

# Ekspresi protein vimetin dan neurofilamen pada tunas anggota depan mencit black-6 umur kebuntingan 12 hari akibat induksi 2-metoksietanol secara Real Time RT-PCR

YULIA IRNIDAYANTI\*

*Irnidayanti Y. 2011. Expression of vimetin protein and neurofilamen on forelimb buds of black-6 mice on gestation day 12 induced by 2-methoxyethanol by Real Time RT-PCR.*

The aim of this study was to investigate impact of 2-methoxyethanol, a major industrial chemical of plastic. Gene expression analysis is increasingly important in biological research, while real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) is becoming the method of choice for high-through put and accurate expression profiling of selected genes. Pregnant black-6 mice were injected intraperitoneally to 7.5 mmol/kg of 2-methoxyethanol on gestation day (GD) 10. Embryo were obtained on gestation day 12. Forelimb buds of embryo was collected and then put in the tube, which containing *RNA-latter solution*. To identify gene expression changes in forelimb bud caused induction 2-methoxyethanol, Real Time PCR were using in this research. For the experiments the real-time RT-PCR Light Cycler technology was used. The results suggested that injection of 2-methoxyethanol, in prenatal period especially on gestation day 12, the expression of vimentin in forelimb buds of mice treatment increase than control mice. Meanwhile the expression of neurofilament tended to decrease, indirectly is not caused by the injection of 2-methoxyethanol.

♥ **Alamat korespondensi:**

<sup>1</sup> Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta. Jl. Pemuda No. 10 Rawangun, Jakarta Timur 13220, Indonesia. Tel: +92-21-4894909. email: irnidayanti@yahoo.com

Manuskrip diterima: 31 Agustus 2009. Revisi disetujui: 16 Oktober 2009.

♥♥

Edisi bahasa Indonesia dari: Irnidayanti Y. 2010. Expression of vimetin protein and neurofilamen on forelimb buds of black-6 mice on gestation day 12 induced by 2-methoxyethanol by Real Time RT-PCR. *Nusantara Bioscience* 2: 116-120

**Key words:** vimentin, neurofilament, 2-methoxyethanol, limb bud, black-6 mice

*Irnidayanti Y. 2011. Ekspresi protein vimetin dan neurofilamen pada tunas anggota depan mencit black-6 umur kebuntingan 12 hari akibat induksi 2-metoksietanol secara Real Time RT-PCR.*

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui dampak dari 2-metoksietanol, bahan kimia utama industri plastik. Analisis ekspresi gen semakin penting dalam penelitian biologi, dimana real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) menjadi metode yang dipilih untuk mendapatkan profil ekspresi dari seleksi gen secara akurat. Mencit black-6 bunting diinjeksi 2-metoksietanol secara intraperitoneal dengan 7,5 mmol/kg pada umur kebuntingan 10 hari. Embrio diperoleh pada umur kebuntingan 12 hari. Tunas anggota depan embrio dikumpulkan dan dimasukkan ke dalam tabung, yang mengandung larutan *RNA-latter*. Untuk mengetahui perubahan ekspresi gen tunas anggota depan yang disebabkan oleh induksi 2-metoksietanol digunakan RT-PCR dalam penelitian ini. Dalam percobaan digunakan teknologi RT-PCR Light Cycler. Hasil penelitian menunjukkan bahwa injeksi 2-metoksietanol, pada periode pralahir terutama pada umur kebuntingan 12 hari, ekspresi vimentin pada tunas anggota depan mencit perlakuan meningkatkan dibandingkan kontrol. Sementara itu ekspresi neurofilamen cenderung menurun, secara tidak langsung tidak disebabkan oleh injeksi 2-metoksietanol.

