

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

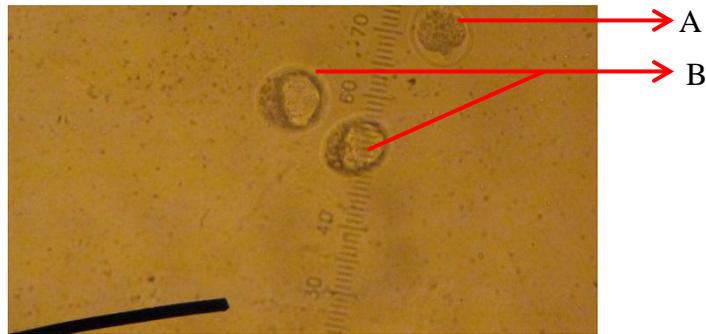
Perkembangan embrio pada mencit dimulai setelah ovum dibuahi oleh sperma. Ovum yang telah dibuahi akan berkembang menjadi zigot. Selanjutnya, zigot akan mengalami proses pembelahan dan berkembang menjadi morula dan blastokista dan terbentuk rongga *blastocoel*. Selanjutnya, terjadi proses gastrulasi dan neurulasi. Tahapan selanjutnya dalam perkembangan embrio adalah pembentukan organ-organ atau organogenesis. Embrio akan mengalami implantasi pada tahap blastokista ketika umur kebuntingan 4 hingga 5 hari (Rugh, 1968). Pada penelitian yang dilakukan, setiap mencit menghasilkan embrio dengan jumlah yang beragam, namun rata-rata jumlah embrio yang didapatkan adalah 9 ± 2.64 buah. Embrio yang diamati dalam penelitian ini adalah embrio yang belum mengalami implantasi dan masih berada pada saluran reproduksi induknya. Berikut ini hasil yang didapatkan pada penelitian yang telah dilakukan

1. Pengaruh ekstrak rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) terhadap tahapan perkembangan embrio praimplantasi

Koleksi embrio praimplantasi dilakukan dengan metode *flushing*. Bagian saluran reproduksi, yaitu uterus dan tuba fallopi diambil kemudian dilakukan *flushing* dengan menggunakan larutan *Phosfat buffer saline* (PBS). Selanjutnya embrio yang terdapat di dalam PBS diperiksa dengan menggunakan mikroskop cahaya. Koleksi embrio hasil *flushing* dapat dilihat pada Gambar 4.1. Gambar tersebut adalah embrio mencit yang berasal dari induk yang telah diberi perlakuan dengan ekstrak rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*).

Pada Gambar 4.1 terdapat beberapa tahapan embrio praimplantasi dari induk yang diberi perlakuan dengan ekstrak rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) dosis 700 mg/kgBB/hari. Tahapan embrio praimplantasi yang ditemukan adalah embrio tahap morula (a) dan embrio tahap blastokista (b). Embrio tahap morula yang ditemukan telah mengalami pematangan sehingga terlihat zona

pelusida yang lebih luas. Pada embrio tahap blastokista, *blastocoel* yang terbentuk lebih dari setengah diameter embrio.



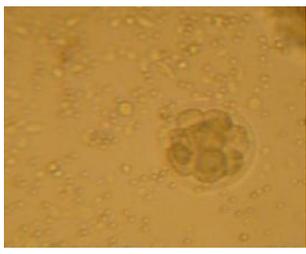
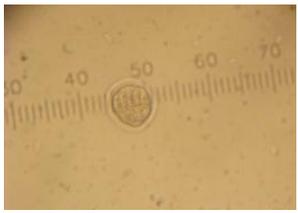
Gambar 4.1 Embrio praimplantasi mencit (*Mus musculus* L.) Swiss Webster pada induk yang diberi perlakuan ekstrak rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.). A. Embrio praimplantasi tahap morula; B. Embrio praimplantasi tahap blastokista (Sumber: dokumentasi pribadi, 2014)

Berdasarkan pengamatan yang dilakukan didapatkan 3 tahapan perkembangan embrio praimplantasi. Embrio praimplantasi yang ditemukan dapat dilihat pada Tabel 4.1. Embrio tahap blastokista yang ditemukan ada yang memiliki rongga *blastocoel* yang sudah lebar namun ada yang masih memiliki rongga *blastocoel* berukuran kecil. Embrio tahap morula yang ditemukan ada yang sudah mampat dan ada yang belum mampat. Embrio tahap pembelahan yang ditemukan adalah embrio dengan jumlah blastomer 4 atau 8.

Pada mencit kelompok kontrol, kelompok perlakuan dosis 140 mg/kgBB/hari dan kelompok perlakuan dosis 280 mg/kgBB/hari hanya ditemukan 2 tahapan embrio praimplantasi yaitu embrio tahap morula dan blastokista serta embrio yang abnormal. Pada perlakuan 700 mg/kgBB/hari ditemukan 3 tahapan embrio praimplantasi yaitu embrio tahap pembelahan, morula, dan blastokista serta terdapat embrio yang abnormal. Persentase embrio yang ditemukan pada setiap tahapan dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.1 Tahapan perkembangan embrio praimplantasi mencit Swiss Webster yang ditemukan pada kelompok perlakuan dan kontrol

Gambar embrio	Keterangan
	Embrio tahap pembelahan pada dosis 700 mg/kgBB/hari. Terdapat 4 buah blastomer dengan ukuran yang tidak sama besar.

	<p>Embrio tahap pembelahan pada dosis 700 mg/kgBB/hari. Terdapat 8 buah blastomer dengan ukuran yang tidak sama besar.</p>
	<p>Embrio tahap morula tidak mampat pada dosis 280 mg/kgBB/hari. Pada morula tidak mampat sel-sel blastomer berdekatan dengan zona pelusida.</p>
	<p>Embrio tahap morula mampat pada dosis 140mg/kgBB/hari. Pada morula mampat sel-sel blastomer berada lebih ke dalam, sehingga terlihat adanya ruang kosong antara embrio dengan zona pelusida.</p>
	<p>Embrio tahap blastokista pada kontrol. Tahap blastokista ditandai dengan adanya <i>blastocoel</i> (bl).</p>

Tabel 4.2 Persentase embrio praimplantasi dan embrio abnormal yang ditemukan pada kelompok kontrol dan perlakuan

Dosis	Tahapan embrio			
	Pembelahan (%)	Morula (%)	Blastokista (%)	Abnormal (%)
Kontrol	0	13.73	76.47	9.8
140 mg/kgBB/hari	0	18.52	62.96	18.52
280 mg/kgBB/hari	0	24.56	49.12	26.32
700 mg/kgBB/hari	3.7	18.52	42.59	35.19

Pada embrio tahap pembelahan hanya ditemukan pada perlakuan ekstrak temu putih dosis 700 mg/kgBB/hari (Tabel 4.2), sedangkan untuk embrio tahap morula, blastokista dan embrio abnormal ditemukan pada semua kelompok perlakuan dan kontrol. Urutan embrio praimplantasi tahap morula dari yang paling kecil yaitu kontrol, perlakuan dosis 140 dan 700 mg/kgBB/hari, dan terakhir dosis 280 mg/kgBB/hari. Pada kontrol (Tabel 4.2) embrio tahap morula sebesar 13.72%. Pada perlakuan dosis 140 mg/kgBB/hari persentase embrio tahap morula adalah 18.52%. Pada dosis 280 mg/kgBB/hari persentase embrio tahap morula adalah 24.56%. Pada perlakuan dosis 700 mg/kgBB/hari persentase embrio praimplantasi tahap morula adalah 18.52% . Embrio tahapan morula paling tinggi ditemukan pada perlakuan dosis 280 mg/kgBB/hari.

