

1. ANTIOXIDANTS
2. POLYSACCHARIDES
3. FETAL GROWTH DISORDERS

LAPORAN PENELITIAN
PROYEK DUE-Like BATCH III

**ANTI OKSIDAN POLYSACCHARIDE KRESTIN (PSK) SEBAGAI
PENGHAMBAT APOPTOSIS DAN MENCEGAH MUNCULNYA
KELAINAN JANIN AKIBAT INDUKSI 2-METHOXYETHANOL**



Oleh :

Drs. Win Darmanto, MSi, Ph.D.

Drs. Rai Pidada, M.Si.

Drs. Eko Prihyantoro, M.Kes.

0065 07191

PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

NOPEMBER 2003

LAPORAN PENELITIAN

ANTI OKSIDAN POLYSACCHARIDE ...

WIN DARMANTO

**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN PROYEK DUE-Like BATCH III

A. Judul Penelitian : Anti Oksidan *Polysaccharide Krestin* (PSK) Sebagai Penghambat Apoptosis Dan Mencegah Munculnya Kelainan Janin Akibat Induksi 2-Methoxyethanol

B. Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap dan Gelar : Drs. Win Darmanto, MSi, Ph.D.
 b. Jenis Kelamin : Laki-laki
 c. Pangkat/Golongan / NIP : Penata TK-I / III-d / 131653741
 d. Bidang Keahlian : Teratologi, Biologi Molekuler
 e. Fakultas/Jurusan : FMIPA / Biologi
 f. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

C. Tim Peneliti :

No.	NAMA DAN GELAR AKADEMIK	BIDANG KEAHLIAN	INSTANSI	PERGURUAN TINGGI
1.	Drs. I.B. Rai Pidada, M.Si	Reproduksi Hewan	FMIPA / Biologi	Universitas Airlangga
2.	Dra Eko Prihyantoro, M.Kes.	Teratologi	FMIPA / Biologi	Universitas Airlangga

D. Pendanaan dan jangka waktu penelitian :

Jangka waktu Penelitian : 7 bulan

Biaya yang diusulkan : Rp. 30.000.000,- (Tiga puluh juta rupiah)

Biaya yang disetujui : Rp. 30.000.000,- (Tiga puluh juta rupiah)

Mengetahui,
Dekan,

(Drs. H. Abdul Latief Burhan, M.S.)
NIP. 131128709

Ketua Peneliti,

(Drs. Win Darmanto, MSi, Ph.D.)
NIP. 131653741

Menyetujui,
Direktur Eksekutif
Tjijik Sri Rahjandari, Ph.D.

ABSTRAK

2-Methoxyethanol (2-ME) atau nama lainnya *ethylene glycol monomethyl ether* (EGME) merupakan contoh senyawa glycol ether, telah diketahui sebagai bahan pencemar lingkungan bersifat toksik maupun teratogenik pada beberapa spesies mamalia. (Darmanto *et al.*, 1998). Polysaccharide Krestine (PSK) hasil ekstraksi dari jamur diketahui mampu menekan munculnya kelainan anggota mencit akibat induksi 5-azacytidine (Kurushita, 1990), menekan munculnya hidrosefalus (Aolad *et al.*, 2000) dan menunda proses apoptosis sel jaringan embrio akibat radiasi sinar-X (Kagohashi, *et al.*, 2000). Penelitian dirancang untuk mendemonstrasikan kemampuan PSK dalam menurunkan angka insiden kelainan janin dan kematian sel calon otak akibat induksi 2-ME. Mencit umur kehamilan (UK) tertentu yaitu UK 7, UK 9, UK 13 dan UK 15 hari diinjeksi dengan 2-ME dosis 7 mmol/kg BB untuk UK7 dan dosis 11 mmol/kg BB untuk UK 9 dan UK 13 hari dan dosis 15 mmol/kg BB. Pada selang waktu satu jam setelah penyuntikan 2-ME mencit disuntik dengan PSK dosis 150 mg/kg BB. Mencit dibunuh pada selang waktu 12 dan 24 jam setelah penyutikan PSK untuk diamati efek akutnya berupa kematian sel pada jaringan calon otak embrio secara histologi. Sebagian mencit dibunuh pada UK 18 hari, untuk diamati insiden munculnya kelainan eksternal dan internal, sebagian kelainan diamati pada waktu postnatal. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa PSK mampu menurunkan persentase kematian embrio intrauterus mencit khususnya pada perlakuan 2-ME pada UK 13 hari, mampu menurunkan insiden kelainan eksternal khususnya pada perlakuan 2-ME pada UK 9 hari, menurunkan angka insiden kelainan palatosisis pada kelompok UK 15 hari, namun tidak menunjukkan penurunan persentase untuk kelainan otak dan anggota. PSK mampu menurunkan angka kematian sel pada jaringan calon otak khususnya pada perlakuan UK 9 hari, menaikkan kadar oksidant darah induk mencit yang diukur dengan kemampuan peredaman oksidant terhadap senyawa radikal bebas DPPH. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan PSK mampu mengurangi efek tosik 2-ME pada embrio berupa kematian sel, sehingga mampu mengurangi angka insiden kelainan janin dan kematian embrio.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kita panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayatNya sehingga kami dapat menyelesaikan penelitian yang berjudul : Anti Oksidan *Polysaccharide Krestin* (PSK) Sebagai Penghambat Apoptosis Dan Mencegah Munculnya Kelainan Janin Akibat Induksi 2-Methoxyethanol. Pada kesempatan ini kami sampaikan rasa terima kepada program DUE-Like Batch III yang telah membiayai penelitian ini, selain itu juga kami sampaikan terima kasih kepada mahasiswa program skripsi yang terlibat dalam penelitian ini.

Kami menyadari bahwa laporan ini masih kurang sempurna, oleh karena itu segala kritik dan saran yang membangun demi penyempurnaanya sangat kami harapkan, agar karya ilmiah ini menjadi lebih sempurna.

Surabaya, 22 November 2003

DAFTAR ISI



LEMBAR PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Permasalahan.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Tinjauan Tentang 2-methoxyethanol (2-ME)	5
2.2. Tinjauan Tentang Polysaccharide Krestine (PSK)	8
2.3. Tinjauan Tentang Mencit	9
2.4. Perkembangan Otak.....	10
2.5. Apoptosis	15
 BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
3.1. Tujuan khusus Penelitian	16
3.2. Tujuan Umum Penelitian	16
3.3. Manfaat Penelitian	17

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	18
4.2 Materi Penelitian	18
4.3 Prosedure Penelitian	19
4.4. Pengukuran Kadar Antioksidant	21

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Pengamatan	23
5.2. Pembahasan	34

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 .Kesimpulan	38
6.2. Saran	38

DAFTAR PUSTAKA	39
----------------------	----

LAMPIRAN.....	46
---------------	----

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 : Kemampuan reproduksi induk mencit setelah diberi PSK dengan dosis 150 mg/kg berat badan yang sebelumnya diinjeksi 2-ME dengan dosis 7,5 mmol/kg berat badan pada umur kebuntingan 7 hari yang diamati pada umur kebuntingan 18 hari.....	23
Tabel 5.2 : Kemampuan reproduksi induk mencit setelah diberi PSK dengan dosis 150 mg/kg berat badan yang sebelumnya diinjeksi 2-ME dengan dosis 7,5 mmol/kg berat badan pada umur kebuntingan 9 hari yang diamati pada umur kebuntingan 18 hari.....	24
Tabel 5.3 : Kemampuan reproduksi induk mencit setelah diberi PSK dengan dosis 150 mg/kg berat badan yang sebelumnya diinjeksi 2-ME dengan dosis 11 mmol/kg berat badan pada umur kebuntingan 15 hari yang diamati pada umur kebuntingan 18 hari ...	25
Tabel 5.4 : Persentase kelainan eksternal dan exencephaly yang muncul akibat induksi 2-ME pada umur kehamilan ke 7 dan diamati pada umur kebuntingan 18 hari	26
Tabel 5.5 : Persentase kelainan eksternal dan kelainan anggota maupun ekor yang muncul akibat induksi 2-ME pada umur kehamilan ke 9 dan diamati pada umur kebuntingan 18 hari.....	27
Tabel 5.6 : Persentase kelainan eksternal dan kelainan palatosisis yang muncul akibat induksi 2-ME pada umur kehamilan ke 15	

dan diamati pada umur kebuntingan 18 hari.....	27
Tabel 5.7 : Persentase Insiden kelainan dinding cereberum (Cerebral kortek) dan cerebellum yang muncul akibat induksi 2-ME pada beberapa umur kehamilan dan diamati pada umur kebuntingan 18 hari.....	28
Tabel 5.8 : Kemampuan penghambatan PSK dalam menghambat kematian sel pada jaringan otak akibat induksi 2ME dosis 11 mol/kg BB pada umur kehamilan 9 hari.....	29
Tabel 5.9 : Rata-Rata Persentase Kematian Sel Calon Cerebellar <i>Cortex</i> (cerebellum) Fetus Mencit (<i>Mus musculus</i>) yang diinduksi 2-ME dosis 15 mmol/kg BB, pada UK 15 hari diamati pada selang waktu 12 dan 24 jam setelah injeksi 2-ME.....	30
Tabel 5.10. Rata-Rata Persentase Kematian Sel Calon Cerebellar <i>Cortex</i> (cerebellum) Fetus Mencit (<i>Mus musculus</i>) yang diinduksi 2-ME dosis 18 mmol/kg BB, pada UK 18 hari daiamati pada selang waktu 12 dan 24 jam setelah injeksi 2-ME.....	30
Tabel 5.11: Persen peredaman DPPH secara <i>in vivo</i> oleh PSK dalam darah mencit kontrol dan darah mencit yang sebelumnya diinjeksi 2-ME.....	33

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Bagan metabolisme 2-ME	6
Gambar 5.1 : Kemampuan (kadar) antioksidan larutan PSK terhadap radikal bebas DPPH secara <i>in vitro</i> yang diamati dengan metode flouresence	32
Gambar 5.2 : Persen peredaman PSK dibandingkan dengan 2-ME terhadap peredaman radiakal bebas DPPH secara <i>in vivo</i> dalam darah induk mencit.....	33

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Tabel kematian sel neuron akibat induksi 2-ME dan 2-ME diikuti PSK yang diamati 24 jam setelah penyuntikan PSK dalam darah induk mencit.....	46

BAB I

PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang Permasalahan

Pada dasawarsa terakhir ini, telah dilaporkan adanya dampak negatif dari bahan-bahan kimia pencemar lingkungan menyebabkan gangguan sistem reproduksi, termasuk efek teratogenik baik pada hewan maupun manusia (Colborn *et al.*, 1993). Phenomena ini diduga sebagai akibat dari keterlibatan dari gangguan sistem endokrin (Ema, 2000). Gangguan pengendalian hormon selama perkembangan prenatal dan postnatal diduga akan mempunyai efek pada kemampuan reproduksi dan perkembangan fetus. Suatu fakta bahwa adanya pengaruh hormon selama masa kehamilan mampu menyebabkan gangguan pada sistem syaraf pusat (Hutchison *et al.*, 1997). Oleh karena itu adanya program unggulan yang dicanangkan oleh para toksikolog dunia khususnya di Jepang memfokuskan penelitian bahan-bahan kimia pencemar lingkungan yang mengganggu sistem syaraf dan endokrin sebagai prioritas utama dalam proyek penelitian (Japan Environment Agency, 1998; Ema. 2000).