**Kata kunci:** vimentin, neurofilamen, 2-metoksietanol, limb bud, mencit black-6

## PENDAHULUAN

Senyawa 2-metoksietanol (2-ME) atau *ethylene-glycol methyl ether* adalah salah satu senyawa *glycol ether* turunan dari senyawa *phthalate ester*. Senyawa ini banyak digunakan sebagai bahan dasar plastik. Plastik sangat bermanfaat dalam kehidupan sehari-hari, setiap orang hampir dipastikan pernah menggunakan dan memiliki barang-barang yang terbuat dari plastik. Plastik umumnya digunakan untuk berbagai aktivitas

manusia, seperti peralatan rumah tangga, bahan pembungkus, botol, wadah makanan, mainan anak-anak, pipa air dan bahkan digunakan untuk keperluan di bidang kesehatan seperti tempat penyimpanan darah untuk transfusi.

Limbah senyawa ini sering terbuang di lingkungan dan menjadi bahan polutan, khususnya di lingkungan perairan atau sungai (Miller *et al.* 1983). Senyawa tersebut telah diketahui bersifat toksik maupun teratogenik pada beberapa spesies mamalia (Feuston *et al.*

1990). Laporan sebelumnya juga menyebutkan bahwa, beberapa orang telah keracunan 2-ME melalui penetrasi ke dalam kulit dan saluran pernafasan (Dugard *et al.* 1984). Sekitar 100.000 orang teracuni 2-ME pertahun, dari jumlah tersebut diduga adalah kaum wanita yang masih dalam masa subur atau mampu melahirkan (Scoot *et al.* 1989). Sifat teratogenik 2-ME pada hewan percobaan, diduga disebabkan oleh hasil metabolisme 2-ME di dalam sel hati menjadi *methoxy-acetic acid* (MAA), oleh bantuan katalisator *alcohol dehydrogenase* (Brown *et al.* 1984; Moslen *et al.* 1995).

Penelitian kami sebelumnya menyebutkan bahwa, 2-ME menyebabkan kelainan pada fetus mencit yang induknya diberi 2-ME maupun MAA, kelainan yang muncul terutama adalah kelainan rangka anggota, kelainan rangka aksial, sebagai akibat kerusakan jaringan embrional somit yang selanjutnya memunculkan kelainan rangka tulang belakang dan tulang rusuk, *medula spinalis* terdedah; dan *eksensefali* (Darmanto *et al.* 1994; Darmanto 1998). Beberapa peneliti telah melaporkan bahwa setelah pemberian MAA dengan dosis tunggal 10 mmol/kg berat badan pada hari kebuntingan 11 pada mencit Jcl:ICR (Rasjad *et al.* 1991), AJ (Sudarwati 1993), Swiss Webster, (Suripto *et al.* 1996), menunjukkan 94% tunas anggota fetus mengalami abnormalitas. Sifat embriotoksik dan teratogenik senyawa MAA telah terbukti pada mamalia, terutama pada embrio periode preimplantasi maupun postimplantasi. Sifat embriotoksik ini sama dengan yang disebabkan oleh senyawa 2-ME (Darmanto *et al.* 1994).

Anggota tubuh merupakan model yang baik untuk mempelajari pola perkembangan dan juga untuk memahami kemungkinan gangguan perkembangan yang disebabkan oleh teratogen tertentu (Ruyani *et al.* 2008). Hasil penelitian Rasjad *et al.* (1991), menunjukkan bahwa pola distribusi dari cacat anggota yang disebabkan oleh MAA, suatu metabolit dari 2-metoksietanol, disebabkan oleh adanya perbedaan dalam jumlah dan distribusi kematian sel yang terjadi pada bagian keping mesoderm anggota. Hasil pengamatan secara mikroskopis menunjukkan bahwa tanda-tanda kelainan tunas anggota yaitu beberapa sel mengalami nekrosis pada mesenkim dan AER (*Apical Ectoderm Ridge*), yang diamati 2 jam setelah pemberian MAA pada umur kebuntingan ke 10,5 hari, setelah 6 jam menunjukkan hipoplasia pada AER. AER itu sendiri berperan dalam mekanisme pembentukan kelainan anggota, karena terjadi

perubahan degenartif struktur dan penyusutan yang lebih cepat pada fetus perlakuan dibandingkan dengan kontrol (Sudarwati 1995). Hasil penelitian Mebus and Welsch (1989), menunjukkan bahwa pemberian MAA dapat mengganggu ketersediaan basa purin dan pirimidin. Hal ini diharapkan dapat mempengaruhi sintesis DNA dan atau sintesis RNA, sehingga menyebabkan kematian sel, yang pada akhirnya mempengaruhi proliferasi dan differensiasi sel di dalam perkembangan embrio.

