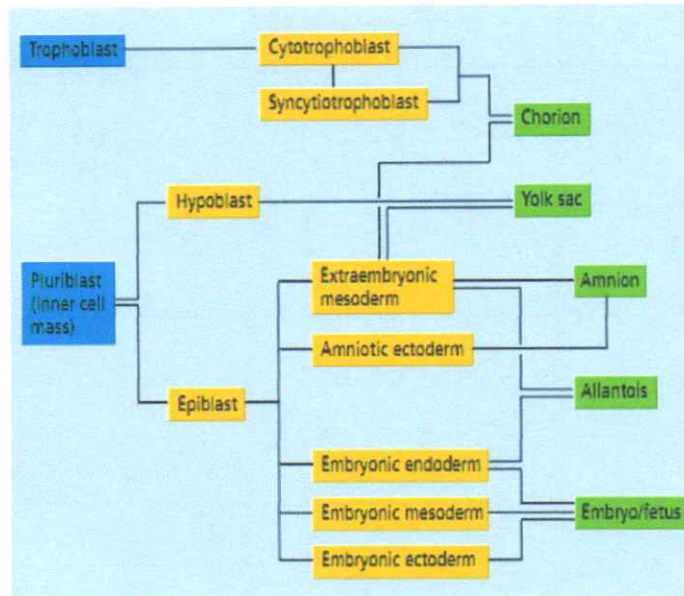
Hasil uji statistik terhadap panjang fetus menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara K+, K-, P1, dengan P2, P3 yang artinya bahwa dosis *mycotoxin binders* 1 mg/ekor/hari merupakan dosis minimal yang dapat

mengurangi efek yang ditimbulkan zearalenon terhadap panjang fetus. Hasil yang tidak berbeda nyata ($p>0,05$) tampak antara K+ dengan K- dan P1 yang artinya bahwa dosis *mycotoxin binders* 0,5 mg/ekor/hari tidak dapat mengeliminasi pengaruh zearalenon terhadap panjang fetus.

Hasil uji statistik terhadap berat fetus menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0,05$) antara K- dengan K+, P1, P2, P3 yang artinya bahwa dosis *mycotoxin binders* 0,5 mg/ekor/hari merupakan dosis minimal yang dapat mengurangi efek yang ditimbulkan zearalenon terhadap berat fetus. Hasil yang tidak berbeda nyata ($p>0,05$) tampak antara K+ dengan P1, P2, P3 yang artinya bahwa semua dosis *mycotoxin binders* dapat mengeliminasi pengaruh zearalenon terhadap berat fetus.

Hasil uji statistik terhadap jumlah fetus tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p>0,05$) antara semua perlakuan yang artinya bahwa dosis *mycotoxin binders* dan zearalenon tidak berpengaruh terhadap jumlah fetus

Menurut Galan *et al.* (2000) apoptosis merupakan kematian sel terprogram yang terjadi pada organisme multiseluler baik karena faktor patologis maupun fisiologis dan bertujuan antara lain untuk menghilangkan sel yang rusak atau tidak memiliki fungsi fisiologis bagi tubuh. Apoptosis dapat terjadi pada sel tropoblast dan inner sel mast untuk mengendalikan masa *cleavage* embrio dari malformasi yang disebabkan oleh agen teratogenik.



Gambar 6.2 Periode blastosis
Sumber : Johnson, 2007^b

Apoptosis pada sel tropoblast akan mengendalikan proliferasi sel *cytotrophoblast* dan *syncytiotrophoblast*. Apoptosis pada inner sel mast akan mengendalikan proliferasi sel *hypoblast* dan epiblast yang terdiri dari : *extraembryonic mesoderm*, *amniotic ectoderm*, *embryonic endoderm*, *embryonic mesoderm*, dan *embryonic ectoderm*. Peningkatan apoptosis pada sel tropoblast dan inner sel mast merupakan kejadian patologis yang dapat mengakibatkan malformasi fetus, berat lahir rendah, dan kretinisme (Johnson, 2007^b).

Mycotoxin binders mengandung bahan aktif antara lain aluminosilikat, selulosa, polisakarida, peptidoglikan, dan polimer sintesis seperti cholestyramine, polivinilpirolidon beserta turunannya (Avantaggiato *et al.*, 2005).

Doll *et al.* (2004) menjelaskan mekanisme kerja *mycotoxin binders* dengan mengeliminasi gugus metil pada struktur kimia zearalenon. *Mycotoxin binders* juga mengandung bahan pakan tambahan seperti *charcoal*, biotin, tiamin, serta

vitamin C dan E yang bersifat antioksidan untuk menurunkan dampak paparan dari residu mikotoksin sebelum dimetabolisme tubuh.

Mycotoxin binders dapat mengikat mikotoksin yang mempunyai senyawa silikat. Struktur silikat terdiri dari neosilikat, sorosilikat, inosilikat, siklosilikat, filosilikat, dan tektosilikat. Struktur tersebut akan diubah menjadi *Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate* yang mudah dimetabolisme tubuh. *Mycotoxin binders* juga dilengkapi dengan bahan dekontaminan yang bermanfaat dalam memperbaiki kondisi hewan (Bingham *et al.*, 2003; Whitlow dan Hagler, 2005).

Yiannikouris *et al.* (2004) menyebutkan bahwa *feed additive* dapat pula dicampurkan sebagai bahan penyusun *mycotoxin binders*, yakni β -D-glukan. β -D-glukan disintesis dari dinding sel *Saccharomyces cerevisiae* yang dapat bertindak sebagai absorben zearalenon. Dalam *mycotoxin binders* yang diproduksi oleh industri pakan ternak sering dijumpai kandungan asam amino lisin, aspartat dan propionat sebagai *feed additive*.

BAB 7

KESIMPULAN

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa :

1. *Mycotoxin binders* dapat meningkatkan jumlah folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, folikel *de Graaf* namun tidak mempengaruhi jumlah korpus luteum organ ovarium mencit (*Mus musculus*) bunting yang terpapar zearalenon.
2. *Mycotoxin binders* dapat menurunkan ekspresi caspase 9 sel granulosa organ ovarium mencit (*Mus musculus*) bunting yang terpapar zearalenon.
3. *Mycotoxin binders* dapat meningkatkan panjang dan berat fetus namun tidak mempengaruhi jumlah fetus mencit (*Mus musculus*) bunting yang terpapar zearalenon.

7.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka saran yang dapat dianjurkan sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensi *mycotoxin binders* terhadap fisiologi dan patologi organ testis, ovarium *dexter et sinister*, plasenta foetalis, kadar testosteron, kadar estrogen, dan kadar ROS baik hewan jantan maupun betina yang terpapar zearalenon.

