PEMBERIAN EKSTRAK RUMPUT LAUT (*Eucheuma cottonii*) TERHADAP EKSPRESI CASPASE-8 DAN JUMLAH SEL TROPOBLAS PADA MENCIT (*Mus musculus*) BUNTING SEBELUM DIPAPAR PLUMBUM (Pb)

Oleh:

Ika Wahyuni, Lalu Faesal Fajri
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Tenggara Barat

Abstrak: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pemberian ekstrak *E. cottonii* pada plasenta mencit bunting sebelum dipapar plumbum berdasarkan ekspresi Caspase-8 dan jumlah sel tropoblas. Penelitian ini menggunakan 4 mencit bunting setiap perlakuan. Kelompok kontrol negatif diberi aquades. Kelompok kontrol positif diberi plumbum dengan dosis 0,011 mg/20 g BB dalam 1 ml aquades. Kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3) diberi ekstrak *E. cottonii* dengan dosis yang berbeda yaitu 3 mg/20 g BB, 6 mg/20 g BB, dan 9 mg/20 g BB. Satu jam kemudian diberi plumbum 0,011 mg/20 g BB. K-, K+, P1, P2, dan P3 diberikan secara peroral pada kebuntingan ke 6-15 hari. Data dianalisis dengan Kruskall-Wallis dan Mann Whitney untuk ekspresi Caspase-8, ANOVA dan Duncan untuk jumlah sel tropoblas. Pewarnaan HE untuk mengetahui jumlah sel tropoblas dan IHK untuk ekspresi Caspase-8. Kedua analisis adalah signifikan. Kesimpulan penelitian ini yaitu kelompok P3 yang diberi *E. cottonii* 9 mg/20 g BB dapat menurunkan ekspresi Caspase-8 dan maningkatkan jumlah sel tropoblas.

Kata kunci : Plumbum, Ekstrak *E. cottonii*, Caspase-8, Sel tropoblas

PENDAHULUAN

Plumbum (Pb) / timbal merupakan logam berat yang dapat menimbulkan berbagai permasalahan polusi di lingkungan. Polusi plumbum menjadi salah satu masalah yang sampai saat ini belum dapat teratasi dengan baik, contoh yang sering dijumpai setiap hari adalah dari kendaraan bermotor. Manusia secara tidak sadar menghirup polusi plumbum, karena hampir setiap hari terpapar oleh kendaraan bermotor. Paparan plumbum dapat menyebabkan gangguan kesehatan, karena plumbum memiliki target-target organ dalam tubuh. Selain manusia peluang terpaparnya hewan juga sangat besar, karena plumbum terdapat di air dan udara. Dosis yang kecil dari plumbum yaitu kurang dari 10 µg/dl, dapat mempengaruhi sistem imun, sistem reproduksi, dan kardiovaskular (WHO, 2010). Fetus dapat terpapar melalui barier plasenta, sehingga fetus akan mengalami cacat lahir ataupun terjadi absorbsi fetus. Secara seluler, plumbum dapat mengakibatkan produksi berlebihan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang selanjutnya terjadi peningkatan peroksidasi lipid. Kadar ROS yang tinggi berdampak buruk pada asam nukleat, protein, dan asam amino. Plumbum sebagai radikal bebas mampu menimbulkan stess oksidatif karena terbentuknya ROS. Hal itu yang berimplikasi pada kerusakan sel (Ibraim *et al*., 2012). Perubahan sel atau kerusakan sel dapat diamati dengan terbentuknya apoptosis. Salah satu indikator apoptosis adalah caspase, sehingga perubahan plasenta secara mikroskopik dapat dilihat dari ekspresi caspase. Ciri-ciri sel yang mengalami apoptosis antara lain sel mengecil, membran menonjol, kromatin mengalami kondensasi, fragmentasi kromosom DNA dan fragmentasi inti (Su *et al*., 2015). Selain ekspresi caspase, sel lain yang dapat diamati yaitu jumlah sel tropoblas. Sel tropoblas merupakan sel-sel penyusun plasenta. Plumbum dapat melewati barier plasenta pada awal kebuntingan pada minggu ke 12 sampai 14, sehingga terakumulasi dalam fetus dan plumbum disimpan dalam lebih dari 90%, selebihnya dilepaskan ke pembuluh darah (Barness, 2010).

