

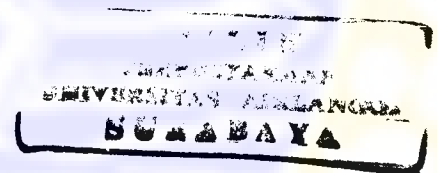
- CELL 12.1.14
- POLYSAFADLN Perpustakaan Universitas Airlangga
- 11.11.14 - 11.11.14

**EFEK 2-METOKSIETANOL TERHADAP KEMATIAN SEL  
/APOPTOSIS OTAK FETUS MENCIT (*Mus musculus*)  
DAN USAHA PENGHAMBATANNYA DENGAN  
POLISAKARIDA KRESTIN ;DIDETEKSI  
SECARA IMUNOHISTOKIMIA**

**SKRIPSI**

MPB 56/05

Hid  
e



**AMALIYAH NURUL HIDAYAH**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2005**

## LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

**Judul** : EFEK 2-METOKSIETANOL TERHADAP KEMATIAN SEL/  
APOPTOSIS OTAK FETUS MENCIT (*Mus musculus*) DAN USAHA  
PENGHAMBATANNYA DENGAN POLISAKARIDA KRESTIN;  
DIDETEKSI SECARA IMUNOHISTOKIMIA

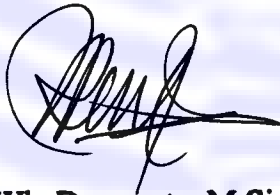
**Penyusun** : Amaliyah Nurul Hidayah

**Nomor Induk** : 080112397

**Tanggal Ujian** : 15 Agustus 2005

Disetujui oleh :

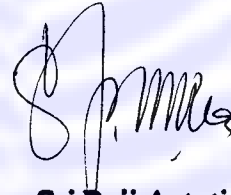
Pembimbing I,



Drs. Win Darmanto, M.Si., Ph.D.

NIP. 131 653 741

Pembimbing II,



Dra. Sri Puji Astuti W, M.Si.

NIP. 131 999 645

Mengetahui :

**Ketua Jurusan Biologi  
FMIPA Universitas Airlangga**



Dra. Rosmanida, M.Kes.

NIP. 131 126 075

## KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillah kepada Allah Subhanallahu Wata'ala, atas segala Rahmat dan HidayahNya sehingga penyusun dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Efek 2-Metoksietanol Terhadap Kematian Sel Otak /Apoptosis Otak Fetus Mencit (*Mus Musculus*) dan Usaha Penghambatannya Dengan Polisakarida Krestin ;Dideteksi Secara Imunohistokimia”**.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains Bidang Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam di Universitas Airlangga, Surabaya.

Selama proses penyusunan skripsi penyusun mendapat banyak kesulitan dan hambatan, namun berkat ridho Allah dan bantuan dari berbagai pihak kesulitan-kesulitan itu dapat diatasi.

Penyusun menyadari bahwa penyusunan naskah skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu dibutuhkan saran dan kritik dari pembaca. Penyusun berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat dan wawasan yang berguna. Amin.

Surabaya, Agustus 2005

Penyusun,

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penyusunan skripsi ini tidak akan terwujud tanpa adanya bimbingan, bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini penyusun menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Drs. Win Darmanto, M.Si, Ph.D selaku dosen pembimbing I atas wawasan, pengetahuan, kesabaran, nasehat, dan waktu selama membimbing penulis sehingga penulis bisa menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
2. Ibu Dra. Sri Puji Astuti W, M.Si., selaku dosen pembimbing II atas pengetahuan, kesabaran dan waktu untuk penulis sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
3. Bapak Sugiharto, S.Si., M.Si, selaku penguji III. Terimakasih atas saran-saran yang telah diberikan kepada penulis.
4. Bapak Dr. Sucipto Hariyanto, DEA., selaku penguji IV. Terimakasih atas saran-saran dan waktu yang disediakan kepada penulis.
5. Drs. Moch. Affandi, M.Si., selaku dosen wali. Terima kasih atas nasehat, wawasan dan semangat-semangat yang telah diberikan selama menjadi dosen waliku, akan selalu kuingat.
6. Bapak dan ibu dosen Jurusan Biologi yang telah mendidik dengan tulus dan ikhlas.
7. Seluruh karyawan Jurusan Biologi atas dukungan dan kerjasamanya.
8. Bapak, Ibu, Adik dan keluarga besarku yang selalu mendukung keinginanku dan selalu menyayangiku, terima kasih atas segalanya.

9. Ratih (Ate) yang membuat hidupku semakin hidup. Bersamamu aku menjadi semakin kuat.
10. Anik dan Heni yang selalu setia dan sabar menjalani persabatan kita. Suka dan dukaku takkan terlalui tanpa kalian, terima kasih atas kebahagiaan dan kesedihan yang kalian bagi bersamaku.
11. Irfan, Muslimin dan Ical, atas saran dan kritik-kritiknya selama ini.
12. Ayu', Azizatur, Hepi', Amel, Sulis, Andin, Desi, Momon, Anita B, Dini, Eka, Nabil, Mila, Enno, Ais, Yasmin, Echi, Erni, Anikhu, Tika, Yuli, Nori' dan Neo Fuji. Empat tahunku terlewati dengan indah bersama kalian.
13. Kakak-Sahabat yang setia mendengarkan curhatku dan tak hentinya menasehatiku, Mas Samsi, terimakasih atas kasih sayang dan perhatiannya selama ini sehingga aku bisa terus bersemangat.
14. Teman-teman seperjuangan : Ana, Kokom, Diah A., Rinna, Kuri, Jemi, dan Indri, tetaplah bersemangat dan jangan menyerah sampai akhir hayat kita.
15. Teman-temanku Datalee dan Datalinkers Sutorejo 21A.
16. Teman-teman Sutorejo 21A (Wee, Ye, Po, dan Ria)

Semoga segala bantuan dan kasih sayang yang telah diberikan mendapatkan pahala dari Allah SWT. Amin

Amaliyah Nurul Hidayah, 2005, **Efek 2-Metoksietanol terhadap Kematian Sel /Apoptosis Otak Fetus Mencit (*Mus musculus*) dan Usaha Penghambatannya dengan Polisakarida Krestin; Dideteksi dengan Metode Imunohistokimia**, Skripsi ini dibawah Bimbingan Drs. Win Darmanto, M.Si, Ph.D dan Dra. Sri Puji Astuti W, M.Si., Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga Surabaya

---

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menunjukkan pengaruh 2-metoksietanol (2-ME) dosis 11 mmol/kg bb terhadap kematian pada sel otak mencit prenatal 15 hari dan peranan polisakarida krestin (PSK) dosis 150 mg/kg bb sebagai penghambat kematian sel otak yang disebabkan oleh 2-ME.

Pada penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah induk mencit betina yang bunting (UK) 15 hari yang dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan perlakuan. Kelompok kontrol negatif adalah kelompok yang diberi aquabides steril secara intraperitoneal, kelompok kontrol positif diberi 2-ME dosis 11 mmol/kg bb, dan kelompok perlakuan diberi PSK dosis 150 mg/kg bb secara *gavage* 2 jam setelah pemberian 2-ME. Induk mencit dibedah pada 24 jam dan 48 jam setelah pemberian 2-ME dan otak fetus diambil. Preparat ada yang diwarnai dengan metode pewarnaan hematoksilin-eosin untuk dihitung jumlah sel otak yang mengalami kematian dan imunohistokimia untuk mendeteksi kematian sel otak secara apoptosis. Data yang berupa kematian sel otak dianalisis dengan uji ANAVA satu arah. Selanjutnya jika ada beda nyata pada setiap kelompok dilanjutkan dengan uji BNT (LSD) dengan  $\alpha = 0,05$ . Sedangkan pengamatan sel otak yang mengalami apoptosis dianalisis secara deskriptif.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa persentase kematian sel otak pada selang waktu 24 jam pada kelompok kontrol positif (2-ME) yaitu 27,65% dan tampak berbeda secara signifikan dengan kontrol negatif (akuades) yaitu sebesar 2,92%, pada kelompok perlakuan dengan PSK menunjukkan bahwa PSK mampu menurunkan rerata kematian sel otak yaitu mencapai 4,67% dan tampak tidak berbeda secara signifikan dengan kontrol negatif. Pengamatan pada selang waktu 48 jam juga menunjukkan peningkatan kematian sel otak pada kelompok kontrol positif (2-ME) yaitu 51,40%, hasil ini berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol negatif (akuades) yaitu 2,89%. Rerata persentase kematian sel otak kelompok perlakuan (PSK) adalah 10,04% dan berbeda secara signifikan dengan kontrol positif pada selang waktu 48 jam.

Sehingga dapat disimpulkan bahwa 2-ME dosis 11 mmol/kg bb dapat menyebabkan kematian sel otak dan PSK dosis 150 mg/kg bb mampu menghambat kematian sel otak akibat 2-ME. Kematian sel otak akibat 2-ME secara dominan bukan melalui jalur apoptosis

Kata kunci: 2-metoksietanol, apoptosis, imunohistokimia, kematian sel otak, dan polisakarida krestin.

*Amaliyah Nurul Hidayah, 2005, The Effect of 2-Methoxyethanol in The Mice (Mus musculus) Brain Cell Death/Apoptosis and The Inhibitor Effects of Polisaccharide Krestin : Detection by Immunohistochemistry, This Thesis is Guided by Drs. Win Darmanto, M.Si, Ph.D and Dra. Sri Puji Astuti W, M.Si, Department of Biology, Mathematics and Natural Science Faculty, Airlangga University, Surabaya*

---

### ABSTRACT

*This experiment was aimed to show the effect of 2-methoxyethanol (2-ME) dose 11 mmol/kg body weight in the mice brain cell death at gestation day (g.d) 15 days and to know the potency of polysaccharide krestin (PSK) dose 150 mg/kg body weight as inhibitor effects of 2-ME.*

*This experiment were used pregnant mice at gestation day (g.d) 15 days. The mice divided into 3 groups, negative control group, positive control group, and the treatment group. Negative control group was given by aquabidest steril intraperitoneally, positive control group was given 2-ME dose 11 mmol/kg body weight intraperitoneally, and treatment group was given PSK dose 150 mg/kg body weight by gavage 2 hours after the administration of 2-ME. Pregnant mice were sacrifice in 24 hours and 48 hours after the administration of 2-ME and the fetuses were collected. The brain of fetuses were observed histologically and stained with Hematoxilin-eosin. Immunohistochemistry used to identify apoptosis in fetuses brain. The result of cell death in fetuses brain was analyzed using one-way ANOVA. If there is any significance, then analyzed using LSD with  $\alpha = 0.05$ . The observation of apoptosis was analyzed descriptively.*

*The result showed that the percentage of cell death were increased at 24 hours after injection in positive control group (2-ME) i.e 27,65% and significantly difference from negative kontrol group (aquadest) i.e 2,92%, PSK caused decreased of the percentage of brain cell death untill 4,67% and was not significantly different from negative control group. The result also showed that at the 48 hours, the percentage of brain cell death in the positive control group was also increased i.e 51,40%, this result was significantly difference from negative control group (aquadest) at 2,89%. The mean of brain cell death percentages in the treatment group (PSK) was 10,04% and significantly difference from negative control group.*

*From this study shown that, 2-ME dose 11 mmol/kg body weight can induce cell death in the mice fetuses brain. PSK dose 150 mg/kg body weight can delayed the brain cell death caused by 2-ME. 2-Methoxyethanol caused cell death, however dominantly were not apoptosis.*

*Keywords: 2-methoxyethanol, apoptosis, brain cell death, imunohistochemistry, and polysaccaride krestin.*

## DAFTAR ISI

Judul	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
UCAPAN TERIMA KASIH.....	ii
ABSTRAK .....	iv
<i>ABSTRACT</i> .....	v
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Asumsi Penelitian.....	5
1.4 Hipotesis Penelitian.....	5
1.4.1 Hipotesis kerja.....	5
1.4.2 Hipotesis statistik .....	6
1.5 Tujuan Penelitian.....	6
1.6 Manfaat Penelitian.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Tinjauan 2-Metoksietanol.....	8
2.1.1 Metabolisme 2-metoksietanol .....	8
2.1.2 Toksisitas, embriotoksisitas, gonadotoksisitas, dan teratogenitas 2-metoksietanol .....	9
2.2 Tinjauan Jamur <i>Coriolus versicolor</i> .....	11
2.2.1 Klasifikasi jamur <i>Coriolus versicolor</i> .....	11
2.2.2 Deskripsi jamur <i>Coriolus versicolor</i> .....	11
2.3 Tinjauan Polisakarida krestin (PSK).....	13



2.3.1	Peranan PSK sebagai imunomodulator .....	15
2.3.2	Peranan PSK sebagai anti teratogenik dan <i>biological response modifier</i> .....	16
2.4	Kematian Sel otak .....	16
2.4.1	Apoptosis.....	16
2.4.2	Nekrosis.....	19
2.5	Tinjauan Mencit .....	21
2.5.1	Klasifikasi mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	21
2.5.2	Perkembangan normal mencit .....	21
2.5.3	Perkembangan otak mencit .....	22
2.6	Tinjauan Pewarnaan Imunohistokimia.....	24
BAB III METODE PENELITIAN.....		27
3.1	Tempat dan Waktu Penelitian .....	27
3.2	Materi Penelitian .....	27
3.2.1	Hewan percobaan .....	27
3.2.2	Bahan penelitian .....	27
3.2.3	Alat penelitian .....	28
3.3	Rancangan Penelitian .....	28
3.4	Variabel Penelitian .....	29
3.5	Prosedur Penelitian.....	29
3.5.1	Persiapan penelitian.....	29
3.5.2	Perlakuan penelitian .....	30
3.5.3	Pembuatan dan pengecatan preparat histologi .....	31
3.5.4	Pewarnaan imunohistokimia .....	31
3.5.5	Pengamatan preparat histologi .....	32
3.6	Pengumpulan Data .....	32
3.7	Analisis Data .....	33

BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	34
4.1	Hasil.....	34
4.1.1	Kematian sel otak fetus mencit .....	34
4.1.2	Deteksi kematian sel otak secara apoptosis dengan metode pewarnaan imunohistokimia.....	38
4.2	Pembahasan .....	39
4.2.1	Efek 2-ME dosis 11 mmol/kg bb terhadap kematian sel otak dan usaha penghambatannya dengan PSK dosis 150 mg/kg bb.....	39
4.2.2	Deteksi kematian sel otak secara apoptosis akibat pemberian 2-ME dosis 11 mmol/kg bb dengan menggunakan metode pewarnaan imunohistokimia .....	41
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN.....	43
	DAFTAR PUSTAKA.....	45

## DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
1	Hubungan antara toksisitas dan biotransformasi 2-ME .....	9
2	Berbagai macam warna <i>Coriolus versicolor</i> .....	12
3	Struktur dinding sel jamur yang menunjukkan ikatan $\beta$ -glukan pada dinding sel jamur .....	13
4	Struktur kimia 1,3 (1,6)- $\beta$ -glukan .....	14
5	Letak $\beta$ -(1,3)-glukan dan $\beta$ -(1,6)-glukan pada dinding sel otak .....	14
6	Proses terjadinya apoptosis di sel otak neural dan fagositosis yang dilakukan oleh makrofag.....	18
7	Proses terjadinya apoptosis atau nekrosis di dalam sel otak .....	19
8	Perbedaan antara sel yang mengalami kematian secara apoptosis dan nekrosis.....	20
9	Perkembangan cerebellum .....	24
10	Metode imunohistokimia <i>avidin biotin complex</i> .....	26
11	Histogram rata-rata persentase sel saraf yang mengalami kematian di <i>cerebral cortex</i> kelompok K (-), K(+), dan P yang dibedah 24 jam dan 48 jam setelah perlakuan .....	35
12	Kematian sel otak yang diamati pada sayatan jaringan <i>cerebral cortex</i> fetus yang dibedah 24 jam dan 48 jam setelah pemberian 2-ME. Diamati pada perbesaran 1000x.....	36
13	Jaringan sel otak yang diwarnai dengan metode imunohistokimia, untuk deteksi kematian sel otak secara apoptosis (diambil dari preparat kelompok P dan diamati pada perbesaran 1000x).....	39

**DAFTAR LAMPIRAN**

No	Judul
1	Cara pembuatan sediaan histologi otak (metode paraffin)
2	Proses pewarnaann imunohistokimia
3	Pembuatan larutan uji
4	Pembuatan PBS ( <i>phosphate buffer saline</i> )
5	Pembuatan larutan fiksatif
6	Data penghitungan kematian sel otak yang diamati 24 jam setelah pemberian 2-ME dengan menggunakan mikroskop binokuler pada perbesaran 1000x
7	Data penghitungan kematian sel otak yang diamati 48 jam setelah pemberian 2-ME dengan menggunakan mikroskop binokuler pada perbesaran 1000x
8	Data analisis menggunakan analisis varian (ANOVA) satu arah dan uji LSD ( <i>least significant different</i> ) pada kematian sel otak 24 jam setelah pemberian 2-ME pada kelompok K(-), K(+), dan P
9	Data analisis menggunakan analisis varian (ANOVA) satu arah dan uji LSD ( <i>least significant different</i> ) pada kematian sel otak 48 jam setelah pemberian 2-ME pada kelompok K(-), K(+), dan P
10	Alat penelitian
11	Bahan penelitian
12	Penyuntikan 2-ME secara intraperitoneal, pemberian PSK secara <i>gavage</i> , dan kandang mencit

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Permasalahan

2-Metoksietanol (2-ME) merupakan suatu senyawa kelompok *glycol ether* yang memiliki campuran organik volatil (VOC) dan merupakan pelarut tidak berwarna (Anonimus 5, 2004) yang mudah terbakar (Anonimus 6, 2004). Penggunaan 2-ME dalam industri cukup luas, diantaranya digunakan sebagai pelarut selulosa asetat, resin, vernis, pewarna kayu, pewarna kuku dan pembersihnya (Anonimus 5, 2004, Moslen *et al.*, 1995, dan Scott *et al.*, 1989).