2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensi *mycotoxin binders* terhadap efektivitas produksi dan reproduksi pada ternak.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensi *mycotoxin binders* terhadap mikotoksin aflatoksin, deoksinivalenol, fumonisin, dan okratoksin.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Wahhab, M.A., A.M. Hasan, S.E. Aly, and K.F. Mahrous. 2005. Adsorption of sterigmatocystin by montmorillonite and inhibition of its genotoxicity in the Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Mutat Res.* 582:20-27.
- Avantaggiato, G., M. Solfrizzo, and A. Visconti. 2005. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. *Food Additives and Contaminants.* 22:379–388.
- Bailey, RH., LF. Kubena, RB. Harvey, SA. Buckley, and GE. Rottinghous. 1998. Efficacy of various inorganic sorbents to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. *Poult. Sci.* 77:1623-1630.
- Baldwin, RS., RD. Williams, and MK. Terry. 1983. Zeranol: a review of the metabolism, toxicology, and analytical methods for detection of tissue residues. *Regul Toxicol Pharmacol.* 3(1):9–25.
- Baraas, F. 2006. Programmed Cell Survival-Programmed Cell Death. Symposium Apoptosis Charming to Death. Jakarta.
- Bingham, AK., TD. Phillips, and JE. Bauer. 2003. Potential for dietary protection against the effects of aflatoxins in animals. *J AVMA* 222:591-596
- Boron, FW., and LE. Boulpaep. 2003. Medical physiology: A Cellular and Molecular Approach. Elsevier Saunders. Page 1300 ISBN: 1-4160-2328-3
- Bridges, A., R. Lemenager, B. Richert, and M. Schutz. 2008. Animal Sciences : Zearalenone Concerns in Reproducing Livestock. Department of Animal Sciences. Purdue University.
- Döll, S., S. Dänicke, H. Valenta, and G. Flachowsky. 2004. In vitro studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. *Arch. Anim. Nutr.* 58:311-324.
- Doric, M., S. Radovic, M. Babic, S. Kuskunovic, I. Tomic, and I. Selak. 2007. Zearalenone-Induced Lymphohagocytosis (T Cell Apoptosis) on The Rat's Thymus. Institute of Pathology Faculty of Medicine University of Sarajevo. Bosnia and Herzegovina. *J Basic Med. Sci.* 7(1):66-70.

- Engelberg-Kulka, H., S. Amitai, I. Kolodken-Gal, and R. Hazan. 2006. Bacterial Programmed Cell Death and Multicellular Behavior in Bacteria. *Plo S Genetics*, 2(10):135.
- Felty, Q., and D. Roy. 2005. Estrogen, mitochondria and growth of cancer and non-cancer cells. *J Carcinog* 4: 1.
- Fink-Gremmels, J. 2008. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *J Vet*, vol. 176 (1): 84-92.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2007. Strengthening National Food Control Systems. A quick guide to assess capacity building needs. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/0010/a1142e/a1142e00.pdf>
- Frizzell, C., D. Ndossi, S. Verhaegen, E. Dahl, G. Eriksen, M. Srrlie, E. Ropstad, M. Muller, CT. Elliott, and L. Connolly. 2011. Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicol Lett* 206: 210-217.
- Gajęcka, M., E. Jakimiuk, M. Polak, I. Otrocka-Domagala, T. Janowski, W. Zwierzchowski, K. Obremski, L. Zielonka, J. Apoznański, and M. Gajęcki. 2004. Zearalenone applied per os provides adverse effects in structure of chosen parts of bitch reproductive system. *Pol J Vet Sci* 7: 59-66.
- Gajęcka, M. 2012. The effect of low-dose experimental zearalenone intoxication on the immunoexpression of estrogen receptors in the ovaries of pre-pubertal bitches. Department of Veterinary Prevention and Feed Hygiene. Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olstyn, Oczapowskiego. Poland. *J Vet. Sci.* 15(4):685-691
- Gajęcka, M. 2013. The effect of experimental low zearalenone intoxication on ovarian follicles in pre-pubertal bitches. Department of Veterinary Prevention and Feed Hygiene. Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olstyn, Oczapowskiego. Poland. *J Vet. Sci.* 16(1):45-54
- Galan, A., JE. O'Connor, D. Valbuena, R. Herrer, J. Remohi, S. Pampfer, A. Pellicer, and C. Simon. 2000. The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesion. *J. Biol Reprod.* 63(1):430-439
- Gellerich. FN., Z. Gizatullina, S. Trumbeckaite, HP. Nguyen, T. Pallas, O. Arandarcikaite, S. Vielhaber, E. Seppet, and F. Strig-gow. 2010. The regulation of OXPHOS by extra-mitochondrial calcium. *Biochem Biophys Acta.* 1797: 1018-1027.

- Guerrero, AD., I. Schmitz, M. Chen, and J. Wang. 2012. Promotion of caspase activation by caspase 9 mediated feedback amplification of mitochondrial damage. Department of Pathology and Immunology, Baylor College of Medicine. Houston, Texas, USA. *J Clin Cell Immun.* 3:3
- Hafez, ESE. 2000^a. Reproductive Cycles. In E.S.E. Hafez *Reproduction in Farm Animal* 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. p.55-67
- Hafez, ESE. 2000^b. Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation. In E.S.E. Hafez *Reproduction in Farm Animal* 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. p.68-81
- Hafez, ESE. 2000^c. Gestation, Prenatal Physiology, and Parturition. In E.S.E. Hafez *Reproduction in Farm Animal* 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. p.140-156
- Hougaard, KS, B. Fadeel, M. Gulumian, VE. Kagan, and K. Savolainen. 2011. Developmental Toxicity of Engineered Nanoparticles. In: Gupta RC, editor. *Reproductive and Developmental Toxicology*. Academic Press. Amsterdam. pp 269-290.
- Hsu, SM., L. Raine, and H. Fanger. 1981. The use of avidin-biotin peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *American J Clinical Pathology.* 75:816-821
- Ismudiono, P. Srianto, H. Anwar, SP. Madyawati, A. Samik, E. Safitri. 2010^a. Anatomi dan Fisiologi Alat Kelamin Betina. In *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Cetakan I. Airlangga University Press. Surabaya. Hal: 25-38
- Ismudiono, P. Srianto, H. Anwar, SP. Madyawati, A. Samik, E. Safitri. 2010^b. Siklus Reproduksi. In *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Cetakan I. Airlangga University Press. Surabaya. Hal: 67-92
- Ismudiono, P. Srianto, H. Anwar, SP. Madyawati, A. Samik, E. Safitri. 2010^c. Fisiologi Kebuntingan dan Kelahiran. In *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Cetakan I. Airlangga University Press. Surabaya. Hal: 93-108
- Johnson, MH. 2007^a. Ovarian Function in The Adult. In *Essential Reproduction* 6th ed. Blackwell Publishing. Australia. p.80-101
- Johnson, MH. 2007^b. Implantation and The Establishment of The Placenta. In *Essential Reproduction* 6th ed. Blackwell Publishing. Australia. p.189-211

- Kiliańska, ZM., and A. Miśkiewicz. 2003. Caspases of the vertebrates – their role in apoptosis. *Postępy Biologii Komórki*. 30: 129-152.
- Kumar, V., RS. Cotran, and S. Robins. 2005. *Basic Pathology 7th Ed* Saunders Philadelphia. Alih bahasa. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal: 3-33
- Kusriningrum, RS. 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Lardy, G. 2013. *Feeding Corn to Beef Cattle*. Department Head Animal Sciences. North Dakota State University. Fargo. North Dakota.
- Laurence, DR. and AL. Bacharach. 1993. *Evaluation of Drug Activities and Pharmacometrics*, Academic Press London and New York 1:pp. 160-161.
- Leffers, H., M. Naesby, B. Vendelbo, NE. Skakkebaek, and M. Jorgensen. 2001. Oestrogenic potencies of zearanol, oestradiol, diethylstilboestrol, bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disrupters. *Human Reproduction*, 16, 1037-45, ISSN: 0268-1161.
- Liben, P. 2003. *Fungsi Estrogen dalam Seminar Fitoestrogen*. Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Linnaeus, C. 1758. Carolus Linnaeus dan Sistem Binomial Nomenclature. *Encyclopedia Britannica*.
- Lumongga, F. 2008. *Apoptosis*. Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. USU Repository.
- Malekinejad, H., RF. Mass-Bakker, and J. Fink-Gremmels. 2005. Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. In *Vet Research*, 36 (5-6): 799-810.
- Malekinejad, H., B. Colenbrander, and J. Fink-Gremmels. 2006. Hydroxysteroid dehydrogenases in bovine and porcine granulosa cells convert zearalenone into its hydroxylated metabolites α -zearalenol and β -zearalenol. *Vet Res Commun* 30: 445-453.

