

# FARMASAINS

## JURNAL ILMIAH ILMU-ILMU KEFARMASIAN

Pengaruh Etanol 96% terhadap Difusi Salbutamol Sulfat dalam Sediaan Transdermal Sistem Matriks Kombinasi Povidon-Etil Selulosa melalui Membran *Millipore*-Isopropil Miristat (Naniek Setiadi, R. M.F. Arifin dan Ade Resi. F : 156-164)

Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol 70% Herba Kucing-kucingan (*Acalypha indica* L.) berdasarkan Respon Antibodi Antitetanus Serum pada Mencit setelah Diimunisasi dengan Toksoid Tetanus (TT) (Hadi Sunaryo, Sutanti Sili Nantini dan Annisa Wari Murti : 165 – 168)

Daun Pare (*Momordica charantia* L.) sebagai Penyubur Rambut (Siska, Sediarto dan Suryatin.A: 169 – 172)

Analisis Interaksi *NADH-Ubiquinon Oxidoreductase* (Komplek I) dengan Kelompok *Acetogenins* pada *Annona muricata* (Rizky Arcintha Rachmania : 173 – 179)

Eksresi Protein Caspase-9 dan Gambaran Histologi Palatum Sekunder Mencit Prenatal akibat Paparan Diazepam di Periode Organogenesis (Rika Yulia : 180 – 184)

Uji Daya Repelan Ekstrak Etanol 70% Daun dan Batang Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) terhadap Nyamuk *Aedes aegypti* (Priyo Wahyudi, Dewi Komalasari dan Hadi Sunaryo : 185 – 191)

Sitotoksitas Rendaman Gelas Plastik, Teko Listrik Plastik dan Piring Melamin pada Sel HEP G2 dan Limfosit (Priyanto, Rina Andriany, Dewi Handayani dan Purwandaning Megawati : 192 – 197)

Gambaran Efek Samping Kombinasi Obat dan Kesesuaian Dosis pada Pasien *Multiple Drug Resistance Tuberculosis* (TB MDR) di Rumah Sakit Umum Pusat Persahabatan Tahun 2010 (Numill Khaira Rusdi : 198-202)

Uji Efek Hemostatik Ekstrak Etanol 96% Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Jantan Galur *Sprague Dawley* (SD) (Sri Teguh Rahayu, Aprilita Rina Yanti dan Enda Ferumita : 203 – 207)

ISSN 2008 - 0008

# FARMASAINS

JURNAL ILMIAH ILMU-ILMU KEFARMASIAN

**FARMASAINS** adalah media informasi bidang ilmu farmasi yang memuat kajian tentang ilmu pengetahuan dan teknologi dalam bentuk tulisan ilmiah, studi kepustakaan atau studi empirik

Terbit 2 kali dalam setahun  
(April dan Oktober)

## Pelindung

Dekan FMIPA UHAMKA

*Drs. Endang Abutarya, M.Pd.*

## Penanggung Jawab

Wakil Dekan I FMIPA UHAMKA

*Drs. Inding Gusmayadi, M.Si., Apt.*

Wakil Dekan II FMIPA UHAMKA

*Drs. Budi Arman, M.Kes., Apt.*

Wakil Dekan III FMIPA UHAMKA

*Drs. Priyanto, M.Biomed., Apt.*

## Pemimpin Umum

Ketua Jurusan Farmasi FMIPA UHAMKA

*Hadi Sunaryo, M.Si.; Apt.*

## Dewan Redaksi

Ketua : *Dra. Fatimah Nisma, M.Si.*

Wk. Ketua : *Supandi, M.Si., Apt.*

Sekretaris : *Rahmah Etflani, M. Farm., Apt.*

Wk. Sekretaris: *Almawati Situmorang, S.Si., Apt.*

Anggota :

*DR. Yusnidar Yusuf, M.Si*

*Drs. Purnomo Sasmito.*

*Dwitiyanti, S.Si., Apt.*

*Siska, M. Farm., Apt.*

*Ari Widayanti, M. Farm., Apt.*

*Elly Wardani, M. Farm., Apt.*

Kuangan : *Laili Yulastuti, SE*

Percetakan dan Distribusi

*Azwar Rusli, SE.*

*Zainuddin*

*Firman*

## Alamat Redaksi

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Muhammadiyah Prof Dr. HAMKA  
Islamic Centre, Jl. Delima II/IV Perumnas Klender,  
Jakarta Timur, 13460

Telp. / Fax 021-8611070, 86603233

e-mail: farmasains\_uhamka@yahoo.com

## EDITORIAL

**P**uji dan syukur kami panjatkan ke hadirat Allah SWT atas perkenannya **FARMASAINS Volume. 1 Nomor. 4** ini dapat kami hadirkan ke hadapan pembaca, meski agak terlambat yang seharusnya yaitu Oktober 2011.

