

**EFEK *2-Methoxyethanol* TERHADAP EKSPRESI PROTEIN
REELIN PADA FETUS MENCIT DENGAN METODE
WESTERN BLOT**

SKRIPSI

MPB 61/05

Agus
e



DIAH AGUSTININGSIH

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

**EFEK 2-Methoxyethanol TERHADAP EKSPRESI PROTEIN
REELIN PADA FETUS MENCIT DENGAN METODE
WESTERN BLOT**

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains Bidang Biologi
Pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Airlangga
Surabaya**


Oleh :

DIAH AGUSTININGSIH
NIM. 080112369

Tanggal Lulus : 12 Agustus 2005

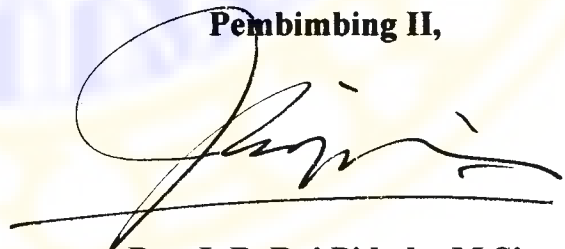
Disetujui oleh :

Pembimbing I,



Drs. Win Darmanto, M.Si., Ph.D
NIP. 131 653 741

Pembimbing II,



Drs. I. B. Rai Pidada, M.Si
NIP. 130 531 824

1. *Abstract*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari 2-Methoxyethanol terhadap sel-sel epitel ginjal tikus. Penelitian ini menggunakan metode kultur sel dengan menggunakan media kultur yang mengandung 2-Methoxyethanol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 2-Methoxyethanol dapat mempengaruhi pertumbuhan sel epitel ginjal tikus. Hal ini dapat dilihat dari perubahan morfologi sel dan jumlah sel yang tumbuh. Penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai efek toksikologi dari 2-Methoxyethanol terhadap sel epitel ginjal tikus.

1. *Abstract*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari 2-Methoxyethanol terhadap sel-sel epitel ginjal tikus. Penelitian ini menggunakan metode kultur sel dengan menggunakan media kultur yang mengandung 2-Methoxyethanol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 2-Methoxyethanol dapat mempengaruhi pertumbuhan sel epitel ginjal tikus. Hal ini dapat dilihat dari perubahan morfologi sel dan jumlah sel yang tumbuh. Penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai efek toksikologi dari 2-Methoxyethanol terhadap sel epitel ginjal tikus.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari 2-Methoxyethanol terhadap sel-sel epitel ginjal tikus. Penelitian ini menggunakan metode kultur sel dengan menggunakan media kultur yang mengandung 2-Methoxyethanol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 2-Methoxyethanol dapat mempengaruhi pertumbuhan sel epitel ginjal tikus. Hal ini dapat dilihat dari perubahan morfologi sel dan jumlah sel yang tumbuh. Penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai efek toksikologi dari 2-Methoxyethanol terhadap sel epitel ginjal tikus.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari 2-Methoxyethanol terhadap sel-sel epitel ginjal tikus. Penelitian ini menggunakan metode kultur sel dengan menggunakan media kultur yang mengandung 2-Methoxyethanol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 2-Methoxyethanol dapat mempengaruhi pertumbuhan sel epitel ginjal tikus. Hal ini dapat dilihat dari perubahan morfologi sel dan jumlah sel yang tumbuh. Penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai efek toksikologi dari 2-Methoxyethanol terhadap sel epitel ginjal tikus.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari 2-Methoxyethanol terhadap sel-sel epitel ginjal tikus. Penelitian ini menggunakan metode kultur sel dengan menggunakan media kultur yang mengandung 2-Methoxyethanol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 2-Methoxyethanol dapat mempengaruhi pertumbuhan sel epitel ginjal tikus. Hal ini dapat dilihat dari perubahan morfologi sel dan jumlah sel yang tumbuh. Penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai efek toksikologi dari 2-Methoxyethanol terhadap sel epitel ginjal tikus.

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Judul : **Efek 2-Methoxyethanol Terhadap Ekspresi Protein Reelin pada Fetus Mencit dengan Metode Western Blot**
Penyusun : **Diah Agustiningsih**
NIM : **080112369**
Tanggal Ujian : **12 Agustus 2005**

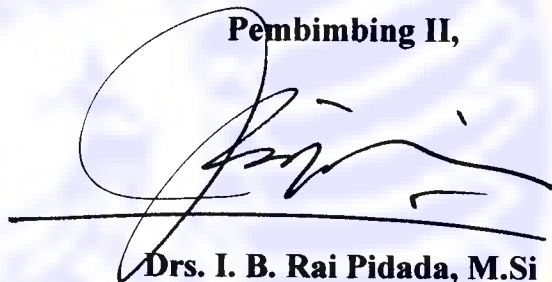
Disetujui oleh :

Pembimbing I,



Drs. Win Darmanto, M.Si., Ph.D
NIP. 131 653 741

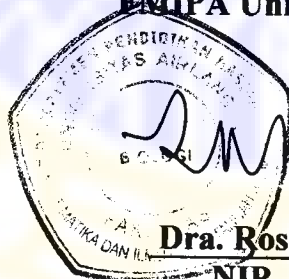
Pembimbing II,



Drs. I. B. Rai Pidada, M.Si
NIP. 130 531 824

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi
EMIPA Universitas Airlangga



Dra. Rosmanida, M.Kes
NIP. 131 126 075

ABSTRAK

Kata Kunci: Efek 2-Methoxyethanol

Abstrak:

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui

efek 2-Methoxyethanol terhadap

sel-sel epitel pada

sel-sel epitel pada

Abstrak:

Kata Kunci:

Abstrak:

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui

efek 2-Methoxyethanol terhadap

sel-sel epitel pada

Abstrak:

Kata Kunci:

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga. Diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan sejin penulis dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah.

Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.



KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penyusun panjatkan kepada Allah SWT. Tanpa rahmat, karunia, dan kekuatan dari Nya penyusun tidak akan mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Efek 2-Methoxyethanol Terhadap Ekspresi Protein Reelin Pada Fetus Mencit Dengan Metode Western Blot”** ini.

Penyusun menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Bapak Drs. Win Darmanto, M.Si., Ph.D selaku pembimbing I dan Bapak Drs. I.B. Rai Pidada, M.Si. selaku pembimbing II atas bimbingan yang diberikan selama penyusun mengerjakan skripsi ini, serta kepada Bapak Drs. Eko Prihiyantoro, M.Kes. atas masukan-masukannya demi penyelesaian skripsi ini. Penyusun ucapkan terima kasih kepada semua pihak atas dukungan dan partisipasinya selama ini.

Penyusun menyadari bahwa dalam skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penyusun berharap kepada semua pihak untuk berkenan memberikan kritik dan sarannya demi kesempurnaan skripsi ini.

Surabaya, 2 Agustus 2005

Penyusun

UCAPAN TERIMA KASIH

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan banyak pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini tak lupa pula penyusun mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Drs. Win Darmanto, M.Si, Ph.D selaku dosen pembimbing I yang dengan penuh kearifan telah banyak memberikan arahan dan bimbingan selama penulisan skripsi ini.
2. Bapak Drs. I.B. Rai Pidada, M.Si. selaku dosen pembimbing II yang dengan penuh kesabaran telah banyak memberikan arahan dan bimbingan selama penulisan skripsi ini.
3. Bapak Sugiharto S.Si, M.Si. selaku dosen penguji III dan Bapak Drs. Salamun, M.Kes selaku penguji IV atas nasehat-nasehat yang berharga guna terselesainya skripsi ini.
4. Ibu Dr. Ir. Tini Surtiningsih DEA selaku dosen wali yang telah banyak memberikan bimbingan selama menempuh pendidikan di Biologi FMIPA UNAIR.
5. Bapak Drs. Eko Prihiyantoro, M. Kes. yang telah mengizinkan penyusun untuk ikut dalam penelitian beliau.
6. Bapak dan Ibu dosen di jurusan Biologi atas dedikasinya yang telah mendidik dengan penuh keikhlasan.
7. Ibu (untuk doa dan kasih sayangnya), adik-adikku dan Mas Imam.
8. Buat Arya makasih untuk semuanya, ayo cepetan lulus aku tunggu lho!
9. Segenap karyawan Biologi (Pak Dji, Pak Sunar, Pak Warni, Mas Eko, Mbak Yatminah, Mbak Ari, Mbak Wuri dan Mas Yanto) atas dukungan dan kerjasamanya.
10. Teman-temanku angkatan 2001 (keluarga besarku di Biologi yang selalu ada dan mendukungku). Ana makasih banyak sudah mau jadi sahabatku, Tika maaf kadang nyakitin, Ayu smoga kita masih bisa bareng terus, Heppy temen lama yang baru aku kenal aslinya, ternyata menyenangkan, Azi' anak kecil yang banyak maunya & baik hati, Anik jadi diri sendiri ya!, Bos Ika makasih

banyak bantuannya, Neo makasih ngajinya, Echi ayo berjuang bareng!, Ate ak belajar banyak dari kamu, Rina & Kuri makasih mau nerima ak jadi tim mencit, Andien & Ais trus semangat ntar lagi slesai, Indri makasih banyak kalkulus & statelnya, Jamilah, Khuro, Linda, Erni tetap semangat & harus sabar, Yasmin, Nori, Desimon, Anita B, Qoqom, Amel thaks dah berbagi semangat, Heni, Eka, Yuli, Sulis thaks sudah nemenin les, Tanti makasih banyak kameranya, Momon thanks buku statelnya, Eno' ayo kamu bisa!, Mila, Dini, Irfan, Ical, Nabil & Muslimin.

11. Keluarga besar PEKSIA ('93 - '04) makasih untuk semua pengalaman yang menyenangkan.
12. Seluruh warga HIMBIO angkatan'98 (Mas Hervin), '99 (mbak Prim, mbak Sasi, Mbak Endah, Mas Ulum, dll), '00(mbak Yayuk, Mbak Din, Mbak Era, mbak Dian Wahyu, dll), '02 (Momo, Vld, Pepeh, Temen-temen PKL thanks a lot, dll) '03 (Putri, Sari, Vivin, Ayunda, dll) dan '04 yang selalu membantu dan mendukung selama menjalani kuliah di Biologi.
13. Anak-anak "Jum" (Windhu (makasih mau dengerin ak ngomel), Iim, Pipik (makasih banyak komputernya ya!), Feni, Tommy, Sigit, Prakoso, Anas, dll) and Jum sendiri, yang buat ak semangat untuk cepet lulus.
14. Dan semua pihak yang tidak bisa penyusun sebut satu persatu.

Penyusun berharap semoga Semua bantuan yang telah diberikan dengan penuh keikhlasan akan mendapat pahala yang tak ternilai dari Allah Subhanahu wa ta'ala. Amin.

Diah Agustiniingsih, 2005. Efek *2-Methoxyethanol* Terhadap Ekspresi Protein Reelin Pada Fetus Mencit Dengan Metode Western Blot. SKRIPSI. Di bawah bimbingan Drs. Windarmanto M. Si., Ph.D dan Drs. I. B. Rai Pidada, M.Si. Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Senyawa *2-Methoxyethanol* (2-ME) banyak digunakan sebagai pelarut dalam industri cat, vernis, zat warna kuku dan tinta. Di sisi lain manusia kurang menyadari bahwa senyawa ini dapat memberikan pengaruh buruk bagi kesehatan.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui (1) adanya kematian sel neural, (2) adanya perubahan profil total protein pada perkembangan otak fetus dan (3) pengaruh 2-ME terhadap ekspresi protein Reelin pada otak fetus mencit (*Mus musculus*).

Induk mencit bunting diinjeksi 2-ME dengan dosis tunggal 12,5 mmol/kg berat badan (BB) pada umur kebuntingan (UK) 15 hari melalui injeksi intraperitoneal. Untuk mengetahui pengaruh 2-ME terhadap kematian sel, mencit dibedah pada UK-17 hari. Kemudian otak fetus diambil dan disimpan dalam PFA 4% untuk selanjutnya dibuat preparat histologi dengan pewarnaan HE (Hematoxylin-Eosin). Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000 X. Sedangkan untuk pengamatan profil total protein dan ekspresi protein Reelin, mencit dibedah pada UK-17, 18, dan 19 hari. Kemudian otak diambil dan diekstraksi. Hasil ekstraksi kemudian dielektroforesis dengan SDS-PAGE sehingga didapatkan profil total protein. Selanjutnya adalah metode Western blot yang dilakukan pada band hasil elektroforesis sehingga didapatkan protein Reelin. Untuk mengetahui kadar protein baik profil total maupun protein Reelin diperoleh melalui densitometri. Rata-rata persentase kematian sel neuron dianalisis dengan Wilcoxon Signed Rank Test, sedangkan perubahan profil total protein dan ekspresi protein Reelin dianalisis dengan pendekatan deskriptif.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 2-ME menyebabkan peningkatan jumlah kematian sel yang signifikan. Hasil pengamatan profil total protein adalah menurunnya kadar protein pada kelompok perlakuan 2-ME UK-17 hari dan UK-18 hari jika dibandingkan dengan kelompok kontrolnya. Sedangkan ekspresi protein Reelin menunjukkan adanya penurunan kadar protein Reelin pada kelompok perlakuan 2-ME UK-17 hari jika dibandingkan dengan kelompok kontrolnya.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa injeksi 2-ME pada UK-15 hari menyebabkan tingginya kematian sel neural dan perubahan profil total protein, juga penurunan ekspresi protein Reelin di otak fetus mencit.

Kata kunci : 2-ME, kematian sel, protein Reelin, Western blot.

Agustiningsih, Diah. 2005. *The Effect of 2-Methoxyethanol to The Expression of Reelin in Mice Fetus by Western Blot*. This script under tuition Drs. Win Darmanto, M.Si. Ph.D and Drs. I.B. Rai Pidada, M. Si. Biology Departmen, Mathematics and Natural Science Faculty, Airlangga University, Surabaya.