- Maresca, M., and J. Fantini. 2010. Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases. *Toxicon*. 56: 282-294.
- Maryanto, I., DJ. Kitchener, dan SN. Prijono. 2005. Morphological analysis of house mice, *Mus musculus* (Rodentia, Muridae) in Southern and Eastern Indonesia and Western Australia. *J. mammal Study*. 30(1):53-63
- Moreira PI, JB. Custódio, E. Nunes, PJ. Oliveira, A. Moreno, R. Seica, CR. Oliveira, MS. Santos. 2011. Mitochondria from distinct tissues are differently affected by 17 β -es-tradiol and tamoxifen. *J Steroid Biochem Mol Biol* 123: 8-16.
- Motea EA, dan AJ. Berdis. 2010. Terminal deoxynucleotidyl transferase: the story of a misguided DNA polymerase. *Biochim Biophys Acta* 1804:1151-1166.
- Murphy, K., P. Travers, and M. Walport. 2008. *Janeway's Immunobiology* 7th Ed. Garland Science. New York.
- Mustofa, I., L. Mahaputra, YP. Dachlan, dan FA. Rantam. 2013. Eksplorasi Potensi Imunokontraseptif gZP3. Airlangga University Press dengan LP3 Unair. Surabaya. Hal : 33-34
- Ndossi, DG., C. Frizzell, NH. Tremoen, CK. Faeste, S. Verhaegen, E. Dahl, GS. Eriksen, M. Sorlie, L. Connolly, and E. Ropstad. 2012. An in vitro investigation of endocrine disrupting effects of trichothecenes deoxynivalenol (DON), T-2 and HT-2 Toxin. In *Toxicology letters* 214(1):268-278
- Nikov, GN., NE. Hopkins, S. Boue, and WL. Alworth. 2000. Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. *Environ. Health Perspect.* 108, 867 – 872.
- Nurhidayat. 2002. Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia dalam Penelitian dan Terapan Bidang Biologi dan Biomedis : Deteksi Bahan Aktif dengan Metode Immunohistokimia. Institute Pertanian Bogor. 1-14
- Nuryono, N., CT. Noviandi, J. Bohm, dan E. Razzazi-Fazeli. 2003. A limited survey of zearalenone in Indonesian maize-based food and feed by ELISA and high performance liquid chromatography. Gadjah Mada University. Yogyakarta. Indonesia. Elsevier : *J.Food Cont.* 16(1):65-71

- Ramos-Vara, JA. 2005. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Journal Veterinary Pathology*. 42(4):405-426
- Rantam, FA. 2003. *Metode Immunologi*. Cetakan pertama Airlangga University Press. Surabaya. 23-136
- Ranzenigo, G., F. Caloni, F. Cremonesi, PY. Aad, and LJ. Spicer. 2008. Effects of Fusarium mycotoxin on steroid production by porcine granulose cells. In *Animal Reprod. Sci.* 107(1-2):115-130
- Sarwono, B. 2009. *Buku pintar pemeliharaan kelinci dan rodensia*. PT. Samindra Utama. Jakarta.
- Sinuhaji, I., B. Siregar, dan Lisnawati. 2013. Ekspresi p16^{INK4A} pada Karsinoma Serviks Usia Muda. Departemen Patologi Anatomi. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. *J Indon Med Assoc* 63:1
- Thompson, CB. 1995. Apoptosis in The Patogenesis and Treatment of Disease. *Sci*, 267:1445-1448.
- Tiemann, U., T. Viergutz, L. Jonas, and F. Schneider. 2003. Influence of the mycotoxins α - and β -zearalenol and deoxynivalenol on the cell cycle of cultured porcine endometrial cells. *J Reprod. Toxicol.* 17(2):209-218
- Tsuchiya, Y., M. Nakajima, and T. Yokoi. 2005. Cytochrome p450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. In *cancer letters* 227(2):115-124
- Vihma, V. 2003. Lipoprotein-Associated 17 β -Estradiol Fatty Acid Esters in Pregnancy and During Postmenopausal Estrogen Therapy. Department of Cardiology Medicine. University of Helsinki. Finland. 12-24
- Whitlow, LW., and WM. Hagler, Jr. 2005. Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs* 77 (No. 38):69-79.
- Whitten, PL., HB. Patisaul, and LJ. Young. 2002. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. *Neurotoxicol. Teratol.* 24, 47 – 54.
- William, JB., and MB. Linda. 2000. *Color Atlas of Veterinary Histology* 2nd Edition. Department of Biology Rutgers University Camden College of Arts and Science. New Jersey. Lippincott Williams and Wilkins. 119-162.

- Yiannikouris A, G. Andre, A. Buléon, G. Jeminet, I. Canet, J. Francois, G. Bertin, JP. Jouany. 2004. Comprehensive conformational study of key interactions involved in zearalenone complexation with b-D-glucans. *Biomacromolecules* 5(6):2176–2185
- Yusuf, TL., MR. Toelihere, I. Supriatna, dan L. Arifiantini. 1993. Penggunaan Berbagai Dosis Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) untuk Kegiatan Superovulasi dan Transfer Embrio pada Sapi FH. Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Zhou, BS., and SJ. Elledge. 2000. The DNA Damage Response : Putting Checkpoints in Perspective. *Nature*, 408:433-439.
- Zhu, L., H. Yuan, C. Guo, Y. Lu, S. Deng, Y. Yang, Q. Wei, L. Wen, and Z. He. 2012. Zearalenone induces apoptosis and necrosis in porcine granulosa cells via a caspase-3- and caspase-9- dependent mitochondrial signaling pathway. *J Cell Physiol*. 227(5):1814-20

LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel konversi perhitungan dosis untuk manusia dan berbagai jenis hewan.

	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmut 400 g	Kelinci 1,5 Kg	Kucing 2 Kg	Kera 4 Kg	Anjing 12 Kg	Manusia 70 Kg
Mencit 20 g	1,0	7,0	2,225	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,47	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmut 400 Kg	0,008	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 Kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 Kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 Kg	0,16	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 Kg	0,008	0,06	0,1	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 Kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

(Sumber : Laurence dan Bacharach, 1993)

Lampiran 2. Perhitungan dosis zearalenon.Diketahui :

Berat mencit dalam tabel (B) : 20 gram

Berat mencit rata-rata (A) : 40 gram

Nilai konversi tikus → mencit dalam tabel (C) : 0,008

Menurut Gajecka, (2012) dosis toksik zearalenon pada anjing 8 kg adalah 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BB/hari atau sama dengan 6,4 mg/ekor/hari. (D)

Ditanyakan :

Dosis mencit... ?

Penyelesaian :

Rumus dosis = $A/B \times C \times D$

Dosis mencit = $40/20 \times 0,008 \times 6,4$

= 0,1 mg/ekor/hari

Lampiran 3. Hasil pengamatan dan perhitungan jumlah folikel primer.

Perlakuan	Ulangan	Lapang Pandang					Rata-rata
		1	2	3	4	5	
K+	1	20	11	12	11	10	12,8
	2	18	19	13	14	11	15
	3	21	16	15	14	12	15,6
	4	14	15	14	12	11	13,2
K-	1	6	7	6	8	8	7
	2	6	8	6	8	8	7,2
	3	7	6	8	7	8	7,2
	4	6	7	7	8	7	7
P1	1	6	7	6	5	7	6,2
	2	7	6	7	5	6	6,2
	3	7	7	6	5	7	6,4
	4	6	6	5	6	7	6
P2	1	9	8	7	7	9	8
	2	6	7	9	7	8	7,4
	3	8	7	9	7	8	7,8
	4	7	9	7	9	8	8
P3	1	8	9	10	9	8	8,8
	2	8	7	8	9	10	8,4
	3	9	7	8	9	7	8
	4	8	8	7	9	9	8,2

Lampiran 4. Hasil pengamatan dan perhitungan jumlah folikel sekunder.