**FARMASAINS** volume ini memuat 9 naskah hasil penelitian yang beragam, farmakologi, kimia farmasi dan farmasi komunitas yang berasal dari instansi penulis yang beragam pula, hal ini menandakan bahwa **FARMASAINS** diminati banyak kalangan, tetapi naskah yang masuk masih didominasi pada penulis yang berdomisili di wilayah Jabodetabek, kami berharap untuk penerbitan yang akan datang penulis naskah dapat berasal dari wilayah lain di luar Jabodetabek. Semoga cita-cita menjadikan **FARMASAINS** menjadi sebuah jurnal yang terakreditasi dapat terwujud.

Tentunya tekad ini tidak akan terwujud tanpa dukungan para dosen penulis artikel, kami berharap naskah-naskah dibidang kefarmasian terus mengalir ke redaksi kami, sehingga memungkinkan terjaganya rutinitas penerbitan. Semoga penyajian nomor ini bisa diterima oleh para pembaca sekalian, dan bermanfaat terutama untuk memperkaya khazanah ilmu pengetahuan kefarmasian.

Dewan Redaksi

## UCAPAN TERIMA KASIH

Dewan Redaksi mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

**Prof. Dr. Ir. Anwar Arif, M.Sc.**  
(Universitas Negeri Jakarta)

**Prof. Dr. Almahdy A., Apt.**  
(Universitas Andalas Padang)

**Prof. Dr. Chairul. M.Chem., Apt.**  
(Botani, LIPI, Cibinong)

Mitra bestari dan sains editor yang telah berperan serta pada penerbitan nomor ini.

## DAFTAR ISI

**NANIEK SETIADI.R, M.F. ARIFIN DAN ADE RESTI. F**  
Pengaruh Etanol 96% terhadap Difusi Salbutamol Sulfat dalam Sediaan Transdermal Sistem Matriks Kombinasi Povidon-Etil Selulosa melalui Membran Millipore-Isopropil Miristat  
156-164

**HADI SUNARYO, SUTANTI SITI NAMTINI DAN ANNISA WARI MURTI**  
Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol 70% Herba Kucing-kucingan (*Acalypha indica* L.) berdasarkan Respon Antibodi Anti tetanus Serum pada Mencit setelah Diimunisasi dengan Toksoid Tetanus (TT)  
165 - 168.

**SISKA, SEDIARSO DAN SURYATIN.A**  
Daun Pare (*Momordica charantia* L.) sebagai Penyubur Rambut  
169 - 172

**RIZKY ARCINTHYA RACHMANIA**  
Analisis Interaksi *NADH-Ubiquinon Oxidoreductase* (Complek I) dengan Kelompok *Acetogenins* pada *Annona muricata*  
173 - 179

**RIKA YULIA**  
Ekspresi Protein Caspase-9 dan Gambaran Histologi Palatum Sekunder Mencit Prenatal akibat Paparan Diazepam di Periode Organogenesis  
180 - 184

**PRIYO WAHYUDI, DEWI KOMALASARI DAN HADI SUNARYO**  
Uji Daya Repelan Ekstrak Etanol 70% Daun dan Batang Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) terhadap Nyamuk *Aedes aegypti*  
185 - 191

**PRIANTO, RINA ANDRIANY, DEWI HANDAYANI DAN PURWANDARINING MEGAWATI**  
Sitotoksitas Rendaman Gelas Plastik, Teko Listrik Plastik dan Piring Melamin pada Sel HEP G2 dan Limfosit  
192 - 197

**NUMLIL KHAIRA RUSDI**  
Gambaran Efek Samping Kombinasi Obat dan Kesesuaian Dosis pada Pasien *Multiple Drug Resistance Tuberculosis* (TB MDR) di Rumah Sakit Umum Pusat Persahabatan Tahun 2010  
198-202

**SRI TEGUH RAHAYU, APRILITA RINA YANTI DAN ENDA FERUMITA**  
Uji Efek Hemostatik Ekstrak Etanol 96% Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Jantan Galur *Sprague Dawley* (SD)  
203 - 207

## EKSPRESI PROTEIN CASPASE-9 DAN GAMBARAN HISTOLOGI PALATUM SEKUNDER MENCIT PRENATAL AKIBAT PAPARAN DIAZEPAM DI PERIODE ORGANOGENESIS

### *Caspase-9 Protein Expression and Description of Histologic Secondary Palate on Prenatal Mice Caused by Exposure to Diazepam in the Period of Organogenesis*

Rika Yulia

Fakultas Farmasi Universitas Surabaya

Naskah diterima tanggal 2 Oktober 2011

#### ABSTRACT

The aim of this research at evaluation of the teratogenic effect of diazepam intake in the period of organogenesis to caspase-9 expression and histology study on secondary palate development. The different steps of palatogenesis were tightly regulated and failure of palatal shelves growth, elevation, contact, and or fusion generate a cleft palate. Cleft palate is one of the most common congenital malformations. About 18 mice (*Mus musculus*) of known age and weight were used. They were divided in two groups : The first groups were control group which were injected daily with distilled water, while the second groups were injected daily with diazepam 8 mg/kg/day. Anomalies of cleft palate were evaluated. The histology results showed cleft palate in the test group. The results of immunohistochemistry showed increased expression of caspase-9 was significant in both test groups. The statistical results indicated that diazepam intake can lead to increase in palatal anomalies and caspase-9 expression.

