

GANGGUAN PEMBENTUKAN ATAP BUMBUNG NEURAL EMBRIO MENCIT AKIBAT INDUKSI 2-ME YANG BERTEPATAN DENGAN MASA NEURULASI PRIMER

Eko Prihiyantoro*, Win Darmanto*, Samekto Wibowo**, Mammed Sagi***, Sri Kadarsih Soedjono****

* Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

** Bagian Neurologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

*** Lab Histologi Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada

**** Bagian Faal Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

The objective of this study was to determine time of neural fold fusion at dorsal mid line neural axis after treatment 2-methoxyethanol (2-ME) to pregnant mouse during neurulation period and to observe relation process of point of neural fold fusion. Mice at 08:05 gestational days treatment with 2-ME dose 7.5 mmol/kg bw on the other hand control group injected with aqua bidest. Pregnant mice at 08:12, 09:00, 09:12 was sacrificed by dislocation cervix. Embryo was collected after observe with dissecting microscope for external morphology and fixation in Bouin solution and buffer formalin for histological preparation and immunohistochemistry process. Result showed that there was failure of first point neural fold fusion at junction of perspective fore brain and mid brain. The failure of neural fold fusion was caused by increasing apoptosis neuroepithelium. There were no relation process between first point of neural fold fusion and second point or another point of fusion. Failure of first point fusion not cause failure another point of fusion. Observation at 09:12 gestational days showed that the only first point fusion was still open but formation of another part neural tube have finished.

Key words: NTDs, exencephally, 2-ME

PENGANTAR

Neurulasi hewan vertebrata meliputi dua tahap perkembangan, yaitu neurulasi primer dan neurulasi sekunder. Hasil akhir tahap pertama adalah terbentuknya bumbung neural yang berasal dari jaringan yang semula berbentuk lempengan kemudian mengalami morfogenesis menjadi bentuk tabung. Tahap kedua perkembangan sistem saraf meliputi proses diferensiasi bumbung neural menjadi otak dan medula spinalis. Kedua tahap perkembangan sistem saraf tersebut mudah terganggu sehingga menyebabkan terjadinya kelainan. Gangguan pada proses perkembangan sistem saraf, khususnya neurulasi primer menyebabkan kelainan yang tergolong *neural tube defects* (NTDs). Kelainan ini meliputi semua bentuk cacat janin yang diakibatkan tidak terbentuknya bumbung neural (Kalthoff, 2001; Wolpert, 2002). Salah satu jenis NTDs yang penting karena angka kejadiannya mencapai 300.000 kelahiran dalam setahun di seluruh dunia adalah eksensefali (Juriloff dan Harris, 2000; Melvin *et al.*, 2000).

Gangguan pembentukan bumbung neural yang berakibat NTDs, selain disebabkan faktor genetik juga dapat disebabkan oleh polutan lingkungan yang bersifat teratogenik. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa polutan lingkungan yang dapat menyebabkan terjadinya eksensefali adalah senyawa *2-methoxyethanol* (2-ME)

(Terry *et al.*, 1996; Ambroso *et al.*, 1999; Prihiyantoro *et al.*, 2002). Senyawa 2-ME adalah *plasticizer* yang sering digunakan sebagai bahan pelapis logam, pelarut cat dan juga digunakan sebagai salah satu untuk membuat plastik pembungkus makanan (Johanson, 2000).

Senyawa 2-ME tidak ditemukan secara alamiah di lingkungan karena keberadaannya di alam merupakan hasil aktivitas industri. Selanjutnya senyawa ini masuk ke dalam tubuh melalui kulit. Di dalam tubuh mengalami metabolisme menjadi *methoxyacetic acid* (MAA) dengan bantuan katalisator alkohol dehidrogenase (ADH) dan aldehid dehidrogenase (ALDH). Metabolit 2-ME yang berupa MAA inilah yang bersifat teratogenik bagi suatu proses perkembangan (Brown *et al.*, 1984; Moslen *et al.*, 1995).

Masuknya senyawa 2-ME ke dalam tubuh induk yang bertepatan dengan masa organogenesis dapat menyebabkan peningkatan kematian sel embrional. Induk bunting yang disuntik dengan 2-ME pada masa neurulasi menyebabkan peningkatan kematian sel neuroepithelium di daerah pembentukan bumbung neural. Sel neuroepithelium yang mati akibat induksi senyawa 2-ME tersebut menunjukkan karakteristik yang sama dengan apoptosis. Sel neuroepithelium mengalami fragmentasi DNA sehingga menyebabkan kematian (Ambroso *et al.*, 1999).

Salah satu tahap penting pembentukan bubungan neural adalah fusi lipatan neural di daerah dorsal untuk membentuk atap bubungan neural. Keberhasilan fusi lipatan neural ditentukan oleh *dorso lateral hinge point* (DLHP) yang berperan sebagai engsel untuk mengarahkan konvergensi kedua lipatan neural di daerah dorsal *mid line* aksis neural. DLHP merupakan struktur antara yang terbentuk oleh kumpulan sel neuroepitelium yang berbentuk baji (*wedge-shape*). Sel neuroepitelium berbentuk baji tersebut dihasilkan oleh proses morfogenesis yang disebut konstiksi apikal yang melibatkan protein aktin sebagai sitoskeleton dan menentukan bentuk suatu sel (Schoenwolf & Smith, 1990; Haigo *et al.*, 2003).

