

**Efek Asam Metoksiasetat (MAA) Terhadap Perkembangan Embrio Tahap  
Praimplantasi Mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster**

**The Effects of Methoxyacetid Acid On Developmental Preimplantation Stage  
Embryos of Swiss Webster Mice (*Mus musculus*)**

**Riyanto<sup>\*)</sup>**

**Abstract**

The effects of methoxyacetic acid on preimplantation stage embryos of Swiss Webster mice (*Mus musculus*) have been studied. Female mice were superovulated with 5 I.U. of PMSG (Folligon) and 5 I.U. of hCG (Chorulon) and were mated with male mice overnight. A vaginal plug detected at the following morning was confirmed as day 0 of gestation. On gestation day 2, mice were administered with MAA dose 2.5 mmol/kg bw by gavage. On gestation day 3.5 mice were sacrificed for embryo collection. The result showed that MAA could decrease significantly ( $p < 0,05$ ) the number of embryos that reached late blastocysts, this was caused by significant increase ( $p < 0,05$ ) of the percentage of embryos that could only reach the morula stage. It could be concluded, that the administration of MAA on gestation day 2 inhibit the developmental of preimplantation embryos, proven by the decrease of percentage of embryos that reached late blastocysts stage caused by developmental retardation, especially on the morula stage.

**Abstrak**

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui efek asam metoksiasetat (MAA) terhadap 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. Hasil pengamatan menunjukkan, bahwa pemberian MAA dapat menurunkan embrio yang mencapai tahap blastokista lanjut secara nyata ( $p < 0,05$ ) disebabkan oleh meningkatnya secara nyata ( $p < 0,05$ ) persentase embrio yang hanya mencapai morula. Dapat disimpulkan, bahwa pemberian MAA pada umur kebuntingan 2 hari dapat menghambat perkembangan embrio praimplantasi dibuktikan dengan menurunnya persentase embrio yang mencapai blastokista lanjut disebabkan oleh terjadinya hambatan perkembangan, terutama karena tertahan pada tahap morula.

**Pendahuluan.**

Dimetoksietil ftalat (DMEP) merupakan salah satu dari delapan ester ftalat yang digunakan sebagai bahan pelentur plastik dan potensial menjadi pencemar lingkungan. Ester ftalat telah diketahui menjadi polutan di perairan, ditemukan di mitokondria hati domba, terakumulasi dalam tubuh ikan, dalam bahan makanan, dan jaringan tubuh manusia (Ritter, *et al.*, 1985).

<sup>\*)</sup> Dosen Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Unsri

DMEP yang masuk ke dalam tubuh mammalia akan dihidrolisis menjadi 2-metoksietanol (2-ME) dan selanjutnya dioksidasi menjadi asam metoksiasetat (MAA). MAA diketahui merupakan senyawa teratogen terakhir (Miller *et al.*, 1983; Ritter *et al.*, 1985). 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 telah diketahui dapat bersifat teratogenik dan embriotoksik. Sifat teratogenik ini terbukti oleh munculnya kelainan anggota tubuh, terutama kelainan pada jari kaki depan maupun kaki belakang seperti ektrodaktili, sindaktili, brakhidaktili, polidaktili dan simbrakhidaktili apabila MAA diberikan pada induk mencit A/J atau Swiss Webster umur kebuntingan 11 hari (Sudarwati *et al.*, 1993; Lisminingsih, 1996). Selain itu, MAA juga menimbulkan kelainan seperti hematoma, perdarahan, "club foot" dan langit-langit bercelah (Sudarwati *et al.*, 1993). 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).

Pengaruh MAA terhadap perkembangan embrio mencit tahap pascaimplantasi sudah banyak dilaporkan. Sedangkan pengaruh MAA terhadap perkembangan embrio mencit Swiss Webster tahap praimplantasi belum banyak dilaporkan. Untuk itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek MAA yang diberikan pada induk mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster umur kebuntingan 2 hari terhadap embrio tahap praimplantasi, sehingga dapat menambah informasi yang sudah ada mengenai efek MAA terhadap perkembangan embrio mencit.