**Keywords:** diazepam, cleft palate, secondary palate, caspase-9

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi efek teratogenik paparan diazepam di periode organogenesis pada mencit prenatal melalui pemeriksaan histologi dan ekspresi protein caspase-9 pada pembentukan palatum sekunder. Proses pembentukan palatum (palatogenesis) terdiri dari beberapa tahap dan diatur dengan ketat. Kegagalan pertumbuhan lempeng palatum, elevasi, kontak dan atau penggabungan dua lempeng palatum dapat menyebabkan terjadinya celah palatum (*cleft palate*). Delapan belas (18) ekor mencit (*Mus musculus*), betina, bunting, yang sudah diketahui umur dan berat badannya digunakan dalam penelitian ini. Hewan coba dibagi menjadi dua (2) kelompok: kelompok kontrol, diberi aquades dan kelompok uji diberi injeksi diazepam 8 mg/kg/BB setiap hari. Kelainan terjadinya celah palatum dievaluasi. Hasil histologi menunjukkan terjadinya celah palatum pada kelompok uji. Hasil imunohistokimia menunjukkan peningkatan ekspresi protein caspase-9 pada kelompok uji. Analisis hasil menunjukkan bahwa paparan diazepam menyebabkan terjadinya celah palatum dan peningkatan ekspresi caspase-9 pada mencit prenatal.

**Kata kunci :** diazepam, celah palatum, palatum sekunder, caspase-9

#### PENDAHULUAN

Obat merupakan salah satu faktor resiko eksternal penyebab kelainan bawaan (anomali kongenital) pada janin, baik struktural maupun fungsional, sehingga penggunaan obat selama kehamilan sebaiknya dihindari (De Santis *et al*, 2004), Namun demikian, masih banyak wanita hamil yang mengkonsumsi satu atau lebih jenis obat selama kehamilan (Headley *et al.*, 2004). Pengaruh buruk obat, tergantung pada sifat obat, dosis, lama paparan dan

umur kehamilan pada saat minum obat (Mulder and Dencker, 2006)

Diazepam, merupakan senyawa psikoaktif golongan benzodiazepin yang penggunaannya semakin meningkat, bahkan paling banyak digunakan di Amerika Serikat (Cannizzaro *et al*, 2005; Marunucci L, 2008). Beberapa peneliti menyatakan bahwa diazepam bersifat teratogen, menyebabkan terjadinya *oral cleft*, namun efek pada manusia masih merupakan kajian yang banyak diperdebatkan (Igbal *et al*, 2002; Gidal, *et al.*, 2008).

Celah palatum (*cleft palate*), salah satu bentuk kelainan *oral cleft* merupakan salah satu bentuk cacat

Alamat korespondensi:

email : rika\_y@ubaya.ac.id

bawaan di daerah kraniofasial pada bayi baru lahir yang paling sering ditemui (Iseki *et al.*, 2007). Cacat ini mengakibatkan gambaran wajah yang abnormal dan gangguan bicara sehingga membutuhkan penanganan yang ekstensif (Meng *et al.*, 2009). Pembentukan palatum, organ yang memisahkan rongga mulut dan rongga hidung merupakan suatu proses yang berlangsung cepat dalam perkembangan embrio vertebrata, membutuhkan beberapa tahapan kritis. Kegagalan dalam tahapan proses tersebut menyebabkan terjadinya celah palatum (Gritli-Linde, 2007; Sheng-Jun, *et al.*, 2008).

Proses penyatuan lempeng palatum dibutuhkan program kematian sel (apoptosis). Apoptosis merupakan proses yang penting dalam perkembangan atau pembentukan organ, peristiwa tersebut dapat dipengaruhi oleh sejumlah faktor eksternal baik secara *in vitro* maupun *in vivo* (Vitale, *et al.*, 2005).

Proses apoptosis melibatkan serangkaian kerja enzim dan protein. Suatu penyimpangan pemilihan gen yang terekspresi atau protein yang tersintesis menyebabkan perkembangan abnormal atau kelainan embrio. Bila hal tersebut terjadi pada saat sel atau jaringan akan membentuk organ, akan terjadi kelainan atau malformasi. Caspase-9 merupakan salah satu protein caspase inisiator terjadinya apoptosis (Darmanto, 2007; Vitale, *et al.*, 2005).

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi pengaruh pemberian diazepam di periode organogenesis terhadap gambaran histologi dan ekspresi protein caspase-9 pada palatum sekunder mencit prenatal.

## METODOLOGI

Hewan Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih (*Mus musculus*), strain BALB/C, betina, dewasa, bunting, berat badan 20-40 gram. serta embrio mencit yang diperoleh pada gestasi hari ke 15 dari masing-masing induk. Bahan uji Diazepam yang digunakan adalah valium produksi Roche, setiap ampul berisi 5 mg/ml.