Euchema cottonii termasuk alga merah memiliki aktivitas antioksidan karena mengandung berbagai jenis bioaktif yang dapat menetralkan radikal bebas. Bioaktif tersebut antara lain klorofil α, klorofil d, likopen kriptoxantin, zeaxantin, α-karoten, β-karoten, pikobilin, dan lutein. *Euchema cottonii* menghasilkan senyawa antioksidan seperti pigmen β-karoten (Amelia dan Tanod, 2014).

Pemanfaatan antioksidan terhadap apoptosis sudah pernah dilakukan penelitian, terkait α-karoten, β-karoten, dan tokoferol. Penelitian yang telah dilakukan oleh Wahyuni (2016) menunjukkan bahwa buah merah yang mengandung karotenoid dan tokoferol 23,98 mg/20 g BB dan 25,68 mg/20 g BB dapat menurunkan ekspresi caspase-8 yang berarti menekan terjadinya apoptsis. Penelitian lain yang serupa yaitu pemberian buah merah yang mengandung karotenoid dan tokoferol sebagai antioksidan dapat meningkatkan jumlah sel tropoblas (Sumarsono, 2016). Permasalahan akan

terjadi apabila pemanfaatan antiokasidan hanya tanaman tertentu saja sehingga perlu dikaji tanaman lain dengan kandungan yang sama.

METODE

Penelitian ini menggunakan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dan bersifat eksperimental laboratorik dengan asumsi semua populasi sama dan homogen.

Menggunakan hewan coba mencit betina (*Mus musculus*) berjumlah 20 ekor dengan kriteria umur 3 bulan, berat badan 20-25 gram, tidak terdapat luka, bulu halus, dan sehat. Mencit jantan yang digunakan berjumlah 20 ekor untuk membuntingkan mencit betina. Perkawinan mencit jantan dan betina dilakukan secara *monomatting*.

Penelitian ini menggunakan sampel sebanyak empat ekor mencit betina bunting setiap kelompok perlakuan. Pemberian ekstrak *E. cottonii* dan plumbum dilakukan secara per oral pada kebuntingan ke-6 sampai 15 hari. Dosis plumbum yaitu 0,011 mg/20 g BB mencit dalam aquades 0,1 mL. Rentang waktu pemberian ekstrak *E. cottonii* dan timah hitam adalah satu jam. Setiap perlakuan menggunakan 4 ekor mencit betina dengan rincian perlakuan sebagai berikut :

a. K- : Mencit bunting disonde dengan aquades 0,1 mL
b. K+ : Mencit bunting diberi plumbum 0,011 mg/ 20 g BB
c. P1 : Mencit bunting diberi ekstrak *E. cottonii* sebanyak 3 mg/20 g BB dan dipapar plumbum 0,011 mg/20 g BB
d. P2 : Mencit bunting diberi ekstrak *E. cottonii* sebanyak 6 mg/20 g BB dan dipapar plumbum 0,011 mg/20 g BB
e. P3 : Mencit bunting diberi ekstrak *E. cottonii* sebanyak 9 mg/20 g BB dan dipapar plumbum 0,011 mg/20 g BB

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit bunting sebanyak 30 ekor. Berat mencit antara 20-25 gram yang dibagi menjadi lima kelompok perlakuan. Bahan untuk sinkroniasasi birahi menggunakan hormon PMSG sebanyak 5 IU (Folligon, Intervet) yang diberikan kepada mencit betina secara intraperitoneal dan hCG (Chorulon, Intervet), untuk superovulasi diberikan 48 jam setelahnya sebanyak 5 IU. Bahan sebagai perlakuan adalah plumbum asetat dan ekstrak *E. cottonii*.

Bahan untuk pembedahan mencit adalah alkohol 70% dan fiksasi jaringan menggunakan alkohol konsentrasi bertingkat (70%, 80% dan 96%), xylene dan parafin cair. Bahan kimia untuk ekspresi caspase-8 menggunakan teknik imunohistokimia (IHK) antara lain : antibodi caspase-8m PBS 10%, H2O2 3%, antibodi sekunder berlabel biotin, streptavidin®, Diaminobenzidine (DAB), eter, NaCL fisiologis, aquades, methyl blue dan green, serta *blocking buffer* ultra violet block. Bahan pewarnaan histologis menggunakan *Hematoxilin Eosin* (HE).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : kandang hewan coba, tempat pakan dan minum mencit, sonde mencit, mikroskop cahaya Nikon Eclipse Ci®, timbangan digital analitik Denver, timbangan analog Instrument®, spuit 1cc, needle 22 G, gloves, masker, kapas steril, dan dissecting set papan seksi.