Pada masa neurulasi primer sel neuroepitelium mensintesis protein Shroom yang bersifat *actin-binding* protein. Dengan disintesisnya protein Shroom, maka aktin terakumulasi di bagian apikal sel neuroepitelium sehingga mengakibatkan kontraksi bagian tersebut. Kontraksi ini menyebabkan bagian apikal sel lebih sempit dibandingkan bagian basalnya. Susunan sel neuroepitelium bentuk baji ini menyebabkan terbentuknya DLHP untuk mengarahkan lipatan neural ke *mid line* aksis neural. Kerusakan DNA akibat masuknya senyawa 2-ME ke dalam tubuh induk yang bertepatan dengan masa neurulasi diduga menyebabkan gangguan sintesis protein Shroom sehingga terjadi kegagalan konstiksi apikal.

Proses perkembangan memerlukan ketepatan waktu dan komponen penyusunnya. Keterlambatan suatu bagian proses perkembangan yang disebabkan oleh kerusakan sel atau komponen penyusun perkembangan organ menyebabkan terjadinya kelainan. Pembentukan bubungan neural dikatakan sempurna bila telah terjadi fusi lipatan neural di daerah dorsal *mid line* aksis neural membentuk atap. Fusi lipatan neural untuk membentuk atap bubungan neural pada mencit terjadi pada lima titik. Kelima proses fusi lipatan neural terjadi antara umur kebuntingan (uk) 08:00 (delapan hari nol jam) yang bertepatan dengan *Theiler stage* (TS) 12 hingga umur kebuntingan 09:12 (TS 15) kecuali bubungan neural paling posterior yang disebut *neuropore* yang terjadi pada umur kebuntingan 10:00 (TS16) (Kaufman dan Dubard, 1999).

Titik fusi pertama terjadi di daerah pertemuan antara calon otak depan dan calon otak tengah. Titik fusi kedua terjadi di daerah paling inferior atau calon otak yang terletak di ventral. Titik fusi selanjutnya terjadi di bagian anterior calon otak depan yang diikuti oleh titik fusi keempat di daerah calon otak tengah yang mengarah ke posterior yang selanjutnya bertemu dengan titik fusi kelima di daerah calon serviks. Titik fusi kelima ini berjalan ke arah anterior dan posterior sehingga terjadi pembentukan atap

bubungan neural di daerah calon korda spinalis (Kaufman dan Dubard, 1999).

Eksensefali adalah salah satu jenis NTDs yang disebabkan hambatan fusi lipatan neural untuk membentuk atap bubungan neural. Kelainan tersebut ditandai dengan terdedahnya jaringan otak keluar akibat tidak terbentuknya kranium. Gangguan pembentukan kranium tersebut dipicu oleh tidak berfusnya lipatan neural pada titik tertentu (Kaufman dan Dubard, 1999; Wolpert, 2002). Namun penelitian yang mengungkapkan titik fusi ke berapa yang terlambat, sehingga terjadi kelainan eksensefali pada mencit serta bagaimana hubungan antara kelima titik fusi tersebut belum pernah dilakukan. Penelitian ini berusaha mengungkapkan penyebab terjadinya kelainan eksensefali dengan mengamati keterlambatan waktu fusi lipatan neural dan keterkaitan proses kelima titik fusi pada terjadinya kelainan eksensefali akibat pemberian senyawa 2-ME pada masa neurulasi.

Dengan diketahuinya titik fusi tertentu yang mengalami keterlambatan proses pembentukan atap bubungan neural akibat pemberian 2-ME yang dikaitkan dengan umur kebuntingannya, maka diharapkan dapat digunakan sebagai acuan untuk menentukan waktu yang tepat pemberian bahan suplemen yang dapat digunakan mencegah terjadinya kelainan eksensefali akibat masuknya senyawa teratogen pada umumnya dan senyawa 2-ME pada khususnya. Selain itu keterkaitan titik fusi satu dengan yang lainnya merupakan informasi ilmiah yang penting dalam upaya *recovery* pasca terjadinya peracunan proses perkembangan oleh suatu bahan teratogen.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi mencit betina dara yang berumur 2,5 bulan dengan berat badan berkisar antara 20–25 gram. Larutan 2-ME dengan kemurnian 99% (*Wako Pure Co Ltd Japan*), akuabides steril, alkohol, toluol, xylol, larutan pewarna hematoksilin (Erllich), larutan pewarna Eosin, pelet Par L untuk pakan mencit, kit imunohistologi untuk apoptosis (Apoptag[®] S7165), larutan fiksatif Bouin dan buffer formalin, zat kimia uji imunohistokimia untuk protein aktin.

Cara Kerja

Pemeliharaan hewan coba

Mencit betina dan jantan ditempatkan dalam kandang yang terpisah diberi pakan berupa pelet Par L pada pagi hari dan diberikan minum berupa air PDAM yang disediakan secara *ad libitum*. Kandang mencit berupa bak plastik yang

diberi alas sekam dan diganti secara teratur 2 kali dalam satu minggu. Selanjutnya mencit diletakkan dalam rumah hewan Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga dengan penerangan berupa cahaya lampu secara bergantian antara gelap dan terang dalam periode waktu 12 jam.

Perkawinan

Mencit betina estrus yang ditandai oleh vulva berwarna kemerahan dikumpulkan dalam satu kandang dengan mencit jantan pada jam 17.00 WIB, kemudian diamati adanya sumbat vagina pada jam 07.00 keesokan harinya. Adanya sumbat vagina menunjukkan bahwa telah terjadi kopulasi. Mencit betina yang ada sumbat vagina ditentukan sedang bunting 00:05 (nol hari lima jam). Penentuan ini berdasarkan hasil penelitian (Rugh, 1962) yang menyatakan bahwa ovulasi mencit terjadi pada pukul 02.00 dan masa estrus mencit terjadi segera setelah ovulasi. Mencit betina bunting selanjutnya dipisahkan kemudian ditandai dan dikelompokkan secara random pada kelompok perlakuan yang meliputi 2-ME dan kontrol.