Mencit bunting diperoleh dengan cara mengumpulkan dua ekor mencit betina yang sedang

dalam fase estrus dalam satu kandang dengan satu ekor mencit jantan fertil semalaman. Apabila besok harinya dijumpai sumbat vagina, maka pada hari itu ditetapkan sebagai gestasi hari ke-0. Setelah bunting, mencit dikelompokkan menjadi tiga kelompok secara random yaitu kelompok kontrol yang diberi larutan fisiologis, kelompok uji I diberi diazepam dengan dosis 8 mg/KgBB dan kelompok uji II diberi diazepam dengan dosis 16 mg/KgBB. Pemberian bahan dilakukan secara intraperitoneal selama fase embriogenesis yaitu gestasi hari ke 9 sampai 15.

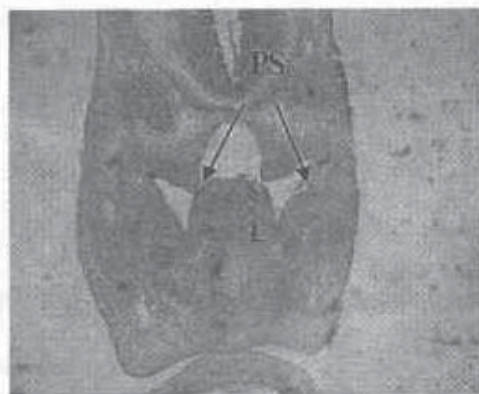
Induk mencit dikorbankan dengan cara dislokasi servikal pada gestasi hari ke 15. Induk mencit dibedah, embrio diambil, dibersihkan dengan larutan fisiologis. Bagian kepala embrio diambil. Embrio difiksasi dalam larutan buffer formalin 10 %, kemudian jaringan diproses dalam pemrosesan rutin sampai dalam bentuk blok parafin dan dipotong dengan potongan seri. Palatum embrio diperoleh dengan membuat irisan frontal kepala (5 µm), diwarnai dengan haematoxylin-eosin (HE).

Untuk penilaian ekspresi protein caspase-9, potongan jaringan diproses dengan teknik imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal, yaitu monoklonal anti-caspase-9, sesuai protokol standar.

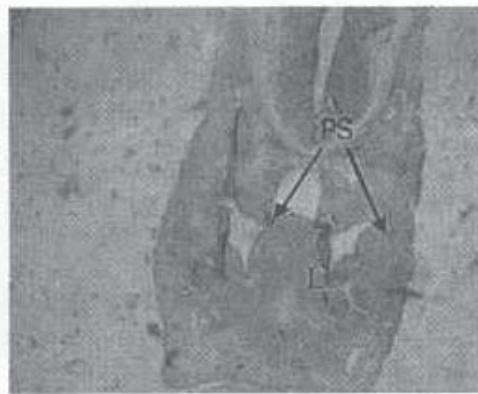
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembentukan wajah dan rahang merupakan suatu proses yang melibatkan migrasi sel, proliferasi, diferensiasi dan apoptosis. Normalnya, langit-langit mulut dilapisi palatum keras dan lunak (*hard and soft palate*) yang memisahkan rongga mulut dan rongga hidung (Gritli-Linde, 2006 ; Charoenchaikom *et al.*, 2009).

Hasil pemeriksaan histologi menunjukkan bahwa pada kelompok uji tidak terjadi penyatuan lempeng palatum pada embrio usia gestasi hari ke 15, sehingga terbentuk celah palatum (*cleft palate*). Sedangkan pada kelompok kontrol terjadi penyatuan lempeng palatum, sehingga terjadi pemisahan antara rongga hidung dan mulut. Seharusnya pada gestasi hari ke 15 sudah terjadi penyatuan kedua lempeng palatum (*palatal fusion*), tetapi pada embrio kelompok uji baik pada pemberian diazepam dosis 8 mg/KgBB dan 16 mg/KgBB, tahap



(A)



(B)

Gambar 1. Hasil Histologi Kelompok Uji I (A) dan Uji II (B)

bawaan di daerah kraniofasial pada bayi baru lahir yang paling sering ditemui (Iseki *et al*, 2007). Cacat ini mengakibatkan gambaran wajah yang abnormal dan gangguan bicara sehingga membutuhkan penanganan yang ekstensif (Meng *et al.*, 2009). Pembentukan palatum, organ yang memisahkan rongga mulut dan rongga hidung merupakan suatu proses yang berlangsung cepat dalam perkembangan embrio vertebrata, membutuhkan beberapa tahapan kritis. Kegagalan dalam tahapan proses tersebut menyebabkan terjadinya celah palatum (Gritli-Linde, 2007; Sheng-Jun, *et al*, 2008).

Proses penyatuan lempeng palatum dibutuhkan program kematian sel (apoptosis). Apoptosis merupakan proses yang penting dalam perkembangan atau pembentukan organ, peristiwa tersebut dapat dipengaruhi oleh sejumlah faktor eksternal baik secara *in vitro* maupun *in vivo* (Vitale, *et al.*, 2005).

Proses apoptosis melibatkan serangkaian kerja enzim dan protein. Suatu penyimpangan pemlihan gen yang terekspresi atau protein yang tersintesis menyebabkan perkembangan abnormal atau kelainan embrio. Bila hal tersebut terjadi pada saat sel atau jaringan akan membentuk organ, akan terjadi kelainan atau malformasi. Caspase-9 merupakan salah satu protein caspase inisiator terjadinya apoptosis (Darmanto, 2007; Vitale, *et al.*, 2005).