ABSTRACT

2-Methoxyethanol (2-ME) is widely used as solvent in paints, varnishes, nail polishes and ink industry. It is many consumed by human, however they are not aware of the negative effects of 2-ME which is toxic and teratogenic.

The purpose of this research are to observe (1) the existence of neuronal cell death at fetus brain, (2) the existence of total profile protein changes at fetus brain and (3) the effect of 2-ME in the expression of Reelin at fetus brain of mice.

The treatment mice were injected with 2-ME at dose 12.5 mmol/kg body weight on gestational day 15 (GD 15) intraperitoneally, while control mice were injected with aquadest. On the observation of cytotoxic effects of 2-ME mice were killed on GD 17, fetus brain were collected and fixated on Paraformaldehyde (PFA) 4% then were observed histologically. While on the observation of total profile protein and the expression of Reelin, mice were killed on GD 17, GD 18 and GD 19. Fetus brain were collected and extracted. The results of extraction were ran in gel electrophoresis with SDS-PAGE and got total profile protein. The next step gel were blotted to nitrocellulose membrane and hybridized with anti CR-50, as a anti-Reelin.

The average percentage of cell death which analyzed with Wilcoxon Signed Rank Test on $\alpha=0.05$, and showed that 2-ME caused significantly increased in the number of cell death. The descriptive analysis about total profile protein and the expression of Reelin indicating that 2-ME also caused the decrease of rate both total profile protein and the expression of Reelin at the fetus brain.

The conclusion of this research proved that 2-ME injected on GD 15 caused the neuronal cell death, decreased of both total profile protein and expression of Reelin at fetus brain of mice.

Keywords: 2-Methoxyethanol, cell death, cerebrum, mice, Reelin, Western blot.

DAFTAR ISI

Judul	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
UCAPAN TERIMAKASIH.....	ii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT.....	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Asumsi Penelitian.....	5
1.4 Hipotesis Penelitian.....	6
1.4.1 Hipotesis kerja.....	6
1.4.2 Hipotesis statistik.....	6
1.5 Tujuan Penelitian.....	7
1.6 Manfaat Penelitian.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Tinjauan Tentang 2-Methoxyethanol (2-ME).....	8
2.1.1 Struktur kimia 2-ME.....	8
2.1.2 Metabolisme 2-ME.....	8
2.1.3 Embriotoksisitas dan teratogenitas 2-ME.....	9
2.2 Tinjauan Tentang Mencit.....	11
2.2.1 Klasifikasi mencit.....	11
2.2.2 Fertilisasi.....	12
2.2.3 Perkembangan normal mencit.....	12
2.3 Tinjauan Tentang Perkembangan Otak Mencit.....	13
2.3.1 Proses migrasi sel saraf.....	14
2.4 Tinjauan Tentang Kematian Sel.....	16
2.5 Tinjauan Tentang Protein Reelin.....	18
BAB III METODE PENELITIAN.....	20
3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian.....	20
3.2 Materi Penelitian.....	20
3.2.1 Hewan coba.....	20
3.2.2 Bahan Penelitian.....	21
3.2.3 Alat Penelitian.....	21
3.3 Rancangan Penelitian.....	21
3.4 Variabel Penelitian.....	21

3.5	Prosedur Penelitian.....	22
3.5.1	Tahap persiapan.....	22
3.5.2	Tahap perkawinan	22
3.5.3	Pembuatan larutan uji.....	23
3.5.4	Perlakuan	23
3.5.5	Pengambilan sampel.....	23
3.5.6	Tahap pembuatan preparat histologi	24
3.5.7	Pengamatan preparat histologi	25
3.5.8	Tahap ekstraksi.....	25
3.5.9	Tahap elektroforesis	26
3.6	Pengumpulan Data	28
3.6.1	Kematian sel pada otak fetus mencit.....	29
3.6.2	Penentuan profil total protein dan ekspresi protein Reelin	29
3.7	Analisis Data	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....		32
4.1	Hasil Penelitian.....	32
4.1.1	Kematian sel pada otak fetus mencit.....	32
4.1.2	Penentuan profil total protein dan ekspresi protein Reelin akibat pemberian <i>2-Methoxyethanol</i> (2-ME)....	35
4.2	Pembahasan	39
4.2.1	Kematian sel pada otak fetus mencit.....	39
4.2.2	Profil total protein dan kadar protein Reelin pada otak fetus mencit.....	41
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....		45
5.1	Kesimpulan.....	45
5.2	Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA.....		46
LAMPIRAN		

DAFTAR TABEL

<u>Nomor</u>	<u>Judul Tabel</u>	<u>Halaman</u>
3.1	Tabel Perlakuan.....	23
4.1	Rata-rata persentase sel otak yang mengalami kematian pada pembedahan 12 jam setelah pemberian 2-ME 12,5 mmol/kg berat badan pada umur kebuntingan 15 hari melalui injeksi intraperitoneal.....	34
4.2	Kadar total protein yang diukur berdasarkan densitas band melalui densitometri.....	37
4.3	Kadar protein Reelin dalam persen setelah dilakukan densitometri	39

DAFTAR GAMBAR

<u>Nomor</u>	<u>Judul Gambar</u>	<u>Halaman</u>
2.1	Bagan Metabolisme 2-ME.....	9
4.1	<i>Cerebrum</i> fetus mencit pada pembedahan 48 jam setelah injeksi 2-ME, perbesaran 2200 X	33
4.2	Histogram persentasi kematian sel neural di <i>cerebral cortex</i> fetus Mencit.....	35
4.3	Profil total protein pada otak fetus mencit (<i>Mus musculus</i>) pada gel elektroforesis dengan SDS-PAGE.....	36
4.3	Ekspresi protein Reelin pada otak fetus mencit (<i>Mus musculus</i>) melalui metode Western blot	38

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul Lampiran
1	Pembuatan Larutan Uji
2	Prosedur Western Blot
3	Pembuatan PBS 1X
4	Pembuatan PFA 4 %
5	Data persentase kematian sel pada <i>cerebral cortex</i> pada pembedahan 48 jam setelah diinjeksi 2-ME
6	Uji Wilcoxon untuk persentase kematian sel pada <i>cerebral cortex</i> pada pembedahan 48 jam setelah diinjeksi 2-ME
7	Hasil densitometri
8	Foto alat dan bahan

BAB I

PENDAHULUAN

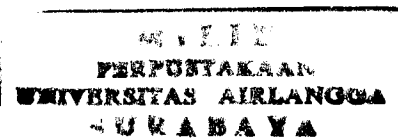
1.1 Latar Belakang Permasalahan

Keinginan manusia untuk meningkatkan kualitas hidupnya semakin tinggi, sehingga mereka banyak memanfaatkan kemajuan industri dan teknologi. Telah banyak bukti bahwa kemajuan industri dan teknologi membuat tingkat kehidupan yang lebih baik. Namun selain dampak positif, ada dampak negatifnya, diantaranya menyebabkan pencemaran yang beresiko terhadap kesehatan.

Penggunaan bahan kimia untuk industri sangat meningkat. Walaupun pemakaian zat kimia yang toksik sudah dilarang dan dibatasi pemakaiannya, namun penggunaan bahan kimia tersebut terus saja berlangsung, sehingga pemaparan zat yang membahayakan tersebut tidak dapat dihindari. Masuknya zat kimia di dalam tubuh, sebagian besar melalui pernafasan dan melalui kontak kulit (Kusnopranto, 1995).

Salah satu zat kimia yang bersifat toksik dan sering digunakan dalam industri cat adalah senyawa *2-methoxyethanol* (2-ME). Senyawa ini disebut juga *Ethylene Glycol Monomethyl Ether* (EGME). Penggunaan senyawa 2-ME dalam industri adalah sebagai bahan pelarut, minyak cat, bahan dalam pembuatan cat kuku dan pembersihnya (Horton *et al.*, 1985).

Senyawa 2-ME banyak digunakan sebagai pelarut organik dalam industri alat rumah tangga, khususnya alat-alat yang terbuat dari bahan plastik. Hasil oksidasi dari 2-ME di dalam sel jaringan hepar adalah *methoxyacetid acid* (MAA)



(Wine *et al.*, 1997). Sifat teratogenik 2-ME diketahui sebagai efek dari hasil metabolisme 2-ME menjadi MAA oleh enzim *alcohol dehydrogenase* (ADH) (Moslen *et al.*, 1995).

Efek toksik dari 2-ME antara lain dapat menyebabkan terjadinya kematian sel, terutama pada embrio yang mempunyai tingkat kerentanan tinggi terhadap terpaparnya suatu bahan toksik. Namun apakah kematian sel tersebut dalam bentuk apoptosis atau nekrosis belum diketahui lebih lanjut. Efek toksik dari 2-ME tersebut dibuktikan melalui berbagai penelitian yang telah dilakukan dengan menggunakan hewan coba. Menurut penelitian Harimiswari (2003), pemberian 2-ME pada mencit betina dosis 10 mmol/kg berat badan melalui injeksi intraperitoneal pada umur kebuntingan 17 hari menyebabkan kematian sel granulosa di daerah *External Granular Layer* (EGL) *cerebellum* fetus dan mulai terlihat 12 jam setelah injeksi.

Perkembangan otak diawali oleh penutupan *neural tube*. Pada saat ini sel *neuroepithelium* bermigrasi dan menempati beberapa lapisan yang berlainan (Carlson, 1988). Proses migrasi sel ini terjadi melalui beraturan dan berhenti pada lokasi yang benar (Gilbert, 1985). Bila pada saat ini fetus terpapar dengan 2-ME dapat menyebabkan beberapa kelainan pada otaknya, misalnya *anencephaly*, *exencephaly*, dan *spina bifida*. Pada umur kebuntingan 15 hari, dinding otak fetus mencit mengalami penebalan dan pembesaran pada bagian tertentu yaitu pada bagian *cerebral hemisphere*, *mesencephalon*, *metencephalon*, *myelencephalon*, serta terjadi pertumbuhan *cerebrum* yang sangat cepat. Bila pada saat tersebut

induk mencit terpapar 2-ME kemungkinan akan menyebabkan kelainan otak pada fetus yang dikandung.

Aldila (2004) melaporkan bahwa pemberian 2-ME 15 mmol/kg berat badan melalui injeksi intraperitoneal pada umur kebuntingan 15 hari dapat menyebabkan kematian sel otak pada fetusnya. Dilaporkan bahwa sistem saraf dan peredaran darah adalah sistem organ target dari toksisitas 2-ME (Cohen, 1984 dan Cook *et al.*, 1982 dalam Anonimus, 1991). Penelitian yang lain melaporkan bahwa MAA menghambat sintesis DNA dan RNA (Rumanta *et al.*, 2001), sehingga sintesis protein yang seharusnya terjadi juga terhambat. Sel neuron juga berproliferasi dalam proses pembentukan otak. Keadaan ini memungkinkan bagi sel neuron untuk dapat dihambat oleh MAA sebagai metabolit 2-ME sehingga menyebabkan kematiannya.

Berbagai protein ekstraseluler seperti CAM (*cell adhesion molecule*) terlibat dalam migrasi sel (Crossin *et al.*, 1990 dalam Harmonis 2001). Jenis CAM seperti *tenascin*, *neural cell adhesion molecule* (NCAM), *fibronectin* dan Reelin diketahui berperan penting dalam proses migrasi, penempatan sel saraf dan perkembangan otak (Darmanto *et al.*, 1999).

Protein Reelin diekspresikan oleh sel granulosa di bagian *cerebellum* dan sel neuron di bagian *cerebrum* mencit. Penelitian yang dilakukan Darmanto *et al.*, (2000) menunjukkan bahwa akibat radiasi sinar X pada tikus bunting, menyebabkan kematian sel granulosa di bagian *cerebellum*, dan mengakibatkan ekspresi protein ekstraseluler reelin dan NCAM menurun.

Syed dan Hecht (1998) melaporkan bahwa perlakuan dengan MAA melalui *in vitro* maupun *in vivo* pada sel Sertoli dapat menurunkan jumlah transkrip 538 nukleotida. Lebih lanjut diketahui bahwa transkrip 538 itu pada tingkat nukleotida memiliki homologi 91% terhadap fosfodiesterase (PDE). Fungsi PDE antara lain menghidrolisis AMP siklik (cAMP) menjadi AMP nonsiklik. Dengan demikian, bila terjadi penurunan aktivitas PDE akan menyebabkan peningkatan cAMP intraseluler, dan cenderung meningkatkan kematian sel granulosa (Aharoni *et al.*, 1995).

Western blot adalah salah satu metode pewarnaan yang digunakan untuk mencirikan protein. Suwarno *et al.*, (2001) melakukan analisis protein untuk mengetahui bobot molekul protein dengan teknik elektroforesis SDS-PAGE, sedangkan pencirian protein dilakukan dengan teknik Western blot menggunakan antibodi yang spesifik terhadap protein yang akan diidentifikasi.

Penelitian ini dirancang untuk membuktikan apakah 2-ME mengakibatkan kematian sel neuron sehingga mempengaruhi ekspresi protein. Oleh karena itu rancangan penelitian difokuskan pada pengukuran profil protein total dan kadar protein reelin akibat pemberian 2-ME dengan metode Western blot.

1.2 Rumusan Masalah

- 1) Apakah pemberian 2-ME 12,5 mmol/kg berat badan melalui injeksi intraperitoneal pada umur kebuntingan 15 hari mampu menyebabkan kematian sel neural fetus mencit (*Mus musculus*) ?
- 2) Apakah pemberian 2-ME 12,5 mmol/kg berat badan melalui injeksi intraperitoneal pada umur kebuntingan 15 hari dapat menyebabkan perubahan profil total protein pada perkembangan otak fetus mencit (*Mus musculus*) ?
- 3) Apakah pemberian 2-ME 12,5 mmol/kg berat badan melalui injeksi intraperitoneal pada umur kebuntingan 15 hari dapat menyebabkan perubahan sintesis protein Reelin pada perkembangan otak fetus mencit (*Mus musculus*) ?