Dalam proses pembentukan tunas anggota tubuh yang normal terdapat beberapa tahap yaitu tahap proliferasi, migrasi, differensiasi dan tahap kematian sel. Pada embrio umur kebuntingan (uk-10 hari), merupakan tahap awal pembentukan tunas anggota awal, dimana sel-sel mengalami proliferasi dengan membentuk AER.

Di samping itu terjadi pula migrasi sel-sel miogenik pada bakal tunas anggota. Struktur muskular tunas anggota sebagian berasal dari miotom somit. Migrasi sel-sel miogenik, dimulai segera setelah pembentukan tunas anggota. Sel-sel tunas anggota mempunyai kemampuan untuk beragregasi membentuk dua massa otot yaitu massa otot premuskular dan massa otot dorsal, yang berada pada stadium awal differensiasi miogenik (Ewan and Everett 1997). Sel-sel miogenik yang terakumulasi di dalam tunas anggota, mengekspresikan protein vimentin (Hayasi *et al.* 1993). Hasil Penelitian Vaittinen *et al.* (2010), menyatakan bahwa vimentin berperandalam miogenesis, baik berperan secara fungsioanal dalam konstruksi maupun restorasi serabut-serabut otot rangka. Keberadaan ekspresi protein vimentin berhubungan dengan fungsi selular sel selama perkembangan embrio. Jadi dapat dikatakan bahwa vimentin terekspresi pada awal organogenesis, yang ditandai dengan adanya agregasi dan kondensasi prekartilago (Viebahn *et al.* 1988). vimentin berperan untuk mentranspor kinase ke inti sel. Kinase tersebut mengaktifkan dan mempengaruhi ekspresi gen neuron sedemikian rupa, sehingga neuron dapat memberi respon terhadap kerusakan yang terjadi. Hal ini membuktikan bahwa vimentin diperlukan dalam mereparasi jaringan yang luka melalui migrasi sel-sel dan pembentukan jaringan (Moon *et al.* 2004).

Ekspansi sel-sel yang beragregasi tersebut, akan berhenti ketika mencapai bentuk kondensasi prekartilago. Bentuk kondensasi prekartilago akan memicu differensiasi kartilago, yang pada akhirnya terbentuk kartilago (Lee *et al.* 1998).

Proses perkembangan ini mencakup aktivitas sel-sel, berupa migrasi sel, adhesi sel, signal intraselular dan proliferasi sel. Proses proliferasi dan migrasi sel-sel miogenik ini, dipengaruhi oleh fibronektin. Protein ini membantu memfasilitasi migrasi sel-sel miogenik, sebagai tempat perlekatan dan mengarahkan migrasi.

Neurofilamen adalah kelompok protein pemandu sel pada saat organogenesis, apabila tingkat ekspresi senyawa ini terganggu oleh senyawa 2-ME, diduga akan memunculkan kelainan yang terjadi pada anggota. Namun kelainan yang terjadi berupa kelainan polidaktili, disebabkan oleh kematian sel bukanlah satu-satunya jalur mekanisme penyebab munculnya kelainan jari. Penelitian lain menyebutkan bahwa adanya kegagalan dalam fungsi otot polos longitudinal dan sirkuler pada kasus stenosis pylorus, diketahui berkaitan dengan tidak terekspresinya ncam dan neurofilamen atau menandakan tidak adanya inervasi pada jaringan otot polos (Kobayashi *et al.* 1995). Perkembangan kuncup anggota masa embrio akan terganggu, dengan adanya penurunan ekspresi protein neurofilamen (Nicholas *et al.* 2003). Berdasarkan hasil tersebut diduga terdapat suatu jenis protein tertentu yang terganggu ekspresinya akibat induksi senyawa 2-ME. Pada penelitian ini diungkapkan ekspresi protein-protein akibat induksi senyawa 2-ME pada masa kritis perkembangan tunas anggota, secara real time RT-PCR. Hal ini diharapkan dapat diketahui protein-protein yang terekspresi selama pembentukan tunas anggota dan juga diharapkan dapat membantu mengungkapkan peran protein dalam memunculkan kelainan tunas anggota.

