

EFEK TERATOGENIK EKSTRAK CIPLUKAN (*PHYSALIS MINIMA* LINN.) TERHADAP FETUS MENCIT (*MUS MUSCULUS*) GALUR SUB SWISS WEBSTER

Tuwuh Purnomo, Lucia Maria Santoso, Riyanto

Universitas Sriwijaya

Email: riyanto1970@yahoo.com

Abstract: A study concerning the teratogenic effect of *Physalis minima* Linn. on fetal mice (*Mus musculus*). Experiment with completely randomized design consisting 4 treatments and 5 replaysments was applied. The treatments consisted control, P1 dose (1,4 mg/0,1 ml Tween 20/10 g weight), P2 dose (2,8 mg/0,1 ml Tween 20/10 g weight), and P3 dose (5,6 mg/0,1 ml Tween 20/10 g weight). *Physalis minima* Linn. extract solution was given by gavage on gestation day at the 9th until 17th. Day 18th treatment, the mice were weighed, was kelled by neck dislocation, and then preparations fetal skeleton was made. Data were analyzed by Anova and Duncen test. Extract of *Physalis minima* Linn. lead to decrease fetal weight and delayed supraoccipital, cervical vertebrae bodies, sakrokaudal vertebrae arches, sternebrae, and posterior intermediet phalanges ossification. It can be concluded that *Physalis minima* Linn. extract have teratogenic effect on mice fetal.

Key words : mice fetal, *Physalis minima* Linn., teratogenic effect

Abstrak: Telah dilakukan penelitian tentang efek teratogenik daun ciplukan (*Physalis minima* Linn.) terhadap fetus mencit (*Mus musculus*) dengan tujuan untuk mengetahui hubungan pemberian ekstrak daun ciplukan dengan potensi teratogenik daun ciplukan terhadap fetus mencit. Metode yang digunakan adalah metode eksperimen dengan rancangan acak lengkap terdiri dari 4 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuan terdiri dari kontrol, dosis P1 (1,4 mg/0,1 ml Tween 20/10 gBB), P2 (2,8 mg/0,1 ml Tween 20/10 gBB), dan P3 (5,6 mg/0,1 ml Tween 20/10 gBB). Larutan ekstrak daun ciplukan diberikan secara gavage pada hari kehamilan ke-9 hingga ke-17. Hari ke-18 perlakuan, mencit ditimbang berat badannya, dimatikan dengan cara dislokasi leher, dan diambil fetusnya kemudian dibuat preparat skeleton fetus. Data dianalisis dengan perhitungan anava dan uji BJND. Ekstrak daun ciplukan menyebabkan penurunan berat badan fetus, panjang badan fetus, dan keterlambatan osifikasi tulang supraoksipital, badan vertebra servikalis, lengkung vertebra sakrokaudalis, sternum, dan falang intermediet posterior. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak ciplukan memiliki efek teratogenik terhadap fetus mencit.

Kata kunci : fetus mencit, ciplukan, teratogenik

PENDAHULUAN

Ciplukan (*Physalis minima* Linn.) merupakan herba musiman yang memiliki tinggi 0,5 hingga 1,5 meter, aun ciplukan berbentuk bulat telur dengan ujungnya yang meruncing, tepi berombak dengan panjang daun antara 5-15 cm dan lebar 2-10 cm. Ciplukan

dapat hidup di dataran rendah hingga dataran dengan ketinggian sekitar 1.650 m dari permukaan laut, memiliki suhu lingkungan berkisar 15-30° C dengan curah hujan hampir merata dan tanah cukup basah, gembur, dan tidak tergenang air (Parmar dan Kausal, 1982). Ciplukan dikenal di Indonesia dengan berbagai

nama, diantaranya Ceplukan, Cecendet, Keceplokan, dan Leletokan. Buah ciplukan berwarna kekuningan jika matang dan dapat dimakan. Ciplukan digunakan sebagai obat tradisional untuk menurunkan demam, patah tulang, nyeri perut, dan epilepsi (Santoso, 2008).

Ciplukan mengandung berbagai senyawa hasil metabolit sekunder. Uji fitokimia menunjukkan ciplukan mengandung alkaloid, flavonoid, fenol, quinon, saponin, steroid, tanin, terpenoid (Nathiya dan Dorcus, 2011), withanone, withaferin A, withanolide A, stigmasterol, β -sitosterol, pigrin (Misra, dkk., 2006), dan fisalin (Azlan, dkk., 2005). Kandungan kimia ciplukan telah terbukti memiliki potensi untuk mengatasi berbagai penyakit. Ciplukan berpotensi sebagai anti bakteri (Patel, dkk., 2011), anti-inflamasi (Khan, dkk., 2009), diuretik (Tammu, dkk., 2012), anti-diabetes (Sucharitha dan Estari, 2013), antileishmanial (Choudhary, dkk., 2005), dan efek sitotoksik pada sel tumor (Leong, dkk., 2009). Selain itu, kandungan fisalin dan withanolide mampu menghambat pertumbuhan sel kanker usus besar, payudara, dan lambung (Fauzi, dkk., 2011). Hampir semua tanaman yang berpotensi antikanker adalah teratogen. Mekanisme ciplukan dalam menghambat pertumbuhan sel kanker adalah memicu terjadinya apoptosis sel dan menghambat proliferasi sel (Wu, dkk., 2012). Apoptosis merupakan kematian sel secara terprogram. Apoptosis sel yang berlebihan dapat menurunkan fungsi suatu organ (Sudiana, 2008). Penghambatan proliferasi merupakan salah satu jalur teratogenik yang dapat menghentikan pertumbuhan organ pada fetus sehingga dapat menyebabkan kecacatan lahir. Saponin memiliki sifat antara lain mempunyai rasa pahit, dalam larutan air membentuk busa yang stabil, menghemolisis eritrosit, dan

