

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUAH MERAH
(*Pandanus conoideus* Lam.) TERHADAP TINGKAT FERTILISASI
DAN PERKEMBANGAN EMBRIO TAHAP PREIMPLANTASI
MENCIT (*Mus musculus*) *IN VIVO***

**THE INFLUENCE OF RED FRUIT EXTRACT
(*Pandanus conoideus* Lam.) TO THE LEVEL OF FERTILIZATION AND *IN VIVO*
GROWTH OF MICE (*Mus musculus*) EMBRYOS DURING
THE PREIMPLANTATION PHASE**

Susanti Wahyuningsih¹, Okid Parama Astirin², Syahrudin Said³
Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta, Jawa Tengah^{1, 2}
Puslit Bioteknologi LIPI Cibinong-Bogor, Jawa Barat³

Red fruit extract (RFE) with its *alpha tocopherol* and *betacaroten* functioning as antioxidant are expected able to prevent the free radical on the female reproducing system. Due to the limited information concerning on the influence of RFE to the reproduction function specifically at the growth of embryo, a study is then required in order to know the influence of RFE to the level of fertilization and growth of mice embryos during the preimplantation phase.

The application of RFE dose 0mL, 0,05mL, and 0,1mL for seven days is done to know its influence to the level of fertilization, then the application of RFE is continued during 0-3 days stage of pregnancy (0 day of pregnancy is the formation of the *vaginal plug*). It is done to know the influence of giving RFE to the level of fertilization and growth of mice embryos during the pre-implantation phase. The super-ovulation of the white mice is done by inseminating 5 IU PMSG and hCG (48 hours after PMSG), breeding those mice with male and female comparison = 1:1. The single-cell-embryos are collected 20 hours after the inoculation of hCG by incising of the oviduct at the CZB+Hepes+hyaluronidase medium, then, the egg cells are cleaned in same medium without hyaluronidase. The ovum is fixated by using glutaraldehyde 2,5% in PBS pH 7,4, soaked in neutral formalin 10%, dehydrated by using ethanol of 95%, coloured with lacmoid 0,25% in acetic acid of 45%, the ovum are then cleaned by applying acetoglycerol and is done by observing the pro-nucleus. The morula and blastosis are collected after 84 hours after the inoculation of hCG, each uterus is then flushed by applying CZB+Hepes medium, embryos are cleaned by the same medium, and the last is the observation towards those embryos.

The influence of the red fruit extract (RFE) at level of white mice fertilization, with dose 0,1mL significantly gives a positive effect (46,01%), when it is compared with dose 0,05mL (37,51%) and controlled (16,38%) towards the formation of the male pro-nucleus. The influence of RFE towards the formation of the female pronucleus at dose 0,1mL (50,91%) and 0,05mL (62,49%), in fact, significantly gives a negative effect (83,62%) at the control (54,16%). The influence of RFE to the growth of embryo during the preimplantation phase with dose of 0,05 mL and 0,1mL may inhibit the growth of mice embryos during the preimplantation phase.

Keywords: *Pandanus conoideus* Lam., pronucleus, morula and blastosis.

PENDAHULUAN

Bioteknologi saat ini telah mengalami perkembangan yang pesat dan penelitian – penelitian yang telah dilakukan memberikan manfaat untuk mengatasi masalah dalam sebagian aspek kehidupan. Salah satunya adalah dengan menggunakan bioteknologi embrio, misalnya pemanfaatan aplikasi bioteknologi *stem cells* yang digunakan sebagai terapi medis dengan menggunakan sel – sel *inner cell mass* yang diisolasi dari blastosis. Kendala yang mungkin terjadi adalah adanya radikal bebas yang terdapat pada lingkungan sekitar tubuh maternal ataupun yang terdapat pada sistem reproduksi maternal, salah satunya adalah terjadinya radikal peroksil pada membran sel, sehingga dapat mempengaruhi perkembangan embrio khususnya tahap preimplantasi.

Embrio tahap preimplantasi merupakan salah satu bahan yang digunakan untuk penelitian dibidang bioteknologi embrio (IVF/IVM= *in vitro fertilization/ maturation*, transfer embrio, dan *stem cells*). Tahap preimplantasi embrio merupakan tahap perkembangan dasar sebelum tahap organogenesis (Rugh, 1968), tahap ini merupakan tahap dimana embrio sangat tergantung pada nutrisi yang ada pada cairan oviduk (Sumarmin dkk., 1999) dan untuk kelangsungan hidup embrio pada tahap selanjutnya sangat tergantung dari keberhasilan hidup embrio pada tahap preimplantasi ini.

Secara umum radikal bebas atau senyawa oksigen reaktif (*reactive oxygen species* = ROS) adalah atom atau gugus yang orbital luarnya memiliki elektron yang tidak berpasangan, bahan ini bersifat magnetik dan reaktif yang dapat menimbulkan kerusakan atau kematian sel dalam tubuh. Adapun salah satu cara penangkalan radikal bebas ini adalah dengan pemberian senyawa antioksidan. Antioksidan berperan aktif menangkap radikal peroksil dengan memberikan atom hidrogennya sehingga menjadi radikal baru yang bersifat lebih stabil karena terjadi delokalisasi elektron yang tidak berpasangan (Maslachah dkk., 2004). Senyawa antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas dan biasa dikonsumsi diantaranya adalah alfa tokoferol dan betakaroten (Maslachah dkk., 2004; Budi dan Paimin, 2005; Silva, 2006). Contoh senyawa alami yang mengandung kedua antioksidan tersebut adalah ekstrak buah merah (EBM).