Senyawa *phthalate ester* (ester ftalat) adalah salah satu bahan dasar plastik (plasticizer), limbah senyawa ini sering menjadi bahan polutan. Kelompok senyawa ftalat ester ini diantaranya adalah glycol ether yang umumnya digunakan juga sebagai bahan plastik dan pelarut dalam industri cat, minyak rem dll (Singh *et al.*, 1972, Krasavage *et al.*, 1985) 2-Methoxyethanol (2-ME) atau nama lainnya *ethylene glycol monomethyl ether* (EGME) merupakan contoh senyawa glycol ether dan telah diketahui sebagai bahan pecemar lingkungan, khususnya lingkungan perairan atau sungai (Miller *et al.*, 1983). Senyawa tersebut diketahui bersifat toksik maupun teratogenik (penyebab cacat kandungan) pada beberapa spesies mamalia

(Feuston *et al.*, 1990, Darmanto *et al.*, 1998). Laporan sebelumnya juga menyebutkan bahwa, beberapa orang telah keracunan 2-ME melalui penetrasi ke dalam kulit dan saluran pernafasan (Dugard *et al.*, 1984). Sekitar 100.000 orang teracuni 2-ME pertahun, dari jumlah tersebut diduga adalah kaum wanita yang masih dalam masa subur atau mampu melahirkan (Scoot *et al.*, 1987). Sifat teratogenik 2-ME pada hewan percobaan, diduga disebabkan oleh hasil metabolisme 2-ME di dalam sel liver menjadi *methoxyacetic acid* (MAA), dengan bantuan katalisator *alcohol dehydrogenase* (ADH) (Brown *et al.*, 1984, Moslen *et al.*, 1995). MAA juga telah terbukti bersifat embriotoksik dan teratogenik pada mamalia baik embrio preimplantasi maupun postimplantasi, sifat toksik ini sama dengan yang disebabkan oleh 2-ME (Darmanto *et al.*, 1994a, Darmanto *et al.*, 1994b, Darmanto *et al.*, 1994c, Greene *et al.*, 1987). Penelitian lain telah membuktikan bahwa 2-ME menyebabkan gangguan pada sistem reproduksi berupa kerusakan pada jaringan testis, khususnya pada proses spermatogenesis, menyebabkan apoptosis (kematian sel) pada spermatosit tikus, marmut, kelinci (Ku *et al.*, 1995, Wine *et al.*, 1997). 2-ME juga diketahui sangat potensial menyebabkan kelainan perkembangan otak yaitu menyebabkan otak terdedah (*exencephaly*) (Ketti *et al.*, 1996) Penelitian kami sebelumnya menyebutkan bahwa, 2-ME menyebabkan kelainan pada fetus mencit yang induknya diberi 2-ME maupun MAA, kelainan yang muncul terutama adalah kelainan rangka anggota, kelainan rangka aksial, sebagai akibat kerusakan jaringan embrional somite yang selanjutnya memunculkan kelainan rangka vertebrae dan tulang rusuk, medula spinalis terdedah (*spina bifida*); dan kelainan otak (*exencephaly*) (Darmanto *et al.*, 1994a, Darmanto *et al.*, 1998)

Seiring dengan telah ditemukannya banyak senyawa teratogenik dan mekanisme munculnya kelainan bawaan, para ilmuwan juga telah berusaha

menemukan dan mencari bahan-bahan anti teratogenik, seperti yang telah dipublikasikan sebelumnya oleh Nomura *et al.*, 1983 dan Gotoh *et al.*, 1988, menunjukkan adanya kemampuan kofein, obat-obat anti nyeri, khemoterapi kanker dan asam retinoid, mampu menekan munculnya kelainan akibat bahan teratogenik. Kubota *et al.*, 2000, juga melaporkan adanya senyawa kofein mampu memperbaiki kerusakan pada embrio tikus akibat induksi logam berat cadmium.

Polysaccharide Krestine (PSK) hasil ekstraksi dari jamur Basidiomycetes, pertama kali dikenalkan sebagai kelompok bahan terapi kanker (Kondo *et al.*, 1981 dan Tsukagoshi *et al.*, 1984 dalam Kagohashi *et al.*, 2002), mampu menekan munculnya kelainan anggota mencit akibat induksi 5-azacytidine (Kurushita, 1990). Berikutnya PSK juga diketahui menekan terjadinya proses apoptosis patologis dan kelainan pada mata akibat radiasi sinar X (Matsui *et al.*, 1995).

Penelitian kami sebelumnya menemukan juga radiasi sinar X pada periode awal kehamilan menyebabkan hidrosefalus (akumulasi cairan cerebrospinal pada ventrikel cerebrum) dan penggunaan ekstrak miselia jamur *Coriolus versicolor* yaitu PSK (*Krestin*) setelah radiasi sinar-X mampu menurunkan angka insiden hidrosefalus, kerusakan jaringan otak dan menunda proses apoptosis dan ekspresi protein p53 (protein yang meningkat saat apoptosis) (Aolad *et al.*, 2000a, Aolad *et al.*, 2000b, Kagohashi *et al.*, 2002).

Penelitian ini dirancang agar bisa mengungkapkan mekanisme penghambatan proses kematian sel embrional (apoptosis), kerusakan susunan jaringan embrional baik pada somite maupun jaringan embrional sistem syaraf oleh bahan anti oksidan PSK. Dengan diketahui model mekanisme penghambatan munculnya kerusakan jaringan dan cacat lahir, diharapkan mampu menemukan pula bahan atau metode yang

dapat mencegah munculnya kelainan eksternal maupun internal atau kerusakan otak akibat bahan polutan lingkungan seperti penggunaan anti oksidan.

Adanya fakta bahwa 2-ME diketahui bersifat teratogenik, yaitu memunculkan kelainan anggota, rangka, syaraf, kerusakan jaringan testis dan apoptosis pada beberapa sel spermatogenik, dan disisi lain PSK telah diduga bersifat anti oksidan dan diketahui mampu menurunkan angka kelainan bawaan dan apoptosis akibat radiasi sinar-X, maka jika PSK diberikan pada mencit segera setelah pemberian 2-ME, diduga mampu menurunkan efek akut 2-ME berupa apoptosis, menurunkan kelainan yang muncul. Selain hal tersebut peneliti juga ingin mengetahui apakah mekanisme kerja PSK sebagai hasil dari sifat anti oksidannya.

1.2. Rumusan Masalah

Dari uraian fakta tersebut diatas, masalah pada penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut :

1. Apakah PSK mampu menurunkan daya embriotoksisitas 2-ME yang diukur dengan angka insiden kematian embrio intrauterus ?
2. Apakah PSK mampu menurunkan insiden kelainan eksternal khususnya otak, anggota dan palatosisis akibat induksi 2-ME pada UK 7, 9 dan 13 hari ?
3. Apakah PSK mampu mencegah atau menurunkan persentase kematian sel akibat induksi 2-ME ?
4. Apakah terjadi kenaikan kadar senyawa antioksidan dalam darah induk mencit setelah pemberian PSK?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang 2-methoxyethanol (2-ME)

2.1.1. Struktur kimia senyawa 2-Methoxyethanol

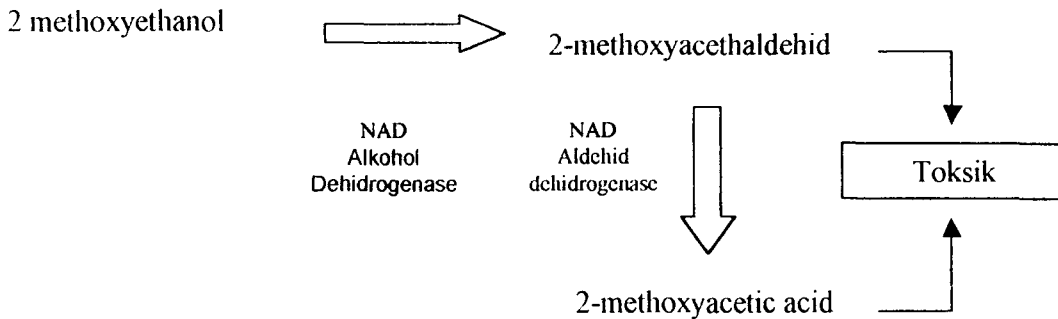
Senyawa 2-ME dalam tubuh mengalami metabolisme menjadi *Methoxyacetic acid* (MAA), dengan bantuan katalisator alkohol dehidrogenase (ADH). Sebelum menjadi MAA terlebih dahulu melalui pembentukan senyawa antara berupa *Methoxyacetaldehyde* (MALD). Senyawa methoxyacetaldehid diubah menjadi MAA dengan bantuan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

2.1.2. Metabolisme Senyawa 2-Methoxyethanol

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

Toksisitas senyawa 2-ME terhadap mikroorganisme di alam tergolong rendah karena dapat mengalami biodegradasi (Epa, 1986). Namun waktu paruh senyawa tersebut di dalam tubuh berkisar 20 jam, sehingga mengakibatkan terjadinya akumulasi di dalam tubuh (Scott *et al.*, 1989). Akumulasi MAA di dalam tubuh embrio dapat mencapai dua kali lipat dibandingkan akumulasinya di dalam tubuh

induknya sebab senyawaq MAA di dalam tubuh embrio lebih lambat didegradasi (Scott *et al.*, 1989).



Gambar 2.1. Bagan Metabolisme 2-ME (Moslen *et al.*, 1995)

2.1.3. Embriotoksisitas dan teratogenisitas 2-ME

Pada akhir-akhir ini telah banyak dilaporkan adanya dampak negatif dari bahan-bahan kimia pencemar lingkungan berupa gangguan pada sistem reproduksi, termasuk efek teratogenik baik pada hewan maupun manusia (Colborn, 1993; Ema, 2000).

Dimethoxyethyl phthalate sebagai salah satu kelompok senyawa *phthalate ester* umumnya digunakan sebagai bahan dasar plastik (plasticizer), limbah senyawa ini sering menjadi bahan polutan (Darmanto, 1998). Kelompok senyawa turunan DMEP ini diantaranya adalah *glycol ether* yang juga digunakan sebagai bahan dasar plastik dan pelarut dalam industri cat (Singh *et al.*, 1972). Senyawa 2-ME merupakan contoh senyawa *glycol ether* dan telah diketahui sebagai bahan pencemar lingkungan, khususnya lingkungan perairan (Miller *et al.*, 1982). Senyawa tersebut diketahui bersifat toksik maupun teratogenik pada beberapa spesies mamalia (Feuston *et al.*, 1990; Darmanto, 1998).

Pemberian 2-ME pada tikus Sprague-Dawley bersama-sama air minum dengan dosis 73 mg/kg berat badan/hari menyebabkan kematian embrionya, sedangkan pada dosis yang lebih rendah menyebabkan kelainan pada jantung. Pengamatan pada anak tikus umur 48-65 hari menyebabkan kematian sebanyak 50% dan kesalahan tingkah laku pergerakan berenang di air (Nelson *et al.*, 1989).

Senyawa 2-ME yang diberikan pada tikus Sprague-Dawley dengan dosis tunggal secara topikal di leher bagian atas dengan dosis 500, 1000 atau 2000 mg/kg berat badan pada umur kebuntingan 10 atau 12 hari, menyebabkan penurunan berat badan fetus, peningkatan resorpsi, peningkatan kelainan eksternal dan internal (kardiovaskuler dan sistem urinaria), kelainan rangka yaitu tulang penyusun anggota, terutama tulang jari, kolumna vertebralis dan terutama pada ekor (Feuston *et al.*, 1990).