Perlakuan

Pada penelitian ini terdapat dua kelompok perlakuan, yaitu 2-ME dan kontrol. Masing-masing kelompok perlakuan meliputi subkelompok umur kebuntingan 08:12, 09:00, 09:12 dan 18:00 dengan jumlah induk mencit 3 ekor untuk setiap sub kelompok umur kebuntingan. Kelompok 2-ME diperlakukan dengan menyuntikkan larutan 2-ME dosis 7,5 mmol/kgbb melalui intraperitoneal, sedangkan kelompok kontrol disuntik pelarut 2-ME berupa akuabides. Penentuan pemberian dosis larutan 2-ME berdasarkan hasil penelitian terdahulu yang telah diketahui dapat memunculkan kelainan eksensefali (Prihiyantoro *et al.*, 2002). Pemberian perlakuan dilakukan pada saat mencit mencapai umur kebuntingan 08:05. Waktu pemberian perlakuan ini bertepatan dengan mulainya masa neurulasi pada mencit (Kaufman, 1992; Kaufman dan Dubard, 1999).

Pembedahan

Pada saat umur kebuntingan mencit mencapai 08:12, 09:00 dan 09:12 dan 18:00. mencit betina dikorbankan dengan cara dislokasi serviks selanjutnya bagian perut dibuka sehingga tampak uterus yang berisi embrio. Uterus berisi embrio tersebut dipotong sedemikian rupa sehingga setiap potongan uterus berisi satu embrio. Untuk mengeluarkan embrio dari uterus, maka potongan uterus tersebut direndam dalam larutan fisiologis kemudian ditekan pada bagian tertentu dengan kekuatan tekanan tertentu pula sedemikian sehingga tekanan yang diberikan tersebut meningkatkan tekanan internal potongan uterus yang berisi embrio. Peningkatan tekanan internal potongan uterus tersebut diharapkan dapat melontarkan embrio keluar. Proses mengeluarkan embrio tersebut dilakukan di dalam larutan garam fisiologis dengan menggunakan bantuan mikroskop bedah. Embrio yang telah berhasil dikeluarkan diamati secara makroskopis menggunakan mikroskop bedah kemudian difoto. Setelah itu 50% embrio tersebut difiksasi dalam larutan Bouin selama 2 jam kemudian disimpan dalam alkohol 70% untuk diproses pembuatan sayatan histologis dengan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin, sedangkan sisanya difiksasi dalam buffer formalin yang selanjutnya digunakan dalam uji imunohistokimia untuk apoptosis dan protein aktin. Penentuan sel neuroepitelium yang mengalami apoptosis dan keberadaan protein aktin berdasarkan perbedaan warna. Sel neuroepitelium yang mengalami apoptosis dan protein aktin akan tercatat berwarna coklat.

HASIL

Kemampuan Reproduksi Induk

Kemampuan reproduksi induk mencit setelah perlakuan 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan 08:05 tercantum dalam Tabel 1.

Tabel 1. Rekapitulasi kemampuan reproduksi induk mencit yang dibedah pada uk 18:00 setelah pemberian 2-ME dosis 7,5 mmol/kgbb pada uk 08:05

No.	Perlakuan	Jumlah Induk	Jumlah Fetus	Rerata Jumlah Implantasi ($x \pm SE$)	Rerata Berat Badan (gram) ($x \pm SE$)	Rerata Persentase Kematian Intrauterus	Rerata Persentase Kelainan Eksternal
1.	Kontrol	3	19	6,33 \pm 0,67	1.0947	0	0
2.	2-ME	4	28	7,00 \pm 1,22	1.0964	0	46,43*

*) berbeda nyata dengan kontrol pada tingkat kepercayaan 95%

Pada penelitian ini berat badan fetus menciit dan jumlah implantasi kelompok perlakuan yang disuntik 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan 08:05 hari tidak berbeda secara nyata dibandingkan dengan kontrolnya, namun terjadi perbedaan secara nyata persentase rata-rata fetus yang mengalami kelainan eksternal.

Perincian jenis dan persentase kejadian kelainan eksternal akibat pemberian 2-ME dosis 7,5 mmol/kgbb pada induk menciit dengan umur kebuntingan 08:05 seperti tercantum dalam Tabel 2.

Jenis kelainan eksternal yang paling banyak terjadi akibat pemberian 2-ME dosis 7,5 mmol/kg bb pada umur kebuntingan 08:05 adalah eksensefali (39,29%), sedangkan persentase kelainan tertinggi berikutnya adalah makroglosus yang mencapai 14,29%.

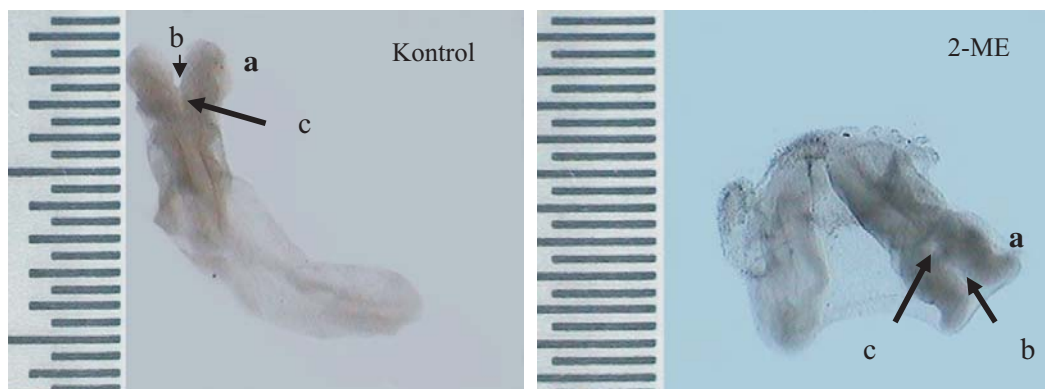
Pembentukan Atap Bambung Neural

Atap bambung neural dibentuk secara bertahap mulai dari umur kebuntingan 8 hari sampai dengan umur kebuntingan 10 hari. Pada penelitian ini diamati proses pembentukan bambung neural pada umur kebuntingan 08:12, 09:00 dan 09:12 untuk mengetahui terjadinya keterlambatan pembentukan atap bambung neural akibat pemberian 2-ME pada umur kebuntingan 08:05.