## **Metode Penelitian**

### **Bahan Penelitian**

#### **1. Hewan Uji**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit Swiss Webster. Mencit betina yang digunakan berumur 10-12 minggu dengan berat badan 25-30 gram, sedangkan mencit jantan berumur 12-14 minggu. Ruang pemeliharaan mencit diberi penerangan listrik pukul 06.00-18.00 WIB. Kelembaban relatif adalah  $82,90 \pm 1,81$  %, suhu ruangan maksimum adalah  $27,52 \pm 0,53$  °C. Mencit ditempatkan dalam kandang yang berukuran 25 (p) X 20 (l) dan 10 (t) cm. Kandang dilengkapi dengan botol minum dan alasnya yang diberi sekam yang

diganti 2 kali seminggu. Pakan yang diberikan berupa pakan anak babi (CP 511) dalam bentuk butiran yang diproduksi oleh PT Charoen Pokphand Indonesia sebanyak 5 gram/ekor/hari dan diberi minum air ledeng secara *ad libitum*.

## **2. Bahan Uji.**

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam metoksiasetat (MAA) berbentuk cair yang diproduksi oleh Wako Pure Chemical Industries Ltd. Sebagai pelarut, digunakan akuabidestilata steril.

## **Prosedur Kerja**

### **1. Superovulasi dan mengawinkan mencit**

Mencit yang digunakan dalam penelitian terlebih dahulu ditimbang untuk memilih mencit dengan berat badan 25-30 gram. Mencit betina dewasa disuperovulasi dengan hormon PMSG (Folligon) dengan dosis 5 I.U./ekor dan 48 kemudian diberi hormon hCG (chorullon) dengan dosis 5 I.U./ekor. Kedua hormon tersebut diinjeksikan secara intraperitoneal dengan volume 0,1 ml pada pukul 15.00 WIB. Setelah mencit betina disuntik hCG, kemudian dikawinkan pada sore hari. Bila keesokan paginya terdapat sumbat vagina, maka mencit dinyatakan bunting 0 hari.

### **2. Perlakuan MAA**

Mencit dengan umur kebuntingan 2 hari dikeompokkan ke dalam kelompok perlakuan dan kontrol. Kelompok perlakuan diberi MAA dengan dosis 2,5 mmol/kg bb secara "gavage" sebanyak 0,1 ml/10 g bb, sedangkan kelompok kontrol diberi akuabides steril sebagai pelarut MAA. Mencit dipelihara sampai umur kebuntingan 3,5 hari.

### **3. Koleksi embrio**

Mencit yang telah bunting 3,5 hari dibunuh dengan cara dislokasi leher, lalu dibedah untuk koleksi embrio. Selanjutnya uterus diangkat dan diletakkan dalam kaca arloji yang kering. Di bawah mikroskop bedah, dengan menggunakan "syringe" 1 ml dan jarum 26 G yang sudah ditumpulkan, dari salah satu ujung yang terbuka uterus dibilas (flushing) dengan PBS. Embrio yang didapatkan dari hasil pembilasan ditampung dalam kaca arloji. Tahap-tahap perkembangan embrio praimplantasi dicatat sebagai data.

## **Analisis data**

Untuk mengetahui adanya pengaruh MAA terhadap parameter yang diuji digunakan uji statistik "Wilcoxon's rank sum test" (Wilcoxon dan Wilcox, 1965).

## Hasil dan Pembahasan

### Hasil

#### Efek MAA yang diberikan pada induk mencit Swiss Webster umur kebuntingan 2 hari terhadap perkembangan embrio tahap praimplantasi.

Pengaruh MAA terhadap perkembangan embrio praimplantasi mencit Swiss Webster tercantum pada Tabel 1. Pemberian MAA dosis 2,5 mmol/kg bb menyebabkan persentase embrio yang mencapai blastokista lanjut (42,6%) menurun secara nyata ( $p < 0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok kontrol (62,6%). Persentase total morula pada kelompok perlakuan (28,4%) meningkat secara nyata ( $p < 0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok kontrol (14,2%). Hal ini disebabkan oleh persentase morula kompak (18,9) yang meningkat secara nyata dibandingkan dengan kelompok kontrol (7,9%). Embrio yang masih berada pada tahap morula tidak kompak dan blastokista awal yang ditemukan pada kelompok perlakuan cenderung meningkat (9,5 % dan 10,9%) dibandingkan dengan kelompok kontrol (6,3% dan 8,1%).