a. Sinkronisasi Birahi Mencit

Mencit betina disuntik secara intraperitoneal dengan hormon Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) 5 IU dan human chrorionic gonadotropin (HCG) 5 IU. Pemberian HCG 48 jam setelah pemberian PMSG (Widjiati, 1997 ; Madyawati dan Rimayanti, 2013).

b. Pengawinan Mencit

Mencit jantan dan betina dikawinkan secara *monomatting*. Vaginal plug diperiksa setelah 17 jam pasca dikawinkan. Kopulasi dinyatakan berhasil apabila terdapat sumbat vaginal.

c. Pembuatan ekstrak *E. cottonii*

Cara pembuatan ekstrak *E. cottonii* berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Fard *et al*. (2011). *Euchema cottonii* dikoleksi dari daerah di Lombok. *Euchema cottonii* dicuci bersih dan dipisahkan dari bagian yang tidak diperlukan, selanjutnya dikeringkan pada suhu 40 ºC dalam ruangan gelap selama 3 hari. Setelah itu dihaluskan menjadi bubuk sehingga dapat melewati lapisan setebal 0,5 mm. Bubuk *E. cottonii* disimpan dalam kontainer yang dilapisi aluminium foil pada suhu -20 ºC. Ekstraksi ethanol dan air berdasarkan cara yang dilakukan oleh Ponce *et al*. (2003) dengan bubuk *E. cottonii* sebanyak 200 g menggunakan 1000 mL dari 80 % (v/v) ethanol dengan *mechanical strring* pada suhu ruang. Residu kemudian dilarutkan dalam 3000 mL *distilad water* dan diaduk selama 8 jam kemudian disaring. Setelah itu ekstrak ethanol dan aqueous dipekatkan dengan ditekan pada suhu 40 dan 70 ºC selama satu jam.

d. Prosedur Pemberian Plumbum

Plumbum diberikan secara peroral dengan dosis 4 mg/kg BB, dosis selanjutnya dikonversikan menjadi dosis mencit yaitu 0,011 mg/20 g BB. Perlakuan diberikan pada kebuntingan hari ke 6-15, sebelum pemberian plumbum setiap kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 diberi ekstrak *E. cottonii*. Dosis paparan plumbum 4mg/kg BB mampu

menurunkan jumlah kelahiran dan menimbulkan kecacatan atau efek teratogenik (Aprioku dan Siminialayi, 2013).

e. Prosedur Pemberian Ekstrak *E. cottonii*

Ekstrak *E. cottonii* diberikan satu jam sebelum pemberian plumbum. Ekstrak *E. cottonii* yang diberikan untuk masing-masing perlakuan P1, P2 dan P3 adalah 3 mg/20 mg BB, 6 mg/20 g BB, dan 9 mg/20 g BB. Ketiga dosis tersebut diperoleh berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan oleh Kania dkk. (2013). Jarak pemberian ekstrak *E. cottonii* dan intoksikasi plumbum adalah satu jam yang berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Anwar *et al*. (2007).

f. Prosedur Pembedahan Mencit dan Pengambilan Sampel

Hewan coba didislokasi os cervicalis, kemudian didesinfeksi menggunakan alkohol 70%. Mencit dibedah menggunakan gunting bedah kecil dari vagina menuju arah perut untuk mendapatkan uterus. Selanjutnya fetus dikeluarkan dan plasenta dipisahkan dari fetus. Plasenta yang sudah didapatkan disimpan dalam formalin 10% untuk pembuatan preparat imunohistokimia.

g. Pengamatan Ekspresi Caspase-8 dengan Metode Imunohistokimia

Preparat plasenta dibuat pada objek glass, selanjutnya dimasukkan dalam xylol dua kali, alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%, 30%) dan aquadest. Preparat dicuci dengan *phospat buffer saline* / PBS (pH 7,4) sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat direndam dalam hidrogen peroksidase (H2O2) 3% selama 5-10 menit. Preparat kemudian direndam dengan BSA 1% dalam PBS selama 10-30 menit pada suhu ruang, ditambahkan antibodi primer anti caspase-8 IgG Biotin labelled selama 1 jam pada suhu ruang. Preparat dicuci dengan PBS (pH 7,4) selama 3x5 menit, ditambahkan Streptavidin-Horse Radish Peroksidase (SA-HRP) selama 30-60 menit pada suhu ruang. Preparat dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit kemudian ditambahkan Cromogen 3,3-diaminbenzidine tetrahydrochloride (DAB) selama 10-20 menit. Preparat dicuci dengan aquadest selama 3x5 menit pada suhu ruang, ditambahkan counterstain (Methylen Blue/Methylen Green) selama 3 menit. Preparat dimounting menggunakan entellan, dilakukan pengamatan dengan mikroskop pembesaran 40, 100, 400, 1000 kali. Penentuan ekspresi caspase-8 diketahui dari jumlah perubahan warna kecoklatan pada sel plasenta dibandingkan dengan kontrol (Bressenot, 2009).