2-Metoksietanol merupakan bahan toksik berdasarkan waktu paruhnya yang panjang sehingga mempengaruhi lingkungan dan diversitas biologi. 2-ME memiliki waktu paruh yang berbeda-beda di alam, di udara 2-ME mampu bereaksi dengan radikal hidroksil dengan waktu paruh 18 jam, dipermukaan air dan tanah aerobik 2-ME terbiodegradasi dengan waktu paruh 1-4 minggu (Anonimus 5, 2004). Senyawa ini juga dikategorikan sebagai polutan lingkungan perairan, khususnya sungai (Miller *et al.*, 1983). 2-ME dalam tubuh makhluk hidup darat, sebagai contoh adalah primata, diubah menjadi metabolit primer yaitu *methoxyacetic acid* (MAA) yang memiliki waktu paruh 20 jam (Scott *et al.*, 1989). Menurut Moslen *et al.* (1995), kemampuan 2-ME yang diubah menjadi MAA menyebabkan 2-ME berbahaya bagi makhluk hidup.

Potensi 2-ME sebagai bahan pencemar cukup besar untuk menginfeksi organisme. Hal ini bisa disebabkan oleh kemampuan 2-ME masuk dalam tubuh

hewan melalui sistem pernafasan, kulit, sistem pencernaan, dan sistem peredaran darah (Anonimus 5, 2004; Hanley *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1984; dan Ritter *et al.*, 1985 dalam Scott *et al.*, 1989). Penelitian Scott *et al.* (1989) pada *primata non-human* menunjukkan bahwa 2-ME merupakan toksin yang berbahaya bagi embrio yang sedang berkembang pada dosis yang relatif rendah (0,16 mmol/kg BB). MAA yang merupakan metabolit primer 2-ME jika terakumulasi pada bagian *limb bud* mampu menghasilkan kelainan anggota tubuh yang bervariasi. Hal ini bisa dihubungkan dengan distribusi sel yang mengalami kematian (Rasjad *et al.*, 1991). Li *et al.* (1997) melaporkan bahwa 2-ME mampu masuk dalam sel spermatozoa melalui mekanisme pompa ion kalsium. 2-ME akan teroksidasi bila masuk dalam sel makhluk hidup (Kim dan Smialowicz, 1997) dan membentuk radikal bebas. Terbentuknya radikal bebas dengan konsentrasi tinggi dapat membahayakan organisme (Maslachah *et al.*, 2003).

Polisakarida krestin (PSK) merupakan protein terikat polisakarida yang diperoleh dari hasil ekstraksi miselia jamur *Coriolus versicolor* (Asai *et al.*, 2000; Pang *et al.*, 2000; Toge dan Yamaguchi, 2000). Berdasarkan penelitian Aolad *et al.* (2000), PSK 200 mg/kg dan 400 mg/kg mampu berfungsi sebagai *biological response modifier*, dengan menurunkan kelainan otak fetus mencit berupa *hydrocephalus* akibat irradiasi sinar-X. Berdasarkan penelitian Lunitasari (2004), pemberian PSK dosis 200 mg/kg berat badan setelah induksi 2-ME dosis 11 mmol/kg berat badan menyebabkan peningkatan kandungan antioksidan darah. Kemampuan PSK sebagai antioksidan menyebabkan PSK dapat mencegah dan melindungi bagian sel dari kerusakan yang diakibatkan oleh oksidan (radikal

bebas) dan senyawa kimia lainnya. Penelitian Lin *et al.* (1996) melaporkan bahwa polisakarida dari *Coriolus versicolor* yang diberikan pada mencit yang limpanya telah diiradiasi sinar Gamma ternyata mampu meningkatkan pemulihan berat relatif limpa dan sintesis DNA splenosit.

Kematian sel dapat melalui dua jalur yaitu jalur apoptosis dan nekrosis. Nekrosis adalah kematian sel secara pasif, yang disebabkan oleh kondisi lingkungan ekstrim yang tidak mendukung sel (Plaetzer *et al.*, 2003). Apoptosis adalah suatu kematian sel secara aktif dan wajar terjadi pada setiap sel tubuh. Tujuan dari apoptosis adalah untuk menyeleksi suatu sel, jika sel dianggap tidak memenuhi kriteria untuk tumbuh maka sel akan mengalami apoptosis (Stewart dan Kleihues, 2003). Sel Purkinje ataupun sel granulosa yang merupakan sel penyusun otak, jika sedang aktif membelah dan bermigrasi akan menyebabkan otak sangat sensitif terhadap gangguan (Darmanto *et al.*, 2000). Penelitian Harinimiswari (2002) menunjukkan bahwa 2-ME dengan konsentrasi 10 mmol/kg berat badan yang disuntikkan pada mencit betina bunting 17 hari mampu menyebabkan kematian sel granulosa pada daerah EGL (*external granular layer*) dan IGL (*internal granular layer*) fetus mencit. Menurut Rugh (1968), umur kebuntingan 15 hari merupakan umur kebuntingan yang peka terhadap bahan toksik dan teratogenik karena pada masa ini otak mencit bagian cerebrum mengalami pertumbuhan yang sangat pesat yaitu adanya proliferasi dan migrasi sel-sel neuroblast.

Sel-sel otak yang mengalami apoptosis dideteksi menggunakan metode imunohistokimia. Fakta tersebut didasari bahwa dalam sel yang mengalami

apoptosis terjadi fragmentasi DNA. Metode imunohistokimia merupakan metode yang mampu mengenali adanya fragmen DNA dalam bahan jaringan atau sel dalam kultur. Prinsip dasar pewarnaan imunohistokimia adalah adanya reaksi antara antigen-antibodi. Fragmen DNA dianggap sebagai antigen dan dapat dikenali oleh enzim TdT (*terminal dioxynucleotidyl tranferase*) dan selanjutnya dapat diwarnai dengan *diaminobenzidine* (DAB) sehingga dapat dengan mudah diamati (Darmanto, 2002 dan Srianto, 2004).

Berdasarkan sifat-sifat toksik dari 2-ME dan kemampuan PSK sebagai *biological response modifier*, maka penelitian ini difokuskan untuk mengetahui efek 2-ME dosis 11 mmol/kg bb terhadap kematian sel *cerebral cortex* dan peranan PSK dosis 150 mg/kg berat badan sebagai penghambat kematian sel pada fetus mencit (*Mus musculus*) prenatal 15 hari. Kematian sel otak secara apoptosis akibat induksi 2-ME dideteksi menggunakan metode imunohistokimia.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian 2-ME dosis 11 mmol/kg bb secara intraperitoneal terhadap induk mencit bunting dengan umur kebuntingan (UK) 15 hari dapat memicu kematian sel *cerebral cortex* fetus mencit?
2. Apakah pemberian PSK dosis 150 mg/kg bb 2 jam setelah pemberian 2-ME dosis 11 mmol/kg bb secara *gavage* terhadap induk mencit bunting UK15 hari dapat menghambat kematian sel *cerebral cortex* fetus mencit?



3. Apakah kematian sel *cerebral cortex* fetus mencit akibat pemberian 2-ME dosis 11 mmol/kg bb secara intraperitoneal terhadap induk mencit bunting UK 15 hari dapat terjadi secara apoptosis?

### 1.3 Asumsi Penelitian

Senyawa 2-ME yang diketahui bersifat toksik diasumsikan mampu memicu kematian sel otak bagian *cerebral cortex* dan PSK yang memiliki kemampuan sebagai *biological response modifier* diasumsikan mampu menghambat kematian sel akibat induksi 2-ME pada mencit prenatal 15 hari. Kematian sel *cerebral cortex* fetus akibat pemberian 2-ME diasumsikan terjadi melalui jalur apoptosis.

### 1.4 Hipotesis Penelitian

#### 1.4.1 Hipotesis Kerja

1. Jika 2-ME bersifat toksik, maka pemberian 2-ME dosis 11 mmol/kg bb secara intraperitoneal pada induk mencit bunting UK 15 hari dapat memicu kematian sel *cerebral cortex* fetus
2. Jika PSK memiliki kemampuan sebagai *biological response modifier*, maka pemberian PSK dosis 150 mg/kg bb 2 jam setelah pemberian 2-ME dosis 11 mmol/kg bb secara *gavage* pada induk mencit bunting UK 15 hari dapat menghambat kematian sel *cerebral cortex* fetus
3. Jika 2-ME bersifat toksik dan menyebabkan kematian sel *cerebral cortex* fetus, maka pemberian 2-ME dosis 11 mmol/kg bb secara

intraperitoneal pada induk mencit bunting UK 15 hari dapat disebabkan oleh apoptosis.

#### 1.4.2 Hipotesis Statistik

Ho<sub>1</sub> : Tidak ada perbedaan persentase kematian sel *cerebral cortex* pada fetus mencit prenatal 15 hari yang terinduksi dan tidak terinduksi 2-ME dosis 11 mmol/kg berat badan.

Ha<sub>1</sub> : Ada perbedaan persentase kematian sel *cerebral cortex* pada fetus mencit prenatal 15 hari yang terinduksi dan tidak terinduksi 2-ME dosis 11 mmol/kg berat badan.

Ho<sub>2</sub> : PSK dosis 150 mg/kg bb tidak dapat menghambat kematian sel *cerebral cortex* fetus mencit prenatal 15 hari akibat induksi 2-ME dosis 11 mmol/kg bb.

Ha<sub>2</sub> : PSK dosis 150 mg/kg bb dapat menghambat kematian sel *cerebral cortex* fetus mencit prenatal 15 hari akibat induksi 2-ME dosis 11 mmol/kg bb.

#### 1.5 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui efek pemberian 2-ME dosis 11 mmol/kg bb terhadap kematian sel *cerebral cortex* fetus mencit prenatal 15 hari.
2. Untuk mengetahui kemampuan PSK dosis 150 mg/kg berat badan dalam menghambat kematian sel *cerebral cortex* akibat pemberian 2-ME pada fetus mencit prenatal 15 hari.

3. Untuk mendeteksi kematian sel secara apoptosis di *cerebral cortex* fetus mencit prenatal 15 hari akibat induksi 2-ME dosis 11 mmol/kg bb dengan metode imunohistokimia.

#### **1.6 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini secara khusus diharapkan dapat menunjukkan sifat toksik dari 2-ME sehingga dalam pemakaiannya efek samping yang ditimbulkan lebih diperhatikan, dan menunjukkan kemampuan PSK sebagai penghambat kematian sel akibat induksi 2-ME. Secara umum penelitian ini diharapkan sebagai dasar untuk eksplorasi sumber daya alam misalnya : jamur *Coriolus versicolor* dan pemanfaatan bahan-bahan alam lainnya.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

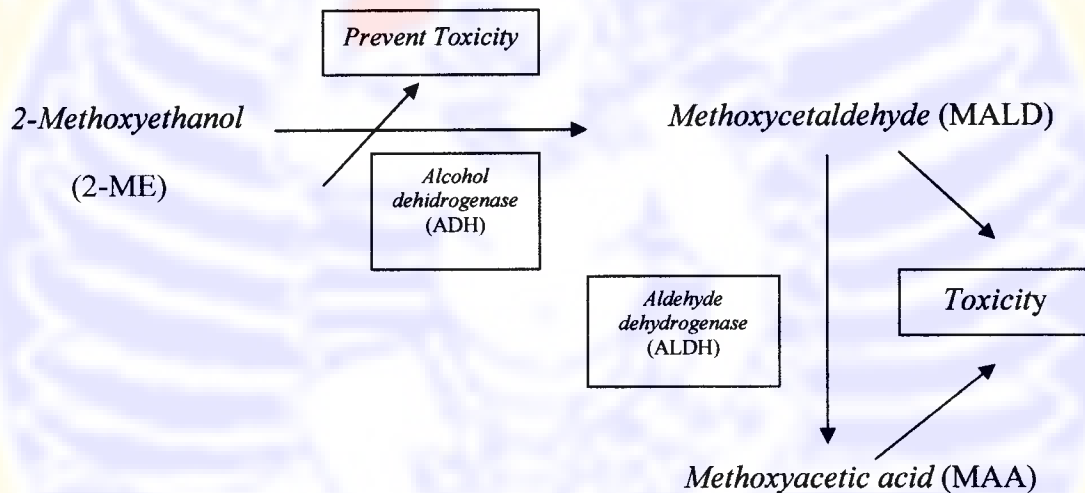
#### 2.1 Tinjauan 2-Metoksietanol (2-ME)

2-Metoksietanol merupakan metabolit hasil hidrolisis *dimethyl phtalat* atau DMEP (Ritter *et al.*, 1985). *Dimethyl phtalat* banyak digunakan dalam industri sebagai pelentur plastik (Darmanto, 1998). 2-ME memiliki beberapa sifat kimia, antara lain: pelarut organik yang tidak berwarna, mudah terlarut dalam air, mudah terbakar, dan berbentuk cair. Senyawa ini memiliki banyak nama lain, antara lain: *ethylene glycol monomethyl ether* (EGME); *methyl cellosolve*; *methyl oxitol*; *ektasolve*; *methyl glycol*; *methoxyethanol*; *methoxyhydroxyethane*; dan *methyl ethoxol*. Walaupun 2-ME memiliki banyak nama lain, tetapi semuanya memiliki sifat fisik yang sama yakni memiliki titik leleh:  $-85,1^{\circ}\text{C}$  dan titik didih:  $124,6^{\circ}\text{C}$ . Rumus kimia 2-ME adalah  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$  (Anonimus 5, 2004). 2-Metoksietanol biasa digunakan dalam industri cat, percetakan, bahan pembersih peralatan rumah tangga (Dhalluin *et al.*, 1999), pendingin bahan bakar jet, pelarut selulose asetat dan resin, pengering pakaian, vernis yang cepat kering, cat kuku dan pembersihnya, dan pewarna kayu (Anonimus 6, 2004).

##### 2.1.1 Metabolisme 2-metoksietanol.

2-Metoksietanol teroksidasi menjadi *methoxyacetic acid* (MAA) di dalam sel atau jaringan hewan (Darmanto, 1999). 2-ME dimetabolisme oleh alkohol dehidrogenase menjadi *methoxyacetaldehyde* (MALD) kemudian diubah menjadi MAA oleh *aldehyde dehydrogenase* (ADH) (Gambar 1) (Dhalluin *et al.*, 1999 dan

Miller *et al.*, 1983). MALD yang merupakan hasil oksidasi 2-ME sangat berbahaya bagi tubuh karena adanya gugus aldehid yang bereaksi lebih cepat dari pada gugus keton, dan pada akhirnya dapat menyebabkan kerusakan sel (Dhalluin *et al.*, 1999 dan Kim dan Smialowicz, 1997). *2-Methoxycetaldehyde* bersifat mutagenik terhadap *Salmonella ephimurium* strain TA97a dan juga merupakan bahan kimia potensial karsinogenik (Hotlack *et al.*, 1995 dalam Dhalluin *et al.*, 1999). Dapat dikatakan bahwa toksisitas 2-ME disebabkan oleh metabolit primernya yaitu MAA.



**Gambar 1.** Hubungan antara toksisitas dan biotransformasi 2-ME (Moslen *et al.*, 1995)

### 2.1.2 Toksisitas, embriotoksisitas, gonadotoksisitas dan teratogenitas 2-metoksietanol (2-ME)

2-Metoksietanol mampu memasuki tubuh makhluk hidup jika menghirup udara yang telah tercemari oleh 2-ME, meminum air yang telah terkontaminasi 2-ME dan bahkan bisa melewati kulit. Jika terpapar 2-ME dalam waktu yang singkat dan dosis yang rendah maka gejala yang dirasakan antara lain: iritasi pada mata, hidung dan tenggorokan dan bila terpapar 2-ME dengan dosis yang tinggi

dapat menyebabkan kepala pusing, berkunang-kunang dan bila berlangsung dalam waktu yang lama akan berakibat pada kerusakan ginjal, kerusakan sel darah, dan testis. Jika terpapar 2-ME secara berulang-ulang akan menyebabkan kepala pusing, tubuh menjadi lemah, perubahan kepribadian, dan tremor (Anonimus 5, 2004). Valentine *et al.* (1999) menunjukkan bahwa 2-ME yang diinduksikan pada tikus jantan melalui inhalasi mampu menyebabkan tingginya atrofi testis, kerusakan pada sel germinal testis, kerusakan spermatosit, sedikitnya sel leydig, oligospermi, dan dalam waktu 42 hari epitel germinal tubulus testis telah kembali menjadi normal, tetapi atrofi testis tetap dipertahankan. *Occupational Exposure Limits* (OEL) untuk penggunaan 2-ME di negara Belanda dan Amerika adalah 5 ppm atau 16 dan 19 mg/m<sup>3</sup> (De Nationale MAC, 1994 dan *American Conference of Governmental Industrial Hygienis*, 1992 dalam Kezic *et al.*, 1997).

