

## Efek Asam Metoksiasetat (MAA) Terhadap Kemunculan Aberasi Kromosom Embrio Tahap Praimplantasi Mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster\*

Riyanto Dosen Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Unsri.

### Abstrak

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui efek asam metoksiasetat (MAA) terhadap kemunculan aberasi kromosom embrio tahap praimplantasi mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster. Mencit betina dewasa disuperovulasi dengan PMSG (Folligon) 5 I.U./ekor dan hCG (Chorulon) 5 I.U./ekor, kemudian dikawinkan semalam. Bila keesokan paginya terdapat sumbat vagina, maka mencit dinyatakan bunting 0 hari. Selanjutnya mencit pada umur kebuntingan 2 hari diberi MAA dengan dosis 2,5 mmol/kg bb secara *gavage*. Pada umur kebuntingan 3,5 hari mencit dibunuh untuk koleksi embrio. Dua jam sebelum dibunuh mencit diberi kolchisin 2 mg/kg bb secara intraperitoneal. Pengamatan aberasi kromosom diperoleh dari blastokista lanjut hasil disagregasi dengan menggunakan metode Tarkowski (1966). Hasil pengamatan menunjukkan, bahwa pemberian MAA menyebabkan jumlah sel yang mengalami kelainan struktur kromosom pada kelompok perlakuan cenderung meningkat (24%) dibandingkan dengan kelompok kontrol (16%). Selain itu, persentase total kromosom metafase yang abnormal (hiperploid dan hipoploid) cenderung meningkat (47,45%) dibandingkan dengan kelompok kontrol (37,28%). Dapat disimpulkan bahwa, pemberian MAA cenderung meningkatkan kelainan struktur kromosom dan jumlah abnormal kromosom blastomer terutama hiperploid.

### Pendahuluan

Aberasi kromosom disebut juga mutasi kromosom. Aberasi kromosom meliputi kelainan struktur kromosom yang terjadi karena perubahan struktur kromosom misalnya delesi, duplikasi dan inversi dan kelainan jumlah kromosom yang terjadi karena bertambah atau berkurang kromosom disebabkan oleh gagal berpisahnya (nondisjunction) kromosom selama pembelahan mitosis misalnya aneuploid (hiperploid dan hipoploid) dan euploid (Russell, 1996). Menurut Tarkowski (1966), salah satu faktor yang menyebabkan kematian embrio tahap praimplantasi adalah terjadinya aneuploid sehingga embrio tidak dapat berkembang ke tahap selanjutnya. Aberasi kromosom pada manusia dan mencit diketahui telah menyebabkan kelainan perkembangan (Russell, 1996; Goodman dan Gorlin, 1983). Miyabara (1990) melaporkan, bahwa aberasi kromosom dapat menyebabkan kelainan perkembangan pada mencit misalnya trisomi 12 dan 14 dapat menyebabkan kelainan sistem saraf pusat dan eksensefali, sedangkan trisomi 16, 13 dan 14 menyebabkan kelainan jantung. Pada mencit delesi pada lengan kromosom menyebabkan kelainan jantung dan paru-paru. Menurut (Epstein, 1985 dalam Kola dan Wilton, 1991) trisomi 16 pada fetus atau embrio mencit dapat menyebabkan terjadinya kematian atau kelainan perkembangan.

Pemberian suatu teratogen terhadap induk mencit bunting tahap praimplantasi dapat menyebabkan kelambatan perkembangan, memunculkan embrio abnormal, menurunkan indeks mitosis dan menginduksi terjadinya aberasi kromosom. Pemberian siklofosamid (CPA) yang merupakan zat anti kanker pada induk mencit, terbukti dapat menurunkan indeks mitosis dan dapat menginduksi aberasi kromosom embrio (Kola *et al.*, 1986).