## BAHAN DAN METODE

### Hewan percobaan

Mencit Black-6 yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Charite-Universitats Medizin Berlin. Adanya vagina plug merupakan tanda telah terjadi kehamilan hari ke nol (Rugh, 1968). Mencit hamil dibunuh secara dislokasi serviks pada umur kebuntingan 10 hari (uk-10). Sampel tunas anggota diisolasi dibawah mikroskop cahaya, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi RNA-latter, untuk analisis RNA dan DNA. Uji RNA dengan RNeasy Kit Real Time RT-PCR.

### Bahan, dosis dan pengumpulan sampel

2-ME dalam bentuk cair yang diperoleh dari Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Japan (Nomor produk: 135-07762) dilarutkan dalam air steril, diberikan secara injeksi peritoneal dengan dosis 7,5 mmol/kg berat badan pada uk-10 hari. Mencit kontrol hanya diberi akuades steril dengan dosis yang sama. Mencit bunting uk-12 dibunuh secara dislokasi serviks, otak diisolasi dan dimasukkan dalam larutan RNA latter, kemudian disimpan untuk analisis lanjut pada suhu -20°C.

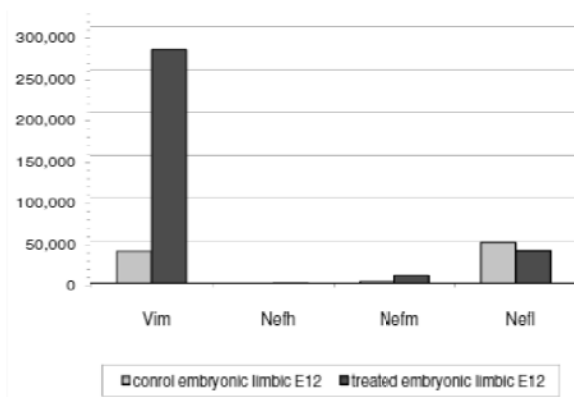
### Real Time RT-PCR

Total RNA dari jaringan tunas anggota diekstraksi dengan RNeasy kit berdasarkan *manufactur's protocols*. cDNA disintesis dari total RNA menggunakan *Qiagen One step RT-PCR Kit* (Cat. No. 210210). Reaksi PCR menggunakan enzim Aid™ H Minus M-MuLV RT (Cat. No. 130125486) pada suhu 95°C, 7 min, PCR 45 siklus (20 det, 95°C; 60 °C, 20 det; 72 °C, 30 det), 42°C, selama 1 jam 15 menit, dandiikuti dengan pemanjangan suhu 70°C selam 5menit; 70°C, 5 menit.

Analisis kuantitatif dilakukan dengan *Real-Time PCR. Analisis Polymerase chain reaction (PCR)* dilakukan dengan menambah masing-masing 9.00 µl dari cDNA tunas anggota perlakuan atau kontrol dan 1 µl Primer-Mix ke dalam masing-masing tabung yang berbeda. Pada eksperimen kami, Primer-Mix terdiri dari 4 jenis primer yaitu vimentin dan Nfh, Nfm, dan Nfl. Pada sampel tunas anggota baik kontrol maupun perlakuan, di tambahkan komponen reaksi yaitu aqua, *SYBER Green*, *2x Bioline buffer*. Selanjutnya reaksi Real Time RT-PCR menampilkan berbagai seri cDNA target yang diikuti oleh *Oligonucleotide primers*. Primer yang digunakan dalam penelitian ini disintesis ke *Biotex Berlin- Buch GmbH*, Berlin, Jerman. Informasi primer-primer, dapat dilihat pada Table 1.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil kopi DNA sacara real time RT-PCR dari otak mencit black-6 menggunakan primer vimentin, neurofilamen high, neurofilamen medium dan neurofilamen low (gambar 1). Pada gambar di atas terlihat bahwa ekspresi vimentin pada masa perkembangan awal tunas anggota sangat tinggi. Protein lainnya seperti nf-low tampak sebaliknya yaitu relatif menurun, bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.