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi pengaruh pemberian diazepam di periode organogenesis terhadap gambaran histologi dan ekspresi protein caspase-9 pada palatum sekunder mencit prenatal.

**METODOLOGI**

Hewan Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih (*Mus musculus*), strain BALB/C, betina, dewasa, bunting, berat badan 20-40 gram. serta embrio mencit yang diperoleh pada gestasi hari ke 15 dari masing-masing induk. Bahan uji Diazepam yang digunakan adalah valium produksi Roche, setiap ampul berisi 5 mg/ml.

Mencit bunting diperoleh dengan cara mengumpulkan dua ekor mencit betina yang sedang

dalam fase estrus dalam satu kandang dengan satu ekor mencit jantan fertil semalaman. Apabila besok harinya, dijumpai sumbat vagina, maka pada hari itu ditetapkan sebagai gestasi hari ke-0. Setelah bunting, mencit dikelompokkan menjadi tiga kelompok secara random yaitu kelompok kontrol yang diberi larutan fisiologis, kelompok uji I diberi diazepam dengan dosis 8 mg/KgBB dan kelompok uji II diberi diazepam dengan dosis 16 mg/KgBB. Pemberian bahan dilakukan secara intraperitoneal selama fase embriogenesis yaitu gestasi hari ke 9 sampai 15.

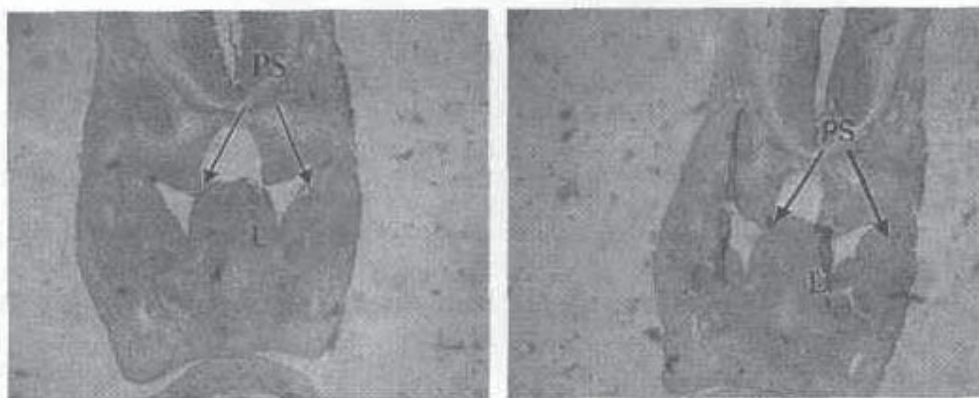
Induk mencit dikorbankan dengan cara dislokasi servikal pada gestasi hari ke 15. Induk mencit dibedah, embrio diambil, dibersihkan dengan larutan fisiologis. Bagian kepala embrio diambil. Embrio difiksasi dalam larutan buffer formalin 10 %, kemudian jaringan diproses dalam pemrosesan rutin sampai dalam bentuk blok parafin dan dipotong dengan potongan seri. Palatum embrio diperoleh dengan membuat irisan frontal kepala (5 µm), diwarnai dengan haematoxylin-eosin (HE).

Untuk penilaian ekspresi protein caspase-9, potongan jaringan diproses dengan teknik imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal, yaitu monoklonal anti-caspase-9, sesuai protokol standar.

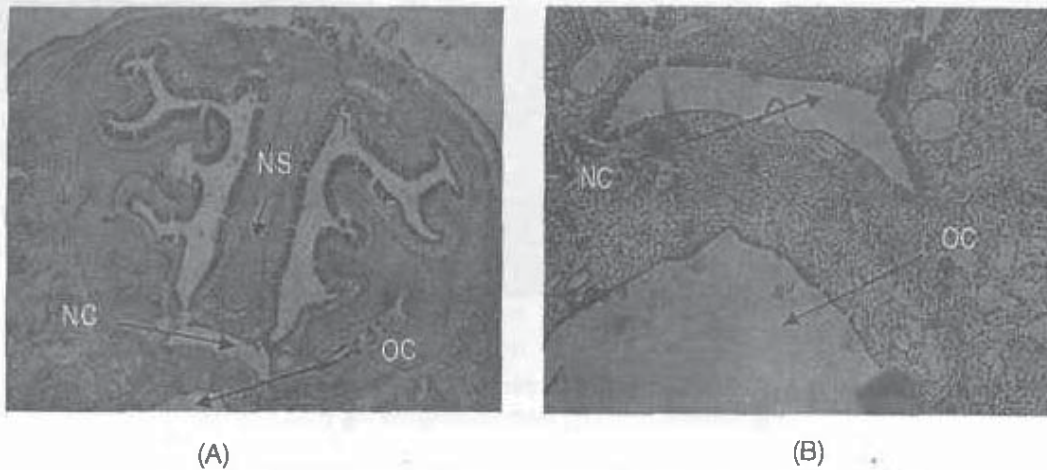
**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Pembentukan wajah dan rahang merupakan suatu proses yang melibatkan migrasi sel, proliferasi, diferensiasi dan apoptosis. Normalnya, langit-langit mulut dilapisi palatum keras dan lunak (*hard and soft palate*) yang memisahkan rongga mulut dan rongga hidung (Gritli-Linde, 2006 ; Charoenchaikom *et al.*, 2009),