Perlakuan	Ulangan	Lapang Pandang					Rata-rata
		1	2	3	4	5	
K+	1	15	12	12	12	6	11,4
	2	14	11	11	13	7	11,2
	3	13	12	12	13	7	11,4
	4	12	13	11	12	6	10,8
K-	1	4	3	2	3	3	3
	2	6	5	6	4	6	5,4
	3	3	2	4	3	3	3
	4	3	4	3	4	2	3,2
P1	1	6	6	4	5	6	5,4
	2	5	5	5	5	6	5,2
	3	5	6	6	4	5	5,2
	4	4	5	6	6	4	5
P2	1	5	7	5	7	5	5,8
	2	6	6	6	6	6	6
	3	5	5	5	5	5	5
	4	5	6	7	7	6	6,2
P3	1	8	9	10	9	8	8,8
	2	8	7	8	9	10	8,4
	3	7	9	8	7	9	8
	4	8	8	7	9	9	8,2

Lampiran 5. Hasil pengamatan dan perhitungan jumlah folikel tersier.

Perlakuan	Ulangan	Lapang Pandang					Rata-rata
		1	2	3	4	5	
K+	1	8	7	9	9	3	7,2
	2	7	6	7	7	3	6
	3	6	8	7	7	3	6,2
	4	8	7	7	8	3	6,6
K-	1	3	4	3	3	4	3,4
	2	7	5	6	6	4	5,6
	3	4	3	3	3	3	3,2
	4	3	4	3	3	2	3
P1	1	3	3	4	3	4	3,4
	2	3	4	4	3	4	3,6
	3	4	4	3	4	4	3,8
	4	4	4	3	4	3	3,6
P2	1	5	5	3	3	4	4
	2	4	4	4	4	3	3,8
	3	4	5	3	3	3	3,6
	4	3	4	4	3	3	3,4
P3	1	4	4	4	4	5	4,2
	2	4	5	5	5	4	4,6
	3	4	4	4	4	6	4,4
	4	4	9	4	4	4	5

Lampiran 6. Hasil pengamatan dan perhitungan jumlah folikel *de Graaf*.

Perlakuan	Ulangan	Lapang Pandang					Rata-rata
		1	2	3	4	5	
K+	1	11	9	7	6	2	7
	2	10	8	6	7	3	6,8
	3	11	9	7	4	8	7,8
	4	10	8	8	5	11	8,4
K-	1	1	1	1	1	1	1
	2	2	3	2	3	2	2,4
	3	1	2	1	1	2	1,4
	4	2	1	1	1	1	1,2
P1	1	2	3	3	2	3	2,6
	2	2	3	2	2	3	2,4
	3	3	2	3	2	2	2,4
	4	3	3	2	3	3	2,8
P2	1	2	3	3	3	3	2,8
	2	3	2	2	2	3	2,4
	3	3	3	3	3	3	3
	4	2	3	3	3	2	2,6
P3	1	6	4	3	4	4	4,2
	2	5	4	3	4	4	4
	3	6	3	3	4	3	3,8
	4	7	8	8	4	3	6

Lampiran 7. Hasil pengamatan dan perhitungan jumlah korpus luteum.

Perlakuan	Ulangan	Lapang Pandang					Rata-rata
		1	2	3	4	5	
K+	1	2	2	2	2	3	1,8
	2	3	3	2	2	1	2,4
	3	2	4	3	2	2	2,4
	4	3	3	2	3	1	2,6
K-	1	1	2	3	3	3	2,4
	2	3	1	4	2	3	2,6
	3	1	3	2	3	3	2,2
	4	1	2	2	1	2	1,8
P1	1	2	3	3	2	3	2,6
	2	2	3	3	2	3	2,6
	3	2	3	2	3	2	2,4
	4	3	3	2	2	3	2,6
P2	1	2	2	3	2	3	2,4
	2	3	3	2	2	3	2,6
	3	2	3	2	3	2	2,4
	4	2	3	2	3	2	2,4
P3	1	3	3	4	5	2	3,6
	2	3	3	4	3	3	3,2
	3	4	4	3	4	3	3,6
	4	3	3	4	3	3	3,2

Lampiran 8. Hasil pengamatan dan skoring ekspresi caspase 9.

Perlakuan	Ulangan	Lapang Pandang					Rata-rata
		1	2	3	4	5	
K+	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	2	2	0	2	1,2
	3	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0
K-	1	9	3	9	9	9	7,8
	2	9	6	9	6	9	7,8
	3	9	6	9	9	6	7,8
	4	6	9	12	12	9	9,6
P1	1	4	2	2	4	4	3,2
	2	4	2	4	2	4	3,2
	3	4	4	3	6	2	3,8
	4	4	4	4	4	4	4
P2	1	4	2	2	2	4	2,8
	2	4	4	3	3	4	3,6
	3	4	3	4	4	2	3,4
	4	2	3	4	3	4	3,2
P3	1	3	4	4	2	2	3
	2	2	2	3	2	3	2,4
	3	3	3	2	3	3	2,8
	4	2	2	3	4	4	3

Lampiran 9. Hasil pengukuran panjang fetus.

Perlakuan	Ulangan	Jumlah Fetus										Rata-rata	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
K+	1	2,1	2	2,5	2,1	2,4							2,25
	2	2,2	2,1	2,1	2,3	2,1	2	2	2,4				2,15
	3	2,2	1,9	2,4	2,1	2,2	2,1						2,15
	4	2,3	2,3	2,4	2	2,2	2,2						2,23
K-	1	1,9	2	2,2	2,2	1,9	2	1,9					2,01
	2	1,8	2	2,1	2,1	2,5	2,3	2					2,11
	3	1,9	2,3	2	2,1	2,2	2	2,2					2,10
	4	1,8	1,9	2	1,8	2,2	2,1						1,96
P1	1	2,1	1,9	2,1	2,2	2	1,9						2,03
	2	1,9	2,3	2	2,3	2,2	2	2	2,2	2,2			2,12
	3	2	2,3	2,2	2,2	2,1	1,8	2					2,09
	4	1,7	1,6	1,7	2,2	2,1	1,9						1,87
P2	1	3,1	2,7	2,4	2,5	3	2,4	2,3					2,63
	2	2,7	2,8	2,8	2,9	2,9	2,8	2,7	2,5				2,76
	3	2,7	3,1	2,9	2,7	2,5	2,6						2,75
	4	2,7	3,1	2,8	2,5	2,7	2,7						2,75
P3	1	2,8	2,7	2,8	2,9	2,8	2,7	3					2,81
	2	2,9	3,1	3,2	3,1								3,07
	3	3,1	2,9	2,9	3,1	2,7	3,2						2,98
	4	2,9	2,8	2,8	2,7	2,6	2,7	2,9					2,77

Lampiran 10. Hasil penimbangan berat badan fetus.