h. Pengamatan Gambaran Histopatologis Sel Tropoblas dengan Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE)

Jaringan plasenta mencit difiksasi dengan *buffer* formalin 10%. Proses pewarnaan menggunakan hematoksilin eosin. Gelas objek direndam ke dalam xilol I dan xilol II, masing-masing selama 2 menit, selanjutnya direndam dalam alkohol absolute (100%), 95%, 90%, 80%, 70% dan 50% masing-masing selama 2 menit. Gelas objek dimasukkan ke dalam pewarnaan hematoxilin selama 7 menit dan dicuci dengan air mengalir dengan tujuan untuk menghilangkan kelebihan zat warna yang tidak diserap. Gelas objek selanjutnya direndam dalam pewarnaan eosin selama 3 menit dan dicuci kembali menggunakan aquadest. Preparat direndam dalam alkohol 50%, 70%, 85%, 90%, 100%, xylol I, xylol II masing-masing selama 2 menit. Preparat yang sudah jadi diperiksa dengan mikroskop untuk melihat perubahan plasenta secara mikroskopik dan jumlah sel tropoblas (Muntha, 2001).

i. Analisis data

Data yang diperoleh selanjutnyadianalisis secara non parametrik menggunakan Uji Kruskal-Wallis dan analisis parametrik. Apabila diperoleh hasil signifikan maka dilanjutkan dengan uji Mann Whitney. Data parametrik diuji dengan analisis varian (ANOVA) satu arah / one way ANOVA dan apabila berbeda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan. Analisis dilakukan dengan asumsi populasi yang diuji berdistribusi normal, homogen dan sampel tidak berhubungan satu sama lain.

HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Jumlah Sel Tropoblas

Pewarnaan sel tropoblas mengunakan *hematoxilin eosin* (HE) yang selanjutnya dibaca menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x untuk menghitung jumlah sel tropoblas. Perhitungannya yaitu lima lapangan pandang. Data hasil perhitungan yang telah didapatkan kemudian diuji normalitas dan homogenitas dengan uji Klmogorov-Smimov dan uji Shapiro-Wilk. Jumlah sel tropoblas diuji dengan *One Way* ANOVA dan apabila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan.

Hasil perlakuan berbagai kelompok dihitung berdasarkan jumlah sel tropoblas normal yang telah diwarnai *hematoxilin eosin* (HE). Penilaian dilakukan dengan menghitung jumlah sel tropoblas normal menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Jumlah sel tropoblas normal dihitung pada lima lapangan pandang berbeda pada setiap perlakuan. Jumlah sel tropoblas normal pada setiap perlakuan selanjutnya dianalisis dengan uji

analisis varian (ANOVA) dan dilanjutkan dengan Duncan's multiple range test 5%. Hasil uji ANOVA menunjukkan f hitung = 8,617 dengan signifikansi berbeda nyata (p<0,05). Uji ANOVA berbeda nyata kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

Hasil uji Duncan terhadap jumlah sel tropoblas normal menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif (K-) menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol positif (K+). Kelompok kontrol positif (K+) memberikan perbedaan yang signifikan dengan kelompok P3.

Tabel 1. Rerata dan simpangan baku jumlah sel tropoblas pada plasenta mencit bunting yang diberi euchema sebelum dipapar plumbum

Kelompok Perlakuan	Jumlah Sel Tropoblas (X±SD)
Kontrol Negatif (K-)	$212{,}25^{c} \pm 44{,}45$
Kontrol Positif (K+)	$82{,}75^{a} \pm 12{,}57$
Perlakuan 1 (P1)	$136{,}00^{ab} \pm 36{,}61$
Perlakuan 2 (P2)	$144{,}75^{b} \pm 26{,}47$
Perlakuan 3 (P3)	$203{,}000^{c} \pm 44{,}58$

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapat perbedaan yangnnyata (p<0,05).