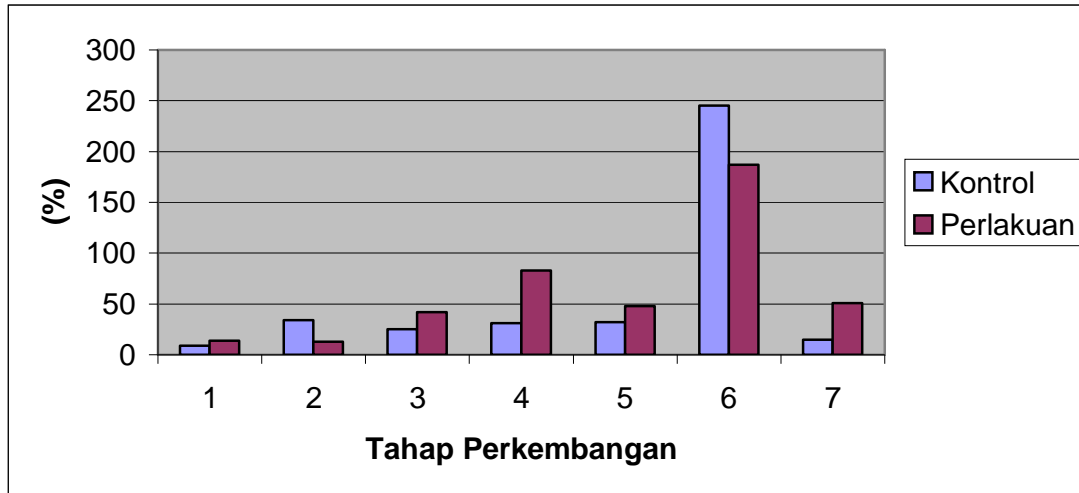
Pada kondisi yang normal masih ditemukan embrio yang berada pada tahap zigot dan tahap 2-8 sel dengan persentase total untuk kelompok perlakuan (6%) dan kelompok kontrol (10%). Pada kelompok perlakuan, embrio pada tahapan perkembangan tersebut merupakan tahapan sebelum MAA diberikan. Oleh karena itu embrio yang ditemukan pada tahap zigot dan tahap 2-8 sel merupakan kelambatan perkembangan pada kondisi yang normal, yang biasanya mencapai sekitar 10% (Kaiin, 1998). Selain itu, ditemukan juga embrio yang abnormal. Persentase embrio yang abnormal pada kelompok perlakuan terlihat cenderung meningkat (11,6%) dibandingkan dengan kelompok kontrol (3%).

Tabel 1. Keadaan perkembangan embrio praimplantasi yang diamati pada umur kebuntingan 3,5 hari dari induk mencit Swiss Webster yang diberi MAA secara "gavage" pada umur kebuntingan 2 hari.

Dosis MAA (mmol/kg bb)	Jumlah induk	Jumlah embrio (X±SD)	Jumlah embrio praimplantasi yang mengalami kelambatan perkembangan (%)					Blastokista lanjut	Σ embrio abnormal (%)	
			Zigot	2-8 sel	Morula					Blastokista awal
					Tidak kompak	Kompak	Total			
0 (Kontrol)	15	391 (26,0±12,17)	9 (2,3)	34 (8,6)	25 (6,3)	31 (7,9)	56 (14,2)	32 (8,1)	245 (62,6)	15 (3,8)
2,5	15	438 (29,2±19,22)	14 (3,1)	13 (2,9)	42 (9,5)	83 (18,9)*	125 (28,4)*	48 (10,9)	187 (42,6)*	51 (11,6)

Keterangan : \* berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol ( $p < 0,05$ ), uji statistik "Wilcoxon's rank sum test".

Pola terhambatnya perkembangan embrio praimplantasi sebagai akibat pengaruh MAA yang diberikan pada induk mencit umur kebuntingan 2 hari tercantum pada Gambar 1 menunjukkan, bahwa hambatan perkembangan yang terjadi sebelum embrio mencapai blastokista lanjut menyebabkan penurunan jumlah embrio yang mencapai blastokista lanjut. Selain itu terlihat pula peningkatan persentase embrio yang abnormal.



Gambar 1. Pola hambatan perkembangan embrio praimplantasi umur kebuntingan 3,5 hari dari induk mencit yang diberi perlakuan MAA dosis 2,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan 2 hari.

Keterangan 1: Zigot, 2: 2-8 sel, 3: Morula tidak kompak, 4: Morula kompak, 5 : Blastokista awal, 6: Blastokista lanjut, 7: Abnormal.

## Pembahasan

### Efek MAA yang diberikan pada induk mencit Swiss Webster umur kebuntingan 2 hari terhadap perkembangan embrio tahap praimplantasi.

