

LAPORAN HASIL PENELITIAN  
TAHUN ANGGARAN 2012



PENGARUH PEMBERIAN *PARTIKULAT MATTER* PADA TIKUS  
(*RATTUS NOVERGICU*) BUNTING TERHADAP EKSPRESI RESEPTOR  
ESTROGEN DAN CACAT KONGINETAL

KETUA PENELITIAN :

Dr. Eka Pramyrtha, MSi., Drh (NIP. 196403161990022001)  
Epy Muhammad Luqman, Msi., Drh (NIP.196712131993031001 )  
Rudi Sukamto, MSc., Drh (NIP.195112031978031001 )

Dibiayai Oleh:  
Dana RKAT FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
SK Dekan No : 32/H3.1.6/KD/2012

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

2012

**LAPORAN HASIL PENELITIAN**  
**TAHUN ANGGARAN 2012**



**PENGARUH PEMBERIAN *PARTIKULAT MATTER* PADA TIKUS  
(*RATTUS NOVERGICU*) BUNTING TERHADAP EKSPRESI RESEPTOR  
ESTROGEN DAN CACAT KONGINETAL**

**KETUA PENELITIAN :**

**Dr. Eka Pramytha, MSi., Drh (NIP. 196403161990022001)**  
**Epy Muhammad Luqman, Msi., Drh (NIP.196712131993031001 )**  
**Rudi Sukamto, MSc., Drh (NIP.195112031978031001 )**

**Dibiayai Oleh:**  
**Dana RKAT FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**  
**SK Dekan No : 32/H3.1.6/KD/2012**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**  
**UNIVERSITAS AIRLANGGA**

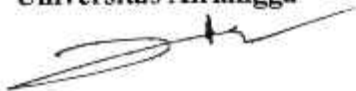
**2012**

**LEMBAR PENGESAHAN**

1. Judul Penelitian : **Pengaruh Pemberian *Partikulat Matter* Pada Tikus (*Rattus novergicus*) Bunting Terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen dan Cacat Konginetal**
2. Ketua Peneliti
  - a. Nama Lengkap : Dr. Eka Pramytha, MSi., Drh
  - b. Jenis Kelamin : Perempuan
  - c. NIP : 19640316 1990 02 2001
  - d. Jabatan fungsional : Lektor
  - e. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Kedokteran Hewan
  - g. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 orang
4. Lokasi Penelitian : Laboratorium Embriologi dan Patologi  
Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga
5. Kerjasama dengan instansi lain
  - a. nama instansi : --
  - b. Alamat : --
6. Masa Penelitian : 6 bulan
7. Biaya yang DIDANAI : Rp 7.000.000 (Tujuh Juta Rupiah)

Surabaya, 31 Oktober 2012

Dekan  
Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga



Prof. Hj. Romziah Sidik., PhD., Drh  
NIP. 130 687 305

Peneliti Utama



Dr. Eka Pramytha, MSi., Drh  
NIP. 196403161990022001

Mengetahui ;  
Ketua Lembaga Penelitian  
Universitas Airlangga

Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi  
NIP. 195908051987011001

## RINGKASAN

JUDUL PENELITIAN : **Pengaruh Pemberian *Partikulat Matter* Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Bunting Terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen dan Cacat Konginetal**

KETUA PENELITIAN : Dr. Eka Pramytha, MSi., Drh

TAHUN : Nopember 2012, 51 halaman

Pencemaran udara memberikan pengaruh buruk terhadap kesehatan ternak, tidak terkecuali terhadap proses kebuntingan dan cacat yang ditimbulkan. *Particulate Matter* (PM) adalah salah satu komponen yang terkandung pada polusi udara. Black carbon merupakan salah satu komponen PM yang berpengaruh terhadap kesehatan karena bersifat sitotoksik dan dinyatakan sebagai salah satu faktor yang memiliki peran cukup besar terhadap global warming yaitu sebesar 25%. PM diketahui dapat menyebabkan terjadinya inflamasi pada sistem pernafasan dan kardiovaskuler serta dapat melewati barrier plasenta sehingga dapat mempengaruhi janin. *Partikulat matter* ini dapat melewati sawar plasenta dan mempengaruhi janin sehingga menyebabkan terjadinya kelainan.

Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari efek teratogen *partikulat matter* terhadap cacat konginental. Selain itu untuk mengetahui efek teratogen *partikulat matter* terhadap ekspresi reseptor estrogen selama kebuntingan. Pada jangka panjang penelitian yang akan dicapai adalah mengetahui efek *partikulat matter* yang ditimbulkan selama kebuntingan untuk mengatasi terjadinya kelainan kebuntingan, serta mengetahui peran sitokin lokal selama periode kebuntingan apabila terpapar dengan bahan teratogen.

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah Penurunan ekspresi reseptor estrogen pada plasenta dapat digunakan sebagai indikator adanya gangguan kebuntingan tikus (*Rattus Norvegicus*) yang disebabkan oleh paparan *carbon black*. Selain itu untuk mendapatkan informasi tentang *carbon black* dapat cacat kongenital pada fetus.

Metode penelitian meliputi Eksplorasi dosis LD 50 dan menentukan dosis teratogenik *black carbon* pada tikus bunting sebagai hewan model, perlakuan pada hewan coba dengan pemberian *black carbon*, pemeriksaan luaran kebuntingan untuk menentukan cacat konginetal secara makroskopis, dan pemeriksaan ekspresi reseptor estrogen dengan pengecatan immunohistokimia.

Hasil penelitian Kelompok kontrol K1 (1,8 %), K2 (2,6%) ,K3 (\$%) meningkatkan jumlah resorpsi embrio meningkat, dibandingkan dengan kelompok yang tidak mendapat paparan *carbon black* K0 (0,4%). Paparan *carbon black* pada kelompok perlakuan juga menurunkan berat badan dan panjang badan fetus dibandingkan kelompok kontro. Ekspresi reseptor estrogen juga menurun akibat paparan *carbon black* dibandingkan pada kelompok control yang tidak mendapat paparan *carbon black*.

Kesimpulan yang dapat ditarik dari hasil penelitian ini paparan *partikulat matter* dapat menyebabkan cacat konginental dan menurunkan ekspresi reseptor estrogen pada plasenta tikus.

(Kedokteran Hewan Universitas Airlangga :Nomor : 32/H3.1.6/KD//2012)

## ABSTRAK

*Partikulat matter* (PM) merupakan salah satu komponen polutan pencemar udara yang diketahui bersifat sitotoksik. Efek yang ditimbulkan oleh polutan ini tergantung dari besarnya paparan yang sangat terkait dengan dosis/kadarnya di udara dan lama waktu paparan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh lama dan dosis paparan *partikulat matter* terhadap gangguan kebuntingan, cacat konginetal dan ekspresi reseptor estrogen.

Manfaat penelitian ini adalah dengan mengetahui efek sitotoksik *partikulat matter* terhadap cacat konginetal yang ditimbulkan sehingga dapat lebih preventif selama kebuntingan.

Dosis *partikulat matter* yang digunakan pada penelitian ini adalah 532 mg/m<sup>3</sup> dan 1064 mg/m<sup>3</sup> dengan lama paparan 4 jam dan 8 jam. Pengamatan yang dilakukan adalah timbulnya cacat konginetal dan peran reseptor estrogen selama kebuntingan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan *partikulat matter* dapat menurunkan ekspresi reseptor estrogen pada plasenta tikus. Selain itu paparan *partikulat matter* dapat menyebabkan cacat konginetal berdasarkan penurunan berat badan fetus, panjang badan fetus dan terjadinya peningkatan resorpsi embrio.

Kesimpulan dari penelitian ini bahwa *carbon black* merupakan bahan teratogen yang berbahaya yang dapat menyebabkan teratologi karena menyebabkan cacat konginetal dan mengganggu sistem hormonal.

**Kata kunci :** *black carbon*, kebuntingan, cacat konginetal, reseptor estrogen, plasenta

## PRAKATA

Syukur alhamdulillah kegiatan penelitian dengan judul “ **Pengaruh Pemberian *Partikulat Matter* Pada Tikus ( *Rattus novergicus*) Bunting Terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen dan Cacat Konginetal** ” dapat kami selesaikan dengan baik.