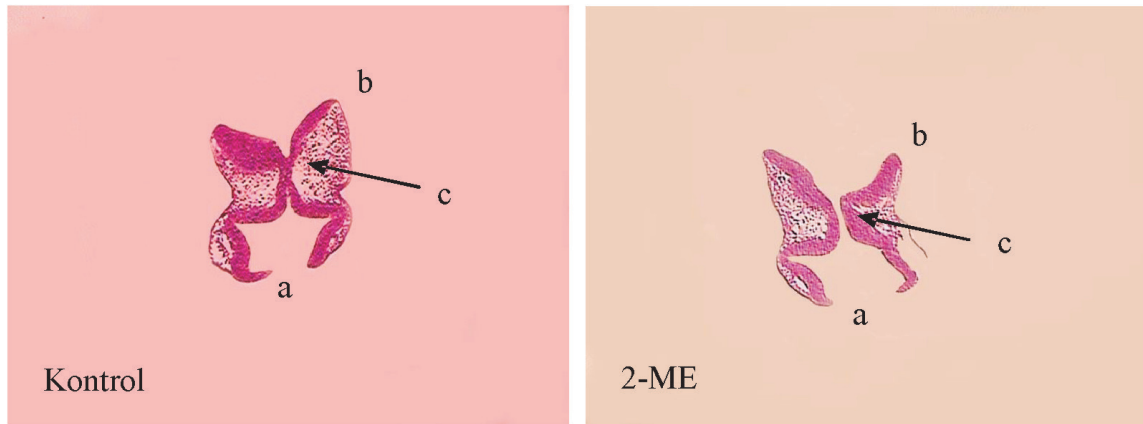
Hasil pengamatan secara makroskopis pada embrio yang diperoleh dari hasil pembedahan menunjukkan bahwa embrio kelompok 2-ME tampak mengalami keterlambatan fusi lipatan neural pada daerah pertemuan antara calon otak depan dan calon otak tengah seperti yang ditunjukkan oleh Gambar 1.

Tabel 2. Jenis kelainan eksternal yang muncul akibat pemberian 2-ME dosis 7,5 mmol/kgbb pada induk menciit uk 08:05 yang dibedah pada umur kebuntingan 18:00

No.	Jenis Kelaianan	Jumlah Induk	Jumlah Fetus	Jumlah Fetus dengan Kelainan	Persentase
1	Eksensefali	3	28	11	39,29
2	Ekor kecil	3	28	1	3,57
3	Anus tidak ada	3	28	1	3,57
4	Makroglosus	3	28	4	14,29
5	Kelainan telinga	3	28	1	3,57
6	open eye lid	3	28	1	3,57
7	Talipes	3	28	1	3,57
8	Makrophtalmia	3	28	1	3,57
9	Anophtalmia	3	28	2	7,14
10	Kinky tail	3	28	1	3,57
11	Palatoschysis	3	28	1	3,57



Gambar 1. Embrio menciit umur kebuntingan 08:12; a. *neural fold*; b. *neural groove*; c. titik fusi pertama pembentukan atap *neural tube*. Garis skala dalam satuan milimeter

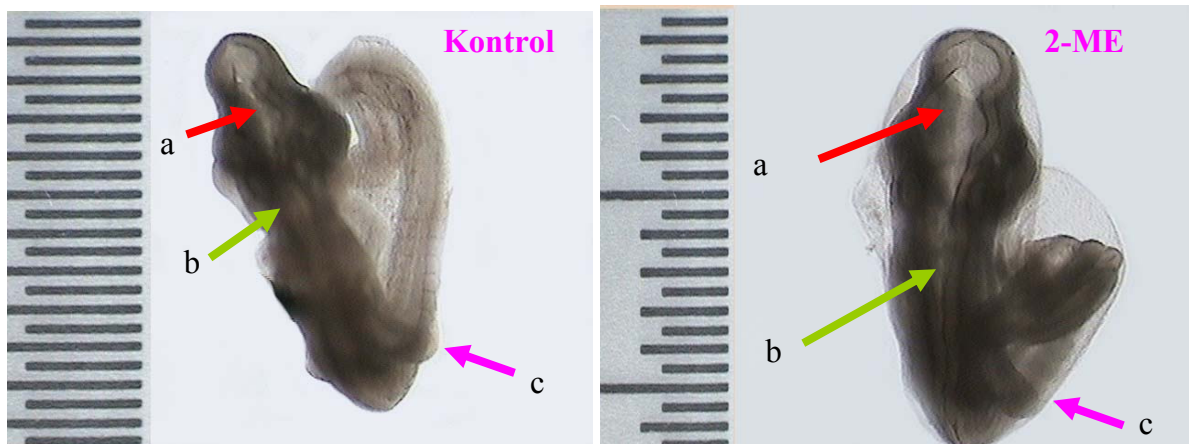


Gambar 2. Sayatan histologi embrio mencit uk 08:12 dengan pewarnaan H&E dan perbesaran 40 \times ; a. *neural fold* daerah calon otak depan b. *neural fold* daerah calon otak belakang; c. fusi *neural fold* yang pertama di daerah pertemuan antara otak tengah dan otak depan.