Perlakuan	Jumlah Fetus										Rata-rata	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
K+	1	1,0543	1,0561	1,0591	1,0451	1,0575						1,0544
	2	1,0539	1,0491	1,0562	1,0483	1,0590	1,0572	1,0579	1,0455			1,0534
	3	1,0592	1,0501	1,0521	1,0510	1,0501	1,0523					1,0525
	4	1,0512	1,0471	1,0571	1,0432	1,0533	1,0570					1,0515
K-	1	0,8762	0,8901	0,9416	0,9661	0,7891	0,8835	0,8528				0,8856
	2	0,8725	0,8872	0,8640	0,8923	0,8542	0,9736	0,9877				0,9045
	3	0,8723	0,7832	0,7881	0,8891	0,7892	0,8320	0,8316				0,8265
	4	0,8672	0,8593	0,8681	0,8487	0,8672	0,8756					0,8644
P1	1	1,0142	1,0171	1,0132	1,0233	1,0234	1,0231					1,0191
	2	1,0234	1,0052	1,0001	1,0121	1,0210	1,0124	1,0345	1,0459	1,0319		1,0207
	3	1,0234	1,0231	1,0132	1,0245	1,0233	1,0342	1,0351				1,0253
	4	1,0102	1,0241	1,0192	1,0100	1,0342	1,0372					1,0225
P2	1	1,0231	1,0301	1,0120	1,0123	1,0193	1,0233	1,0391				1,0227
	2	1,0152	0,9324	0,9982	1,0429	1,0374	1,0278	1,0240	1,0347			1,0141
	3	1,0274	1,0230	1,0401	1,0278	1,0282	1,0371					1,0306
	4	1,0298	1,0278	1,0487	1,0258	1,0298	1,0382					1,0334
P3	1	1,0132	1,0108	1,0186	1,0072	1,0092	1,0111	1,0034				1,0105
	2	1,0117	1,0092	1,0173	1,0037							1,0105
	3	1,0138	1,0154	1,0033	1,0761	1,0122	1,0012					1,0203
	4	1,0099	1,0119	1,0123	1,0094	1,0139	1,0109	1,0037				1,0103

Lampiran 11. Hasil analisis statistik jumlah folikel, korpus luteum, ekspresi caspase 9, panjang, berat dan jumlah fetus.

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a		Shapiro-Wilk	
	Statistic	df	Statistic	Sig.
Primer_F	,293	20	,761	,054
Sekunder_F	,190	20	,904	,049
Tersier_F	,193	20	,872	,053
DeGraaf_F	,231	20	,868	,051
Luteal_C	,292	20	,865	,050
Caspase_9	,245	20	,870	,052
Lenght	,232	20	,871	,052
Weight	,386	20	,711	,050
Fetus_Total	,208	20	,915	,080

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K+	4	14,1500	1,36015	,68007	11,9857	16,3143	12,80	15,60
K-	4	7,1000	,11547	,05774	6,9163	7,2837	7,00	7,20
P1	4	6,2000	,16330	,08165	5,9402	6,4598	6,00	6,40
P2	4	7,8000	,28284	,14142	7,3499	8,2501	7,40	8,00
P3	4	8,3500	,34157	,17078	7,8065	8,8935	8,00	8,80
Total	20	8,7200	2,93824	,65701	7,3449	10,0951	6,00	15,60

	K+	4	11,2000	,28284	,14142	10,7499	11,6501	10,80	11,40
	K-	4	3,6500	1,17047	,58523	1,7875	5,5125	3,00	5,40
	P1	4	5,2000	,16330	,08165	4,9402	5,4598	5,00	5,40
	P2	4	5,7500	,52599	,26300	4,9130	6,5870	5,00	6,20
	P3	4	8,3500	,34157	,17078	7,8065	8,8935	8,00	8,80
	Total	20	6,8300	2,78135	,62193	5,5283	8,1317	3,00	11,40
	K+	4	6,5000	,52915	,26458	5,6580	7,3420	6,00	7,20
	K-	4	3,8000	1,21106	,60553	1,8729	5,7271	3,00	5,60
	P1	4	3,6000	,16330	,08165	3,3402	3,8598	3,40	3,80
	P2	4	3,7000	,25820	,12910	3,2891	4,1109	3,40	4,00
	P3	4	4,5500	,34157	,17078	4,0065	5,0935	4,20	5,00
	Total	20	4,4300	1,24693	,27882	3,8464	5,0136	3,00	7,20
	K+	4	7,5000	,73937	,36968	6,3235	8,6765	6,80	8,40
	K-	4	1,5000	,62183	,31091	,5105	2,4895	1,00	2,40
	P1	4	2,5500	,19149	,09574	2,2453	2,8547	2,40	2,80
	P2	4	2,7000	,25820	,12910	2,2891	3,1109	2,40	3,00
	P3	4	4,5000	1,01325	,50662	2,8877	6,1123	3,80	6,00
	Total	20	3,7500	2,23736	,50029	2,7029	4,7971	1,00	8,40
	K+	4	2,3000	,34641	,17321	1,7488	2,8512	1,80	2,60
	K-	4	2,2500	,34157	,17078	1,7065	2,7935	1,80	2,60
	P1	4	2,5500	,10000	,05000	2,3908	2,7091	2,40	2,60
	P2	4	2,4500	,10000	,05000	2,2909	2,6091	2,40	2,60
	P3	4	3,4000	,23094	,11547	3,0325	3,7675	3,20	3,60
	Total	20	2,5900	,48330	,10807	2,3638	2,8162	1,80	3,60
	K+	4	,3000	,60000	,30000	-,6547	1,2547	,00	1,20
	K-	4	8,2500	,90000	,45000	6,8179	9,6821	7,80	9,60
	P1	4	3,5500	,41231	,20616	2,8939	4,2061	3,20	4,00

P2	4	3,2500	,34157	,17078	2,7065	3,7935	2,80	3,60
P3	4	2,8000	,28284	,14142	2,3499	3,2501	2,40	3,00
Total	20	3,6300	2,69211	,60197	2,3701	4,8899	,00	9,60
K+	4	2,1950	,05280	,02630	2,1113	2,2787	2,15	2,25
K-	4	2,0450	,07234	,03617	1,9299	2,1601	1,96	2,11
P1	4	2,0275	,11147	,05573	1,8501	2,2049	1,87	2,12
P2	4	2,7225	,06185	,03092	2,6241	2,8209	2,63	2,76
P3	4	2,9075	,14151	,07075	2,6823	3,1327	2,77	3,07
Total	20	2,3795	,38374	,08581	2,1999	2,5591	1,87	3,07
K+	4	1,0500	,00000	,00000	1,0500	1,0500	1,05	1,05
K-	4	,8700	,03162	,01581	,8197	,9203	,83	,90
P1	4	1,0225	,00500	,00250	1,0145	1,0305	1,02	1,03
P2	4	1,0225	,00957	,00479	1,0073	1,0377	1,01	1,03
P3	4	1,0125	,00500	,00250	1,0045	1,0205	1,01	1,02
Total	20	,9955	,06700	,01498	,9641	1,0269	,83	1,05
K+	4	6,2500	1,25831	,62915	4,2478	8,2522	5,00	8,00
K-	4	6,7500	,50000	,25000	5,9544	7,5456	6,00	7,00
P1	4	7,0000	1,41421	,70711	4,7497	9,2503	6,00	9,00
P2	4	6,7500	,95743	,47871	5,2265	8,2735	6,00	8,00
P3	4	6,0000	1,41421	,70711	3,7497	8,2503	4,00	7,00
Total	20	6,5500	1,09904	,24575	6,0356	7,0644	4,00	9,00

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Primer_F	24,906	4	15	,000
Sekunder_F	3,623	4	15	,029

Tersier_F	3,877	4	15	,023
DeGraaf_F	2,740	4	15	,068
Luteal_C	2,117	4	15	,129
Caspase_9	1,977	4	15	,150
Lenght	2,498	4	15	,087
Weight	9,941	4	15	,000
Fetus_Total	,632	4	15	,647

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Primer_F	157,772	4	39,443	94,512	,000
Between Groups					
Within Groups	6,260	15	,417		
Total	164,032	19			
Sekunder_F	141,372	4	35,343	94,500	,000
Between Groups					
Within Groups	5,610	15	,374		
Total	146,982	19			
Tersier_F	23,672	4	5,918	15,123	,000
Between Groups					
Within Groups	5,870	15	,391		
Total	29,542	19			
DeGraaf_F	88,920	4	22,230	53,869	,000
Between Groups					
Within Groups	6,190	15	,413		
Total	95,110	19			
Luteal_C	3,508	4	,877	14,145	,000
Between Groups					
Within Groups	,930	15	,062		
Total	4,438	19			
Caspase_9	133,092	4	33,273	108,264	,000
Between Groups					