*Methoxyacetic acid* yang merupakan metabolit 2-ME mampu menyebabkan kelainan rangka aksial dan anggota, kegagalan perkembangan dan kelainan bentuk, menghambat perkembangan embrio preimplantasi dari tahap 2-sel sampai tahap *blastocyst*. *Methoxyacetic acid* bersifat toksik dan teratogenik pada embrio mencit preimplantasi, dan bahkan diduga menyebabkan degenerasi embrio mencit preimplantasi yang diinduksi oleh apoptosis pada sel blastomer (Darmanto, 1999). Penelitian Brown *et al.* (1984) melaporkan bahwa kelainan yang ditimbulkan oleh MAA pada konsentrasi 0,1-2,5 mmol/kg yang diinjeksikan ke tikus antara lain: *skeletal anomalies*, *hydrocephalus*, dan dilatasi pelvis ginjal. Moslen *et al.* (1995) melaporkan bahwa kemampuan 2-ME untuk mengadakan

biotransformasi dengan bantuan alkohol dan aldehyd dehidrogenase mengakibatkan pelarut ini bersifat toksik.

## **2.2 Tinjauan Jamur *Coriolus versicolor***

### **2.2.1 Klasifikasi jamur *Coriolus versicolor***

Klasifikasi jamur *Coriolus versicolor* menurut Arjun dan Ramesh (1982) adalah sebagai berikut:

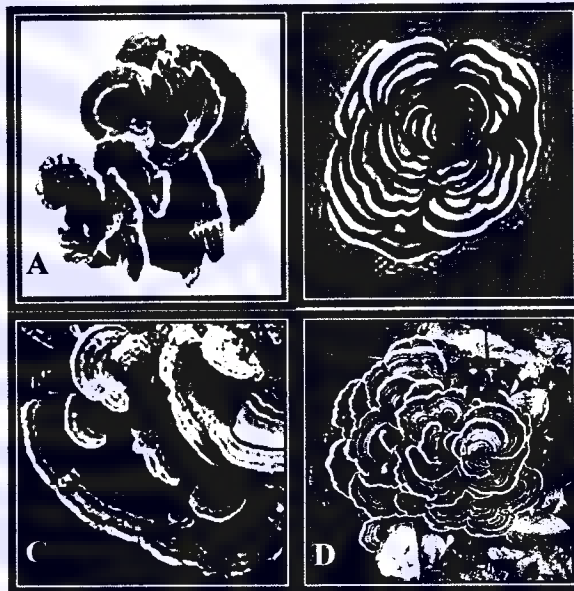
Kingdom	: Fungi
Divisio	: Basidiomycota
Classis	: Basidiomycetes
Subclassis	: Homobasidiomycetes
Ordo	: Polyporales
Familia	: Polyporaceae
Genus	: <i>Coriolus</i>
Spesies	: <i>Coriolus versicolor</i> L.

### **2.2.2 Deskripsi jamur *Coriolus versicolor***

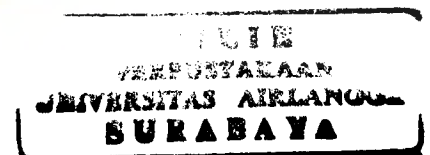
Tubuh buah berbentuk semisirkuler, seperti kipas dengan tepi yang bergelombang. Permukaan atas tubuh buahnya berbeludru dengan zona konsentris yang multi warna, yaitu coklat, kuning, abu-abu, kehijauan atau hitam. Permukaan bawah tubuh buahnya berwarna putih hingga kuning muda (Gambar 2). Panjang tubuh buahnya mencapai 10 cm dengan lebar antara 3-5 cm. Spora berukuran

4-6 x 1,5-2,5  $\mu\text{m}$  berbentuk kurva hingga silindris dengan warna hialin, putih hingga kuning pucat (Cui dan Chisti, 2003).

*Coriolus versicolor* tumbuh secara sejajar atau tumpang tindih pada berbagai macam substrat, yaitu gergajian, kaki kayu, batang dan ranting pohon. Jamur ini tumbuh pada daerah yang beriklim sedang di Asia, Eropa dan Amerika Utara. Jamur ini memiliki banyak nama lain, diantaranya: *Boletus versicolor*, *Polyporus versicolor*, *Agaricus versicolor*, *Poris versicolor*, *Trametes versicolor*, *Polysticus versicolor*, Yun-Zhi (di Cina), Kawaratake (di Jepang) dan *turkey tail* (di Amerika Utara) (Cui dan Chisti, 2003 ).



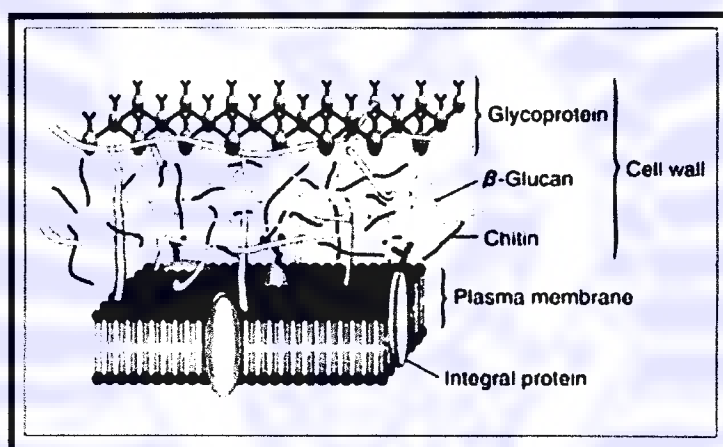
**Gambar 2.** Berbagai macam warna *Coriolus versicolor*. A. tepi berwarna kuning dengan degradasi warna coklat, B. tepi berwarna putih dengan degradasi warna hitam dan kuning , C. tepi berwarna coklat muda dengan degradasi coklat tua, D. tepi putih dengan degradasi abu-abu. (Sumber: Anonimus 4, 2004)





### 2.3 Tinjauan Polisakarida krestin (PSK)

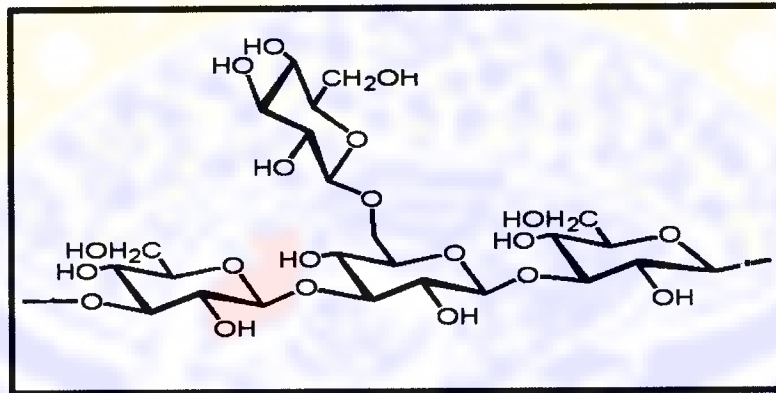
Polisakarida krestin terdapat dalam kemasan berupa serbuk berwarna coklat yang larut dalam air panas, *methanol*, *pyridine*, *chloroform*, *benzene*, *hexane*, dan memiliki kelarutan tinggi dalam air (Tsukagoshi *et al.*, 1984). PSK merupakan bahan aktif yang diperoleh dari ekstraksi jamur *Coriolus versicolor* (Pang *et al.*, 2000). Tubuh buah dari jamur ini tersusun oleh miselium yang kemudian diekstraksi (Asai *et al.*, 2000). Miselium terdiri dari sel yang memiliki dinding sel dan mengandung kitin (Gambar 3). Kitin mengandung bahan aktif yaitu polisakarida (Yang *et al.*, 1993).



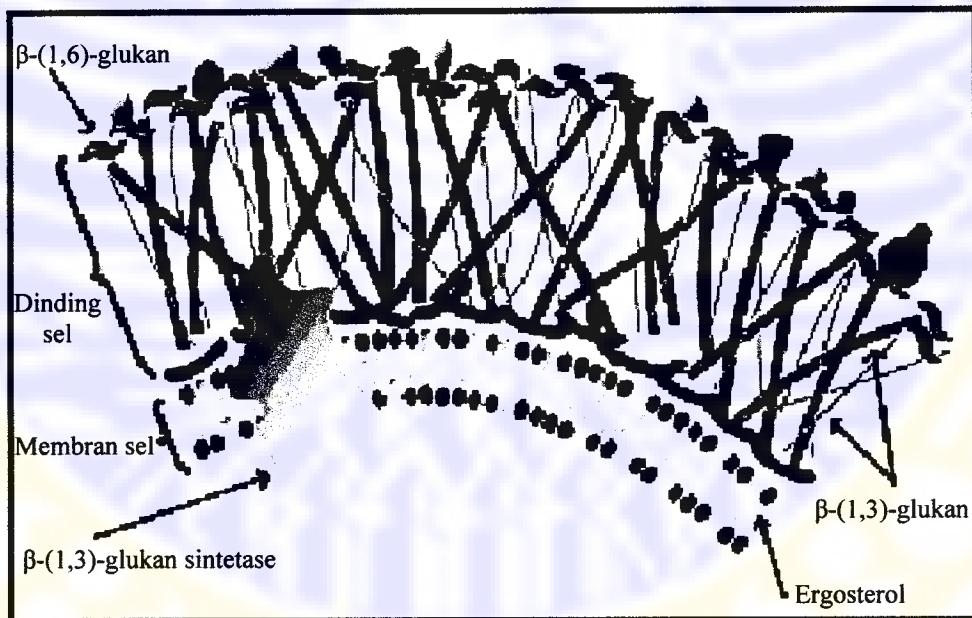
**Gambar 3.** Struktur dinding sel jamur yang menunjukkan ikatan  $\beta$ -glukan pada dinding sel jamur .  
(Sumber: Anonimus 2, 2004)

Berat molekul rata-rata PSK  $\pm$  9,4 KDa, komponen utama penyusunnya adalah glukosa dengan rantai utama  $\beta$  1-4 dan rantai samping  $\beta$  1-3 dan  $\beta$  1-6 yang terikat pada protein membran melalui rantai O- atau N-glycoside (Gambar 4 dan 5) (Tsukagoshi *et al.*, 1984). Karbohidrat penyusunnya antara lain glukosa, galaktosa, manosa, *xylosa* dan fukosa akan tetapi penyusun utamanya adalah D-glukosa dan galaktosa, selain itu juga tersusun oleh lipid, fungisterol,

ergosterol, sitosterol dan *hydroxymethylquinoline* (Tsukagoshi *et al.*, 1984 dan Steinberg., 1997). Ekstrak bubuk mengandung 34-35 % protein (Chui dan Chisti, 2003). Asam amino yang terkandung antara lain: asam aspartat, treonin, serin, asam glutamat, glisin, alanin, valin, dan leusin.



**Gambar 4.** Struktur kimia 1,3(1,6)-  $\beta$ -glukan.  
(Sumber: Anonimus 1, 2004)



**Gambar 5.** Letak  $\beta$ -(1,3)-glukan dan  $\beta$ -(1,6)-glukan pada dinding sel  
(Sumber: Anonimus 2, 2004)

### 2.3.1 Peranan PSK sebagai imunomodulator

Keunggulan PSK terletak pada kemampuannya untuk meningkatkan respon imun, misalnya digunakan pada terapi anti tumor (Pang *et al.*, 2000) ataupun pada imunoterapi kanker (Iguchi *et al.*, 2001). Kemampuan PSK untuk meningkatkan respon imun tubuh diantaranya adalah: (1) meningkatkan kerja enzim antioksidan dalam makrofag (Pang *et al.*, 2000), (2) meningkatkan daya tahan tubuh terhadap kanker lambung dengan cara meningkatkan aktivitas *Natural Killer Cell* (Kobayashi *et al.*, 1995; Pedrinaci *et al.*, 1999 dan Toge dan Yamaguchi, 2000), (3) suplemen kemoterapi dan radioterapi kanker (Cui dan Chisti, 2003), (4) pencegah infeksi mikroorganisme (Pedrinaci *et al.*, 1999).

Waktu paruh PSK dalam tubuh manusia sekitar 18 jam dan mampu menunjukkan adanya aktivasi makrofag, sel T-killer, dan stimulasi jumlah limfosit (Steinberg, 1997). Polisakarida krestin bisa digunakan sebagai *adjuvant immunochemotherapy* pada pasien yang menderita kanker payudara lebih baik jika dibandingkan dengan pengobatan yang mendapatkan kemoterapi saja (Yokoe *et al.*, 1997). Perpaduan antara terapi menggunakan PSK dan terapi menggunakan radiasi akan mempercepat kesembuhan penderita kanker karena PSK mampu meningkatkan produksi sel imun (Kidd., 2000).

### **2.3.2 Peranan PSK sebagai anti teratogenik dan *biological response modifier*.**

Kurishita (1990) mengungkap bahwa PSK mampu menghambat terjadinya kelainan jari akibat induksi 5-azacytidine. Menurut Kagohashi *et al.* (2002), PSK mampu sebagai pengubah respon biologis (*biological response modifier*) dengan menggunakan embrio tikus umur 7,5 hari yang diinduksi sinar-X sebesar 2 Gy kemudian diinjeksikan PSK dosis 200 mg/kg berat badan secara intraperitoneal. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa PSK dapat mempengaruhi mekanisme seluler dengan cara menunda waktu apoptosis dan menghambat mitosis 12 jam setelah irradiasi sinar-X, sedangkan mekanisme molekuler menunjukkan bahwa PSK mampu menunda ekspresi gen p53 pada 6 jam setelah irradiasi.

## **2.4 Kematian Sel**

### **2.4.1 Apoptosis**

Pada masa perkembangan sel mengalami 5 proses antara lain: proliferasi, migrasi, penempatan posisi, pendewasaan, dan apoptosis (Darmanto, 2002). Menurut Dhalluin *et al.* (1999) apoptosis adalah proses biologi untuk menghilangkan sel yang dianggap tidak mampu berkembang dengan baik. Menurut Krebs (1998) dan Ma'ruf (2002), apoptosis adalah kematian sel yang telah diprogram secara sistematis, yang disebut sebagai apoptosis fisiologis. Menurut Darmanto (2002), apoptosis adalah pemutusan rantai ganda DNA inti melalui degradasi dari struktur rangkaian DNA.

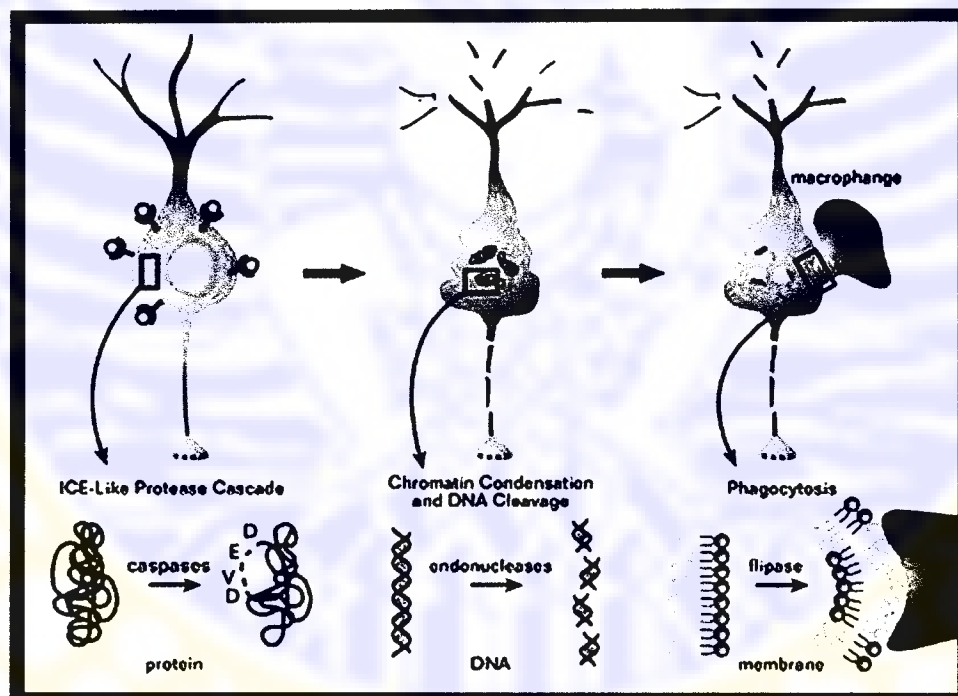
Apoptosis juga terjadi pada sistem imun dan sistem saraf (Darmanto, 2002), sel yang sudah tidak diinginkan dan karena faktor penuaan sel (Marrieb

dan Mallatt, 2001). Apoptosis dikendalikan oleh gen famili *bcl-2*, famili *caspase* dan protoonkogen (gen penekan tumor) (Darmanto, 2002). Menurut Robertson dan Orrenius (2000) dan Pollack *et al.* (2002), apoptosis disebabkan karena adanya disfungsi mitokondria yang disebabkan oleh ketidakseimbangan reaksi reduksi-oksidasi dan umur sel. Apoptosis dapat juga disebabkan oleh bahan-bahan toksik, apoptosis ini disebut sebagai apoptosis patologis.