merupakan racun kuat untuk ikan dan amfibi. Saponin juga dapat menahan siklus sel pada fase G1, sehingga tidak dapat berlanjut ke fase S, G2, dan fase M. Saponin yang terdapat pada kulit buah mahkota dewa telah terbukti menyebabkan berbagai malformasi struktur pada fetus mencit berupa hemoragi, punggung fleksi, cacat bentuk tubuh, dan gangguan osifikasi (Widyastuti, dkk., 2006). Alkaloid yang terdapat pada biji petai cina yang telah terbukti menurunkan persentase hidup, berat dan panjang fetus (Syamsudin, dkk., 2006), sedangkan Alkaloid pada kulit batang pule telah menyebabkan keguguran dan hidrocephalus pada fetus tikus (Kumolosasi, dkk., 2004). Selain itu penelitian yang dilakukan Wahyudi (2012) menunjukkan bahwa ekstrak daun keji beling yang memiliki kandungan kimia Stigmasterol, β -sitosterol, alkaloid, flavonoid, dan tannin telah terbukti memperlambat penulangan fetus mencit. Penggunaan tanaman sebagai obat harus memenuhi persyaratan aman, bermanfaat dan sudah terstandar. Untuk memenuhi persyaratan tersebut perlu dilakukan upaya penegakan keamanan melalui uji toksisitas. Uji toksisitas digunakan untuk menentukan dosis maksimum ciplukan yang boleh digunakan sebagai obat herbal. Salah satu uji toksisitas yang harus dilakukan adalah uji teratogenik. Berdasarkan uraian di atas perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah pemberian ekstrak ciplukan memiliki efek teratogenik terhadap fetus mencit dan apa saja jenis malformasi struktur fetus mencit yang dipengaruhi oleh ekstrak ciplukan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek teratogenik ciplukan terhadap fetus mencit, jenis-jenis malformasi struktur fetus mencit, dan untuk mengetahui dosis minimum yang dapat menimbulkan malformasi struktur fetus mencit. Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini

dapat dijadikan bahan pertimbangan dalam pengembangan ciplukan sebagai obat alternatif.

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Sriwijaya dan Kebun botani FKIP Universitas Sriwijaya Indralaya. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2014 – Oktober 2014.

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah botol besar untuk merendam tanaman ciplukan, *rotary evaporator* RE 300, blender, kertas saring, gelas ukur, gelas kimia, kandang pemeliharaan mencit, jarum *gavage*, mikroskop binokuler, pipet tetes, kaca preparat, kaca penutup, alat bedah, mikroskop stereo, timbangan digital dan kamera. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ciplukan, metanol, Tween 20, akuades, alkohol 95%, zat warna *Alizarin Red S* 0,01%, KOH, gliserin, mencit galur Sub Swiss Webster yang berumur 8 minggu dengan berat antara 28-34 gram. Pakan mencit yang digunakan adalah pelet ikan merek Grobest No.5. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) terdiri dari 5 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuan terdiri dari 2 kontrol dan 3 tingkatan dosis. Kontrol tersebut adalah kontrol negatif (0 mg/0,1 ml Aquadest/10 g BB) dan kontrol positif (0 mg/0,1 Tween 20/ 10 g BB). Tingkatan dosis tersebut adalah P1 (1,4 mg/0,1 ml Aquadest/10 g BB); P2 (2,8 mg/0,1 ml Aquadest/10 g BB); P3 (5,6 mg/0,1 ml Aquadest/10 g BB).

Cara Kerja

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur Sub Swiss Webster. Mencit di aklimatisasi selama 7 hari di kandang pemeliharaan sebelum diberi perlakuan serta

diberi makan dan minum secara teratur. Kandang pemeliharaan berupa kotak plastik dengan penutup kawat kasa. Mencit menerima cahaya lampu listrik selama pukul 06.00-18.00 WIB dan tidak menerima cahaya lampu listrik selama pukul 18.00-06.00 WIB. Mencit hanya akan melakukan kopulasi pada fase estrus. Fase estrus mencit ditentukan dengan pengamatan terhadap apusan vagina dengan cara *lavage*. Jika pada apusan vagina terdapat sel epitel yang menanduk dalam jumlah yang banyak, maka mencit dalam fase estrus (Pang, dkk., 2014). Mencit betina dan mencit jantan disatukan dalam satu kandang pemeliharaan selama 1 malam. Setiap kandang berisi 1 ekor mencit jantan dan 1 mencit betina. Penyatuan dilakukan pada pukul 18.00 WIB. Kopulasi akan sukses jika terdapat sumbat vagina pada mencit vagina. Pengamatan sumbat vagina dilakukan pada pukul 06.00 WIB. Jika pada mencit betina terdapat sumbat vagina, maka dihitung sebagai hari kehamilan ke-0.

Pembuatan Ekstrak Daun Ciplukan

Daun ciplukan yang digunakan diambil di daerah Indralaya. Daun yang telah diambil di cuci bersih kemudian dikeringanginkan hingga memiliki berat yang stabil. Daun kering tersebut diambil 500 gram kemudian diblender dan direndam menggunakan metanol selama 3 hari. Kemudian ekstrak tersebut disaring menggunakan kertas saring. Hasil saringan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Hasil ekstraksi yang sudah dipekatkan dianginkan sehingga dihasilkan ekstrak metanol daun ciplukan 100%. Hasil ekstraksi diencerkan menjadi beberapa dosis dengan menambahkan pelarut Tween 20 untuk membuat larutan yang homogen.

Larutan dibuat dengan cara mengambil ekstrak sesuai dengan dosis yang ditentukan lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia, kemudian

dituangkan pelarut Tween 20 sambil diaduk sampai kelarutannya homogen.

Tabel 1. Ekstrak Daun Ciplukan yang diperlukan untuk Membuat Larutan sebanyak 100 ml

| Dosis | Ekstrak Ciplukan yang Diperlukan |
|--------|--|
| 1,4 mg | $1,4 \text{ mg} \times 1000 = 1400 \text{ mg} = 1,4 \text{ g}$ |
| 2,8 mg | $2,8 \text{ mg} \times 1000 = 2800 \text{ mg} = 2,8 \text{ g}$ |
| 5,6 mg | $5,6 \text{ mg} \times 1000 = 5600 \text{ mg} = 5,6 \text{ g}$ |

Penyediaan larutan sesuai dosis (Larutan Dosis) yang diperlukan dibuat dengan rumus sebagai berikut, Larutan Dosis = $0,1 \text{ ml Aquades} \times \text{Perbesaran (N)}$ (Hayati dikutip Nadifah, 2007). Ekstrak dibuat ke dalam larutan 100 ml sehingga perbesarannya adalah $0,1 \text{ ml Aquades} \times N = 100$. $N = 1000$ kali. Jumlah ekstrak yang diperlukan dituangkan ke dalam gelas kimia lalu dilarutkan Tween 20 sebanyak 0,5%. Kemudian dituangkan aquades hingga volumenya mencapai 100 ml, dan diaduk hingga kelarutannya homogen. Ekstrak metanol ciplukan diberikan secara *gavage* menggunakan jarum oral pada hari kehamilan ke-9 sampai ke-17. Volume *gavage* yaitu sebanyak 0,1 ml/10 g BB sesuai dosis yang ditentukan. Misalnya berat badan mencit 28 gram, maka volume *gavage* yang dibutuhkan adalah sebanyak 0,28 ml.