DMEP merupakan salah satu dari delapan ester ftalat yang digunakan sebagai bahan pelentur plastik dan potensial menjadi pencemar lingkungan. DMEP yang masuk ke dalam tubuh mammalia akan dihidrolisis menjadi 2-metoksietanol (2-ME) dan selanjutnya dioksidasi menjadi MAA. MAA diketahui merupakan senyawa teratogen terakhir (Miller *et al.*, 1983). Pada molaritas yang sama ketiga senyawa tersebut memiliki potensi teratogenik yang sama, bila diberikan pada tikus Wistar umur kebuntingan 12 hari. Kelainan yang dihasilkan oleh ketiga teratogen tersebut adalah hidronefrosis, kelainan jantung, anggota tubuh pendek, dan kelainan ekor (Ritter *et al.*, 1985).

Pengaruh MAA terhadap perkembangan embrio mencit tahap pascaimplantasi dan praimplantasi telah diketahui dapat bersifat teratogenik dan embriotoksik. MAA yang diberikan pada induk mencit A/J atau Swiss Webster umur kebuntingan 11 hari terbukti menyebabkan kelainan anggota tubuh, hematoma, perdarahan, "club foot" dan langit-langit bercelah. Sifat embriotoksik ditandai oleh kematian embrio intrauterus yang meningkat setelah induk mencit diberi MAA dan sifat embriotoksi ringan ditandai oleh berkurangnya berat badan fetus (Sudarwati *et al.*, 1993; Lisminingsih, 1996). Selain itu, MAA yang diberikan pada embrio mencit tahap praimplantasi secara *in vivo* dan *in vitro* menyebabkan kelambatan perkembangan dan embrio abnormal (Darmanto, 1994a, 1994b; Yusuf *et al.*, 1996; Kaiin, 1998). Mengingat MAA juga merupakan zat yang bersifat teratogenik dan embriotoksik, maka pendedahan MAA pada embrio tahap praimplantasi diharapkan dapat menginduksi kemunculan aberasi kromosom.

### **Metodologi Penelitian**

Hewan uji yang digunakan adalah mencit betina dan jantan galur Swiss Webster yang telah dewasa. Bahan uji yang digunakan adalah MAA berbentuk cair yang diproduksi oleh Wako Pure Chemical Industries Ltd. Mencit betina dewasa disuperovulasi dengan hormon PMSG (Folligon) dan hormon hCG (chorullon), yang diinjeksikan secara intraperitoneal dengan volume 0,1 ml. Setelah itu mencit betina dikawinkan, bila keesokan paginya terdapat sumbat vagina, maka mencit dinyatakan bunting. Mencit umur

kebuntingan 2 hari kelompok perlakuan diberi MAA dengan dosis 2,5 mmol/kg bb secara “gavage” sebanyak 0,1 ml/10 g bb, sedangkan kelompok kontrol diberi akuabidestilata steril. Mencit yang telah bunting 3,5 hari dibunuh dengan cara dislokasi leher, lalu dibedah untuk koleksi embrio. Dua jam sebelum dibunuh mencit diberi kolkhisin 2 mg/kg bb secara intraperitoneal. Embrio yang didapatkan dari hasil pembilasan (Flushing) dengan PBS ditampung dalam kaca arloji. Untuk pengamatan aberasi kromosom digunakan metode pewarnaan Tarkowski (1966) dengan beberapa modifikasi. Untuk mengetahui adanya pengaruh MAA terhadap parameter yang diuji digunakan uji statistik “Wilcoxon’s rank sum test” (Wilcoxon dan Wilcox, 1965).

## Hasil dan Pembahasan

### Efek MAA yang diberikan pada induk mencit Swiss Webster umur kebuntingan 2 hari dalam memunculkan kelainan struktur kromosom blastomer.