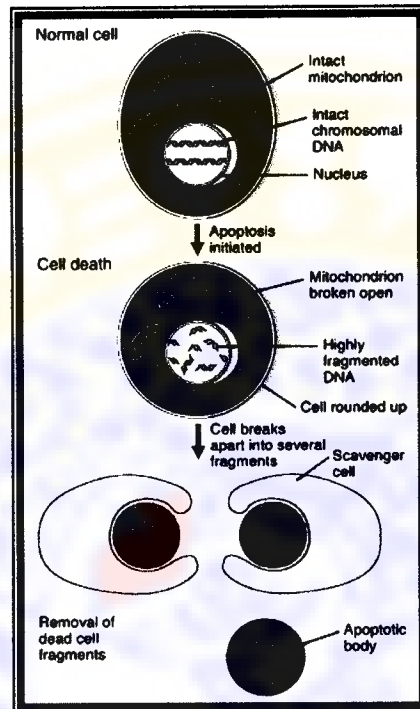
Apoptosis ditandai dengan penyusutan ukuran sel dan sel memisah dari lingkungannya walaupun semua organel tetap mempertahankan ukurannya (Krebs, 1998). Apoptosis tidak menunjukkan adanya inflamasi sel walaupun ada sekresi sitokin oleh sel fagosit, dan tidak terjadi pada nekrosis. Proses terjadinya apoptosis dalam sel antara lain: (1) terjadi kondensasi kromatin, (2) membran sel bergelembung dikarenakan adanya gangguan pada asimetris fosfolipid sehingga terjadi disfungsi *phosphatidilserine*, (3) membran mitokondria mengeluarkan komponen intermitokondria seperti *sitokrom c* dan *apoptosis inducing factor* (AIF), (4) aktivasi caspase dan endonuklease, (5) fragmentasi sel dan fraksinasi pada nukleus sehingga membentuk badan apoptotik, setelah badan apoptotik ini hilang maka keadaan jaringan akan normal kembali (Dhalluin *et al.*, 1999, Darmanto, 2002; Ma'ruf, 2002, dan). Proses terjadinya apoptosis ditunjukkan oleh Gambar 6 dan 7.

Proses apoptosis yang ditunjukkan oleh Gambar 6 dan 7 terjadi ketika sinyal ekstraseluler mengaktifasi enzim-enzim yang mengaktifasi apoptosis dan sel yang telah mati secara apoptosis dianggap sebagai benda asing kemudian difagositosis oleh makrofag (Naegele dan Lombroso, 1998).

Ada beberapa tujuan dari apoptosis antara lain : (1) untuk menyeleksi sel-sel yang mampu untuk mengadakan diferensiasi secara lengkap pada masa posnatal (Darmanto, 2002), (2) menjaga kelangsungan makhluk hidup dengan cara memusnahkan sel yang dianggap membahayakan (Ma'ruf, 2002) dan (3) pada masa embriogenesis, apoptosis bertujuan untuk menghilangkan jaringan yang tidak diinginkan (Stewart dan Kleihues, 2003). Contoh kematian sel yang bisa kita lihat langsung, antara lain: pembentukan jari tangan dan kaki pada masa diferensiasi fetus, pengelupasan endometrium dan pada Mammalia terjadi penghilangan neuron yang jumlahnya cukup banyak untuk membentuk sistem saraf (Duke *et al.*, 1996 dan Lodish *et al.*, 1995 dalam Ma'ruf, 2002).



**Gambar 6.** Proses terjadinya apoptosis di sel neural dan fagositosis yang dilakukan oleh makrofag (Naegele dan Lombroso 1998)



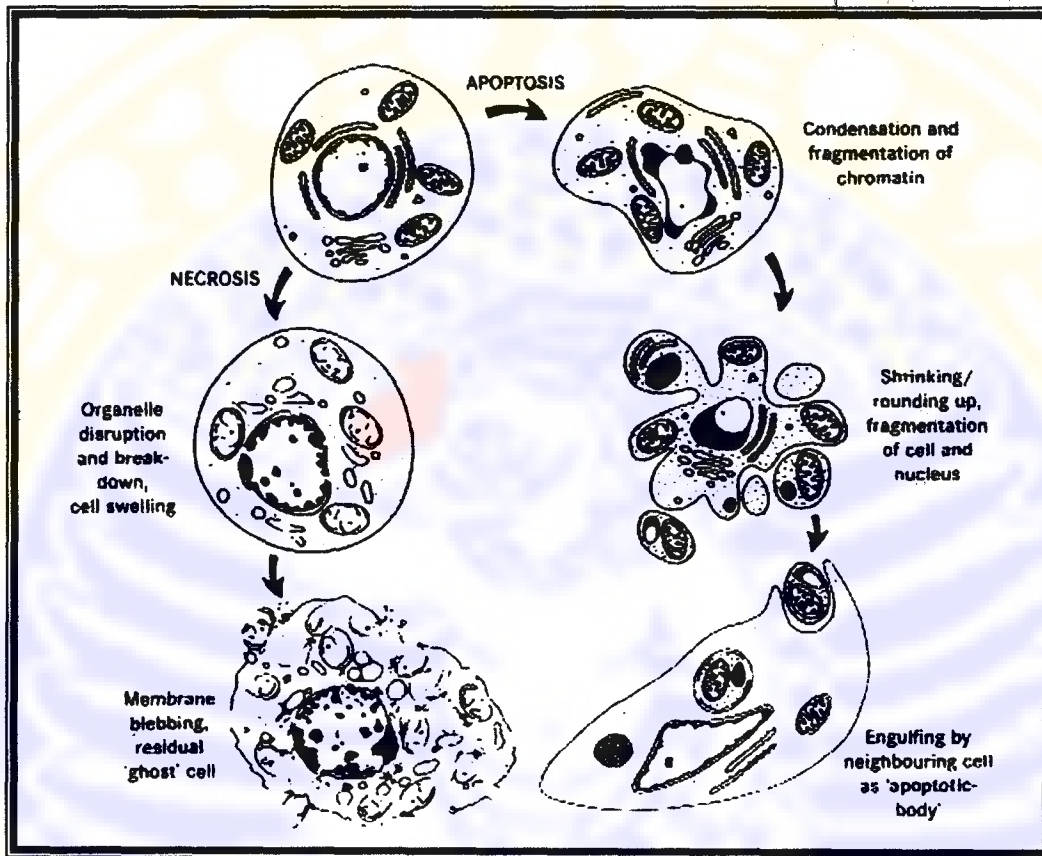
**Gambar 7.** Proses terjadinya apoptosis atau nekrosis di dalam sel  
(Sumber: Anonimus 7, 2004 )

#### 2.4.2 Nekrosis

Nekrosis merupakan kematian sel secara pasif dan bersifat *irreversible*. Kematian sel secara nekrosis dialami oleh sel yang berada dalam kondisi lingkungan eksternal yang ekstrim, diantaranya : temperatur, tekanan, osmolaritas, dan pH, dan kondisi kerusakan seluler yang ekstrim yang diinduksi oleh serangkaian proses kimiawi, diantaranya : radiasi ionisasi, inhibitor metabolik, dan bahan-bahan toksik (Plaetzer *et al.*, 2003).

Kematian sel secara nekrosis menyebabkan membran sel menjadi tidak kompak dan pecah, sel membengkak, sel mengalami asidosis, organel sel rusak, integritas membran rusak, protein mengalami koagulasi atau likuefaksi, terjadinya

Inflamasi mengakibatkan kerusakan sekunder pada jaringan normal sekitarnya (gambar 8) (Currey, 2004).



**Gambar 8.** Perbedaan antara sel yang mengalami kematian secara nekrosis dan apoptosis (Sumber: Stewart dan Klichues, 2003 )



## 2.5 Tinjauan Mencit

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

Menurut Jordan dan Verma, (1980), mencit diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Classis	: Mammalia
Subclassis	: Theria
Ordo	: Muridae
Genus	: <i>Mus</i>
Spesies	: <i>Mus musculus</i>

### 2.5.2 Perkembangan normal mencit

Perkembangan awal mencit dimulai dengan proses bertemunya sperma dan ovum di *traktus genitalia feminina* untuk mengadakan fertilisasi, kemudian dilanjutkan dengan *cleavage* menjadi 2 sel, 4 sel, 8 sel kemudian masuk tahap *morula*. Tahap *morula* menunjukkan adanya kompaksi sel dan kemudian dilanjutkan dengan tahap *blastocyst* yang ditandai dengan pembentukan *trophoblast* pada bagian luar sel dan *inner cell mass* pada bagian dalam sel. *Inner cell mass* akan membentuk embrio dan *trophoblast* akan membentuk plasenta (Marieb dan Mallatt, 2001). Embrio mencit tahap 1-2 sel terjadi pada umur kebuntingan 1 hari, tahap 2 sampai 16 sel terjadi pada umur kebuntingan (UK) 2 hari, tahap *morula* terjadi pada UK 3 hari dan tahap *blastocyst* terjadi pada UK 4

hari, *trophoblastic* dan *inner cell mass* ditemui pada UK 4,5 hari. Umur kebuntingan 17 hari perkembangan membran ekstraembrionik sudah pada tahap maksimum. Kelahiran terjadi pada umur kebuntingan 18-20 hari (Rugh, 1968).

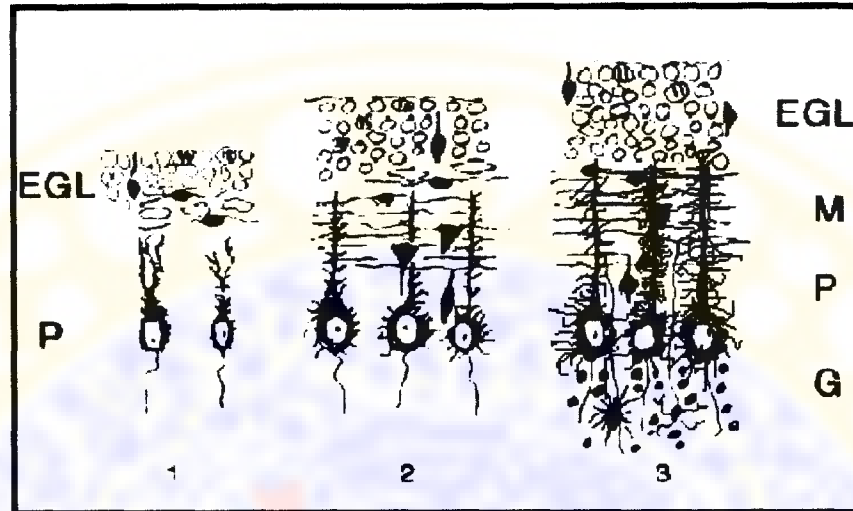
### 2.5.3 Perkembangan otak mencit

Sistem saraf pusat merupakan sistem yang pertama kali berkembang dan berdiferensiasi, tetapi selesai paling akhir jika dibandingkan dengan sistem organ lain. Neurulasi pada mencit terjadi diantara UK 7-7,5 hari. Tahap neurulasi berasal dari lapisan ekstraembrionik yakni ektoderm yang terinduksi oleh notokord yang berada pada bagian bawahnya sehingga terbentuk *neural plate*. Pada tahap selanjutnya terjadi pelipatan *neural plate* pada kedua ujungnya sehingga membentuk *neural fold*. Perkembangan lebih lanjut membentuk *neural groove* dengan bagian ujung masih membuka. Penutupan bagian ini akan membentuk *neural tube* yang pada UK 8 hari, hanya menutup sebagian dan pada UK 9 hari menutup dengan sempurna. *Neural crest* yang merupakan bagian dorso-lateral *neural tube* akan membentuk susunan saraf tepi (Yatim, 1990). *Neural crest* terjadi pada UK 8 hari dan menyebar secara ventrolateral dan cranial. Pada UK 8½ hari, terbentuk vesikel otak primer, *cranial flexure* dan terpisahnya *ganglia cranial* dari *neural tube*. Pada umur kebuntingan 9 hari, atap *rhombencephalon* mengalami penipisan dan pada UK 10 terjadi evaginasi *telencephalon*. Pada UK 11 hari terbentuk *cervical flexure*. Pada UK 12 hari *metencephalon* terbentuk. Pada UK 13-15 hari terjadi diferensiasi beberapa lapisan otak, yaitu lapisan mantel, germinal dan marginal. Pada UK 17 hari,

menunjukkan *cerebellum* mengalami penambahan ukuran tetapi belum mengalami pelipatan, penambahan ukuran terbesar terjadi pada bagian *telencephalon*. Pada UK 18 hari, topografi otak secara umum sudah lengkap, *telencephalon* terbagi menjadi dua lobi. Umur kebuntingan 19 hari, otak belum sepenuhnya selesai berdiferensiasi tetapi akan terus berdiferensiasi sampai beberapa hari setelah lahir (Rugh, 1968)

Perkembangan dan pertumbuhan cerebelum dimulai dengan munculnya sel calon granulosa, kemudian akan memperbanyak diri dengan berproliferasi dari lapisan paling luar korteks cerebelum untuk membentuk EGL (*eksternal granular layer*) (Hatten *et al.*, 1993 dalam Darmanto, 2002). Sel purkinje lahir pada bagian *neuroepithelium* dari *rhombic lip* yang merupakan calon *cerebellum*, terjadi pada umur kebuntingan 15 hari. Sel purkinje yang masih muda bermigrasi dari *ventricular zone* yang merupakan daerah di bagian ventrikel IV menuju bagian korteks cerebral dan dipandu oleh *radial glial fibers* yang dimiliki oleh sel astroglia. Pada bagian korteks cerebral, sel purkinje membentuk beberapa lapis sel dan sekitar minggu pertama setelah kelahiran sel purkinje membentuk selapis sel (Darmanto, 1998). Sel purkinje yang *immature* akan membentuk kompleks dendrit pada lapisan dibawah EGL (Wetts R dan Herrup K., 1983 dalam Darmanto *et al.*, 1998)





**Gambar 9.** Perkembangan cerebellum. Proliferasi terjadi pada *external granular layer* (EGL); migrasinya sel-sel granulose (G) dari bagian permukaan menuju *molecular layer* (M) yang sedang berkembang dan dibawah M terdapat *sel purkinje* (P) yang membentuk *internal granular layer* (IGL).  
(Sumber: Anonimus 3, 2004)

Sel purkinje ataupun sel calon granulosa yang sedang aktif membelah dan bermigrasi ini sangat sensitif terhadap gangguan. Penelitian Harinimiswari (2002) menunjukkan bahwa 2-ME mampu menyebabkan kematian sel granulosa pada daerah EGL dan IGL fetus mencit. Sejalan dengan penelitian Triana (2003) juga menunjukkan bahwa 2-ME bersifat teratogenik karena mampu menyebabkan kelainan pada otak besar.

## 2.6 Tinjauan Pewarnaan Imunohistokimia

Imunohistokimia adalah suatu metode pewarnaan untuk mendeteksi antigen dalam jaringan dengan menggunakan prinsip-prinsip dasar imunologi. Prinsip dasar imunologi adalah adanya reaksi pengikatan protein (antigen) dalam spesimen oleh imunoglobulin (antibodi) dalam larutan uji. Reaksi ini

diidentifikasi dengan adanya pengikatan antigen-antibodi yang dapat divisualisasikan, sehingga keberadaan bahan tersebut dapat dikenali dalam spesimen. Reaksi antigen-antibodi merupakan salah satu syarat yang harus dipenuhi dari metode ini. Syarat lainnya adalah antigen di dalam spesimen harus tersedia dalam jumlah cukup, sehingga dapat diikat oleh antibodi-penanda (*marker*) dan divisualisasikan. Penanda (*marker*) bisa berupa fluoresin, enzim, dan bahan partikel atau isotop. Bahan aktif bisa berupa protein, karbohidrat, asam nukleat dan lemak (Nurhidayat, 2002 dan Setijanto, 2002 dalam Srianto, 2004).

Pewarnaan imunohistokimia terhadap sel yang mengalami apoptosis didasari oleh fakta bahwa apoptosis disebabkan oleh adanya fragmentasi DNA. Bagian ujung potongan DNA menjadi substrat *enzyme Terminal deoxynucleotidyl Transferase* (TdT). Enzim TdT berkonjugasi dengan *biotynilated nucleotides* dan berikatan kovalen dengan bagian ujung DNA. *Biotynilated nucleotides* dideteksi oleh *streptavidin conjugate*. Untuk menampakkan warna, digunakan *diaminobenzidine* (DAB). DAB akan bereaksi dengan daerah dimana terjadi pemotongan DNA dan menghasilkan warna spesifik (Gambar 8) (Darmanto, 2002).

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Reproduksi, Laboratorium Mikroteknik, Rumah Mencit, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Surabaya pada bulan Agustus 2004- Juni 2005.

#### **3.2 Materi Penelitian**

##### **3.2.1 Hewan percobaan**

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit betina (*Mus musculus*) strain BALB/C umur 8-9 minggu yang belum pernah kawin, dengan berat 20-30 gram. Mencit jantan dan betina diperoleh dari Laboratorium Pemeliharaan Hewan Percobaan, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya. Mencit betina dan mencit jantan dipelihara secara terpisah di kandang.

##### **3.2.2 Bahan penelitian**

Bahan yang diperlukan antara lain : pakan mencit berupa pelet "Poor 594", air minum mencit berupa air ledeng yang diberikan secara terus menerus dan tidak dibatasi (*ad libitum*), sekam, aquades steril, larutan 2-ME (dari *Wako Pure Chemical Industries*, Japan) dan PSK (dari PT. Sankyo, Japan), sedangkan larutan fikasatif otak fetus adalah PFA (*paraformaldehyde*) 4%. Bahan kimia yang

dibutuhkan untuk pembuatan preparat jaringan otak adalah alkohol (70%, 80%, 90%, 96% atau absolut), *xylol*, parafin larutan hematoksin–eosin dan bahan-bahan untuk pewarnaan immunohistokimia: *proteinase K*, *phosphate buffer saline* (PBS) 1X, dH<sub>2</sub>O, *konjugat anti-digosigenin*, *substrat peroksidase: diamino benzidine* (DAB), dan *methyl green*.