**Gambar 1.** Jumlah kopi gen untuk DNA protein tunas anggota embrio umur kebuntingan 12 hari, hasil real time RT-PCR antara Tunas anggota dari kontrol dan perlakuan

Pada Table 2, terlihat bahwa jumlah kopi gen untuk vimentin terekspresi sangat tinggi dibandingkan dengan gen protein vimentin pada kelompok kontrol. Jumlah kopi gen tersebut sekitar 272.989, relatif lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol yaitu 37.127. Sementara jumlah kopi gen protein neurofilamen low pada kelompok perlakuan lebih rendah dari kontrol yaitu 38.269 pada perlakuan dan 4.927 pada kontrol, dan berbeda dari kontrol. Sedangkan neurofilamen medium dan neuro-filamen high sangat rendah pada perlakuan yaitu 9.416 dan 849, sementara pada kontrol yaitu 2.327 dan 200.

### Pembahasan

Tunas anggota pertama kali muncul pada umur kebuntingan 10 hari, dimana tampak adanya sekumpulan sel-sel mesenkim yang tumbuh seperti tunas anggota depan. Sel-sel mesenkim yang menutupi bakal tunas anggota berupa sel-sel berbentuk kubus berasal dari

G/C lapisan ektoderm. Bentuk ini dikenal dengan *Apical Ectoderm Ridge (AER)*. Pada uk-12 hari, tunas anggota berbentuk polygonal atau lebih tepatnya berbentuk pentagonal. Peranan protein dalam perkembangan tunas anggota, dapat langsung bekerja pada sel tersebut atau melalui perantara dengan mengubah konfigurasi substrat.

Dalam proses pembentukan tunas anggota tubuh yang normal terdapat beberapa tahap yaitu tahap proliferasi, migrasi, differensiasi dan tahap kematian sel. Pada embrio umur kebuntingan (UK-10 hari), merupakan tahap awal pembentukan tunas anggota, dimana sel-sel mengalami proliferasi dengan membentuk AER. Di samping itu terjadi pula migrasi sel-sel miogenik pada bakal tunas anggota. Sel-sel miogenik yang terakumulasi di dalam tunas anggota, mengekspresikan protein vimentin (Hayasi *et al.* 1993).

Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi protein vimentin pada perlakuan meningkat, dibandingkan kontrol. Dalam keadaan normal, ekspresi protein vimentin pada embrio uk-10, sangat tinggi (Irnidayanti, 2009), kemudian mengalami penurunan pada uk-12. Namun dalam penelitian ini, setelah pemberian 2-ME, ekspresi protein vimentin tampak sebaliknya yaitu terjadi peningkatan pada embrio uk-12 hari. Data ini didukung oleh Vaittinen *et al.* (2001), bahwa ekspresi vimentin meningkat maksimum selama 3-5 hari setelah *post injuri* pada mioblas. Hal ini berarti bahwa setelah pemberian 2-ME, terjadi kerusakan pada jaringan tunas anggota. Pada jaringan yang rusak, tampak ekspresi protein vimentin meningkat. Tingginya ekspresi protein vimentin diperlukan untuk perbaikan jaringan yang rusak akibat induksi 2-ME.