Penelitian ini dapat dilaksanakan atas pembiayaan dari dana RKAT Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga tahun anggaran 2012. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, selaku pemberi dana pada penelitian tahun anggaran 2012
2. Prof. Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi., selaku Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
3. Semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Akhirnya, diharapkan hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi perkembangan penelitian khususnya di bidang teratologi.

Surabaya, Nopember 2012

Tim Peneliti

**DAFTAR ISI**

	<b>Halaman</b>
DAFTAR ISI	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
ABSTRACT	iv
PRAKATA	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	
I            PENDAHULUAN	
II           TINJAUAN PUSTAKA	
III          TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
IV          METODE PENELITIAN	
V            HASIL DAN PEMBAHASAN	
VI          KESIMPULAN DAN SARAN	
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	



DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
1 Hasil Uji Mann Whitney Ekspresi Reseptor Estrogen	
2 Rerata Panjang badan dan berat fetus kelompok control dan kelompok perlakuan dosis paparan <i>carbon black</i> 532 mg/m <sup>3</sup> dan <i>carbon black</i> 1064 mg/m <sup>3</sup> selama 4 dan 8 jam	
3 Persentase jumlah resorpsi embrio kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dosis paparan <i>carbon black</i> 532 mg/m <sup>3</sup> dan <i>carbon black</i> 1064 mg/m <sup>3</sup> selama 4 dan 8 jam	

## DAFTAR GAMBAR

## Halaman

- 1 Ekspresi Reseptor estrogen oleh warna coklat muda hingga coklat tua pada sel-sel immunoreaktif. Pada slide A tidak nampak adanya sel immunoreaktif. Slide B menunjukkan ekspresi Reseptor estrogen dengan intensitas sedang yang ditemukan pada sel syntropoblast (panah). Slide C dan D menunjukkan sel immunoreaktif terhadap Reseptor estrogen dengan intensitas kuat dengan warna coklat tua yang banyak diekspresikan oleh sel-sel cytotropoblast (panah) dan sel-sel endotel (kepala panah) (*Pewarnaan immunohistokimia ; pembesaran 1000x; Olympus BX-50. Pentax optio 230; Camera Digital 2.0 megapixel*).
- 2 Fetus kelompok perlakuan paparan *carbon black* dan Fetus tikus kelompok control tanpa paparan *carbon black*

**DAFTAR LAMPIRAN**

Halaman

- 1 Metode pembacaan ekspresi reseptor estrogen
- 2 Data Ekspresi Reseptor Estrogen
- 3 Data berat badan, panjang badan dan jumlah resobsi embrio
- 4 Hasil Analisis Statistik Reseptor Estrogen

## BAB I PENDAHULUAN

Pencemaran udara memberikan pengaruh buruk terhadap kesehatan ternak, tidak terkecuali terhadap proses kebuntingan dan cacat yang ditimbulkan. Pencemaran udara juga merupakan masalah besar bagi dunia, karena pencemaran udara menyebabkan peningkatan suhu secara global yang dikenal dengan istilah *global warming*. Sekitar 70% pencemaran udara di banyak kota besar berasal dari sumber bergerak yaitu kendaraan bermotor, sedangkan 30% pencemaran udara berasal dari sumber tidak bergerak yaitu kegiatan industri, rumah tangga, pembakaran sampah dan lainnya. Kondisi ini diperparah oleh semakin terdesaknya ruang terbuka hijau yang telah efektif mengurangi zat pencemar udara maupun efek kesehatan karena iklim. Balai Besar Teknik Hampir semua parameter dalam baku mutu udara ambien pada beberapa kota di wilayah Jawa Timur telah melewati ambang batas yang ditentukan oleh pemerintah ( BBTKL dan P2M Surabaya, 2009).

Polutan berupa partikulat tersuspensi yang disebut juga *Particulate Matter* (PM) adalah salah satu komponen penting pada polusi udara terkait dengan pengaruhnya terhadap kesehatan. Black carbon merupakan salah satu komponen PM yang berpengaruh terhadap kesehatan karena bersifat sitotoksik dan dinyatakan sebagai salah satu faktor yang memiliki peran cukup besar terhadap *global warming* yaitu sebesar 25%. PM diketahui dapat menyebabkan terjadinya inflamasi pada sistem pernafasan dan kardiovaskuler serta dapat melewati barrier plasenta sehingga dapat mempengaruhi janin. Peningkatan kadar PM pada

penelitian terdahulu ternyata juga berhubungan dengan peningkatan kejadian *intra uterine growth retardation* (IUGR), yang terinduksi pada awal tahap perkembangan. *Partikulat matter* ini dapat melewati sawar plasenta dan mempengaruhi janin sehingga menyebabkan terjadinya IUGR. (Dejmek *et al.*, 1999; GISS, 2003; Garza *et al.*, 2008; Wick *et al.*, 2009; Berkowitz *et al.*, 2009).

Paparan lingkungan yang berasal dari produk sisa pembakaran diketahui dapat mempengaruhi kesehatan maternal perinatal melalui berbagai mekanisme. Salah satu mekanisme yang diduga berperan adalah terjadinya stres oksidatif yang kemudian akan meningkatkan *Reaktif Oxygen Species* (ROS) dalam tubuh, sehingga akan menyebabkan gangguan bila terjadi kebuntingan. Peningkatan kadar MDA sebagai produksi dari stress oksidatif pada plasma darah, darah umbilikus dan jaringan plasenta dapat dijadikan indikator terjadinya kelainan yang terjadi selama kebuntinga. Stres oksidatif inilah yang selanjutnya menginduksi perubahan pada jaringan plasenta dan memberikan kontribusi terhadap berat plasenta menjadi lebih rendah serta cacat konginental berupa IUGR, berat badan lahir rendah maupun cacat bawaan. (Sagai *et al.*, 1993; Kamath *et al.*, 2006; Biri *et al.*, 2007; NIEHS, 2007; Suryohudoyo, 2007; Veras *et al.*, 2008 ).

Stress oksidatif juga mempengaruhi mekanisme hormonal selama kebuntingan. Peningkatan hormone estrogen selama kebuntingan akan berefek negative terhadap kebuntingan itu sendiri dan kelainan kebuntingan yang ditimbulkan akan sangat merugikan. Berdasarkan uraian di atas, apabila pencemaran udara oleh *partikulat matter* semakin meningkat, maka dapat diramalkan akan berdampak pula pada peningkatan angka kejadian cacat

konginental. Konsekuensi dari keadaan ini adalah angka kematian fetus yang juga menjadi semakin tinggi. Fakta ini menunjukan pada kesimpulan bahwa pengendalian emisi partikulat polutan udara harus menjadi bagian dari kegiatan yang dilakukan dalam rangkaian program penurunan angka kematian fetus yang dilahirkan baik pada manusia maupun binatang. Upaya preventif berupa pengendalian pencemaran udara secara terpadu dan promosi kesehatan yang intensif terhadap masyarakat luas tentang dampak buruk pencemaran udara terhadap kesehatan maternal-perinatal, sangat penting untuk segera dilakukan dan memerlukan kemauan, upaya keras dan keseriusan dari semua pihak yang terkait.

### 1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah paparan *partikulat matter* dapat menurunkan ekspresi reseptor estrogen pada plasenta tikus ?
2. Apakah paparan *partikulat matter* dapat menyebabkan cacat konginental berdasarkan parameter berat badan fetus, panjang badan fetus dan resorpsi embrio?