Embrio praimplantasi tahap blastokista (Tabel 4.2) ditemukan pada kontrol dan semua kelompok perlakuan. Urutan embrio praimplantasi tahap blastokista dari yang paling tinggi adalah kontrol, dosis 140 mg/kgBB/hari, dosis 280 mg/kgBB/hari dan 700 mg/kgBB/hari. Pada kontrol persentase embrio tahap blastokista adalah 76.47%. Pada perlakuan dosis 140 mg/kgBB/hari persentase embrio tahap blastokista adalah 62.96%. Pada dosis 280 mg/kgBB/hari persentase embrio tahap blastokista adalah 49.12%. Pada perlakuan dosis 700 mg/kgBB/hari persentase embrio praimplantasi tahap blastokista adalah 42.59% .

Pada kontrol dan kelompok perlakuan (Tabel 4.2) ditemukan adanya embrio abnormal. Pada kontrol embrio abnormal sebesar 9.80%. Pada perlakuan dosis 140 mg/kgBB/hari embrio abnormal sebesar 18.52%. Pada kelompok perlakuan 280 mg/kgBB/hari persentase embrio abnormal adalah 26.32%. Pada kelompok perlakuan dosis 700 mg/Kb BB/ hari persentase jumlah embrio abnormal adalah 35.19%. Persentase Embrio abnormal paling tinggi ditemukan pada perlakuan dosis 700 mg/kgBB/hari.

Pada saat umur kebuntingan mencit 66-82 jam, embrio mencit berada pada tahap blastokista (Rugh, 1968). Embrio yang perkembangannya terganggu akan terhambat perkembangannya atau embrio akan mengalami abnormalitas. Apabila perkembangan embrio terhambat maka akan ditemukan embrio yang berada pada tahap pembelahan, tahap morula atau pada saat embrio masih memiliki 1 sel atau tahap zigot. Embrio praimplantasi yang berada pada tahap blastokista adalah

embrio yang tidak mengalami penghambatan perkembangan. Abnormalitas yang dapat diamati pada penelitian ini adalah abnormalitas pada morfologi embrio saja. Data rata-rata embrio dengan perkembangan normal dan terganggu dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Rata-rata embrio yang mengalami perkembangan normal dan terhambat serta embrio abnormal pada kelompok perlakuan dan kontrol

Dosis	Rata-rata jumlah embrio		
	Terhambat	Tidak terhambat	Abnormal
Kontrol	1.17±0.98	6.50±2.34	0.83±0.75
140 mg/kgBB/hari	1.67±1.51	5.50±3.51	1.83±1.51
280 mg/kgBB/hari	2.33±2.25	4.67±3.33	2.50±1.22
700 mg/kgBB/hari	2.00±2.19	3.83±3.32	3.17±3.19

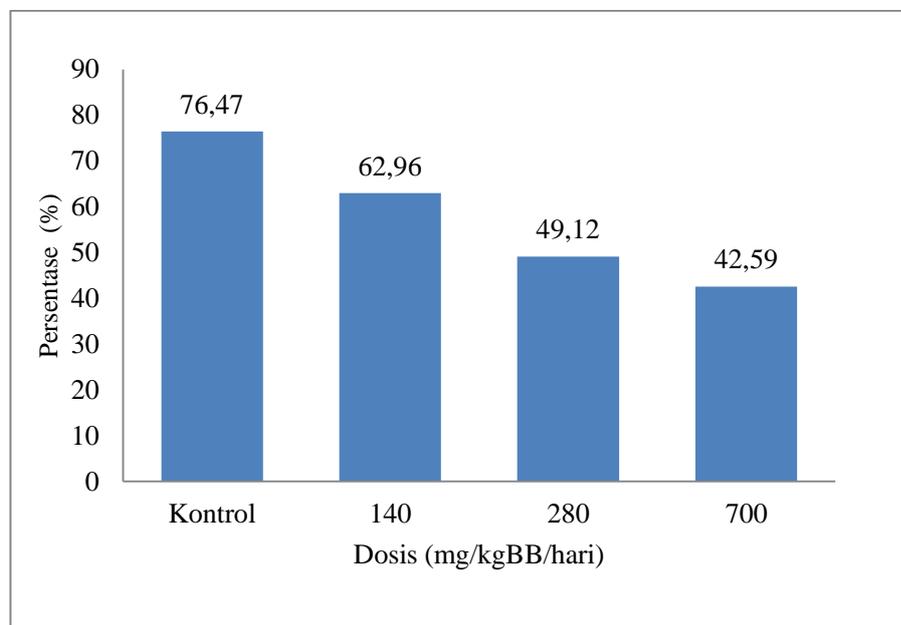
Hasil uji statistik pada embrio praimplantasi yang tidak terhambat perkembangannya (tahap blastokista) menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen ($p > \alpha 0.05$) sehingga data diuji dengan menggunakan uji parametrik. Uji parametrik yang digunakan adalah uji *One Way Anova*. Hasil analisis data uji *One Way Anova* pada embrio tahap blastokista didapatkan $F_{hitung} (0.777) < F_{tabel} (3.10)$, sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan rata-rata pada embrio tahap blastokista antara kelompok perlakuan dan kontrol.