Tabel 1. memperlihatkan, bahwa pemberian MAA cenderung meningkatkan jumlah sel yang mengalami kelainan struktur kromosom pada kelompok perlakuan (24%), sedangkan pada kelompok kontrol (16%). Persentase total kelainan struktur kromosom pada kelompok perlakuan (26%) cenderung meningkat dibandingkan dengan kelompok kontrol (18%). Persentase jenis kelainan struktur kromosom berbentuk fragmentasi, fragmen hilang dan asentrik pada kelompok perlakuan (berturut-turut 6%, 18% dan 2%) cenderung meningkat dibanding dengan kelompok kontrol (2%, 16% dan 0%).

Tabel 1. Efek MAA yang diberikan pada induk mencit Swiss Webster umur kebuntingan 2 hari dalam memunculkan kelainan struktur kromosom.

Dosis MAA (mmol/kg bb)	Jumlah yang diamati		Per 50 metafase (%)				
	Blastokista	Metafase	Σ sel yang mengalami kelainan struktur kromosom	Jenis aberasi kromosom			Total
				Jumlah fragmentasi	Jumlah fragmen hilang	Jumlah asentrik	
0 (kontrol)	49	50	8 (16)	1 (2)	8 (16)	0 (0)	9 (18)
2,5	40	50	12 (24)	3 (6)	9 (18)	1 (2)	13 (26)

Keterangan: Uji statistik t-Student terhadap kontrol ( $p < 0,05$ )

“Wilcoxon’s rank sum test” terhadap kontrol ( $p < 0,05$ )

Pengamatan terhadap kelainan struktur kromosom didasarkan pada ada atau tidaknya kelainan struktur kromosomnya. Zat antikanker yang bersifat menghambat mitosis, seperti CPA telah diketahui dapat menyebabkan terjadinya kelainan struktur kromosom (Kola *et al.*, 1986). Oleh karena itu MAA yang telah diketahui juga menghambat mitosis diharapkan dapat menyebabkan terjadinya kelainan struktur kromosom.

Pada penelitian ini dari hasil pengamatan terhadap 50 metafase diperoleh tiga jenis kelainan struktur kromosom, yaitu fragmentasi, fragmen hilang dan asentrik dengan peningkatan yang tidak nyata. Hasil ini mungkin disebabkan karena jumlah sampel metafase yang diamati hanya 50. Sedangkan menurut Kola *et al.*, (1986) untuk melakukan pengamatan kelainan struktur kromosom diperlukan jumlah 100 sampel metafase. Kemungkinan lain, yaitu dosis MAA yang diberikan perlu ditingkatkan atau dilakukan penelitian MAA secara *in vitro*, sehingga MAA dapat berpengaruh langsung terhadap metafase blastomer.

Pemberian MAA pada mencit bunting telah dilaporkan dapat menyebabkan kematian intrauterus secara nyata (Darmanto, 1993; Lisminingsih, 1996; Yusuf *et al.*, 1996). Kejadian ini, diduga disebabkan oleh terjadinya kelainan struktur kromosom. Kola *et al.*, (1986) melaporkan, bahwa agensia genotoksik yang melewati plasenta dapat menyebabkan terjadinya kematian fetus dan menyebabkan kelainan perkembangan. Demikian pula menurut Tarkowski (1966), bahwa salah satu faktor penyebab kematian embrio tahap praimplantasi adalah kelainan kromosom, sehingga embrio tidak dapat berkembang ke tahap selanjutnya.

**Efek MAA yang diberikan pada induk mencit Swiss Webster umur kebuntingan 2 hari terhadap jumlah abnormal kromosom metafase blastomer**

Tabel 2 menunjukkan, bahwa superovulasi dan pemberian MAA cenderung meningkatkan persentase total metafase yang abnormal (hiperploid dan hipoploid) (47,45%) dibanding dengan kelompok kontrol (37,28%). Kejadian hiperploid dan hipoploid pada kelompok perlakuan (berturut-turut 10,17% dan 37,28%) cenderung meningkat dibandingkan dengan kelompok kontrol (5,08% dan 32,20%).