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tinjauan Tentang *Partikel Matter*

*Partikel matter* (karbon) juga diketahui bersifat sitotoksik dan genotoksik karena dapat memproduksi *Reactive Oxygen Species* (ROS), dapat mengalami translokasi ke dalam darah, otak, sistem kardiovaskuler, limpa, dan hati serta dapat melalui plasenta dan air susu maternal sehingga berpengaruh pada perkembangan anak sebelum maupun sesudah kelahiran. *Partikulat Matter* (PM) dalam berbagai ukuran dan bentuk, dengan pemeriksaan *Electron Paramagnetic Resonance* (EPR) diketahui menghasilkan radikal bebas antara lain yaitu hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang bila bereaksi dengan Fe membentuk radikal hidroksil ( $OH\cdot$ ) (Sharp *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2003; Hoet *et al.*, 2004; Donaldson *et al.*, 2005; Garza *et al.*, 2008; Hougaard *et al.*, 2008; Folkmann *et al.*, 2009)

*Black carbon* merupakan partikulat berukuran nanometer yang sering digolongkan pada *ultrafine PM*. Jelaga adalah produk pembakaran yang tidak sempurna, terutama dari bahan bakar pada mesin diesel, *biofuel* (kayu, kotoran hewan, dll), batu bara dan pembakaran sampah. Sumber penghasil partikulat jelaga bisa berasal dari dalam dan luar ruangan, seperti misalnya jelaga lilin, kayu, diesel, ban mobil, pembakaran gas alam, proses industri dan lainnya. Penggunaan kayu bakar sebagai sumber energi yang banyak digunakan di

beberapa negara miskin, menghasilkan asap kayu bakar yang merupakan salah satu sumber penghasil jelaga, dilaporkan memberikan sumbangan kematian balita sekitar 56% dari seluruh kematian karena infeksi saluran nafas bawah. Asap yang dihasilkan dari pembakaran kayu lebih berbahaya dari asap rokok. Satu kilogram kayu bakar yang digunakan akan menghasilkan polutan udara CO sebesar 129 ppm, partikulat sebesar 3300 ppm, benzene sebesar 800 ppm, 1-3 butadine sebesar 150 ppm, dan formaldehyde sebesar 700 ppm (*Energy, the environment and health*, 2000; WHO. 2002; Donaldson *et al.*, 2005; Garza *et al.*, 2008).

## 2.2. Tinjauan Tentang Hormon Esrtrogen

Sintesis hormon steroid seks terjadi didalam sel steroidogenik, yaitu sel teka, sel granulosis yang mengalami luteinisasi, sel luteal dan sel leydig. Lokasi lain untuk steroidogenesis adalah plasenta, korteks adrenal dan otak. Protein pengangkut bahan baku steroidogenesis terdalam di dalam sel tersebut. Kolesterol dalam bentuk HDL kolesterol dan LDL kolesterol sebagai bahan baku steroidogenesis yang berikatan dengan respektornya di sel teka, kemudian diangkut ke dalam mitokondria dengan bantuan protein fosfoprotein sitoplasmik yang disebut StAR. Kolesterol masuk dari membran luar mitokondria ke dalam membran dalam mitokondria. StAR bekerja di sitoplasma dari membran mitokondria bagian luar dengan membuka konfirmasinya untuk memasukkan kolesterol ke dalam mitokondria. Enzim sitokrom P450<sub>scc</sub> akan mengubah kolesterol menjadi pregnenolon di



membran dalam mitokondria. Pregnenolon yang dikeluarkan dari mitokondria akan diubah menjadi progesterone dengan bantuan enzim  $3\beta$ HSD (Gambar 2.10) (Bose dkk., 2007; King dan Lavoie, 2009).

Steroidogenesis diovarium dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan dan gonadotropin. Produksi steroid seks yang meningkat dapat disebabkan oleh peningkatan transkripsi enzim steroidogenik dan StAR (King dan Lavoie, 2009).

Estrogen paling banyak disekresi oleh ovarium dan dalam jumlah yang sedikit oleh korteks adrenal pada wanita normal yang tidak hamil (Guyton dan Hall, 1997). Sel teka dan granulosis folikel di ovarium bekerjasama untuk mensintesis estrogen pada fase folikuler dan luteal siklus reproduksi wanita. Sintesis DHA terjadi di dalam sel teka, berawal pada fase folikuler dimana kolesterol diubah dulu menjadi pregnenolon dengan bantuan LH. Pregnenolon kemudian menjadi 17 hidroksi pregnenolon, dan akhirnya diubah menjadi DHA. DHA kemudian masuk ke dalam sel granulosis dan diaromatisasi menjadi estradiol dengan bantuan FSH. Sintesis DHA pada fase luteal terjadi di luar sel teka walaupun prosesnya sama seperti pada fase folikuler. DHA yang dihasilkan juga dibawa ke sel granulosis untuk diaromatisasi menjadi estradiol dengan bantuan FSH. Pada fase ini terjadi sintesis progesteron di dalam sel granulosis melalui reaksi kolesterol yang diubah dahulu menjadi pregnenolon dengan bantuan LH, kemudian pregnenolon akan diubah menjadi progesteron (Cunningham dkk, 1995).

Estrogen yang disekresikan terdiri dari beta estradiol (E2), estron (E1), dan estriol (E3). Perbandingan potensi estrogenik dari ketiga estrogen tersebut adalah  $E2 : E1 : E3 = 10 : 5 : 1$ . Estrogen utama yang disekresi adalah beta estradiol karena efek estrogeniknya 12 kali lebih besar dari pada estron dan 80x lebih besar daripada estriol. Estron disekresi dalam jumlah kecil dari aromatisasi androgen di perifer. Estriol adalah bentuk oksidasi estradiol dan estron, perubahannya terjadi di hepar (Guyton dan Hall, 1997; Wiknjosastro, 1997).

### 2.3. Tinjauan Tentang Plasenta

Plasenta terdiri dari dua bagian yaitu selaput ekstra embrionik dan selaput lendir rahim yang berintegrasi menjadi satu kesatuan untuk keperluan pertukaran timbal balik faal antara induk dan fetus serta dapat menghasilkan hormon. Plasenta induk adalah endometrium rahim dan plasenta fetus adalah chorioallantois (Poernomo *et al.*, 2006). Plasenta memiliki peranan berupa transport zat dari ibu ke janin, penghasil hormon yang berguna selama kehamilan, serta sebagai barier. Melihat pentingnya peranan dari plasenta maka apabila terjadi kelainan pada plasenta akan menyebabkan kelainan pada janin ataupun mengganggu proses persalinan.

Proses pembentukan plasenta dimulai setelah terjadinya fertilisasi ovum oleh sperma maka sel yang dihasilkan tersebut disebut zigot. Fertilisasi ini biasanya terjadi di dalam ampulla tuba falopii dan *fertilized ovum* dalam bentuk blastocyst/blastokista akan menuju cavum uteri untuk kemudian

tertanam dalam endometrium (nidasi). Nidasi atau implantasi ini biasanya terjadi pada daerah fundus uteri. Saat implantasi blastokista ini terjadi kira-kira 6-7 hari setelah ovulasi (Rahardjo, 2006).

### BAB III

## TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

### 3.1. Tujuan Khusus

#### Tujuan Jangka Pendek

Tujuan jangka pendek yang akan dicapai adalah :

1. Mempelajari efek teratogen *partikulat matter* terhadap cacat konginental
2. Mempelajari efek teratogen *partikulat matter* terhadap ekspresi reseptor estrogen selama kebuntingan

#### Tujuan Jangka Panjang

Tujuan jangka panjang yang akan dicapai adalah :

1. Dapat mengetahui efek *partikulat matter* yang ditimbulkan selama kebuntingan unntuk mengatasi terjadinya kelainan kebuntingan
2. Dapat mengetahui peran sitokin lokal selama periode kebuntingan apabila terpapar dengan bahan teratogen.

### 3.2. Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah :

1. Penurunan ekspresi reseptor estrogen pada plasenta dapat digunakan sebagai indikator adanya gangguan kebuntingan tikus (*Rattus Norvegicus*) yang disebabkan oleh paparan *carbon black*
2. Mendapatkan informasi tentang *carbon black* dapat cacat kongenital pada fetus.

## BAB IV METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode eksplorasi laboratorium secara eksperimental, dilakukan untuk menguji hipotesis melalui beberapa tahapan penelitian.

1. Eksplorasi dosis LD 50 dan menentukan dosis teratogenik *black carbon* pada tikus bunting sebagai hewan model (lestari, 2010)
2. Perlakuan pada hewan coba dengan pemberian *black carbon*
3. Pemeriksaan luaran kebuntingan untuk menentukan cacat konginetal secara makroskopis
4. Pemeriksaan ekspresi reseptor estrogen dengan pengecatan immunohistokimia

### 3.1. Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan asumsi semua perlakuan dihasilkan sama dari pengambilan sampel sampai dengan pengerjaan serta kondisi laboratorium.