Berdasarkan uji statistik normalitas *Kolmogorov-Smirnov* dapat diketahui bahwa data pada embrio abnormal terdistribusi normal ($p > 0.05$), sedangkan hasil uji Homogenitas *Levene* dapat diketahui data tidak terdistribusi dengan homogen ($p < 0.05$) sehingga data dianalisis dengan menggunakan uji nonparametrik. Analisis yang dilakukan adalah uji *Kruskall-Walis*. Hasil signifikansi hitung pada embrio abnormal lebih besar dibandingkan $\alpha 0.05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan rata-rata pada embrio abnormal kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Data embrio yang terhambat perkembangannya diuji secara parametrik karena nilai p pada uji normalitas dan homogenitas lebih besar dari 0.05. Selanjutnya, data diuji secara parametrik dengan menggunakan *One Way Anova*. Hasil perhitungan uji statistik *One Way Anova* didapatkan nilai $F_{hitung} (0.600) < F_{tabel}$

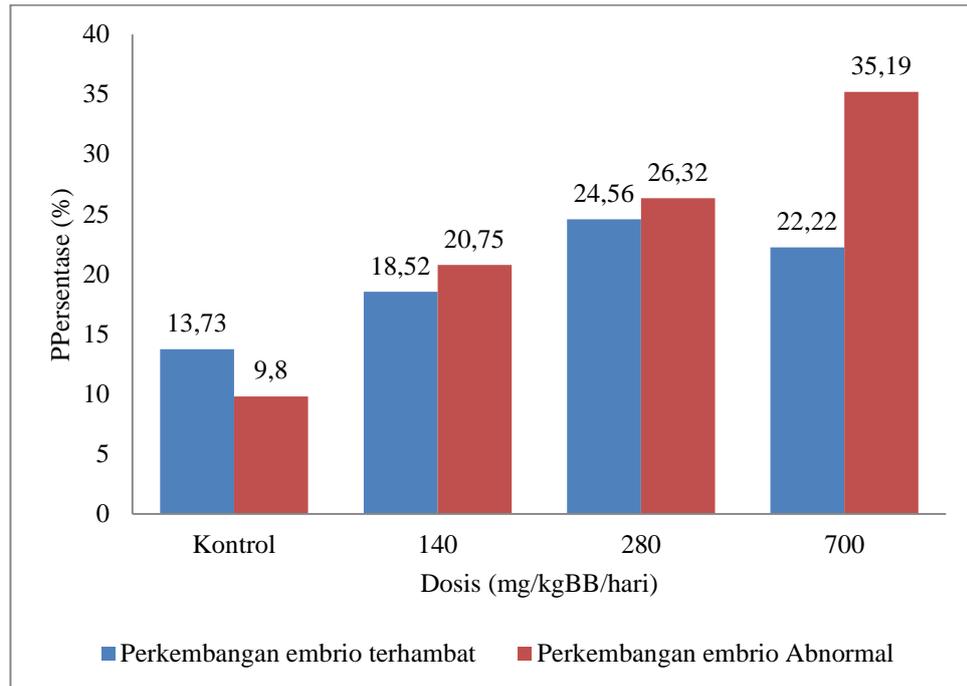
(3.10). Hal ini menunjukkan tidak adanya perbedaan rata-rata pada kelompok perlakuan dengan kontrol.

Hasil uji statistik menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol, maka dilakukan penghitungan persentase pada embrio dengan perkembangan normal (tahap blastokista), embrio dengan perkembangan terhambat dan embrio abnormal. Persentase embrio perkembangannya normal dapat dilihat pada Gambar 4.2, sedangkan persentase embrio dengan perkembangan terhambat dan embrio abnormal dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.2 Persentase perkembangan embrio praimplantasi yang tidak terhambat (tahap blastokista) pada kelompok perlakuan dan kontrol

Kontrol (Gambar 4.2) memiliki persentase paling tinggi pada embrio praimplantasi yang tidak terhambat (tahap blastokista) perkembangannya yaitu sebesar 76.47 %. Pada perlakuan dosis 140 mg/kgBB/hari persentase embrio yang tidak terhambat perkembangannya sebesar 62.96%. Pada dosis 280 mg/kgBB/hari persentase embrio yang tidak terhambat perkembangannya adalah 49.12% . Dosis yang paling sedikit embrio yang tidak terhambat perkembangannya adalah dosis 700 mg/kgBB/hari, yaitu sebesar 42.59%.



Gambar 4.3 Persentase embrio praimplantasi mencit Swiss Webster yang terganggu perkembangannya pada kelompok kontrol dan perlakuan

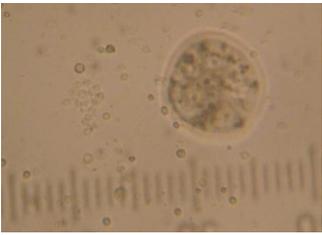
Pada kontrol (Gambar 4.3) jumlah embrio terhambat sebesar 13.73% dan embrio abnormal sebesar 9.8%. Pada dosis 140 mg/kgBB/hari persentase embrio yang terhambat perkembangannya dan embrio abnormal sama besar yaitu sebesar 18.52%, sedangkan pada dosis 280 mg/kgBB/hari persentase embrio yang terhambat perkembangannya adalah 24.26% dan persentase embrio abnormal adalah 26.32%. Pada dosis 700 mg/kgBB/hari (Gambar 4.3) persentase embrio yang terhambat perkembangannya adalah sebesar 22.22%, sedangkan embrio yang abnormal sebesar 35.19%.

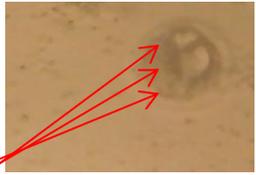
2. Abnormalitas pada embrio

Abnormalitas pada embrio ada yang bisa diamati dan ada yang tidak bisa diamati dengan menggunakan mikroskop. Apabila abnormalitas terjadi pada tingkat gen maka tidak akan bisa diamati namun cepat atau lambat abnormalitas ini akan diekspresikan dan akan muncul. Apabila abnormalitas terjadi pada morfologi atau bentuk embrio maka abnormalitas ini dapat diamati dengan menggunakan mikroskop. Pada penelitian yang dilakukan ditemukan beberapa abnormalitas morfologi embrio praimplantasi baik pada kontrol maupun pada

kelompok perlakuan. Gambar embrio abnormal dapat dilihat pada Tabel 4.4. Abnormalitas embrio yang ditemukan yaitu adanya zona pelusida tanpa embrio, embrio yang terdegenerasi (sel-sel blastomer pecah), morula tanpa zona pelusida, morula terfragmentasi, morula dengan zona pelusida abnormal, blastokista tanpa zona pelusida dan blastokista yang memiliki *blastocoel* lebih dari satu. Rata-rata embrio abnormal dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.4 Gambar embrio abnormal yang ditemukan pada kelompok perlakuan dan kontrol

No	Embrio Abnormal	Gambar	Keterangan
1	Zona pelusida tanpa embrio		Pada abnormalitas zona pelusida tanpa embrio (dosis 700 mg/kgBB/hari) berbentuk bulat, bagian dalam tidak terdapat sel.
2	Embrio degenerasi (blastomer pecah)		Pada embrio yang terdegenerasi (dosis 700 mg/kgBB/hari) tidak menunjukkan adanya blastomer, hanya terlihat adanya bulatan-bulatan yang kecil pada embrio.
3	Morula tanpa zona pelusida		Pada morula tanpa zona pelusida (kontrol) terlihat seperti kotoran pada medium PBS namun terlihat adanya blastomer.
4	Morula fragmentasi		Pada morula terfragmentasi (dosis 140 mg/kgBB/hari) terlihat adanya blastomer, namun terlihat blastomer yang terpisah-pisah mejadi beberapa bagian. Selain itu, ukuran pada blastomer berbeda-beda.