K- : Mencit bunting disonde dengan aquades 0,1 ml

K+ : Mencit bunting diberi plumbum 0,011 mg/ 20 g BB

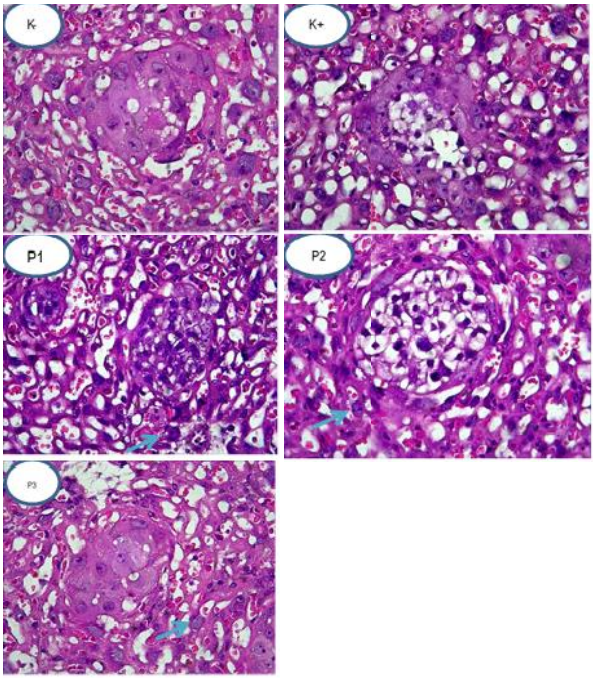
P1 : Mencit bunting diberi ekstrak *E. cottonii* sebanyak 3 mg/20 g BB dan dipapar plumbum 0,011 mg/20 g BB

P2 : Mencit bunting diberi ekstrak *E. cottonii* sebanyak 6 mg/20 g BB dan dipapar plumbum 0,011 mg/20 g BB

P3 : Mencit bunting diberi ekstrak *E. cottonii* sebanyak 9 mg/20 g BB dan dipapar plumbum 0,011 mg/20 g BB

Apabila ditinjau menurut dosis, kelompok P1 yang diberi *E. cottonii* 3 mg/20 g BB dan P2 yang diberi *E. cottonii* 6 mg/20 g BB tidak memberikan perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol positif karena jumlah sel-sel tropoblas masih mendekati kelompok kontrol positif. Berbeda halnya dengan P3 yang memberikan perbedaan signifikan dengan kelompok kontrol positif yaitu dengan dosis 9 mg/20 g BB.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *E. cottonii* sebagai antioksidan yang diberikan pada mencitt bunting sebelum dipapar logam berat plumbum memberikan pengaruh positif terhadap jumlah sel tropoblas. Gambar histopatologisnya terdapat pada gambar 1.



Gambar.1. Gambaran histopatologis plasenta mencit (Mus musculus) pada tiap perlakuan, tanda panah menunjukkan sel tropoblas. (*Pewarnaan HE : Perbesaran 400x*)

b. Ekspresi Caspase-8

Hasil perhitungan ekspresi Caspase-8 pada sel tropoblas plasenta menggunakan metode semi kuantitatif *Indeks Skala Remmele* yang dimodifikasi. Data hasil perhitungan dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis dan diperoleh hasil yang berbeda nyata (0,05). Hasil uji yang berbeda nyata kemudian dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney untuk mengetahui perbedaan antar dua kelompok perlakuan.

Kelompok kontrol negatif berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol positif (p<0,05). Kelompok kontrol positif berbeda nyata dengan kelompok perlakuan P3 namun tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan P1 dan P2. Demikian juga kelompok perlakuan P1 dan P2 berbeda nyata dengan kelompok perlakuan P3. Berdasarkan analisis tersebut dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak *E. cottonii* sebagai antioksidan pada mencit bunting sebelum dipapar plumbum dapat menurunkan ekspresi Caspase-8 pada sel tropoblas plasenta. Ditinjau berdasarkan dosis, terlihat bahwa dosis kelompok P3 yang menunjukkan pengaruh nyata dapat menurunkan ekspresi Caspase-8 pada sel tropoblas plasenta. Hasil uji Maan-Whitney antar dua kelompok perlakuan terdapat pada tabel 4.2

Tabel 2. Hasil uji Mann-Whitney ekspresi Caspase-8 sel tropoblas pada plasenta mencit bunting yang diberi Ekstrak *E. Cotonii* merah sebelum dipapar plumbum.