1.3 Asumsi Penelitian

2-Methoxyethanol (2-ME) merupakan senyawa kimia yang diketahui mempunyai efek embriotoksik pada penghambatan perkembangan otak embrio mencit melalui terjadinya kematian sel. Protein Reelin adalah protein yang disekresikan oleh sel granulosa di *cerebellum* dan sel-sel neural di *cerebrum* mencit. Pada umur kebuntingan 15 hari, dinding otak fetus mencit mengalami penebalan dan pembesaran pada bagian tertentu yaitu pada bagian *cerebral hemisphere*, *mesencephalon*, *metencephalon*, *myelencephalon*, serta terjadi pertumbuhan *cerebrum* yang sangat cepat. Apabila 2-ME diberikan pada induk mencit pada umur kebuntingan 15 hari dapat mengakibatkan kematian sel neural

di *cerebrum*, sehingga kadar protein Reelin yang disekresikan akan menurun dan dapat diamati dengan metode Western blot.

1.4 Hipotesis Penelitian

1.4.1 Hipotesis Kerja

1. Jika 2-ME bersifat toksik, maka pemberian 2-ME pada induk mencit (*Mus musculus*) pada umur kebuntingan 15 hari dengan dosis 12,5 mmol/kg berat badan akan menyebabkan kematian sel neural fetusnya.
2. Jika 2-ME bersifat toksik dan teratogenik bagi perkembangan otak janin, maka pemberian 2-ME pada induk mencit (*Mus musculus*) pada umur kebuntingan 15 hari dengan dosis 12,5 mmol/kg berat badan akan mengganggu perkembangan otak yang terlihat dari terhambatnya sintesis protein total pada *cerebrum* fetusnya.
3. Jika 2-ME bersifat toksik dan teratogenik bagi perkembangan otak janin, maka pemberian 2-ME pada induk mencit (*Mus musculus*) pada umur kebuntingan 15 hari dengan dosis 12,5 mmol/kg berat badan akan mengganggu perkembangan otak yang terlihat dari terhambatnya sintesis protein Reelin pada *cerebrum* fetusnya.

1.4.2 Hipotesis Statistik

Ho : Tidak ada perbedaan rata-rata jumlah sel calon otak yang mengalami kematian sel antara kelompok perlakuan dan kontrol.

Ha : Ada perbedaan rata-rata jumlah sel calon otak yang mati antara kelompok perlakuan dan kontrol.

1.5 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui adanya pengaruh 2-ME terhadap kematian sel neural fetus mencit (*Mus musculus*) bila induk diberi senyawa 2-ME melalui injeksi intraperitoneal pada umur kebuntingan 15 hari.
2. Mengetahui adanya pengaruh 2-ME terhadap profil total protein pada perkembangan otak fetus mencit (*Mus musculus*) bila induk diberi senyawa 2-ME melalui injeksi intraperitoneal pada umur kebuntingan 15 hari.
3. Mengetahui adanya pengaruh 2-ME terhadap sintesis protein Reelin pada perkembangan otak fetus mencit (*Mus musculus*) bila induk diberi senyawa 2-ME melalui injeksi intraperitoneal pada umur kebuntingan 15 hari.

1.6 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dipakai sebagai informasi ilmiah mengenai pengaruh 2-ME terhadap kematian sel neural di otak, profil total protein di *cerebrum* dan sintesis protein Reelin pada perkembangan otak mencit (*Mus musculus*). Sehingga dapat digunakan sebagai pertimbangan dalam penggunaan 2-ME.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang 2-ME

2.1.1 Struktur kimia 2-ME

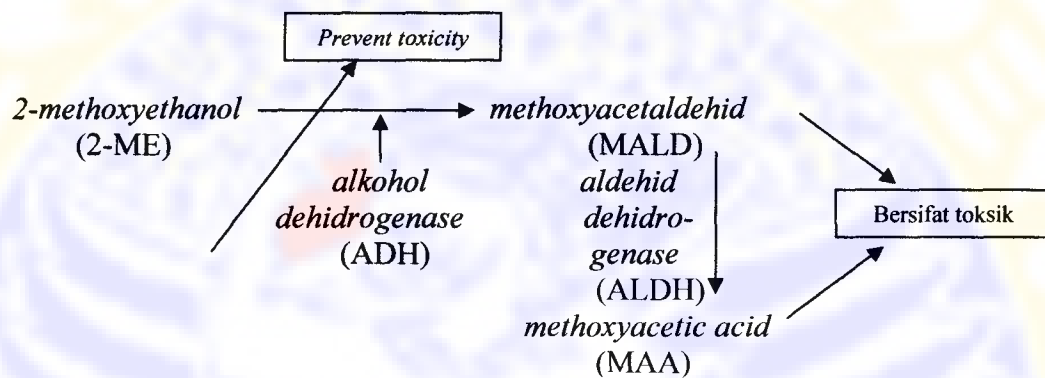
Senyawa *2-methoxyethanol* (2-ME) adalah sinonim dengan *ethylene glycol monomethyl ether*, senyawa tersebut merupakan metabolit hasil hidrolisis *dimethyl phtalat* atau DMEP (Ritter *et al.*, 1985) dengan rumus kimia yaitu HO-CH₂-CH₂-O-CH₃ (Doull *et al.*, 1980).

2.1.2 Metabolisme 2-ME

Di alam, 2-ME kurang memiliki sifat toksik terhadap mikroorganisme dan organisme perairan karena dapat mengalami biodegradasi sehingga sedikit mempunyai kecenderungan bioakumulasi (Anonimus, 1986).

2-ME telah dinyatakan toksik oleh ECWWs pada tahun 2004 berdasarkan waktu paruhnya yang panjang sehingga mempengaruhi lingkungan dan diversitas biologi. Di alam, 2-ME mempunyai waktu paruh yang berbeda-beda. 2-ME mampu bereaksi dengan radikal hidroksil dengan waktu paruh 18 jam di udara, sedangkan di permukaan air dan tanah aerobik 2-ME dapat terbiodegradasi dengan waktu paruh 1-4 minggu (Anonimus, 2004). 2-ME dapat masuk ke dalam tubuh organisme antara lain melalui sistem pernafasan, kulit, sistem pencernaan dan melalui perlakuan khusus. Oleh karena itu 2-ME mempunyai potensi yang sangat besar dalam menginfeksi organisme (Ritter *et al.*, 1985).

Dalam tubuh organisme, 2-ME mengalami metabolisme menjadi senyawa metabolit *2-methoxyacetaldehid* (MALD) dan *2-methoxyacetic acid* (MAA) dengan katalisator *alcohol dehidrogenase* (ADH) (Moslen *et al.*, 1995). Senyawa metabolit MALD dan MAA diketahui bersifat toksik (Moslen *et al.*, 1995) dan teratogenik (Darmanto, 1993).



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

Besar konsentrasi MAA di dalam embrio adalah dua kali lebih besar dari konsentrasi MAA pada serum induk dengan selang waktu 2 jam, 8 jam dan 24 jam setelah pemberian 2-ME. Senyawa MAA dalam induk dan embrio lambat diekskresi (Scott *et al.*, 1987).

Waktu paruh MAA di dalam tubuh lebih kurang 20 jam sehingga dapat mengakibatkan terjadinya akumulasi dalam plasma induk (Scott *et al.*, 1989).

2.1.3 Embriotoksisitas dan teratogenitas 2-ME

Beberapa hewan percobaan menunjukkan respon teratogenik terhadap 2-ME, baik yang diberikan melalui pernafasan maupun pencernaan. Pemberian 2-ME pada mencit CD-1 melalui *gavage* dengan dosis tunggal 500 mg/kg berat badan pada umur kebuntingan 7-10 hari menyebabkan fetus mengalami

exencephaly dan kelainan anggota, serta menunjukkan bahwa anggota depan lebih peka dari pada anggota belakang (Horton *et al.*, 1985).

Penelitian Morissey *et al.*, (1989) dengan menggunakan tikus Fischer 344 yang diberi 2-ME secara *gavage* pada umur kebuntingan 6-15 hari dengan dosis 12,5; 25; 50 atau 100 mg/kg berat badan/hari dapat menyebabkan penurunan berat badan induk yang disertai dengan penurunan berat uterus, peningkatan resorpsi, penurunan jumlah fetus hidup dan menurunkan berat badan anak tikus serta kemampuan hidup anak tikus.

Induk tikus Wistar-Porton diinjeksi MAA melalui intraperitoneal dengan dosis 2,5 mmol/kg berat badan pada umur kebuntingan 8, 10, 12 atau 14 hari menyebabkan kematian embrio dan menyebabkan kelainan perkembangan berupa kelainan rangka, *hidrosefalus* dan *hidronefrosis* (Brown *et al.*, 1984).

Penelitian tentang embriotoksisitas pada primata non manusia dengan menggunakan *Macaca fascicularis* bunting yang diberi perlakuan 2-ME melalui *gavage* dengan dosis 0,16; 0,32 dan 0,47 mmol/kg berat badan pada umur kebuntingan 20-45 hari menyebabkan kematian embrio yang tinggi (Scott *et al.*, 1989).

Induk mencit yang diberi MAA dengan dosis tunggal sebesar 1,0; 1,5 atau 2,0 mmol/kg berat badan secara injeksi intraperitoneal pada umur kebuntingan 7, 9, 11 atau 13 hari menyebabkan kelainan anggota badan, kelainan rangka, *hidrosefalus* dan *hidronefrosis* (Darmanto, 1993).

Penelitian Darmanto (1998) pada mencit putih yang bunting diberi 2-ME dengan dosis 15 mmol/kg berat badan melalui injeksi intraperitoneal pada umur

kebuntingan 8 hari menyebabkan fetus mencit mengalami kelainan *vertebrae* (kelainan tulang belakang) dan kelainan perkembangan sistem saraf berupa *spina bifida*.

2.2 Tinjauan Tentang Mencit

2.2.1 Klasifikasi mencit (Jasin 1984).

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Sub phylum	: Vertebrata
Classis	: Mammalia
Sub classis	: Theria
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Mus</i>
Species	: <i>Mus musculus</i>

Merupakan hewan pengerat berkaki empat, setiap kaki berjari lima, tubuh ditutupi rambut berwarna putih, pada kondisi tertentu bersifat kanibalisme, masa hidup antara 2,5 – 3 tahun, masa reproduksi 2 – 14 bulan, mencit jantan lebih agresif dengan perawakan lebih besar, mencit betina siap untuk bunting pada umur 7 – 8 minggu, lama kebuntingan 19 – 20 hari, jumlah anak yang dilahirkan rata-rata 10 ekor (Rugh, 1968).

2.2.2 Fertilisasi

Seperti mammalia pada umumnya, mencit betina siap menerima mencit jantan selama masa estrus. Pada mencit, ovulasi dapat terjadi setelah ada induksi kopulasi. Tanda-tanda dari masa estrus dapat diketahui melalui pengamatan kondisi vulva dan hapusan vagina. Perkawinan dapat terjadi pada tengah malam atau pagi hari. Interval ovulasi dan fertilisasi lebih kurang lima jam.

Setelah terjadi kopulasi, sekresi vesikula seminalis akan mengalami koagulasi membentuk sumbat vagina, yang merupakan tanda telah terjadi perkawinan dan dianggap sebagai umur kebuntingan nol hari. Sumbat tersebut biasanya tidak dilepas sampai 12 jam setelah kopulasi. Terkadang sumbat ini tidak bisa dilihat (Rugh, 1968).

2.2.3 Perkembangan normal mencit

Setelah terjadi fertilisasi, ovum dan sperma akan membentuk pronuklei jantan dan betina. Kemudian pronuklei jantan dan betina akan berfusi membentuk embrio. Kemudian pada umur kebuntingan 1 hari akan terjadi pembelahan pada embrio menjadi 2 sel di dalam oviduk. Keesokan harinya akan terjadi pembelahan lagi 2 – 16 sel dan akan bermigrasi dari oviduk menuju uterus. Di uterus, embrio ini akan melewati fase morula sampai berumur 3 hari. Tepat pada umur kebuntingan 4 hari terbentuk blastula dan terjadi nidasi dan implantasi awal di dinding uterus (Rugh, 1968).

Pada umur kebuntingan 7 hari mulai pembentukan otak yang diawali dengan terbentuknya *neural plate*. Pada umur kebuntingan 11 hari terjadi evaginasi *epiphysis* dan *hipophysis* otak. Sefalisasi terjadi pada embrio saat

berusia 13 hari. Fetus mencit akan lahir pada umur kebuntingan 19 – 20 hari (Rugh,1968).

2.3 Tinjauan Tentang Perkembangan Otak Mencit

Embrio pada tahap awal akan memperlihatkan penebalan sel *ectoderm* pada daerah dorsal. *Notochord* yang terletak di bawahnya menginduksi sel tersebut hingga menjadi *neural plate*. *Neural plate* di sepanjang batas lateral tumbuh lebih cepat dibandingkan yang terletak di tengah. Sehingga terbentuklah *neural fold* pada bagian kanan dan kiri dan setelah itu tumbuhlah *neural groove* kemudian bergabung dan terbentuk *neural tube* (Frandsen, 1992).

Neural tube pada pertumbuhan selanjutnya dibagian anterior akan menjadi *encephalon* dan dibagian posterior akan menjadi *medulla spinalis*. Selanjutnya *encephalon* akan berkembang menjadi tiga bagian utama yaitu *prosencephalon* (otak depan), *mesencephalon* (otak tengah), dan *rhombencephalon* (otak belakang) (Yatim, 1990).