Pengamatan

Mencit dibedah pada hari kehamilan ke-18 untuk diambil fetusnya. Sebelum dibedah mencit ditimbang untuk mengetahui berat akhir. Mencit dibunuh dengan cara dislokasi leher. Pemeriksaan fetus mencit setelah pembedahan meliputi: berat badan fetus, panjang fetus, jumlah fetus hidup, jumlah fetus mati, jumlah implantasi, jumlah embrio yang diresorpsi, kelainan eksternal fetus, dan kelainan rangka fetus.

Pembuatan Preparat Skeleton Fetus

Menurut Conn, dkk., (2013) pembuatan preparat skeleton fetus mencit melalui proses sebagai berikut.

1. Fetus dieviserasi kemudian difiksasi dalam alkohol 95% selama 7 hari.
2. Spesimen direndam dalam larutan KOH 1% selama 24 jam sampai otonya tampak jernih.
3. Spesimen direndam dalam larutan pewarna *Alizarin Red S* 0,01% dalam KOH 1% selama 24 jam sampai rangkanya tampak berwarna merah.
4. Setelah rangka tampak merah, spesimen dijernihkan dalam KOH dan gliserin dengan perbandingan KOH 1% : gliserin (3:1); KOH 1% : gliserin (1:1); KOH 1% : gliserin (1:3); masing-masing selama 24 jam.
5. Selanjutnya spesimen disimpan dalam larutan gliserin murni dan siap untuk diamati.

Pengamatan preparat skeleton fetus mencit dilakukan dibawah mikroskop stereo, dan didokumentasikan.

Analisa Data

Data kuantitatif (berat badan induk, berat badan fetus, jumlah fetus hidup, jumlah fetus mati, jumlah implantasi, jumlah embrio yang diresorpsi, dan kelainan eksternal) yang diperoleh dianalisis dengan Analisis Varian (ANOVA). Jika hasil anava menunjukkan hasil yang berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan uji Beda Jarak Nyata Duncan (BJND).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pengamatan Penampilan Reproduksi Mencit

Pengamatan yang dilakukan adalah penambahan berat badan induk, berat badan fetus, panjang badan fetus, jumlah fetus hidup, jumlah fetus mati, dan resorpsi. Hasil rata-rata

penampilan reproduksi mencit dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata Pengamatan Penampilan Reproduksi Mencit

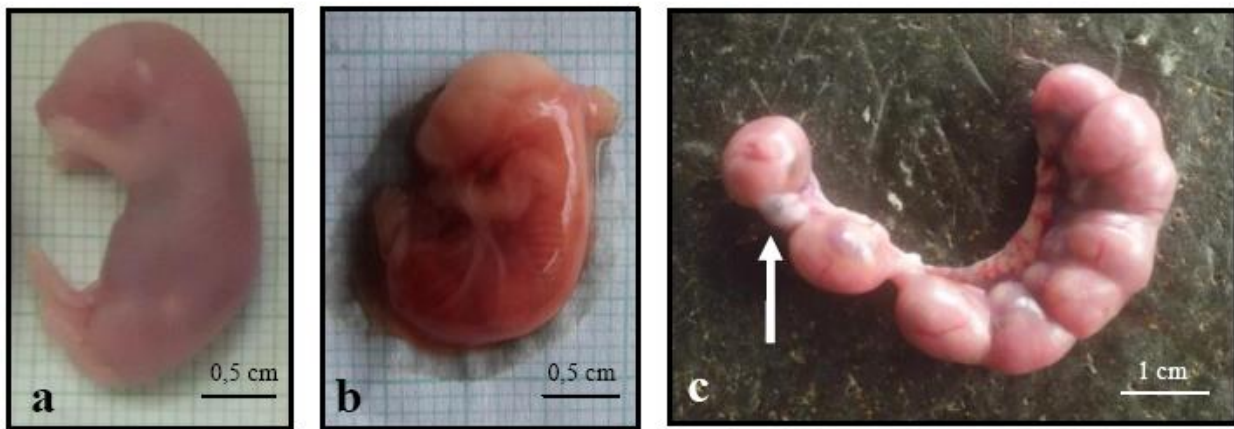
| Dosis (mg) | Pertambahan Berat Badan Induk (g) | Jumlah Implantasi | Berat Badan Fetus (g) | Panjang Badan Fetus (cm) | Fetus Hidup | Fetus Mati | Resorpsi |
|------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|
| P0 (0) | 23,81 ±3,15 | 12,2±0,44 | 1,51±0,07** | 2,37 ±0,1** | 11,4±1,94 | 0,2 ±0,44** | 0,6 ±1,34* |
| P1(1,4) | 23,44 ±5,78 | 12,4±2,7 | 1,27 ±0,21 | 2,21 ±0,16 | 11,2±2,04 | 0,2 ±0,44** | 1 ±,070 |
| P2(2,8) | 25,62 ±2,66** | 14,6±2,07** | 1,22 ±0,15 | 2,14 ±0,16 | 12,2±2,86** | 0 ±0,00* | 2,4 ±1,67** |
| P3(5,6) | 19,56 ±2,81* | 10,2±2,94* | 1,16 ±0,26* | 1,72 ±0,44* | 9,6±2,5* | 0,2 ±0,44** | 0,6 ±0,89* |

Ket: - $\bar{X} \pm SD$ (Rata-rata ± Standar Deviasi)
 - * = Rata-rata Terendah; ** Rata-rata Tertinggi

Berdasarkan Tabel 2 rata-rata jumlah implantasi mengalami kenaikan pada dosis P1 dibandingkan dosis kontrol. Jumlah implantasi tertinggi terdapat pada dosis P2 yaitu sebanyak 73 individu, sedangkan jumlah implantasi terendah terdapat pada dosis P3 yaitu sebanyak 51 individu. Berdasarkan uji anava, F hitung menunjukkan nilai yang berbeda tidak nyata ($\alpha < 5\%$). Rata-rata jumlah fetus hidup mengalami penurunan pada dosis P1 dibandingkan dengan dosis kontrol. Rata-rata tertinggi jumlah fetus hidup terdapat pada dosis P2, sedangkan rata-rata terendah terdapat pada dosis P3. Berdasarkan uji anava yang dilakukan, F hitung menunjukkan nilai yang berbeda tidak nyata ($\alpha < 5\%$). Rata-rata jumlah fetus mati

memiliki nilai yang sama pada dosis kontrol, dosis P1, dan dosis P3, sedangkan pada dosis P2 tidak terdapat fetus mati. Jumlah fetus mati pada dosis kontrol, dosis P1, dan dosis P3 adalah satu ekor. Berdasarkan uji anava yang dilakukan, F hitung menunjukkan nilai yang berbeda tidak nyata ($\alpha < 5\%$).