### 3.2.3 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang mencit berupa bak plastik dengan tutup dari kawat kasa dan diletakkan di rumah mencit, tempat makanan dan minuman mencit yang terbuat dari kawat kasa, timbangan, alat bedah (*dissecting set*), mikroskop, spuit (*disposable syringe*) untuk suntik 2-ME secara intraperitoneal, spuit (*disposable syringe*) yang ujungnya telah dimodifikasi dan digunakan untuk pemberian PSK secara *gavage*, seperangkat peralatan mikroteknik untuk pembuatan preparat jaringan otak, peralatan untuk pewarnaan immunohistokimia dan alat dokumentasi.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (Nasir, 1999) dengan sampel adalah fetus mencit (*Mus musculus*) yang diambil pada umur kebuntingan 15 hari untuk kemudian diambil otaknya dan dihitung jumlah sel otak yang mengalami kematian dan kemudian dengan menggunakan metode immunohistokimia untuk mendeteksi apoptosis, pembagian kelompok adalah sebagai berikut:

- K (-) :kelompok tanpa pemberian 2-ME ataupun PSK, dan digantikan oleh pemberian akuabidestilata steril secara intraperitoneal pada umur kebuntingan 15 hari dan dibedah pada 24 jam dan 48 jam kemudian.
- K (+) :kelompok dengan pemberian 2-ME dosis 11 mmol/kg berat badan (0,1 ml/10 g berat badan) secara intraperitoneal pada induk mencit betina bunting 15 hari dan dibedah pada 24 jam dan 48 jam setelah pemberian 2-ME.
- P :kelompok dengan pemberian 2-ME dengan dosis 11 mmol/kg berat badan secara intraperitoneal pada induk mencit betina bunting 15 hari. Dua jam kemudian diberi PSK dengan dosis 150 mg/kg berat badan dan dibedah pada 24 jam dan 48 jam setelah pemberian 2-ME.

### **3.4 Variabel Penelitian**

Penelitian ini terdiri atas 3 variabel yaitu:

1. Variabel bebas, yaitu dosis 2-ME dan PSK yang diberikan kepada mencit betina bunting, umur kebuntingan, dan waktu pembedahan.
2. Variabel terikat, yaitu kelainan berupa apoptosis sel otak fetus mencit.
3. Variabel kendali, yaitu strain, umur, berat badan dan pakan mencit

### **3.5 Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1 Persiapan penelitian**

Penelitian ini membutuhkan 40 ekor mencit (*Mus musculus*) dewasa dengan perincian 20 ekor jantan dan 20 ekor betina yang berumur  $\pm$  8-9 minggu.



gunting bedah miring sampai di belakang telinga dan di atas leher dan dilanjutkan dengan pemotongan bagian-bagian di sekitar otak, dengan tujuan untuk mendapatkan bagian otaknya saja sehingga preparat yang dihasilkan sesuai dengan keinginan yakni bagian otaknya saja.

### **3.5.3 Pembuatan dan pengecatan jaringan otak**

Setelah dilakukan koleksi otak fetus mencit kemudian dilanjutkan dengan pembuatan dan pengecatan preparat yang dilakukan melalui proses yang tercantum pada lampiran 1.

### **3.5.4 Pewarnaan imunohistokimia**

Preparat jaringan otak fetus mencit selain diwarnai dengan hematoxilin eosin juga diwarnai menggunakan metode imunohistokimia. Pewarnaan preparat menggunakan metode imunohistokimia merupakan suatu cara yang dilakukan untuk mengenali dan menampilkan sel apoptosis dalam suatu jaringan, sedangkan pewarnaan menggunakan hematoxilin-eosin dilakukan untuk mengenali dan menampilkan sel yang mengalami kematian. Pewarnaan imunohistokimia dalam penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi terjadinya apoptosis pada sel otak, sedangkan untuk menghitung jumlah sel otak yang mengalami kematian dilakukan dengan pewarnaan hematoxilin-eosin. Apoptosis dideteksi menggunakan *ApopTag<sup>®</sup> In Situ Apoptosis Detection Kit* yang mampu mengenali sel apoptosis melalui deteksi fragmen DNA oleh suatu enzim *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT). Pewarnaan menggunakan metode ini

dilakukan dalam kondisi tidak boleh kering. Proses pewarnaan imunohistokimia tercantum dalam lampiran 2

### **3.5.5 Pengamatan preparat histologi**

Bagian yang diamati dalam penelitian ini adalah:

1. Pada preparat kelompok K(-), K(+), dan P yang diwarnai secara imunohistokimia dilakukan pemeriksaan untuk mengetahui (mendeteksi) ada tidaknya sel otak fetus mencit yang mengalami apoptosis dan tidak dilakukan penghitungan.
2. Pada preparat kelompok K(-), K(+), dan P yang diwarnai dengan hematoxilin-eosin dilakukan pemeriksaan dan penghitungan sel otak fetus mencit yang mengalami kematian.

### **3.6 Pengumpulan Data**

Otak fetus yang telah dikoleksi difiksasi dalam larutan PFA 4%, kemudian dibuat preparat jaringan otak, dan dilanjutkan dengan pewarnaan hematoxilin-eosin atau imunohistokimia. Pengumpulan data diperoleh dengan melakukan pengamatan preparat jaringan otak fetus mencit yang telah diwarnai dengan hematoxilin-eosin atau imunohistokimia dengan menggunakan mikroskop. Preparat otak fetus mencit diamati sebanyak 10 lapang pandang, dengan tujuan untuk mengurangi kesalahan. Dengan pewarnaan imunohistokimia, sel otak yang mengalami apoptosis ditandai dengan adanya kondensasi kromatin dan sel berwarna lebih coklat berbeda dengan sel hidup disekitarnya, sedangkan dengan

pewarnaan hematoksin-eosin, sel otak yang mengalami kematian ditandai dengan adanya kondensasi sitoplasma dan nukleus, dan sel berwarna lebih gelap dari sel hidup disekitarnya (Darmanto, 2002). Data yang diperoleh ditabulasikan dalam tabel 1 dan 2.

### **3.7 Analisis Data**

Data berupa persentase sel otak yang apoptosis dan persentase sel otak yang mengalami kematian. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan metode ANAVA satu arah dan jika ada perbedaan nyata antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil), dengan  $\alpha < 0,05$ . Sedangkan sel otak yang mengalami apoptosis dianalisis secara deskriptif (Wijaya, 2001).

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini diharapkan mampu menunjukkan pengaruh 2-metoksietanol (2-ME) dosis 11 mmol/kg bb terhadap kematian pada sel *cerebral cortex* mencit prenatal 15 hari dan peranan polisakarida krestin (PSK) dosis 150 mg/kg bb sebagai penghambat kematian sel *cerebral cortex* yang disebabkan oleh 2-ME. Kematian sel saraf di *cerebral cortex* akibat 2-ME secara apoptosis dideteksi menggunakan metode pewarnaan imunohistokimia, sedangkan metode pewarnaan hematoxilin-eosin digunakan untuk menghitung jumlah sel yang mengalami kematian.

#### 4.1 Hasil

##### 4.1.1 Kematian sel otak fetus mencit

Hasil pengamatan jaringan otak terhadap kematian sel di *cerebral cortex* pada preparat kontrol negatif, kontrol positif, dan perlakuan yang dibedah 24 dan 48 jam setelah pemberian 2-ME dengan menggunakan pewarnaan hematoxilin-eosin dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 11 dan 12.

Tabel 1. Rata-rata persentase kematian sel saraf di *cerebral cortex* kelompok K(-), K(+), dan P pada pembedahan 24 dan 48 jam.

Jumlah ulangan pada setiap kelompok	Kelompok	Rerata % kematian sel saraf di <i>cerebral cortex</i>	
		24 Jam	48 Jam
10	K (-)	2,92 <sup>a</sup> ± 1,75	2,89 <sup>c</sup> ± 3,56
	K (+)	27,65 <sup>b</sup> ± 9,9	51,40 <sup>d</sup> ± 10,6
	P	4,67 <sup>a</sup> ± 2,65	10,04 <sup>c</sup> ± 2,13

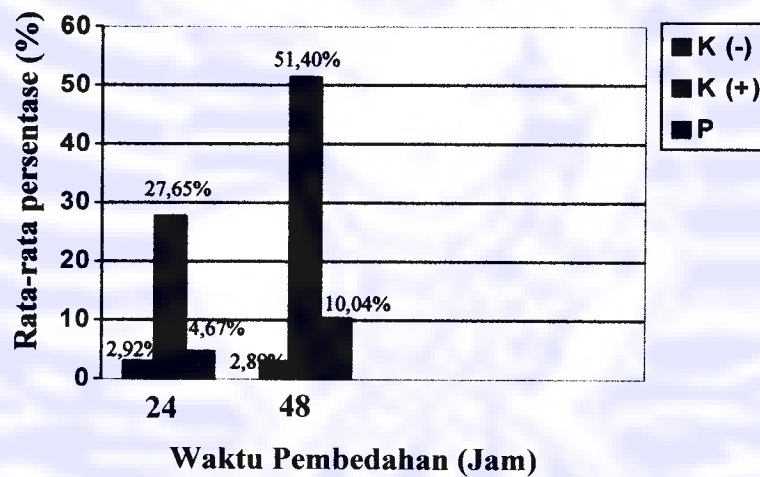
Keterangan :

Angka yang diikuti dengan huruf kecil yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata pada  $\alpha = 0,05$

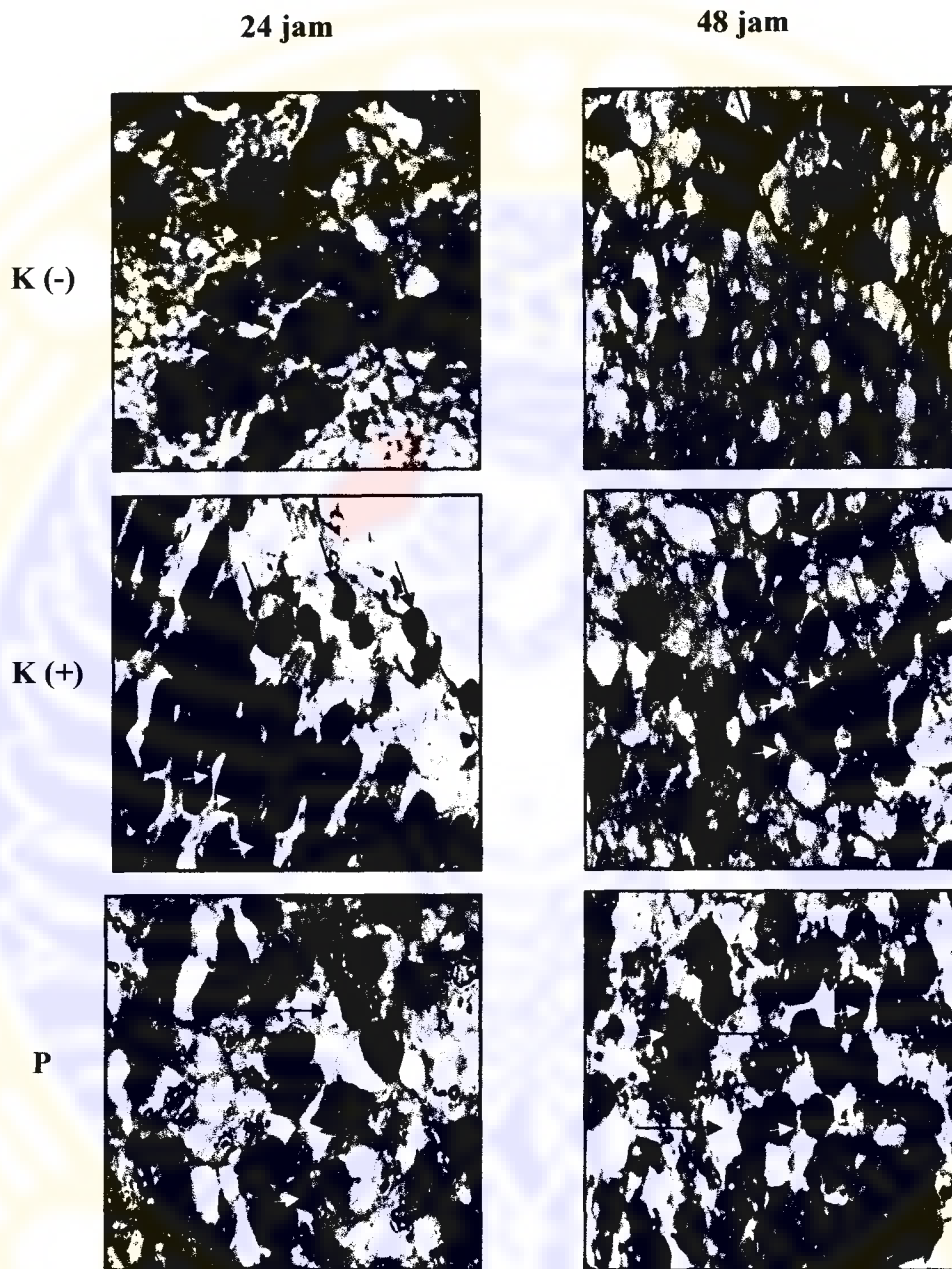
K (-) = kelompok kontrol yang diberi aquabides steril

K (+) = kelompok yang diberi 2-ME dosis 11 mmol/kg bb

P = kelompok yang diberi 2-ME dosis 11 mmol/kg bb dan 2 jam



Gambar 11. Histogram rata-rata persentase sel otak yang mengalami kematian di *cerebral cortex* pada kelompok K (-), K (+), dan P yang dibedah 24 jam dan 48 jam setelah perlakuan.



**Gambar 12.** Kematian sel yang diamati pada sayatan jaringan *cerebral cortex* fetus yang dibedah 24 jam dan 48 jam setelah pemberian 2-ME. (perbesaran 1000x)

Keterangan :

→ : sel normal

→ : sel mati

Penampakan preparat sel otak pada kelompok kontrol negatif yang diberi akuades dapat dilihat pada gambar 12. Hasil pengamatan terhadap preparat histologi *cerebral cortex* fetus yang diwarnai dengan hematoksilin-eosin menunjukkan bahwa, sel yang mengalami kematian berwarna lebih gelap dibandingkan sel hidup dengan ukuran lebih kecil dan lebih kompak. Pada gambar 12 tampak bahwa ukuran sel pada kelompok satu dengan yang lainnya berbeda. Hal ini disebabkan oleh letak pengamatan yang berbeda pada bagian lapisan *cerebral cortex*.

Pengamatan terhadap kematian sel otak di bagian *cerebral cortex* fetus mencit UK 15 yang dibedah 24 jam setelah pemberian 2-ME memperlihatkan bahwa, rerata persentase kematian sel otak pada kontrol positif yang diberi 2-ME dosis 11 mmol/kg bb adalah 27,65%, hasil ini berbeda secara signifikan dengan rerata persentase kematian sel otak pada kontrol negatif yaitu sebesar 2,92%. Sedangkan rerata persentase kematian sel otak pada kelompok perlakuan yang diberi PSK dosis 150 mg/kg bb 2 jam setelah 2-ME adalah 4,67%, hasil ini tidak berbeda secara signifikan dengan kontrol negatif (tabel 1 dan gambar 11). Hasil tersebut menunjukkan bahwa, dalam selang waktu 24 jam 2-ME dosis 11 mmol/kg bb mampu meningkatkan kematian sel otak dan PSK dosis 150 mg/kg bb mampu menurunkan kematian sel otak akibat 2-ME .

Pengamatan terhadap kematian sel otak bagian *cerebral cortex* fetus mencit UK 15 yang dibedah 48 jam setelah 2-ME memperlihatkan bahwa, rerata persentase kematian sel otak pada kontrol positif yang diberi 2-ME dosis 11 mmol/kg bb adalah 51,40%, hasil ini berbeda secara signifikan dengan rerata

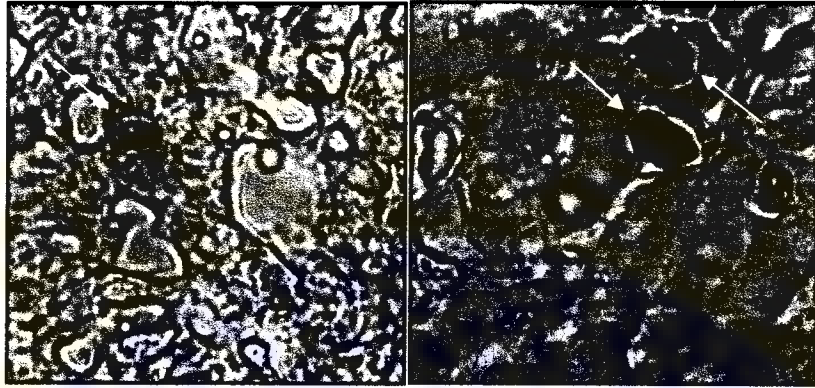
persentase kematian sel otak kontrol negatif yaitu sebesar 2,89%. Pemberian PSK dosis 150 mg/kg bb yang diberikan 2 jam setelah 2-ME ternyata mampu menurunkan kematian sel otak dengan rerata persentasenya adalah 10,04%, tetapi hasil ini berbeda secara signifikan dengan kontrol negatif (tabel 1 dan gambar 11). Hasil tersebut menunjukkan bahwa, dalam selang waktu 48 jam 2-ME dosis 11 mmol/kg bb mampu meningkatkan kematian sel otak akibat 2-ME namun kemampuan PSK dalam selang waktu 48 jam belum mampu menghambat kematian sel otak seperti kemampuan PSK dalam selang waktu 24 jam.