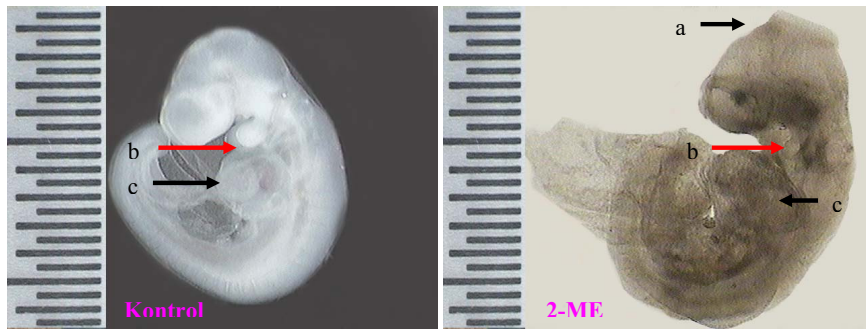
Keterlambatan fusi lipatan neural pada umur kebuntingan 08:12 tersebut juga tampak pada hasil sayatan histologis dengan menggunakan pewarnaan Hematoksilin Eosin seperti tampak pada Gambar 2.

Pengamatan pada embrio umur kebuntingan 09:00 menunjukkan fakta yang sama bahwa pada titik fusi lipatan neural pertama menunjukkan perbedaan jarak lipatan neural yang semakin jelas (Gambar 3).

Titik fusi pertama lipatan neural pada embrio umur kebuntingan 09:00 tetap tidak menutup pada pengamatan embrio uk 09:00 seperti yang ditunjukkan oleh tanda panah berwarna merah. Pada perkembangan normal embrio umur kebuntingan 09:00 mulai terjadi fusi lipatan neural di daerah calon otak tengah yang dilanjutkan fusi lipatan neural di daerah serviks.



Gambar 3. Embrio mencit umur kebuntingan 09:00. a. calon otak depan; b. calon korda spinalis; c. calon ekstrimitas depan



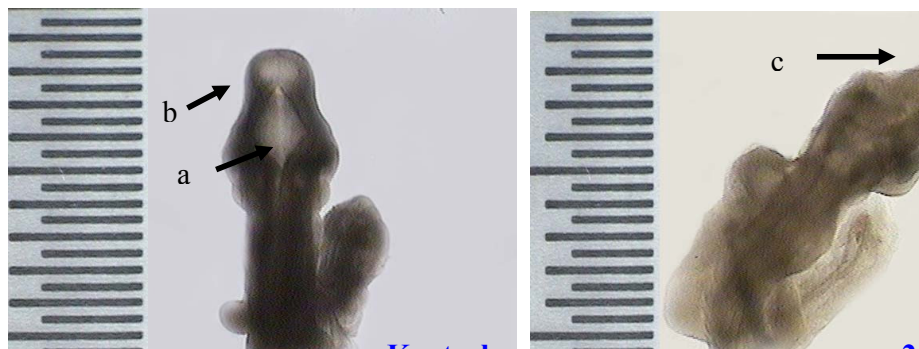
Gambar 4. Embrio mencit umur kebuntingan 09:12 a. *neural fold* yang belum berfusi; b. archus mandibularis; c. organ visceral

Gangguan fusi lipatan neural pada titik pertama ini tetap teramati pada embrio umur 09:12. Hasil pengamatannya seperti pada Gambar 4.

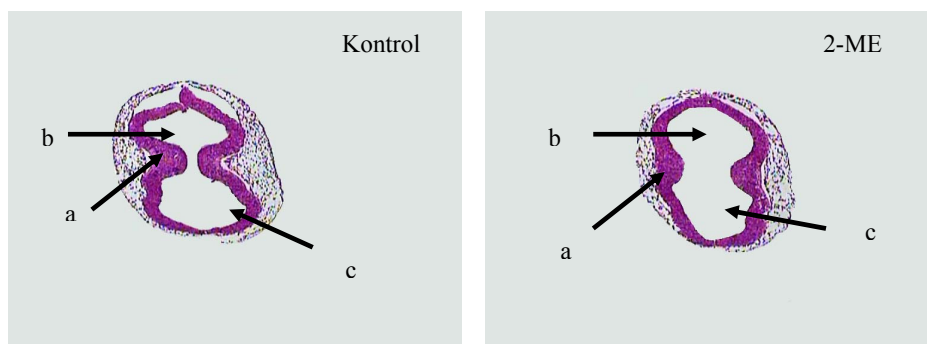
Embrio kelompok kontrol yang diamati dari sisi lateral tampak telah terjadi pembentukan atap bambung neural yang sempurna, sedangkan embrio pada kelompok 2-ME tampak adanya bentukan yang menonjol menyerupai fetus yang mengalami kelainan eksensefali. Bentukan tersebut

sebenarnya adalah lipatan neural yang belum berfusi di daerah sambungan antara otak depan dan otak tengah.

Pengamatan embrio mencit umur kebuntingan 09:12 dari arah ventral (Gambar 5), khususnya embrio kelompok perlakuan, tampak bahwa lipatan neural mengarah ke lateral. Seharusnya fusi *neural fold* terjadi di daerah dorsal *mid line* aksis neural.



Gambar 5. Embrio mencit umur kebuntingan 09:12 a. calon otak tengah; b. kuncup ekstremitas posterior; c. *neural fold* yang belum menutup dan tidak mengalami konvergensi ke daerah *mid line*.



Gambar 6. Sayatan histologis dengan pewarnaan H & E dengan perbesaran 4× embrio umur kebuntingan 09:12. a. *neural fold*, b. calon otak tengah. c. calon otak depan.

Pengamatan secara histologi pada embrio umur kebuntingan 09:12 (Gambar 6) menunjukkan bahwa lipatan neural di daerah fusi pertama pada embrio kelompok 2-ME menunjukkan jarak yang lebih lebar dibandingkan dengan embrio pada kelompok kontrol.