Hasil pemeriksaan histologi menunjukkan bahwa pada kelompok uji tidak terjadi penyatuan lempeng palatum pada embrio usia gestasi hari ke 15, sehingga terbentuk celah palatum (*cleft palate*). Sedangkan pada kelompok kontrol terjadi penyatuan lempeng palatum, sehingga terjadi pemisahan antara rongga hidung dan mulut. Seharusnya pada gestasi hari ke 15 sudah terjadi penyatuan kedua lempeng palatum (*palatal fusion*), tetapi pada embrio kelompok uji baik pada pemberian diazepam dosis 8 mg/KgBB dan 16 mg/KgBB, tahap



(A) (B)  
Gambar 1. Hasil Histologi Kelompok Uji I (A) dan Uji II (B)



Gambar 2. Hasil Histologi Kelompok Kontrol

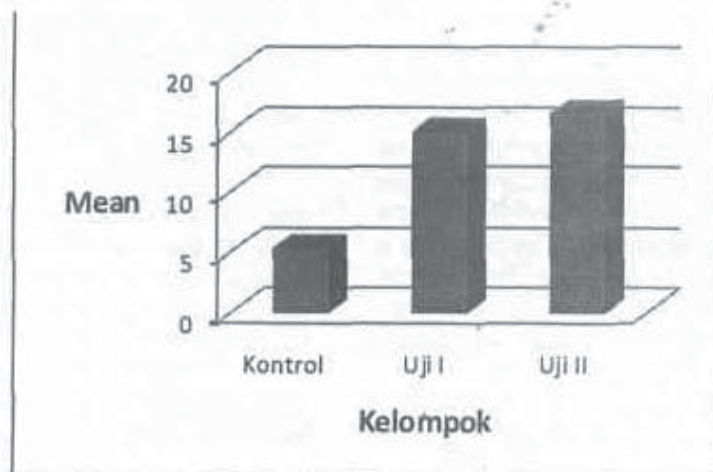
palatogenesis terhenti pada pertumbuhan vertikal (*palatal shelves elevation*). Kesulitan yang ditemui pada pemeriksaan histologi adalah sulitnya pemotongan palatum pada pemeriksaan histologi, karena ukuran embrio yang sangat kecil, apalagi pada umur gestasi ke 15.

Pada gambar 1. terlihat potongan frontal melalui kepala embrio mencit usia gestasi 15 hari, kelompok uji I yang diberi diazepam dengan dosis 8 mg/kgBB (A), kelompok uji II yang diberi diazepam dengan dosis 16 mg/kgBB (B). Menggunakan pewarnaan Haematoxylin eosin, diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 40x. Lempeng palatum terlihat disisi kiri dan kanan lidah dalam posisi vertikal. L : lidah, PS: Palatum sekunder

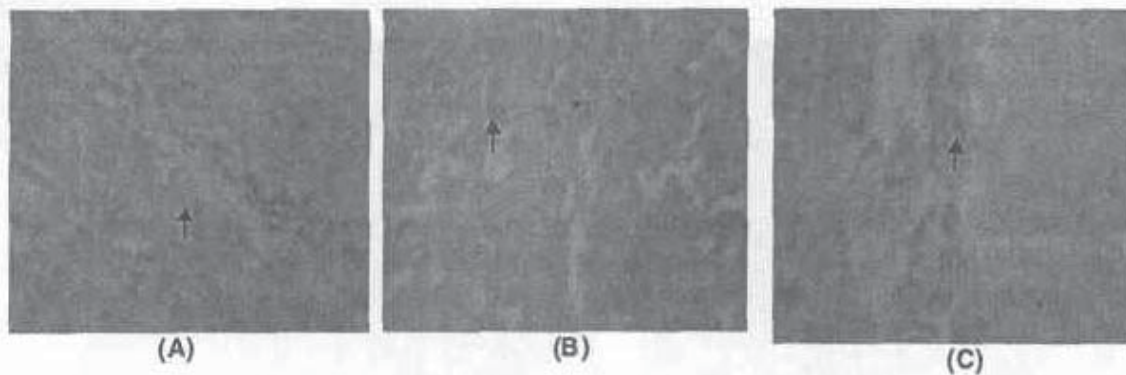
Pada gambar 2. Terlihat potongan frontal melalui kepala embrio mencit usia gestasi 15 hari, menggunakan pewarnaan Haematoxylin eosin. Kedua lempeng telah menyatu satu sama lain, terjadi pemisahan rongga hidung dan mulut. Gambar A, diamati

dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x, gambar B dengan perbesaran 100x. NC : nasal cavity, NS: nasal septum, OC : oral cavity