Rerata persentase kematian sel otak di bagian *cerebral cortex* akibat 2-ME dosis 11 mmol/kg bb pada selang waktu 48 jam lebih tinggi dibandingkan dengan 24 jam. Hal ini menunjukkan bahwa 2-ME dalam selang waktu 48 jam lebih bersifat toksik daripada 24 jam. PSK dosis 150 mg/kg bb yang diberikan 2 jam setelah 2-ME dalam selang waktu 24 jam mampu menurunkan kematian sel lebih baik daripada dalam selang waktu 48 jam.

#### **4.1.2 Deteksi kematian sel secara apoptosis dengan metode pewarnaan imunohistokimia.**

Pewarnaan imunohistokimia pada sel otak yang mengalami apoptosis menunjukkan inti sel yang berwarna coklat gelap dengan sitoplasma sedikit atau tidak ada. Hasil pewarnaan imunohistokimia pada kelompok perlakuan yang dibedah 24 jam setelah pemberian 2-ME menunjukkan adanya apoptosis dengan jumlah sedikit, sedangkan pada kelompok yang lain tidak (Gambar 13).





**Gambar 13.**Jaringan sel otak yang diwarnai dengan metode imunohistokimia, untuk deteksi kematian sel secara apoptosis (diambil dari preparat kelompok P yang dibedah 24 jam setelah pemberian 2-ME dan diamati pada perbesaran 1000x).  
( : sel yang terdeteksi mati secara apoptosis)

## 4.2 PEMBAHASAN

### 4.2.1 Efek 2-ME dosis 11 mmol/kg bb terhadap kematian sel otak dan usaha penghambatannya dengan PSK dosis 150 mg/kg bb.

Penelitian ini menunjukkan bahwa rerata persentase kematian sel otak akibat pemberian 2-ME dosis 11 mmol/kg bb pada selang waktu 48 jam lebih tinggi dari selang waktu 24 jam. Hasil tersebut juga memperlihatkan bahwa 2-ME dosis 11 mmol/kg bb dalam selang waktu 48 jam lebih bersifat toksik daripada dalam selang waktu 24 jam. Hasil penelitian ini didukung dengan penelitian Harinimiswari (2003) dan Aldila (2004) yang melaporkan bahwa kematian sel otak di bagian *cerebral cortex* sudah terlihat pada pembedahan 12 jam setelah pemberian 2-ME dan persentase kematian sel pada pembedahan 24 jam setelah induksi 2-ME mengalami peningkatan dari pembedahan 12 jam. Kematian sel otak fetus dalam penelitian ini diduga disebabkan oleh metabolit 2-ME yaitu MALD dan MAA yang dalam waktu 48 jam masih mempunyai kadar cukup

tinggi di dalam darah. Kim dan Smialowicz (1997) melaporkan bahwa MAA dalam waktu 24 jam sudah terdistribusi ke dalam jaringan fetus mencit. Selain itu, 2-ME yang masuk ke dalam tubuh akan teroksidasi membentuk radikal bebas. 2-ME yang teroksidasi menjadi MALD dengan bantuan enzim ADH mampu menyebabkan terbentuknya radikal bebas dan membentuk  $H_2O_2$ . *Methoxyacetaldehyde* tersebut akan teroksidasi lagi menjadi MAA dengan bantuan ALDH dengan melepaskan hidrogen dan menambah oksigen. Radikal bebas yang berlebih di dalam sel akan menyebabkan terjadinya kerusakan metabolisme sel (Darmanto, 1999, Dhalluin *et al.*, 1999, Moslen, 1995 dan Miller *et al.*, 1983). Menurut Dhalluin *et al.* (1999) dan Kim dan Smialowicz (1997), MALD yang merupakan hasil oksidasi 2-ME sangat berbahaya bagi tubuh karena adanya gugus aldehid yang bereaksi lebih cepat dari pada gugus keton, dan pada akhirnya dapat menyebabkan kerusakan sel. Penelitian Rumanta *et al.* (2001) dalam Aldila (2004) melaporkan bahwa MAA yang diberikan kepada tikus dapat menyebabkan fragmentasi DNA, yang merupakan ciri dari apoptosis, pada spermatosit pakhiten. Adanya MAA dalam jaringan embrio dapat meningkatkan permeabilitas membran meningkat sehingga terjadi overload  $Ca^{2+}$  dalam sel yang dapat menghambat fosforilasi oksidatif dan menyebabkan ATP berkurang dan pada akhirnya sel akan mengalami kematian. Hal tersebut juga didukung oleh penelitian Ku dan Chapin pada tahun 1995 yang melaporkan bahwa MAA dalam jaringan menyebabkan terhambatnya sintesis DNA dan RNA.

Polisakarida krestin (PSK) dosis 150 mg/kg bb yang diberikan 2 jam setelah 2-ME dalam penelitian ini mampu menurunkan kematian sel yang

disebabkan oleh 2-ME. Penurunan kematian sel setelah pemberian PSK diduga melalui jalur pertahanan tubuh dan jalur seluler. Jalur pertahanan tubuh antara lain: (1) meningkatkan kemampuan sel-sel imunokompeten di dalam tubuh (imunomodulator) (2) meningkatkan aktivitas SOD (*superoksidase dismutase*). Jalur seluler yang ditempuh oleh PSK antara lain : (1) menghambat apoptosis melalui penundaan ekspresi gen p53 (Kagohashi, 2002) (2) memiliki kemampuan sebagai *scavenging* terhadap radikal bebas (Kurishita, 1991). Menurut Halliwell (1991) dan Pang *et al.* (2000) superoksidase dismutase merupakan enzim yang melindungi mitokondria sel dari oksidan dan membuang radikal superoksida, SOD juga mampu menekan ROS (*Reactive Oxygen Species*) intraseluler yang merupakan radikal bebas, meningkatkan potensial transmembran mitokondria dan mencegah sel untuk mengalami kematian. Berdasarkan penelitian Pang *et al.* (2000) PSK mampu meningkatkan aktivitas *glutathione peroxidase* pada makrofag peritoneal mencit sehingga mampu meningkatkan transkripsi dan ekspresi mRNA. Cassileth dan dan Yeung pada tahun 2003 melaporkan bahwa PSK yang diberikan secara oral mampu diabsorpsi tubuh selama 24 jam.

#### **4.2.2 Deteksi kematian sel secara apoptosis akibat pemberian 2-ME dosis 11 mmol/kg bb dengan menggunakan metode pewarnaan imunohistokimia.**

Pada pewarnaan menggunakan hematoksilin-eosin jumlah sel otak yang mengalami kematian relatif banyak, sedangkan dengan pewarnaan imunohistokimia menunjukkan bahwa hanya sedikit sel otak yang terwarnai. Hal ini berarti kematian sel yang disebabkan oleh 2-ME diduga tidak hanya melalui

jalur apoptosis. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kematian sel sebagian besar tidak melalui fragmentasi DNA yang merupakan ciri dari apoptosis (Darmanto, 2002). Jalur lain yang diduga menyebabkan kematian sel adalah jalur nekrosis.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Pemberian 2-ME dengan dosis 11 mmol/kg bb pada induk mencit (*Mus musculus*) bunting 15 hari menyebabkan kematian sel saraf di *cerebral cortex* fetus. 2-ME dosis 11 mmol/kg bb pada selang waktu 48 jam lebih bersifat toksik daripada pada selang waktu 24 jam
2. Pemberian PSK dosis 150 mg/kg berat badan 2 jam setelah pemberian 2-ME dosis 11 mmol/kg berat badan pada mencit betina (*Mus musculus*) kebuntingan 15 hari mampu menurunkan kematian sel saraf di *cerebral cortex* fetus. PSK dosis 150 mg/kg bb yang diberikan 2 jam setelah 2-ME dalam selang waktu 24 jam mampu menurunkan kematian sel lebih baik daripada dalam selang waktu 48 jam
3. Pemberian 2-ME pada induk mencit mampu menyebabkan kematian sel, namun mayoritas kematian sel tersebut bukan melalui apoptosis.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus 1, 2004, America's Largest Produces of Organic Medicinal Mushrooms. Aloha Medicinals Inc. Available at: [<http://www.alohamedicinals.com/gest/chemistry.html>].
- Anonimus 2, 2004. Cancidas (caspofungin) är ett registrerat varumärke från Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA Copyright © 2004 Merck & Co., Inc. Alla rättigheter förbehålles. Available at : [[http://www.cancidas.se/secure/index\\_main.html](http://www.cancidas.se/secure/index_main.html)].
- Anonimus 3, 2004. 2004. Clinical Colony . Umas Medical School.. Available at: [<http://www.ummsmindbrainandbehavior1developmentofcerebellum.html>].
- Anonimus 4, 2004. Coriolus versicolor. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Available at : [[http:// www.joramom.com/ssetas/laminab.htm](http://www.joramom.com/ssetas/laminab.htm)].
- Anonimus 5, 2004. Current Use Patterns in Canada, Toxicology Profiles of Alternatives, and the Feasibility of Performing an Exposure Assessment Study., The Green Lane™, Environment Canada's World Wide Web site (ECWWs). Available at : [<http://www.ec.gc.ca>]
- Anonimus 6, 2004. **National Pollutant Inventory Substance Profile.** Departement of the Environment and Heritage Australia.
- Anonimus 7, 2004. The Genetics of Cancer: Regulation of Cell Number and Division. UM Biology Facilities in the University of Miami Departement of Biology. Available at: [[http://www.bio.miami.edu/dana/250/25003\\_2.html](http://www.bio.miami.edu/dana/250/25003_2.html)].
- Aldila, L.F., 2004. Kelainan Perkembangan Otak Mencit (*Mus musculus*) Akibat Induksi 2-Methoxyethanol pada Umur Kebuntingan 15 Hari. **Skripsi**, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga, Surabaya.
- Aolad, H. Md., Inouye, M., Hayasaka, S., Darmanto, W., Murata, Y., 2000. Effect of PSK, a Biological Response Modifier, on X-Ray Induced Congenital Hydrocephalus in Mice. **Congenital Anomalies**, 2002, Vol. 40 (3).
- Arjun, K.S dan Ramesh, P.S., 1982. **A Textbook of Botany: Thallophyta (Algae, Fungi, Bacteria, Virus and Lichen)**, vol.1 ed. Rev ke-8. Delhi: Ratan Prakan Mandir, Educational and University Publishar. Hal. 191.

- Asai K, Kato H, Hirose K, Akaogi K, Kimura S, Mukai S, Inoue M, Yamamura Y, Sano H, Sugino S, Yoshikawa T, dan Kondo M., 2000. PSK and OK-432-induced immunomodulation of inducible nitric oxide (NO) synthase gene expression in mouse peritoneal polymorphonuclear leukocytes and NO-mediated cytotoxicity. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 2000. Vol. 22, Hal.221-235.
- Brown, NA., Holt, D., dan Web, M., 1984, The teratogenicity of methoxyacetic acid in the rat. **Toxicology Letters**,1984, Vol. 22, Hal. 93-100.
- Cassileth, B., dan Yeung, KS., 2003, Coriolus Versicolor, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. [<http://www.mskecc.org/aboutherbs>]
- Cui J., dan Chisti Y., 2003, Polisaccharopeptides of Coriolus versicolor: physiological activity, uses, and production. **Biotechnology Advance**, 2003 Hal.109-122.
- Currey, C. 2004. **Cell Injury and Disease**. University of Florida PA Program Introduction to Medicine I. Available at : [<http://www.medinfo.ufl.edu/pa/chuck/fall/handouts/injury.htm>].
- Darmanto, W., 1998. Efek 2-methoxyethanol terhadap pembentukan somite dan kelainan rangka aksial pada mencit. **Proceeding Temu Ilmiah VII**, 1998, Hiroshima, Japan. Hal.19-22.
- Darmanto, W., Inouye, M., Hayasaka, S., Takagishi, Y., Aolad, HM., dan Murata, Y., 1998. Dose Response Relationship of Disturbed Migration of Purkinje Cells in the Cerebellum Due to X-Irradiation. **Environmental Medicine**, 1998, Vol. 42 No.1. hal 46.
- Darmanto, W., 1999. Gangguan Perkembangan Embrio Mencit Pre Implantasi Akibat Induksi Senyawa Methoxyacetic Acid (MAA). **Proceedings of the 8<sup>th</sup> Scientific Meetings (TI-VIII)**, 1999, Hal.173-176.
- Darmanto, W., Inouye, M., Takagishi, Y., Ogawa, M., Mikoshiba, K., and Murata, Y., 2000. Derangement of Purkinje cells in the rat cerebellum following prenatal exposure to X-irradiation : Decreased Reelin level is possible cause. **Journal Neuropathology and Experimental Neurology**. Vol.59. Hal. 245-256.
- Darmanto, W., 2002. Apoptosis Pada Sel Granulosa Cerebellum Tikus Akibat Radiasi Sinar-X: Deteksi Apoptosis Dengan Metode Tacs<sup>tm</sup> In Situ Apoptosis Detection Kit. **Jurnal MIPA** , Vol.7, Hal.134.

- Dhalluin, S., Elias, Z., Poirot, O., Gate, L., Pages, N., Tapiero, H., Vasseur, P., Nguyen-Ba, B., 1999. Apoptosis inhibition and ornithine decarboxylase superinduction as early apigenetic events in morphological transformation of syrian hamster embryo cells exposed to 2-methoxycetaldehyde, a metabolite of 2-methoxyethanol. **Toxicology Letters**, 1999, Vol. 105, Hal.163-175.
- Harinimiswari, A., 2003. Penggunaan PSK (Krestin) sebagai Proteksi terhadap Efek Teratogenik 2-Methoxyethanol pada Perkembangan Cerebellum Mencit (*Mus musculus*) Prenatal. **Skripsi**, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga, Surabaya.
- Iguchi C., Nio Y., Takeda H., Yamasawa K., Hirahara N., Toga T., Itakura M., dan Tamura K., 2001, Plant polysaccharide PSK: cytostatic effects on growth and invasion of HLA and adhesion molecules on human gastric and colonic tumor cell surface, **Anticancer Research**, 2001, Vol. 21, Hal. 1007-1013.
- Jordan, E.L., dan P.S. Verma, 1980. **Chordate Zoology**. S. Chand Company Ltd Rm Nagar. New Delhi.
- Kezic, S., Mahicu, K., Monster, A.C., Frederik A de Wolff, 1997. Dermal absorption of vaporous and liquid 2-methoxyethanol and 2-ethoxyethanol in volunteers. **Occupational Environment Medicine**, 1997, Vol.54, Hal.38-43.
- Kidd PM., 2000. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. **Alternative Medicine Rev**, 2000, Vol. 5, Hal.4-27.
- Kim, B.S., Smialowicz, R.J., 1997. The Role of Metabolism in 2-methoxyethanol-induced Suppression of In Vitro Polyclonal Antibody Responses by Rat and Mouse Lymphocytes. **Toxicology**, 1997, Vol.123, Hal. 227-239.
- Kobayashi H, Matsunaga K, Oguchi Y., 1995. Antimetastatic effects of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide obtained from basidiomycetes:an overview. **Cancer Epidemiol Biomarkers Preventing**, 1995, Vol. 4, Hal. 275-81.
- Krebs, J., 1998. The role of calcium in apoptosis. **BioMetals**, 1998, Vol.II, Hal. 375-382.
- Ku, WW., Wine, RN., Chae, BY., Ghanayem, BL., Chapin, RE., 1995. Spermatoocyte Toxicity of 2-Methoxyethanol (ME) in Rats and Guinea Pigs : Evidence for the Induction of Apoptosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Vol. 134, Hal 100-110.



- Kurishita, A., 1990. Suppressive Effects of Two Bioresponse Modifiers, Krestin and Levamisole, on 5-Azacytidine-Induced Digital Defects in Rats, **Teratogenesis, Carcinogenesis, And Mutagenesis**, 1990, Vol. 10, Hal. 409-415.
- Li, L.-H., Wine, N, N., Miller, D.S., Reece, J.M., Smith, M., Chapin, R.E., 1997. Protection Against Methoxyacetic-Acid-Induced Spermatocyte Apoptosis With Calcium Channel Blockers in Culture rat Seminiferous Tubules: Possible Mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 1997, Vol. 144, Hal.105-119.
- Lin IH, Hau DM, dan Chang YH, 1996. Restorative effect of Coriolus versicolor polysaccharides against gamma-irradiation-induced spleen injury in mice. **Zhongguo Yao Li Xue Bao**, 1996, Vol. 17, Hal.102-4.
- Lunitasari, Y., 2004. Kandungan Antioksidan Darah Pada Mencit (*Mus musculus*) akibat pemberian 2-Metoksietanol dan Usaha Pencegahan dengan PSK (Polisakarida Krestin). **Skripsi**, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga, Surabaya.
- Ma'ruf, A., 2002, Fisiologi Kematian Sel, Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, **Majalah Ilmu Faal Indonesia**, Vol.01/2/2002.
- Marrieb, E.N., dan Mallatt, J, 2001. **Human Anatomy 3<sup>rd</sup> ed.** Pearson Education, Inc., USA, hal. 52.
- Maslachah, L., Sukmanadi, M., Sugihartuti, R., 2003. Pengaruh Pemberian Antisterilitas Alpha Tocopherol Terhadap Spermatogenesis Tikus Yang menerima Stressor. **Laporan Penelitian**, Fakultas Kedokteran Hewan, UNAIR, Surabaya.
- Miller, R.R., Hermann, E.A., Langvardt, P.W., McKenna, M.J dan Schwetz, B.A., 1983. Comparativa Metabolism and Disposition of Ethylene Glycol Monomethyl Ether and Propylen Glycol Monomethyl Ether in Male Rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 1983, Vol. 67, Hal. 229-237.
- Moslen, MT., Kaphalia L., Balasubramanian, H., Yin, Y.-M., William W. Au. 1995, Species differences in testicular and hepatic biotransformation of 2- methoxyethanol. **Toxicology**, 1995, Vol. 96, Hal. 217-224.
- Naegele, J., dan Lombroso, J.P., 1998, Development of the Cerebral Cortex: VIII. Apoptosis: Neuronal Hari-Kari. **Journal American Academic Child Adolescence Psychiatry**, 37(8):890-892.
- Nasir, M., 1999. **Metode Penelitian**. Ghalia Indonesia, Jakarta.