Rata-rata jumlah resorpsi mengalami kenaikan pada dosis P1 dibandingkan dosis kontrol. Jumlah resorpsi kembali mengalami kenaikan pada dosis P2 namun mengalami penurunan pada dosis P3. Resorpsi terbanyak terdapat pada dosis P2 yaitu 12 embrio. Berdasarkan hasil uji anava yang dilakukan, F Hitung menunjukkan nilai yang berbeda tidak nyata ($\alpha < 5\%$).



Gambar 1. a) Fetus Normal (P0); b) Fetus Mati (P1); c) Resorpsi (P2).

Rata-rata penambahan berat badan induk mengalami penurunan pada dosis P1 dibandingkan dosis kontrol, dan mengalami

kenaikan pada dosis P2. Penambahan berat badan induk tertinggi terdapat pada dosis P2 dan penambahan berat badan induk terendah

terdapat pada dosis P3. Hasil uji anava, F hitung penambahan berat badan induk memiliki nilai yang berbeda tidak nyata ($\alpha < 5\%$).

Rata-rata berat badan fetus mengalami penurunan pada dosis P1 dibandingkan dosis kontrol. Berat badan fetus kembali mengalami penurunan pada dosis P2 dan dosis P3. Berat badan fetus tertinggi terdapat pada dosis kontrol dan berat badan fetus terendah terdapat pada dosis P3. Berdasarkan hasil uji anava menunjukkan nilai yang berbeda nyata ($\alpha < 5\%$). Hal ini bermakna bahwa ekstrak ciplukan mampu menyebabkan penurunan berat badan fetus.

Rata-rata panjang badan fetus mencit mengalami penurunan pada dosis P1

dibandingkan dosis kontrol. Rata-rata panjang badan fetus kembali mengalami penurunan pada dosis P2 dan panjang badan fetus terendah terdapat pada dosis P3. Berdasarkan hasil uji anava, F Hitung rata-rata panjang badan fetus memiliki nilai yang berbeda sangat nyata ($\alpha > 1\%$). Hal ini bermakna bahwa ekstrak ciplukan mampu menyebabkan penurunan panjang badan fetus.

Hasil Pengamatan Keterlambatan Osifikasi Tulang Fetus

Hasil pengamatan keterlambatan osifikasi tulang fetus mencit dapat dilihat pada Tabel 3 dan Tabel 4.

Tabel 3. Rata-rata Keterlambatan Osifikasi Tulang Supraoksipital, Badan Vertebra Servikalis, Badan Vertebra Sakrokaudalis, Lengkung Vertebra Sakrokaudalis, dan Sternum

| Dosis (mg) | Supra-oksipital | Inter-parietal | Badan Vertebra Servikalis | Badan Vertebra Sakrokaudalis | Lengkung Vertebra Sakrokaudalis | Sternum |
|------------|-----------------|----------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------|
| P0 (0) | 0,02±0,04* | 0±0* | 0,01±0,02* | 0,93 ±0,71* | 0,26±0,19* | 0,03±0,04* |
| P1(1,4) | 0,19±0,12 | 0,05±0,1** | 0,23±0,44 | 1,98±1,32 | 0,55±0,44 | 0,16±0,07 |
| P2(2,8) | 0,4±0,15 | 0±0* | 0,37±0,38 | 2,48±1,43 | 0,51±0,33 | 0,27±0,11 |
| P3(5,6) | 0,74±0,17** | 0,02±0,04 | 0,68±0,2** | 2,51±1,23** | 0,94±0,23** | 0,38±0,13** |

Ket: - $\bar{X} \pm SD$ (Rata-rata ± Standar Deviasi) ;
 - *= Rata-rata Terendah; ** Rata-rata Tertinggi

Tabel 4. Rata-rata Keterlambatan Osifikasi Tulang Anggota Gerak depan dan Anggota Gerak Belakang

| Dosis (mg) | Falang Proksimal Anterior | Falang Intermediet Anterior | Falang Distal Anterior | Falang Proksimal Posterior | Falang Intermediet Posterior | Falang Distal Posterior |
|------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------|
| P0 (0) | 0±0* | 0,04 ±0,7* | 0±0* | 0±0* | 0,15 ±0,29* | 0±0* |
| P1(1,4) | 0,2±0,45 | 0,37±0,36 | 0,2±0,45 | 0,19±0,39 | 0,5±0,32 | 0,2±0,45 |
| P2(2,8) | 0,22±0,44** | 0,44±0,33 | 0,23±0,43** | 0,31±0,38 | 0,86±0,16** | 0,21±0,44 |
| P3(5,6) | 0,2±0,23 | 0,6±0,35** | 0,15±0,19 | 0,4±0,29** | 0,85±0,21 | 0,28±0,35** |

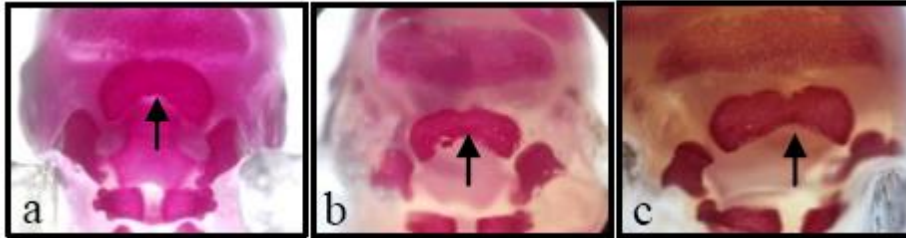
Ket: - $\bar{X} \pm SD$ (Rata-rata ± Standar Deviasi)
 - *= Rata-rata Terendah; ** Rata-rata Tertinggi

Berdasarkan Tabel 3 rata-rata tulang supraoksipital yang mengalami keterlambatan

osifikasi meningkat pada dosis P1 dibandingkan dosis kontrol, selanjutnya

kembali meningkat pada dosis P2 dan P3. F Hitung memiliki nilai yang berbeda sangat nyata ($\alpha > 1\%$). Hal ini bermakna bahwa

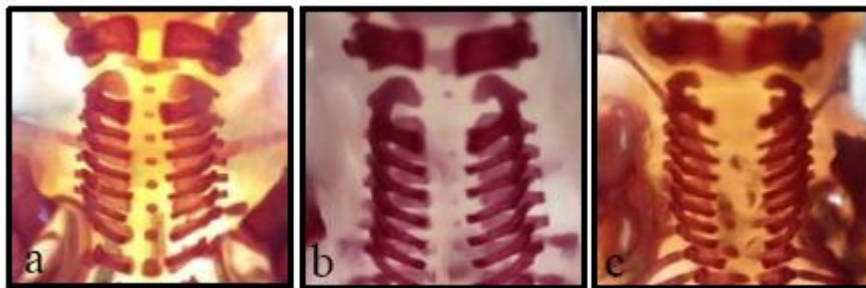
ekstrak ciplukan mampu menyebabkan keterlambatan osifikasi tulang supraoksipital.