Menurut Budi dan Paimin (2005) ekstrak buah merah (EBM) mengandung senyawa antioksidan (alfa tokoferol dan betakaroten) yang tinggi. Beta karoten (vitamin A) dan alfa tokoferol (vitamin E) merupakan senyawa esensial yang dibutuhkan pada fungsi reproduksi (Bendich *and* Langseth, 1989; Linder, 1992; Chew *et al.*, 1993; Rothman *et al.*, 1995; Redmond *et al.*, 2001; Schweigert *et al.*, 2003; Lintig *and* Vogt, 2004 dan Jishage *et al.*, 2005). Suplementasi vitamin A pada biri-biri yang disuperovulasi dapat meningkatkan pembentukan embrio blastosis secara *in vitro* (Eberhardt *et al.*, 1999). Penelitian yang dilakukan oleh Gajda *et al.* (2008) efek suplementasi vitamin E terhadap kultur *in vitro* embrio babi dapat meningkatkan produksi blastosis.

Ekstrak buah merah (EBM) dengan kandungan alfa tokoferol dan betakaroten yang berfungsi sebagai antioksidan dapat menangkal radikal bebas yang terdapat pada sistem reproduksi maternal, sehingga diharapkan dapat meningkatkan keberhasilan perkembangan embrio tahap preimplantasi. Masih terbatasnya informasi mengenai pengaruh EBM terhadap fungsi reproduksi khususnya pada perkembangan embrio, maka perlu diteliti untuk mengetahui pengaruh EBM terhadap tingkat fertilisasi dan perkembangan embrio tahap preimplantasi mencit (*Mus musculus*) *in vivo*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2007 – Desember 2007 di Laboratorium Reproduksi dan Genetika Ternak Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong, Bogor.

Mencit betina () (umur 6-8 minggu dengan berat badan 30-35 gram) yang digunakan sebanyak 30 ekor terbagi menjadi 3 kelompok perlakuan, masing-masing perlakuan 10 ekor yang terbagi menjadi dua subkelompok perlakuan, dan masing-masing subkelompok terdiri dari lima ulangan. Pemberian EBM pada mencit dilakukan secara oral dengan dosis A1&A2 (0mL/ekor/hari); B1&B2 (0,05mL/ekor/hari); dan C1&C2 (0,1mL/ekor/hari) (dosis mengacu metode Sakinah (2007), Roza (2006) dan Intan (2006)). Pemberian EBM dilakukan selama 7 hari berturut-turut sebelum fertilisasi (subkelompok pengamatan tingkat fertilisasi: A1, B1, C1) dan selama 0-3 hari umur kebuntingan (subkelompok pengamatan tingkat perkembangan embrio preimplantasi *in vivo*: A2, B2, C2).

Setelah terjadinya fertilisasi yang ditandai dengan terbentuknya *vaginal plug*, yang sebelumnya telah dilakukan superovulasi pada hari ke-4 dan ke-7 perlakuan yaitu dengan dengan suntikan 5 IU PMSG diikuti dengan suntikan 5 IU hCG secara *intra-peritoneal*. Waktu penyuntikan PMSG (*Pregnant Mare Serum Gonadotropin*) adalah pada pertengahan siklus terang, yaitu pada pukul 12.00, sedangkan penyuntikan hCG (*Human Chorionic Gonadotropin*) dilakukan 48 jam setelah PMSG (Hogan *et al*, 1986), maka embrio selanjutnya dapat dikoleksi. Embrio 1-sel dikoleksi 20 jam pasca penyuntikan hCG (Ayu, 2005) dengan menoreh bagian oviduk pada medium CZB (Uranga dan Arechaga, 1997)+Hepes+*Hyaluronidase*. Embrio tahap morula dan blastosis dikoleksi setelah 84 jam (3½ hari) pasca penyuntikan hCG (Hogan *et al*, 1986) cara pengoleksiannya adalah dengan memflushing bagian uterus menggunakan medium CZB+Hepes.

Embrio 1-sel yang telah dikoleksi dicuci dengan medium CZB+Hepes. Selanjutnya embrio diletakkan pada gelas benda, difiksasi, diwarnai dan diamati pronukleusnya. Sedangkan embrio tahap morula dan blastosis diamati dan dikelompokkan sesuai pada tahapannya (morula dan blastosis). Pengamatan dilakukan dengan menggunakan *stereo microscope* untuk pengamatan pronukleus, dengan perbesaran 1000x, *inverted microscope* untuk pengamatan morula dan blastosis, dengan perbesaran 1000x.

Embrio 1-sel yang telah dikoleksi diletakkan diatas kaca obyek, lalu ditutup dengan kaca penutup yang memiliki bantalan terbuat dari parafin dan vaselin (1:9) dikeempat sudutnya. Difiksasi dengan *glutaraldehyde* 2,5% dalam PBS pH 7,4 selanjutnya dicelup ke dalam formalin netral 10% selama 4 jam pada suhu ruangan. Sampel kemudian didehidrasi menggunakan etanol 95% dan diwarnai dengan lacmoid 0,25% dalam asam asetat 45%, kemudian dicuci dengan mengalirkan *acetoglycerol* pada sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak buah merah (EBM) terhadap tingkat fertilisasi dan perkembangan embrio tahap preimplantasi mencit secara *in vivo*. Tingkat fertilisasi ditandai dengan pembentukan pronukleus jantan dan betina, sedangkan perkembangan embrio tahap preimplantasi ditandai dengan perkembangan embrio mencapai tahap morula dan blastosis.