Keterlambatan fusi lipatan neural pada titik pertama diduga akibat peningkatan kematian sel neuroepitelium di daerah tersebut sehingga pembentukan DLHP sebagai struktur antara yang mengarahkan konvergensi lipatan neural ke daerah *midline* mengalami gangguan pembentukan. Berikut ini adalah rekapitulasi hasil penghitungan sel neuroepitelium yang mati setelah pemberian senyawa 2-ME dosis 7,5 mmol/kgbb pada induk mencit umur kebuntingan 08:05 jam (Tabel 3).

Tabel 3. Rerata persentase sel mati pada embrio yang induknya diberi 2-ME pada masa kebuntingannya.

No.	Umur Kebuntingan	Kelompok Perlakuan	Jumlah Embrio	Rerata Persentase Sel mati (%)
1	08:12	Kontrol	3	0,5972 ^a
		2-ME	3	0,8558 ^b
2	09:12	Kontrol	3	0,6031 ^a
		2-ME	3	0,6992 ^b

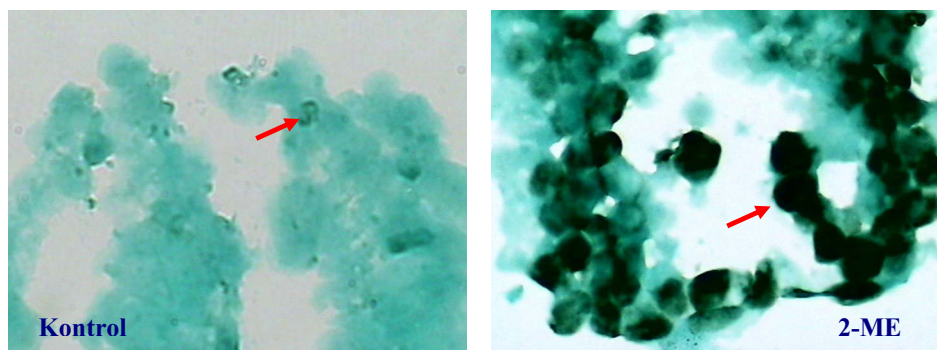
notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan rata-rata yang signifikan pada tingkat kepercayaan 95%

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji t, menunjukkan bahwa rerata persentase sel neuroepitelium yang mati akibat pemberian 2-ME berbeda nyata baik pada

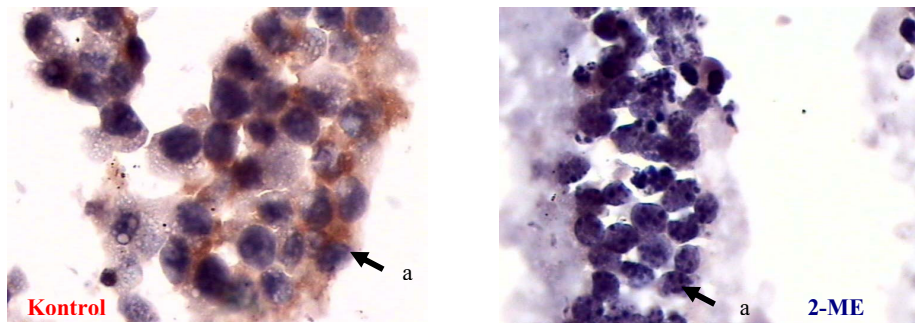
embrio mencit uk 08:12 maupun embrio mencit uk 09:12. Selisih rata-rata persentase kematian sel neuroepitelium pada embrio uk 08:12 antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan adalah 0,2586%, sedangkan pada embrio uk 09:12 selisih rata-rata persentase kematian sel neuroepitelium adalah 0,0961. Tampak bahwa selisih rata-rata persentase kematian selnya cenderung terjadi penurunan. Hal ini berarti terjadi upaya *recovery* kematian sel akibat pemberian 2-ME.

Peningkatan kematian sel neuroepitelium akibat pemberian senyawa 2-ME tersebut menyebabkan gangguan pembentukan DLHP. Gangguan tersebut mungkin disebabkan oleh terjadinya hambatan konstiksi apikal. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengamatan pada keberadaan protein aktin. Hasil pengamatan keberadaan protein aktin seperti terlihat pada Gambar 8.

Pada Gambar 8 tampak pada kelompok kontrol protein aktin yang terakumulasi di sitoplasma berwarna kecoklatan, sedangkan embrio kelompok perlakuan tidak dijumpai adanya akumulasi protein aktin karena tidak ada warna kecoklatan di sekitar inti. Mungkin aktin tersebar merata di seluruh sitoplasma atau mungkin sel neuroepitelium di daerah pembentukan banyak yang mati sehingga tidak dijumpai adanya akumulasi aktin. Akumulasi aktin pada daerah apikal sel berperan dalam perubahan bentuk sel neuroepitelium dari kolumnar menjadi baji. Perubahan bentuk sel ini penting untuk pembentukan DLHP yang mengarahkan konvergensi lipatan neural ke *mid line* aksis neural.