Gambar 2.a) Tulang supraoksipital yang osifikasi sempurna; b) dan c) Tulang supraoksipital yang mengalami keterlambatan osifikasi.

Rata-rata tulang interparietal yang mengalami keterlambatan osifikasi meningkat pada dosis P1 dibandingkan dosis kontrol, namun kembali mengalami penurunan pada dosis P2. F Hitung rata-rata tulang interparietal memiliki nilai yang berbeda tidak nyata ($\alpha < 5\%$). Hal ini bermakna bahwa ekstrak ciplukan tidak menyebabkan keterlambatan osifikasi pada tulang interparietal.

Rata-rata tulang badan vertebra servikalis yang mengalami keterlambatan osifikasi meningkat pada dosis P1 dibandingkan dosis kontrol, dan kembali mengalami peningkatan pada dosis P2 dan dosis P3. F Hitung memiliki nilai yang berbeda sangat nyata ($\alpha > 1\%$). Hal ini bermakna bahwa ekstrak ciplukan mampu menyebabkan keterlambatan osifikasi pada tulang badan vertebra servikalis.



Gambar 3.a) Tulang badan vertebra servikalis yang osifikasi sempurna; b) dan c) Keterlambatan osifikasi pada tulang badan vertebra servikalis.

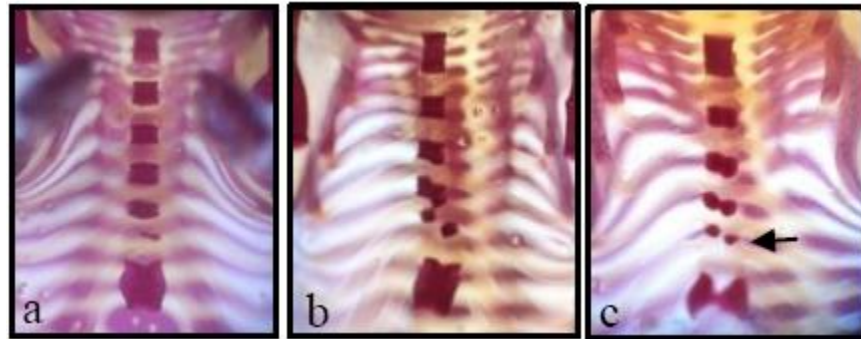
Rata-rata tulang badan vertebra sakrokaudalis yang mengalami keterlambatan osifikasi meningkat pada dosis P1 dibandingkan dengan dosis kontrol. F Hitung memiliki nilai yang berbeda tidak nyata ($\alpha < 5\%$). Hal ini bermakna bahwa ekstrak ciplukan tidak menyebabkan keterlambatan osifikasi tulang badan vertebra sakrokaudalis.

Rata-rata tulang lengkung vertebra sakrokaudalis yang mengalami keterlambatan osifikasi meningkat pada dosis P1 dibandingkan dengan dosis kontrol. Namun kembali mengalami penurunan pada dosis P2 dan rata-rata tertinggi tulang lengkung vertebra sakrokaudalis yang mengalami keterlambatan osifikasi terdapat pada dosis P3. F Hitung memiliki nilai yang berbeda nyata ($\alpha > 5\%$).

Hal ini bermakna bahwa ekstrak ciplukan mampu menyebabkan keterlambatan osifikasi pada tulang lengkung vertebra sakrokaudalis.

Rata-rata tulang sternum yang mengalami keterlambatan osifikasi meningkat pada dosis P1 dibandingkan dosis kontrol, dan

kembali meningkat pada dosis P2 dan dosis P3. F Hitung memiliki nilai yang berbeda sangat nyata ($\alpha > 1\%$). Hal ini bermakna bahwa ekstrak ciplukan mampu menyebabkan keterlambatan osifikasi tulang sternum.



Gambar 4.a) Tulang falang sternum yang osifikasi sempurna; b) dan c) Tulang sternum yang mengalami keterlambatan osifikasi.

Berdasarkan Tabel 4 rata-rata tulang falang proksimal yang mengalami keterlambatan osifikasi meningkat pada dosis P1 dibandingkan dengan dosis kontrol. Rata-rata tulang falang proksimal kembali mengalami

peningkatan pada dosis P2. F Hitung memiliki nilai yang berbeda tidak nyata ($\alpha < 5\%$). Hal ini bermakna bahwa ekstrak ciplukan tidak menyebabkan keterlambatan osifikasi pada tulang falang proksimal anterior.



Gambar 5.a) Tulang falang proksimal dan intermediet anggota gerak depan yang osifikasi sempurna (P0); b) dan c) Tulang falang proksimal dan intermediet anggota gerak depan yang mengalami keterlambatan osifikasi.

Rata-rata tulang falang intermediet yang mengalami keterlambatan osifikasi meningkat pada dosis P1 dibandingkan dengan dosis kontrol. F Hitung memiliki nilai yang berbeda tidak nyata ($\alpha < 5\%$). Hal ini bermakna bahwa ekstrak ciplukan tidak

menyebabkan keterlambatan osifikasi pada tulang falang intermediet anterior.

Rata-rata tulang falang distal anggota gerak depan yang mengalami keterlambatan osifikasi meningkat pada dosis P1 dibandingkan dosis kontrol, dan kembali meningkat pada dosis P2. F Hitung memiliki

nilai yang berbeda tidak nyata ($a < 5\%$). Hal ini bermakna bahwa ekstrak ciplukan tidak menyebabkan keterlambatan osifikasi pada tulang falang distal anterior.

Rata-rata tulang falang proksimal anggota gerak belakang yang mengalami keterlambatan osifikasi meningkat pada dosis P1 dibandingkan dosis kontrol. Rata-rata



Gambar 6.a) Tulang falang proksimal dan intermediet anggota gerak belakang yang osifikasi sempurna (P0); b) dan c) Tulang falang proksimal dan intermediet anggota gerak belakang yang mengalami keterlambatan osifikasi.