Within Groups	4,610	15	,307		
Total	137,702	19			
Between Groups	2,665	4	,666	75,242	,000
Within Groups	,133	15	,009		
Total	2,798	19			
Between Groups	,082	4	,020	89,639	,000
Within Groups	,003	15	,000		
Total	,085	19			
Between Groups	2,700	4	,675	,500	,736
Fetus_Total	20,250	15	1,350		
Within Groups					
Total	22,950	19			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Primer_F	K+	K-	7,05000*	,45680	,000	6,0764	8,0236
		P1	7,95000*	,45680	,000	6,9764	8,9236
		P2	6,35000*	,45680	,000	5,3764	7,3236
		P3	5,80000*	,45680	,000	4,8264	6,7736
	K-	K+	-7,05000*	,45680	,000	-8,0236	-6,0764
		P1	,90000	,45680	,068	-,0736	1,8736
	P1	P2	-,70000	,45680	,146	-1,6736	,2736
		P3	-1,25000*	,45680	,015	-2,2236	-,2764
	P1	P1	-7,95000*	,45680	,000	-8,9236	-6,9764

	P3		-2,60000	,43243	,000	-3,5217	-1,6783
	K+		-2,85000	,43243	,000	-3,7717	-1,9283
	K-		4,70000	,43243	,000	3,7783	5,6217
	P1	P3	3,15000	,43243	,000	2,2283	4,0717
	P2		2,60000	,43243	,000	1,6783	3,5217
	K-		2,70000	,44234	,000	1,7572	3,6428
	P1	K+	2,90000	,44234	,000	1,9572	3,8428
	P2		2,80000	,44234	,000	1,8572	3,7428
	P3		1,95000	,44234	,001	1,0072	2,8928
	K+		-2,70000	,44234	,000	-3,6428	-1,7572
	P1	K-	,20000	,44234	,658	-,7428	1,1428
	P2		,10000	,44234	,824	-,8428	1,0428
	P3		-,75000	,44234	,111	-1,6928	,1928
	K+		-2,90000	,44234	,000	-3,8428	-1,9572
	K-		-,20000	,44234	,658	-1,1428	,7428
	P2	P1	-,10000	,44234	,824	-1,0428	,8428
	P3		-,95000	,44234	,048	-1,8928	-,0072
	K+		-2,80000	,44234	,000	-3,7428	-1,8572
	K-		-,10000	,44234	,824	-1,0428	,8428
	P1	P2	,10000	,44234	,824	-,8428	1,0428
	P3		-,85000	,44234	,074	-1,7928	,0928
	K+		-1,95000	,44234	,001	-2,8928	-1,0072
	K-		,75000	,44234	,111	-,1928	1,6928
	P1	P3	,95000	,44234	,048	,0072	1,8928
	P2		,85000	,44234	,074	-,0928	1,7928
	K-		6,00000	,45424	,000	5,0318	6,9682
	P1	K+	4,95000	,45424	,000	3,9818	5,9182

K-		,30000	,17607	,109	-,0753	,6753
P2		,10000	,17607	,578	-,2753	,4753
P3		-,85000*	,17607	,000	-,1,2253	-,4747
K+		,15000	,17607	,408	-,2253	,5253
K-		,20000	,17607	,274	-,1753	,5753
P1	P2	-,10000	,17607	,578	-,4753	,2753
P3		-,95000*	,17607	,000	-,1,3253	-,5747
K+		1,10000*	,17607	,000	,7247	1,4753
K-		1,15000*	,17607	,000	,7747	1,5253
P1	P3	,85000*	,17607	,000	,4747	1,2253
P2		,95000*	,17607	,000	,5747	1,3253
K-		-,7,95000*	,39200	,000	-,8,7855	-,7,1145
P1		-,3,25000*	,39200	,000	-,4,0855	-,2,4145
P2	K+	-,2,95000*	,39200	,000	-,3,7855	-,2,1145
P3		-,2,50000*	,39200	,000	-,3,3355	-,1,6645
K+		7,95000*	,39200	,000	7,1145	8,7855
P1	K-	4,70000*	,39200	,000	3,8645	5,5355
P2		5,00000*	,39200	,000	4,1645	5,8355
P3		5,45000*	,39200	,000	4,6145	6,2855
K+		3,25000*	,39200	,000	2,4145	4,0855
K-		-,4,70000*	,39200	,000	-,5,5355	-,3,8645
P2	P1	,30000	,39200	,456	-,5355	1,1355
P3		,75000	,39200	,075	-,0855	1,5855
K+		2,95000*	,39200	,000	2,1145	3,7855
K-		-,5,00000*	,39200	,000	-,5,8355	-,4,1645
P1	P2	-,30000	,39200	,456	-,1,1355	,5355
P3		,45000	,39200	,269	-,3855	1,2855

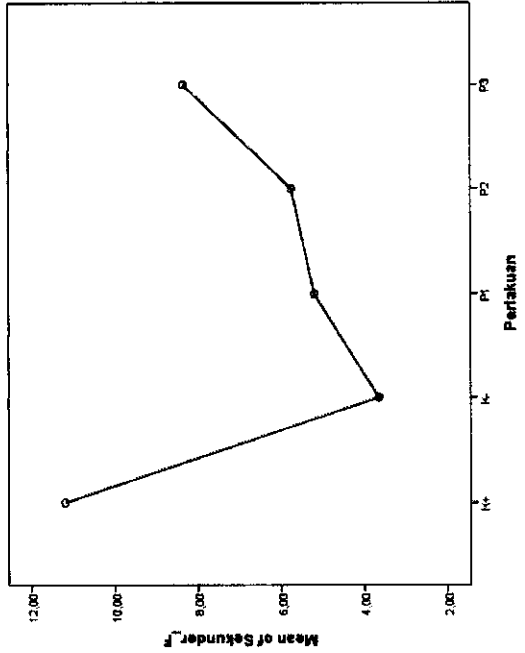
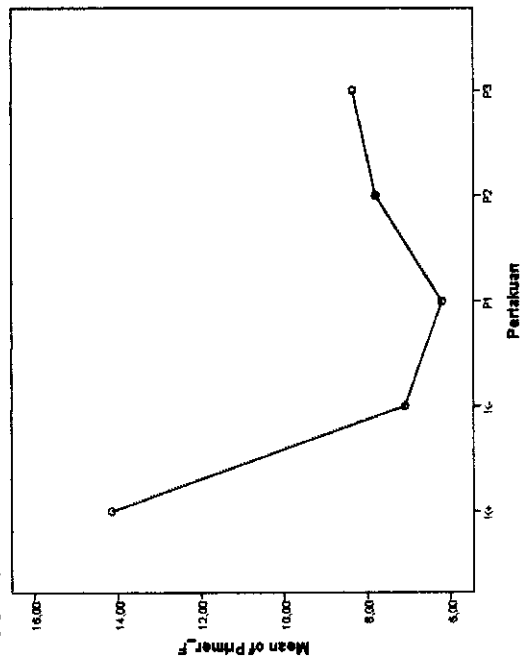
Caspase_9