Berdasarkan penelitian (Viebahn, 1988) menyatakan bahwa keberadaan ekspresi protein tampaknya berhubungan dengan fungsi seluler selama perkembangan embrionik. Vimentin, yang merupakan filamen intemediet, berperan sebagai signal transduksi (Helfand *et al.* 2005). Vimentin dapat berinteraksi dengan MAP (*mitogen-activated protein*) kinase, yang terdapat pada ujung akson yang luka. Vimentin berperan

**Table 2.** Kondisi siklus DNA protein-protein otak embrio UK-12 hari akibat induksi 2-ME secara real-time reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR).

No.	Name	Ct	Take Off	Amplification	Tm [°C]	Tm [°C]	Calc. Conc. (copies/reaction)	(copies/1Mio GAPDH)
E1	GAPDH - limbic E12 control	Sample	13.04	14.1	1.73	86.1	3,017,422	
E2	FN1 mix1	Sample	23.14	24.5	1.76	86.1	38,135	12,638
E3	FN1 mix2	Sample	25.45	27.1	1.70	86.6	14,033	4,651
E4	FN1 mix3	Sample	27.99	29.5	1.80	86.6	4,675	1,549
E5	Ncam1	Sample	24.95	26.2	1.79	87.1	17,423	5,774
E6	Tnc	Sample	24.48	26.0	1.77	84.9	21,354	7,077
E7	Vim	Sample	20.65	21.9	1.76	86.1	112,027	37,127
E8	Nefh	Sample	32.72	33.9	1.98	76.6	604	200
F1	Nefm	Sample	27.05	28.2	1.80	86.6	88.8 7,022	2,327
F2	Nefl	Sample	20.06	21.0	1.73	86.8	144,616	47,927
G1	GAPDH - limbic E12 treated	Sample	14.35	15.6	1.73	86.6	1,711,668	
G2	FN1 mix1	Sample	20.55	22.0	1.75	86.1	116,982	68,344
G3	FN1 mix2	Sample	22.32	23.9	1.72	86.6	54,381	31,771
G4	FN1 mix3	Sample	28.22	29.9	1.81	87.3	4,232	2,472
G5	Ncam1	Sample	23.16	24.4	1.83	87.4	37,807	22,088
G6	Tnc	Sample	22.65	24.1	1.84	85.1	47,143	27,542
G7	Vim	Sample	17.35	18.7	1.80	86.4	467,267	272,989
G8	Nefh	Sample	30.69	32.3	1.74	77.8	87.1 1,453	849
H1	Nefm	Sample	25.13	26.8	1.83	89.1	16,118	9,416
H2	Nefl	Sample	21.89	23.3	1.77	86.6	65,504	38,269

untuk mentranspor kinase ke badan sel dan menuju inti sel. Kinase tersebut mengaktifkan dan mempengaruhi ekspresi gen neuron sedemikian rupa, sehingga neuron dapat memberi respon terhadap kerusakan yang terjadi. Moon *et al* (2004), menyatakan bahwa vimentin banyak terekspresikan pada jaringan yang mengalami kerusakan. Oleh karena itu diduga bahwa tingginya ekspresi protein vimentin ini pada embrio uk-12 hari, berhubungan dengan proses proliferasi dan migrasi sel-sel yang diperlukan untuk perbaikan jaringan tunas anggota, akibat pemberian 2-ME. Dalam penelitian ini, pemberian 2-ME dilakukan pada uk-10 hari dan pengamatan dilakukan pada embrio uk-12. Pada 48 jam setelah pemberian, dimana belum berakhirnya usaha pemulihan. Hal ini menyebabkan ekspresi vimentin yang sangat tinggi, sangat diperlukan untuk proses proliferasi dalam perbaikan jaringan. Hasil penelitian Ruyani (2008) menyatakan bahwa Setelah pemberian 2-ME pada mencit Swiss webster pada uk-11 hari dengan dosis 10 mmol/kg berat badan, dapat mengubah profil protein tunas anggota depan. Hasil metabolit 2-ME, yaitu MAA, langsung berpengaruh terhadap

ekspresi gen yang kemudian berpengaruh pula terhadap keberadaan protein tertentu. Sehingga tingginya ekspresi protein vimentin diperlukan sesuai dengan fungsi seluler untuk perbaikan jaringan akibat 2-ME.