### 3.2. Variabel Penelitian

#### Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah :

Dosis *black carbon*

#### Variabel Tergantung

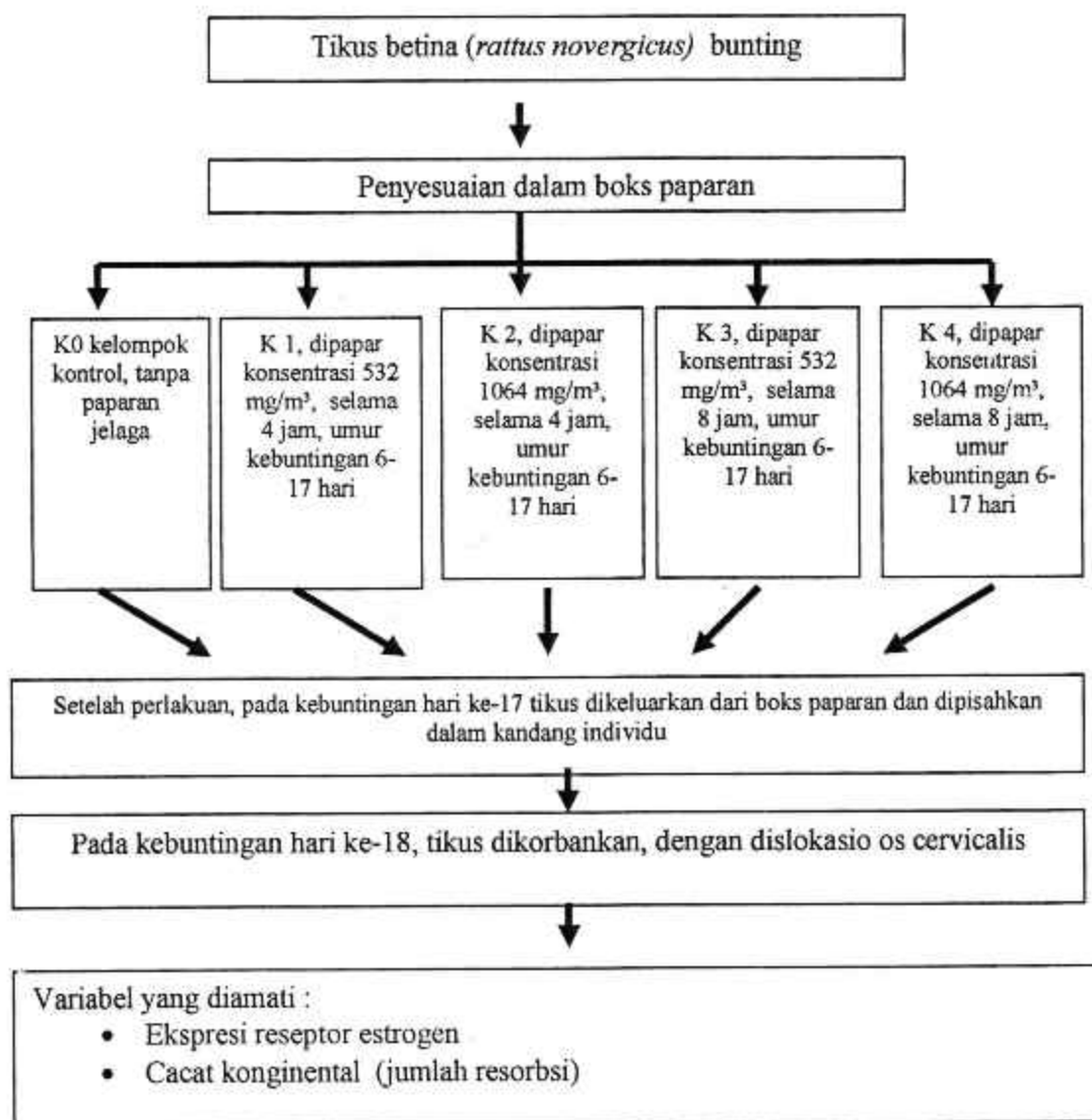
Variabel tergantung pada penelitian ini adalah :

1. Cacat konginental secara makroskopis
2. Ekspresi reseptor estrogen

**Variabel Terkontrol**

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah ruang penelitian, peralatan, pemilihan alat ukur dari hasil penelitian, bahan-bahan yang digunakan pada penelitian.

**Kerangka operasional penelitian**



### 3.3. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk perlakuan hewan coba dan laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk pemeriksaan immunohistokimia mengamati ekspresi reseptor estrogen.

### 3.4. Metode Penelitian

#### a. Sinkronisasi siklus estrus tikus

Tikus merupakan hewan poliestrus, artinya dalam satu tahun dapat beberapa kali mengalami masa birahi, kecuali bila dalam keadaan bunting. Dalam penelitian ini digunakan *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG) untuk menyamakan siklus estrus dan *human chorionic gonadotropin* (HCG) untuk superovulasi dengan cara PMSG diberikan subkutan sebanyak 10 IU lebih dulu kemudian HCG sebanyak 10 IU diberikan 48 jam sesudahnya. Tiap fase estrus dapat dideteksi dengan apusan mukosa vagina. Apusan dibuat dengan memakai larutan garam fisiologis sebanyak dua sampai tiga tetes menggunakan pipet berujung halus, kemudian larutan tersebut disemprotkan ke dalam vagina dan dihisap kembali. Dengan demikian di dalam pipet sudah terisi cairan yang mengandung sel-sel mukosa vagina. Cairan itu diteteskan di atas gelas obyek kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 kali atau 400 kali.

Pada hapusan vagina, fase proestrus ditandai dengan adanya sebagian besar sel epitel berinti dan sel leukosit dengan jumlah sedikit. Pada fase estrus hanya terlihat adanya sel-sel menanduk dengan jumlah yang dominan, sedangkan

pada fase metestrus ditandai dengan banyaknya leukosit dan sedikit sisa sel yang menanduk. Hal ini berbeda dengan fase diestrus karena pada fase ini sel leukosit berjumlah banyak sedangkan sel epitel berinti berjumlah sangat sedikit ( Hafez, 1970).

#### **b. Prosedur mengawinkan tikus**

Tikus dikawinkan secara bertahap sesuai kelompok perlakuan, dengan cara dikumpulkan dengan tikus jantan dalam satu kandang. Tikus 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 dan pada saat itu dianggap kebuntingan hari ke nol. Untuk memastikan kebuntingan dilakukan hapusan vagina. Tikus yang bunting ini kemudian diberi nomor, dengan cara pemberian zat warna pada bagian tubuh sesuai kelompok.

#### **c. Prosedur treatment paparan *black carbon*.**

##### **1. Prosedur pemberian paparan**

Sumber paparan : *Black Carbon powder* yang disemprotkan dalam udara boks paparan. Perlakuan diberikan dalam boks paparan yang berbeda dengan monitor suhu udara, kecepatan aliran 5 – 7,5 km/jam (angin sepoi-sepoi) pada suhu dan kelembapan setempat dengan tekanan satu atmosfer secara inhalasi. Perlakuan diberikan secara bertahap sesuai kelompok (Lestari, 2010).

##### **2. Prosedur perlakuan hewan coba**



Hewan coba ditempatkan dalam kandang pemeliharaan sampai perlakuan dimulai. Sebelum percobaan dimulai dilakukan aklimatisasi pada boks paparan. Hewan coba dimasukkan boks paparan untuk diberikan perlakuan, sejak kebuntingan hari ke-6 sampai hari ke-17. Pada hari ke-17 setelah perlakuan hewan coba dimasukkan kandang individu, dan pada hari ke-18 tikus dikorbankan.

### 3. Prosedur perlakuan hewan coba kontrol

Hewan coba kontrol dipelihara dalam kandang pemeliharaan dan boks paparan dengan perlakuan yang sama dengan hewan coba perlakuan kecuali pemberian paparan *black carbon*.