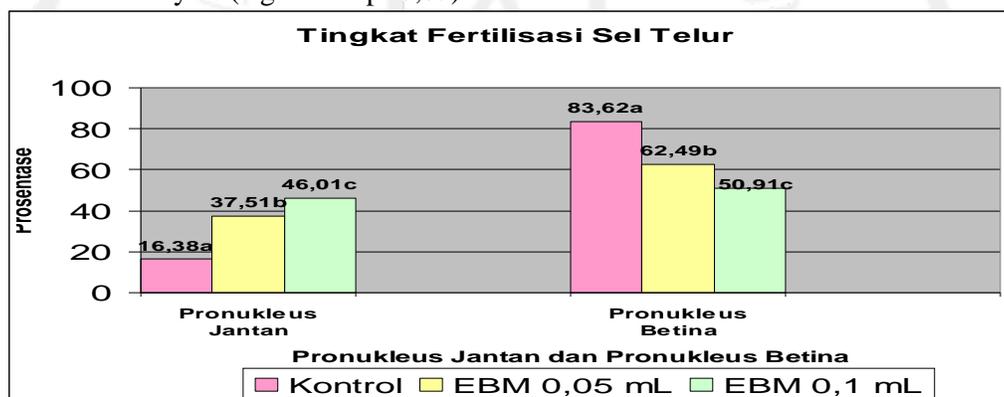
A. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Merah (EBM) Terhadap Tingkat Fertilisasi

Tingkat fertilisasi sel telur pada penelitian ini dilihat dari prosentase kehadiran pronukleus. Hasil pengujian statistik yang dilakukan terhadap prosentase kehadiran pronukleus, untuk pengamatan tingkat fertilitas disampaikan pada Tabel 1 dan Gambar 1 berikut:

Tabel 1. Hasil Analisis Statistik Prosentase Pronukleus Jantan dan Betina setelah 20 jam pasca hCG

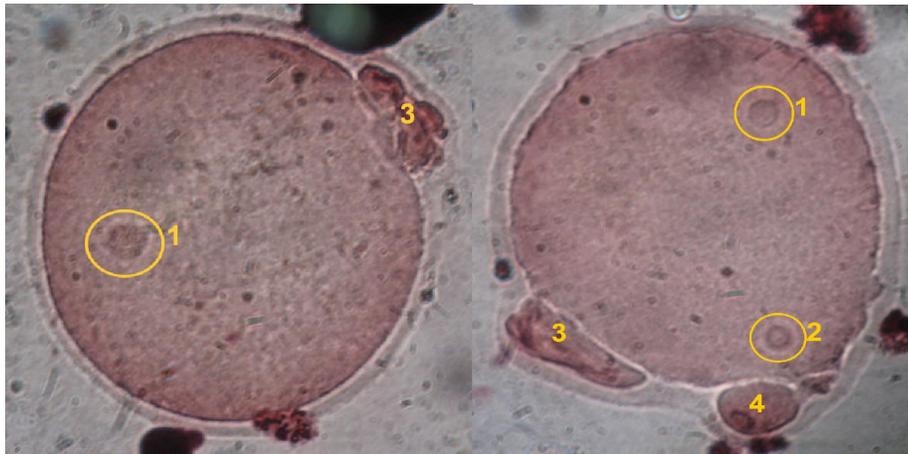
Perlakuan	Jumlah (n)	Prosentase Pronukleus \pm SD	
		Pronukleus Jantan	Pronukleus Betina
EBM 0mL	98	16,38 ^a \pm 3,25	83,62 ^a \pm 3,26
EBM 0,05mL	75	37,51 ^b \pm 1,57	62,49 ^b \pm 1,57
EBM 0,1mL	67	46,01 ^c \pm 5,28	50,91 ^c \pm 4,13

Keterangan: huruf yang berbeda pada satu kolom yang sama menunjukkan beda nyata (signifikan p 0,05)



Gambar 1. Grafik prosentase pronukleus jantan dan pronukleus betina

Prosentase perolehan pronukleus diambil dari waktu terbentuknya pronukleus jantan dan betina. Terbentuknya pronukleus jantan dan betina adalah 8 jam pasca fertilisasi, dimana 0 jam adalah 12 jam pasca hCG (saat ovulasi) (Ayu, 2005). Pronukleus jantan terbentuk lebih dahulu daripada pronukleus betina (Harjanti, 2002; Ayu, 2005) dan mengenai ukuran, pronukleus jantan biasanya lebih besar daripada pronukleus betina (Rugh, 1968; Hafez, 1970; Ayu, 2005). Hasil dari pengamatan dapat dilihat pada Gambar 2 berikut, dengan perbesaran 1000x:



Gambar 2. Sel telur dengan pronukleus jantan dan betina.
Keterangan: 1). Pronukleus Jantan; 2). Pronukleus Betina;
3). Polar Bodi I; 4). Polar Bodi II

Pemberian ekstrak buah merah (EBM) pada mencit selama 7 hari ternyata memberikan pengaruh secara signifikan terhadap pembentukan pronukleus jantan (PNJ). Pada pemberian EBM dosis 0,1mL memberikan efek positif pada pembentukan PNJ. Berdasarkan hasil analisis statistik ternyata pemberian EBM dosis 0,1ml ($46,01^c \pm 5,28$) berbeda secara signifikan terhadap kontrol ($16,38^a \pm 3,25$) dan terhadap pemberian EBM dosis 0,05mL ($37,51^b \pm 1,57$).

Perbedaan yang signifikan pada pemberian ekstrak buah merah (EBM) dosis 0,05mL dan 0,1mL terhadap pembentukan pronukleus jantan (PNJ), karena terciptanya lingkungan yang mendukung proses kapasitasi spermatozoa dalam sistem reproduksi betina, sehingga dapat mempermudah proses pembentukan PNJ. Menurut Meles (2006), faktor terjadinya perubahan kemampuan spermatozoa yang ada di dalam saluran reproduksi betina untuk membuahi sel telur, disebabkan adanya perubahan lingkungan di dalam saluran reproduksi betina yang berperan dalam proses fertilisasi sehingga kapasitasi dan fertilisasi dapat berlangsung.

Ekstrak buah merah (EBM) yang mengandung alfa tokoferol, betakaroten dan asam lemak yang diberikan pada mencit betina selama tujuh hari sebelum fertilisasi dapat memberikan pengaruh terhadap lingkungan sistem reproduksi betina. *Reactive oxygen species* (ROS) yang dihasilkan sperma berasal dari spermatozoa abnormal yang berada pada semen (Agarwal dan Saleh, 2002 dan Maslachah dkk., 2004; Silva, 2006), akibat dari gangguan pada spermatogenesis (Agarwal and Saleh, 2002).