Ekspresi protein Neurofilamen-low kelompok perlakuan, tampak rendah dibandingkan dengan kontrol. Ekspresi ketiga sub- unit neurofilamen bervariasi, baik di antara populasi neuron-neuron maupun pada akson-akson pada stadium perkembangan. Ekspresi ketiga subunit berhubungan dengan berbagai macam fungsi dari sel-sel selama stadium perkembangan (Viebhan, 1988). Seperti yang telah diketahui bahwa, neurofilaman berperan dalam morfogenesis neuron (Matus, 1988; Robinson dan Anderton, 1988; Riederer,1990; Riederer,1992), terutama untuk mempertahankan kekakuan sel, disamping itu juga berperan untuk memandu transport intraselular ke akson dan dendrit. Bersama-sama dengan protein sitoskeleton lainnya, neurofilamen berperan untuk membentuk dan mempertahankan bentuk sel dan memfasilitasi transpor partikel-partikel serta organel-organel di dalam sitoplasma (Liu *et al.* 2004).Meningkatkan suplai syaraf dan otot ke dalam

tunas anggota mulai terjadi pada embrio uk-13, maka ekspresi protein neurofilamen-low juga tampak tereksresi rendah pada kontrol. Dari data yang diperoleh menunjukkan bahwa ekspresi protein neurofilamen low yang rendah setelah pemberian 2-ME pada uk-10 hari, diduga bukan disebabkan oleh terganggunya sintesis RNA dan DNA oleh 2-ME. Rendahnya ekspresi protein neurofilamen low bukan disebabkan oleh senyawa 2-ME, mengingat inervasi syaraf terjadi pada uk-ke 13 hari. Sedangkan protein neurofilamen-medium dan neurofilamen-high, mulai tampak diekspresikan, yang cenderung meningkat dibandingkan dengan kontrol.

## KESIMPULAN

Dosis tunggal 2-ME 7,5 mmol/kg berat badan yang diberikan secara intraperitoneal pada uk-10 hari, menyebabkan peningkatan ekspresi protein vimentin, dan penurunan ekspresi protein neurofilamen pada tunas anggota depan embrio mencit, bukan disebabkan oleh 2-ME.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Program Sandwich Like Dikti 2008. Untuk itu, penulis mengucapkan terima kasih.

## DAFTAR PUSTAKA

Darmanto W. 1998. Efek 2-methoxyethanol terhadap pembentukan somite dan kelainan rangka aksial pada mencit. *Proceeding Temu Ilmiah VII*. Hiroshima. Japan.

Darmanto W, Sudarwati S, Sutasurya LA. 1994. Effects of methoxyacetic acid on prenatal development of mice. *Environ Med* 38: 25-28.

Dugard PH, Walker M, Mawdsley SJ, Scott RC. 1984. Absorption of some glycol ethers through human skin in vitro. *Environ Health Perspect* 57: 193-197.

Ewan KBR, Everett AW. 1997. Migration of myogenic cells in the developing limb. *Basic Appl Myol* 7 (2): 131-135.

Feuston MH, Kerstetter SL, Wilson PD. 1990. Teratogenicity of 2-methoxyethanol applied as a single dermal dose to rats. *Fundam Appl Toxicol* 15: 448-456.

Hayashi K, Hagiwara Y, Ozawa E. 1993. Vimentin expression pattern is different between the flank region and limb regions of somatopleural mesoderm in the chicken embryo. *Develop Growth Differ* 35: 301-309.

Helfand BT, Chou YH, Shumaker DK, Goldman RD. 2005. *Intermediate filament proteins participate in signal transduction*. *Trends Cell Biol* 15 (11): 568-570.

Irnidayanti Y. 2009. Comparison of the expression of cDNA extracellular matrix protein between brain E-10 days black-6 mice,

hLN-405, rF-98 and cell line mHT-22 [Research Sandwich Program]. Humboldt University. Berlin.