Ekspresi Caspase-8	Kelompok	Kelompok Banding	Signifikansi
Caspase-8	K-	K+	0,021*
		P1	0,021*
		P2	0,020*
		P3	0,020*
Caspase-8	K+	P1	1,000
		P2	0,058
		P3	0,020*
Caspase-8	P1	P2	0,042*
		P3	0,020*
Caspase-8	P2	P3	0,019*

Keterangan : *Signifikansi pada p<0,05

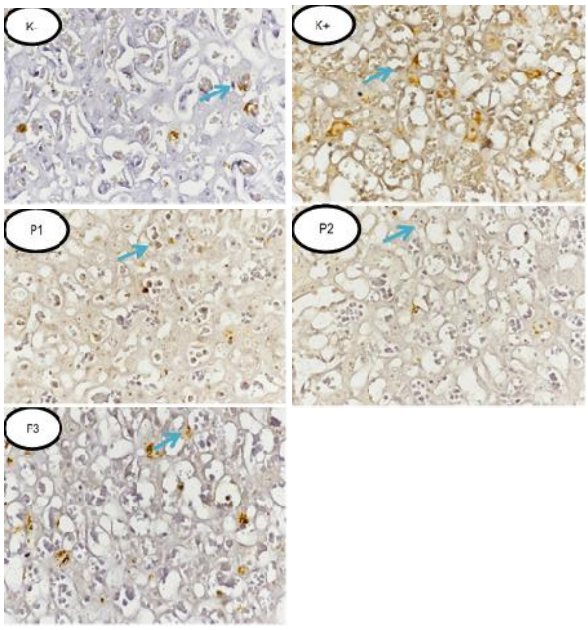
K- : Mencit bunting disonde dengan aquades 0,1 ml

K+ : Mencit bunting diberi plumbum 0,011 mg/ 20 g BB

P1 : Mencit bunting diberi ekstrak *E. cottonii* sebanyak 3 mg/20 g BB dan dipapar plumbum 0,011 mg/20 g BB

P2 : Mencit bunting diberi ekstrak *E. cottonii* sebanyak 6 mg/20 g BB dan dipapar plumbum 0,011 mg/20 g BB

P3 : Mencit bunting diberi ekstrak *E. cottonii* sebanyak 9 mg/20 g BB dan dipapar plumbum 0,011 mg/20 g BB



Gambar 2. Gambaran ekspresi caspase 8 pada plasenta tiap kelompok perlakuan. Pada panah menunjukkan adanya ekpresi Caspase 8 pada bagian tropoblas plasenta yang ditandai dengan adanya warna coklat chromogen (tanda panah). IHC. 400x

PEMBAHASAN

a. Jumlah Sel Tropoblas

Sel tropoblas rentan akibat induksi plumbum karena sel ini yang berhubungan langsung dengan darah yang berasal dari induk (Furukawa *et al*., 2011).

Pada preparat plasenta dengan pewarnaan HE kelompok K+ yang hanya mendapat paparan plumbum menunjukkan penurunan jumlah sel tropoblas normal dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Uji Duncan menunjukkan kelompok K+ terdapat perbedaan yang signifikan dengan K- dan P3. Hal tersebut dikarenakan adanya paparan plumbum yang menyebabkan terjadinya apoptosis. Sedangkan kelompok perlakuan yang mendapat antioksidan ekstrak *E. cottonii* sebelum diberi paparan plumbum menunjukkan perbedaan yang nyata dengan K+. Hal tersebut dikarenakan adanya antioksidan α-karoten dan β-karoten yang terkadung dalam *E. cottonii*. Selain itu terdapat bioaktif lainya yaitu klorofil α, klorofil d, likopen kriptoxantin, zeaxantin, pikobilin, dan lutein yang mampu menetralisir radikal bebas, dalam hal ini adalah plumbum. *E. cottonii* sebagai antioksidan alami mampu melindungi sel dari ROS, cara kerjanya yaitu dengan memutus rantai radikal bebas. Hal ini sesuai dengan pernyataan Christijanti dkk (2010) bahwa β-karoten dan tokoferol mampu menghentikan reaksi berantai radikal bebas.