Gambar 7. Uji imunohistokimia embrio mencit umur kebuntingan 08:12 untuk mengamati peningkatan apoptosis sel neuroepitelium. Tanda panah menunjukkan sel neuroepitelium yang mengalami apoptosis. Perbesaran 100×



Gambar 8. Uji imunohistokimia protein aktin pada embrio mencit umur kebuntingan 08:12 hari dengan perbesaran 100× a. inti sel b. aktin yang terakumulasi

PEMBAHASAN

Kemampuan reproduksi induk mencit akibat pemberian 2-ME pada umur kebuntingan 08:05 yang bertepatan dengan masa neurulasi, mengalami penurunan karena terjadi peningkatan yang signifikan pada fetus yang mengalami kelainan eksternal terutama kelainan eksensefali, walaupun jumlah implantasi, kematian intrauterin dan berat badan fetus mencit tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa 2-ME dosis 7,5 mmol/kgbb yang diberikan pada umur kebuntingan tersebut lebih bersifat teratogenik dibandingkan sifat toksiknya. Selain itu menunjukkan juga bahwa 7,5 mmol/kgbb adalah dosis yang tepat untuk memunculkan kelainan eksensefali pada mencit. Tingginya persentase kelainan eksensefali akibat pemberian 2-ME menunjukkan bahwa mencit adalah hewan coba yang paling tepat untuk mempelajari kelainan eksensefali (Jurilof dan Haris, 2000). Kelainan eksensefali bersifat lethal dan biasanya disertai jenis kelainan yang lain. Pada penelitian ini kelainan lain yang menyertai dengan persentase tertinggi adalah makroglosus. Hal ini mungkin berkaitan dengan masa organogenesis lidah yang bertepatan dengan pembentukan atap bubungan neural.

Terjadinya kelainan eksensefali diakibatkan keterlambatan fusi lipatan neural pada masa neurulasi. Fusi lipatan neural menyebabkan terbentuknya atap bubungan neural. Apabila atap bubungan neural tidak terbentuk menyebabkan pembentukan otak juga tidak sempurna. Otak yang tidak terbentuk dengan sempurna akan menginduksi juga keterlambatan osifikasi tulang kranium. Pada penelitian ini kelainan eksensefali akibat pemberian larutan 2-ME dosis 7,5 mmol/kgbb melalui intraperitoneal disebabkan keterlambatan fusi lipatan neural di daerah pertemuan calon otak depan dan otak tengah. Keterlambatan fusi ini diakibatkan oleh peningkatan kematian sel neuroepitelium akibat pemberian senyawa 2-ME tujuh jam sebelumnya.

Kematian sel yang terjadi memiliki ciri yang sama dengan apoptosis, yaitu terjadinya fragmentasi DNA. Meningkatnya fragmentasi DNA menyebabkan terjadinya kematian sel neuroepitelium bila kerusakannya parah. Mungkin sel neuroepitelium yang lain tidak mengalami fragmentasi DNA yang menyebabkan kematian, namun hanya mengakibatkan perubahan gen sehingga mengakibatkan terganggunya ekspresi protein tertentu yang berperan pada pembentukan atap bubungan neural melalui fusi lipatan neural.

Salah satu jenis protein yang berperan pada pembentukan atap bubungan neural adalah Shroom. Protein ini berperan dalam proses konstiksi apikal untuk proses perubahan bentuk sel neuroepitelium menjadi bentuk baji. Sel berbentuk baji diperlukan untuk terjadinya struktur antara DLHP yang berfungsi mengarahkan konvergensi lipatan neural (Haigo *et al.*, 2003). Pada penelitian ini rata-rata persentase sel neuroepitelium yang mengalami kematian pada kelompok 2-ME yang dihitung pada embrio umur kebuntingan 08:12 meningkat secara nyata dibandingkan kontrolnya. Peningkatan rata-rata persentase kematian sel ini menyebabkan keterlambatan fusi lipatan neural titik pertama yang teramati pada embrio umur kebuntingan 08:12. Hal ini sejalan dengan hasil pengamatan pada protein aktin yang menunjukkan perbedaan penampakan dengan kontrolnya (Gambar 8). Pada kelompok kontrol tampak protein aktin berwarna kecoklatan terdistribusi di satu tempat tertentu, sedangkan pada kelompok 2-ME tidak dijumpai akumulasi protein aktin.

Aktin adalah salah satu komponen sitoskeleton yang terdapat di dalam sitoplasma dan berfungsi untuk menentukan bentuk sel. Akumulasi aktin pada tempat tertentu memungkinkan terjadinya kontraksi yang mengubah bentuk sel tersebut. Protein Shroom bersifat mengikat protein aktin sehingga keberadaan protein ini mengakumulasi aktin di sekitarnya. Hasil penelitian Haigo *et al.* (2003) menyatakan bahwa pada masa neurulasi sel neuroepitelium

di daerah pembentukan atap bumbung neural mensintesis protein Shroom dan terakumulasi di daerah apikal sel. Akumulasi protein Shroom inilah yang memungkinkan terjadinya proses konstiksi apikal yang mengubah bentuk sel neuroepitelium menjadi bentuk baji.

Pada kelompok 2-ME tidak tampak akumulasi protein aktin pada daerah tertentu. Mungkin aktin terdistribusi merata pada sitoplasma sehingga tidak menunjukkan reaksi positif dengan menampilkan kesan warna coklat. Tidak terakumulasinya protein aktin mungkin disebabkan oleh gangguan sintesis protein Shroom akibat meningkatnya persentase kematian sel neuroepitelium atau mungkin disebabkan perubahan gen.

Pengamatan pada embrio mencit dengan umur kebuntingan 09:00 dan 09:12 menunjukkan gambaran bahwa pembentukan atap bumbung neural pada titik fusi lipatan neural pertama tetap tidak menutup, sedangkan titik fusi yang lain menutup sesuai dengan waktunya. Hal ini berarti bahwa tidak terdapat keterkaitan proses antara titik fusi satu dengan yang lain. Keterlambatan fusi lipatan neural pada titik pertama tidak menyebabkan titik fusi lipatan neural berikutnya juga terlambat atau gagal menutup. Hal ini ditunjang dari hasil pengamatan pada umur kebuntingan 09:12 yang menunjukkan terjadinya pembentukan atap bumbung neural yang sempurna pada titik fusi yang lain kecuali pada titik fusi pertama (Gambar 4). Pada gambar tersebut tampak perbedaan bentuk antara embrio kelompok 2-ME dan embrio kelompok kontrol. Embrio kelompok 2-ME menunjukkan penampakan seperti fetus yang mengalami kelainan eksensefali. Bentuk kelainan tersebut akan tetap berlanjut sampai lahir di mana jaringan otak yang tidak sempurna terdedah keluar dari kranium akibat keterlambatan osifikasi tulang kranium.