#### d. Prosedur pengamatan cacat konginental

Pembedahan dimulai dgn mengorbankan hewan coba dengan cara dislokasio os atlas. Desinfeksi dengan alkohol 70% dibedah dengan cepat diambil uterusnya. Pembedahan dimulai dari vagina menuju ke arah perut menggunakan gunting kecil. Dicari uterus untuk mengeluarkan fetus. Berat fetus ditimbang, panjang fetus diukur, dihitung jumlah resorpsi dan jumlah fetus mati intra uterin, jumlah fetus hidup, jumlah fetus hidup yang cacat eksternal, dan jumlah fetus mati yang cacat eksternal. Jaringan plasenta dipisahkan dari uterus tikus. Plasenta ditimbang beratnya, semua plasenta dimasukkan dalam boks dingin untuk pemeriksaan variable penelitian

#### e. Identifikasi ekspresi Reseptor Estrogen pada plasenta tikus dengan immunohistokimia

Plasenta tikus difiksasi pada obyek glass, selanjutnya dilakukan fiksasi pada obyek glas. Selanjutnya dilakukan rehidrasi dengan alkohol bertingkat, kemudian

cuci dengan PBS, kemudian direndam pada 3% hidrogen peroksida  $H_2O_2$  (dalam DI water) selama 20 menit, 1% BSA dalam PBS 30 menit suhu ruang, Antibodi Primer (*reseptor estrogen*) 1:1000 semalam, suhu dingin  $4^\circ C$ , Antibodi sekunder berlabel biotin (*Anti Rat IgG Biotin Labelled*) dan antibodi primer reseptor estrogen, 1 jam suhu ruang, SA-HRP (Sterp Avidin- Hoseradish Peroxidase), 60 menit, suhu ruang, Cromogen DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*), 20 menit, suhu ruang, Counterstain (*Aceto orcein*), 3 menit, suhu ruang kemudian diperiksa dibawah mikroskop. Setiap pergantian tahapan selalu dicuci dengan PBS untuk membersihkan sisa bahan yang menempel.

#### **f. Analisis data**

Pengumpulan data dilakukan dalam lingkungan yang terkontrol dan terkendali dengan asumsi semua kondisi diusahakan sama. Data yang diperoleh dari cacat konginental dan ekspresi reseptor estrogen diuji dengan anova (Steel and Torrie, 1991).

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Ekspresi Reseptor Estrogen

Berdasarkan hasil penelitian dengan berbagai perlakuan yaitu kelompok Kontrol (K0) tanpa paparan *carbon black*, kelompok perlakuan I (K1) dengan paparan *carbon black* 532 mg/m<sup>3</sup> pada umur kebuntingan 6-17 hari selama 4 jam, kelompok perlakuan II (K2) paparan *carbon black* 1064 mg/m<sup>3</sup> pada umur kebuntingan 6-17 hari selama 4 jam, kelompok perlakuan III (KIII) dengan paparan *carbon black* 532 mg/m<sup>3</sup> pada umur kebuntingan 6-17 hari selama 8 jam, kelompok perlakuan IV (KIV) paparan *carbon black* 1064 mg/m<sup>3</sup> pada umur kebuntingan 6-17 hari selama 8 jam terhadap ekspresi reseptor estrogen dan cact konginental dapat dilihat pada table dibawah ini.

Ekspresi Reseptor estrogen pada setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut metode Remmele (Novak *et al.*, 2007). Indeks skala Remmele (IRS) merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna yang dihasilkan pada sel (lampiran 1).

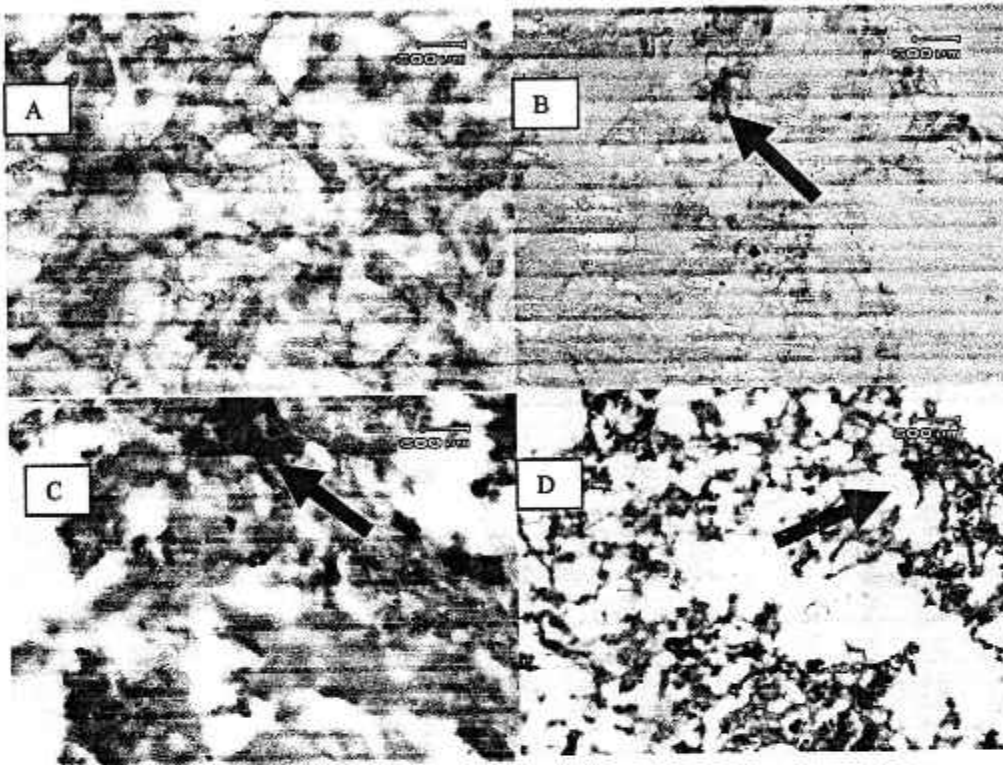
Dari hasil analisis perhitungan yang dilakukan dengan Uji Kruskal Wallis terhadap keseluruhan perlakuan didapatkan hasil yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ). Kemudian dari hasil analisis selanjutnya dilakukan uji perbandingan antar perlakuan dengan Uji Mann, hasil perhitungan dapat dilihat pada table 1.

Tabel 1. Hasil Uji Mann Whitney Ekspresi Reseptor Estrogen

KELOMPOK	RERATA
K0	0,4 <sup>a</sup>
K1	1,8 <sup>ab</sup>
K2	2,6 <sup>bc</sup>
K3	4,2 <sup>cd</sup>
K4	6 <sup>d</sup>

**Keterangan :**

- K0 : Tikus bunting yang tidak mendapat paparan *carbon black*
- K1 : Tikus bunting umur kebuntingan 6-17 hari yang mendapat paparan *carbon black* 532 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam
- K2 : Tikus bunting umur kebuntingan 6-17 hari yang mendapat paparan *carbon black* 1064 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam
- K3 : Tikus bunting umur kebuntingan 6-17 hari yang mendapat paparan *carbon black* 532 mg/m<sup>3</sup> selama 8 jam
- K4 : Tikus bunting umur kebuntingan 6-17 hari yang mendapat paparan *carbon black* 1064 mg/m<sup>3</sup> selama 8 jam



Gambar 1. Ekspresi Reseptor estrogen oleh warna coklat muda hingga coklat tua pada sel-sel immunoreaktif. Pada slide A tidak nampak adanya sel immunoreaktif. Slide B menunjukkan ekspresi Reseptor estrogen dengan intensitas sedang yang ditemukan pada sel syntropoblast (panah). Slide C dan D menunjukkan sel immunoreaktif terhadap Reseptor estrogen dengan intensitas kuat dengan warna coklat tua yang banyak diekspresikan oleh sel-sel cytotropoblast (panah) dan sel-sel endotel (kepala panah) (Pewarnaan immunohistokimia ; pembesaran 1000x; Olympus BX-50. Pentax optio 230; Camera Digital 2.0 megapixel).

Menurut Hardjopranto (1995) estrogen menyebabkan sintesa dan sekresi *growth hormone* sehingga dapat menstimulir pertumbuhan banyak sel dalam tubuh, mempercepat pertambahan berat badan, merangsang korteks kelenjar adrenal untuk lebih banyak meningkatkan metabolisme

karena terjadinya peningkatan nitrogen. Selain itu estrogen pada uterus menyebabkan terjadinya hipertropi dan hiperplasia tenunan endometrium dan miometrium.