Perkembangan otak mencit mulai terbentuk pada umur kebuntingan 7 hari yang diawali terbentuknya *neural plate* (keping otak). Kemudian pada umur kebuntingan 8 sampai 8 ½ hari terjadi penutupan *neural tube* dan *neuropore* bagian anterior, terbentuk 3 vesikel utama dan *rhombencephalon*. Pada umur kebuntingan 10 hari, otak telah terbagi 3 bagian utama dan dua hari selanjutnya *metencephalon* (*cerebellum*) terbentuk yang pada 12 ½ hari mengalami penebalan. *Epiphysis*, *optic thalamus*, *foramen of monroe* terlihat jelas dan sebagian *hemisphere* menutup *diencephalon* terjadi pada umur kebuntingan 13 hari. Kemudian pada umur kebuntingan 15 hari semua bagian yang telah terbentuk

mengalami pembesaran lebih lanjut, *cerebellum* masuk diantara *mesencephalon*, dan *spinal cord*. Selain itu *optik chiasma*, *infundibulum* terlihat jelas, *foramen of monroe* mengalami reduksi dan terjadi diferensiasi beberapa lapisan otak yaitu lapisan *mantel*, *germinal*, *marginal* yang dimulai pada umur kebuntingan 13 hari. Selain itu pada saat ini terjadi pertumbuhan *cerebrum* yang sangat cepat. Pada umur kebuntingan 17 hari *nervus olfactory*, *nervus optic* muncul bersamaan dengan *telencephalon* dan *diencephalon*, *cerebellum* membesar tetapi belum ada batasnya. Setelah 18 hari, otak telah hampir sempurna, *telencephalon* terpisah atas 2 lobus *cerebral hemisphere*. *Lobus olfactory* mulai terbentuk dan *cerebellum* mulai membentuk lekukan-lekukan secara transversal atau proses foliasi. Pada hari ke-19 *cerebellum* telah mempunyai lekukan yang jelas dan cukup dalam walaupun belum sepenuhnya terdiferensiasi sampai waktu setelah lahir (Rugh, 1968).

2.3.1 Proses migrasi sel saraf

Pada perkembangan otak hewan *mammalia* memerlukan proses migrasi sel menuju posisi yang seharusnya dan penempatan yang benar dari sekitar 100 milyar sel saraf, yang masing-masing memuat ribuan hubungan satu sama lain (Curran dan D'Arcangelo¹, 1998). Dalam proses pembentukan dan perkembangan otak, diperlukan rangkaian interaksi sel-sel yang sering melibatkan migrasi dan reorganisasi sel pada waktu dan tempat yang tepat. Jenis sel tertentu bermigrasi dari satu sisi ke tujuan akhir dengan jarak yang relatif jauh (Darmanto *et al.*, 1999).

Cerebellum merupakan bagian dari otak yang berperan sebagai pengatur keseimbangan pada tubuh, keterampilan gerak dan tingkah laku. Dalam proses pertumbuhan dan perkembangan *cerebellum*, sel Purkinje lahir dari bagian *neuropithelium* dari *rhombic lip* (calon *cerebellum*) pada umur kebuntingan 13 hari pada mencit (Rugh, 1968). Pada awalnya sel Purkinje berada di daerah korteks *cerebellar* tersusun beberapa lapis sel, yang selanjutnya sekitar minggu pertama kelahiran sel Purkinje membentuk satu lapis sel (Altman dan Shierly, 1978).

Sel glial mempunyai peran penting sebagai pemandu migrasi sel saraf. Ada dua jenis sel glial dalam *cerebellum* yaitu *radial glial*, merupakan bentukan fiber memanjang dari bagian *ventricular zone* menuju lapisan terluar *cerebellum*. *Radial glial* ini diduga dibentuk oleh sel astroglia muda, yang bergerak dari daerah ventrikuler menuju daerah korteks, sehingga *radial glial* atau disebut juga *radial fiber* memanjang sepanjang perjalanan astroglia (Ono *et al.*, 1989). Pada hewan dewasa, sel astroglia ini berkembang menjadi sel astrosit yang terletak di daerah ventrikuler menuju daerah di bawah *external granular layer* (EGL). Jenis sel glial yang kedua adalah *Bergmann fiber*, memanjang hanya di daerah korteks *cerebellum*, mempunyai asal yang sama dengan sel astrosit yaitu sel astroglia. Dalam bermigrasi sel-sel saraf sering melibatkan beberapa jenis protein misalnya CAM (*cell adhesion molecule*), terutama yang berfungsi dalam *contact guidance* antara sel Purkinje dengan *Bergmann fiber* pada *cerebellum* atau antara sel neuron dengan *radial fiber* pada *cerebrum* (Crossin *et al.*, 1990 dalam Harmonis 2001). Beberapa jenis CAM seperti tenascin, *neural cell adhesion molecule* (NCAM),

fibronectin dan Reelin telah diketahui berperan penting dalam proses migrasi, penempatan sel saraf dan perkembangan otak (Darmanto *et al.*, 1999).

Gangguan migrasi sel dan atau penempatan sel telah diketahui berkaitan dengan kerusakan atau tidak normalnya sistem saraf. Sebagai contoh adalah *displasia korteks cerebral* yang sering menumbuhkan manifestasi epilepsi bawaan dan ketidaknormalan susunan sel saraf pada korteks dengan manifestasi *schizophrenia* (Mischel *et al.*, 1995; Ross dan Perlson, 1996). Arah migrasi neuron yang abnormal menyebabkan salah letak dari sel saraf korteks dan menampakkan kelainan berupa menurunnya fungsi kognitif dan retardasi mental (Darmanto *et al.*, 1999).

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.

Protein ekstraseluler Reelin, merupakan protein yang paling bertanggungjawab dalam memunculkan kelainan korteks *cerebellar* berupa ketidakteraturan posisi sel Purkinje dan hambatan pertumbuhan dendrit sel Purkinje pada *cerebellum* (Darmanto *et al.*, 2000).

2.4 Tinjauan tentang Kematian Sel

Hampir setiap hari jutaan sel di dalam tubuh kita mengalami kematian. Kebanyakan dari sel yang mati adalah dari reaksi bunuh diri yang justru

dipergunakan untuk mengatur kehidupan suatu organisme. Data penelitian menunjukkan bahwa tingkat kesehatan suatu organisme tidak hanya ditentukan oleh kemampuan sel dalam menghasilkan sel baru, tetapi juga kemampuan dalam membunuh dirinya sendiri bila mengalami perubahan atau kerusakan. Proses yang amat kritis ini disebut apoptosis (Duke *et.al.*, 1996)

Setiap sel sudah ditentukan waktu untuk hidup dan waktu untuk mati. Kematian suatu sel dapat melalui dua jalan yaitu karena ada *agent injury* dan proses bunuh diri atau apoptosis. *Agent injury* dapat berupa mekanik maupun terpapar bahan toksik (Ma'ruf, 2002).

Sel yang mati akibat apoptosis akan hilang seperti pecahnya gelembung udara dipermukaan air yang mendidih dan segera sel tersebut diganti dengan sel baru. Ciri khas sel yang mengalami apoptosis adalah mengkerut, degradasi kromatin, *phospholipid phosphatidylserine* yang normalnya ada dalam membran plasma keluar pada permukaan sel, sel fagosit mensekresi sitokin sehingga menghambat inflammasi, terjadi fraksinasi pada nukleus dan sel terpecah menjadi sejumlah *apoptotic bodies* yang berisi pecahan nukleus. *Apoptotic bodies* ini segera dihilangkan sehingga keadaan jaringan menjadi normal kembali (Ma'ruf, 2002).

Secara umum proses apoptosis terjadi pada masa pertumbuhan dan perkembangan organisme serta pada proses respon imun, sehingga memungkinkan suatu organisme membuang sel-sel yang sudah tua, mati atau tidak diinginkan (Sudarno., 2000 *dalam* Aldila, 2004).

Rumanta *et.al* (2001) menunjukkan bahwa adanya metabolit 2-ME yaitu MAA dapat meningkatkan permeabilitas membran sel yang mengakibatkan influks ion Ca^{2+} menjadi berlebih yang akan menghambat fosforilasi oksidatif dalam sel dan menyebabkan perolehan ATP berkurang. Selain itu MAA sebagai metabolit 2-ME juga dapat mengaktifkan enzim protease dan fosfolipase yang dapat mendegradasi protein-protein sitoskeleton yang diperlukan dalam membangun struktur sel.

Menurut Darmanto (2002) kematian sel granulosa akibat radiasi ditandai dengan adanya fragmentasi DNA, kondensasi inti disertai kondensasi sitoplasma, sehingga pengamatan dengan pewarnaan HE terlihat warna sel lebih gelap bila dibandingkan dengan sel granulosa yang masih hidup.

2.5 Tinjauan Tentang Protein Reelin.

Gangguan pada gen reelin yang disebabkan oleh mutasi menyebabkan gangguan syaraf yang disebut *neurological reeler* yang dicirikan oleh gerakan ataxia, tremor, ketidakseimbangan, dan cara berjalan yang terhuyung yang terlihat 2 minggu setelah kelahiran (Lambert dan Goffinet, 1988 dalam D'Arcangelo *et al.*, 1999). Tingkah laku ini dihubungkan dengan *hypoplasia* yang menyangkut otak besar dan *neuronal ectopia* di daerah yang melapisi otak termasuk *cerebral*, *cerebellar cortices* dan *hippocampus*. mRNA reelin mengkode suatu glikoprotein ekstraselluler besar yang berisi 8 urutan sekuen yang berulang yang meliputi motif *EGF-like cysteine*. Selama perkembangan embrio, Reelin adalah hasil ekspresi dari populasi sel neural yang menduduki lapisan superficial dari otak

(D'Arcangelo *et al.*, 1995, Ogawa *et al.*, 1995 dan Rice *et al.*, 1998 dalam D'Arcangelo *et al.*, 1999). Reelin diduga mengendalikan pola pembentukan formasi lapisan otak dengan cara berperan sebagai attractant dan pemandu migrasi sel neuron, seperti pembentukan *cortical plate neuron* di dalam *cerebral cortex* dan penyusunan sel Purkinje di dalam *cerebellum*, yang mendorong ke arah pembentukan lapisan otak dan proses pertumbuhan sel neuron (Curran dan D'Arcangelo², 1998).

Migrasi sel neuron dan proses laminasi dalam perkembangan cerebral cortex tergantung pada sinyal yang disekresikan, termasuk protein matriks ekstraseluler Reelin yang diproduksi oleh suatu subpopulasi sel pioneer dari sel neuron (D'Arcangelo *et al.*, 1995 dalam D'Arcangelo *et al.*, 1999).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan di laboratorium Biologi Reproduksi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga Surabaya. Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba dilakukan di dalam rumah hewan percobaan jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga Surabaya. Ekstraksi, elektroforesis dan blotting homogenat otak dilakukan di Tropical Disease Center Universitas Airlangga Surabaya. Lama waktu penelitian selama 7 bulan (bulan Juni tahun 2004 sampai dengan Januari tahun 2005) .

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Hewan Coba

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) betina dewasa strain BALB/C berumur 10-12 minggu dengan berat badan 25-30 gram. Hewan coba ditempatkan di rumah hewan dalam kandang berupa bak plastik dengan tutup kawat kasa beralas sekam, kondisi ruangan berfentilasi. Ruangan pemeliharaan tersebut mendapat penerangan 12 jam terang dan 12 jam gelap sesuai dengan fotoperioditas daerah tropis. Hewan percobaan diberi makanan pelet ayam broiler CP 511-B dan minum air PDAM, keduanya secara *ad libitum*.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : pakan mencit berupa pelet ayam, air minum mencit berupa air PDAM, sekam, larutan *2-Methoxyethanol* (yang merupakan produksi dari *WAKO Pure Chemical Industries, Ltd.* Jepang) 12,5 mmol, aquabidest, alkohol 70%, *dry ice*, bahan untuk pembuatan preparat histologi, bahan untuk ekstraksi, elektroforesis dan bahan untuk Western Blot.

3.2.3. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : kandang mencit berupa bak plastik dengan penutup dari kawat, tempat makan dan minum mencit, neraca analitik, *disposable syringe* 1 cc, alat bedah, peralatan untuk membuat preparat histologi, peralatan ekstraksi, peralatan elektroforesis dan peralatan Western Blot.

3.3. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan eksperimental. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL).

3.4. Variabel Penelitian

Penelitian ini terdiri dari variabel :

1. Variabel bebas : Pemberian 2-ME dengan dosis 12,5 mmol/kg dan waktu pembedahan.
2. Variabel terikat : Kematian sel, ekspresi total protein, dan ekspresi protein reelin pada otak fetus mencit.

3. Variabel terkendali : Strain mencit, berat badan mencit, umur mencit, makanan, minuman, suhu kandang, cara pengamatan dan umur kebuntingan 15 hari.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Tahap persiapan

Dalam penelitian ini dibutuhkan 24 ekor mencit dewasa strain BALB/C (16 ekor betina dan 8 ekor jantan) yang berumur 10-12 minggu, yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Surabaya. Mencit jantan dan betina ditempatkan secara terpisah pada bak yang diberi alas sekam dan diberi penutup kawat. Pakan mencit berupa pelet ayam yang ditempatkan pada sebuah wadah yang terbuat dari kawat kasa dan diletakkan di atas kawat penutup secara *ad libitum*. Minumnya berupa air PDAM secara *ad libitum*. Waktu aklimasi selama satu minggu.

3.5.2 Tahap perkawinan

Sebelum dilakukan perkawinan, terlebih dulu menentukan masa estrus mencit betina dengan cara pengamatan kondisi vulva. Perkawinan dilakukan pada sore hari selama semalam dengan menyatukan 1-2 ekor mencit betina dengan 1 ekor mencit jantan. Kemudian besok pagi mengamati ada tidaknya sumbat vagina pada mencit betina. Sumbat vagina merupakan tanda bahwa telah terjadi koitus. Apabila ditemukan sumbat vagina, maka dianggap sebagai umur kebuntingan 0 hari. Selain itu juga dilakukan penimbangan berat badan induk mencit awal dan dipisahkan dari mencit jantan.

3.5.3 Pembuatan Larutan Uji

Bahan uji yang diberikan pada penelitian ini adalah 2-ME, berupa cairan dengan kemurnian 99,0 %. Sebagai pelarut digunakan aquadest. Dosis larutan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah 12,5 mmol/kg berat badan. Cara penyediaan larutan uji dosis 12,5 mmol/kg berat badan dapat dilihat pada lampiran 1.

3.5.4 Perlakuan

Dalam penelitian ini digunakan 16 ekor mencit betina bunting yang dibagi dalam 8 kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 2 ekor mencit.

Hewan coba diberi perlakuan melalui injeksi intraperitoneal dan diperlakukan sesuai dengan kelompoknya seperti yang tercantum dalam tabel 3.1 dibawah ini :

Tabel 3.1 Perlakuan yang diberikan pada induk mencit melalui injeksi intraperitoneal.