Palatogenesis dibedakan atas 4 tahap, yaitu pertumbuhan awal lempeng palatum (*initial palatal shelves growth*) dimana terjadi pembesaran lempeng palatum dan berkembang pada posisi bilateral disamping lidah, yang terjadi sekitar hari ke 11 pada embrio mencit, pertumbuhan seperti mendaki (*shelves elevation*) yang terjadi sekitar hari ke 12,5-14, pertumbuhan horizontal (*horizontal shelves growth*) pada hari ke 14,5-15, dan penyatuan lempeng (*palatal fusion*). Tahap pertumbuhan reorientasi ke arah horizontal hanya membutuhkan waktu yang singkat yaitu beberapa menit hingga jam. Setelah itu lempeng palatum yang kini sudah menempati posisi di atas lidah akan tumbuh saling mendekat secara horizontal dari kedua arah hingga terjadi kontak antara kedua ujungnya. Proses tumbuh horizontal melibatkan



Gambar 3. Grafik Rerata Jumlah Sel yang Mengekspresikan Protein Caspase-9 Pada Kelompok Kontrol, Uji I dan Uji II



**Gambar 4. Sel epitel yang mengekspresikan protein Caspase-9 pada kelompok kontrol (A), kelompok uji I (B) dan kelompok uji II (C)**

aktivitas pembelahan sel dan sintesis senyawa matriks ekstrasel (Gritti-Linde, 2007; Charoenchaikorn *et al.*, 2009).

Berdasarkan periode waktu pembentukan palatum tersebut, maka pemberian bahan uji diazepam diberikan pada gestasi hari ke 9 sampai 15. Hasil histologi, menunjukkan terbentuknya celah palatum pada kelompok uji, dimana pembentukan palatum terhenti pada pertumbuhan vertikal (*palatal shelves elevation*), yang normalnya pada embrio mencit berlangsung pada gestasi hari ke ke 12,5–14. Pada hari ke 15, lempeng palatum seharusnya sudah menyatu, sehingga palatum terbentuk sempurna, memisahkan rongga mulut dan rongga hidung. Pada kelompok kontrol sudah terbentuk rongga hidung, menunjukkan bahwa lempeng palatum menyatu.

Eksresi caspase-9 semua kelompok perlakuan menunjukkan peningkatan signifikan ( $p < 0.05$ ), tapi tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok uji I dan uji II (0.429). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian diazepam selama periode organogenesis memicu aktivitas caspase inisiator caspase-9 yang mencerminkan terjadinya peningkatan apoptosis jalur intrinsik.

Menggunakan monoklonal anti caspase-9, pengamatan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Tanda panah menunjukkan sel yang mengekspresi protein caspase-9. Proses penyatuan lempeng pembentukan palatum sekunder (*secondary palate shelf fusion*) dibutuhkan program kematian sel (apoptosis), dan proses ini dapat dipengaruhi oleh zat teratogen (Cuervo *et al.*, 2002). Ketidakseimbangan antara pro dan anti-apoptotik anggota kelompok Bcl-2 dapat menyebabkan pelepasan faktor seperti cytochrome c, afaf-1, *apoptosis-inducing factor* (AIF) dan Smac/Diablo, yang bertanggung jawab atas terjadinya aktivasi caspase inisiator dan eksekutor. Caspase-9 merupakan salah satu protein caspase inisiator (Vitale, *et al.*, 2005).

Pada penelitian ini terbukti terjadi peningkatan ekspresi protein Caspase-9, yang bermakna pada kelompok uji dengan metode imunohistokimia

menggunakan antibodi spesifik untuk masing-masing protein. Caspase-9 adalah protease inisiator apoptosis yang diaktivasi sebagai respon terhadap kerusakan mitokondria oleh berbagai faktor, yang menandai terjadinya apoptosis jalur intrinsik. Apoptosis merupakan mekanisme kontrol yang esensial terhadap kualitas dan jumlah sel, yang sangat penting dalam pembentukan atau perkembangan jaringan. Caspase-9 merupakan inisiator caspase sentral.

Hasil menunjukkan bahwa penggunaan diazepam pada periode organogenesis menyebabkan terjadinya celah palatum pada mencit prenatal. Pada umumnya data toksisitas diperoleh dari eksperimen pada hewan. Hasil satu studi harus diinterpretasikan dengan memperhatikan hasil studi toksisitas lainnya dan harus mempertimbangkan keterbatasan bila data dari uji pada hewan diekstrapolasikan dengan kondisi paparan pada manusia.

Penggunaan obat selama kehamilan sebaiknya dihindari untuk mencegah terjadinya efek teratogenesis dan efek buruk lainnya pada fetus atau bayi baru lahir, karena setiap obat menimbulkan berbagai reaksi yang tidak diinginkan (*adverse effects*) dengan mekanisme kerja yang berbeda-beda dan tingkat resiko yang beragam. Pengaruh buruk obat terhadap janin, secara umum dapat bersifat toksik, teratogenik, maupun letal, tergantung pada sifat obat, dosis, lama paparan dan umur kehamilan pada saat minum obat (De Santis, *et al.*, 2004; Mulder, 2006). Efek tersebut berkorelasi dengan konsentrasi obat dalam serum ibu.