Rata-rata tulang falang intermediet anggota gerak belakang yang mengalami keterlambatan osifikasi meningkat pada dosis P1 jika dibandingkan dengan dosis kontrol. Rata-rata tulang falang intermediet yang mengalami keterlambatan osifikasi kembali meningkat pada dosis P2, namun mengalami penurunan pada dosis P3 jika dibandingkan dengan dosis P2. F Hitung memiliki nilai yang berbeda sangat nyata ($a > 1\%$). Hal ini bermakna bahwa ekstrak ciplukan mampu menyebabkan keterlambatan osifikasi pada tulang falang intermediet posterior.

Rata-rata tulang distal anggota gerak belakang yang mengalami keterlambatan osifikasi meningkat pada dosis P1 jika dibandingkan dengan dosis kontrol. Rata-rata terendah terdapat pada dosis kontrol, sedangkan rata-rata tertinggi terdapat pada dosis P3. F Hitung memiliki nilai yang berbeda tidak nyata ($a < 5\%$). Hal ini bermakna bahwa ekstrak ciplukan tidak menyebabkan

tulang falang proksimal yang mengalami keterlambatan osifikasi kembali meningkat pada dosis P2 dan dosis P3. F Hitung memiliki nilai yang berbeda tidak nyata ($a < 5\%$). Hal ini bermakna bahwa ekstrak ciplukan tidak menyebabkan keterlambatan osifikasi pada tulang falang proksimal posterior.

keterlambatan osifikasi pada tulang falang distal posterior.

PEMBAHASAN

Penampilan Reproduksi Mencit

Implantasi merupakan proses penetrasi embrio ke dinding uterus (Gilbert, 2010). Setelah implantasi embrio mendapatkan nutrisi untuk perkembangannya dari induk. Nutrisi tersebut diterima embrio melalui plasenta yang berkembang dari tropoblas. Sedangkan sel massa dalam akan berkembang, berdiferensiasi dan setelah proses organogenesis akan menjadi fetus. Jumlah implantasi pada setiap mencit dipengaruhi oleh jumlah oosit yang dilepaskan oleh ovarium, jumlah oosit yang dibuahi oleh sel sperma, kesiapan blastosis melakukan penetrasi, dan kesiapan dinding uterus menerima blastosis. Implantasi terjadi pada hari kehamilan ke- 4,5 setelah fertilisasi (Rugh, 1967). Pemberian ekstrak ciplukan tidak berpengaruh terhadap jumlah implantasi karena diberikan pada hari kehamilan ke-9.

Fetus hidup adalah fetus yang memiliki struktur morfologi organ yang baik dan merespon rangsangan sentuhan (Taylor, 1986). Uji anava pada rata-rata jumlah fetus hidup menunjukkan nilai berbeda tidak nyata. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak ciplukan tidak berpengaruh terhadap jumlah fetus hidup. Fetus mati adalah fetus yang memiliki struktur organ yang baik, panjang tubuh dapat diukur tetapi tidak merespon rangsangan sentuhan (Taylor, 1986). Uji anava pada rata-rata jumlah fetus mati menunjukkan nilai berbeda tidak nyata. Hal ini menunjukkan bahwa kematian fetus tidak dipengaruhi oleh ekstrak ciplukan. Kematian fetus yang terjadi disebabkan oleh faktor internal, yaitu faktor genetik. Kelainan genetik menyebabkan terhambatnya perkembangan fetus sehingga fetus mati.

Resorpsi merupakan proses penyerapan kembali embrio yang berhenti berkembang dan kemudian mati oleh makrofag pada masa kehamilan setelah implantasi. Resorpsi ditandai dengan adanya plasenta dan sisa-sisa embrio (Taylor, 1986). Pengukuran panjang badan pada embrio yang diresorpsi tidak dapat dilakukan karena kematiannya terjadi sebelum organogenesis selesai. Sehingga organ-organ tubuh belum terbentuk dengan sempurna. Berdasarkan uji anava, F hitung memiliki nilai yang berbeda tidak nyata. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak ciplukan tidak berpengaruh terhadap jumlah resorpsi embrio. Resorpsi disebabkan oleh dua faktor, yaitu faktor eksternal dan faktor internal. Faktor eksternal disebabkan oleh masuknya benda asing ke embrio yang sedang berkembang, sedangkan faktor internal merupakan resorpsi spontan.

Penambahan berat badan induk dipengaruhi oleh jumlah nutrisi yang diserap oleh tubuh induk. Berdasarkan uji anava yang dilakukan, penambahan berat badan induk berbeda tidak nyata. Hal tersebut menunjukkan

bahwa ekstrak ciplukan tidak menyebabkan induk sakit.

Berat badan fetus dan panjang fetus merupakan parameter yang penting pada penelitian teratogenik. Penurunan berat badan fetus dan panjang fetus merupakan efek teratogenik yang dapat terlihat dengan jelas (Wilson, 1972). Berdasarkan uji anava, nilai F hitung rata-rata berat badan fetus memiliki nilai yang berbeda nyata, sedangkan hasil uji anava pada rata-rata panjang badan fetus, F hitung memiliki nilai yang berbeda sangat nyata. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak ciplukan memiliki pengaruh terhadap penurunan berat badan dan panjang badan fetus.

Penurunan berat badan dan panjang badan fetus dipengaruhi oleh nutrisi yang diterima embrio, fungsi plasenta dalam mengantarkan nutrisi, dan genetik embrio. ketiga faktor tersebut kemudian mempengaruhi perkembangan embrio. Kandungan senyawa tanin yang terdapat pada ekstrak ciplukan diduga menyebabkan penyerapan nutrisi di dalam usus induk terhambat, menurut Cannas (2013) tanin mampu berikatan dengan protein dan meningkatkan ekskresi protein dan asam amino. Terhambatnya penyerapan pada usus induk menyebabkan embrio kekurangan nutrisi yang dibutuhkan untuk melakukan pembelahan sel pada masa pembentukan organ. Hal ini menyebabkan peningkatan jumlah sel terhambat dan berat badan fetus menjadi lebih rendah.

Keterlambatan Osifikasi Tulang Fetus

Ekstrak ciplukan menyebabkan keterlambatan osifikasi pada tulang supraoksipital, badan vertebra servikalis, lengkung vertebra sakrokaudalis, sternum, dan falang intermediet anggota gerak belakang. Keterlambatan penulangan (osifikasi) dapat

diamati dengan melakukan pewarnaan pada tulang fetus menggunakan pewarna *Alizarin Red S* (Conn, dkk., 1960). Pewarna tersebut mampu berikatan dengan kalsium yang terdapat pada tulang yang telah mengalami osifikasi sehingga tulang berwarna merah. Pengamatan osifikasi tulang merupakan indikator yang baik untuk mengetahui sifat teratogen senyawa dan merupakan indikator keterlambatan pertumbuhan fetus (Beck, 1989).