Kelompok	Sub Kelompok	Perlakuan	Waktu Pembedahan	Keterangan
Kontrol	K1	Aquades 0,1ml / 10gr berat badan	48 jam setelah pemberian	Dibuat preparat histologi
	K2	Aquades 0,1ml / 10gr berat badan	48 jam setelah pemberian	Diamati kadar proteinnya
	K3	Aquades 0,1ml / 10gr berat badan	72 jam setelah pemberian	Diamati kadar proteinnya
	K4	Aquades 0,1ml / 10gr berat badan	96 jam setelah pemberian	Diamati kadar proteinnya
Perlakuan	P1	2-ME 12,5 mmol/kg berat badan	48 jam setelah pemberian	Dibuat preparat histologi
	P2	2-ME 12,5 mmol/kg berat badan	48 jam setelah pemberian	Diamati kadar proteinnya
	P3	2-ME 12,5 mmol/kg berat badan	72 jam setelah pemberian	Diamati kadar proteinnya
	P4	2-ME 12,5 mmol/kg berat badan	96 jam setelah pemberian	Diamati kadar proteinnya

3.5.5 Pengambilan sampel

Untuk kelompok perlakuan K2, P2, K3, P3, K4 dan P4 induk mencit betina dikorbankan dengan cara dilokasi serviks. Induk mencit dibedah dan diambil satu

fetus tiap induk kemudian fetus mencit dibekukan dengan cara diletakkan di atas *dry ice*. Bagian *cerebrum* fetus mencit diambil, dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan disimpan dalam kondisi suhu -80°C sebelum dipisahkan proteinnya melalui elektroforesis. Sedangkan untuk kelompok perlakuan K1 dan P1 induk mencit betina dikorbankan dengan cara dilokasi serviks. Induk mencit dibedah dan diambil satu fetus tiap induk kemudian bagian *cerebrum* fetus dimasukkan dalam larutan PFA 4% untuk dibuat preparat histologi yang akan digunakan untuk mengetahui jumlah kematian sel pada *cerebrum* fetus.

3.5.6 Tahap pembuatan preparat histologi

Organ yang telah diambil pada saat pembedahan difiksasi dengan PFA 4 %. Pembuatan preparat histologi menurut Humason (1967) dimulai dengan memfiksasi otak fetus dengan larutan PFA. Kemudian didehidrasi dengan alkohol bertingkat mulai dari 70%, 80%, dan alkohol absolut masing-masing 1,5 jam dengan cara direndam.

Bagian *cerebrum* fetus kemudian dipindahkan ke dalam campuran alkohol absolut dan xilol dengan perbandingan 1:1 selama 30 menit dan xilol murni. Kemudian *cerebrum* fetus dipindahkan ke dalam campuran xilol-parafin, parafin murni I, parafin murni II, dan parafin murni III masing-masing selama 30 menit pada suhu 56°C (di atas titik cair parafin).

Selanjutnya dilakukan embedding dengan membuat blok parafin yang didalamnya telah ditanam bahan yang akan dibuat preparat. Spesimen diiris dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 mikron sehingga terbentuk pita-pita irisan yang kemudian diletakkan pada gelas objek yang telah diolesi albumin.

Proses pewarnaan dimulai dengan memasukkan preparat dalam xilol I dan II masing-masing selama 15 menit, kemudian dimasukkan dalam alkohol bertingkat mulai dari alkohol absolut, alkohol 96%, alkohol 80% dan alkohol 70% selama masing-masing 5 menit.

Preparat kemudian dimasukkan dalam larutan Hematoxilin selama 5-10 menit, lalu dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Selanjutnya dimasukkan dalam larutan alkohol + HCl (1%) selama 30 detik.

Pengecatan pembanding dilakukan dengan larutan Eosin selama 5 menit, kemudian dimasukkan dalam alkohol bertingkat mulai dari alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96% dan alkohol absolut masing-masing selama 5 menit. Setelah itu, preparat dimasukkan dalam xilol I dan II selama masing-masing 5 menit.

Preparat diangkat dari xilol dan ditutup dengan gelas penutup menggunakan entellan, diberi label dan disimpan dalam suhu kamar.

3.5.7 Pengamatan preparat histologi

Pada kelompok perlakuan K1 dan P1 yang diamati adalah jumlah sel otak yang mengalami apoptosis yaitu yang warnanya lebih gelap dari sel yang lainnya. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 X. Setiap kelompok perlakuan diambil enam fetus untuk dibuat sayatan histologi. Setiap preparat histologi diamati 4 lapang pandang.

3.5.8 Tahap ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode mekanik yaitu sonikasi. Setiap perlakuan K2, P2, K3, P3, K4 dan P4 diambil dua *cerebrum* fetus untuk dilakukan proses ekstraksi. Bagian *cerebrum* fetus dimasukkan ke dalam tabung

sentrifuge kemudian ditambahkan dengan PBS 1X yang telah di steril sebanyak 2 ml. Bagian *cerebrum* fetus digerus dengan batang gelas sampai tidak ada gumpalan besar. Kemudian dilakukan proses sonikasi selama 4 menit dan istirahat selama 1 menit. Proses sonikasi ini diulang sampai 5 kali. Setelah proses sonikasi selesai, bagian *cerebrum* fetus disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Kemudian diambil supernatnya dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Langkah berikutnya adalah bagian *cerebrum* fetus disentrifugasi dengan kecepatan 16000 rpm selama 10 menit. Kemudian disimpan dalam kondisi suhu -30°C sebelum dilakukan elektroforesis.

3.5.9 Tahap elektroforesis

Dalam penelitian ini untuk menemukan profil total protein dan analisis protein Reelin dari *cerebrum* fetus mencit (*Mus musculus*) digunakan metode blotting dengan Western blot. Sebelum dilakukan pewarnaan, bagian *cerebrum* fetus harus dielektroforesis terlebih dahulu, elektroforesis yang digunakan adalah SDS-PAGE atau *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Elektroforesis* (Soejoedono *et al.*, 2004).

Prosedure pemeriksaan protein dengan SDS-PAGE 10 % :

1. Mencetak *separating gel* 10 %

Pembuatan *separating gel* dengan cara mencampurkan bahan-bahan untuk *separating gel* yaitu Akrilamid 2,08 ml, Tris HCl pH 8,8 sebanyak 1,2 ml, SDS 0,5 % sebanyak 1,2 ml, Aquadest 1,1 ml, TEMED 5 μl , APS 10% sebanyak 30 μl . Campuran harus homogen dan dimasukkan ke dalam gelas plate yang telah bersekat dan melakukan fiksasi dan ditambahkan *butanol* 5 % diatas

bagian *separating gel* untuk meratakan bagian atas *separating gel*, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 25 menit. Langkah selanjutnya adalah membuang *butanol* 5% dan mencuci *separating gel* dengan menggunakan elektroforesis buffer yang telah diencerkan 10 X. dengan kertas filter *separating gel* dibersihkan dan dikeringkan.

2. Mencetak *Stacking gel* 10%

Membuat *stacking gel* dengan mencampurkan bahan-bahan *stacking gel* sampai homogen yakni Akrilamid 0,825 ml, Tris HCl pH 6,8 sebanyak 0,8 ml, SDS 0,5% sebanyak 0,8 ml, aquades 0,8ml, TEMED 0,4 μ l, APS 10% sebanyak 20 μ l. *Stacking gel* dimasukkan ke dalam gelas plate, diinkubasi pada suhu kamar selama 25 menit sampai memadat. *Comb* dilepas dan dibersihkan. *Stacking gel* dicuci 1 X dengan elektroforesis buffer.

3. Menyiapkan sampel

Suspensi *cerebrum* fetus sebanyak 20 μ l dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang tutupnya sudah berlubang dan dicampur dengan laemli buffer (*indicator win*) 10 μ l. Tabung eppendorf yang telah dipisahkan dipanaskan dalam suhu 100 °C selama 5 menit.

4. Elektroforesis

Gelas plate yang berisi gel dimasukkan ke dalam perangkat elektroforesis bio-rad dan dituangi dengan elektroforesis buffer sebanyak 800 ml. Marker dan bagian *cerebrum* fetus dimasukkan ke dalam lubang gel. Menggunakan listrik 125 v, 40 mA sampai marker dan bagian *cerebrum* fetus turun. Setelah turun

sampai ± 75 % panjangnya, listrik dimatikan gel dilepas perlahan dan dimasukkan dalam petridish yang sudah berisi larutan pencucian.

5. Pencucian

Pencucian yang dilakukan ada 4 tahap dengan larutan yang berbeda. Pencucian pertama menggunakan campuran dari *methanol* 25 ml, *acetic acid* 3,75 ml dan aquades 71,25 ml. *Petridish* yang berisi gel dan larutan pencuci digoyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit. Setelah 30 menit larutan pencuci dibuang dan diganti dengan larutan pencuci kedua yakni campuran dari *methanol* 25 ml, *acetic acid* 3,75 ml dan aquades 23,75 ml. Digoyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit. Pencucian ketiga dengan larutan *Glutaraldehyd* 10% yakni 10 ml *Glutaraldehyd* dengan 90 ml aquades digoyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit. Pencucian yang terakhir dengan aquades 100 ml selama 30 menit dan pencucian ini dilakukan 3 X.

6. Pewarnaan

Pewarnaan band akan dilakukan dengan metode Western blot. Prosedur metode pewarnaan Western blot dapat dilihat pada lampiran 2.

3.6 Pengumpulan Data

Proses pengumpulan data terbagi menjadi dua yaitu pengumpulan data untuk mengetahui adanya kematian sel dan untuk mengetahui kadar protein Reelin. Berikut adalah penjelasannya.

3.6.1 Kematian sel pada otak fetus mencit

Kelompok perlakuan K1 (Induk mencit diberi aquades 0,1 ml /10 gram berat badan melalui injeksi intraperitoneal pada usia kebuntingan 15 hari dan dibedah 48 jam setelah pemberian) dan P1 (Induk mencit diberi 2—ME 12,5 mmol/kg berat badan melalui injeksi intraperitoneal pada usia kebuntingan 15 hari dan dibedah 48 jam setelah pemberian) *cerebrum* fetus mencit (*Mus musculus*) dibuat preparat histologi dengan pewarnaan *hemaktosilin eosin* (HE). Kemudian dilakukan penghitungan sel yang mati, sel hidup dan sel total dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 X. Pengamatan dan penghitungan sel tersebut dilakukan di daerah *cerebral cortex*. Kemudian hasil dari penghitungan tersebut dianalisa secara statistik.

3.6.2 Penentuan profil total protein dan ekspresi protein Reelin

1. Kelompok perlakuan :

- K2 (Induk mencit diberi aquadest 0,1 ml /10 gram berat badan melalui injeksi intraperitoneal pada usia kebuntingan 15 hari dan dibedah 48 jam setelah pemberian)
- P2 (Induk mencit diberi 2-ME 12,5 mmol/kg berat badan melalui injeksi intraperitoneal pada usia kebuntingan 15 hari dan dibedah 48 jam setelah pemberian)
- K3 (Induk mencit diberi aquadest 0,1 ml /10 gram berat badan melalui injeksi intraperitoneal pada usia kebuntingan 15 hari dan dibedah 72 jam setelah pemberian)

- P3 (Induk mencit diberi 2-ME 12,5 mmol/kg berat badan melalui injeksi intraperitoneal pada usia kebuntingan 15 hari dan dibedah 72 jam setelah pemberian),
- K4 (Induk mencit diberi aquades 0,1 ml /10 gram berat badan melalui injeksi intraperitoneal pada usia kebuntingan 15 hari dan dibedah 96 jam setelah injeksi) dan
- P4 (Induk mencit diberi 2-ME 12,5 mmol/kg berat badan melalui injeksi intraperitoneal pada usia kebuntingan 15 hari dan dibedah 96 jam setelah pemberian)

Diambil satu fetus tiap induk, diisolasi *cerebrumnya* untuk dilakukan proses ekstraksi.

2. Kemudian hasil ekstraksi digunakan untuk elektroforesis untuk melihat profil total protein. Kemudian dilakukan blotting dengan Western blot untuk mengidentifikasi protein Reelin secara kualitatif maupun kuantitatif. Elektroforesis yang digunakan adalah SDS-PAGE atau Sodium *Deodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Elektrophoresis* (Soejoedono *et al.*, 2004).
3. Setelah dilakukan Western blot akan didapatkan ekspresi protein Reelin dalam bentuk band pada membran. Selanjutnya band tersebut diukur densitasnya dengan densitometri. Maka kadar protein Reelin pada otak fetus yang diinginkan akan didapat dan kemudian dilakukan analisa berdasarkan besar kecil nilai kadar tersebut.

3.7 Analisis Data

Data berupa jumlah sel otak yang mati, dianalisis dengan metode Wilcoxon's Signed Ranks Test dengan taraf signifikansi $\alpha = 0,05$. Dari uji tersebut akan diketahui ada tidaknya perbedaan rata-rata jumlah sel yang mati antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Sedangkan data mengenai perbedaan ekspresi total protein dan perbedaan ekspresi protein Reelin pada otak fetus mencit dianalisis dengan pendekatan deskriptif.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Induk dibedah 48 jam setelah induksi, diambil otak fetusnya untuk pengamatan efek akut berupa kematian sel serta untuk mengetahui kadar protein lainnya. Untuk mengetahui kadar protein Reelin, selain dibedah 48 jam juga dilakukan pembedahan pada 72 dan 96 jam setelah induksi.

4.1.1 Kematian sel pada otak fetus mencit

Pengamatan kematian sel neural pada fetus mencit yang induknya diinjeksi secara intraperitoneal dengan dosis 12,5 mmol/kg berat badan pada umur kebuntingan 15 hari yang diamati di bagian *cerebral cortex* dengan perbesaran 1000 X ditunjukkan pada gambar 4.1. Pada kontrol menunjukkan sel neural memiliki ukuran dan warna yang hampir sama serta inti dari sel tampak sangat jelas (gambar 4.1 A). Pada fetus mencit yang dibedah pada 48 jam setelah diberi perlakuan, kematian sel neural dapat diamati dengan adanya kondensasi nukleus, sel yang memiliki warna lebih gelap serta ukuran sel yang lebih kecil jika dibandingkan dengan sel neural yang hidup yaitu pada kontrol maupun pada perlakuan itu sendiri (Gambar 4.1 B).