Tabel 2. Efek MAA yang diberikan pada induk mencit Swiss Webster umur kebuntingan 2 hari terhadap jumlah kromosom blastomer.

Dosis MAA (mmol/kg bb)	Jumlah yang diamati			Jumlah kejadian (%)			
	Induk	Blastokista	Metafase	Normal (2n=40)	Abnormal		
					Hiperploid	Hipoploid	Total
0 (Kontrol)	33	49	59	37 (62,71)	3 (5,08)	19 (32,20)	22 (37,28)
2,5	32	40	59	31 (52,54)	6 (10,17)	22 (37,28)	28 (47,45)

Keterangan: "Wilcoxon's rank sum test" terhadap kontrol (p<0,05)

Hiperploid: > 40 (41-79)

Hipoploid : < 40 (20-39)

Dari 59 metafase yang diamati, pemberian MAA cenderung meningkatkan kejadian aneuploid. Hasil ini mungkin disebabkan karena jumlah sampel metafase hanya 59. Menurut Sengoku dan Dukelow (1988) untuk pengamatan kelainan hiperploidi dan hipoploidi diperlukan 99-304 sampel metafase. Oleh karena itu untuk mengetahui efek MAA terhadap jumlah abnormal kromosom metafase jumlah sampel pengamatan yang diamati perlu ditingkatkan, sehingga mungkin terjadinya aneuploid dapat tampak lebih nyata.

Pada penelitian ini mencit yang digunakan, baik untuk kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan disuperovulasi. Sengoku dan Dukelow (1988) menyatakan, bahwa superovulasi pada hamster tidak menyebabkan terjadinya aneuploid dan poliploidi secara nyata. Oleh karena itu hasil yang didapatkan pada penelitian ini (Tabel 2) meningkatnya kejadian hiperploidi dan hipoploidi diduga disebabkan karena pengaruh MAA.

Dari penelitian terdahulu diketahui, bahwa pemberian MAA pada mencit bunting dapat menyebabkan kelainan perkembangan pada fetus dan kematian intrauterus secara nyata (Sudarwati *et al.*, 1993; Darmanto 1993). Kelainan di atas mungkin disebabkan karena terjadinya aneuploidi. Hal ini didukung oleh Tarkowski (1966), bahwa kelainan kromosom yang berupa aneuploid menyebabkan kematian intrauterus dan kelainan perkembangan. Menurut Kola dan Wilton (1991) fetus mencit yang mengalami trisomi 16 atau aneuploidi memiliki ciri pertumbuhan terhambat, kelainan wajah, serta jari dan anggota tubuh kecil. Kasus trisomi 16 pada mencit menyebabkan kematian dan kelainan wajah seperti moncong rata dan mata abnormal. Kelainan kromosom lainnya, yaitu monosomi juga dilaporkan dapat menyebabkan kematian embrio pada tahap praimplantasi (Epstein, 1985 *dalam* Kola dan Wilton, 1991). Pada penelitian ini ditemukan hiperploidi dan hipoploidi, hal ini mungkin yang menyebabkan kematian intrauterus, hambatan perkembangan embrio dan terbentuknya embrio abnormal.

## **Kesimpulan dan saran**

### **Kesimpulan**

MAA yang diberikan secara “gavage” dengan dosis 2,5 mmol/kg bb pada induk mencit Swiss Webster umur kebuntingan 2 hari dan diamati pada umur kebuntingan 3,5 hari dapat meningkatkan aberasi kromosom (kelainan struktur kromosom dan jumlah abnormal kromosom blastomer terutama hiperploidi) embrio mencit tahap praimplantasi.

## Saran

Untuk menambah informasi perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek MAA yang diberikan pada tahap praimplantasi dan diamati minimal sampai 100 metafase kromosom blastomer embrio tahap praimplantasi.