Osifikasi dapat melalui dua cara, yaitu intramembran dan endokondral. Tulang pipih seperti tulang tengkorak terbentuk melalui osifikasi intramembran, sedangkan tulang aksial dan apendikular terbentuk melalui osifikasi endokondral. Osifikasi intramembran dimulai dengan diferensiasi sel mesenkim menjadi osteoblas. Osteoblas yang dibentuk akan mensekresikan matriks ekstraseluler, selanjutnya matriks akan berikatan dengan kalsium. Osifikasi endokondral dimulai dengan penimbunan sel mesenkim dan kemudian berdiferensiasi menjadi sel kondrosit. Sel kondrosit kemudian akan digantikan oleh sel osteoblas, sel osteoblas akan mensekresi matriks ekstraseluler yang akan berikatan dengan kalsium (Gilbert, 2010). Diferensiasi sel mesenkim menjadi sel kondrosit, penggantian sel kondrosit oleh sel osteoblas, proliferasi sel osteoblas, dan penimbunan matriks tulang merupakan tahapan kritis yang rentan dipengaruhi oleh tanin, saponin, alkaloid, dan steroid. Hal ini menyebabkan keterlambatan osifikasi tulang.

Tulang sternum, badan vertebra servikalis, lengkung vertebra sakrokaudalis, dan intermediet anggota gerak belakang adalah tulang yang terbentuk melalui osifikasi endokondral. Sedangkan tulang supraoksipital terbentuk melalui osifikasi intramembran. Keterlambatan tulang ini diduga karena

terhambatnya proliferasi sel osteoblas oleh saponin, alkaloid, dan steroid dan terganggunya penyerapan kalsium oleh senyawa tanin yang terdapat pada ekstrak ciplukan.

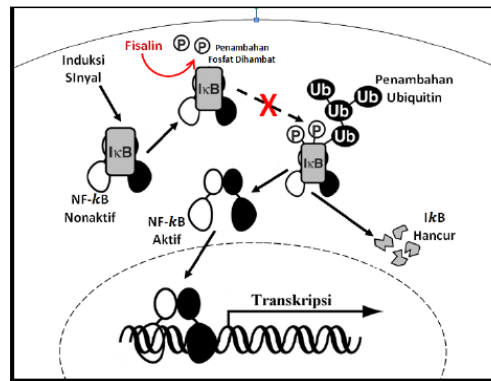
Tanin mampu berikatan dengan protein dan menyebabkan kurangnya protein yang diserap tubuh induk sehingga mengganggu proliferasi sel osteoblas pada proses pembentukan tulang. Menurut Cannas (2013) tanin merupakan senyawa yang dapat menghambat penyerapan nutrisi di dalam usus dan meningkatkan ekskresi protein dan asam amino. Terhambatnya penyerapan nutrisi tersebut menyebabkan kurangnya ketersediaan nutrisi yang dibutuhkan oleh embrio yang sedang berkembang (malnutrisi). Malnutrisi terutama kalsium yang dibutuhkan oleh embrio selama pembentukan tulang dapat menyebabkan keterlambatan osifikasi.

Menurut Nogrady (1992) dalam Widyastuti, dkk. (2006) alkaloid mampu mengganggu pembelahan sel sehingga tetap pada fase metafase dengan menghambat fungsi spindle mitosis sehingga akan menyebabkan kromosom pecah, menyebar, atau mengelompok dan mengakibatkan sel mati. Spindel mitosis berfungsi sebagai penarik kromosom yang berada pada bidang ekuator pada tahap metafase. Spindel mitosis tersusun atas mikrotubul, filamen terpolarisasi yang terdiri dari α/β tubulin. Alkaloid mampu menghambat polimerisasi mikrotubul sehingga tidak dapat mencapai kinetokor sehingga tahap metafase tidak terjadi dan mitosis sel tidak dilakukan, sedangkan saponin mampu menghambat siklus sel osteoblas tetap pada fase G1. Fase G1 merupakan fase antara fase mitosis dan fase sintesis DNA. Terhambatnya siklus sel tetap pada fase G1 oleh saponin menyebabkan sel tidak dapat melanjutkan ke fase S, G2, dan M. Hal ini menyebabkan sel

gagal melakukan mitosis. Kegagalan mitosis sel osteoblas yang disebabkan oleh alkaloid dan saponin menyebabkan kurangnya jumlah osteoblas yang akan membentuk tulang.

Jenis senyawa steroid yang terdapat di dalam ekstrak ciplukan adalah fisalin dan withanolide. Fisalin merupakan senyawa yang mampu menghambat proses proliferasi sel melalui mekanisme penghambatan aktivasi faktor transkripsi NF-*κ*B (Wu, dkk., 2012). Sebelum mendapat sinyal untuk membelah, NF-*κ*B berada di dalam sitosol dan berikatan

dengan protein inhibitor I κ B. Setelah sel mendapat sinyal untuk membelah, I κ B berikatan dengan fosfat. Setelah berikatan dengan fosfat, kemudian terjadi penambahan ligan ubiquitin. Ikatan tersebut membuat I κ B hancur dan melepas NF-*κ*B sehingga NF-*κ*B menjadi aktif. Kandungan senyawa fisalin di dalam ekstrak ciplukan menghambat ikatan antara protein I κ B dan fosfor sehingga NF-*κ*B tidak aktif. Diagram penghambatan aktivasi NF-*κ*B dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Diagram Jalur Sinyal NF- κ B yang dihambat oleh fisalin

Proliferasi sel osteoblas yang terhambat oleh senyawa yang terdapat pada ekstrak ciplukan menyebabkan sintesis matriks ekstraseluler oleh sel osteoblas menjadi terhambat. Penimbunan matriks ekstraseluler yang terhambat menyebabkan keterlambatan pengikatan kalsium oleh matriks ekstraseluler pada proses osifikasi tulang.