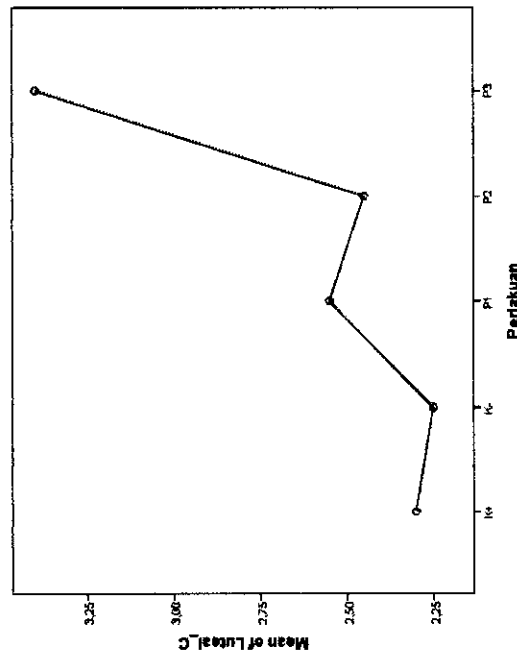
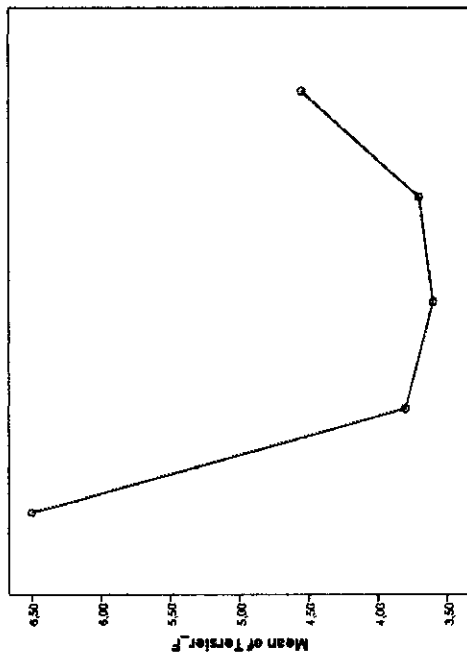
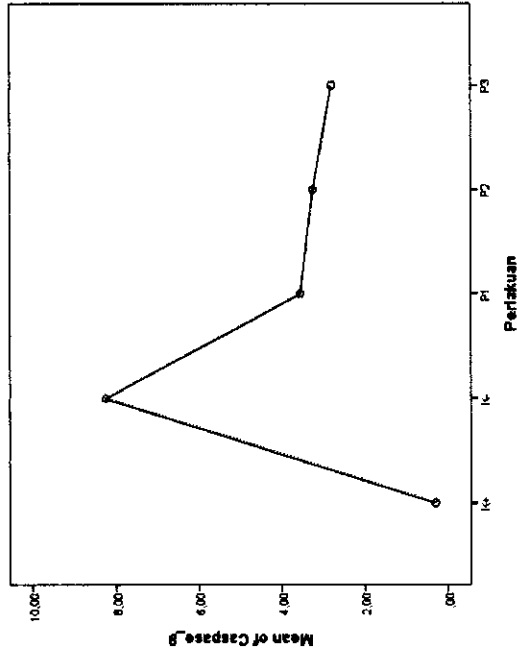
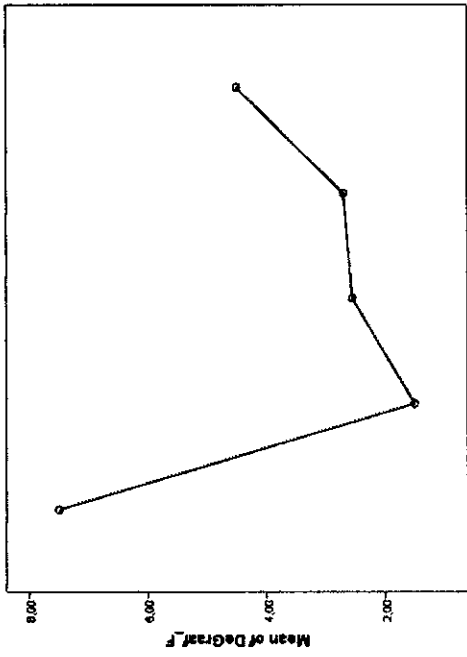
	K+	2,50000	,39200	,000	1,6645	3,3355
	K-	-5,45000	,39200	,000	-6,2855	-4,6145
P3	P1	-,75000	,39200	,075	-1,5855	,0855
	P2	-,45000	,39200	,269	-1,2855	,3855
	K-	,15000	,06654	,040	,0082	,2918
	P1	,16750	,06654	,024	,0257	,3093
K+	P2	-,52750	,06654	,000	-,6693	-,3857
	P3	-,71250	,06654	,000	-,8543	-,5707
	K+	-,15000	,06654	,040	-,2918	-,0082
	P1	,01750	,06654	,796	-,1243	,1593
	P2	-,67750	,06654	,000	-,8193	-,5357
	P3	-,86250	,06654	,000	-1,0043	-,7207
	K+	-,16750	,06654	,024	-,3093	-,0257
	K-	-,01750	,06654	,796	-,1593	,1243
P1	P2	-,69500	,06654	,000	-,8368	-,5532
	P3	-,88000	,06654	,000	-1,0218	-,7382
	K+	,52750	,06654	,000	,3857	,6693
	K-	,67750	,06654	,000	,5357	,8193
	P1	,69500	,06654	,000	,5532	,8368
P2	P3	-,18500	,06654	,014	-,3268	-,0432
	K+	,71250	,06654	,000	,5707	,8543
	K-	,86250	,06654	,000	,7207	1,0043
	P1	,88000	,06654	,000	,7382	1,0218
P3	P2	,18500	,06654	,014	,0432	,3268
	K-	,18000	,01068	,000	,1572	,2028
	P1	,02750	,01068	,021	,0047	,0503
	P2	,02750	,01068	,021	,0047	,0503
Lenght						
Weight						

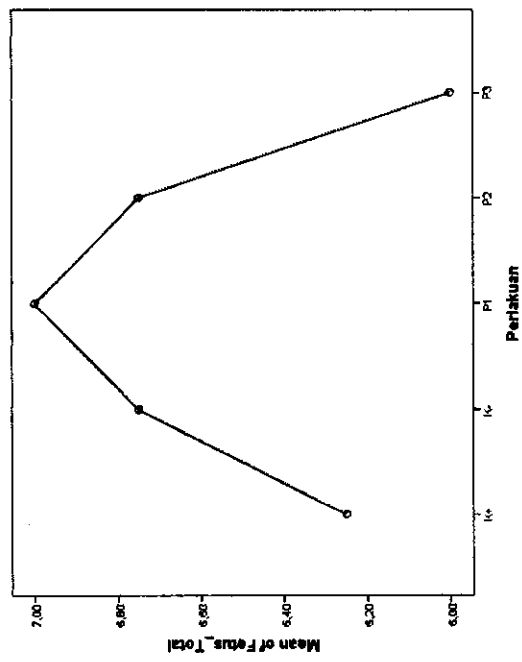
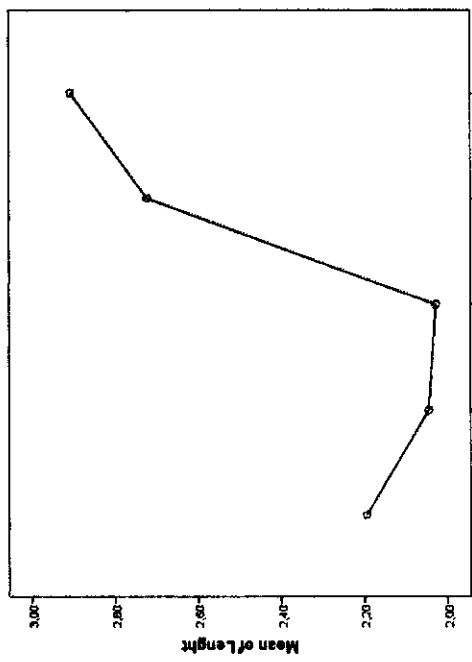
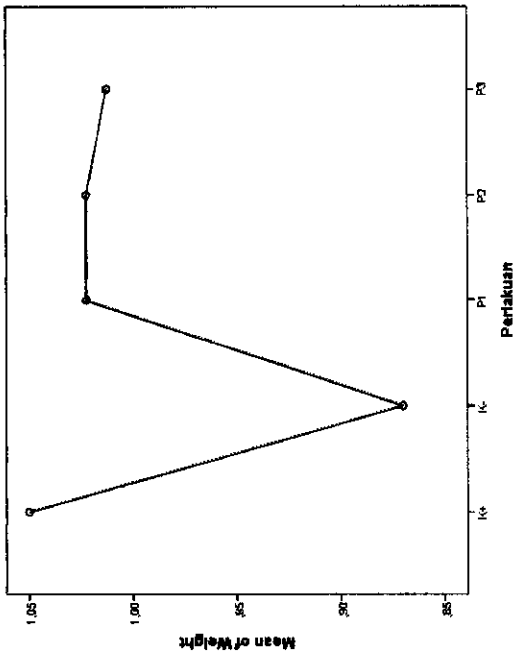
K-	,25000	,82158	,765	-1,5012	2,0012
P2	,25000	,82158	,765	-1,5012	2,0012
P3	1,00000	,82158	,242	-,7512	2,7512
K+	,50000	,82158	,552	-1,2512	2,2512
K-	,00000	,82158	1,000	-1,7512	1,7512
P1	-,25000	,82158	,765	-2,0012	1,5012
P3	,75000	,82158	,376	-1,0012	2,5012
K+	-,25000	,82158	,765	-2,0012	1,5012
K-	-,75000	,82158	,376	-2,5012	1,0012
P1	-1,00000	,82158	,242	-2,7512	,7512
P2	-,75000	,82158	,376	-2,5012	1,0012