Beberapa hewan percobaan selain tikus juga menunjukkan respon teratogenik terhadap 2-ME, baik yang diberikan melalui pernafasan maupun pencernaan. Pemberian 2-ME pada mencit CD-1 melalui “gavage” dengan dosis tunggal 500 mg/kg berat badan pada umur kebuntingan 7-10 hari dapat menyebabkan *eksensefali* (otak tidak tertutup tulang tengkorak), sedang pemberian 2-ME pada umur kebuntingan 11 hari menyebabkan kelainan pada jari berupa *syndactily*, *oligodactily* dan *brachydactily*. Hasil penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa anggota depan lebih peka terhadap pemberian 2-ME dari pada anggota belakang (Horton *et al.*, 1985).

Penelitian dengan menggunakan *Macaca fascicularis* yang diberi perlakuan 2-ME secara “gavage” pada masa organogenesis umur kebuntingan 20-45 hari dengan dosis 0,47 mmol/kg berat badan, menyebabkan kematian embrio dan *ectrodactily* (Scott *et al.*, 1989).

Pada penelitian lain menyebutkan bahwa beberapa orang telah keracunan 2-ME yang masuk melalui kulit dan saluran pernafasan (Dugard *et al.*, 1984). Pada penelitian kami menunjukkan bahwa MAA bersifat embriotoksik dan teratogenik pada mammalia, baik embrio preimplantasi maupun postimplantasi, sifat toksik ini sama dengan yang disebabkan oleh 2-ME (Darmanto *et al.*, 1994).

Senyawa 2-ME juga diketahui sangat potensial menyebabkan kelainan perkembangan otak yaitu *eksensefali* (otak tidak tertutup tulang tengkorak) (Ketti *et al.*, 1996). Penelitian lain menyebutkan bahwa 2-ME menyebabkan kelainan fetus mencit, yang induknya diberi 2-ME maupun MAA, kelainan yang muncul terutama adalah kelainan rangka anggota, kelainan rangka aksial (rangka vertebrae dan tulang rusuk) dan kelainan otak (Darmanto, 1998).

2.2. Tinjauan Tentang Polisakarida Krestin (PSK) Sebagai Antioksidan

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

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

Zat ini terdapat pada jamur *Coriolus versicolor* dari kelas Basidiomycetes (Kobayashi., *et al.* 1995, Tsukagoshi., *et al.* 1984). Struktur tubuh dari *Coriolus*

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

Selain PSK ada 2 jenis polisakarida lain yang diekstrak dari miselium jamur tersebut, yaitu Small Peptide of *Coriolus versicolor* (SPCV) dan Polysaccharida Peptide (PSP) (Yang et al., 1992). Dan kedua zat tersebut telah dibuktikan mampu untuk melawan terbentuknya sel kanker atau sebagai anti kanker.

Polisakarida krestin memiliki karakteristik berupa serbuk atau bubuk berwarna coklat, larut dalam methanol, pyridine, chloroform, benzene dan hexane, serta memiliki kelarutan yang sangat tinggi dengan air. Didalam larutan yang menggunakan pelarut air, PSK memiliki pH sekitar 7 atau pH normal. Berat molekul dari PSK adalah 9.4 KD (Tsukagoshi., et al. 1984). Terdiri atas protein yang tersusun atas asam amino-asam amino seperti asam aspartat, asam glutamat, valin, leusin, lysine, arginin, dan lain-lain serta monosakarida, yaitu glukosa yang merupakan komponen penyusun yang terbesar (74,6 %), galaktosa, mannos, xylosa dan fucosa (Tsukagoshi., et al, 1984).

2.3. Tinjauan Tentang Mencit

Mencit yang digunakan termasuk dalam klas mamalia, Ordo: Rodensia, Famili : Muridae dan spesies: *Mus musculus* (Jasin, 1984)

Mencit mempunyai kemampuan hidup selama 2,5 - 3 tahun. Mencit tergolong hewan menyusui yang dapat dikawinkan pada umur 8 minggu dengan lama

kebuntingan 18 - 20 hari. Masa reproduksinya antara 2 - 14 bulan dengan siklus birahi setiap 4 - 5 hari. Mencit rata-rata melahirkan pada umur kebuntingan 19 hari dengan rata-rata jumlah anak 10 ekor dan menyusui anaknya selama 21 hari (Rugh, 1968).

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

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

Pada penelitian ini perlakuan dilakukan pada umur kebuntingan 7 hari (tahap pembentukan neural tube); dan 15 hari merupakan awal perkembangan cerebellum, sehingga merupakan masa kritis untuk kelainan cerebellum.

2.4. Perkembangan otak

2.4.1. Perkembangan *neural ectoderm*

Hasil proses gastrulasi pada embrio mamalia menghasilkan tiga lapisan tubuh yaitu ektoderm, mesoderm dan endoderm. Ektoderm berdiferensiasi menjadi *skin ectoderm* dan *neural ectoderm*. Selanjutnya *neural ectoderm* akan berdiferensiasi menjadi sistem saraf. melalui pembentukan *neural tube*. *Neural tube* berkembang dari

hasil induksi chorda mesoderm terhadap *neural ectoderm*, sehingga terbentuk tabung yang disebut *neural tube*.

Pembentukan *neural tube* terjadi pada saat terbentuknya *somite mesoderm* ke-4. Penutupan *neural tube* terjadi pada bagian tengah embrio kemudian berjalan kearah anterior dan posterior. Penutupan *neural tube* pada bagian anterior tidak bersamaan dengan bagian posterior, sehingga terbentuk rongga yang disebut *anterior neuropore* dan posterior neuropore. Penutupan kedua neuropore ini juga tidak bersamaan. Pada mencit *neuropore anterior* menutup pada satu jam pertama umur kebuntingan 9 hari (tingkat 18 *somite*), sedang *neuropore posterior* menutup pada 12 jam pertama hari kebuntingan ke-9 (tingkat 24 *somite*) (Rugh, 1968).

2.4.2. Proses proliferasi sel saraf

Perkembangan otak ditandai dengan terjadinya proliferasi, migrasi, penempatan sel dan laminasi sel saraf (Curran *et al.*, 1998). Pada awalnya otak tersusun dari ventrikel yang lebar (*neural tube*) yang dikelilingi oleh lapisan sel-sel yang aktif berproliferasi, disebut *neuroepithelium*. Perkembangan otak umumnya diawali di bagian dorsal dari *neural tube*, sebagai akibat dari proliferasi sel *neuroepithelium* yang mengelilingi ventrikel. Perkembangan dari *neural tube* adalah terbentuknya *vesicula telencephalic* (Bayer *et al.*, 1993). Pelebaran *vesicula telencephalic* menghasilkan sepasang ventrikel lateral (ventrikel I dan II) dan selanjutnya mengalami proses evaginasi ke arah vertikal membentuk ventrikel III yang dikelilingi oleh *diencephalon*. Pada bagian atas *diencephalon* dapat dijumpai *thalamus*, sedang di bagian bawahnya terdapat *hypothalamus* (Bayer *et al.*, 1993).

Neuroepithelium terus aktif berproliferasi dan menjadi berlapis sel yang selanjutnya menjadi korteks cerebral (Bayer *et al.*, 1993), sehingga sel-sel yang

mendominasi korteks cerebral adalah *cortical neuroepithelium*. Lapisan korteks cerebral tersusun dari dua lapisan yaitu *intermediate zone* dan *cortical plate*. *Intermediate zone* terdiri dari sel-sel saraf muda sebagai hasil proliferasi dari sel *neuroepithelium* dan *cortical plate*. Lapisan tersebut merupakan lapisan tipis sel-sel saraf korteks muda di bawah membran pial. Pada bagian tersebut tampak terjadi pertumbuhan *choroid plexus* di dalam ventrikel lateral.



2.4.3. Proses migrasi dan penempatan sel saraf

Pada perkembangan otak hewan mamalia terjadi migrasi sel dan penempatan yang benar dari sekitar 100 milyar sel saraf, yang masing-masing membuat ribuan hubungan satu dengan yang lain (Curran *et al.*, 1998). Dalam proses pembentukan dan perkembangan otak, diperlukan rangkaian interaksi sel-sel yang sering melibatkan migrasi dan reorganisasi sel pada waktu dan tempat yang tepat. Jenis sel tertentu bermigrasi dari satu sisi tempat asal ke tempat tujuan akhir dengan jarak yang relatif jauh. Proses ini sering melibatkan beberapa jenis *cell adhesion molecule* (CAM), seperti neurofilamen, neural cell adhesion molecule (NCAM), fibronectin, tenascin dan reelin. (Darmanto *et al.*, 2000).

Gangguan migrasi sel dan atau penempatan telah diketahui berkaitan dengan kerusakan atau tidak normalnya sistem saraf, contohnya terjadi displasia korteks cerebral yang sering menimbulkan epilepsi bawaan dan ketidaknormalan susunan sel saraf korteks yang menimbulkan *schizophrenia* (Mischel *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 1996). Arah migrasi neuron yang abnormal menyebabkan *malpositioning* sel saraf korteks dan menampakkan kelainan berupa menurunnya fungsi kognitif dan retardasi mental (Darmanto *et al.*, 1999).

2.4.4. Proses perkembangan cerebellum

Cerebellum merupakan bagian otak yang berperan sebagai pengatur keseimbangan pada tubuh, keterampilan gerak dan tingkah laku. Perkembangan cerebellum mencit dimulai sekitar umur kebuntingan 13 hari (Rugh, 1968). Perkembangan terbesar cerebellum terjadi saat minggu pertama setelah kelahiran. Hal ini sesuai dengan fungsi cerebellum sebagai bagian dari susunan saraf pusat seperti yang telah disebutkan diatas.

Perkembangan dan pertumbuhan cerebellum diawali dengan munculnya calon sel granulosa dan selanjutnya bermitosis untuk memperbanyak diri. Calon sel granulosa berproliferasi dari lapisan terluar korteks cerebellum untuk membentuk *external granular layer* (EGL) (Hatten *et al.*, 1993, Darmanto *et al.*, 2000).

Migrasi sel granulosa dipandu oleh *glial fiber* dari sel Bergmann melintasi calon *molecular layer* (Rakic *et al.*, 1981). Ada dua jenis sel glial di dalam cerebellum, yang pertama yaitu *radial glial*, merupakan bentukan fiber memanjang dari bagian *ventricular zone* menuju daerah *pial surface* (lapisan terluar cerebellum) (Shiga, 1983). *Radial glial* ini diduga dibentuk oleh sel astroglia muda, yang bergerak dari daerah ventrikuler menuju daerah korteks, sehingga *radial glial* atau disebut juga *radial fiber* memanjang sepanjang perjalanan astroglia (Ono *et al.*, 1989). Pada hewan dewasa sel astroglia ini berkembang menjadi sel astrosit yang terletak di daerah *white matter*. Jenis fiber yang kedua adalah *Bergmann fiber* atau *glial fiber*, memanjang hanya di daerah korteks cerebellum atau tepatnya di daerah *external granular layer* yang dalam perkembangannya menjadi daerah *molecular layer*. Fiber sel Bergmann berasal dari proses diferensiasi dari *radial glial fiber* yang juga merupakan sel astrosit yang terletak di bagian *intermediate zone*, dan bermigrasi berlawanan arah dari sel

granulosa, selanjutnya menempati posisi tepat dibawah lapisan sel Purkinje (Choi *et al.*, 1980).

Glial fiber berperan penting dalam proses migrasi sel granulosa muda dari *external granular layer* menuju bagian *internal granular layer* (IGL). Gangguan struktur *glial fiber* dan *radial fiber* pada masa kritis embrio tikus telah dilaporkan menyebabkan stratifikasi sel saraf di bagian korteks cerebral tidak beraturan, meliputi susunan sel Purkinje, sel Bergmann dan sel granulosa (Darmanto *et al.*, 1998; Darmanto *et al.*, 2000).