Hasil penghitungan sel neuroepitelium yang mati akibat pemberian senyawa 2-ME pada umur kebuntingan 09:12 masih menunjukkan perbedaan rata-rata persentase kematian sel yang nyata dibandingkan kontrolnya, meskipun terdapat penurunan selisih rata-rata persentase antara kelompok kontrol dan perlakuannya. Hal ini menunjukkan adanya upaya *recovery* pascaperacunan oleh senyawa 2-ME melalui peningkatan proliferasi sel. Namun upaya *recovery* tersebut tidak menyebabkan terkoreksinya keterlambatan fusi lipatan neural pada titik pertama. Kemungkinan peningkatan proliferasi sel ini memperbaiki keadaan untuk proses fusi lipatan neural pada titik berikutnya.

Pengamatan dari arah ventral (Gambar 5) menunjukkan bahwa calon atap bumbung neural yang seharusnya berfusi di bagian dorsal *mid line* aksis neural, ternyata melebar ke arah lateral. Hal ini terjadi kemungkinan disebabkan tidak

kokohnya kedudukan DLHP. Pada saat terjadinya fusi lipatan neural membentuk atap bumbung neural terjadi gaya tarik longitudinal yang kuat akibat peningkatan laju proliferasi dan interkalasi sel neuroepitelium sehingga untuk terjadinya fusi lipatan neural yang sempurna kedudukan DLHP harus kokoh melekat pada jaringan di sekitarnya. Kekokohan kedudukan DLHP ditentukan oleh fibronektin yang mengisi matriks ekstraseluler. Fibronektin di daerah pembentukan atap bumbung neural tersebut disintesis oleh sel neuroepitelium (Schoenwolf dan Smith, 1990; George *et al.*, 1993). Pengamatan embrio dari arah ventral yang menunjukkan melebarnya calon atap bumbung neural ke arah lateral mungkin juga disebabkan terganggunya sintesis fibronektin akibat meningkatnya persentase kematian sel neuroepitelium setelah pemberian 2-ME. Perlu dilakukan kajian secara khusus kadar fibronektin akibat pemberian senyawa 2-ME pada masa neurulasi sehingga dapat diketahui secara lengkap faktor penyebab terjadinya kelainan eksensefali akibat pemberian 2-ME pada masa neurulasi.

KEPUSTAKAAN

- Ambroso JF, Stedman DB, Elswick BA, dan Welsch F. 1999. Characterization of cell death induced by 2-methoxyethanol in CD-1 mouse embryos on gestation day 8. *Teratology*, 58, 231–240.
- Brown NA, Holt D, dan Webb M, 1984. The teratogenicity of methoxyacetic acid in the rat. *Toxic Lett.*, 22: 93–100.
- George Elizabeth L, Georges-Labouesse Elisabeth N, Patel-King Ramila S, Rayburn Helen and Hynes Richard O, 1993. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119, 1079–1091.
- Haigo SL, Hildebrand JD, Harland RM, dan Wallingford JB, 2003. Shroom induces apical constriction and is required for hingepoint formation during neural tube closure. *Current Biology.*, Vol 13: 2125–2137, December 16. Elsevier Science Ltd.
- Johanson G, 2000 Toxicity Review of Ethylene Glycol Monomethyl Ether and its Acetate Ester. *Critical Reviews in Toxicology*; 30(3): 307–345.
- Juriloff DM dan Harris MJ, 2000. Mouse models for neural tube closure defects. *Human Molecular Genetics*, 9(6).
- Kalthoff K, 2001. *Analysis of Biological Development* 2nd. The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Kaufman MH, 1992. *The Atlas of Mouse Development*. Academic Press. Harcourt Brace & Company Publisher London.
- Kaufman MH dan Bard JBL, 1999. *The Anatomical Basis of Mouse Development*. Academic Press. London.
- Melvin EC, George TM, Worley G, dan Franklyn A, 2000. Genetic studies in neural tube defects. *Pediatr. Neurosurg* 32:1–9.

- Moslen MT, Kaphalia L, Balasubramanian H, Yin YM, dan Au WW, 1995. Species differences in testicular and hepatic biotransformation of 2-methoxyethanol. *Toxicology*, 96: 217–224.
- Prihiyantoro E, Darmanto W, Pidada IB, Soepriandono H, 2002 Gangguan Migrasi dan Perkembangan Sel Saraf Pada Cerebrum dan Cerebelum Mencit Akibat Induksi 2-Methoxyethanol; Sebagai Model Mekanisme Kelainan Otak. Laporan Penelitian Hibah Bersaing X/1.
- Rugh R, 1968. *The Mouse. Its reproduction and development*. Burgess Publishing Company, Mineapolis.
- Schoenwolf GC dan Smith JL, 1990. Mechanisms of Neurulation. Traditional Viewpoint and Recent Advances. *Development*. 109: 243–270.
- Terry KK, Stedman DB, Bolon B, dan Welsch F, 1996. Effects of 2-Methoxyethanol on Mouse Neurulation. *Teratology* 54: 219–229.
- Wolpert L, 2002. *Principles of Development* 2nd ed. Oxford University Press.

Reviewer: **Prof. Sutiman Bambang Sumitro, M.Sc., D.Sc.**