Kobayashi H, O'Brain DS, Puri P. 1995. Immunochemical characterization of neural cell adhesion molecule (NCAM), nitric oxide synthase, and neurofilament protein expression in pyrolic muscle of patients with pyrolic stenosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 20 (3): 319-325.

Lee YS, Stott NS, Jiang RB, Widelitz, Chuong CM. 1998. Early events during precartilago condensation in limb bud micromass culture. *Cells and Materials* 8: 19-32.

Liu Q, Xieb F, Siedlak SL, Nunomurac A, Hondaa K, Moreiraa PI, Zhua X, Smitha M.A. Perrya G. 2004. Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. *Rev Cell Mol Life Sci* 61: 3057-3075.

Mebus CA, Welsch F, 1989. The possible role of one-carbon moieties in 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid induced development toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 99: 98-109.

Miller RR, Hermann EA, Langvardt PW, McKenna J, Schwetz, BA. 1983. Comparative Metabolism and Disposition of Ethylene Glycol Monomethyl Ether and Propylene Glycol Monomethyl Ether in Male Rats. *Toxic and App Pharmacol* 67: 229-237.

Moon C, Ahn M, Kim S, Jin JK, Sim KB, Kim HM, Lee MY, Shin T. 2004. Temporal patterns of the embryonic intermediate filaments nestin and vimentin expression in the cerebral cortex of adult rats after cryoinjury. *Brain Res* 1028: 238-242

Moslen MT, Kaphalia L, Balasubramanian H, Yin YM, William WA. 1995. Species differences in testicular and hepatic biotransformation of 2-methoxyethanol. *Toxicol* 96: 217-224.

Nicolas MA, Cai L, Brown DD. 2004. Thyroid hormone controls the developments between the spinal cord and limbs during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Proc Nat Acad Sci USA* 101 (1): 165-170.

Rasjad C, Yamashita K, Datu AR Yasuda M. 1991. Pathogenesis of limb malformation in mice induced by methoxyacetic acid. *Hiroshima J Med Sci* 40(3):101-107.

Riederer BM. 1992. Differential phosphorylation of some proteins of the neuronal cytoskeleton during brain development. *Histochem J* 24: 783-790.

Rugh R. 1968. The mouse: its reproduction and development. Burgess. Minneapolis.

Ruyani A, Sudarwati S, Sutasurya LS, Sumarsono SH. 2008. Perubahan profil protein tunas anggota tubuh depan mencit (*Mus musculus*) Swiss webster akibat perlakuan dengan asam methoxyasetat (MAA). *Laboratorium Biologi Perkembangan, Institut Teknologi Bandung*. Bandung.

Scott WJ, Fradkin R, Wittfoht W, Nau H. 1989. Teratologic potential of 2-methoxyethanol and transplacental distribution of its metabolite, 2-methoxyacetic acid, in non-human primates. *Teratology* 39: 363-373.

Sudarwati S, Surjono TW, Yusuf AT. 1993. Efek "methoxyasetat acid" (MAA) terhadap perkembangan anggota mencit (*Mus musculus*) galur A/J. *J Matematika Sains* 1: 11-19.

Sudarwati S, Surjono TW, Yusuf AT. 1993. Kelainan perkembangan awal anggota depan mencit A/J yang diinduksi asam methoxyasetat (MAA). *Jurnal Matematika dan Sains, Supplement H*: 60-70.

Suripto S, Surjono TW, Kamal A. 1996. Pengaruh asam metoksiasetat terhadap kandungan DNA pada anggota badan embrio mencit (*Mus musculus*) Swiss webster. [Laporan Penelitian]. *Institut Teknologi Bandung*. Bandung.

Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C, Hurme T, Rantanen J, Lendahl U, Eriksson JE, Kalimo H. 2001. The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J Neuropathol Experiment Neurol* 60 (6): 588-597.

Viebahn C, Lane EB, Ramaekers FCS. 1988. Keratin and vimentin in early organogenesis of the rabbit embryo. *Cell Tissue Res* 253: 553-562.