5	Morula dengan zona pelusida abnormal	 <p data-bbox="624 524 655 555">zp</p>	Pada embrio tahap morula (dosis 700 mg/kgBB/hari) terlihat normal, namun bagian zona pelusida yang biasanya berbentuk bulat terlihat berbentuk kubus.
6	Blastokista tanpa zona pelusida		Pada Blastokista tanpa zona pelusida (kontrol) memiliki bentuk dan <i>blastocoel</i> yang normal, namun tidak ditemukan adanya zona pelusida yang melindungi embrio.
7	Blastokista dengan 2 buah <i>blastocoel</i>	 <p data-bbox="624 1144 655 1176">bl</p>	Pada blastokista dengan 2 <i>blastocoel</i> (dosis 280 mg/kgBB/hari) terlihat adanya 2 rongga pada bagian atas blastokista.
8	Blastokista dengan 3 buah <i>blastocoel</i>	 <p data-bbox="608 1357 639 1388">bl</p>	Pada blastokista dengan dengan 3 <i>blastocoel</i> (dosis 280 mg/kgBB/hari) terlihat adanya 3 rongga pada bagian atas blastokista.
9	Blastokista dengan 4 buah <i>blastocoel</i>	 <p data-bbox="608 1675 639 1706">bl</p>	Blastokista dengan dengan 3 <i>blastocoel</i> memiliki zona pelusida dan memiliki bentuk yang bulat namun <i>blastocoel</i> yang terbentuk lebih dari 1.

Keterangan:

bl: *blastocoel*

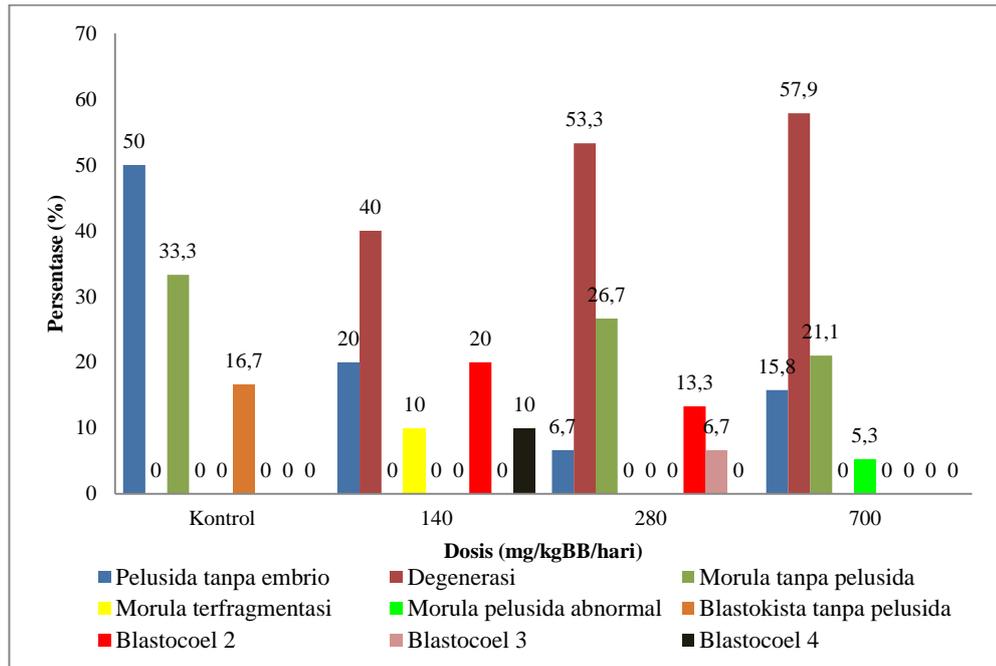
zp: zona pelusida

Tabel 4.5 Rata-rata embrio abnormal pada kelompok perlakuan dan kontrol

Dosis	Jenis embrio abnormal								
	a	b	c	d	e	f	g	h	i
Kontrol	0.50 ± 0.55	0	0.33 ± 0.52	0	0	0.17 ± 0.41	0	0	0
140 mg/Kg BB/hari	0.33 ± 0.52	0.67 ± 0.82	0	0.17 ± 0.41	0	0	0.33 ± 0.82	0	0.13 ± 0.41
280 mg/Kg BB/hari	0.17 ± 0.41	1.33 ± 1.03	0.67 ± 1.21	0	0	0	0.33 ± 0.52	0.17 ± 0.41	0
700 mg/Kg BB/hari	0.50 ± 1.22	1.83 ± 2.64	0.67 ± 1.21	0	0.17± 0.41	0	0	0	0

Keterangan: (a). Pelusida tanpa embrio (b). Embrio Degenerasi (c). Morula tanpa pelusida (d). Morula terfragmentasi (e). Morula dengan bentuk pelusida abnormal (f). Blastokista tanpa zona pelusida (g). Blastokista dengan 2 *blastocoel* (h). Blastokista dengan 3 *Blastocoel* (i). Blastokista dengan 4 *blastocoel*

Berdasarkan uji normalitas *Kolomogorov Smirnov* yang dilakukan didapatkan data nilai signifikansi yang kurang dari α 0.005 ($p < 0.05$) pada semua embrio abnormal. Selain itu, pada uji homogenitas *Levene* signifikansi yang didapat kurang dari α 0.005 ($p < 0.05$). Kesimpulan dari uji normalitas *Kolomogorov Smirnov* dapat diketahui bahwa data tidak terdistribusi normal. Pada uji homogenitas *Levene* pun didapatkan hasil bahwa semua data berbagai jenis abnormalitas yang ditemukan tidak terdistribusi homogen. Pengujian hipotesis dilakukan dengan menggunakan uji non parametrik. Uji nonparametrik yang digunakan adalah uji *Kruskal-Wallis*. Pada hasil analisis nonparametrik menunjukkan nilai signifikansi lebih besar dari 0.05 ($p > 0.05$) pada semua jenis abnormalitas yang ditemukan. Berdasarkan hasil analisis yang dilakukan dapat disimpulkan ternyata tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada setiap jenis abnormalitas yang ditemukan pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Berdasarkan hal ini dilakukan penghitungan persentase yang dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Persentase abnormalitas embrio mencit Swiss Webster pada kelompok perlakuan dan kontrol