Tulang merupakan penyedia nutrisi penting, mineral, lipid, tempat pembentukan sel darah, dan berperan penting dalam melindungi organ tubuh. Keterlambatan osifikasi pada tulang menyebabkan gangguan fisiologis pada fetus. Fungsi fisiologis yang terganggu berkaitan dengan keterlambatan osifikasi dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Keterlambatan Osifikasi

| No. | Tulang | Fungsi Fisiologi yang Terganggu |
|-----|--------------------|---|
| 1. | Supraoksipital | Gangguan fungsi untuk melindungi organ otak. |
| 2. | Vertebra | Gangguan fungsi untuk melindungi sistem saraf tepi |
| 3. | Sternum | Gangguan perlekatan tulang rusuk, gangguan sistem pernapasan, dan gangguan pembentukan sel darah. |
| 4. | Falang Intermediet | Gangguan sistem gerak anggota tubuh. |

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak ciplukan memiliki efek teratogenik terhadap fetus mencit.
2. Efek teratogenik yang terjadi berupa penurunan berat badan fetus, penurunan panjang fetus, dan keterlambatan osifikasi pada tulang supraoksipital, badan vertebra servikalis, lengkung vertebra sakrokaudalis, tulang sternum, dan falang intermediet anggota gerak belakang.
3. Dosis minimum yang dapat menyebabkan efek teratogenik yaitu dosis P1 (1,4mg/0,1 ml Tween 20/10g BB).

Saran

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa aktif yang terdapat pada ciplukan berpotensi teratogen terhadap fetus mencit. Namun belum diketahui efeknya terhadap organ lain dan fungsi fisiologi tubuh anak mencit. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian efek teratogenik ekstrak ciplukan terhadap organ lain dan fungsi fisiologi anak mencit.

DAFTAR PUSTAKA

- Azlan, G. Jualang., M. Marziah, M. Radzali, dan R. Johari. 2005. Accumulation of Physalin in Cell and Tissue of *Physalis minima* L. *Acta Hort*, 676: 53-59.
- Beck, Sidney L. 1989. Prenatal Ossification as an Indicator of Exposure to Toxic Agent. *Teratology*, 40: 365-374.
- Cannas, Antonello. 2013. *Tannin: fascinating but sometimes dangerous molecules*. <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin.html>. Diakses tanggal 2 Februari 2014.
- Choudhary, M. Iqbal., Sammer Yousaf, Shakil Ahmed, Samreen, Kauser Yasmeen, dan Atta-ur-Rahman. 2005. Antileishmanial Physalis from *Physalis minima*. *Chemistry & Biodiversity*, 2: 1164-1173.
- Conn, H.J., Mary A. Darrow., dan Victor M. Emmel. 1960. *Staining Procedures*. 2nd Edition. The Williams & Wilkins Co, Baltimore.
- Fauzi, Ilham Agusta., Fikri Amalia, Nurma Sabila, Adam Hermawan, Muthi Ikawati, dan Edy Meiyanto. 2011. Aktivitas Antiproliferasi Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) Terhadap Sel Hepar Tikus Betina Galur Sprague Dawley Terinduksi 7,12-Dimetilbenz[a]antrasena. *Majalah Kesehatan PharmaMedika*, 3(1): 194-199.
- Gilbert, Scott F. 2010. *Developmental Biology*, 9th Edition. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan. 2013. *Kuriulum 2013 Kompetensi Dasar Sekolah Menengah Atas (SMA)/Madrasah Aliyah (MA)*. Jakarta: Kemendikbud.
- Kispert, Andreas dan Achim Gossler. 2012. Early Mouse Development. Dalam Hedrich, Hans J. (Ed): *The Laboratory Mouse*: 117-143.
- Khan M A., Khan H, Khan S, Mahmood T, Khan P. M, dan Jabar A. 2009. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of *Physalis minima* Linn.. *J Enzyme Inhibit Med Chem*, 24: 632-637.
- Leong, Ooi Kheng., Tengku Sifzizul Tengku Muhammad, dan Shaida Fariza Sulaiman. Cytotoxic Activities of *Physalis minima* L. Chloroform Extract on Human Lung Adenocarcinoma NCL-

- H23 Cell Lines by Induction of Apoptosis. *eCAM*: 1-10.
- Nathiya M. dan Dorcus D. 2012. Preliminary phytochemical and antibacterial studies on *Physalis minima* Linn.. *Int J Curr Sci*, pp: 24-30.
- Parmar, C. dan M.K. Kaushal. 1982. *Physalis minima* In: *Wild Fruits*. <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/parmar/16.html>. Diakses tanggal 4 Februari 2014.
- Patel, T., K. Shah, K. Jiwan, dan Neeta Shrivastava. 2011. Study the Antibacterial Potential of *Physalis minima* Linn. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(1): 111-115.
- Rugh, Robert. 1967. *The Mouse Its Reproduction and Development*. Minneapolis: Burgess Publishing Company.
- Santoso, Hieronymus Budi. 2008. *Ragam & Khasiat Tanaman Obat: Sehat Alami dari Halaman Asri*. Jakarta: PT. Agromedia Pustaka.
- Sucharitha, Esampally dan Mamidala Estari. 2013. Evaluation of antidiabetic activity of medical plant extract used by tribal communities in rural areas of Warangal distric, Andhra Pradesh, India. *Biology and Medicine*, 5: 20-25.
- Syamsudin., Yayan Rizikiyan, dan Darmono. 2006. Efek Teratogenik Ekstrak Metanol Biji Petai Cina (*Leucaena leucocephala* (Lmk) De Wit) pada Mencit Hamil. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 6(1): 33-36.
- Tammu, Jyothibas., K. Venkata Ramana, Sreenu Thalla, dan Narasimha Raju Bh. 2012. Diuretic activity of methanolic extract of *Physalis minima* leaves. *Der Pharmacia Lettre*, 4(6): 1832-1834.
- Taylor, P. 1986. *Practical Teratology*. London: Academic Press, Harcourt Brace Jovanonic Publishers.
- Wahyudi, Budi Eko. 2013. Efek Teratogenik Ekstrak Daun Keji Beling (*Strobilanthes crispus* Bl.) terhadap Fetus Mencit (*Mus musculus*) Galur Sub Swiss Webster serta Rancangan Pembelajarannya pada Sekolah Menengah Atas. *Skripsi*. Indralaya: FKIP Universitas Sriwijaya.
- Widyastuti, Nurul., Tetri Widiyani, dan Shanti Listyawati. 2006. Efek Teratogenik Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Galur Winstar. *Bioteknologi*, 3(2): 56-62.
- Wilson, James G. 1972. Environmental Effects on Development Teratology. Dalam Assali, Nicholas S. (Ed): *Pathophysiology of Gestation, Fetal Placenta Disorders*, 2: 270-271.
- Wu, Szu-Ying., Yann-Lii Leu, Ya-Ling Chang, Tian-Shung Wu, Ping-Chun Kuo, Yu-Ren Liao, Che-Ming Teng, dan Shiow-Lin Pan. 2012. Physalin F induces Cell Apoptosis in Human Renal Carcinoma Cells by Targeting NF-kappaN and Generating Reactive Oxygen Species. *Plos ONE*, 7(7): 1-10.