Gambar 4.1 *Cerebrum* fetus mencit pada pembedahan 48 jam setelah injeksi 2-ME, perbesaran 2200 X. (A) Kontrol, tampak terdapat sel yang mati (anak panah) dengan warna lebih gelap dan ukuran lebih kecil bila dibandingkan dengan sel disekitarnya, (B) Perlakuan 2-ME dosis 12,5 mmol/kg berat badan, tampak terdapat beberapa sel neural yang mati (anak panah) dengan warna lebih gelap, terjadi kondensasi nucleus dan ukuran lebih kecil.

Dari pengamatan preparat histologi diketahui bahwa pada pembedahan 48 jam setelah induksi sudah terdapat sel otak yang mengalami kematian di *cerebral cortex*. Pada kelompok kontrol meskipun tidak diberi 2-ME juga terdapat sel otak yang mengalami kematian secara fisiologis seperti yang ditunjukkan pada tabel 4.1 berikut ini.

Tabel 4.1 Rata-rata persentase sel otak yang mengalami kematian pada pembedahan 48 jam setelah pemberian 2-ME 12,5 mmol/kg berat badan pada umur kebuntingan 15 hari melalui injeksi intraperitoneal.

Lapang Pandang	Kontrol		Perlakuan	
	M/T	Persentase	M/T	Persentase
1	25/485	5,2	489/733	66,7
2	112/675	16,6	16/754	2,1
3	52/774	6,7	69/645	10,7
4	45/609	7,4	107/697	15,4
5	52/474	11,0	303/530	57,2
6	44/521	8,4	52/506	10,3
7	22/446	4,9	45/680	6,6
8	40/537	7,4	87/572	15,2
9	32/601	5,3	285/708	40,3
10	21/358	5,9	369/774	47,7
11	27/426	6,3	287/812	35,3
12	40/524	7,6	382/809	47,2
13	23/530	4,3	66/602	11,0
14	27/506	5,3	111/645	17,2
15	21/530	4,0	135/884	15,3
16	19/461	4,1	221/879	25,1
17	20/448	4,5	220/795	27,7
18	22/426	5,2	532/693	76,8
19	24/479	5,0	192/678	28,3
20	22/510	4,3	320/798	40,1
21	11/517	2,1	220/922	23,9
22	13/453	2,9	78/749	10,4
23	22/512	4,3	68/596	11,4
24	8/401	2,0	490/556	88,1
Rata-rata		5,86 ^a ± 3,047		30,42 ^b ± 23,362

Keterangan :

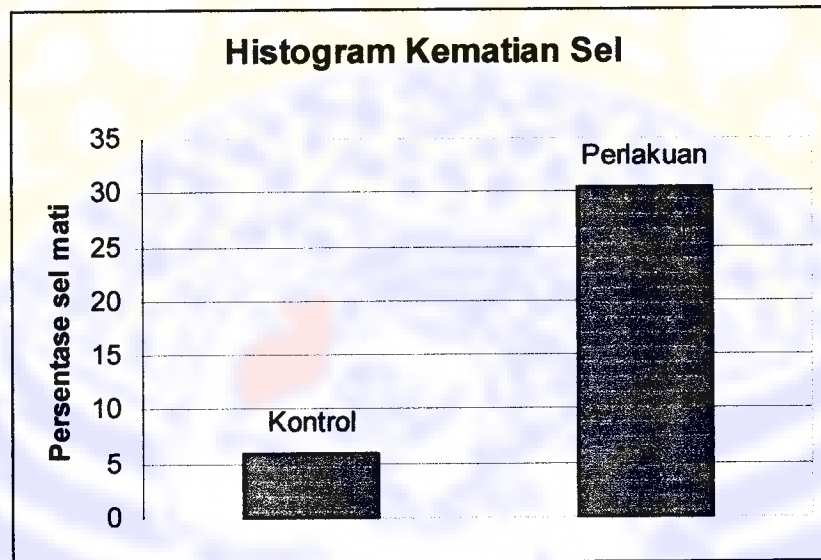
M : Jumlah sel yang mati

T : Jumlah sel total

Huruf yang tidak sama menunjukkan ada beda nyata pada $\alpha = 0.05$

Dari tabel di atas diketahui bahwa rata-rata persentase sel otak yang mengalami kematian pada kelompok perlakuan sebesar 30,42 sedang pada kelompok kontrol 5,86. Dengan menggunakan uji Wilcoxon signed ranks test

menunjukkan α hasil analisis $< 0,05$, ini berarti antara kontrol dan perlakuan memiliki perbedaan yang nyata.

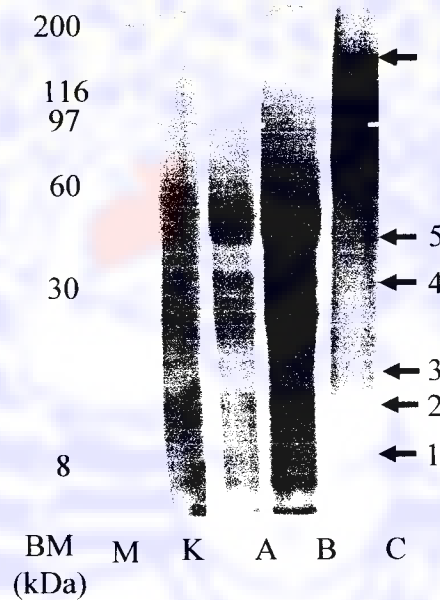


Gambar 4.2 Histogram persentasi kematian sel neural di *cerebral cortex* fetus mencit yang induknya diberi 12,5 mmol/kg berat badan pada umur kebuntingan 15 hari, dan dibedah setelah selang waktu 48 jam setelah pemberian.

4.1.2 Penentuan profil total protein dan ekspresi protein Reelin akibat pemberian 2-Metoxyethanol (2-ME).

Untuk mengetahui profil protein Reelin pada fetus mencit yang induknya telah diberi 2-ME melalui injeksi intraperitoneal dengan dosis 12,5 mmol/kg berat badan pada umur kebuntingan 15 hari, dilakukan pembedahan pada induk dengan selang waktu yang berbeda yaitu 48 jam, 72 jam dan 96 jam setelah pemberian. Kemudian mengambil otak fetus dan dilakukan proses ekstraksi dan dilanjutkan dengan elektroforesis dengan SDS-PAGE. Hasil elektroforesis menunjukkan adanya beberapa band protein (gambar 4.3).

Dari tahap elektroforesis dapat dipisahkan beberapa protein yang terkandung di dalamnya berdasarkan berat molekul yang dimiliki protein tersebut. Pemisahan protein berdasarkan pada berat molekul yang dilewatkan pada pori gel dengan bantuan arus listrik.



Gambar 4.3 Profil total protein pada otak fetus mencit (*Mus musculus*) yang induknya diinjeksi 2-ME dengan dosis 12,5 mmol/kg berat badan. Diamati pada selang waktu 48 jam setelah pemberian (A), 72 jam setelah pemberian (B), 96 jam setelah pemberian (C) dan Kontrol (K) tampak beberapa band yang terlihat jelas pada gel elektroforesis dengan SDS-PAGE (yang ditunjuk ← 1-5). Juga didapatkan band dengan berat molekul sebesar 180 kDa (←) yang diperkirakan protein Reelin. M = Marker dan BM = Berat Molekul.

Berdasarkan gambar 4.3 terlihat ada beberapa band protein dan setelah dicocokkan dengan berat molekul markernya, didapatkan data bahwa band tersebut memiliki kisaran berat molekul antara 9 sampai 180 kDa. Untuk mengetahui kadar protein yang terkandung di dalam band tersebut, maka dilakukan pengukuran melalui densitometri. Data mengenai kadar band dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Kadar total protein yang diukur berdasarkan densitas band melalui densitometri.

Band	Kadar Protein (%)			
	Kontrol	Perlakuan		
	UK18	UK 17	UK 18	UK19
1	13,9	4,1	2,3	3,7
2	4,8	2,9	3,1	2,9
3	7,0	2,4	2,2	3,9
4	9,2	2,7	6,0	2,3
5	4,9	2,8	2,6	9,1
Total	39,8	14,9	16,2	21,9

Dari tabel diatas diketahui bahwa kadar protein pada perlakuan UK 17 dan 18 menurun pada band ke 1, 3 dan 5. Namun mengalami kenaikan kembali pada perlakuan UK 19.

Band-band profil protein tersebut kemudian digunakan untuk identifikasi protein Reelin dengan metode Western blot dengan menggunakan CR-50 sebagai antibodi untuk melabel protein Reelin. Dari hasil Western Blot kemudian akan didapatkan pita-pita yang merupakan protein Reelin yang telah diikat oleh CR-50 (gambar 4.4).

Reelin telah didapatkan melalui Western blotting dengan menggunakan antibodi monoklonal CR-50. Tiga isomer dari Reelin telah didapatkan, satu *full-length* protein kira-kira 400 kDa dan dua protein yang ujungnya dipotong kira-kira 250 dan 180 kDa (D'Arcangelo *et al.*, 1995). Oleh karena itu pada gambar 4.3 (yang ditunjuk ←) dapat diperkirakan sebagai protein Reelin dengan berat molekul kira-kira 180 kDa. Hasil Western blot dengan antibodi CR-50 dapat dilihat pada gambar 4.4 sebagai berikut.



Gambar 4.4 Ekspresi protein Reelin (→) pada otak fetus mencit setelah induknya diinjeksi 2-ME 12,5 mmol/kg berat badan diamati pada selang waktu 48 jam setelah perlakuan (A), 72 jam setelah perlakuan (B) dan 96 jam setelah perlakuan (C) dan Kontrol (K). Tampak perbedaan ketebalan band yang terlihat antara perlakuan dan kontrol.

Dari gambar 4.4 dapat dilihat bahwa protein Reelin ditemukan pada otak fetus baik pada pembedahan 48 jam setelah induk diinjeksi 2-ME maupun pada waktu pembedahan 72 jam setelah induk diinduksi 2-ME. Sedangkan pada waktu pembedahan 96 jam setelah induk diinjeksi 2-ME ekspresi protein Reelin tidak tampak. Dari ketebalan pita yang tampak, dapat dikatakan bahwa ekspresi protein Reelin pada perlakuan B (diamati 48 jam setelah pemberian 2-ME) menurun apabila dibandingkan dengan kontrol. Sedangkan pada perlakuan C (diamati 72 jam setelah pemberian 2-ME) ekspresi protein Reelin mengalami peningkatan apabila dibandingkan dengan perlakuan B, tetapi tidak setebal kontrol. Hal ini dapat diperkuat dengan melihat hasil pengukuran protein Reelin secara kuantitatif.

Untuk mengukur kadar protein Reelin secara kuantitatif, band diukur densitasnya dengan densitometer. Dari hasil densitometri (lampiran 7) ini akan diperoleh nilai kadar protein Reelin pada otak fetus sebagai berikut.

Tabel 4.3 Nilai kadar protein Reelin dalam persen setelah dilakukan densitometri.

Perlakuan	Kontrol	48 jam setelah injeksi 2-ME	72 jam setelah Injeksi 2-ME
Kadar protein Reelin (%)	19,5	13,6	15,6

Dari tabel diatas terlihat pada 48 jam setelah pemberian 2-ME kadar protein Reelin menurun dari 19,5 % menjadi 13,6 %. Sedangkan pada 72 jam setelah pemberian 2-ME kadarnya meningkat menjadi 15,6 %.

4.2 Pembahasan

4.2.1 Kematian sel pada otak fetus mencit.

Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa dengan pewarnaan *hemaktosilin eosin* tingkat kematian sel calon *cerebral cortex* fetus mencit (*Mus musculus*) setelah diberi perlakuan 2-ME dengan dosis 12,5 mmol/kg berat badan pada umur kebuntingan 9 hari sudah terlihat pada umur pembedahan 12 jam setelah injeksi. Dan jumlah sel matinya lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2-ME yang dibedah 24 jam setelah injeksi (Insani 2004).

Ferrer I, 1996 dan Ferrer *et al.*, 1996 dalam Darmanto (2002) menyatakan bahwa pada mencit UK 15 hari, EGL adalah bagian *cerebellum* yang sel-selnya aktif berploriferasi, sedangkan pada *cerebrum* bagian yang sensitif adalah pada *cerebral cortex*.

Pada penelitian Harinimiswari (2002) melaporkan bahwa kematian sel terlihat pada pembedahan 12 jam setelah induksi. Efek akut tersebut terjadi pula pada penelitian ini di daerah *cerebral cortex* yang ditandai dengan warna sel terlihat lebih gelap bila dibandingkan dengan sel sekitarnya yang masih hidup.

2-ME yang diinjeksi melalui intraperitoneal ke dalam tubuh induk akan masuk ke dalam tubuh fetus melalui plasenta. Kemudian akan diakumulasi di dalam sel hati. 2-ME akan teroksidasi di dalam organel mitokondria pada sel hati menjadi MALD dengan bantuan enzim ADH dan menjadi MAA dengan bantuan enzim ALDH. Oksidasi 2-ME menghasilkan MAA akan menyebabkan hilangnya 2 molekul hidrogen dan memakai oksigen bebas (O_2 yang lepas dari sistem) sehingga terbentuk radikal bebas, yaitu superoksida sebagai akseptornya yang kemudian akan membentuk hidrogen peroksida (H_2O_2) dan hidroksil. Radikal bebas ini akan selalu bereaksi (menarik elektron) dengan komponen disekitarnya (membran sel, DNA dan protein) untuk mencapai kondisi yang stabil, sehingga terjadi reaksi rantai yang menyebabkan terbentuknya radikal bebas yang semakin banyak (Lieber C. S., *et al.*, 2003 dalam Lunitasari, 2004).