Pada kontrol (Gambar 4.4) hanya ditemukan 3 jenis abnormalitas yaitu zona pelusida tanpa embrio (50%), morula tanpa zona pelusida (33.33%) dan blastokista tanpa pelusida (16.67%). Pada dosis 140 mg/kgBB/hari ditemukan 5 macam abnormalitas, yaitu zona pelusida tanpa embrio (20%), degenerasi atau sel-sel blatomer pecah (40%), morula terfragmentasi (10%), blastokista tanpa zona pelusida (20%) dan blastokista dengan 4 *blastocoel* (10%). Pada dosis 280 mg/kgBB/hari (Gambar 4.4) ditemukan 5 jenis abnormalitas pada embrio, yaitu zona pelusida tanpa embrio (6.67%), embrio degenerasi (53.33%), morula tanpa zona pelusida (26.67%), blastokista dengan 2 *blastocoel* (13.33%) dan blastokista dengan 3 *blastocoel* (6.67%). Pada dosis 700 mg/KbBB/hari ditemukan 4 jenis abnormalitas yaitu zona pelusida tanpa embrio (15.79%), embrio degenerasi (57.89%) morula tanpa zona pelusida (21.05%) dan morula dengan zona pelusida abnormal (5.26%).

Abnormalitas embrio yang ditemukan pada semua kelompok perlakuan dan kontrol adalah zona pelusida tanpa embrio. Abnormalitas embrio degenerasi dan morula tanpa zona pelusida hanya ditemukan pada 3 kelompok perlakuan. Embrio degenerasi terdapat pada semua kelompok mencit yang diberi perlakuan dengan ekstrak rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*) namun tidak ditemukan

dari kontrol. Embrio tahap morula yang tidak memiliki zona pelusida ditemukan pada kontrol dan mencit Swiss Webster yang diberi perlakuan ekstrak temu putih (*Curcuma zedoaria*) dengan dosis 280 mg/kgBB/hari dan 700 mg/kgBB/hari. Morula tanpa zona pelusida tidak ditemukan pada perlakuan ekstrak temu putih (*Curcuma zedoaria*) dosis 140 mg/kgBB/hari. Embrio tahap blastokista yang memiliki 2 *blastocoel* ditemukan pada perlakuan ekstrak temu putih (*Curcuma zedoaria*) dosis 140 mg/kgBB/hari dan 280 mg/kgBB/hari. Blastokista yang memiliki 3 dan 4 blasocoel masing-masing ditemukan pada 1 kelompok perlakuan. Blastokista dengan 3 *blastocoel* ditemukan pada perlakuan dengan dosis 280 mg/kgBB/hari, sedangkan blastokista dengan 3 *blastocoel* ditemukan pada perlakuan dengan dosis 700 mg/kgBB/hari. Blastokista tanpa pelusida hanya ditemukan pada kontrol. Morula terfragmentasi hanya ditemukan pada dosis 140 mg/kgBB/hari.

Jenis abnormalitas yang paling banyak ditemukan pada kelompok perlakuan adalah embrio degenerasi, dimana embrio degenerasi paling tinggi terdapat pada perlakuan dosis 700 mg/kgBB/hari (57.9%). Pada kelompok kontrol abnormalitas yang paling tinggi adalah zona pelusida tanpa embrio (50%).

3. Diameter embrio praimplantasi tahap blastokista

Berdasarkan hasil penghitungan diameter embrio tahap blastokista pada kelompok kontrol dan perlakuan didapatkan data yang terdapat pada Tabel 4.8.

Tabel 4.6 Diameter embrio tahap blastokista mencit Swiss Webster pada kelompok perlakuan dan kontrol

Dosis	Rata-rata diameter embrio tahap blastokista	
	Vertikal (mm)	Horizontal (mm)
Kontrol	0.09±0.008	0.09±0.005
140 mg/kgBB/hari	0.09±0.005	0.09±0.007
280 mg/kgBB/hari	0.09±0.007	0.08±0.006
700 mg/kgBB/hari	0.08±0.006	0.08±0.007

Pada kontrol dan dosis 140 mg/kgBB/hari embrio praimplantasi yang ditemukan umumnya berbentuk ideal yaitu seperti bola. Pada kontrol diameter vertikal 0.09 ±0.008 mm dan diameter horizontal 0.09±0.005 mm. Pada perlakuan

dosis 140 mg/kgBB/hari 0.09 ± 0.005 mm, sedangkan diameter horizontal 0.09 ± 0.007 . Pada dosis 280 mg/kgBB/hari embrio yang ditemukan berbentuk lonjong dengan diameter verikal 0.09 ± 0.007 mm dan diameter horizontal 0.08 ± 0.006 mm. Pada dosis 700 mg/kgBB/hari tidak embrio memiliki bentuk yang seperti bola namun memiliki ukuran diameter yang lebih kecil yaitu 0.08 ± 0.006 mm pada diameter vertikal dan 0.08 ± 0.007 pada diameter horizontal.

Berdasarkan uji statistik normalitas *Kolmogorov-Smirnov* data tidak terdistribusi normal ($p < 0.05$), namun berdasarkan uji homogenitas *Levene* data yang didapat terdistribusi homogen ($p > 0.05$), sehingga digunakan uji nonparametrik untuk menguji hipotesis yang diajukan. Uji non parametrik yang digunakan adalah *Kruskal-Wallis*. Berdasarkan hasil uji hipotesis yang dilakukan ternyata tidak ada perbedaan pada diameter vertikal maupun horizontal pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol ($p < 0.05$).

B. Pembahasan

Berdasarkan uji statistik yang dilakukan menunjukkan tidak adanya pengaruh ekstrak rimpang temu putih terhadap jumlah embrio pada setiap tahapan, terbentuknya embrio abnormal dan diameter blastokista mencit Swiss Webster pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Tidak adanya pengaruh pemberian ekstrak rimpang temu putih diduga terjadi oleh beberapa faktor. Pertama, pada umumnya percobaan antiproliferasi dilakukan secara *in vitro*, sedangkan pada penelitian yang dilakukan, pemberian ekstrak rimpang temu putih dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan metode *gavage* (Huang, 2013). Kedua, zat-zat aktif pada rimpang temu putih yang diberikan secara oral akan masuk ke dalam sistem pencernaan dan akan diserap oleh sel-sel epitel pada usus yang selanjutnya akan melalui metabolisme pada hati sehingga konsentrasi zat aktif pada tubuh akan menurun dan konsentrasi zat aktif yang sampai pada saluran reproduksi tidak diketahui secara pasti (Huang *et al.*, 2013; Christopher *et al.*, 2002). Penyebab lainnya yaitu beberapa zat aktif larut dalam lemak sehingga seharusnya hewan uji diberikan pakan yang kaya akan lemak (Huang *et al.*, 2013).