Terciptanya lingkungan sistem reproduksi betina yang mengurangi reaksi oksidan pada spermatozoa sendiri oleh senyawa antioksidan dapat mendukung proses kapasitas spermatozoa dan meneruskan reaksi akrosomal sehingga pronukleus jantan (PNJ) dapat terbentuk.

Alfa tokoferol yang terkandung dalam ekstrak buah merah (EBM) dapat bertindak sebagai antioksidan yang akan menetralkan ROS menjadi inaktif atau stabil. Menurut Agarwal dan Saleh (2002), ROS yang terdapat pada semen harus inaktif atau kecil kadarnya, kadar yang kecil diperlukan untuk mengatur fungsi normal sperma seperti kapasitas sperma, reaksi akrosomal. Hal ini didukung oleh hasil penelitian Maslachah dkk. (2004), dengan pemberian alfa tokoferol 100mg/kg bb pada tikus yang diberi stressor berenang selama 30menit/hari selama 21 hari, ternyata dapat mencegah penurunan jumlah spermatozoa normal.

Keberhasilan terbentuknya pronukleus jantan tergantung ketersediaan kadar GSH (*Glutathione Stymulating Hormone*) pada ovum untuk mereduksi ikatan disulfid (-S-S-) pada inti protamin spermatozoa menjadi ikatan -S-H- (*thiol*). Jika kadar GSH pada ovum cukup, maka dengan tereduksinya ikatan disulfid status kondensasi pada spermatozoa dapat berlanjut menjadi dekonvensi yang merupakan syarat keberhasilan terbentuknya pronukleus jantan (PNJ) (Calvin and Bedford, 1971; Funahashi *et al.*, 1995). *Glutathione* pada oosit memiliki peran penting pada maturasi oosit (Luberda, 2005), selain itu GSH pada oosit juga berperan sebagai antioksidan dan melindunginya dari aktifitas toksik yang dihasilkan ROS yaitu dengan memutus reaksi berantai, sehingga dapat meredam radikal berbahaya yang terbentuk selama reaksi berantai (Luberda, 2005). Pemberian ekstrak buah merah (EBM) yang mengandung alfa tokoferol dimungkinkan dapat membantu kerja GSH dalam menangkal radikal bebas yang memapar ovum, sehingga ketersediaan GSH pada ovum meningkat. Didukung dengan hasil penelitian yang dilakukan Khotimah (2006) yang melakukan perlakuan paparan asap rokok pada tikus yang kemudian diberi ekstrak jinten hitam yang kaya akan senyawa antioksidan, memberikan pengaruh positif yaitu peningkatan kadar GSH paru dan GSH hepar dibandingkan dengan kontrol negatif (tanpa pemberian ekstrak). Ketersediaan GSH pada ovum yang meningkat dapat mencukupi kebutuhan GSH untuk mereduksi ikatan disulfid

pada inti protamin spermatozoa, sehingga status dekondensasi spermatozoa dapat terjadi dan PNJ pun akan terbentuk.

Ekstrak buah merah (EBM) yang diberikan pada mencit betina selama 7 hari ternyata juga memberikan pengaruh secara signifikan terhadap pembentukan pronukleus betina (PNB). Berdasarkan hasil analisis statistik ternyata pemberian EBM dosis 0,05mL ($62,49^b \pm 1,57$) berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) terhadap kontrol ($83,62^a \pm 3,26$) dan terhadap pemberian EBM dosis 0,1ml ($50,91^c \pm 4,13$), dimana pada pemberian EBM dosis 0,05mL dan 0,1mL presentase pembentukan pronukleus betina lebih sedikit dibandingkan dengan kontrol.

Pada saat aktivasi sel telur terjadi, sel telur akan melanjutkan tahapan perubahan inti (Harjanti, 2002), yaitu segera menyelesaikan pemasakan dari metafase II ke anafase II, telofase II dan membentuk pronukleus betina (Rugh, 1971). Proses perubahan inti tersebut melibatkan aktifitas mikrotubul (Reksoatmodjo, 1993; Campbell, 2002). Ekstrak buah merah dikenal sebagai obat anti kanker dan anti tumor (Budi dan Paimin, 2005), penelitian yang telah dilakukan oleh Wiryowidagdo (2006) EBM pada kultur *in vitro* sel kanker yaitu sel L1210 (penyebab kanker leukemia) dan HeLa (penyebab kanker rahim), ternyata EBM pada dosis 20,04 $\mu\text{g/ml}$ dapat mematikan 50% sel kanker L1210, sedangkan pada sel kanker HeLa adalah pada dosis 240 $\mu\text{g/ml}$. Penelitian yang dilakukan oleh Mun'im dkk. (2006) pada sel tumor tikus yang diinduksi dengan DMBA (7,12-dimetilbenz(a)antrasen) memberikan hasil yang positif, yaitu dengan pemberian EBM dosis 0,21ml/ 200g bb dapat menghambat pertumbuhan tumor. Penelitian yang dilakukan oleh Astirin dkk. (2007) terhadap sel kanker Raji, ternyata dengan pemberian EBM dapat mematikan 50% sel kanker Raji pada konsentrasi 0,03125 $\mu\text{L/mL}$ dan melalui imunostaining EBM memiliki aktifitas *recycle* gen P53 dengan memperlihatkan terjadinya apoptosis yaitu adanya fragmentasi nukleus. Dari hasil penelitian Wiryowidagdo (2006), Mun'im dkk. (2006) dan Astirin dkk. (2007) tersebut, kandungan dari EBM yang dapat menghambat pertumbuhan kanker dan tumor, maka dapat disimpulkan bahwa EBM memiliki aktifitas antikanker dan antitumor.

Mikrotubula pada umumnya sangat labil, cepat terakit maupun terurai. Hal inilah yang menyebabkan sangat pekanya gelendong mikrotubula terhadap pengaruh obat-obatan. Gangguan pada gelendong mikrotubula dapat mengganggu aktivitas sel

yang sedang membelah, biasanya zat-zat yang dapat mengganggu aktifitas mikrotubul salah satunya adalah zat antikanker yang dapat mencegah terbentuknya mikrotubula (Reksoatmodjo, 1993). Ekstrak buah merah yang telah terbukti memiliki aktifitas sebagai antikanker dan antitumor, maka EBM juga dapat mengganggu terbentuknya gelendong mikrotubulin pada proses meosis inti sel telur (metafase II, anafase II, telofase II), sehingga pembentukan pronukleus betina terhambat.