Dalam proses pertumbuhan dan perkembangan cerebellum, sel Purkinje lahir dari bagian *neuroepithelium* dari *rhombic lip* (calon cerebellum). Sel Purkinje muda bermigrasi dari *ventricular zone* menuju ke bagian korteks dan dipandu oleh *radial glial fiber* (Goffinet *et al.*, 1984). Berbagai protein ekstraseluler seperti CAM (*Cell Adhesion Molecule*) terlibat dalam migrasi sel Purkinje, terutama dalam *contact guidance* antara sel Purkinje dengan *glial fiber* (Crossin *et al.*, 1990). Pada awal minggu pertama setelah lahir, sel Purkinje yang berada di daerah korteks cerebellar tersusun beberapa lapis sel. Sekitar satu minggu pertama kelahiran, sel Purkinje membentuk satu lapis sel (Altman *et al.*, 1978). Sel muda astroglia bermigrasi dari *ventricular zone* menuju ke daerah korteks tempat sel Purkinje membentuk satu lapis sel. Sel astroglia ini mempunyai *radial fiber* dan selanjutnya disebut sebagai *radial glial* (Choi *et al.*, 1980). Sel astroglia dewasa umumnya berada tepat dibawah lapisan sel Purkinje, sehingga sel ini dianggap sebagai sel muda dari sel Bergmann. Jenis CAM seperti *tenascin*, *neural cell adhesion molecule* (NCAM), *fibronectin* dan *reelin* diketahui berperan penting dalam proses migrasi, penempatan sel saraf dan perkembangan otak (Darmanto *et al.*, 1999).

2.5. Apoptosis

Apoptosis itu sendiri merupakan proses biologi yang diikuti adanya proses perubahan sel, berupa rangkaian perubahan secara morfologi yaitu: kondensasi kromatin, membran bergelembung, fragmentasi sel menjadi potongan-potongan kecil atau badan apoptotik. Tidak seperti nekrosis, apoptosis diinduksi oleh perkembangan dan rangsangan lingkungan yang dikendalikan oleh sejumlah besar gen famili bcl-2, famili caspase (ICE yang berhubungan dengan enzim protease), beberapa protooncogen dan kelompok gen penekan tumor (Yang and Korsmeyer 1996). Pada proses perkembangan kanker, diasumsikan bahwa penghambatan terhadap apoptosis diduga sebagai titik awal tidak adanya kematian sel yang akan mermunculkan sifat tumorogenik (Schultehermann *et al.*, 1996; Goldsworthy *et al.*, 1996). Mekanisme yang pasti mengenai apoptosis masih bervariasi antara peneliti satu dengan yang lainnya. Beberapa laporan menunjukkan bahwa apoptosis diikuti adanya gangguan rangkaian biokimia seperti : (1) gangguan pada asimetris fosfolipid dari membran sitoplasma, sehingga menyebabkan fosfatidilserin terdedah ke lapisan luar membran; (2) gangguan pada membran mikondria sehingga melepaskan komponen membran intermitokondria seperti sitokrom C dan *apoptosis inducing factor* (AIF); (3) aktivasi berjenjang dari endonuklease, akan menyebabkan kerusakan DNA nukleosomal dan pembelahan protein esensial seperti PARP, lamin, actin dan fodrin, yang mana protein ini sering disebut sebagai substrat kematian (Kluck *et al.*, 1997; Kroemer *et al.*, 1997). Seperti yang ditunjukkan Wyllie 1980, apoptosis ditandai dengan adanya pemutusan rantai ganda DNA inti, dan degradasi dari struktur rangkaian DNA yang merupakan tanda akhir dari proses apoptosis (Duval dan Wyllie 1986). Hal ini ada kemungkinan bahwa bahan-bahan karsinogen disekitar sel mungkin mempengaruhi masing-masing proses tersebut dan merubah suatu respon apoptosis.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Khusus Penelitian

1. Untuk mengetahui kemampuan PSK dalam mengurangi sifat embriotoksisitas 2-ME
2. Untuk mengetahui kemampuan PSK menghambat munculnya kelainan eksternal khususnya kelainan otak, kelainan anggota dan palatosis akibat induksi 2-ME pada UK 7, 9 dan 15 hari.
3. Untuk mengetahui kemampuan PSK dalam menghambat kematian sel akibat induksi 2-ME .
4. Untuk mengetahui kemampuan PSK dalam menaikkan kadar senyawa antioksidan dalam darah induk mencit setelah pemberian 2-ME

3.2. Tujuan Umum Penelitian

Mengingat makin meningkatnya insiden cacat lahir berupa kelainan anggota, rangka dan sistem syaraf pusat seperti *autisme*, *shizophrenia* dan *mental retardation*, khususnya di Indonesia, dan masih Sedikitnya peran sertanya lembaga penelitian dalam mencegah munculnya kelainan bawaan seperti kelainan sistem syaraf pusat, maka penelitian ditujukan untuk mencari model mekanisme pencegahan kerusakan sel embrional munculnya beberapa kelainan bawaan akibat bahan pencemar dengan menggunakan bahan alam hayati berupa ekstrak jamur *Coriolus versicolor* dari kelas Basidiomycetes. Dari phenomena penggunaan PSK sebagai bahan yang mampu mencegah munculnya efek teratogenik 2-ME pada perkembangan anggota, rangka dan otak, diharapkan dapat menjadi model suatu

mekanisme pencegahan munculnya cacat lahir atau kelainan perkembangan sistem syaraf pusat.

3.3. Manfaat Penelitian

Pentingnya penelitian ini menyangkup beberapa aspek, tidak hanya aspek hasil penelitian, kemajuan ilmu dan teknologi, tetapi juga salah satu usaha untuk meningkatkan proses belajar mengajar, baik untuk staf pegajar juga mahasiswa. Pelaksanaan penelitian dirancang bekerja sama dengan mahasiswa program skripsi, sehingga diharapkan mampu membantu kelancaran studi mahasiswa melalui; pemendekan masa studi, biaya skripsi dikurangi dan pemanfaatan laboratorium semaksimal mungkin.

Ditinjau dari segi keilmuan, berikut di bawah ini merupakan uraian keutamaan dari rencana penelitian ini. Hasil penelitian ditargetkan mampu meyelesaikan masalah yang timbul akibat dampak pencemaran lingkungan khususnya limbah plastik terhadap munculnya kelainan bawaan, baik kelainan eksternal pada anggota maupun kelainan internal berupa kelainan rangka, khususnya sebagai akibat kerusakan jaringan somite yang mampu menyebabkan kelainan vertebrae. Dari phenomena penggunaan PSK sebagai bahan yang mampu mencegah munculnya efek teratogenik 2-ME pada perkembangan anggota, rangka dan otak, diharapkan uasaha terhadap pencegahan munculnya kelainan perkembangan janin dapat berhasil dengan baik.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Mei tahun 2003 sampai bulan September 2003 di Laboratorium Biologi Reproduksi Jurusan Biologi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga Surabaya.

4.2. Materi Penelitian

4.2.1 Hewan coba

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) betina dara strain BALB/C yang berumur delapan minggu. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di dalam kandang berupa bak plastik dengan tutup kawat kasa beralas sekam yang ditempatkan di rumah hewan Fakultas MIPA Universitas airlangga. Setiap pagi diberi makan berupa pelet Par L dan minum secara *ad libitum*.

4.2.2. Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah (1) pakan mencit berupa pelet Par L, (2) air minum, (3) larutan 2-methoxyethanol produksi dari WAKO Pure Chemical Industries, Ltd. Jepang, (4) *aquadest steril* (5) larutan fiksatif.

4.2.3. Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah (1) kandang berupa bak plastik dengan tutup kawat kasa beralas sekam, (2) tempat pakan dan minum, (3) timbangan, (4) syringe 1 cc, (5) alat bedah dan (6) mikroskop.

4.3. Prosedur Penelitian

4.3.1 Persiapan

Mencit betina dara dan jantan yang diperoleh dari Pusat Veteriner Farma (PUSVETMA) Surabaya diaklimatisasi selama dua minggu sebelum digunakan sebagai hewan coba. Setiap pagi diberi makan berupa pelet Par L dan diberi minum secara *ad libitum*. Mencit baru dikawinkan setelah berat badannya mencapai 20 gr atau lebih.

4.3.2 Tahap mengawinkan

Mencit yang telah mencapai berat badan minimal 20 g ditempatkan dalam satu kandang dengan mencit jantan, namun dipisahkan oleh sekat. Tujuan pemisahan ini adalah untuk menginduksi masa estrus betina. Setelah dilakukan pemisahan selama tiga hari, maka sekat dibuka untuk terjadinya proses perkawinan. Bila ditemukan sumbat vagina, maka pada hari tersebut ditetapkan sebagai umur kebuntingan nol hari.

4.3.3 Cara Kerja

Larutan 2 ME yang digunakan dalam penelitian ini meliputi dosis yaitu 10 mmol/kg bb, dengan volume penyuntikan 0,1 ml/10 g berat badan. Pemberian larutan 2 ME dilakukan pada umur kebuntingan 7, 9, 15, dan 17 hari. Pemberian senyawa 2-ME dikelompokkan dalam kelompok perlakuan sebagai berikut :

Mencit betina hamil dikelompokkan menjadi enam kelompok.

Kelompok I: Mencit disuntik 2-ME secara intraperitoneal saat umur kehamilan ke 7 hari (untuk memunculkan kelainan otak), 9 hari (untuk memunculkan kelainan anggota dan rangka) dan 15 hari (untuk memunculkan kelainan otak) pada pukul 10 AM dengan dosis 7,5 mmol/kg BB, dan 11 mmol/kg

BB, sesuai dengan penelitian sebelumnya mampu memunculkan kelainan anggota dan rangka (Darmanto 1998). Mencit dikorbankan pada umur kehamilan ke 18 (sehari sebelum lahir) dan diamati kondisi embrio, kematian, persentase kelainannya baik eksternal maupun internal.

Kelompok II: Mencit setelah diperlakukan seperti kelompok I, dibunuh pada selang waktu 12 jam dan 24 jam setelah penyuntikan 2-ME, untuk dibuat sayatan dan diamati jumlah kematian sel pada jaringan embrional calon otak secara konvensional dengan hematoxilin eosin.

Kelompok III: Mencit setelah diperlakukan seperti kelompok I, selang waktu satu jam berikutnya, mencit tersebut disuntik PSK secara gavage dengan dosis 150 mg/kg bb. Selanjutnya mencit dikorbankan pada umur kehamilan 18 untuk diamati persentase kelainan yang muncul, seperti pada kelompok I.

Kelompok IV: Mencit diperlakukan seperti pada kelompok III, hanya dibunuh pada selang waktu 12 jam dan 24 jam setelah penyuntikan PSK, selanjutnya dibuat sayatan dan diamati jumlah kematian sel pada jaringan embrional calon otak secara konvensional dengan hematoxilin eosin seperti kelompok II.

Kelompok V: Kelompok kontrol, mencit diperlakukan seperti kelompok I, hanya saja disuntik dengan larutan pelarut aquadest.

Kelompok VI: Kelompok kontrol untuk kondisi jaringan embrional, mencit diperlakukan seperti kelompok V, tetapi embrio di ambil pada selang waktu 12 jam dan 24 jam, selanjutnya diamati seperti kelompok IV.

Kelompok VII: Kelompok mencit disuntik 2-ME dan satu jam berikutnya disuntik PSK, seperti kelompok III, selanjutnya 12 jam setelah penyuntikan PSK diukur kadar anti oksidan dalam darah mencit dengan metode immunoflourescence.