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Means Plots







Case Summaries^a

	Primer F	Sekunder F	Tersier F	DeGraaf F	Luteal C	Caspase 9	Lenght	Weight	Fetus Total
1	12,80	11,40	7,20	7,00	1,80	,00	2,25	1,05	5,00
2	15,00	11,20	6,00	6,80	2,40	1,20	2,15	1,05	8,00
3	15,60	11,40	6,20	7,80	2,40	,00	2,15	1,05	6,00
K+ 4	13,20	10,80	6,60	8,40	2,60	,00	2,23	1,05	6,00
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Total Mean	14,1500	11,2000	6,5000	7,5000	2,3000	,3000	2,1950	1,0500	6,2500
Std. Deviation	1,36015	,28284	,52915	,73937	,34641	,60000	,02360	,01000	1,25831
1	7,00	3,00	3,40	1,00	2,40	7,80	2,01	,89	7,00
2	7,20	5,40	5,60	2,40	2,60	7,80	2,11	,90	7,00
3	7,20	3,00	3,20	1,40	2,20	7,80	2,10	,83	7,00
K- 4	7,00	3,20	3,00	1,20	1,80	9,60	1,96	,86	6,00
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Total Mean	7,1000	3,6500	3,8000	1,5000	2,2500	8,2500	2,0450	,8700	6,7500
Std. Deviation	,11547	1,17047	1,21106	,62183	,34157	,90000	,57634	,58162	,50000
1	6,20	5,40	3,40	2,60	2,60	3,20	2,03	1,02	6,00
2	6,20	5,20	3,60	2,40	2,60	3,20	2,12	1,02	9,00
3	6,40	5,20	3,80	2,40	2,40	3,80	2,09	1,03	7,00
P1 4	6,00	5,00	3,60	2,80	2,60	4,00	1,87	1,02	6,00
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Total Mean	6,2000	5,2000	3,6000	2,5500	2,5500	3,5500	2,0275	1,0225	7,0000
Std. Deviation	,16330	,16330	,16330	,19149	,10000	,41231	,89147	,01100	1,41421
P2 1	8,00	5,80	4,00	2,80	2,40	2,80	2,63	1,02	7,00

2	7,40	6,00	3,80	2,40	2,60	3,60	2,76	1,01	8,00
3	7,80	5,00	3,60	3,00	2,40	3,40	2,75	1,03	6,00
4	8,00	6,20	3,40	2,60	2,40	3,20	2,75	1,03	6,00
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Total Mean	7,8000	5,7500	3,7000	2,7000	2,4500	3,2500	2,7225	1,0225	6,7500
Std. Deviation	,28284	,52599	,25820	,25820	,10000	,34157	,14185	,08457	,95743
1	8,80	8,80	4,20	4,20	3,60	3,00	2,81	1,01	7,00
2	8,40	8,40	4,60	4,00	3,20	2,40	3,07	1,01	4,00
3	8,00	8,00	4,40	3,80	3,60	2,80	2,98	1,02	6,00
4	8,20	8,20	5,00	6,00	3,20	3,00	2,77	1,01	7,00
P3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Total Mean	8,3500	8,3500	4,5500	4,5000	3,4000	2,8000	2,9075	1,0125	6,0000
Std. Deviation	,34157	,34157	,34157	1,01325	,23094	,28284	,48151	,01200	1,41421
N	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Total Mean	8,7200	6,8300	4,4300	3,7500	2,5900	3,6300	2,3795	,9955	6,5500
Std. Deviation	2,93824	2,78135	1,24693	2,23736	,48330	2,69211	,38374	,06700	1,09904

a. Limited to first 100 cases.

Lampiran 12. Jadwal kegiatan penelitian.

Kegiatan	November				Desember				Januari				Februari				Maret			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Penelusuran pustaka dan informasi penyusunan tesis																				
Konsultasi penyusunan tesis																				
Sidang proposal dan etika penelitian																				
Persiapan alat dan bahan penelitian																				
Persiapan mencit																				
Adaptasi mencit																				
Penimbangan berat badan mencit																				
Perlakuan induksi birahi																				
Mengawinkan mencit																				
Pemberian perlakuan zearalenon																				
Diseksi dan pengambilan organ ovarium																				
Penyimpanan organ dengan larutan buoin																				
Pembuatan sediaan histologis dan imunohistokimia																				
Pemeriksaan sediaan histologis dan imunohistokimia																				
Mengambil data skor histologis ovarium dan ekspresi caspase 9																				
Analisis data skoring																				
Konsultasi penyusunan hasil dan pembahasan penelitian tesis																				
Pelaksanaan seminar hasil dan laporan akhir penelitian tesis																				
Pelaksanaan sidang tesis																				
Penulisan artikel ilmiah dan publikasi hasil penelitian tesis																				

Lampiran 13. Sertifikat *ethical clearance*.



**KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
*Animal Care and Use Committee (ACUC)***

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
“ ETHICAL CLEARANCE ”**

No : 309-KE

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :**

PENELITIAN BERJUDUL : Potensi Mycotoxin Binders Terhadap Ekspresi
Caspase 9 dan Gambaran Histologi Ovarium Mencit
(*Mus musculus*) Bunting Yang Terpapar Zearalenon.

PENELITI UTAMA : M. Thohawi Elziyad Purnama

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT
PENELITIAN** : S2 Ilmu Biologi Reproduksi
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Surabaya, 15 Januari 2014

Mengetahui,
Dekan FKH-Unair,



Prof. Romziah Sidik, Ph.D.,drh.
NIP. 195312161978062001

Ketua,



Dr. E. Bimo Aksono, M.Kes., Drh.
NIP. 196609201992031003

Lampiran 14. Dokumentasi kegiatan penelitian.



Kandang hewan coba FKH Unair



Pembagian hewan coba secara random



Pakan untuk mencit



Sekam dari gabah padi



Penyuntikan hormon PMSG-HCG



Mengawinkan secara *single mating*



Hormon PMSG-HCG



Zearalenon[®] Tocris Bioscience



Mycotoxin binders[®] Biotek Indonesia



Penimbangan dosis Zearalenon dan Mycotoxin binders



Perlakuan dengan sonde



Pembiusan dengan kloroform