Reaksi radikal bebas dengan asam lemak tak jenuh yang ada di membran akan menyebabkan putusannya rantai asam lemak menjadi senyawa MDA (*malondialdehid*) yang bersifat toksik terhadap sel (Maslachah, *et al.*, 2003). Putusnya asam lemak dapat menyebabkan permeabilitas membran sel menjadi rendah yang mengakibatkan influks ion Ca^{2+} menjadi berlebih (Ca^{2+} *overload*). Melimpahnya ion Ca^{2+} di dalam sel akan menyebabkan terputusnya rantai respirasi karena menghambat fosforilasi oksidatif, sehingga perolehan ATP berkurang sehingga menyebabkan kematian sel (Li *et al.*, 1997).

Pada penelitian ini, pengamatan preparat histologis menampakkan adanya sel yang mengalami kondensasi inti sehingga diduga kematian sel yang terjadi

pada penelitian ini adalah apoptosis. Namun sebagian juga menampakkan adanya pembengkakan sel yang merupakan ciri dari nekrosis.

4.2.2 Profil total protein dan kadar protein Reelin pada otak fetus mencit

Profil total protein pada otak fetus mencit yang dapat dilihat pada hasil elektroforesis menunjukkan adanya perubahan. Dengan mengukur densitas band protein pada gel elektroforesis dengan densitometri didapatkan hasil seperti pada tabel 4.2. Pada tabel tersebut ditunjukkan bahwa pada hampir semua band mengalami penurunan kandungan total protein. Pola penurunan kandungan total protein yaitu menurun pada UK 17 (48 jam setelah pemberian 2-ME) bila dibandingkan dengan kontrol, kemudian pada UK 18 (72 jam setelah pemberian 2-ME) juga menurun bila dibandingkan UK 17. Sedangkan pada UK 19 (96 jam setelah pemberian 2-ME) kandungan total protein meningkat. Pola seperti ini terjadi pada band 1, 3 dan 5. Sedangkan pada band 2 dan 4 polanya berbeda yaitu menurun pada UK 17, meningkat pada UK 18 dan menurun kembali pada UK 19. Hal ini perlu adanya identifikasi masing-masing protein berkaitan dengan perbedaan pola dari beberapa band yang muncul.

Penurunan kandungan total protein (pada band 1, 3 dan 5) terjadi setelah 48 jam pemberian 2-ME dan semakin menurun pada 72 jam setelah pemberian 2-ME. Penurunan ini diduga sebagai akibat dari pengaruh MAA, karena MAA diduga mempengaruhi beberapa tahapan sintesis protein, misalnya menurunkan tingkat replikasi DNA, atau menurunkan jumlah mRNA yang disintesis per satuan waktu, atau mempercepat terjadinya *turnover* mRNA, atau menghambat sintesis ribosom sehingga translasi berjalan lambat yang mengakibatkan translasi belum

selesai berlangsung pada saat mRNA sudah mengalami *turnover* (Margrita, 1998 dalam Ruyani, 2001).

Migrasi sel-sel neuron dan proses laminasi dalam perkembangan *cerebral cortex* tergantung pada sinyal yang disekresikan, termasuk protein ekstraseluler matriks Reelin yang diproduksi oleh sekelompok pioneer sel neuron (D'Arcangelo *et al.*, 1995 dalam D'Arcangelo *et al.*, 1999).

Reelin adalah protein sekretori ekstraseluler yang disintesis oleh sel granulosus dari *cerebellum* atau sel Cajhal Retzius dari *cerebrum* dan telah diketahui berperan dalam membantu adhesi dan migrasi sel neuron pada tahap perkembangan otak (Ogawa *et al.*, 1995, D'Arcangelo *et al.*, 1995, Sheldon *et al.*, 1997, D'Arcangelo *et al.*, 1996, Howell *et al.*, 1997 dan Miyata *et al.*, 1997 dalam Darmanto *et al.*, 2000).

Salah satu jenis sel yang pertama dihasilkan cortex adalah sel Cajhal Retzius, sel ini mempunyai suatu peran penting dalam proses laminasi cortex, hal ini karena sel Cajhal Retzius mampu menghasilkan protein Reelin yang dapat sebagai pemandu migrasi dan penempatan posisi sel neuron (Fishell dan Kriegstein, 2005). Faktor fisiologis yang mengatur ekspresi Reelin masih sedikit diketahui. Hanya akhir-akhir ini, *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) telah digambarkan sebagai pengatur ekspresi Reelin (Ringstedt *et al.*, 1998). Untuk mengetahui apakah distribusi Reelin selalu diubah di *hypothyroid* tikus, maka dilakukan pengecatan immuno dengan CR 50 mAb pada bagian otak yang akan mengenali bagian N-terminal dari Reelin (Ogawa *et al.*, 1995; D'Arcangelo *et al.*, 1997 dalam Ringstedt *et al.*, 1998).

Reelin diekspresikan dengan kadar tinggi pada otak yaitu pada saat awal postnatal, sampai proses migrasi neuron selesai (Ikeda dan Terashima, 1997 dalam D'Arcangelo *et al.*, 1999). Daerah dengan tingkat ekspresi Reelin tinggi meliputi *hippocampus*, *entorhinal cortex*, *bulbus olfactory* dan *cerebellum*. Maka, dapat dilihat adanya korelasi antara tingkat ekspresi Reelin yang tinggi dengan tingkat perkembangan maturasi neuron dan perubahan bentuk *synaptic*. Peranan Reelin dalam *synaptogenesis* dan percabangan axon telah diduga terjadi di *postnatal hippocampus* (Del Rio *et al.*, 1997).

Reelin telah ditunjukkan melalui metode Western blotting dengan menggunakan antibodi monoklonal CR-50. Tiga isomer dari Reelin telah didapatkan, satu full-length protein kira-kira 400 kDa dan dua protein yang ujungnya dipotong kira-kira 250 dan 180 kDa (D'Arcangelo *et al.*, 1995 dalam D'Arcangelo *et al.*, 1999). Dari hasil elektroforesis dengan SDS-PAGE diketahui bahwa pada otak fetus mencit (*Mus musculus*) terdapat protein dengan berat molekul 180 kDa, maka dapat diasumsikan bahwa protein tersebut adalah protein Reelin.

Setelah dilakukan densitometri pada hasil Western blot didapatkan kadar protein Reelin pada kontrol 19,5%. Pada perlakuan 48 jam setelah pemberian 2-ME pada induk pada umur kebuntingan 15 hari melalui injeksi intraperitoneal, kadar protein Reelin turun menjadi 13,6%. Hal ini jika dihubungkan dengan adanya kematian sel pada tabel 4.1, maka dapat diduga penurunan protein Reelin disebabkan oleh kematian sel neuron pada *cerebral cortex* yang diduga mengekspresikan protein Reelin. Jumlah sel neuron hidup menurun sehingga

kadar protein Reelin yang diekspresikan pun menurun. Pada perlakuan 72 jam setelah pemberian 2-ME pada induk pada umur kebuntingan 15 hari secara injeksi intraperitoneal, kadar protein Reelin sebesar 15,6%, meningkat dari perlakuan 48 jam setelah pemberian 2-ME. Diperkirakan pada perlakuan tersebut sudah terjadi pemulihan pada sel-sel neuron yang mati, sehingga jumlah sel hidup sudah mulai bertambah dan kadar protein Reelin yang diekspresikan juga bertambah. Sedangkan pada perlakuan 96 jam setelah pemberian 2-ME pada induk pada umur kebuntingan 15 hari secara injeksi intraperitoneal, kadar protein Reelin tidak didapatkan. Pada membran hasil Western blot juga tidak didapatkan protein Reelin yang terikat oleh CR 50. Hal ini dapat dikarenakan adanya kemungkinan kesalahan preparasi sampel, atau memang kadarnya menurun.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil analisis data pada preparat *cerebral cortex* fetus mencit, profil total protein dan kadar protein Reelin pada otak fetus mencit dapat disimpulkan sebagai berikut :

- 1) Pemberian 2-ME mampu menyebabkan kematian sel neural fetus mencit (*Mus musculus*) pada umur kebuntingan 15 hari.
- 2) Pemberian 2-ME mempengaruhi sintesis protein pada perkembangan otak fetus mencit (*Mus musculus*), terlihat adanya perubahan profil protein yang menunjukkan penurunan bila dibandingkan dengan kontrolnya .
- 3) Pemberian 2-ME mampu menyebabkan terhambatnya sintesis protein Reelin pada perkembangan otak fetus mencit (*Mus musculus*) pada umur kebuntingan 15 hari, yaitu pada selang waktu 48 jam setelah perlakuan kadar protein Reelin menurun bila dibandingkan dengan kontrol.

5.2 Saran

Untuk memastikan adanya penurunan ekspresi protein Reelin, apakah disebabkan karena kematian sel atau kerusakan protein itu sendiri perlu diukur kadar mRNA Reelin dengan metode Northern blot. Undang-undang tentang pemakaian bahan kimia berbahaya pada berbagai industri perlu diperhatikan lagi agar pemaparan zat tersebut terhadap masyarakat dapat dikurangi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aldila, L. F. 2004. Kelainan Perkembangan Otak Mencit (*Mus musculus*) Akibat Induksi 2-Methoxyethanol pada Umur Kebuntingan 15 Hari. **Skripsi**. FMIPA, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Aharoni, D., Dantes, A., Oren, M., dan Amsterdam, A. 1995. cAMP-mediated signals as determinants for apoptosis in primary granulosa cells. **Experimental Cell Research.**, Vol. 218. Hal. 271-282
- Altman, J. dan Shierly, A.B. 1978. Prenatal development of the cerebellar system in the rat, cyrogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum. **J. Comp. Neurol.** Vol. 179, Hal. 23 – 48.
- Anonimus. 1986. **Section 9 Report to the Occupational Safety and Health Administration (OSHA)**, EPA (Environmental Protection Agency), Nol.51 No.97, Hal.18488-18497
- Anonimus. 1991. 2-Methoxyethanol (CASRN. 109 – 86 - 4). Office of Polution and Toxic US, EPA (Environmental Protection Agency). **[http:// www. epa . gov / iris / subst / 0525.htm](http://www.epa.gov/iris/subst/0525.htm)**.
- Anonimus. 2004. Current Use Pattern in Canada, Toxycology Profiles of Alternatives, and the Feasibility of Performing an Exposure Assessment Study. The Green Lane™, Environment Canada's World Wide Web site (ECWWWs), **<http://www.ec.gc.ca>**.
- Brown, N.A., Holt dan Webb. M. 1984, The Teratogenic of Methoxyacetic acid in the Rat. **Toxycology.** Vol. 22, Hal. 93 – 100.
- Carlson, B.M. 1988. **Patten's Foundations of Embryology.** Fifth edition. Mcgraw Hill Inc. USA.
- Curran, T. dan D'Arcangelo, G. 1998¹. Role of Reelin in The Control of Brain Development. **Brain Research Reviews** Vol. 26, Hal. 286-294.
- Curran, T. dan D'Arcangelo, G. 1998². Reeler : New Tales on a Old Mutant Mouse. **Bio Essays** Vol.20, Hal. 235-244.
- Darmanto, W. 1993. Pengaruh Asam Metoksi Asetat terhadap Perkembangan Pralahir Mencit (*Mus musculus*) Albino Galur AJ. **Tesis**. Pasca Sarjana Institut Teknologi Bandung. Bandung.

- Darmanto, W., Sudarwati, S. dan Sutasurya. L. A. 1994. Effects of Methoxyacetic Acid on Prenatal Development of Mice, **Environmental Medicine**, Vol. 38, No. 1, Hal. 25-28.
- Darmanto, W. 1998. Efek 2 *Methoxyetanol* terhadap Pembentukan Somit dan Kelainan Rangka Aksial pada Mencit. **Proceedings- Temu Ilmiah VII**. Hiroshima 5 – 6 September 1998. Persatuan Pelajar Indonesia di Jepang. Jepang.
- Darmanto, W., Inouye, M. dan Murata, Y. 1999. Efek Radiasi Sinar X Terhadap Kadar Protein Reelin, Migrasi Sel Purkinje dan Sel Bergmann pada Cerebellum Tikus Putih., **Proceeding Temu Ilmiah VIII**. Osaka. Jepang.
- Darmanto, W., Inouye, M., Takagishi, Y., Ogawa, M., Mikoshiba, K., dan Murata, Y. 2000. Dearrangement 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.5, Hal..245-256.
- Darmanto, W. 2002. Apoptosis pada Sel Granulosa Cerebellum Tikus Akibat Radiasi sinar X : Deteksi Apoptosis Dengan Metode TACSTM In Situ Apoptosis Detection Kit. **Jurnal**, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Arlangga. Vol.3.No.7. Hal.105-109.
- D’Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, S.D., Sheldon, M., dan Curran, T. 1999. Reelin is a Ligand for Lipoprotein Receptors. **Neuron**. Vol.24. Hal. 471-479.
- Del Rio, J. A., Heimrich, B., Borrel, V., Forster, E., Drakew, A., Alcantara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, M., Derer, P., Frotscher, M. dan Soriano, E. 1997. A role for Cajal-Retzius cells and Reelin in the development of hippocampal connections. **Nature**.Vol.385.Hal. 70-75
- Doull, J., Klaassen, C.D. dan Amdur M. O. 1980. **The Basic Science of Poisons**, Second Edition, Machmilan Publishing Co., Inc., New York.
- Duke, R.C., Ojcius D.M. dan Young D.E. 1996. **Cell Suicide in Health and Disease**. Scientific American. Hal. 48-55.
- Fishell, G. dan Kriegstein, A. 2005. Cortical Development: New Concepts. **Journal Neuron**. Vol. 46. Hal 361-362.
- Frandsen, R.D. 1992. **Anatomi dan Fisiologi Ternak**. Edisi ke-empat. Fak. Peternakan UNDIP. Gajah Mada University Press.