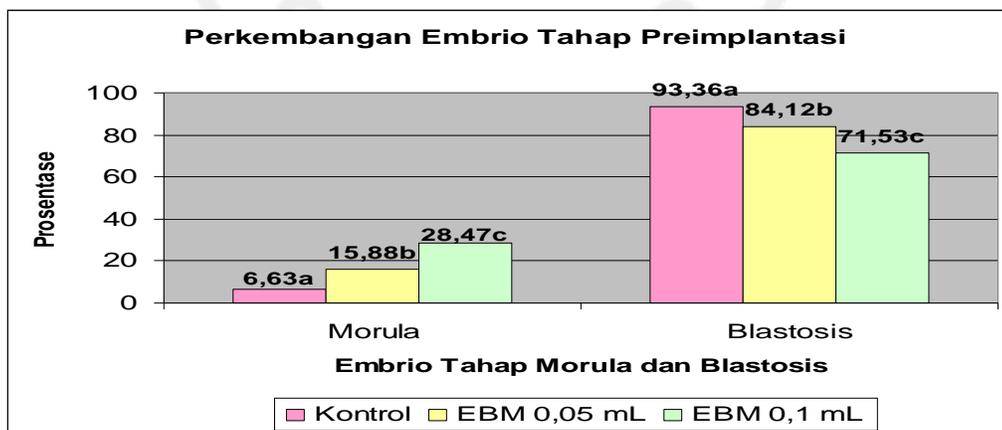
B. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Merah (EBM) Terhadap Perkembangan Embrio Tahap Preimplantasi

Pengaruh ekstrak buah merah (EBM) terhadap perkembangan embrio tahap preimplantasi dilihat dari prosentase terbentuknya morula dan blastosis. Hasil pengujian statistik yang dilakukan pada prosentase morula dan blastosis untuk pengamatan pengaruh ekstrak buah merah (EBM) terhadap perkembangan embrio tahap preimplantasi disampaikan pada Tabel 2 dan Gambar 3 berikut:

Tabel 2. Hasil Analisis Statistik Prosentase Morula dan Blastosis 84 jam pasca hCG

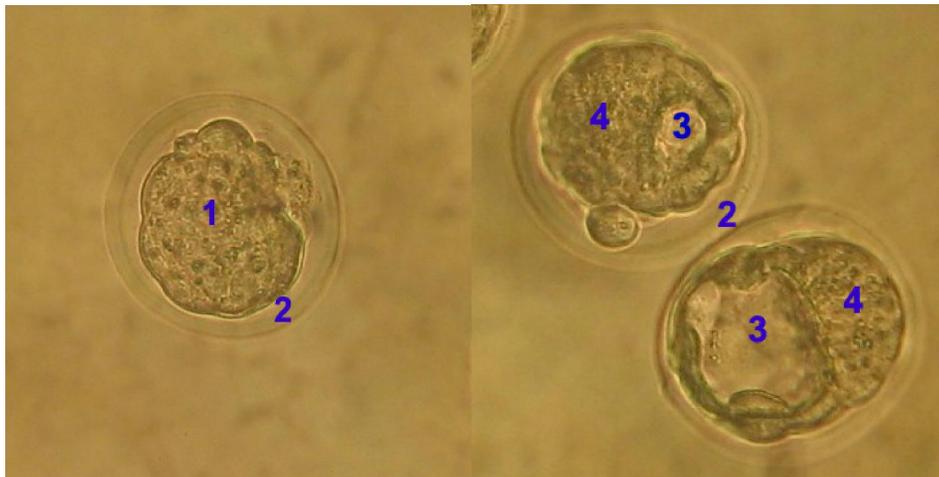
Perlakuan	Jumlah (n)	Prosentase Morula dan Blastosis \pm SD	
		Morula	Blastosis
EBM 0mL	105	6,63 ^a \pm 1,28	93,36 ^a \pm 1,28
EBM 0,05mL	105	15,88 ^b \pm 3,37	84,12 ^b \pm 3,37
EBM 0,1mL	105	28,47 ^c \pm 2,46	71,53 ^c \pm 2,46

Keterangan: huruf yang berbeda pada satu kolom yang sama menunjukkan beda nyata (signifikan = p 0,05)



Gambar 3. Grafik prosentase perkembangan embrio tahap preimplantasi

Data tersebut diperoleh dari waktu mulai terbentuknya blastosis, terbentuknya blastosis adalah 84 jam pasca hCG (Hogan *et al.*, 1986). Pemberian ekstrak buah merah (EBM) selama 7 hari sebelum fertilisasi dan dilanjutkan selama 0-3 hari umur kebuntingan. Adapun hasil pengamatan embrio morula dan blastosis dapat dilihat pada Gambar 4 berikut, dengan perbesaran 1000x:



a

b

Gambar 4. Gambar embrio mencit tahap morula dan blastosis
Keterangan: a). Morula; b). Blastosis; 1). Sel blastomer;
2). Zona pelucida; 3). Blastocoel; 4). Inner cell mass

Pengaruh pemberian EBM terhadap morula berdasarkan hasil analisis statistik, ternyata pada ketiga dosis pemberian EBM memberikan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$). Dosis 0,05mL ($15,88^b \pm 3,37$) berbeda secara signifikan terhadap pemberian EBM dosis 0,1mL ($28,47^c \pm 2,46$) dan kontrol ($6,63^a \pm 1,28$). Pada pengaruh pemberian EBM terhadap blastosis berdasarkan hasil analisis statistik, juga menunjukkan adanya perbedaan nyata ($p < 0,05$), pada dosis pemberian EBM dosis 0,05mL ($84,12^b \pm 3,37$) berbeda secara signifikan terhadap pemberian EBM dosis 0,1mL ($71,53^c \pm 2,46$) dan kontrol ($93,36^a \pm 1,28$). Dari hasil perhitungan statistik morula dan blastosis diatas, terlihat bahwa pemberian EBM dosis 0,05mL dan 0,1mL, ternyata belum tepat untuk perkembangan embrio tahap preimplantasi mencit, hal ini terlihat dari masih terdapat embrio yang berada pada tahap morula di kedua perlakuan (EBM 0,05mL= 15,88%, dan EBM 0,1mL= 28,47%) dibandingkan dengan kontrol (6,63%).