Hormon estrogen menyebabkan kelenjar selaput lendir uterus menebal dan juga menyebabkan kelenjar hipofisa berhenti memproduksi FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) yang dikenal dengan mekanisme *feed back negative*. Estrogen dapat merangsang kelenjar hipofisa untuk menghasilkan hormon LH (*Luteinizing Hormone*). Hormon LH menyebabkan terjadinya ovulasi yaitu folikel pecah dan telur keluar dari folikel kemudian masuk ke dalam oviduk di dekatnya. Folikel yang pecah menjadi badan kuning disebut korpus luteum. Korpus luteum ini mengeluarkan hormon progesteron yang berfungsi mempercepat pertumbuhan banyak kelenjar dan banyak pembuluh darah dan selaput lendir uterus (Anggiani, 2006).

## 5.2. Cacat Konginental

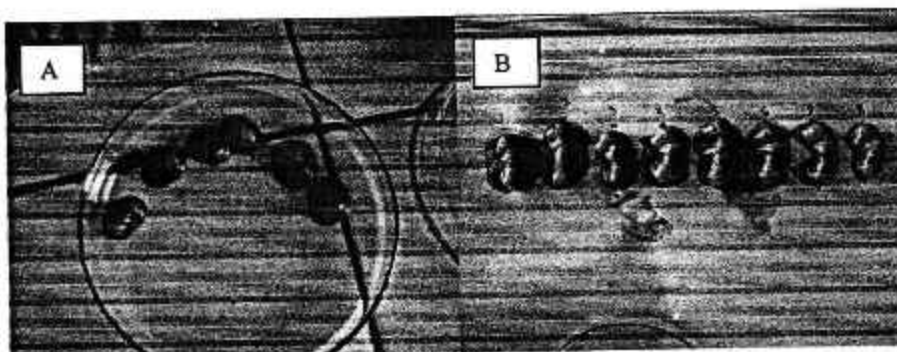
Tabel 2. Rerata Panjang badan dan berat fetus kelompok control dan kelompok perlakuan dosis paparan *carbon black* 532 mg/m<sup>3</sup> dan *carbon black* 1064 mg/m<sup>3</sup> selama 4 dan 8 jam

Kelompok	Rerata	
	Panjang badan fetus	Berat badan fetus
K0	0,72 ± 0,44 <sup>d</sup>	2,18 ± 0,21 <sup>d</sup>
K1	0,73 ± 0,75 <sup>c</sup>	1,53 ± 0,11 <sup>c</sup>
K2	0,23 ± 0,02 <sup>c</sup>	1,45 ± 0,98 <sup>bc</sup>
K3	0,13 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,26 ± 0,11 <sup>b</sup>
K4	0,43 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,11 <sup>a</sup>

Huruf yang berbeda dalam kolom yang sama berbeda nyata ( $p < 0,05$ ).

**Keterangan :**

- K0 : Tikus bunting yang tidak mendapat paparan *carbon black*
- K1 : Tikus bunting umur kebuntingan 6-17 hari yang mendapat paparan *carbon black* 532 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam
- K2 : Tikus bunting umur kebuntingan 6-17 hari yang mendapat paparan *carbon black* 1064 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam
- K3 : Tikus bunting umur kebuntingan 6-17 hari yang mendapat paparan *carbon black* 532 mg/m<sup>3</sup> selama 8 jam
- K4 : Tikus bunting umur kebuntingan 6-17 hari yang mendapat paparan *carbon black* 1064 mg/m<sup>3</sup> selama 8 jam



Gambar 2. A. Fetus kelompok perlakuan paparan *carbon black*  
 B. Fetus tikus kelompok control tanpa paparan *carbon black*

Dari hasil penelitian terjadi penurunan berat badan fetus akibat paparan *carbon black* pada induk tikus bunting. Dari analisis statistik menunjukkan penurunan berat badan fetus berbeda antara kelompok yang tidak dipapar dengan *carbon black* dengan kelompok yang dipapar *carbon black*. Masing-masing kelompok perlakuan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ).

Demikian juga hasil analisis statistik terhadap panjang badan fetus menunjukkan perbedaan masing-masing antar perlakuan ( $p < 0,05$ ), antara kelompok kontrol yang tidak mendapat paparan *carbon black* dengan kelompok perlakuan yang mendapat paparan *carbon black*.

Hal ini menunjukkan *carbon black* sebagai sumber bahan teratogen mengganggu proses organogenesis sehingga menyebabkan cacat konginental berupa penurunan berat badan fetus. Penurunan berat badan fetus juga dipengaruhi oleh akumulasi bahan teratogen yang ada dalam darah sehingga mempengaruhi kondisi lingkungan mikro didalam uterus.

Akumulasi *carbon black* sebagai sumber bahan teratogen juga mempengaruhi panjang badan fetus. Hal ini terlihat dari hasil penelitian selain terjadi penurunan berat badan fetus juga terjadi penurunan panjang badan fetus. *Carbon black* yang ada didalam darah induk bunting mengganggu proses organogenesis sehingga mempengaruhi perkembangan dan pertumbuhan embrio, hal ini terlihat dengan menurunnya panjang badan fetus.

Tabel 3. Persentase jumlah resorpsi embrio kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dosis paparan *carbon black*  $532 \text{ mg/m}^3$  dan *carbon black*  $1064 \text{ mg/m}^3$  selama 4 dan 8 jam

Kelompok	Jumlah embrio	Persentase Jumlah Resorpsi embrio
K0	27	0 (0,0 %)
K1	23	1(4,3 %)
K2	21	2(9,5 %)
K3	22	5(22,7 %)
K4	23	10(43,3%)

**Keterangan :**

K0 : Tikus bunting yang tidak mendapat paparan *carbon black*

K1 : Tikus bunting umur kebuntingan 6-17 hari yang mendapat paparan



- carbon black* 532 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam
- K2 : Tikus bunting umur kebuntingan 6-17 hari yang mendapat paparan *carbon black* 1064 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam
- K3 : Tikus bunting umur kebuntingan 6-17 hari yang mendapat paparan
- K4 : Tikus bunting umur kebuntingan 6-17 hari yang mendapat paparan *carbon black* 1064 mg/m<sup>3</sup> selama 8 jam

Berdasarkan angka persentase resorpsi embrio lama waktu paparan dan dosis paparan *carbon black* dapat meningkatkan jumlah resorpsi embrio, dibandingkan dengan kelompok yang tidak mendapat paparan *carbon black*.

Persentase tikus bunting umur kebuntingan 6-17 hari yang mendapat paparan *carbon black* 532 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam adalah 4,3 %, tikus bunting umur kebuntingan 6-17 hari yang mendapat paparan *carbon black* 532 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam adalah 9,5 %, tikus bunting umur kebuntingan 6-17 hari yang mendapat paparan *carbon black* 532 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam adalah 22,7 %, dan tikus bunting umur kebuntingan 6-17 hari yang mendapat paparan *carbon black* 532 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam adalah 43,3%.

Peningkatan jumlah resorpsi embrio ini mengindikasikan bahwa *carbon black* merupakan bahan teratogen yang berbahaya yang dapat menyebabkan teratologi dengan mengamati peningkatan jumlah resorpsi embrio. Hal ini perlu diwaspadai karena sumber *carbon black* sebagai bahan teratogen ada dilingkungan kehisupan sehari-hari mulai dari pembakaran sampah yang tidak sempurna sampai dengan polusi yang dihasilkan oleh limbah pabrik.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat disampaikan dari hasil penelitian ini adalah

1. Paparan *partikulat matter* dapat menurunkan ekspresi reseptor estrogen pada plasenta tikus.
2. Paparan *partikulat matter* dapat menyebabkan cacat konginental berdasarkan penurunan berat badan fetus, panjang badan fetus dan terjadinya peningkatan resorpsi embrio

#### 6.2. Saran

Saran yang bisa disampaikan adalah

1. *Carbon black* sebagai sumber *partikulat matter* dapat menyebabkan terjadinya cacat konginental pada tikus bunting, oleh karena itu perlu berhati-hati pada ibu hamil terhadap polusi *Carbon black*
2. Perlu dilakukan penelitian dengan parameter lain yang lebih komprehensif sehingga dapat diungkap mekanisme teratology akibat paparan *Carbon black*