- Gilbert, S. F. 1985. **Development Biology**. Sinaeur Associates. Inc. Publishers Sunderland. Massachusetts.
- Harinimiswari, A. 2002. Penggunaan PSK (Krestin) sebagai Proteksi Terhadap Efek Teratogenik 2-Methoxyethanol pada Perkembangan Cerebellum Mencit (*Mus musculus*) Prenatal. **Skripsi**. Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Harmonis, R. 2001. Kelainan Korteks Cerebrum dan Cerebellum Mencit (*Mus musculus*) Akibat Induksi 2-Methoxyethanol. **Skripsi**. Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Horton, V.L., Sleet, R.B., Greene, J.A. dan F, Welsch. 1985. Developmental phase spesific and dose related teratogenic effects of ethylene glycol monomethyl ether in CD-1 mice. **Toxicology and Applied Pharmacology** 80, Hal. 108-118.
- Humason, G. L. 1967. **Animal Tissue Technique**. W. H. Freeman and Company, san Francisco.
- Insani, D. M. 2004. Pengaruh 2-Methoxyethanol (2-ME) Pada Masa Awal Organogenesis Terhadap Perkembangan Otak Mencit (*Mus musculus*) Prenatal. **Skripsi**. FMIPA, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Jasin, M. 1984. **Sistematik Hewan (Invertebrata dan Vertebrata)**, Sinar Jaya, Surabaya.
- Kusnoputranto, H. 1995. **Pengantar Toksikologi Lingkungan**. UI bekerja sama dengan proyek Pengembanagn Pusat Studi Lingkungan Direktorat Jendral Pendidikan. DEPDIBUD. Jakarta.
- Lambert de Rouvroit, C. dan Goffinet, A. M. 1998. The Reeler Mouse as a Model of Brain Development. **Adv. Anat. Embryol Cell Biol.** Vol. 150, Hal.1-108.
- Li, L. H., Winw, N., Mille, D. S., Reece, J. M., Smith, M. Dan Chapin, R. E. 1997. Protection Againts Methoxyacetic-Acid Induced Spermatocyte Apoptosis With Calcium Channel Blockers In Culture Rat Seminiferous Tubule : Possible Mechanism, **Toxicology and Applied Pharmacology**, Vol.144, Hal. 105-119.
- Lunitasari Y. 2004. Kandungan Antioksidan Darah Pada Mencit (*Mus musculus*) Akibat Pemberian 2-metoksietanol Dan Usaha Pencegahan Dengan PSK (Polisakarida Krestin). **Skripsi**. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Airlangga. Surabaya.

- Ma'ruf, A. 2002. Fisiologi Kematian Sel. **Majalah Ilmu Faal Indonesia.** Vol. 01/2/2002. Hal 13-27.
- Maslachah, L., Sukmanadi, M. dan Sugihartuti, R. 2003. Pengaruh pemberian Antisterilitas Alpha Tocopherol Terhadap Sprematogenesis Tikus Yang Menerima Stresor. **Laporan Penelitian**, FKH, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Mischel, P.S., Nguyen, L.P. dan Vinters, H.V. 1995. Cerebral cortical dysplasia associated with pediatric epilepsy. Review on Neuropathologic features and proposal for a Grading System. **Jurnal Neuropathology and Experimental Neurology**. Vol. 54. Hal.137 – 153.
- Moslen, M.T., Kaphalia, L., Balasubramanian, H., Yin, Yong Mei dan Au. W.W. 1995. Spesies Differentes in Testicular and Hepatic Biotransformation of 2-Methoxyethanol, **Toxicology**, Vol. 96, Hal. 217-224.
- Morrisey, R.E., Harris, M.W. dan B. A. Schwetz. 1989. Developmental Toxicity Screen Result of Rat Studies with Diethylaxyl Phtalate and Ethylene Glycol Monomethyl Ether, **Teratogen. Carcinogen. Mutagen**, Vol. 9., Hal. 119 – 129.
- Ono, K., Yanaghara, M., Mizukawa, K., Yuasa, S. dan Kawamura, K. 1989. Monoclonal Antibody that binds to both the prenatal and postnatal astroglia in rodent cerebellum. **Developmental Brain Research**. Vol. 50, Hal. 54 –159.
- Ringstedt, T., Linnarsson, S., Wagner, J., Lendahl, U., Kokaia, Z., Arenas, E., Ernfors, P. dan Ibanez, F.C. 1998. BDNF Regulates Reelin Expression and Cajal-Retzius Cell Development in the Cerebral Cortex, **Neuron**. Vol. 21, Hal 305-315.
- Ritter, E. J., Scoot, W. J., Randall, J.L. dan J. M. Ritter. 1985. Teratogenicity of Dimethyl Phtalate and Its Metabolites Methoxyethanol and Methoxyacetic acid in The Rat, **Teratology** Vol. 32, Hal. 5-31.
- Ross, C.A. dan Pearlson, G.D. 1996. Schizophrenia, The Heteromodal Association Neurocortex and Development. Potential for Neurogenetic Approach. **Trends Neurosci**. Vol. 19, Hal. 171 – 176.
- Rugh, R. 1968. **The Mouse : Its Reproduction and Development**. Minneapolis. Burgess Publising Company.
- Rumanta, M., T.W. Surjono, S. dan Sudarwati. 2001. Pengaruh asam metoksiasetat terhadap organ reproduksi mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster Jantan. **Proceeding, ITB**. Vol.3.No.2.

- Ruyani A., Sudarwati S., dan Sutasurya L.A. 2001. Perubahan Profil Protein Tunas Anggota Tubuh Depan Mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster Akibat perlakuan dengan Methoxyacetic acid. ITB. Bandung.
<http://www.tempo.co.id/medika/arsip/062001/index-isi.asp?file=art-3>
- Scott, W.J., Nau, H., Wittfouht, W. dan H.J Marker. 1987. Ventral Duplication of Autopic : Chemical Induction by Methoxyacetic Acid in Rat Embryos, **Development**, Vol. 99, Hal. 127 – 136.
- Scot t, W.J., Franklin, R., wittfoth, W. dan Nau, H. 1989. Teratologic Potential of 2-Methoxyethano and transplacental Distribution of its Metabolite, 2-Metthoxyacetic acid, in Non-human Primates. **Teratology**. 1998. Vol. 39 Hal 363 – 373.
- Soejoedono, D.R., Djuwita,I. dan Damayanti, S.C. 2004. Modul Praktikum Isolasi dan Identifikasi Protein. **Pelatihan Pemanfaatan Teknik dan Instrumentasi Biologi Molekuler, FKH IPB**, Modul 7.
- Suwarno, Rantam, F. A. dan Dachlan, P. Y. 2001. Ciri Protein PRM Virus Dengue-3 Isolat Surabaya sebagai Bahan Diagnostik. **Landasan Ilmiah Produksi Bahan Bioaktif dalam Budi Daya dan Kultur Jaringan**. Hal : 11.
- Syed, V. dan Hecht, N.B. 1998. Rat pachytene spermatocytes down-regulated a polo-like kinase and up-regualted a thiol-specific antioxidant protein, whereas Sertoli cells down-regulate a phosphodiesterase and up regulate an oxidative stress protein after exposure to methoxyethanol and methoxyacetic acid. **Endocrinology**. Vol. 39, Hal. 3503-35111
- Wine, R.N., Ku, W.W., Li, L.H. dan Chapin, R.E. 1997. Cyclophilin is a present in rat germ cells and is associated with spermatocyte apoptosis. **Biology Reproduction**.Vol. 56. Hal. 493 – 446.
- Yatim, W. 1990. **Reproduksi dan Embryologi**, Penerbit Tarsito, Bandung.

Lampiran 1

Cara pembuatan larutan uji

☆ Pembuatan larutan 2-ME 12,5 mmol/kg berat badan :

Diketahui : Mr 2-ME = 76,1

Massa jenis = 0,96

Induksi dilakukan secara intraperitoneal sebesar 1,0 ml / 10 gr bb atau 10 ml / kg bb.

Ini berarti bahwa setiap 10 ml / kg bb harus mengandung 12,5 mol

10 ml / kg mengandung 12,5 mmol / kg bb atau $12,5 \text{ mmol} / 10 \text{ ml} = 1,25$ molar.

1,25 molar = 1,25 mol 2-ME / 1 liter pelarut

1,25 mol 2-ME = X gram / 76,1

X gram 2-ME = $1,25 \times 76,1 \text{ gr} / \text{lt} = 95,125 \text{ gr}$

Jadi : $95,125 \text{ gr 2-ME} = 95,125 / 0,96 = 99,09 \text{ ml}$ dalam 1 liter pelarut.

Car substrat : 0,8 mg / ml ℓ -NPP dalam 500 ml aquadest

Buffer substrat : car substrat = 1 : 1

10. Blot dicuci dengan PBS selama 5 menit keringkan

11. Menggunakan marker standart dengan BM 86,0 – 200,0 kDA.

Lampiran 3

Pembuatan PBS 1X (Metode Dulbeco's)

PBS 1X diperoleh dari stok PBS 10 X

☆ Pembuatan PBS 10 X

NaCl = 8 gr

KCl = 0,2 gr

Na₂HPO₄ = 2,9 gr

KH₂PO₄ = 0,2 gr

Ditambahkan aquades steril sampai volume mencapai 100 cc dan memeriksa pH = 7,4. Jika kurang asam atau kurang basa ditambahkan lagi dengan HCl atau NaOH / KOH.

☆ Pembuatan PBS 1 X sebanyak 10 ml

$$V_1M_1 = V_2M_2$$

$$V_1 10 = 10.1$$

$$V_1 = 10/10$$

$$= 1$$

Jadi 1ml PBS 10 X + 9 ml aquades = PBS 1 X

Lampiran 4

Pembuatan PFA 4 %

PFA 4 % diperoleh dari stok PFA *) 20 %

☆ Pembuatan PFA 20 % (stok)

- 20 gram PFA ditambah aquades **) ± 70 cc kemudian dipanaskan dengan hot plate sambil di stirrer $\pm 70^{\circ}\text{C}$
- Ditambahkan NaOH 5N ± 2 tetes atau 2N ± 4 tetes sedikit demi sedikit sampai jernih dan tidak ada krista
- Ditambahkan aquabides sampai dengan 100 cc dan disimpan dalam refrigerator.

☆ Pembuatan PFA 4 % dalam pelarut PBS 10 X (dari stok) volume 100 cc.

PFA 20 % (stok)	= 20 cc
PBS 10 X	= 10 cc
Aquabides	= <u>70 cc+</u>
	100 cc

*) PFA dalam bentuk serbuk produksi dari Merck, Jerman.

**) Pelarut aquabides steril produksi dari Ika Pharmindo Pitramas, Indonesia.

Lampiran 5

Data persentase kematian sel pada cerebral cortex pada pembedahan 48 jam setelah diinjeksi 2-ME pada umur kebuntingan 18 hari secara intraperitoneal dengan dosis 12,5 mmol/kg berat badan dengan 24 kali replikasi pada perbesaran 2200 X.

Kontrol				
No.	Jumlah Sel Mati	Jumlah Sel Hidup	Jumlah Sel Total	% sel mati
1	25	460	485	5,2
2	112	563	675	16,6
3	52	722	774	6,7
4	45	564	609	7,4
5	52	422	474	11,0
6	44	477	521	8,4
7	22	424	446	4,9
8	40	497	537	7,4
9	32	569	601	5,3
10	21	337	358	5,9
11	27	399	426	6,3
12	40	484	524	7,6
13	23	507	530	4,3
14	27	479	506	5,3
15	21	509	530	4,0
16	19	442	461	4,1
17	20	428	448	4,5
18	22	404	426	5,2
19	24	455	479	5,0
20	22	488	510	4,3
21	11	506	517	2,1
22	13	440	453	2,9
23	22	490	512	4,3
24	8	393	401	2,0

Perlakuan

No.	Jumlah sel mati	Jumlah sel hidup	Jumlah Sel Total	% sel mati
1	489	244	733	66.7
2	16	738	754	2.1
3	69	576	645	10.7
4	107	590	697	15.4
5	303	227	530	57.2
6	52	454	506	10.3
7	45	635	680	6.6
8	87	485	572	15.2
9	285	423	708	40.3
10	369	405	774	47.7
11	287	525	812	35.3
12	382	427	809	47.2
13	66	536	602	11.0
14	111	534	645	17.2
15	135	749	884	15.3
16	221	658	879	25.1
17	220	575	795	27.7
18	532	161	693	76.8
19	192	486	678	28.3
20	320	478	798	40.1
21	220	702	922	23.9
22	78	671	749	10.4
23	68	528	596	11.4
24	490	66	556	88.1

Lampiran 6

Uji Wilcoxon untuk persentase kematian sel pada cerebral cortex pada pembedahan 48 jam setelah diinjeksi 2-ME pada umur kebuntingan 18 hari secara intra peritoneal dengan dosis 12,5 mmol/kg berat badan.

NPar Tests**Descriptive Statistics**

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
KONTROL	24	5.863	3.047	2.0	16.6
PERLAKUA	24	30.417	23.362	2.1	88.1

Wilcoxon Signed Ranks Test**Ranks**

	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PERLAKUA - KONTROL Negative Ranks	1 ^a	11.00	11.00
Positive Ranks	23 ^b	12.57	289.00
Ties	0 ^c		
Total	24		

- a. PERLAKUA < KONTROL
 b. PERLAKUA > KONTROL
 c. KONTROL = PERLAKUA

Test Statistics^b

	PERLAKUA - KONTROL
Z	-3.971 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000

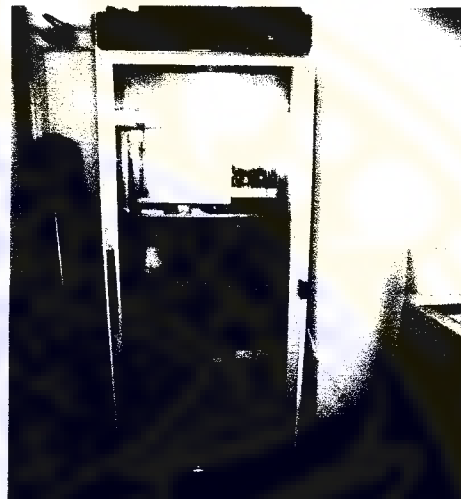
- a. Based on negative ranks.
 b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Lampiran 8

Foto alat dan bahan



A



B



C



D

Keterangan :

- A. Ultrasonikasi
- B. Lemari pendingin
- C. dan D. Sentrifuge dingin