Berdasarkan uji statistik tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada perkembangan embrio, terbentuknya embrio abnormal dan diameter embrio tahap

blastokista antara kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol, sehingga dilakukan perbandingan persentase antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Berikut ini pembahasan lebih lanjut mengenai pengaruh ekstrak rimpang temu putih terhadap perkembangan embrio praimplantasi, terbentuknya embrio abnormal dan diameter blastokista mencit Swiss Webster berdasarkan perbandingan persentase yang dilakukan.

1. Pengaruh ekstrak rimpang temu putih terhadap tahapan perkembangan embrio praimplantasi mencit Swiss Webster

Berdasarkan uji statistik menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan dalam hal perkembangan embrio yang terhambat dan tidak terhambat serta terbentuknya embrio abnormal, namun berdasarkan perbandingan persentase menunjukkan adanya perbedaan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol setiap tahapan embrio praimplantasi. Pada embrio yang terhambat embrio berada pada tahap pembelahan dan tahap morula. Pada embrio tahap pembelahan hanya ditemukan pada perlakuan dosis 700 mg/kgBB/hari, sedangkan embrio tahap morula ditemukan pada semua kelompok perlakuan dan kontrol namun persentase paling tinggi terdapat pada dosis 280 mg/kgBB/hari. Embrio tahap pembelahan dan tahap morula seharusnya tidak ditemukan pada saat umur kebuntingan lebih dari 66 jam. Embrio seharusnya berada pada tahap pembelahan ketika usia kebuntingan 21-64 jam, sedangkan tahap morula seharusnya ditemukan pada saat umur kebuntingan 50-70 jam (Rugh,1986). Adanya embrio pada tahap pembelahan dan morula menunjukkan adanya penghambatan perkembangan. Penghambatan perkembangan dapat disebabkan oleh pemberian ekstrak rimpang temu putih.

Pada kontrol ditemukan 13.73% embrio yang perkembangannya terhambat. Hal ini bisa diakibatkan beberapa hal, kemungkinan pertama lamanya waktu penetrasi sperma terhadap embrio berbeda-beda (Rugh, 1986). Kemungkinan lainnya adalah waktu kopulasi pada mencit berbeda-beda, ada yang melakukan kopulasi pada petang hari, tengah malam atau menjelang pagi. Pada perlakuan dosis 280 mg/kgBB/hari jumlah embrio yang terhambat sebanyak 24.56%, sedangkan pada dosis 700 mg/kgBB hari pesentase embrio yang terhambat adalah

22.22%. Pada dosis 700 mg/kgBB/hari, walaupun persentase embrio yang terhambat lebih kecil dibandingkan dengan dosis 280 mg/kgBB/hari, tetapi pada dosis 700 mg/kgBB/hari masih ditemukan embrio yang seharusnya berada pada tahap awal perkembangan embrio, yaitu tahap pembelahan 4 sel dan 8 sel, sedangkan pada dosis 280 mg/kgBB/hari semua embrio yang terhambat berada pada tahap morula. Terhambatnya perkembangan embrio kemungkinan karena rimpang temu putih mengandung *curcumin*. Menurut Chen & Chan (2012), pemberian *curcumin* dengan konsentrasi 40 μ M secara *in vitro* pada embrio praimplantasi dapat menghambat perkembangan embrio mulai tahap zigot hingga blastokista.

Embrio pada tahap blastokista ditemukan pada semua kelompok perlakuan dan kontrol. Persentase embrio tahap blastokista paling tinggi pada kontrol (76.47%), sedangkan persentase paling rendah terdapat pada kelompok perlakuan dosis 700 mg/kgBB/hari (42.59). Menurut Rugh (1968), pada usia kebuntingan lebih dari 66 jam embrio mencit berada pada tahap blastokista, sedangkan menurut Dye (1993), tahap blastokista pada mencit terjadi pada umur kebuntingan 74 jam. Pada saat melakukan pembedahan, umur kebuntingan pada mencit \pm 78 jam sehingga pada kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan ekstrak rimpang persentase embrio yang berkembang dengan normal lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan.

Persentase embrio abnormal meningkat seiring dengan meningkatnya dosis ekstrak rimpang temu putih yang diberikan. Persentase paling tinggi ditemukan pada kelompok perlakuan 700 mg/kgBB/hari (35.19%). Tingginya persentase ini diduga karena semakin tinggi dosis yang diberikan maka semakin tinggi konsentrasi zat aktif yang terkandung di dalamnya. Pada ekstrak rimpang temu putih terdapat beberapa kandungan zat aktif yang dapat menyebabkan penghambatan proliferasi, apoptosis dan menyebabkan nekrosis (Hamdi *et al.*, 2014; Rahman *et al.*, 2013, Chen *et al.* 2010; Chen & Chan, 2012; Murwati, *et al.*, 2006).

Menurut Hamdi (2014), temu putih mengandung *curcumenone* dan *curcumenol*. Pemberian *curcumenone* dan *curcumenol* dengan konsentrasi 12.5 μ g/ml dan 25 μ g/ml secara *in vitro* dapat menyebabkan apoptosis dan nekrosis

pada sel kanker payudara. Penelitian lain yang dilakukan Rahman (2013), menunjukan bahwa temu putih mengandung *curzerenon* dan *alismol*. Pemberian *alismol* dan *curzerenon* dengan dosis 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 40 µg/ml dan 50 µg/ml secara *in vitro* dapat menyebabkan apoptosis dan nekrosis pada sel kanker payudara, sel karsinoma kolon, dan sel karsinoma serviks. Komponen lain dalam temu putih yang dapat menyebabkan antiproliferasi adalah *curcumin*. Penelitian yang dilakukan oleh Kim & Lee (2010) menunjukan bahwa pemberian *curcumin* dengan konsentrasi 20 µM dapat menyebabkan terbentuknya ROS dan menyebabkan *downregulation* ekspresi gen E₂F₄ yang memegang peranan penting dalam pertumbuhan sel kolon. Menurunnya ekspresi gen E₂F₄ akan menyebabkan proliferasi sel terhambat. Menurut Aggarwal *et al.* (2003), pemberian *curcumin* berpengaruh terhadap siklus sel. *Curcumin* dapat menghambat siklus sel pada fase yang berbeda-beda tergantung jenis selnya. Selain itu, *curcumin* juga dapat menghambat proliferasi sel dengan menurunkan *ornithine decarboxylase* (ODC).