## DAFTAR PUSTAKA

- Anggiani. 2006. Pengaruh pemberian Perasan Daun Semanggi Air Terhadap Ketebalan Uterus Mencit (Skripsi). Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Biri, A., Bozkurt, N., Turp, A., Kavutcu, M., Himmetoglu, O., and Durak, I. 2007. Role of Oxidative Stress in Intrauterine Growth Restriction. *Ginecol Obstet Invest* 64(4):187-192.
- Balai Besar Tehnik Kesehatan Lingkungan dan Pemberantasan Penyakit Menular/BBTKL dan P2M. 2009. Laporan: Situasi dan kecenderungan parameter pencemar udara dan air minum serta potensi resiko gangguan kesehatan di Jawa Timur 2006-2008. Surabaya.
- Berkowitz, G.S., Wolff, M.S., Janevic, T.M., Holzman, I., Yehuda, R., and Landrigan, P. 2009: "The World Trade Center disaster and intrauterine growth restriction," *Journal of the American Medical Association*, 290(5), 595-6.
- Bose M., D. Debnath, Y. Chen dan H.S.Bose. 2007. Folding activity and import of steroidogenic acute regulatory protein into mitochondria changed by nicotine exposure. *Journal of Molecular Endocrinology* 39 : 67-79
- Cunningham FG, P.C.MacDonald and N.F.Gant. 1995. *Obstetri Williams* edisi 18. Jakarta : EG. 1084-1105.
- Dejmek, J., Selevan, S.G., Benes, I., Solansky, I., and Sram, R.J. 1999. Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. *Environmental Health Perspectives* 107 960; 475-80.
- Donaldson, K., Stone, V., Clouter, A., Renwick, L., and MacNee, W. 2001. Ultrafines Particles. *Occupational Environment Medicine* 58; 211-216
- Donaldson, K., Tran, L., Jimenez, L.A., Duffin, R., Newby, D.E., Mills ,N., Macnee, W., and Stone, V. 2005. Combustion derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure. *Particle and fibre toxicology* 2; 10
- Folkmann, J.K., Risom, L., Jacobsen, N.R., Wallin, H., Loft, S., and Meller, P. 2009. Oxidatively damaged DNA in rat by Oral Gavage to C60 fullerenes and single-walled Carbon nanotubes. *Environment Health Perspective* 117: 703-708.
- Garza, K.M., Soto, K.F. and Murr, L.E. 2008. Cytotoxicity and reactive oxygen spesies generation from aggregated carbon and carbonaceous

- nanoparticulate materials. *International Journal of Nanomedicine* 3 (1): 83-94.
- Guyton A.C. dan J.E.Hall. 197. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran edisi 9*. Jakarta : EGC, 1285-1290.
- Hoet, P.H.M., Hohlfeld, I.R., and Salata, O.V. 2004. Nanoparticles-known and unknown health risks. *Journal of nanotechnology* 2(12):1-15
- Hougaard, K.S., Jensen, K.A., Nordly, P., Taxvig, C., Vogel, U., Saber, A., and Wallin, H. 2008. Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on development, behaviour, genotoxicity and inflammation in mice. *Particle and fibre toxicology* 5 (3).
- Kamath, U., Rao, G., Kamath, S.U., and Rai, L. 2006. Maternal and fetal indicators of oxidative stress during intra uterine growth retardation (IUGR). *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 21 (1): 111-115.
- Kaufmann, P., Black, S., and Huppertz, B. 2003. Endovascular Trophoblast Invasion: Implication for the pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia. *Biology of Reproduction* 69; 1-7
- King SR and Lavoie HA. 2009. Regulation of the early steps in gonadal steroidogenesis. In : *Reproductive endocrinology, a molecular approach*. New York : Springer, 175.
- National Institute of Environmental Health Science/NIEHS. 2007. Global environment health conference. San Fransisco California.
- Novak M, Madej JA, Dziegeil P. 2007 Intensity of Cox 2 expression in Cell of Soft Tissue Fibrosarcomas in Dog As Related to Grade of Tumor malignation. *Bull Vet inst Pulawy* 51, 275-279. 2007
- Sagai, M., Saito, H., Ichinose, T., Kodama, M., and Mori, Y. 1993: Biological effects of diesel exhaust particles. I. In vitro production of superoxide and in vivo toxicity in mouse. *Free Radic Biol Med* 14:37-47.
- Shi, T., Schins, R.P.F., Knaapen, A.M., Kuhlbusch, T., Pitz, M., Heinrich, J., and Borm, J.A. 2003. Hydroxyl Radical generation by electron paramagnetic resonance as a new method to monitor ambient particulate matter composition. *J. environment Monitor*, 5:550-556
- Suryohudoyo, P. 2007. *Kapita selekta ilmu kedokteran molekuler*. Sagung seto. Jakarta.
- Veras, M.M., Rodrigues, N.R., Caidini, E.G., Ribeiro, A.M., Mayhew, T.M., Saldiva, P.H.N., and Dolnikoff, M. 2008. Particulate urban air pollution

affects the functional Morphology of mouse placenta. *Biology of Reproduction* 79: 578-584

Wick P., Malek, A., Manser, P., Meili, D., Althaus, X.M., Diener, L., Diener, P.A., Zisch, A., Krug, H.F., and Mandagh, U.V. 2009. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environmen Health Perspectives*. <http://dx.doi.org/> online 12 november 2009.

Wiknjosastro H. 1997. Ilmu kandungan edisi kedua cetakan kedua. Jakarta : Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo, 74-76.

World Health Organization (WHO) 2002. Initiating an alliance for action: healthy environment for children. <http://www.cgil.it/org.politicasalute/adessostomeglio/200250/OMS.pdf>

## Lampiran 1. Metode pembacaan ekspresi reseptor estrogen

Tabel 1. Skala semikuantitatif IRS merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel positif (A) dengan Skor Intesitas reaksi warna (B), jadi skala IRS = (A x B)

A	B
Skor 0 : tidak ada sel positif	Skor 0 : tidak ada reaksi warna
Skor 1 : Sel positif kurang dari 10%	Skor 1 : Intensitas warna rendah
Skor 2 : Sel positif antara dari 11% - 50%	Skor 2 : Intensitas warna sedang
Skor 3 : Sel positif antara dari 51% - 80%	Skor 3 : Intensitas warna kuat
Skor 4 : Sel positif antara dari lebih dari 80%	

## Lampiran 2. Data Ekspresi Reseptor Estrogen

NO	KODE PREPARA	SKOR PERSENTASE POSITIF (A)	SKOR INTENSITAS WARNA (B)	INDEKS IRS (AXB)	KETERANGAN
1	K0.1	1	2	2	
2	K0.2	0	0	0	
3	K0.3	0	0	0	
4	K0.4	0	0	0	
5	K0.5	0	0	0	
rerata				0,4	
1	K1.1	1	2	2	
2	K1.2	1	3	3	
3	K1.3	0	0	0	
4	K1.4	1	2	2	
5	K1.5	1	2	2	
rerata				1,8	
1	K2.1	1	2	2	
2	K2.2	1	3	3	
3	K2.3	1	3	3	
4	K2.4	1	2	2	
5	K2.5	1	3	3	
rerata				2,6	
1	K3.1	2	3	6	
2	K3.2	1	3	3	
3	K3.3	1	3	3	
4	K3.4	2	3	6	
5	K3.5	1	3	3	
				4,2	
1	K4.1	2	3	6	

2	K4.2	2	3	6	
3	K4.3	3	3	9	
4	K4.4	2	3	6	
5	K4.5	2	3	3	
rerata				6	



Lampiran 3. Data berat badan, panjang badan dan jumlah resorpsi embrio

NO	KODE PREPARA	Berat badan	Panjang Badan	Jumlah Resorpsi embrio
1	K0.1	2 cm	0,75 gr	0
		2,5 cm	0,90 gr	
		2,5 cm	0,90 gr	
		2 cm	0,60 gr	
		2 cm	0,70 gr	
2	K0.2	2,7 cm	0,75 gr	0
		2,3 cm	0,90 gr	
		2,3 cm	0,90 gr	
		2,7 cm	0,100 gr	
3	K0.3	2 cm	0,75 gr	0
		2,5 cm	0,90 gr	
		2,5 cm	0,90 gr	
		2 cm	0,60 gr	
		2 cm	0,70 gr	
4	K0.4	1,9 cm	0,75 gr	0
		1,5 cm	0,60 gr	
		1,9 cm	0,70 gr	
		2 cm	0,60 gr	
		2 cm	0,70 gr	
		2,2 cm	0,75gr	
		2,2 cm	0,75 gr	
5	K0.5	2 cm	0,75 gr	0
		2,1 cm	0,70 gr	
		2,1 cm	0,70 gr	
		2 cm	0,60 gr	
		2 cm	0,70 gr	
		2,2cm	0,70 gr	
rerata				
1	K1.1	1,7 cm	0,50 gr	0
		1,7cm	0,50 gr	
		1,6 cm	0,50 gr	
		1,8 cm	0,45 gr	
		1,7 cm	0,40 gr	
2	K1.2	1,5 cm	0,30 gr	1