- Pang ZJ, Chen Y and Zhou M., 2000. Polisaccharide Krestin enhances manganese superoxide dismutase activity and mRNA expression in mouse peritoneal macrophages. **American Journal Chinese Medicine**, 2000, Vol.28, Hal. 331-341.
- Pedrinaci, S., Algarra, I., Garrido, F., 1999. Protein-bound polysaccharide (PSK) induces cytotoxic activity in the NKL human natural killer cell line. **International Journal Clinic Laboratory Research**, 1999, Vol. 29, Hal. 135-140.
- Plaetzer, K., Kiesslich, T., Verwanger, T., dan Krammer, B. 2003. The Modes of Cell Death Induced by PDT : An Overview. **Medicine Laser Applied**. Vol. 18. Hal. 7-19.
- Pollack, M., Phaneuf, S., Dirks, A., and Leewenbuurgh, C., 2002. The Role of Apoptosis in the Normal Aging Brain, Skeletal Muscle, and Heart. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2002, Vol. 959, Hal. 93-107.
- Rasjad, Yamashita, K., Datu, AR., dan Yasuda, M., 1991. Patogenesis of Limb Malformations in Mice Induced by Methoxyacetic Acid. **Hiroshima Journal Medicine Science**, Vol 40, Hal. 101-107.
- Ritter, E.J., W.J. Scott, J.L. Randall, and J.M. Ritter, 1985. Teratogenicity of Dimethoxyethyl phthalate and its metabolites methoxyethanol and methoxyacetic acid in the rat. **Teratology**, 1985, Vol.32, Hal. 25-31.
- Robertson JD dan Orrenius S., 2000. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. **Crit Rev Toxicology**, 2000, Vol. 30, Hal. 609-27.
- Rugh, R., 1968. **The Mouse : Its Reproduction and Development**. Burgess Publishing Company, Minneapolis.
- Scott, W.J., Fradkin, R., Wittfoht, W., dan Nau, H., 1989. Teratologic Potential of 2-Metoxyethanol and Transplacental Distribution of its Metabolite, 2-Methoxyacetic Acid, in Non-Human Primates. **Teratology**, 1989, Vol. 39, Hal. 363-373.
- Srianto, P., 2004. Peruntun Alur Luteolitik Hormon Prostaglandin F<sub>2α</sub> Yang Diberikan Secara Submukosa Vulva untuk Gertak Birahi Pada sapi perah. **Naskah Desertasi**, Program Pascasarjana UNAIR.
- Steinberg, P., 1997. PSK-Coriolus versicolor and Cancer. **Wildfire Natural Products**.

- Stewart B. W. dan Klihues P.(Eds), 2003. **WHO : World Cancer Report**. IARC Press, Lyon.hal. 113.
- Taylor, P., 1986. **Practical Teratology**. Academic Press Inc. London.
- Toge T dan Yamaguchi Y., 2000. Protein-bound polysaccharide increases survival in resected gastric cancer cases stratified with a prorative granulocyte and lymphocyte count. **Oncology Reports**, 2000, Vol. 7, Hal.1157-1161.
- Triana, 2003. Induksi 2-Methoxyethanol (2-ME) terhadap Perkembangan Otak Besar (Cerebrum) Mencit (Mus musculus) Prenatal. **Skripsi**, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga, Surabaya.
- Tsukagoshi S., Hashimoto Y., Fujii G., Kobayashi H., Nomoto K., dan Orita K., 1984. Krestin (PSK). **Cancer Treatment Rev**, 1984, Vol. 11, Hal.131-155.
- Valentine, R., O'Neill, A.J., Lee, K.P., dan Kennedy Jr, G.L., 1999. Subchronic Inhalation Toxicity of Diglyme. **Food and Chemical Toxicology**, 1999, Vol. 37, Hal. 75-86.
- Wijaya, Ir., 2001, **Analisis Statistik dengan Program SPSS 10.0**. Alfabeta, Bandung.
- Yang, M.M.P., Chen, Z., Kwok, J.S.L., 1993. The Antitumor Effect of A Small Polypeptide From *Coriolus versicolor* (SPCV). **Cancer Epidemiology Biomarkers Preventing**, 1993, Vol. 4, Hal.275-281.
- Yatim, W., 1990. **Reproduksi dan Embriologi**. Penerbit Tarsito , Bandung
- Yokoe T., Lino Y., Takei H., Horiguchi J., Koibuchi Y., Maemura M., Ohwada S., dan Morishita Y., 1997. HLA antigen as predictive index for the outcome of breast cancer patients with adjuvant immunochemotherapy with PSK. **Anticancer Research**, 1997, Vol.17, Hal.2815-2818.

Stewart B. W. dan Klihues P.(Eds), 2003. **WHO : World Cancer Report**. IARCPress, Lyon.hal. 113.

Taylor, P., 1986. **Practical Teratology**. Academic Press Inc. London.

Toge T dan Yamaguchi Y., 2000. Protein-bound polysaccharide increases survival in resected gastric cancer cases stratified with a prorative granulocyte and lymphocyte count. **Oncology Reports**, 2000, Vol. 7, Hal.1157-1161.

Triana, 2003. Induksi 2-Methoxyethanol (2-ME) terhadap Perkembangan Otak Besar (Cerebrum) Mencit (Mus musculus) Prenatal. **Skripsi**, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga, Surabaya.

Tsukagoshi S., Hashimoto Y., Fujii G., Kobayashi H., Nomoto K., dan Orita K., 1984. Krestin (PSK). **Cancer Treatment Rev**, 1984, Vol. 11, Hal.131-155.

Valentine, R., O'Neill, A.J., Lee, K.P., dan Kennedy Jr, G.L., 1999. Subchronic Inhalation Toxicity of Diglyme. **Food and Chemical Toxicology**, 1999, Vol. 37, Hal. 75-86.

Wijaya, Ir., 2001, **Analisis Statistik dengan Program SPSS 10.0**. Alfabeta, Bandung.

Yang, M.M.P., Chen, Z., Kwok, J.S.L., 1993. The Antitumor Effect of A Small Polypeptide From *Coriolus versicolor* (SPCV). **Cancer Epidemiology Biomarkers Preventing**, 1993, Vol. 4, Hal.275-281.

Yatim, W., 1990. **Reproduksi dan Embriologi**. Penerbit Tarsito , Bandung

Yokoe T., Lino Y., Takei H., Horiguchi J., Koibuchi Y., Maemura M., Ohwada S., dan Morishita Y., 1997. HLA antigen as predictive index for the outcome of breast cancer patients with adjuvant immunochemotherapy with PSK. **Anticancer Research**, 1997, Vol.17, Hal.2815-2818.

## **Lampiran 1**

### **Cara pembuatan sediaan jaringan otak (metode parafin)**

1. **Fiksasi** :otak fetus difiksasi dengan larutan *Bouin's* selama 2x24 jam. Proses fiksasi menjadi lebih mudah jika pembungkus otak dibuka terlebih dahulu.
2. **Washing** :bahan dicuci menggunakan garam fisiologis ( NaCl 0,9%) selama 1 jam, kemudian dicuci dengan alkohol 70% sebanyak dua kali.
3. **Dehidrasi** :bertujuan untuk menghilangkan kandungan air yang mengisi jaringan. Proses ini dilakukan dengan cara merendam bahan dalam alkohol bertingkat mulai dari 80%, 90% dan 96% atau absolut masing-masing selama 1,5 jam.
4. **Clearing** :penjernihan jaringan lemak menggunakan pelarut lemak *xylol*. Pertama-tama bahan direndam dengan campuran alkohol absolut dan *xylol* dengan perbandingan 2:1, dilanjutkan dengan alkohol-*xylol* 1:1 kemudian *xylol* murni, masing-masing selama 30 menit. Berakhirnya proses ditandai dengan kondisi jaringan yang tampak jernih dan transparan.
5. **Infiltrasi** :peresapan parafin dalam jaringan. Dilakukan dalam oven bersuhu 58-60°C (diatas titik cair parafin) dengan cara

perendaman jaringan berturut-turut dari campuran *xylol*-parafin, parafin murni I, parafin murni II dan parafin murni III, masing-masing 3 jam.

6. *Embedding* :bahan ditanam dalam blok parafin yang masih hangat (Temperatur = 60°C), kemudian dibiarkan memadat.
7. *Sectioning* :spesimen otak dalam blok parafin diiris menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 mikron dan terbentuk pita-pita irisan yang kemudian ditempatkan pada gelas obyek yang telah diolesi albumin.
8. Pewarnaan dan Penutupan Sediaan

Sayatan otak yang akan diwarnai dengan hematoxylin-eosin diperlakukan dengan proses sebagai berikut:

1. Deparafinisasi, gelas obyek berisi sayatan otak dicelup ke dalam *xylol* masing-masing sebanyak dua kali.
2. Dipindah kedalam alkohol dengan konsentrasi menurun, mulai dari alkohol absolut 96%, 90%, 80%, 70%, akuades, masing-masing selama 5 menit.
3. Dipindahkan ke dalam pewarna Harris hematoxylin selama 10 menit.  
Sisa pewarna dicuci dengan air mengalir selama 15 menit.
4. Dipindah kedalam larutan alkohol 70 % dan HCl 1 % selama 30 detik
5. Dipindahkan kedalam pewarna eosin selama 5 menit
6. Dipindahka ke dalam alkohol bertingkat dari konsentrasi 70%-80%-90%-96%-alkohol absolut, masing-masing selama 5 menit.

7. Dipindahkan ke dalam campuran *xylol*:alkohol dengan perbandingan 1:1 selama 5 menit.
8. Dipindahkan ke dalam *xylol* murni sebanyak dua kali, masing-masing selama 10 menit
9. Direkatkan dengan gelas penutup dengan perekat entelan (Humason, 1967)



Pewarnaan preparat jaringan otak dilakukan di dalam *coplin jar* dengan urutan dimulai dari kanan.

## **Lampiran 2**

### **Proses Pewarnaan Imunohistokimia**

Proses ini dilakukan dalam keadaan tidak boleh kering, dengan proses sebagai berikut :

1. Deparafinisasi irisan jaringan dalam *coplin jar*
  - a. Spesimen dicuci menggunakan *xylol* sebanyak tiga kali, masing-masing lima menit
  - b. Spesimen dicuci menggunakan etanol absolut sebanyak dua kali, masing-masing lima menit
  - c. Spesimen dicuci menggunakan 95% etanol sebanyak satu kali dan di 70% etanol sebanyak satu kali, masing-masing tiga menit
  - d. Spesimen dicuci menggunakan PBS 1X selama lima menit
2. Jaringan yang belum diperlakukan
  - a. *Protein digestion enzyme* atau *proteinase K* (20 µg/mL) dimasukkan ke spesimen selama 15 menit pada temperatur kamar dalam *coplin jar* atau langsung pada slide (~60 µL/5 cm<sup>2</sup>)
  - b. Spesimen dicuci menggunakan dH<sub>2</sub>O sebanyak dua kali dalam *coplin jar* selama dua menit setiap pencucian
3. Didalam *endogenous peroksidase*
  - a. Dikeringkan dengan 3.0% hidrogen peroksida dalam PBS 1X selama lima menit pada suhu kamar (baik pada slide atau *coplin jar*)



- b. Spesimen dicuci sebanyak dua kali menggunakan PBS 1X atau air, selama lima menit dalam *coplin jar*
4. Diletakkan pada *buffer equilibration*
  - a. Dibuat batas pada tiap sisi irisan (mengelilingi) sehingga cairan tidak keluar
  - b. 75  $\mu\text{L}$  *buffer equilibration* ditambahkan langsung pada irisan
  - c. Diinkubasi sekitar 10 detik pada suhu kamar.
5. Ditambahkan *working strength TdT enzyme*
  - a. Dibuat batas pada tiap sisi irisan (mengelilingi) sehingga cairan tidak keluar
  - b. Ditambahkan 55  $\mu\text{L}/5 \text{ cm}^2$  *working strength TdT enzyme* pada irisan dengan segera.
  - c. Diinkubasi di ruang kedap udara suhu 37°C selama 1 jam
6. Penempatan spesimen dalam *stop buffer /wash buffer*
  - a. Spesimen diletakkan pada *coplin jar* yang dilengkapi *working strength stop/wash buffer*, diagitasi selama 15 detik dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar.
  - b. *Anti-digoxigenin conjugate* dipindahkan dari *stock vial* untuk memproses sejumlah spesimen. Dihangatkan pada suhu kamar
7. Penempatan spesimen dalam 65  $\mu\text{L}/5 \text{ cm}^2$  *konjugat anti-digoxigenin*
  - a. Spesimen dicuci menggunakan PBS 1X sebanyak tiga kali pencucian, setiap pencucian selama satu menit setiap pencucian
  - b. Di buat batas pada tiap sisi irisan sehingga cairan tidak keluar

- c. Di tambahkan *konjugat anti digoxigenin* pada slide, sebanyak  $65 \mu\text{L}/5 \text{ cm}^2$  pada area permukaan spesimen.
  - d. Diinkubasi pada ruang kedap udara selama 30 menit pada suhu kamar
8. Pencucian spesimen dalam PBS 1X
- a. Spesimen dicuci menggunakan PBS 1X sebanyak 4 kali dalam *coplin jar* masing-masing selama 2 menit setiap kali pencucian, pada suhu kamar
  - b. Selama slide dicuci disiapkan *substrate working strength peroksidase*.
9. Penampakan warna dengan *substrat peroksidase* (DAB)
- a. Dibuat batas pada tiap sisi irisan sehingga cairan tidak bisa keluar
  - b. Ditambahkan *substrat peroksidase* (DAB) secukupnya untuk menutup specimen secara sempurna ( $75 \mu\text{L}/5 \text{ cm}^2$ )
  - c. Diwarnai selama 3 sampai 6 menit pada suhu kamar. Pada ruang kedap udara
  - d. Untuk mendapatkan waktu pewarnaan yang optimal, monitor warna dapat dilakukan dengan melihat slide di bawah mikroskop
10. Pencucian spesimen dengan  $\text{dH}_2\text{O}$
- a. Spesimen dicuci menggunakan  $\text{dH}_2\text{O}$  sebanyak tiga kali dalam *coplin jar* selama 1 menit setiap pencucian (pencucian yang lebih lama tidak akan merusak jaringan yang terwarnai)
  - b. Slide diinkubasi pada  $\text{dH}_2\text{O}$  dalam *coplin jar* selama 5 menit pada suhu kamar

11. Pewarnaan spesimen

- a. Spesimen diwarnai pada 0.5%(w:v) *methyl green* dalam *coplin jar* selama 10 menit pada suhu kamar.
- b. Spesimen dicuci pada 3 jenis dH<sub>2</sub>O dalam *coplin jar*, rendam slide 10 kali pada pencucian yang pertama dan kedua, kemudian 30 detik tanpa agitasi pada pencucian ketiga.
- c. Spesimen dicuci pada 3 jenis 100% N-Butanol pada *coplin jar*, rendam slide 10 kali pada pencucian pertama dan kedua, diikuti 30 detik tanpa agitasi pada pencucian ketiga

12. Mounting spesimen (untuk spesimen pada glass slide *silanized*)

- a. Spesimen di dehidrasi dengan memindahkan slide ke *xylol* sebanyak 3 kali, diinkubasi selama 2 menit pada setiap *jar*
- b. Slide dipindahkan setiap waktu dari *coplin jar*. Secara hati-hati seluruh slide dikeringkan tetapi spesimen jangan sampai kering

13. Ditungkup menggunakan *cover glass*

14. Diamati dalam mikroskop. (slide disimpan pada suhu kamar)

**Lampiran 3****Pembuatan Larutan Uji****1. Larutan 2-ME dosis 11 mmol/kg berat badan**

$$\text{Diketahui: Mr 2-ME} = 76,1$$

$$\text{Massa jenis 2-ME} = 0,96$$

$$10 \text{ ml} = 1 \text{ molar}$$

$$11 \text{ ml} = 1,1 \text{ molar}$$

$$1,1 \text{ molar} = 1,1 \text{ molar 2-ME} / 1 \text{ L pelarut}$$

$$1,1 \text{ mol 2-ME} = \frac{x \text{ gram}}{\text{Mr 2-ME}}$$

$$1,1 \text{ mol} = \frac{x \text{ gram}}{76,1}$$

$$x \text{ gram 2-ME} = 83,71 \text{ gram/L}$$

$$\text{massa jenis 2-ME} = 0,96$$

$$= M/V$$

$$0,96 = 83,71/V$$

$$V = 87,19 \text{ ml}$$

Jadi dalam 1 L pelarut terdapat 87,19 ml 2-ME atau 0,872 ml 2-ME dalam 10 ml akuabidestilata steril, dengan volume penyuntikan 0,1 ml/10 gr berat badan.