Ekstrak buah merah (EBM) pada kedua dosis yang diberikan pada mencit belum tepat, karena dapat menghambat pembentukan blastosis. Menurut Neganova (2000) penurunan kemampuan perkembangan embrio mamalia disebabkan disfungsi mitokondria dan ATP yang tersedia rendah. Menurut Silva (2006) selama perkembangan embrio, metabolisme dalam sel membentuk *reactive oxygen species* (ROS) pada sekitar ekstraselulernya. Efek dari ROS pada perkembangan embrio dapat memblok atau menahan perkembangan normal pada embrio. Semakin banyak sel hasil perkembangan embrio tersebut, maka semakin banyak pula ROS yang terbentuk.

Pada awal perkembangan embrio setelah fertilisasi, embrio masih tergantung dengan ekspresi gen dari maternalnya, sehingga embrio masih dapat menangkal ROS atas bantuan *glutathione hormone stimulating* (GSH) dari maternalnya. Pada sapi, genom embrio ini diaktifkan pada tahap 8-16 sel, tanpa disertai sintesis GSH dari tubuh maternalnya (Silva, 2006). Sedangkan pada embrio mencit genom embrio diaktifkan pada tahap 2-sel (King, 1993). Dengan tidak adanya ekspresi gen dari maternal pada embrio untuk menangkal ROS, maka embrio membutuhkan peningkatan ATP untuk perkembangan embrio (Silva, 2006). Pemberian ekstrak buah merah pada kedua dosis (0,05mL dan 0,1mL), belum tepat untuk menyediakan ATP dari oksidasi asam-asam lemak yang terkandung dalam EBM. Menurut Murray *et al.* (2003), gangguan oksidasi asam lemak dapat terjadi akibat terdapatnya peningkatan asam lemak bebas dalam plasma sehingga menyebabkan akumulasi lipid. Akumulasi lipid ini terjadi akibat adanya defisiensi karnitin yang terjadi akibat dari biosintesis yang tidak memadai atau adanya kebocoran ginjal. Karnitin disintesis dari lisin dan metionin di hati dan ginjal.

Terjadinya defisiensi karnitin oleh asam – asam lemak yang terdapat pada EBM ini diperkuat oleh adanya hasil penelitian pemberian EBM dosis tunggal 0,1 mL pada mencit yang dikawinkan, ternyata dapat mengakibatkan kerusakan pada organ hati (Roza, 2006), ginjal (Intan, 2006) dan uterus (Suherman, 2006). Menurut Gibson dan Skett (1991), obat yang sering diberikan dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan suatu organ tertentu menjadi jenuh. Kerusakan yang terjadi pada organ hati yaitu degenerasi berbutir dan degenerasi lemak (Roza, 2006). Kerusakan yang terjadi pada organ ginjal yaitu degenerasi berbutir dan degenerasi

hidropis pada tubulus korteks dan medula, serta terjadi atrofi glomerulus dan glomerulus mengalami perlekatan dengan kapsula bowmen. Degenerasi adalah dimana sel kehilangan struktur dan fungsi normal, biasanya progresif, dan apabila berlanjut maka sel akan mengalami kematian. Pada penelitian yang dilakukan oleh Suherman (2006), EBM dapat menyebabkan degenerasi dan kongesti pada organ uterus. Kongesti merupakan suatu keadaan yang diakibatkan oleh terganggunya aliran darah, sehingga sirkulasi darah menjadi lambat dan oksigenasi ke jaringan menurun, karena darah masih berada dalam pembuluh darah.

Kongesti yang terjadi pada organ uterus yang telah dilaporkan dapat mengurangi suplai oksigen dalam cairan uterus. Menurut Sumarmin dkk. (1999), embrio preimplantasi sangat bergantung pada sekret kelenjar oviduk dan uterus. Perkembangan embrio merupakan aktifitas dalam kondisi aerobik, yaitu aktifitas yang memerlukan oksigen (Campbell, 2004). Dengan berkurangnya suplai oksigen akibat kongesti pada uterus maka perkembangan embrio akan terhambat. Rusaknya hati dan ginjal yang telah dilaporkan diduga dapat menghambat proses biosintesis karnitin dan menyebabkan defisiensi karnitin karena karnitin disintesis dari lisin dan metionin di hati dan ginjal. Akibatnya oksidasi pada asam-asam lemak pada EBM terhambat, sehingga kebutuhan ATP yang diperlukan untuk menangkal ROS yang terbentuk selama perkembangan embrio tidak dapat terpenuhi dan mengakibatkan penghambatan perkembangan embrio.

Alfa tokoferol bersifat stabil sebab mempunyai lipofilitas yang tinggi. Untuk menjadi lebih polar maka alfa tokoferol harus diabsorpsi kembali, oleh karena obat harus bersifat polar jika diekskresi (Gibson dan Skett, 1999; Maslachah dkk., 2004), sehingga akan terjadi kejenuhan alfa tokoferol yang mengakibatkan alfa tokoferol berfungsi sebagai oksidan (kurang reaktif) atau biasa disebut pro-oksidan (Maslachah dkk., 2004). Secara normal antioksidan lebih efektif pada konsentrasi rendah (AA, 2007), dengan kata lain pada kondisi dimana telah terjadi kejenuhan alfa tokoferol maka aktivitas antioksidan dari alfa tokoferol tidak dapat berfungsi secara maksimal untuk menangkal ROS yang dihasilkan saat perkembangan embrio.