Embrio memiliki tingkat pembelahan sel yang tinggi dan memiliki beberapa gen yang aktif seperti halnya pada sel kanker (Oppenheimer & Lefevre, 1989). Hal ini diduga akan menyebabkan embrio ikut terpengaruh oleh zat-zat yang dapat menyebabkan antiproliferasi pada sel kanker. *Curcumin* yang menghambat proliferasi dan menyebabkan apoptosis pada sel kanker kolon (Kim & Lee, 2010) ternyata berpengaruh terhadap perkembangan embrio. Penelitian yang dilakukan oleh Chen & Chan (2012), menunjukan bahwa pemberian *curcumin* dengan konsentrasi 40 µM secara *in vitro* pada embrio tikus dengan dapat menyebabkan kerusakan pada perkembangan awal embrio. *Curcumin* menyebabkan berkurangnya jumlah *Inner Cell Mass* (ICM), namun jumlah sel tropoblas tidak terpengaruh oleh adanya *curcumin*. Selain itu, pemberian *curcumin* menyebabkan terjadinya penghambatan perkembangan embrio mulai dari zigot hingga morula.

Jumlah embrio yang terhambat dan embrio abnormal bertambah seiring dengan bertambahnya dosis yang diberikan diduga karena adanya pemberian ekstrak temu putih. Hal tersebut disebabkan embrio yang sangat sensitif terhadap senyawa teratogen atau senyawa toksik (Pollard *et al.*, 1999 dalam priyandoko 2001). Selain itu, cara kerja temu putih untuk menghambat kanker adalah menciptakan lingkungan yang tidak sesuai untuk perkembangan sel kanker

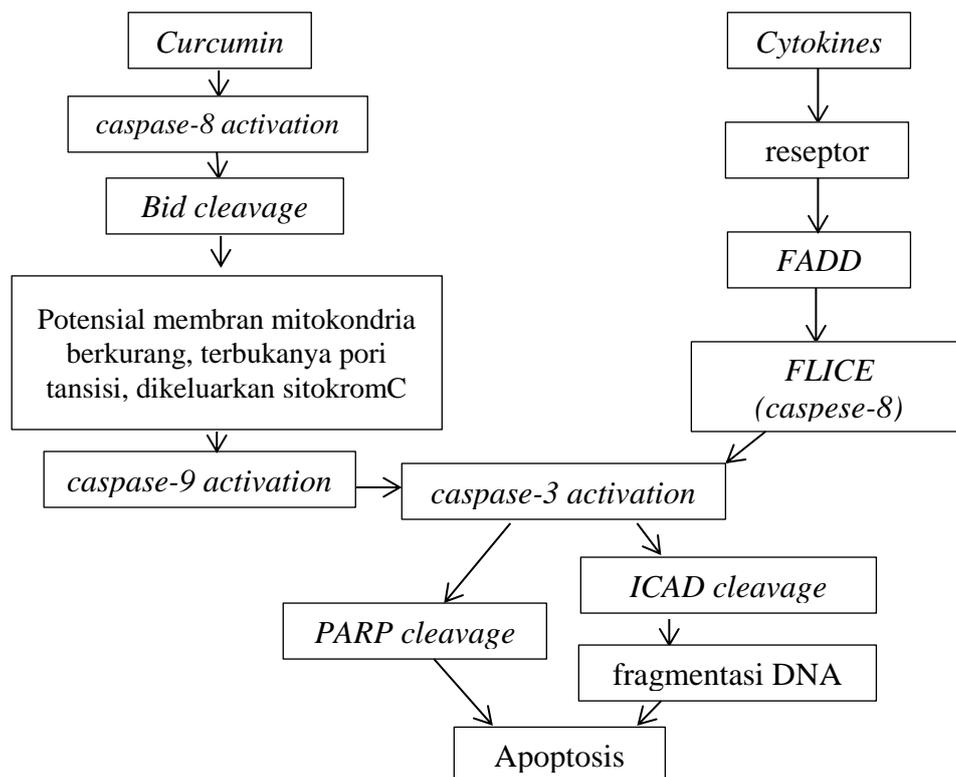
(Mangan, 2003). Embrio yang memiliki karakteristik yang sama dengan sel kanker juga diduga perkembangannya akan ikut terganggu. Selain itu, penelitian yang dilakukan Yadav (2011) menyebutkan bahwa pemberian ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) secara oral kepada tikus dapat menyebabkan perubahan biokimia uterus dan dapat menghambat implantasi embrio.

2. Pengaruh ekstrak rimpang temu putih terhadap terbentuknya embrio abnormal

Berdasarkan perbandingan persentase pada kelompok perlakuan dan kontrol didapatkan bahwa pemberian ekstrak rimpang temu putih dapat meningkatkan persentase embrio abnormal. Embrio abnormal yang ditemukan pada penelitian ini ada 9 macam yaitu zona pelusida tanpa embrio, embrio degenerasi, morula tanpa zona pelusida, morula terfragmentasi, morula dengan bentuk zona pelusida abnormal, blastokista tanpa zona pelusida, blastokista yang memiliki 2, 3 atau 4 *blastocoel*. Zona pelusida tanpa embrio merupakan jenis abnormalitas yang terdapat pada kontrol maupun pada semua kelompok perlakuan. Persentase zona pelusida tanpa embrio paling tinggi ditemukan pada kelompok kontrol (50%). Jenis abnormalitas lain yang ditemukan banyak terjadi adalah morula tanpa zona pelusida yaitu pada kontrol, kelompok perlakuan rimpang temu putih dengan dosis 280 mg/kgBB/hari dan 700 mg/kgBB/hari. Abnormalitas embrio degenerasi ditemukan pada semua kelompok perlakuan, namun tidak ditemukan pada kelompok kontrol.

Abnormalitas embrio degenerasi paling tinggi terjadi pada kelompok perlakuan dengan dosis 700 mg/kgBB/hari (53.33%). Pada embrio degenerasi terlihat adanya blastomer yang pecah. Pecahnya blastomer diduga karena adanya zat yang memicu nekrosis dan apoptosis. Temu putih mengandung *alismol*, *curzerenone*, *curcumenone*, dan *curcumenol* yang dapat menyebabkan apoptosis dan nekrosis (Rahman, 2013; Hamndi, 2014). Peristiwa nekrosis akan mengakibatkan hancur atau matinya sekelompok sel-sel, sedangkan peristiwa apoptosis mengakibatkan hancur atau matinya satu sel (Hardy, 1999). Selain itu, masih terdapat satu komponen lainnya yang dapat menyebabkan apoptosis. *Curcumin* dapat menghambat proliferasi dan memicu apoptosis pada ICM embrio

(Chen & Chan, 2010). Mekanisme apoptosis yang disebabkan oleh *curcumin* ada 2 macam, yaitu melalui hilangnya potensial membran mitokondria atau melalui sintesis protein *cytokines* (Aggarawal, 2003). Pada embrio apoptosis dipicu karena hilangnya potensial membran mitokondria (Chen & Chan, 2012). Menurut Aggarawal (2003), *curcumin* menginduksi *caspase 8-activation* dan *BID cleavage*. Selanjutnya, potensial membran pada mitokondria hilang, terbukanya pori transisi dan dikeluarkannya sitokrom C, *caspase-9 activation*, *caspase 3 activation*. *caspase 3 activation* dapat memicu dikeluarkannya *PARP cleavage* atau *ICAD cleavage*. *PARP cleavage* akan langsung memicu apoptosis, sedangkan *ICAD cleavage* akan memicu fragmentasi DNA yang selanjutnya memicu apoptosis. Berikut bagan alir terjadinya apoptosis