**2. Pembuatan Larutan PSK 150 mg/kg berat badan dari Stok 200 mg/kg berat badan**

**a. Pembuatan Stok PSK dosis 200 mg/kg berat badan**

1. 200 mg (0,2 g) serbuk PSK ditimbang menggunakan timbangan analitik.
2. Dilarutkan dalam 100 cc akuabidestilata steril
3. Larutan dipanaskan menggunakan hot plate dengan suhu 60°C-70°C
4. Diaduk menggunakan stirer dan dijaga supaya tidak mendidih

**b. Pembuatan Larutan PSK dosis 150 mg/kg berat badan dari stok**

Larutan PSK 200 mg/kg berat badan diencerkan dengan cara:

Diketahui :  $V_1$  = volume yang dicari

$M_1$  = dosis stok (200 mg/kg berat badan)

$V_1$  = volume stok (10 ml)

$M_2$  = dosis yang diinginkan (150 mg/kg berat badan)

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \cdot 200 = 10 \cdot 150$$

$$V_1 = \frac{1000}{200}$$

$$= 7,5 \text{ cc PSK}$$

7,5 cc PSK + 2,5 cc akuabidestilata steril = 150 mg/kg berat badan

Volume penyuntikan 0,1 cc/10 g berat badan

#### **Lampiran 4**

#### **Pembuatan PBS (Phosphate Buffer Saline)**

Pembuatan 100 cc PBS 10 x (Dulbecco's PBS)

1. Bahan-bahan yang digunakan:

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
Akuabidestilata steril	100 cc

2. Semua bahan dicampur dan diaduk menggunakan stirrer diatas hot plate, dan dijaga supaya tidak mendidih.

## **Lampiran 5**

### **Pembuatan Larutan Fiksatif**

Larutan fiksatif untuk otak fetus mencit adalah PFA 4%, cara pembuatannya adalah sebagai berikut:

#### 1. Pembuatan PFA 20 % (stok)

Cara pembuatannya:

1. 20 g PFA ditambahkan dalam 70 cc akuabidestilata steril
2. Dipanaskan menggunakan *hot plate* suhu 70°C, dan diaduk menggunakan stirer,
3. Ditambahkan 2 tetes NaOH 5 N sedikit demi sedikit sampai terlihat jernih dan tidak ada krista.
4. Ditambahkan akuabidestilata steril sampai 100 cc.

#### 2. Pembuatan PFA 4 %

PFA 20 % (stok)	= 20 cc
PBS 10X	= 10 cc
Akuabidestilata steril	= 70 cc

**Lampiran 6**

**Data penghitungan kematian sel otak yang diamati 24 jam setelah pemberian 2-ME dengan menggunakan mikroskop binokuler pada perbesaran 1000x**

Kelompok	LP	H	M	T	%	$(\bar{X} \pm SD) \%$
<b>K (-)</b>	1	82	4	86	4.65	<b>2.92 ± 1.75</b>
	2	60	3	63	4.76	
	3	128	7	135	5.18	
	4	116	3	119	2.50	
	5	114	2	116	1.72	
	6	67	1	68	1.47	
	7	71	1	72	1.40	
	8	70	3	73	4.11	
	9	115	0	115	0	
	10	141	5	146	3.42	
<b>K (+)</b>	1	55	25	80	31.25	<b>27.65 ± 9.99</b>
	2	181	30	211	14.21	
	3	72	31	103	30.09	
	4	101	22	123	17.88	
	5	54	36	90	40	
	6	121	39	160	24.38	
	7	76	32	108	29.63	
	8	82	63	145	43.44	
	9	88	40	128	31.25	
	10	89	15	104	14.42	
<b>P</b>	1	274	7	281	2.49	<b>4.67 ± 2.65</b>
	2	165	11	176	6.25	
	3	170	8	178	4.49	
	4	234	7	241	2.90	
	5	114	0	114	0	
	6	122	4	126	3.17	
	7	182	8	190	4.21	
	8	206	18	224	8.03	
	9	248	20	268	7.46	
	10	166	14	180	7.77	



**Lampiran 7**

**Data penghitungan kematian sel otak yang diamati 48 jam setelah pemberian 2-ME dengan menggunakan mikroskop binokuler pada perbesaran 1000x**

Kelompok	LP	H	M	T	%	$(\bar{X} \pm SD) \%$
<b>K (-)</b>	1	36	2	38	5.2	<b>2.89 ± 3.56</b>
	2	138	0	138	0	
	3	95	2	97	2.06	
	4	157	1	158	0.60	
	5	178	1	179	0.50	
	6	202	3	205	1.46	
	7	51	7	58	12	
	8	127	2	129	1.55	
	9	126	5	131	3.81	
	10	114	2	116	1.72	
<b>K (+)</b>	1	100	84	184	45.65	<b>51.34 ± 10.64</b>
	2	122	101	223	45.29	
	3	120	55	175	31.43	
	4	68	67	135	49.62	
	5	88	64	152	42.11	
	6	88	94	182	51.64	
	7	54	99	153	64.71	
	8	74	106	180	58.9	
	9	48	78	126	61.9	
	10	68	112	180	62.2	
<b>P</b>	1	135	11	146	7.53	<b>10.04 ± 2.13</b>
	2	137	11	148	7.43	
	3	165	12	177	6.78	
	4	166	20	186	10.75	
	5	179	23	202	11.39	
	6	219	26	245	10.61	
	7	193	24	217	11.06	
	8	163	25	188	13.23	
	9	203	22	225	9.78	
	10	186	25	211	11.84	

**Lampiran 8**

Data hasil analisis menggunakan analisis varian (ANOVA) satu arah dan uji LSD (*Least Significant Different*) pada kematian sel otak 24 jam setelah pemberian 2-ME pada kelompok K (-), K (+), dan P

**Oneway****Descriptives**

## Kematian Sel pada 24 jam

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K (-)	10	2.9210	1.7546	.5549	1.6658	4.1762	.00	5.18
K (+)	10	27.6550	9.9970	3.1613	20.5036	34.8064	14.21	43.44
P	10	4.6770	2.6535	.8391	2.7788	6.5752	.00	8.03
Total	30	11.7510	12.8654	2.3489	6.9470	16.5550	.00	43.44

**Test of Homogeneity of Variances**

## Kematian Sel pada 24 jam

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
11.708	2	27	.000

**ANOVA**

## Kematian Sel pada 24 jam

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3809.476	2	1904.738	51.920	.000
Within Groups	990.528	27	36.686		
Total	4800.004	29			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kematian Sel pada 24 jam

LSD

(I) data 1	(J) data 1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K (-)	K(+)	-24.7340*	2.7087	.000	-30.2919	-19.1761
	P	-1.7560	2.7087	.522	-7.3139	3.8019
K (+)	K(-)	24.7340*	2.7087	.000	19.1761	30.2919
	P	22.9780*	2.7087	.000	17.4201	28.5359
P	K(-)	1.7560	2.7087	.522	-3.8019	7.3139
	K(+)	-22.9780*	2.7087	.000	-28.5359	-17.4201

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

## NPar Tests

### Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kematian Sel pada 24 jam	30	11.7510	12.8654	.00	43.44
data 1	30	2.0000	.8305	1.00	3.00

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kematian Sel pada 24 jam	data 1
N		30	30
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	11.7510	2.0000
	Std. Deviation	12.8654	.8305
Most Extreme Differences	Absolute	.280	.219
	Positive	.280	.219
	Negative	-.181	-.219
Kolmogorov-Smirnov Z		1.536	1.200
Asymp. Sig. (2-tailed)		.018	.112

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

**Lampiran 9**

Data hasil analisis menggunakan analisis varian (ANAVA) satu arah dan uji LSD (*Least Significant Different*) pada kematian sel otak 48 jam setelah pemberian 2-ME pada kelompok K (-), K (+), dan P.

**Oneway****Descriptives**

Kematian Sel pada 48 Jam

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K(-)	10	2.8900	3.5650	1.1273	.3398	5.4402	.00	12.00
K(+)	10	51.3450	10.6405	3.3648	43.7332	58.9568	31.43	64.71
P	10	10.0400	2.1322	.6743	8.5147	11.5653	6.78	13.23
Total	30	21.4250	22.6350	4.1326	12.9729	29.8771	.00	64.71

**Test of Homogeneity of Variances**

Kematian Sel pada 48 Jam

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
10.524	2	27	.000

**ANOVA**

Kematian Sel pada 48 Jam

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3683.708	2	6841.854	157.312	.000
Within Groups	1174.288	27	43.492		
Total	4857.997	29			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kematian Sel pada 48 Jam

LSD

(I) data 1	(J) data 1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K(-)	K(+)	-48.4550*	2.9493	.000	-54.5065	-42.4035
	P	-7.1500*	2.9493	.022	-13.2015	-1.0985
K(+)	K(-)	48.4550*	2.9493	.000	42.4035	54.5065
	P	41.3050*	2.9493	.000	35.2535	47.3565
P	K(-)	7.1500*	2.9493	.022	1.0985	13.2015
	K(+)	-41.3050*	2.9493	.000	-47.3565	-35.2535

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

## NPar Tests

### Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kematian Sel pada 48 Jam	30	21.4250	22.6350	.00	64.71
data 1	30	2.0000	.8305	1.00	3.00

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

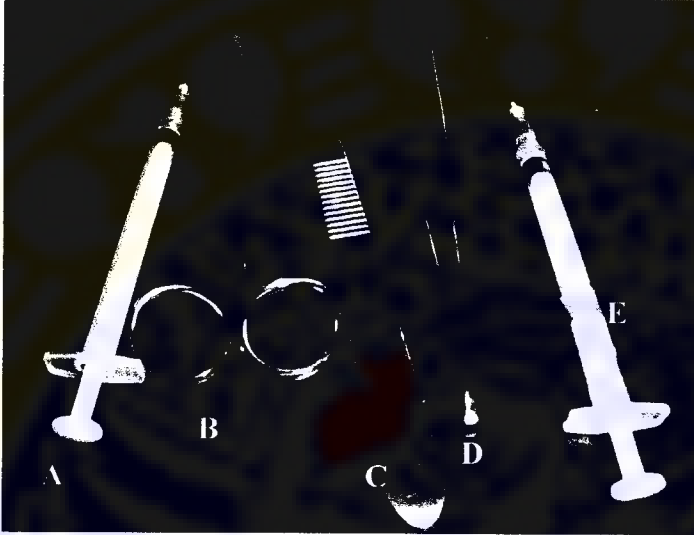
		Kematian Sel pada 48 Jam	data 1
N		30	30
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	21.4250	2.0000
	Std. Deviation	22.6350	.8305
Most Extreme Differences	Absolute	.308	.219
	Positive	.308	.219
	Negative	-.172	-.219
Kolmogorov-Smirnov Z		1.687	1.200
Asymp. Sig. (2-tailed)		.007	.112

a. Test distribution is Normal.

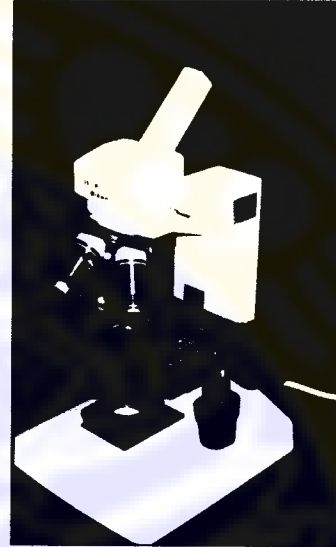
b. Calculated from data.

**Lampiran 10**

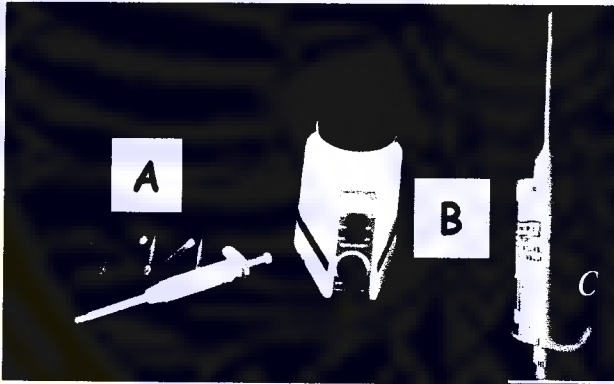
**ALAT PENELITIAN**



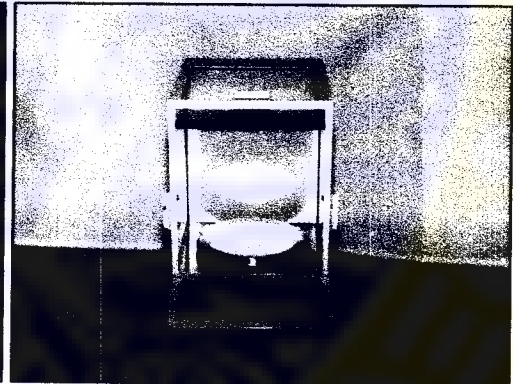
(A) Spuit untuk suntik secara *intraperitoneal*,  
(B) Gunting bedah, (C) Pisau bedah, (D) Sepet  
bedah, (E) Spuit untuk *gavage*



Mikroskop Binokuler



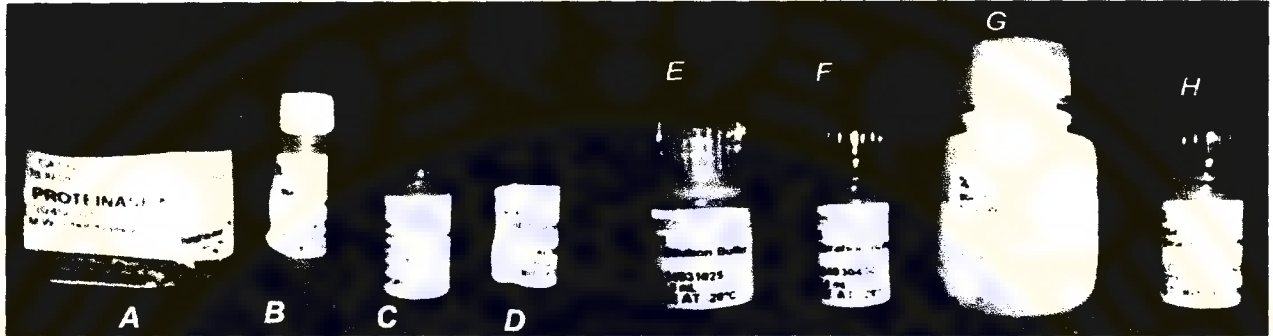
(A) Mikropipet 0,1-1  $\mu$ l  
(B) Stirer  
(C) Mikropipet 10-100 $\mu$ l



Neraca Analitik

*Lampiran 11*

**BAHAN PENELITIAN**

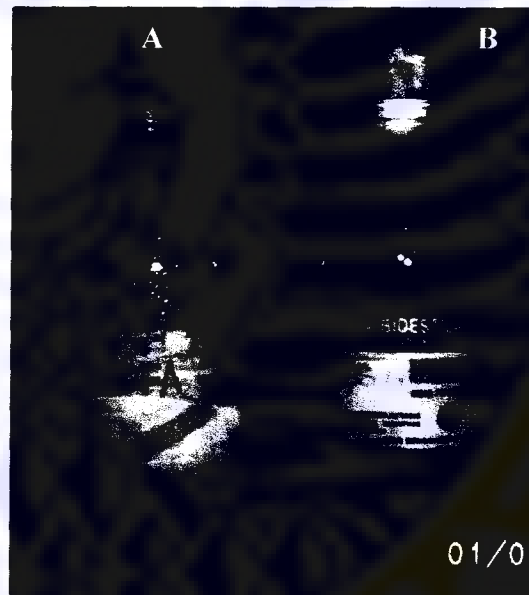


Bahan-bahan untuk pewarnaan imunohistokimia

- |                                |                         |
|--------------------------------|-------------------------|
| A. Proteinase K                | E. DAB Dilution Buffer. |
| B. TdT Enzyme                  | F. Equilibration Buffer |
| C. Anti Digoxigenin Peroxidase | G. Stop/Wash Buffer     |
| D. DAB Substrate               | H. Reaction Buffer      |



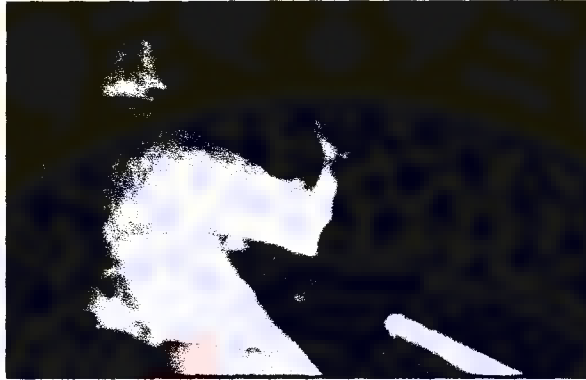
Larutan uji:  
(A) PSK  
(B) 2-Metoksietanol



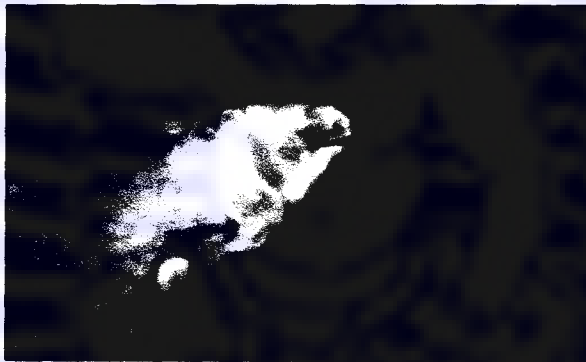
(A) PFA  
(B) PBS

**Lampiran 12**

**PENYUNTIKAN 2-ME SECARA INTRAPERITONEAL, PEMBERIAN  
PSK SECARA *GAVAGE*, DAN KANDANG MENCIT**



Penyuntikan 2-ME secara intraperitoneal



Pemberian PSK secara *gavage*



Tampak depan



Tampak atas

Kandang Mencit (*Mus musculus*)