Penelitian tentang pengaruh pemberian vitamin E terhadap fertilitas, *cleavage* dan perkembangan embrio pada mencit telah dilakukan oleh Hassa *et al.* (2007) namun hasil menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh terhadap fertilitas, *cleavage* dan

perkembangan embrio mencit. Didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Jishage *et al.* (2005) pada mencit, alfa tokoferol sangat diperlukan untuk proliferasi dan/atau fungsi dari plasenta, tetapi tidak diperlukan oleh perkembangan embrio itu sendiri. Penghambatan perkembangan embrio yang terjadi dikarenakan secara fisiologis ini dapat terlihat pada individu-individu mencit yang menolak pemberian EBM dengan memuntahkan kembali dan bersikap agresif, serta lama kelamaan bulu mencit menjadi kusam.

KESIMPULAN

Pengaruh pemberian ekstrak buah merah (EBM) pada tingkat fertilisasi mencit, dengan dosis 0,1mL memberikan efek positif dibandingkan dengan dosis 0,05mL dan kontrol terhadap pembentukan pronukleus jantan. Pengaruh pemberian ekstrak buah merah (EBM) pada dosis 0,05mL dan 0,1mL menyebabkan hambatan terhadap pembentukan pronukleus betina. Pengaruh pemberian EBM perkembangan embrio tahap preimplantasi dengan dosis 0,05 mL dan 0,1mL pada embrio mencit menyebabkan hambatan perkembangan embrio preimplantasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A. and R.A., Saleh. 2002. Review article: Role of oxidants in male infertility: Rationale, Significance, and Treatment. *Urologic Clinics of North America*. Vol 29(4): 1-11.
- AA. 2007. *Antioxidant*. <http://class.fst.ohio-state.edu/fst8211/Lect/AA.pdf>. [28 Februari 2008]
- Astirin, O.P., D.R. Budiani, F.R. Wibowo. 2007. Cytotoxicity, Proliferation Activity and P53 Expression on Raji Cells Affected Red Fruit (*Pandanus conoideus* Lam.) Treatment as Anticancer Candidate. *Seminar Internasional Universitas Brawijaya, Malang*.
- Ayu, D. R. Siti. 2005. Pembentukan Pronukleus Jantan Dan Pronukleus Betina Berdasarkan Waktu Setelah Terjadinya Fertilisasi Pada Mencit (*Mus musculus*). *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Prodi Biologi Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Bendich, A., and L. Langseth. 1989. Safety of Vitamin A. *Am J Clin Nutr* 49: 358-371.

- Budi, I Made. 2000. Kajian Kandungan Zat Gizi Dan Sifat Fisiko Kimia Berbagai Jenis Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) Hasil Ekstraksi Secara Tradisional Di Kabupaten Jayawijaya Propinsi Irian Jaya. *Tesis*. Program Pascasarjana IPB, Bogor.
- Budi, I Made, dan Paimin, Fendy R. 2005. *Buah Merah*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Campbell, A. Neil, J.B., Reece, and L.G., Mitchell. 2002. *Biologi. Edisi kelima. Jilid I*. Diterjemahkan oleh: Drs. Rahayu Lestari. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Campbell, A. Neil, J.B., Reece, and L.G., Mitchell. 2004. *Biologi. Edisi kelima. Jilid III*. Diterjemahkan oleh: Prof. Dr. Ir. Wasmen Manalu. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Calvin, HI., and Bedford, JM. 1971. Formation of Disulfide Bonds in The Nucleus and Accessory Structures of Mammalian Spermatozoa During Maturation in The Epididymis. *J Reprod Fertil. 13: 45-75*.
- Chew, B.P. 1993. Effect of Supplemental β -Carotene and Vitamin A on Reproduction in Swine. *J. Anim. Sci. 71: 247-252*
- Eberhardt D.M., Will W.A., and Godkin J.D. 1999. Retinol Administration to superovulated Ewes Improves *in vitro* Embryonic Viability. *Biology of Reproduction, 60: 1483-1487*.
- Funahashi, H., Machaty, Z., Prather, RS., Day, BN. 1995. Glutamyltranspeptidase (GGT) of Spermatozoa May Reduce Oocyte Glutathione (GSH) Content at Sperm Penetration. *Biol. Reprod. 52 (Suppl,1): 140 (Abstr)*.
- Gajda, B., M. Bryla and Z. Smorag. 2008. Effect of Protein Source, Vitamin E and Phenazine Ethosulfate on Developmental Competence and Quality of Porcine Embryos Cultured *in vitro*. *Folia Biologica (Krakow). 56(1-2): 57-63*.
- Gibson, G. G., and Skett, P. 1991. *Pengantar Metabolisme Obat*. UI Press, Jakarta.
- Harjanti, D.W. 2002. Perkembangan Inti Sel Telur dan Sperma Pasca Fertilisasi In vivo dan In vitro Pada Mencit (*Mus musculus albinus*). *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan. IPB, Bogor.
- Hassa, H., F. Gurer., H. M. Tanir, M. Kaya, N. B. Gunduz, A.E. Sariboyaci, and C. Bal. 2007. Effect of Cigarette Smoke and *alpha-tocopherol* (vitamin E) on Fertilization, Cleavage, and Embryo Development Rates in mice: An experimental in vitro fertilization mice model study. *Eur. J. Obstet Gynecol Reprod Biol 15: 1802 (Abstr)*.
- Hogan, B., Constantini, F., and Lacy, E. 1986. *Manipulating the Mouse Embryo A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.