Pemberian MAA dosis 2,5 mmol/kg bb secara “gavage” pada induk mencit bunting umur 2 hari secara nyata menurunkan persentase embrio yang dapat mencapai tahap blastokista lanjut. Hal ini disebabkan oleh meningkatnya embrio yang mengalami kelambatan perkembangan terutama tertahan pada tahap morula kompak secara nyata, serta meningkatnya persentase embrio yang abnormal (Tabel 1). Dilaporkan pula oleh Kiin (1998) yang memberikan MAA dosis 2,3 mmol/kg bb secara “gavage” pada induk mencit Swiss Webster bunting umur 2 hari, bahwa persentase embrio yang dapat mencapai blastokista lanjut menurun, karena embrio mengalami hambatan perkembangan terutama tertahan pada tahap blastokista awal. Perbedaan tahap terjadinya perkembangan ini mungkin disebabkan oleh perbedaan dosis MAA yang diberikan. Darmanto *et al.*, (1994) menyatakan, bahwa pemberian

MAA dengan dosis mmol/kg bb pada induk mencit SLc : ICR umur kebuntingan 0 hari secara subkutan dapat menghambat perkembangan embrio tahap praimplantasi, terbukti dengan meningkatnya jumlah embrio yang berdegenerasi dan blastokista abnormal. Yusuf *et al.*, (1996) melaporkan, bahwa pemberian MAA dengan dosis 1,75 atau 2,0 mM/kg bb secara “gavage” pada induk emncit Swiss Webster umur kebuntingan 0 hari dapat menurunkan jumlah embrio yang dapat mencapai blastokista akhir, karena terhambatnya perkembangan pada tahap morula kompak.

Pemberian MAA pada penelitian ini dilakukan pada induk mencit umur kebuntingan 2 hari dan embrio pada umur kebuntingan tersebut mulai memasuki tahap morula. Hasil yang diperoleh sesuai dengan yang diharapkan, karena embrio mengalami hambatan perkembangan, yaitu terutama tertahap pada tahap morula kompak. Kejadian ini diduga, karena MAA berpengaruh langsung menghambat pembelahan blastomer. Menurut Rugh (1968) pada umur kebuntingan 2 hari embrio berada pada tahap perkembangan 8 sampai 16 sel, yaitu morula tidak kompak. Embrio berada pada tahap ini paling lama 10 jam. Dengan demikian, MAA yang memiliki waktu paruh 6 jam (Sleet *et al.*, 1988) dapat berpengaruh langsung terhadap pembelahan blastomer tahap morula.

MAA diduga dapat masuk ke dalam embrio, sehingga secara langsung dapat mempengaruhi pembentukan blastomer. Fabro dan Sieber (1969a *dalam* Tuchmann-Duplessis, 1975) melaporkan, bahwa berbagai senyawa dengan berat molekul kurang dari 17.000 dapat ditemukan di dalam blastokista. Dengan demikian, MAA yang memiliki berat molekul 90,08 dengan mudah dapat masuk ke dalam blastokista, sehingga dapat berpengaruh langsung menghambat pembelahan blastomer.

Selain embrio yang mengalami hambatan perkembangan, ditemukan juga embrio yang abnormal (Tabel 1). Embrio abnormal ini ditemukan, baik pada kelompok perlakuan maupun pada kelompok kontrol. Karena embrio abnormal ini juga ditemukan pada kelompok kontrol dan kejadiannya tidak berbeda nyata, maka diduga embrio abnormal tersebut terjadi secara spontan.

## **Kesimpulan dan saran**

### **Kesimpulan**

Asam metoksiasetat (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 menghambat perkembangan embrio praimplantasi dibuktikan dengan menurunnya embrio yang mencapai blastokista lanjut disebabkan oleh

terjadinya hambatan perkembangan, terutama karena tertahan pada tahap morula dan cenderung meningkatnya persentase embrio abnormal.

### Saran

Untuk menambah informasi perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek MAA yang diberikan pada tahap praimplantasi dan diamati efeknya terhadap organ reproduksi mencit jantan.

### Daftar Pustaka

- 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.
- 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*.
- 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.
- 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.
- Rugh, R., 1996. *The Mouse : Its reproduction and development*. 1<sup>st</sup> ed. Burgess Publishing Co, Minneapolis. P. 60.
- Sleet, R.B., Greene, J.A., and Welsch, F. 1988. The relationship of embryotoxicity to disposition of 2-methoxyethanol in mice. *Toxicol. And Appl. Pharmacol.* 93 : 195-207.
- 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.
- Tuchmann-Duplessis, H., 1975. *Drug effects on the fetus*. Academic Press. London. P. 52.
- 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*.