Gambar 4.5 Bagan alir terjadinya apoptosis karena *curcumin*

Persentase Embrio tahap morula tanpa zona pelusida paling tinggi ditemukan pada kontrol (33.33%). Hilangnya zona pelusida pada embrio memang biasa terjadi pada tahap akhir blastokista ketika embrio akan implan ke dalam endometrium uterus (Moore *et al.*, 2013). Zona pelusida luruh akibat adanya perbedaan pH pada uterus dan tuba fallopi. Keadaan pH uterus lebih rendah

(asam) dibandingkan dengan pH tuba fallopi (Rugh, 1968). Menurut Hartshorne (2000), ketebalan zona pelusida pada setiap embrio berbeda-beda. Hal ini diduga penyebab hilangnya zona pelusida di awal perkembangan embrio. Diduga zona pelusida pada beberapa embrio sangat tipis sehingga mudah luruh ketika mencapai uterus. Zona pelusida sudah luruh sepenuhnya ketika embrio belum mencapai tahap blastokista. Selain pada morula, embrio tanpa zona pelusida juga ditemukan pada tahap blasokista. Embrio tahap blastokista akhir memang tidak memiliki zona pelusida, namun blastokista yang tidak memiliki zona pelusida ini berada pada tahap awal perkembangan blastokista yang ditandai dengan *blastocoel* yang sempit. Normalnya embrio tahap blastokista awal masih memiliki zona pelusida. Embrio tahap blastokista tanpa zona pelusida hanya ditemukan pada kelompok kontrol (16.67%). Kejadian ini mungkin sama dengan yang terjadi pada embrio tahap morula yang tidak memiliki zona pelusida dimana embrio memiliki zona pelusida yang tipis. Pada blastokista tanpa zona pelusida mungkin pada awalnya memiliki zona pelusida yang lebih tebal dibandingkan dengan embrio tahap morula tanpa pelusida namun ketebal zona pelusida tidak setebal pada embrio yang normal. Pada blastokista tanpa pelusida, embrio berhasil melewati tahapan morula ketika zona pelusida masih ada, sedangkan pada morula tanpa pelusida, embrio telah kehilangan zona pelusida sebelum berhasil melewati tahapan morula karena zona pelusida yang sangat tipis.

Pada penelitian yang dilakukan, ditemukan adanya blastokista yang mengalami abnormalitas, baik itu abnormalitas pada jumlah *blastocoel* maupun abnormalitas karena tidak adanya zona pelusida. Menurut Hartshorn (2000), blastokista yang memiliki morfologi abnormal belum tentu menghasilkan anak yang cacat. Embrio tahap blastokista yang ditemukan mungkin akan menghasilkan anak yang sempurna.

Pada penelitian yang dilakukan didapatkan embrio tahap morula yang mengalami fragmentasi. Menurut Alkani (2000), peristiwa fragmentasi pada embrio memang kadang terjadi walaupun embrio tersebut berkembang secara *in vivo*, namun embrio yang berkembang secara *in vitro* menunjuk peristiwa fragmentasi yang lebih tinggi. Embrio yang mengalami fragmentasi pada tahap awal perkembangannya masih dapat berkembang menjadi blastokista yang normal

tergantung pada tingkat fragmentasi pada embrio. Embrio yang mengalami fragmentasi masih memiliki kemampuan untuk melakukan implantasi tergantung pada distribusi dan ukuran fragmentasi.

Berdasarkan pernyataan Alkani (2000), yang menyebutkan bahwa embrio terfragmentasi memang terkadang terjadi pada embrio normal maka diduga morula terfragmentasi mungkin saja bukan karena pengaruh dari perlakuan. Hal ini karena fragmentasi pada embrio hanya terjadi pada dosis 140 mg/kgBB/hari. Apabila peristiwa fragmentasi memang terjadi karena perlakuan yang diberikan, seharusnya pada dosis yang lebih tinggi persentase embrio fragmentasi meningkat, namun justru pada kelompok perlakuan dosis 280 mg/kgBB/hari dan 700 mg/kgBB/hari tidak ditemukan embrio fragmentasi.

Pada embrio abnormal yang terlihat adanya zona pelusida namun tidak ditemukan zona adanya blastomer masih belum diketahui secara pasti penyebabnya, namun diduga proses fertilisasi pada embrio ini terganggu atau pada proses awal perkembangan embrio ketika tahap zigot yang terganggu. menurut Chen (2012), *curcumin* dapat menyebabkan penghambatan perkembangan dari mulai zigot hingga blastokista.

3. Pengaruh ekstrak rimpang temu putih terhadap diameter blastokista.

Pada perlakuan dosis 700 mg/kgBB/hari diameter blastokista (horizontal 0.08, vertikal 0.08) berbeda dengan blastokista kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang lain. Berdasarkan uji statistik pada ukuran embrio tahap blastokista tidak terjadi pengaruh oleh perlakuan ekstrak rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*). Pada saat embrio tahap blastokista menggelinding menuruni uterus, ukuran blastokista mengembang karena ukuran *blastocoel* yang bertambah (Gilbert, 1991). Ukuran blastokista pada perlakuan 700 mg/kgBB/hari lebih kecil diduga karena perkembangan embrio yang terganggu maka penambahan ukuran blastokista ikut terhambat. Menurut Rugh (1968), diameter embrio tahap blastokista adalah 90 mikron (0.09 mm). Hal tersebut menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dosis 140 mg/kgBB/hari, tidak terpengaruh oleh pemberian ekstrak rimpang temu putih, sedangkan pada perlakuan dosis 280 mg/kgBB/hari hanya berbeda memiliki bentuk yang tidak

bulat. Bentuk embrio tahap blastokista adalah elips dengan diameter horizontal 0.08 dan diameter vertikal 0.09. Hal tersebut menandakan adanya sedikit gangguan pada perkembangan embrio tahap blastokista. Menurut Cean *et al.* (2011), ukuran pada embrio dapat dijadikan viabilitas dari embrio. Pada embrio tikus tahap blastokista yang memiliki ukuran 120.8 ± 6.1 memiliki viabilitas lebih baik dibandingkan dengan blastokista yang memiliki ukuran 111.7 ± 7.9 . Berkurangnya ukuran diameter pada blastokista mencit yang diberi perlakuan 700 mg/kgBB/hari menunjukkan bahwa viabilitas embrio yang terbentuk menjadi berkurang.