- Intan, Putri Retno. 2006. Pengaruh Pemberian Sari Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) Terhadap Mencit (*Mus musculus*) yang Dikawinkan: Gambaran Histopatologi Organ Ginjal. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Bogor.
- Jishage, K., T. Tachibe, T. Ito, N. Shibata, S. Suzuki, T. Mori, T. Hani, H. Arai, and H. Suzuki. 2005. Vitamin E Is Essential for Mouse Placentation but Not for Embryonic Development It Self. *Biology Of Reproduction*, 73: 983-987.
- Khotimah, Siti. 2006. Pengaruh Pemberian Ekstrak Jinten Hitam (*Nigella sativa*) Terhadap Kadar GSH Paru dan Hepar Tikus Wistar yang Dipapar Asap Rokok. *JBP Vol.8 (2): 55-60*.
- King, G.J. 1993. *Reproduction In Domesticated Animals*. Elsevier Science Publisher, New York
- Leffingwell, John C. 2001. *Carotenoids as Flavor and Fragrance Precursors*. <http://www.leffingwell.com/carotene.htm>. [5 Mei 2007].
- Linder, M. C. 1992. *Biokimia Nutrisi dan Metabolisme: Dengan Pemakaian Secara Klinis*. UI Press, Jakarta.
- Lintig, J. and K. Vogt. 2004. Vitamin A Formation in Animals: Molecular Identification and Fuctional Characterization of Carotene Cleaving Enymes. *J. Nutr.* 134: 251S-256S.
- Luberda, Zofia. 2005. The Role of Glutathione in Mammalian Gametes. *Reproductive biologi. Vol 5(1): 5-13*
- Maslachah, L., M. Sukmanadi, dan R. Sugihartuti. 2004. Pengaruh Pemberian Antisterilitas *Alpha tocopherol* Terhadap Spermatogenesis Tikus Yang Menerima Stresor. *Jurnal Penelitian Medika Eksakta. 5: 258-269*.
- Meles, D.K. 2006. Efek Fraksi Alkaloid *Achyranthes aspera* L. Terhadap Fertilisasi dan Pembelahan Embrio Tikus. *JBP Vol 8(2): 82-86*.
- Mun'im, Abdul, R. Andrajati dan H. Susilowati. 2006. Uji HambatanTurmorigenesis Sari Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) Terhadap Tikus Putih Betina Yang Diinduksi 7,12 Dimetilbenz(a)Antrasen (DMBA). *Majalah Ilmu Kefarmasian III(3): 153-161*.
- Murray, R.K, Rand, M.L., and Harfenist, E.J. 2003. *Biokimia Harper*. Diterjemahkan oleh: dr. Andry Hartono. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Neganova, I.E., G.G., Sekirina, and U.E. Ritter. 2000. Surface-expressed E-cadherin, and Mitochondrial and Microtubule Distribution in Rescue of mouse

- Embryos from 2-cell block by Aggregation. *Molecular Human Reproduction*. Vol 6: 5: 454-46.
- Redmond, T.M., S. Gentleman, T. Duncan, S. Yu, B. Wiggert, E. Gantt, and F.X. Cunningham Jr. 2001. Identification, Expression, and Substrate Specificity of a Mammalian β -Carotene 15,15'-Dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 276 (9): 6560-6565.
- Reksoatmodjo, S.M.I., 1993. *Biologi Sel*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Proyek Pembinaan Tenaga Kependidikan Tinggi, Yogyakarta.
- Rothman. K.J., L.L. Moore, M.R. Singer, U.D.T. Nguyen, S. Mannino, and A. Milunsky. 1995. Teratogenicity of High Vitamin A Intake. *The New England Journal of Medicine*. 333: 1369-1373.
- Roza, Suhesti. 2006. Pengaruh Pemberian Sari Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) Terhadap Mencit yang Dikawinkan: Gambaran Histopatologi Organ Hati. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Bogor.
- Rugh, R. 1968. *The Mouse its Reproduction and Development*. USA: Burgess Publishing company.
- Sakinah, N., Sukrasno, M. Immaculata. 2007. *Efek Ekstrak Etanol Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dan Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) Terhadap Respon Imun Mencit*. <http://bahan-alam.fa.itb.ac.id>. [20 Februari 2008].
- Schweigert, F. J., B. Steinhagen, J. Raila, A. Siemann, D. Peet, and U. Buscher. 2003. Concentration of Carotenoid, Retinol and α -tocopherol in plasma and follicular fluid of women undergoing IVF. *Human Reproduction*. 18(16): 1259-1264.
- Silva, P.F. Nunes. 2006. *Physiology of Peroxidation Processes in Mammalian Sperm: Chapter 1. Oxidative Stress and Fertility-aspects of Molecular Oxidation and Their Effects on The mammalian Reproductive Output*. *Thesis PhD*. Faculty of Veterinary Medicine, with Summary. Utrecht University, Portuguese.
- Suherman. D.A. 2006. Pengaruh Pemberian Sari Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) Terhadap Mencit (*Mus musculus*) Yang Dikawinkan: Gambaran Histopatologi Uterus Mencit Post Partus. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan. IPB, Bogor.
- Sumarmin, R., T.W. Surjono, dan S. Sudarwati. 1999. Efek Perlakuan Rubratoksin B pada Tahap Praimplantasi Terhadap Perkembangan Embrio Praimplantasi dan Fetus Mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster. *Proceedings Institut Teknologi Bandung* : 1-8

Uranga, J.A. and Arechaga, J. 1997. Analyse Comparative du Defelopment in vitro D'embryos De Souris non Consanguines Cultives dans des milieux a Base de Krebs-ringer ou de Tyrode. *Reprod. Nutr. Dev.* 37: 41-49

Wiryowidagdo, Sumali. 2006. *Fakta Terbaru Buah Merah*. Trubus 445_Desember_2006_Edisi XXXVII.



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUAH MERAH
(*Pandanus conoideus* Lam.) TERHADAP TINGKAT FERTILISASI
DAN PERKEMBANGAN EMBRIO TAHAP PREIMPLANTASI
MENCIT (*Mus musculus*) *IN VIVO***

Naskah Publikasi

Skripsi

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan
guna memperoleh gelar Sarjana Sains**



**Oleh:
Susanti Wahyuningsih
M0403051**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
SURAKARTA
2008**