## Daftar Pustaka

- Darmanto, W. 1993. *Pengaruh asam metoksiasetat terhadap perkembangan pralahir mencit (Mus musculus) albino galur A/J*. Tesis Pascasarjana Biologi ITB.
- Darmanto, W., Kabir, N., Inouye, M., Takagishi, Y., and Yamamura, H. 1994. Effects of 2-methoxyethanol and methoxyacetic acid on preimplantation mouse embryos *in vivo*. *Environ. Med.* 38 : 29-32.
- Darmanto, W., Kabir, N., Inouye, M., Takagishi, Y., and Yamamura, H. 1994. Effects of 2-methoxyethanol and methoxyacetic acid on preimplantation mouse embryos *in vitro*. *Environ. Med.* 38 : 33-36.
- Goodman, R. and Gorlin, R.J. 1983. *The malformed infant and child*. Oxford University Press. New York.
- Kaiin, E.M., 1998. *Peran induk dalam memunculkan efek asam metoksiasetat (MAA) yang diberikan sebelum implantasi terhadap perkembangan embrio mencit (Mus musculus) Swiss Webster*. Tesis Pascasarjana Biologi ITB.
- Kola, I., Folb, P.I. and Parker, M.I. 1986. Maternal administration of cyclophosphamide induces chromosomal aberrations and inhibits cell number, histon synthesis, and DNA synthesis in preimplantation mouse embryos. *Teratog. Carcinog. and Mutagen.* 6: 115-127.
- Kola, I. And Wilton, L. 1991. Preimplantation embryo biopsy: detection of trisomy in a single cell biopsied from a four-cell mouse embryo. *Mol. Reprod. and Develop.* P. 29: 16-21.
- Lisminingsih, R.D., 1996. *Pengaruh asam metoksiasetat yang diberikan pada periode awal pembentukan anggota tubuh terhadap perkembangan embrio mencit (Mus musculus) albino Swiss Webster*. Tesis Pascasarjana Biologi ITB.
- Miller, R.R., Hermann, E.A., Langvardt, P.W., MC Kenna, M.J. and Schwetz, B.A., 1983. Comparative metabolism and disposition of ethylene glycol monomethyl ether and propylene glycol monomethyl ether in male rats. *Toxicol. And Appl. Pharmacol.* 67 : 229-237.
- Miyabara, S. 1990. Animal model for congenital anomalies induced by chromosome aberrations. *Cong. Anom.* 30: 49-68.
- Ritter, E.J., Scott, W.J., Randall, J.L. and Ritter, J.M., 1985. Teratogenicity of dimethoxyethyl phthalate and its metabolites methoxyethanol and methoxyacetic acid in the rat. *Teratology* 32 : 25-31.
- Russel, P.J., 1996. *Genetics*. 4<sup>th</sup> ed. Harper Collins College Publishers. New York. P. 213.
- Sengoku, K and Dukelow, W.R. 1988. Gonadotropin effects on chromosomal normality of hamster preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* 38: 150-155.
- Sudarwati, S., Suryono, T.W., dan Yusuf, A.T. 1993. Efek "methoxyacetic acid" (MAA) terhadap perkembangan anggota mencit (*Mus musculus*) galur A/J. *J. Mat. Sains I Supl. D* : 11-19.
- Tarkowski, A.K. 1966. An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 3 : 394 – 400.
- Wilcoxon, F. and Wilcox, R.A., 1965. *Some rapid approximate statistic procedures*. Lederle Laboratories. New York.
- Yusuf, A. T., Syamrizal, dan Sudarwati, S. 1996. Pengaruh asam metoksiasetat (MAA) yang diberikan pada tahap awal perkembangan embrio terhadap perkembangan praimplantasi dan pascaimplantasi mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster. *Laporan Penelitian Nomor : 060 OPF-ITB 1995/1996*.

**Makalah Seminar SEMIRATA Bidang MIPA XVI 2003  
BKS PTN Indonesia Wilayah Barat**