Diazepam dan metabolitnya, N-desmethyldiazepam, aktif secara farmakologis, dapat melewati plasenta secara bebas pada awal kehamilan, karena solubilitas lipid yang tinggi. Diazepam memiliki beberapa efek pada proses perkembangan embrio seperti pembelahan sel, mitosis dan interaksi antar sel, sehingga memungkinkan timbulnya efek teratogenik pada embrio (Cannizzaro *et al.*, 2005; Marinucci, 2008).



**KESIMPULAN DAN SARAN****Kesimpulan**

Pemberian diazepam pada periode organogenesis menyebabkan gangguan pembentukan palatum sekunder sehingga terjadi celah palatum (*cleft palate*) pada mencit prenatal serta meningkatkan jumlah sel epitel palatum, yang mengekspresikan protein caspase-9, yang merupakan protein inisiator apoptosis mitokondria.

**Saran**

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui bagaimana pengaruh diazepam terhadap program kematian sel (apoptosis).

**UCAPAN TERIMAKASIH**

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Penelitian Program Doktor (S3)

**DAFTAR PUSTAKA**

- Cannizzaro, E.M, martier, M, Gagliano, F, Plescia, M., La Barbera, G., Mantia, A., Mineo, G., Cannizzaro and Cannizzaro C, 2005. Reversal of prenatal diazepam induced deficit in a spatial-object learning task by brief, periodic maternal separation in adult rats. *Behavioural Brain Research* 161, 320-330
- Charoenchaikorn, K., Yokomizo, T., Rice, D.P., Honjo, T., Matsuzaki, K., Shintaku, Y., Imai, Y., Wakamatsu, A., Takahashi, S., Ito, Y., Takano-Yamamoto, T., Thesleff, I., Yamamoto, M., Yamashiro, T., 2009. Runx1 is involved in the fusion of the primary and the secondary palatal shelves. *Developmental Biology* 326, 392-402.
- Cuervo, R., Vaencia, C., Chandraratna, R., Covarrubias, 2002. Programmed cell death is required for palate shelf fusion and is regulated by retinoic acid. *Developmental Biology* 245, 145-156
- Damanto, W., 2007. Pendekatan Teratology Molekuler sebagai Dasar Menurunkan Insiden Janin Cacat serta usaha Menciptakan Generasi Berkualitas. Pidata pengukuhan Guru Besar dalam bidang Biologi Reproduksi. Universitas Airlangga.
- De Santis, M., Straface, G., Carducci, B., Cavaliere, A. F., De santis, L., Lucchese A., Merolea, A.M., Caruso, A., 2004. Risk of drug-induced congenital defects. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 117, 10-19
- Gidai, J., Acs, N., Banhidy, F., Czeizel, AE., 2008. No association found between use of very large doses of diazepam by 112 pregnant women for a suicide attempt and congenital abnormalities in their offspring. *Toxicology and industrial health* 24, 29-39
- Gritti-Linde A, 2007. Molecular control of secondary palate development. *Developmental Biology* 301, 309-326
- Headley, J., Northstoen, K., Simmons, H., Golding, J., and the ALSPAC study team, 2004. Medication use during pregnancy: data from the Avon longitudinal study of parents and children. *European Journal Clinical Pharmacology* 60, 355 – 361.
- Iqbal, MM., Sobhan, T., Ryals, T., 2002. Effects of Commonly Used Benzodiazepines on The Fetus, The Neonate and The Nursing Infant. *Psychiatric Services* 53, 39-49
- Iseki, S., Ishii-Suzuki, M., Tsunekawa, N., Yamada, Y., Eto K and Kunihiro Obata., 2007. Experimental induction of palate shelf elevation in glutamate decarboxylase 67-deficient mice with cleft palate due to vertically oriented palatal sheft. *Birth defects research (part A)* 79, 688-695
- Marunucci. L., Balloni, S., Bodo, M., Carinci, F., Pezzetti, F., Stabellini, G., Carmela, C Lumare, E., 2008. Patterns of some extracellular matrix gene expression are similar in cells from cleft lip-palate patients and in human palatal fibroblasts exposed to diazepam in culture. *Toxicology* 257, 10-16
- Meng, L., Bian, Z., Torensma, R and J.W. Von den Hof., 2009. Biological Mechanisms in Palatogenesis and Cleft Palate. *Journal of Dental Research* 88, 22-33
- Mulder, G. J., Dencker, L., 2006. Pharmaceutical Toxicology. Pharmaceutical Press. UK
- Sheng-jun, L.U., Wei H.E., Bing S.H., Tian M.E.N.G., Xiang-yu L.I., Yu-rong L.I.U., 2009. A preliminary study on the teratogenesis of dexamethasone and the preventive effect of vitamin B12 on murine embryonic palatal shelf fusion in vitro. *Journal of Zhejiang University Science B* 4, 306-312
- Vitale, I., Antoccia, A., Crateri, P., Leone, S., Arancia, G., Tanzarella, C., 2005. Caspase-independent apoptosis is activated by diazepam-induced mitotic failure in HeLa cells, but not in human primary fibroblast. *Apoptosis* 10, 909-920