4.4 Pengukuran Kadar Antioksidan

4.4.1. Analisis kemampuan PSK (krestin) sebagai antioksidan secara in vitro

Menentukan IC_{50} aktivitas anti radikal bebas Scavenger dengan membuat larutan senyawa PSK (krestin) murni dalam berbagai konsentrasi yaitu 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 1000 ppm, 10000 ppm yang kemudian ditambahkan pereaksi DPPH 0,004% dalam pelarut methanol (Jojeux, 1995, *dalam* Mahmiah, 2003).

Larutan DPPH sebanyak 3,9 ml ditambahkan methanol 0,1 ml dicatat absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Beckman pada panjang gelombang 497 nm, 517 nm dan 537 nm (sebagai larutan standar). PSK (krestin) dengan berbagai konsentrasi juga ditentukan absorbansinya.

Observasi aktivitas anti radikal bebas senyawa terhadap pereaksi DPPH dapat dihitung absorbansinya sebagai berikut:

$$\text{Absorbansi hitung } \lambda_{517 \text{ nm}} = A_{517 \text{ nm}} - \frac{A_{497} + A_{537}}{2}$$

2

Perhitungan kapasitas anti radikal bebas sebagai prosen peredaman absorban menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ peredaman DPPH} = 1 - \left[\frac{\text{Absorban hitung bahan uji}}{\text{Absorban hitung DPPH (standar)}} \right] \times 100\%$$

Analisis data daya hambat IC_{50} (inhibitor concentration 50%) ditentukan berdasarkan analisis regresi linier % peredaman DPPH terhadap konsentrasi senyawa.

Jika $IC_{50} < 1000$ ppm maka senyawa tersebut mempunyai aktivitas sebagai anti radikal bebas (Cos, 1998, *dalam* Mahmiah, 2003).

B A B V

HASIL PENGAMATAN DAN PEMBAHASAN



5.1. Hasil Pengamatan

5.1.1. Kelainan perkembangan embrio mencit prenatal akibat induksi 2-ME

Tabel 5.1 menunjukkan adanya efek 2-ME dapat mempengaruhi kemampuan reproduksi, meliputi persentase fetus hidup, persentase kematian intra uterus, berat badan fetus dan beberapa kelainan seperti kelainan eksternal (kelainan otak berupa eksensefali) khususnya pada perlakuan 2-ME pada umur kehamilan 7 hari.. Dari data tersebut diketahui bahwa 2-ME mampu menyebabkan penurunan persentase fetus hidup, peningkatan kematian intra uterus, penurunan berat fetus dan peningkatan munculnya kelainan eksternal.

Pemberian senyawa polysaccharide krestine tidak menunjukkan adanya penghambatan terhadap efek 2-ME pada penurunan kemampuan reproduksi induk mencit pada kelompok UK 7 haari.

Tabel 5.1. Kemampuan reproduksi induk mencit setelah diberi PSK dengan dosis 150 mg/kg berat badan yang sebelumnya diinjeksi 2-ME dengan dosis 7,5 mmol/kg berat badan pada umur kebuntingan 7 hari yang diamati pada umur kebuntingan 18 hari

Perla- kuan (hari)	Dosis 2-ME (mmol/ kg bb)	Σ Induk	Implan- tasi (x)	% fetus hidup (x)	% kematian intrauterus (x)	Berat badan fetus (gram) (x $\pm$ SEM)	% kelainan ekster- nal *)
Kontrol	0	10	9,3	97,6	2,9	1,22 $\pm$ 0,05	1
2-ME	7.5	9	8,2	79,4	20,5	0,91 $\pm$ 0,05	30,3
UK7 2ME+ PSK	7,5	10	7,1	67,6	32.4	0,93	45,8

*) Kelainan eksternal yang muncul berupa : Eksensefali, hematoma, kinky, ekor rudimenter, simpodia, genital tubercle agenesis, imperforata anus, mata membuka.

Kontrol : Induk mencit hanya diberi akuabides steril.

Perlakuan 2-ME : induk mencit diberi 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb

Perlakuan 2-ME + PSK : induk mencit diberi 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb dan PSK dosis 150 mg/kg bb

Tabel 5.2. Kemampuan reproduksi induk mencit setelah diberi PSK dengan dosis 150 mg/kg berat badan yang sebelumnya diinjeksi 2-ME dengan dosis 7,5 mmol/kg berat badan pada umur kebuntingan 9 hari yang diamati pada umur kebuntingan 18 hari

Perla- kuan (hari)	Dosis 2-ME (mmol/ kg bb)	Σ Induk	Implan- tasi (x)	% fetus hidup (x)	% kematian intrauterus (x)	Berat badan fetus (gram) (x $\pm$ SEM)	% kelainan ekster- nal #)
Kontrol	0	10	9,3	97,6	2,9	1,22 $\pm$ 0,05	1
2-ME	11	7	8,6	42,1	58,5	9,03 $\pm$ 1,2	83,8
2-ME + PSK	11	9	8,25	40,2	58,7	0,89 $\pm$ 0,7	59,4*

* berbeda secara signifikan dibandingkan dengan kontrol pada α 0,05

#) Kelainan eksternal yang muncul berupa : Eksensefali, hematoma, kinky, simpodia, mata membuka.

Tabel 5.2 Menunjukkan adanya efek 2-ME pada UK 9 hari, dapat mempengaruhi kemampuan reproduksi, meliputi persentase fetus hidup, persentase kematian intra uterus, berat badan fetus dan beberapa kelainan seperti kelainan eksternal (khususnya kelainan anggota dan ekor). Dari data tersebut diketahui bahwa 2-ME mampu menyebabkan penurunan persentase fetus hidup, peningkatan kematian intra uterus, penurunan berat fetus dan peningkatan munculnya kelainan eksternal.

Pemberian senyawa polysaccharide krestine pada UK 9 hari mampu menunjukkan adanya hambatan terhadap efek 2-ME berupa penurunan persentase kelainan eksternal yang muncul, khususnya kelainan anggota dan ekor.

Tabel 5.3. Menunjukkan adanya efek 2-ME pada UK 15 hari, dapat mempengaruhi kemampuan reproduksi, meliputi persentase fetus hidup, persentase kematian intra uterus dan beberapa kelainan seperti kelainan eksternal (khususnya kelainan ceilosisis dan palatosisis). Dari data tersebut diketahui bahwa 2-ME mampu menyebabkan penurunan persentase fetus hidup, peningkatan kematian intra uterus dan peningkatan munculnya kelainan eksternal.

Pemberian senyawa polysaccharide krestine pada UK 9 hari mampu menunjukkan adanya hambatan terhadap efek 2-ME berupa penurunan persentase fetus hidup dan peningkatan kematian intrauterus.

Tabel 5.3. Kemampuan reproduksi induk mencit setelah diberi PSK dengan dosis 150 mg/kg berat badan yang sebelumnya diinjeksi 2-ME dengan dosis 11 mmol/kg berat badan pada umur kebuntingan 15 hari yang diamati pada umur kebuntingan 18 hari

Perla- kuan (hari)	Dosis 2-ME (mmol/ kg bb)	Σ Induk	Implan- tasi (x)	% fetus hidup (x)	% kematian intrauterus (x)	Berat badan fetus (gram) (x $\pm$ SEM)	% kelainan ekster- nal #)
Kontrol	0	10	9,3	97,6	2,9	1,22 $\pm$ 0,05	1
2-ME	11	9	8,7	70,6	29,3	1,0 $\pm$ 0,1	20,6
2-ME + PSK	11	6	8,6	95,6*	2,2*	1,03 $\pm$ 0,3	18,75

#) Kelainan eksternal yang muncul berupa : Hematoma, kinky, ekor rudimenter, mata membuka, Palatosisis, Ceilosisis.

Pada tabel 5.4 persentase kelainan eksternal yang spesifik sesuai dengan UK pemberian 2-ME. Pada Uk 7 nampak 30,3 % kelainan eksternal yang muncul, sekitar 12,9 % adalah kelainan exencephaly atau otak terdedah.

Tabel 5.4. Persentase kelainan eksternal dan exencephaly yang muncul akibat induksi 2-ME pada umur kehamilan ke 7 dan diamati pada umur kebuntingan 18 hari.

Perlakuan (hari)	Jumlah induk mencit	Jumlah fetus yang diamati	Dosis 2-ME (mmol/kg bb)	% Kelainan eksternal *	% Exencephaly
Kontrol	10	110	0	1	0
2-ME	9	47	7,5	30,3	12,9
2-ME + PSK	10	50	7,5	45,8	18,5

*) Kelainan eksternal yang muncul berupa : Eksensefali, hematoma, kinky, ekor rudimenter, simpodia, genital tubercle agenesis, imperforata anus, mata membuka,

Sedangkan pada UK ke 9 (tabel 5.5) hampir seluruh kelainan eksternal yang muncul tampak didominasi oleh kelainan anggota dan ekor. Dari 83,8 % kelainan eksternal yang muncul, sekitar 53,85 % nya berupa kelainan anggota dan ekor. Berdasarkan data pada table 5.5 dapat diketahui bahwa, kejadian kelainan eksternal tertinggi terjadi pada kelompok perlakuan UK 9 yaitu mencapai 83,8 persen dari fetus hidup sebanyak 23 fetus. Hal ini sesuai dengan masa perkembangan organogenesis, karena pada UK 9 merupakan masa terbentuknya kuncup anggota.

Tabel 5.6. 2-ME yang diberikan pada umur kehamilan 15 hari menginduksi kelainan langit-langit berceah (palatosis) dan bibir bercelah (ceilosisis). Tampak dari 20,6 % kelainan yang terjadi 10,3 persennya adalah palatosis dan ceilosisis. Pemberian senyawa polysaccharide krestine pada UK 15 hari, mampu menurunkan persentase insiden palatosis yang muncul akibat 2-ME.

Tabel 5.5. Persentase kelainan eksternal dan kelainan anggota maupun ekor yang muncul akibat induksi 2-ME pada umur kehamilan ke 9 dan diamati pada umur kebuntingan 18 hari.

Perlakuan (hari)	Jumlah induk mencit	Jumlah fetus yang diamati	Dosis 2-ME (mmol/kg bb)	% Kelainan eksternal	% Anggota
Kontrol	10	110	0	1	0
2-ME	9	23	11	83,8	53,85
2-ME + PSK	9	32	11	59,4	53,1

Tabel 5.6. Persentase kelainan eksternal dan kelainan palatosisis yang muncul akibat induksi 2-ME pada umur kehamilan ke 15 dan diamati pada umur kebuntingan 18 hari.

Perlakuan (hari)	Jumlah induk mencit	Jumlah fetus yang diamati	Dosis 2-ME (mmol/kg bb)	% Kelainan eksternal	% Palatosisis dan ceilosisis.
Kontrol	10	110	0	1	0
2-ME	9	61	11	20,6	10,3
2-ME + PSK	6	30	11	18,75	0

Pengamatan histologis yang dilakukan untuk mengamati adanya penipisan kortek cerebrum, yang merupakan indikasi adanya gejala mikrosefali, menunjukkan angka yang cukup tinggi yaitu sebesar 25 % pada kelompok perlakuan UK 7 hari. Selain itu juga ditemukan kelainan berupa pelebaran rongga ventrikel yang merupakan indikator gejala hidrocefalus. Persentase kejadian kelainan pelebaran rongga ventrikel tertinggi pada kelompok perlakuan UK 7 sebesar 35%. Pengamatan pada anak mencit postnatal yang dilakukan pada umur 10 hari, menunjukkan adanya kelainan pada cerebrum dan cerebellum yang cukup tinggi yaitu masing 66 % baik

pada kelompok perlakuan UK 15 hari (data tidak ditunjukkan). Kelainan cerebrum maupun cerebellum sebesar 66 %, terlihat yang diamati pada masa postnatal terlihat muncul pada perlakuan UK 15 hari.