Plumbum sebagai senyawa radikal bebas memiliki ukuran nano partikel yang mampu menyebabkan terjadinya stress oksidatif, prosesnya didahului dengan kerusakan pada membran. Plumbum akan membentuk ikatan kovalen dengan komponen membran sehingga terbentuk reaksi peroksidasi lipid. Senyawa reaktif yang dihasilkan oleh plumbum salah satunya yaitu radikal hidroksil. Senyawa ini yag paling berbahaya karena memiliki rekatifitas sangat tinggi. Mekanisme plumbum dalam menyebabkan stress oksidatif terjadi melalui beberapa cara : efek langsung plumbum terhadap membran sel, interaksi antara plumbum-Hb, dan plumbum dapat berikatan dengan *sulphydryl group* dan *amine group* (Ercal *et al*., 2001)

Kandungan karoten pada *E. cottonii* bekerja dengan cara mencegah terbentuknya lipid peroksidase dan mengikat radikal bebas. Karoten memecah singlet oksigen dan peroxy radikal. Lipid peroksidase meningkat ketika terjadi reaksi antara lipid dengan radikal bebas. Permulaan reaksi terjadi pelepasan hidrogen dari asam lemak tidak jenuh secara homolitik sehingga terbentuk radikal alkil. Radikal alkil cepat bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi, kemudian radikal peroksi bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh

membentuk hidroproksida dengan radikal alkil. Menurut Kusmita dan Limantara (2008), mekanisme karoten yaitu dengan cara memadamkan singlet oksigen dan selanjutnya berinteraksi dengan radikal bebas.

b. Ekspresi Caspase 8

Ekspresi Caspase-8 menggunakan pewarnaan imunihistokimia (IHK). Sel tropoblas yang mengalami apoptosis akan mengekspresikan Caspase-8, karena Caspase-8 merupakan marker atau indikator apoptosis melalui jalur ekstrinsik. Pada preparat akan tampak warna kecoklatan yang menunjukkan bahwa terdapat reaksi Caspase-8, sedangkan apabila tampak warna hijau maka sel tropoblas dalam keadaan normal. Pembacaan IHK menggunakan mikroskop pembesaran 400x dengan cara skoring yaitu *Indeks Skala Remmele*. Skor sel positif dikalikan dengan skor intensitas warna. Caspase-8 terekspresi karena adanya paparan plumbum atau terjadi secara fisiologis menjelang partus, sehingga pada kelompok kontrol negatif masih terekspresi warna coklat tetapi tidak pekat seperti kontrol positif.

Plumbum sebagai radikal bebas dapat menyebabkan stress oksidatif yang selanjutnya meningkatkan ROS. Peningkatan ROS merupakan awal terjadinya apoptosis. Caspase-8 merupakan marker apoptosis melalui jalur ekstrinsik. *Reactive Oxygen Species* yang terbentuk pada sel tropoblas dapat mengakibatkan stress pada tropoblas plasenta. Apoptosis jalur ekstrinsik diakibatkan oleh sitokin inflamasi yang dikeluarkan oleh sel radang plasenta. Apoptosis ekstrinsik diawali dengan aktivasi TNFR yang meliputi Fas, TNFR1, TNFRII dan DR 4. Ikatan pada ligan selanjutnya akan mengaktifkan reseptor TNFR1 dan Fas untuk menarik dan mengikat protein death effector FADD/Mort-1. FADD kemudian menempel pada reseptor kematian yang akan mengikat proCaspase-8. ProCaspase-8 kemudian berubah menjadi bentuk aktif yaitu Caspase-8 (Mudjahid, 2011).

Euchema cottonii mengandung α-karoten, β-karoten, dan senyawa bioaktif lainnya yang mampu menurunkan ekspresi Caspase-8. Kandungan antioksidan pada *E. cottonii* dapat menurunkan konsentrasi proinflamatori sitokin TNF- α dengan cara menghambat ROS dan sintesis lipid peroksidase. Karotenoid dapat menurunkan sekresi sitokin anti-inflamatori (Agarwal *et al*., 2012).

PENUTUP

a. Simpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak *E. cottonii* dapat menaikkan jumlah sel tropoblas pada plasenta mencit bunting sebelum dipapar plumbum.
2. Pemberian ekstrak *E. cottonii* dapat menurunkan ekspresi Caspase-8 pada plasenta mencit bunting sebelum dipapar plumbum.

b. Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan berkaitan dengan dosis yang lebih bervariasi sehingga diperoleh dosis yang efektif dan juga pengaruhnya dengan organ lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementrian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah mendanai penelitan kami, LPPM UNTB, Politeknik Medica Farma Husada Mataram, dan Universitas Airlangga Surabaya yang telah membantu kami dalam proses dan penyelesaian penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Agarwal, M., R. P. Parameswari, H. R. Vasanthi and D. K. Das. 2012. Dynamic Action of Carotenoids In Cardioprotection and Maintenance of Cardiac Health. Journal Molecules.