		1,4 cm 1,3 cm 1,5 cm	0,25 gr 0,25 gr 0,30 gr	
3	K1.3	1,6 cm 1,7 cm 1,4 cm 1,5 cm 1,6 cm	0,30 gr 0,30 gr 0,20 gr 0,25 gr 0,30 gr	0
4	K1.4	1,3 cm 1,5 cm 1,3 cm 1,7 cm	0,16 gr 0,19 gr 0,18 gr 0,19 gr	0
5	K1.5	1,6 cm 1,5 cm 1,5 cm 1,5 cm 1,6 cm	0,30 gr 0,29 gr 0,28 gr 0,25 gr 0,25 gr	0
rerata				
1	K2.1	1,4 cm 1,5 cm 1,5 cm 1,3 cm	0,25 gr 0,25 gr 0,20 gr 0,20 gr	1
2	K2.2	1,5 cm 1,5 cm 1,5 cm 1,6 cm	0,30 gr 0,20 gr 0,20 gr 0,25 gr	1
3	K2.3	1,4 cm 1,4 cm 1,5 cm 1,5 cm	0,20 gr 0,20 gr 0,20 gr 0,20 gr	0
4	K2.4	1,3 cm 1,3 cm 1,5 cm 1,3 cm 1,2 cm	0,15 gr 0,15 gr 0,20 gr 0,15 gr 0,10 gr	0
5	K2.5	1,8 cm 1,5 cm 1,5 cm 1,5 cm	0,30 gr 0,23 gr 0,23 gr 0,25 gr	0

<b>1</b>	<b>K3.1</b>	1,1 cm 1,3 cm 1,2 cm 1,3 cm 1,1 cm	0,10 gr 0,15 gr 0,11 gr 0,15 gr 0,10 gr	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>K3.2</b>	1,0 cm 1,2 cm 1,1 cm	0,10 gr 0,10 gr 0,10 gr	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>K3.3</b>	1,1 cm 1,5 cm 1,4 cm 1,2 cm 1,5 cm	0,11 gr 0,22 gr 0,22 gr 0,10 gr 0,20 gr	<b>0</b>
<b>4</b>	<b>K3.4</b>	1,6 cm 1,5 cm 1,3 cm 1,1 cm	0,15 gr 0,15 gr 0,12 gr 0,10 gr	<b>1</b>
<b>5</b>	<b>K3.5</b>	1,2 cm 1,3 cm 1,4 cm 1,2 cm 1,3 cm	0,11 gr 0,12 gr 0,15 gr 0,10 gr 0,12 gr	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>K4.1</b>	0,3 cm 0,3 cm 0,3 cm 0,3 cm 0,5 cm 0,3 cm	0,03 gr 0,03 gr 0,03 gr 0,04 gr 0,05 gr 0,03 gr	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>K4.2</b>	0,5 cm 0,5 cm 0,5 cm 0,5 cm 0,5 cm	0,04 gr 0,05 gr 0,04 gr 0,05 gr 0,05 gr	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>K4.3</b>	0,4 cm 0,4 cm 0,5 cm 0,7 cm	0,06 gr 0,04 gr 0,05 gr 0,05 gr	<b>2</b>
<b>4</b>	<b>K4.4</b>	0,5 cm 0,5 cm 0,5 cm 0,5 cm	0,04 gr 0,04 gr 0,05 gr 0,06 gr	<b>2</b>
<b>5</b>	<b>K4.5</b>	0,4 cm	0,03 gr	<b>2</b>

		0,5 cm	0,05 gr	
		0,5 cm	0,04 gr	
		0,3 cm	0,03 gr	

**Lampiran 4. Hasil Analisis Statistik Reseptor Estrogen**

**NPar Tests  
Kruskal-Wallis Test**

**Ranks**

perlakuan	N	Mean Rank
indeks di K0	5	4.10
m K1	5	8.80
en K2	5	12.70
si K3	5	18.10
on K4	5	21.30
1 Total	25	

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

	indeks
Chi-square	18.862
df	4
Asymp. Sig.	.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping

Variable: perlakuan

**NPar Tests  
Mann-Whitney Test**

**Ranks**

perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
indeks di K0	5	3.90	19.50
m K1	5	7.10	35.50

en Total si on 1	10		
---------------------------	----	--	--

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

	indeks
Mann-Whitney U	4.500
Wilcoxon W	19.500
Z	-1.848
Asymp. Sig. (2-tailed)	.065
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.095 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable:  
perlakuan

**NPar Tests**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
indeks di K0	5	3.20	16.00
m K2	5	7.80	39.00
en Total si on 1	10		

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

	indeks
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-2.545
Asymp. Sig. (2-tailed)	.011

Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 <sup>a</sup>
--------------------------------	-------------------

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable:  
perlakuan

**NPar Tests**  
**Mann-Whitney Test**

Ranks			
perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
indeks di K0	5	3.00	15.00
m K3	5	8.00	40.00
en Total	10		
si			
on			
l			

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

	indeks
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.739
Asymp. Sig. (2-tailed)	.006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable:  
perlakuan

**NPar Tests**  
**Mann-Whitney Test**

Ranks			
perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
indeks di K0	5	3.00	15.00
m K4	5	8.00	40.00

en Total si on 1	10		
---------------------------	----	--	--

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

	indeks
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.730
Asymp. Sig. (2-tailed)	.006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable:  
perlakuan

**NPar Tests**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
indeks di K1	5	4.30	21.50
m K2	5	6.70	33.50
en Total si on 1	10		

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

	indeks
Mann-Whitney U	6.500
Wilcoxon W	21.500
Z	-1.386
Asymp. Sig. (2-tailed)	.166



Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.222 <sup>a</sup>
--------------------------------	-------------------

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable:  
perlakuan

**NPar Tests**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
indeks di K1	5	3.30	16.50
m K3	5	7.70	38.50
en Total	10		
si			
on			
1			

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

	indeks
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	16.500
Z	-2.410
Asymp. Sig. (2-tailed)	.016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable:  
perlakuan

**NPar Tests**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
indeks di K1	5	3.10	15.50
m K4	5	7.90	39.50

en Total	10		
si			
on			
1			

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

	indeks
Mann-Whitney U	.500
Wilcoxon W	15.500
Z	-2.578
Asymp. Sig. (2-tailed)	.010
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable:  
perlakuan

**NPar Tests**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
indeks di K2	5	3.90	19.50
m K3	5	7.10	35.50
en Total	10		
si			
on			
1			

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

	indeks
Mann-Whitney U	4.500
Wilcoxon W	19.500
Z	-1.897
Asymp. Sig. (2-tailed)	.058

Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.095 <sup>a</sup>
--------------------------------	-------------------

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable:  
perlakuan

**NPar Tests  
Mann-Whitney Test**

Ranks			
perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
indeks di K2	5	3.30	16.50
m K4	5	7.70	38.50
en Total	10		
si			
on			
l			

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

	indeks
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	16.500
Z	-2.410
Asymp. Sig. (2-tailed)	.016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 <sup>a</sup>

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable:  
perlakuan

**NPar Tests  
Mann-Whitney Test**

Ranks			
perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
n			

indeks	di K3	5	4.30	21.50
	m K4	5	6.70	33.50
	en Total	10		
	si			
	on			
	1			

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

	indeks
Mann-Whitney U	6.500
Wilcoxon W	21.500
Z	-1.386
Asymp. Sig. (2-tailed)	.166
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.222 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable:  
perlakuan