Tabel 5.7. Persentase Insiden kelainan dinding cereberum (Cerebral kortek) dan cerebellum yang muncul akibat induksi 2-ME pada beberapa umur kehamilan dan diamati pada umur kebuntingan 18 hari.

Perla- kuan (hari)	Jumlah induk mencit	Jumlah fetus yang diamati	Dosis 2-ME (mmol/ kg bb)	% Insiden Kelainan Otak (jumlah fetus yang diamati)		% Kelainan cerebrum / Cerebellum Pada post- natal (Fetus)
				Penipisan kortek cerebrum	Pelebaran ventrikel	
Kontrol	13	110	0	0	0	0
UK 7	11	47	7,5	25(6)	35 (6)	-
UK 9	5	18	10	-	-	-
UK 15	7	51	10	-	-	66(12)

Berdasarkan data pada tabel 5.1, 5.2 dan 5.3 tersebut persentasi kejadian kelainan yang muncul cukup tinggi, sehingga peneliti ingin mencari mekanisme munculnya kelainan tersebut dengan metode “follow up study” perkembangan embrio segera setelah setelah pemberian 2-ME, yaitu mulai 12 jam, 24 jam dan 48 jam setelah pemberian 2-ME, yang merupakan efek akut dari 2-ME berupa kematian sel/ apoptosis. Data efek akut 2-ME pada embrio dapat dilihat pada tabel 5.8

Tabel 5.8 menunjukkan adanya efek akut akibat 2-ME berupa kematian sel pada jaringan embrio, khususnya pada jaringan calon otak. Kematian sel tersebut atau kemungkinan berupa apotosis terjadi pada saat 12 dan 24 jam setelah pemberian 2-ME.

Tabel 5.8. Kemampuan penghambatan PSK dalam menghambat kematian sel pada jaringan otak akibat induksi 2ME dosis 11 mol/kg BB pada umur kehamilan 9 hari.

Perlakuan	Waktu Pengamatan (Setelah ijeksi)	Jumlah induk mencit/ fetus yang diamati	Rata-rata Jumlah	
			Sel mati/sel yang diamati	Persen
Kontrol	12 jam	5/45	1,5 / 536,2	0.25±0.28 a
2-ME	12 jam	5/47	42,7 / 544,0	7,85 * b
2-ME	24 jam	5/50	86.5 / 684.4	12.76 ± 1.4 * c
2-ME + PSK	24 jam	3/20	14.65 / 590.5	2.51 ± 0.7 * d

* berbeda secara signifikan dibandingkan dengan kontrol pada α 0,05

Kematian sel teridentifikasi pada selang waktu 12 dan 24 jam setelah pemberian 2-ME. Kematian sel tersebut terlihat tinggi pada selang waktu 24 jam setelah penyuntikan 2-ME. Pemberian senyawa polysaccharide krestine pada UK 9 hari mampu menghambat kematian sel secara signifikan pada selang waktu 24 jam setelah injeksi 2-ME yaitu terjadi penurunan sekitar 5 kalinya (12.76 % dibanding 2,51 %).

Tabel 5.9 menunjukkan efek akut 2-ME berupa kematian sel juga terlihat pada jaringan calon otak cerebellum, khususnya dibagian external granular layer dari cerebellar cortex. Kematian sel tersebut teramati pada selang waktu 12 jam dan 24 jam setelah injeksi 2-ME. Kematian sel terlihat lebih tinggi pada selang pengamatan 24 jam.

Pengamatan efek akut terhadap 2-ME juga ditunjukkan pada saat 2-ME diijeksikan sehari menjelang kelahiran yaitu UK18, dimana pada UK 18 adalah masa pertumbuhan cerebellum yang paling pesat diharapkan sangat sensitive terhadap bahan toksik. Hasil pengamatan menunjukkan 2-ME mampu menginduksi kematian

sel pada selang waktu pengamatan 12 jam setelah injeksi sebesar 4 % dan pada selang waktu 24 jam sebesar 11,5 %.

Tabel 5.9 Rata-Rata Persentase Kematian Sel Calon Cerebellar *Cortex* (cerebellum) Fetus Mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi 2-ME dosis 15 mmol/kg BB, pada UK 15 hari diamati pada selang waktu 12 dan 24 jam setelah injeksi 2-ME.

	Perlakuan	Pengamatan Setelah 2-ME	Jumlah induk / jumlah fetus	Rata-rata	
				Sel Mati	%
K1	Kontrol	Uk15+12 jam	5 / 41	11,1 / 819	0,005
P1	2-ME	Uk15+12 jam	5 / 42	64,2/665,9	0,03*
K2	kontrol	Uk15+24 jam	5 / 41	11,1 / 819	0,005
P2	2-ME	Uk15+24 jam	5 / 39	81,8/893,2	0,013*

Tabel 5.10. Rata-Rata Persentase Kematian Sel Calon Cerebellar *Cortex* (cerebellum) Fetus Mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi 2-ME dosis 18 mmol/kg BB, pada UK 18 hari daiamati pada selang waktu 12 dan 24 jam setelah injeksi 2-ME.

	perlakuan	Pengamatan Setelah Injeksi 2-ME	Jumlah Induk/ umlah fetus	Rata-rata	
				Sel Mati/Total sel	Persen
K1	Kontrol	Uk18+12 jam	35	0,55 /176,3	0,29
P1	2-ME	Uk18+12 jam	31	6,4 / 155,9	4,00*
K2	kontrol	Uk18+24 jam	36	0,9 / 181,6	0,48
P2	2-ME	Uk18+24 jam	34	9,5 / 74,7	11,5*

Dari hasil pengamatan keseluruhan terhadap efek akut 2-ME terhadap kematian sel baik pada Uk 9, UK 15 maupun UK 18, semua menunjukkan persentase

kematian sel yang tinggi pada selang waktu 24 jam setelah injeksi 2-ME, dari pada selang 12 jam setelah injeksi.

Pertanyaan yang muncul adalah apakah efek akut dari 2-ME, hanya menginduksi kematian sel atau menginduksi adanya kerusakan atau penghambatan sintesis protein tertentu yang dapat menghambat perkembangan normal embrio, khususnya perkembangan otak. Sehingga pengamatan berikutnya adalah untuk mengetahui ekspresi protein tertentu yaitu yang merupakan protein yang berperan dalam perkembangan inervasi pada embrio. Pada penelitian ini kami juga telah mencoba pengamatan terhadap ekspresi neurofilamen yang terdapat pada embrio UK 12 hari yang telah diperlakukan dengan 2-ME pada umur 9 hari.

Telah dibuktikan bahwa kegagalan ekspresi neurofilamen mengakibatkan kegagalan perkembangan embrio, yang diduga sebagai akibat gangguan migrasi sel neuron saat perkembangan embrio.

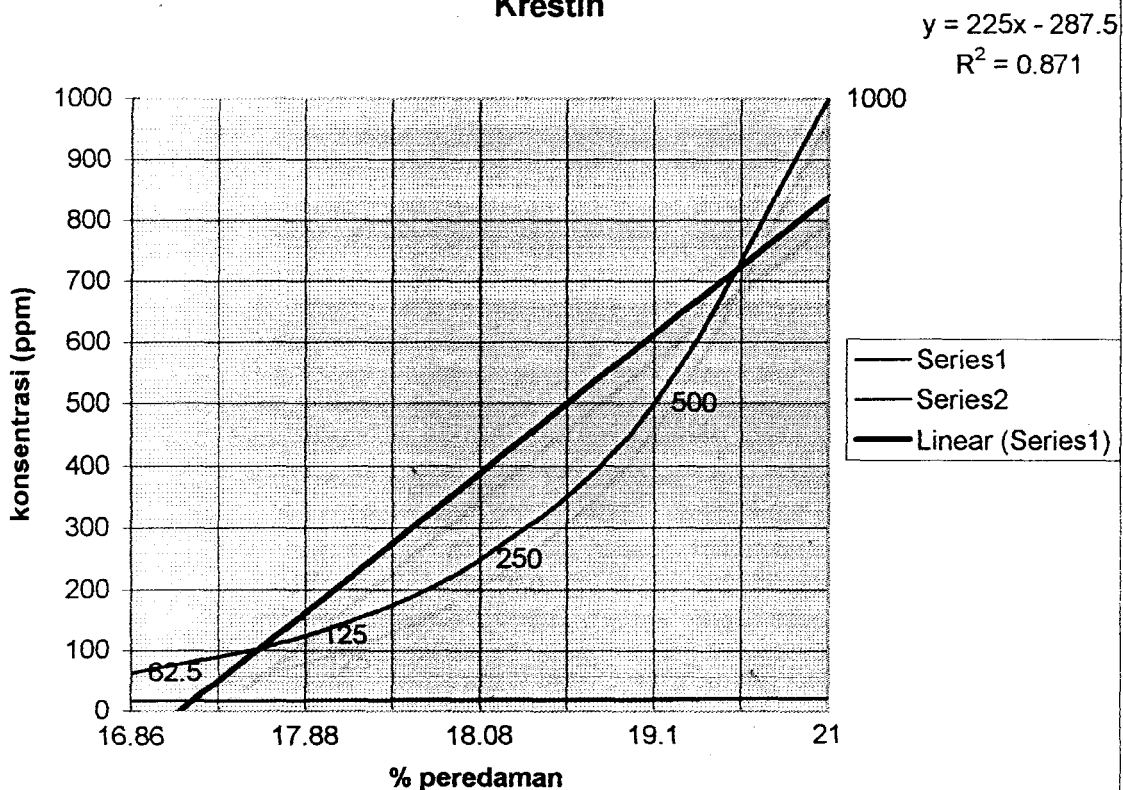
Pengamatan histologi secara konvensional dengan pewarnaan hematoxilin eosin pada kelainan eksensefali, menunjukkan bahwa kedua ventrikel lateral (ventrikel I dan II) masih terbentuk, walaupun cranium tidak terbentuk, namun ventrikel ke III membuka menghadap keluar, seperti terlihat pada gambar 5.1.

Dengan adanya kematian sel atau apoptosis, berarti diharapkan akan terdeteksi adanya proses kerusakan jaringan embrio dan proses pemulihannya. Ketidak sempurnaan proses pemulihan kerusakan jaringan ini akan memunculkan suatu kelainan, atau menyebabkan penurunan ekspresi protein tertentu yang juga akan menyebabkan munculnya kelainan, baik kelainan eksternal maupun internal dalam hal ini kelainan otak atau rangka.

Pengamatan secara *in vitro* terhadap kadar antioksidan dalam senyawa polysaccharide krestine dalam meredam senyawa DPPH sebagai senyawa radikal bebas dapat dilihat pada gambar berikut dibawah (Gambar. 5.1).

Ekstrak jamur *Cariolus versicolour* yang mengandung Polysachharide krestine mempunyai kandungan antioksidan yang sangat rendah bila dibandingkan dengan antioksidan standart DPPH (gambar 5.1).