Amelia, R dan W. A. Tanod. 2016. Kandungan Antioksidan Alga merah *Eucheuma cottonii* Dengan Metode Pengeringan Yang Berbeda. Journal of Fisheries, Marine and Aquatic Science Volume1, Nomor 1.

Anwar, K., J. Iqbal and M. M. Hussain. 2007. Mechanisms Involved in Vitamin E Transport by Primary Enterocytes and in Vivo Absorption. J. Lipid Res. 48:2028-2038.

Barness, E.G. 2010. Review: Teratogenic Causes of Malformations. Ann. of Cli. & Lab. Sci, 40 (2):99-114.

Bressenot, A., S. Marchal, L. Bezdetnaya, J. Garrier, F. Gullemin and F. Plenat. 2009. Assessment of Apoptosis by Immunohistochemistry to Active Caspase-3, Active Caspase-7, or Cleaved PARP in Monolayer Cells and Spheroid and Subcutaneous Xenografts of Human Carcinoma. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 57(4): 289-300

Christijanti, W., N. R. Utami, dan A. Iswara. 2010. Pemberian Antioksidan Vitamin C dan E terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Putih Terpapar Allethrin. Biosaintifika, 2(1):18-26. ISSN 2085-191X.

Ercal, N., H. Gurer-Orhan and N. Aykin-Burns. 2001. Toxic Metals and Oxidative Stress Part 1; Mechanisms Involved in Metal Induced Oxidative Damage. Current Topics in Medicinal Chemistry (1) : 529-539.

Fard, S. G., F. T. Shamsabadi, M. Emadi, G. Y. Meng, K. Muhammad and S. Mohamed. 2011. "Ethanolic extract of *Eucheuma cottonii* promotes in vivo hair growth and wound healing," Journal of Animal and Veterinary Advances, vol. 10, no. 5, pp. 601–605,2011.

Furukawa, S., S. Hayashi, K. Usuda, M. Abe, S. Hagio and I. Ogawa. 2011. Toxicological Pathology in the Rat Placenta. Journal of Toxicol Pathol, 24: 95–111.

Kania, N., E. Mayangsari, B. Setiawan, D. Nugrahenny, F. Tony, E. S. Wahyuni and M. A. Widodo. The Effect of *Euchema cottonii* on Signaling Pathway Inducing Mucin Synthesis in Rat Lungs Chronically Exposed to Particulate matter 10 (PM_{10}) Coal Dust. Journal of Toxycology ID 528146, 8 pages.

Mudjahid. 2011. Pengaruh Pemberian Ekstrak Batang Sarang Semut (Myrmecodia Pendens Merr & Perry) Terhadap Ekspresi P21 dan Ekspresi Ki67 pada Galur Sel Karsinoma Mammae T47d [Tesis]. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Bandung

Muntha, M. 2001. Tenik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringn Hewan Dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (H&E).

Parast, M.M., H. Yu, A. Ciric, M.W. Salata, and V. Davis. 2009. PPARc Regulates Tropoblast Proliferation and Promotes Labirinthine Trilineage Differentiation. Plos One, 4(11).

Su, Z., Z. Yang, Y. Xu, Y. Xu, Y. Chen and Q. Yuo. 2015. Apoptosis, Autophagy, Necroptosis and Cancer Metastasis. 14:48 DOI 10.1186/S12943-0150321-5.

Sumarsono, P. 2016. Potensi Antioksidan Buah Merah (*Pandanus conoideus Lam.*) Terhadap Ekspresi Caspase-9 Dan Jumlah Sel Tropoblas Plasenta Mencit (Mus Musculus) Bunting Sebelum Terpapar Plumbum [Tesis]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.

Wahyuni, I. 2016. Pemberian Buah Merah (Pandanus conoideus Lam) sebelum Dipapar Timah Hitam Menekan Ekspresi Caspase-8 dan Jumlah Sel Hofbauer Mencit (*Mus musculus*) Bunting. Jurnal Veteriner Maret 2017 Vol. 18 No. 1 : 128-134.

Widjiati. 1997. Pengaruh Fosfat, Glukosa dan Kombinasinya dalam Medium Kultur In-Vitro Terhadap Perkembangan Embrio Mencit [Tesis]. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor

World Health Organization. 2010. Childhood Lead Poisoning. WHO Library Cataloguing-In-Publication Data.