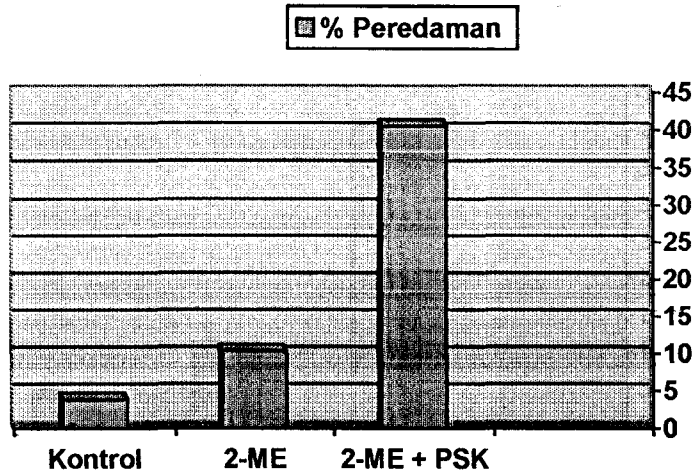
Grafik % peredaman DPPH oleh senyawa Polisaccharide Krestin



Gambar 5.1. Kemampuan (kadar) antioksidan larutan PSK terhadap peredaman terhadap radikal bebas DPPH secara *in vitro* yang diamati dengan metode flourencense dengan pemabanding larutan standart DPPH.

Tabel 5.11: Persen peredaman DPPH secara *in vivo* oleh PSK dalam darah mencit kontrol dan darah mencit yang sebelumnya diinjeksi 2-ME.

Konsentrasi Darah (ppm)	Rerata % Peredaman PSK Terhadap Radikal Bebas DPPH		
	Kontrol	2-ME (11 mmol/kg B)	2-ME (11 mmol/kg BB) dan PSK (150 mg/kg BB)
10.000	7,505	9,69	36,97
5.000	2,89	13,17	36,53
2.500	2,52	8,23	35,42
1.250	2,17	8,76	36,58
625	4,66	12,04	51,38
312.5	3,33	10,67	46,3
Rata-rata	3,85	10,67*	40,53*



Gambar 5.2: Persen peredaman PSK dibandingkan dengan 2-ME terhadap radiakal bebas DPPH secara *in vivo* pada darah mencit.

Pengamatan secara *in vivo* terhadap kadar antioksidan PSK yang diukur melalui kemampuan peredaman PSK terhadap DPPH (radikal bebas) dalam tubuh mencit, dibandingkan dengan antara mencit kontrol dengan mencit yang diinjeksi 2-

ME sebelumnya dapat dilihat pada tabel 5.11. Pemberian PSK secara gavage mampu meningkatkan kadar antioksidan dalam darah induk mencit yang diukur melalui kemampuan peredaman terhadap oksidant DPPH, bila dibandingkan dengan kontrol dan induk mencit yang hanya diberi 2-ME.

4.2. Pembahasan

Pemberian 2-ME pada mencit umur kehamilan tertentu dapat menyebabkan kelainan eksternal maupun internal. Pada penelitian ini terutama terlihat pada kelompok perlakuan UK 7 hari. Hal ini menunjukkan bahwa 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb bersifat teratogenik pada mencit. Sebelumnya 2-ME dan derivatnya seperti MAA juga telah diketahui bersifat teratogenik khususnya menyebabkan kelainan pada anggota, tulang vertebrae dan rusuk (Horton *et al.*, 1985; Morrissey *et al.*, 1989; Darmanto *et al.*, 1994a; Darmanto 1998; Feuston *et al.*, 1990) dan bersifat embriotoksik baik pada masa organogenesis maupun pada embrio praimplantasi (Darmanto *et al.*, 1994b, Darmanto *et al.*, 1994c).

Kelainan perkembangan otak berupa penipisan korteks cerebrum dan atau pelebaran ventrikel lateral telah diamati pada kelompok perlakuan baik pada kelompok UK 7, UK 9 dan UK 15 hari. Pengamatan pada kelainan perkembangan otak ini ditujukan untuk mengetahui efek 2-ME pada jenis kelainan mikrosefalus (otak mengecil) yang ditandai dengan penipisan dari korteks cerebrum dan kelainan hidrosefalus ditandai dengan pembesaran hidrosefalus. Selain tanda tersebut hidrosefalus juga ditandai dengan pelebaran ventrikel diikuti pembesaran kepala atau cerebrum akibat pengumpulan cairan otak yang abnormal di dalam ventrikel yang sering disebut dengan hidrofelus internus. Bentuk kelainan hidrosefalus lainnya adalah penimbunan cairan otak diantara otak dan duramater (hidrosefalus eksternus)

(Moore, 1974). Pada penelitian hidrocefalus yang terjadi adalah hidrocefalus internus pada bagian cerebrum dan diensefalon. Penelitian sebelumnya dengan menggunakan derivat 2-ME yaitu MAA yang diberikan pada mencit A/J juga telah diketahui menyebabkan kelainan hidrocefalus (Darmanto *et al.*, 1994a). Kelainan hidrocefalus umumnya disebabkan oleh penyumbatan aquaeductus sylvii, sehingga akan menghalangi cairan otak dalam ventrikel lateral dan ventrikel III mengalir ke ventrikel ke IV atau subarachnoidea (Aolad *et al.*, 2000a). Namun pada penelitian kami sebelumnya dengan menggunakan mencit Slc-ICR yang diradiasi dengan sinar X pada UK7.5 hari, hidrocefalus yang terjadi lebih disebabkan oleh penurunan kemampuan sel untuk berproliferasi di bagian ependymal pada saat perkembangan otak dan akibat gangguan perkembangan choroid plexus pada ventrikel (Aolad *et al.*, 2000a). Choroid plexus merupakan jaringan yang terdapat dalam ventrikel yang berperan dalam mengatur proses sekresi dan resorpsi cerebrospinal fluid (cairan otak) (Aolad *et al.*, 2000a). Mikrocefalus (otak kecil) pada penelitian ini dideteksi dengan adanya penipisan korteks cerebrum, diduga disebabkan oleh adanya hambatan migrasi sel neuron di bagian cerebrum sehingga menyebabkan salah posisi sel neuron berupa “ectopic gray matter”, dan ditandai dengan ketidak normalan dari “radial glial cell” yang berfungsi sebagai pemandu migrasi sel neuron. Mekanisme kelainan mikrocefalus ini pernah dilakukan penelitian pada mencit yang diradiasi sinar-X (Sun *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1997).

Selain mikrocefalus dan hidrocefalus yang lain yang cukup menonjol adalah eksensefali. Kelainan eksensefali dicirikan dengan adanya otak yang terdedah, cranium tidak terbentuk, yang merupakan akibat dari tidak menutupnya neural tube saat masa pembentukan neural tube. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa 2-ME mampu membuka kembali neural tube yang telah menutup. Sehingga ada dua

kemungkinan penyebab eksensefali akibat induksi 2-ME ini. Pertama 2-ME mampu menyebabkan neural tube rusak atau membuka kembali, hal ini dapat dinyakinkan karena masa pemberian 2-ME terjadi pada waktu neural tube telah menutup.

Kerusakan pembuluh darah otak pada mencit yang diinduksi 2-ME, merupakan faktor yang mendukung adanya munculnya kegagalan perkembangan normal dari otak, melalui penghambatan suplai makanan atau oksigen ke jaringan calon otak.

Harapan dari hasil penelitian ini selain mengetahui mekanisme munculnya kelainan otak, juga membuktikan bahwa Polysaccharide krestine (PSK), mampu mencegah kerusakan jaringan otak akibat 2-ME, yaitu kita gunakan sebagai bahan antiteratogenik, melalui mekanisme mencegah apoptosis.

Pengamatan terhadap kemampuan PSK mampu mengurangi persentase kelainan yang muncul, berupa penurunan persentase kelainan eksternal hanya terjadi pada UK 9 hari. Namun pada UK 15 terlihat PSK mampu meningkatkan persentase fetus hidup dan penurunan persentase kematian intrauterus.

Bagaimana PSK menghambat munculnya kelainan yang muncul, mekanismenya dapat diterangkan melalui kemampuan PSK dalam menghambat kematian sel akibat induksi 2-ME. Terbukti PSK mampu menghambat kematian sel pada semua kelompok umur perlakuan yaitu mulai UK 9, UK15 dan UK18. Penghambatan tersebut jelas terlihat pada selang waktu 24 jam setelah injeksi 2-ME.

Kemampuan PSK menghambat apoptosis, sebelumnya juga telah dibuktikan oleh Kagohashi et al., 2000. PSK mampu menunda proses apoptosis akibat Radiasi sinar. Apakah kemampuan PSK menghambat munculnya kelainan seperti pada UK 9 atau penurunan persentase kematian intra uterus melalui kandungan antioksidan ?. Pada tabel 5.11 dan gambar 5.2 dapat dilihat bahwa PSK mampu yang disuntikkan

dalam tubuh mencit mampu berperan sebagai antioksidant dalam darah sehingga mampu menetralkan radikal bebas yang dihasilkan oleh DPPH, bila dibanding dengan darah tanpa PSK. Kemampuan peredaman PS tersebut sangat berbeda secara signifikan bila tanpa PSK, sehingga dapat disimpulkan kemampuan PSK menurunkan efek toksik dan teratogenik dari 2-ME sebagai kerja antioksidant PSK yang mampu mengurangi sifat toksik dari 2-ME.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. PSK mampu menurunkan persentase kematian embrio intrauterus mencit khususnya pada perlakuan UK 13 hari.
2. PSK mampu menurunkan insiden kelainan eksternal secara khususnya pada perlakuan UK 9 hari dan kelainan palatosisis pada perlakuan UK 15, namun tidak untuk kelainan otak dan anggota.
3. PSK mampu menurunkan angka kematian sel pada jaringan calon otak khususnya pada perlakuan UK 9 hari.
4. PSK mampu menaikkan kadar oksidant darah mencit yang diukur dengan kemampuan peredaman oksidant terhadap senyawa radikal bebas DPPH.

5.2 Saran :

1. Untuk memastikan peran PSK dalam menghambat kematian sel akibat induksi 2-ME perlu diukur oksidant dalam jaringan embrio setelah pemberian 2-ME atau pemberian PSK.
2. Perlunya diukur adanya perubahan sifat terhadap imunokompeten sel pada tubuh induk yang diberi 2-ME maupun 2-ME dan PSK.



DAFTAR PUSTAKA

- Altman J and Shirley A Bayer. 1978. Prenatal development of the cerebellar system in the rat I. cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum. *J Comp Neur*; 179: 23-48.
- Aolad HMD, Inouye M, Darmanto W, Hayasaka S, Murata Y. 2000a. Hydrocephalus in mice following X-irradiation at early gestational stage: Possible due to persistent deceleration of cell proliferation. *J Radiat Res*; 41: 213-226.
- Aolad HMD, Inouye M, Hayasaka S, Darmanto W, Murata Y. 2000b. Effects of PSK, a biological response modifier, on X-ray-induced congenital hydrocephalus in mice. *Cong. Anom*; 40:204-205.
- Brown NA, Holt B, Webb M. 1984. The teratogenicity of methoxyacetic acid in the rats. *Toxicol Lett*. 22: 93-100.
- Choi BH, and LW Lapham. Evolution of Bergmann glia in developing human fetal cerebellum: A Golgi, electron microscopic and immunofluorescent study. *Brain Res* 1980; 190: 369-383.
- Colborn T, Vom SF, Soto AM. 993. Developmental effects of chemicals in wildlife and humans. *Environmen Health Perspect*, 101: 378-384.
- Crossin KL, Prieto AL, Hoffman S, Jones FS, Friedlander DR. 1990. Expression of adhesion molecules and the establishment of boundaries during embryonic and neural development. *Exp Neurol*; 109: 6-18.
- Curran, T. and D'Acangelo, G. 1998. Role of Reelin in the control of brain development. *Brain Res Rev*. 26: 285-294.
- Colborn T, Vom SF, Soto AM. 1993. Developmental effects of chemicals in wildlife and humans. *Environmen Health Perspect*, 101: 378-384.

exposure to X-irradiation: Decreased Reelin level is possible cause. *J Neuropathol Exp Neurol*; 59: 245-256.

Darmanto W, Inouye M, Hayasaka S, Takagishi Y, Aolad HM, Murata Y. 1998. Dose response relationship of disturbed migration of Purkinje cells in the cerebellum due to X-irradiation. *Environ Med*; 42: 46-50.

Darmanto W, Hayasaka S, Takagishi Y, Aolad HM, Inouye M. 1997. Sensitivity difference between anterior and posterior lobes of rat cerebellum to prenatal exposure to 2.5 Gy X-irradiation: A histological study. *Environ Med*; 41: 93-96.

Darmanto W, Sudarwati S and Sutasurya LA. 1994a. Effects of methoxyacetic acid on prenatal development of mice. *Environ Med*; 38: 25-28.

Darmanto W, Kabir N, Inouye M, Takagishi Y, Yamamura H. 1994b. Effects of 2-methoxyethanol and methoxyacetic acid on preimplantation mouse embryos in vivo. *Environ Med*; 38: 29-32.

Darmanto W, Kabir N, Inouye M, Takagishi Y and Yamamura H. 1994c. Effects of 2-methoxyethanol and methoxyacetic acid on preimplantation mouse embryos in vitro. *Environ Med*; 38: 33-36.

Darmanto W, Inouye M, Hayasaka S, Takagishi Y, Ogawa M, Mikoshiba K and Y Murata. 1998. Disturbed Purkinje cells migration due to reduced expression of Reelin by X-irradiation in developing rat cerebellum. *Biological Science in Space*; 12; 255-245.

Darmanto W. 1998. Efek 2-Methoxyethanol terhadap pembentukan somite dan kelainan rangka aksial pada mencit. *Proceeding Temu Ilmiah VII. Hiroshima Japan*: 19-22.

Dugard, P.H., Walker, M., Mawdsley, S.J. and Scott, R.C. 1984. Absorption of some glycol ethers through human skin in vitro. *Environ. Health. Perspect.*, 57: 193-197.

- Japan Environment Agency. 1998. Strategic Programs on Environmental Endocrine Disruptors'98. *Japan Environment Agency*, Tokyo.
- Jasin, M. 1984. *Sistematik Hewan (Invertebrata dan Vertebrata)*, Sinar Jaya, Surabaya.
- Kagohashi Y, Naora H, Otani H. 2002. PSK, a biological response modifier, modifier p53 expression, mitosis and apoptosis in X-ray irradiated mouse embryos: Possible cellular mechanism of the anti-teratogenic effect. *Congenital Anomalies* 42; 15-20
- Ketti KT, Donald BS, Stedman BB, Welch F. 1996. Effects of 2-methoxyethanol on mouse neurulation. *Teratology*; 54: 219-229.
- Kluck R.M., Bossy W., Green E., Newmeyer D.R., 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 275: 1132-1136.
- Kobayashi H, Matsunaga K, Oguchi Yoshiharu. Antimetastatic Effects of PSK (Krestin), a Protein-bound Polysaccharide Obtained from Basidiomycetes: An Overview. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1995;4: 275-281.
- Krasavage WJ, Katz GV. 1985. Developmental toxicity of ethylene glycol monopropyl ether in the rats. *Teratology*; 32: 93-102.
- Kroemer G., Zamzami N., Susin M.A., 1997. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today*. 18: 44-51.
- Ku WW, Wine RN, Chae BY, Ghanayem BI and Chapin RE. 1995. Spermatocyte toxicity of 2-methoxyethanol (2-ME) in rats and guinea pigs: evidence for the induction of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol*: 134: 100-110.
- Kurishita A. 1990. Suppressive Effects of Two Bioresponse Modifiers, Krestin and Levamisole, on 5-Azacytidine-Induced Digital Defects in Rats. *Teratogenesis, Carcinogen Mutagens*: 10: 409-415.

- Duval E. and Wyllie A.H., 1986. Death and cell. *Immunology Today*. 7: 115-119.
- Ema M. (2000) Reproductive and developmental toxicity of triphenyltin chloride in rats. *Cong. Anom.* 40: 8-13. Review.
- Ema M, Miyawaki E, Kawashima K (1999c) Suppression of uterine decidualization as a cause of implantation failure induce by triphenyltin chloride in rats. *Arch Toxicol*, 73: 175-179.
- Feuston MH, Kerstetter SL, and Wilson PD. 1990. Teratogenicity of 2-methoxyethanol applied as a single dermal dose to rats. *Fundam Appl Toxicol*; 15: 448-456.
- Goldsworthy T.L., Conolly R.B., Franssonsteen R., 1996. Apoptosis and cancer risk assesment. *Mutation Research: Reviews in Genetic Toxicology*. 365: 71-90.
- Goffinet AM, K-F So, M Yamamoto, M Edwards, VS Caviness,Jr. 1984. Architectonic and hodological organization of the cerebellum in reeler mutant mice. *Dev brain Res*; 16: 263-276.
- Gotoh H, Nomura T, Nakajima H, Hasegawa C, Saka moto Y. 1988. Inhibiting effects of nicotinamide on urethane-induced malformations and tumors in mice. *Mutat. Res*, 199 : 55 – 63.
- Greene JA, Sleet RB, Morgan KT, Welch F. 1987. Cytotoxic effects of ethylene glycol monomethyl ether in the fore limb bud of the mouse embryo. *Teratology*; 36: 23-34.
- Hatten ME. 1993. The role of migration in central nervous system neuronal development. *Neurobiology*; 3: 38-44.
- Hutchison JB . 1997. Gender-specific steroid metabolism in neuro differentiation. *Cell Mol. Neurbiol.* 17: 603-625.

- Matsui H, Setogawa T, Naora H, Tanaka O. 1995. The effects of PSK, a biological response modifier, on congenital ocular abnormalities induced by X-ray irradiation. *Histol Histopathol*, 10: 47 – 54.
- Miller, R.R., Carreon, R.E., Young J.T. and McKenna, M.J. 1982. Toxicity of methoxyacetic acid in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 2: 158-60.
- Mischel P.S., Nguyen L.P., dan Vinters H.V. Cerebral cortical dysplasia associated with pediatric epilepsy. Review of Neuropathologic features and proposal for a Grading System. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1995; 54: 137-153.
- Moslen MT, Kaphalia L, Balasubramanian H, Yin YM, Au WW. 1995. Species differences in testicular and hepatic biotransformation of 2-methoxyethanol. *Toxicology*; 96: 217-224
- Ono K, Yanagihara K, Mizukawa S, Yuasa K, Kawamura K. Monoclonal antibody that binds to both the prenatal and postnatal astroglia in rodent cerebellum. *Dev Brain Res* 1989; 50: 154-159.
- Rakic P., 1981, Neuron-glia interaction during brain development, *Trends Neurosci* 4: 184-187.
- Ross ME. Cell division and the nervous system: regulating the cycle from neural differentiation to death. *Trends Neurosci* 1996; 19: 62- 67.
- Rugh R. 1967. *The mouse: Its reproduction and development*, 1st ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company.
- Scott WJ, Fradkin R, Wittfoht W et al. 1989. Teratologic potential of 2-methoxyethanol and transplacental distribution of its metabolite, 2-methoxyacetic acid, in non-human primates. *Teratology*; 39: 363-73.
- Sigh AR, Lawrence WH, Austin J. 1972. Teratogenicity of phthalate esters in rats. *J Pharmacuet Sci.* 61: 51.

- Schultehermann R., Bursch W., Graslkraupp B., Torok L., Ellinger A., Mullauer L., 1996. Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis. *Toxicology Letter*. 82: 143-148.
- Scott AR, Fradkin R, Wittfoht W, Nau H. 1987. Teratologic potential of 2-methoxyethanol and transplacental distribution of its metabolite, 2-methoxyacetic acid, in non-human primates. *Teratology*; 39: 363-373.
- Singh, A.R., Lawrence, W.H. and Austin, J. 1972. Teratogenecity of phthalate esters in rats. *J. Pharmaceut. Sci.*, 61: 51-55.
- Sun X-Z, M Inouye, Y Takagishi, S Hayasaka, and H Yamamura. 1996. Follow-up study on histogenesis of microcephaly associated with ectopic gray matter induced by prenatal γ -irradiation in the mouse. *J Neuropathol Exp Neur*; 55: 357-365.
- Sun X-Z, Inouye M, Fukui Y, Hisano S, Sawada K, Muramatsu H, Muramatsu T. 1997. An Immunohistochemical Study of Radial Glial Cells in the Mouse Brain Prenatally Exposed to γ -irradiation. *J Neuropathol Exp Neurol*; 56: 1339-1348.
- Tsukagoshi, S., Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H., Nomoto, K., Orita, K., 1984, *Krestin (PSK)*, *Cancer Treatment Reviews* 11, p. 131-155
- Wine RN, Ku WW, Li LH, Chapin RE. 1997. Cyclophilin a is present in rat germ cells and is associated with spermatocyte apoptosis. *Biol reproduct*; 56: 439-446.
- Wyllie A.H., 1987. Apoptosis: Cell death in tissue regulation. *J Pathol*. 153: 313-316.
- Yang, M. M. P., Chen, Z., Kwok, J. S. L., 1992, The Antitumor Effect of A Small Polypeptide From *Coriolus versicolor* (SPCV), *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 4(3), p. 275-281

- Yang, Q., 1993, The Comparative Analysis of The Extracts of The Mycelia And The Fruitbodies of Yun Zhi (*Coriolus versicolor*), *PSP Internastional Symposium*, p.41-55
- Yuasa S, Kawamura K, Ono K, Yamakuni T, Takahashi Y. Development and migration of Purkinjr cells in the mouse cerebellar primordium. *Anat Embryol* 1991; 184: 195-212.

Lampiran 1: Tabel Kematian Sel Neuron Akibat induksi 2-ME dan 2-ME diikuti PSK yang Diamati 24 jam Setelah Injeksi

No	Sel Mati	Total sel diamati	2-ME (% sel mati)	Kontrol Sel Mati (%)	Sel Mati 2-ME + PSK	Total Sel diamati	(% sel mati) ME+PSK
1	56	496	11.29	0	10	563	1.78
2	70	612	11.44	0.40	12	333	3.60
3	71	585	12.14	0.41	31	788	3.93
4	111	828	13.41	0	24	768	3.12
5	104	702	14.81	0.30	29	836	3.47
6	64	488	13.11	0.25	7	446	1.57
7	195	1508	12.93	0.23	18	654	2.75
8	124	1112	11.15	0.32	19	751	2.53
9	82	652	12.58	0.48	22	779	2.82
10	89	788	11.30	0	15	592	2.53
11	110	784	14.03	0.13	12	282	4.25
12	91	625	14.56	0.36	12	780	2.54
13	70	585	11.97	0	8	507	1.58
14	66	520	12.70	0.85	13	699	1.87
15	93	792	11.74	0.98	14	660	2.12
16	71	431	16.47	0	9	414	2.17
17	59	494	11.94	0	11	365	3.01
18	86	723	11.89	0	16	627	2.55
19	71	511	13.89	0.23	7	742	0.94
20	55	462	11.90	0	4	224	1.75
21							
Rata-rata	86.5 ±31.3	684.4	12.762 ±1.4	0.25±0.28	14.65 ±7.1	590.5±	2.51±0.79