

**PENGARUH PEMBERIAN ALPHA LIPOIC ACID TERHADAP PERKEMBANGAN EMBRIO
IN VIVO PADA MENCIT (*Mus musculus*) YANG TERPAPAR ASAP ROKOK**

**THE EFFECT OF ALPHA LIPOIC ACID ON BLASTOCYST EMBRYO DEVELOPMENT IN
VIVO IN MICE (*Mus musculus*) EXPOSED CIGARETTE SMOKE**

Syahrudin Said^{1*}, Adi Setyawan Prianto², dan Senri Utami Pramadipta²

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong, 16911

²Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, 53122

Submitted: 1 May 2017, Accepted: 3 October 2017

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *alpha lipoic acid* (ALA) terhadap perkembangan embrio blastosis *in vivo* pada mencit (*Mus musculus*) yang terpapar asap rokok. Penelitian ini menggunakan 30 ekor mencit dibagi menjadi 6 kelompok faktorial 2x3. Faktor A adalah perlakuan pemberian ALA (0; 16,5 µM; 49,5 µM) per oral, dan faktor B adalah perlakuan asap rokok (dengan dan tanpa asap rokok). Pemberian asap rokok dilakukan dengan menutup kandang dengan plastik memiliki dua lubang untuk asap rokok dan aliran udara. Data yang diperoleh diolah menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial 2x3, dilanjutkan uji parametrik *analysis of variance* (ANOVA) dan independent sample t-test, serta uji *Post Hoc Duncan*. Perkembangan embrio mencit mencapai tahap blastosis pada pemberian ALA dengan dosis 16,5 µM (16,00±7,12) berpengaruh nyata lebih tinggi ($p<0,05$) dibandingkan dengan kontrol negatif (13,50±1,73), akan tetapi tidak berpengaruh nyata dengan ALA dosis 49,5 µM (19,25±4,03). Perkembangan embrio blastosis mencit yang terpapar dengan asap rokok (7,25±2,99), nyata lebih rendah ($p<0,05$) dibandingkan dengan control negatif. Ketika mencit yang terpapar asap rokok diberikan ALA, perkembangan embrio blastosis kembali normal seperti pada kontrol, dimana dosis 16,5 µM dan 49,5 µM tidak berbeda nyata. Dapat disimpulkan bahwa (1) ALA dosis 16,5 µM dan 49,5 µM berpengaruh positif terhadap perkembangan blastosis *in vivo*, (2) asap rokok berpengaruh negatif terhadap perkembangan blastosis, (3) ALA 16,5 µM dan 49,5 µM per oral mampu menangkal radikal bebas akibat paparan asap rokok.

(Kata kunci : ALA, Blastosis, Asap rokok, *In vivo*, Mencit, Perkembangan embrio)

ABSTRACT

This study was conducted to find out effect of alpha lipoic acid (ALA) on the development of in vivo blastocyst embryo in mice (Mus musculus) exposed in cigarettes smoke. This study used 30 mice divided into 6 treatment groups factorial 2x3. Factor A is treatment of ALA (0; 16.5 µM; 49.5 µM) per orally. Factor B is the treatment of cigarette smoke (with and without cigarette smoke). Giving cigarette smoke was done by covering the cage with plastic having two holes for cigarette smoke and airflow. The data obtained were analyzed using a complete randomized design (RAL) 2x3, followed by parametric Analysis of Variance (ANOVA) and independent sample T-Test, and Post Hoc Duncan test. The development of embryo of mice reaching blastocyst stage at ALA with dose 16.5 µM (16.00±7.12) were significantly higher ($p<0.05$) than negative control (13.50±1.73), but no significant effect with ALA dose 49.5 µM (19.25±4.03). The development of mice blastocyst embryos exposed to cigarette smoke (7.25±2.99) were significantly lower ($p<0.05$) compared with negative control. When the mice exposed to cigarette smoke were given ALA, the development of the blastocyst embryo returned to normal as in control, where the doses of 16.5 µM and 49.5 µM were not significantly different. It can be concluded that (1) ALA dose 16.5 µM and 49.5 µM have positive effect on blastocyst development in vivo, (2) cigarette smoke have negative effect on blastocyst development, (3) ALA 16.5 µM and 49.5 µM per orally capable counteract the oxidative stress caused by exposure to cigarette smoke.

(Key words: ALA, Blastocyst, Cigarette smoke, Development embryos, *In vivo*, Mice)

* Korespondensi (corresponding author):

Telp. +62 811112441

E-mail: syahrudinsaid01@gmail.com

Pendahuluan

Radikal bebas dapat menyebabkan stres oksidatif dan menjadi salah satu faktor penyebab terjadinya gangguan perkembangan embrio (Anggraini, 2006). Radikal bebas bersifat magnetik dan reaktif yang dapat menimbulkan kerusakan atau kematian sel (apoptosis) dalam tubuh (Said et al., 2011). Secara umum radikal bebas merupakan molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan di orbit luar dan bersifat tidak stabil. Untuk mencapai kestabilannya maka molekul reaktif akan mencari elektron pasangannya sehingga disebut *reactive oxygen species* (ROS) (Medicinus, 2011).

Rokok merupakan salah satu sumber utama radikal bebas yang berasal dari lingkungan. Rokok mengandung 4000 senyawa kimia diantaranya nikotin, tar, mutagen atau karsinogen, dan konstituen lainnya (Claudia et al., 2013). Salah satu kandungan bahan kimia dalam asap rokok yang dapat mempengaruhi implantasi adalah nikotin. Nikotin dapat menekan kadar estrogen yang berpengaruh terhadap penurunan fertilitas ovarium dan kejadian keguguran lebih tinggi (Oktavianis, 2011). Pemberian nikotin baik secara langsung maupun tidak langsung dapat menghambat proses pembelahan sel, menghambat pembentukan blastosis, dan mencegah terjadinya implantasi bahkan mengganggu perkembangan awal embrio (Card dan Mitchell, 1979).

Salah satu cara untuk menangkal radikal bebas adalah dengan melakukan pemberian antioksidan. Antioksidan memiliki peran aktif dalam menangkap radikal bebas dengan memberikan atom hidrogen sehingga menjadi radikal baru yang bersifat lebih stabil. ALA merupakan antioksidan baik dalam bentuk teroksidasi maupun tereduksi sehingga disebut juga antioksidan universal. ALA berperan dalam regenerasi dan perpanjangan masa aktif antioksidan glutathion, koenzim Q10, vitamin C, dan vitamin E serta dapat menekan respon inflamasi dengan cara menghambat jalur sinyal molekuler yang teraktivasi oleh sitokin proinflamatori seperti tumor necrosis factor- α (Carlson et al., 2007).

Penelitian ini bertujuan mengetahui efek ALA terhadap perkembangan embrio

blastosis *in vivo* pada mencit (*Mus musculus*) yang dipapar asap rokok.

Materi dan Metode

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang mencit, timbangan digital, sonde lambung, *syringe* 3 cc, *syringe* 1 cc, gelas ukur, *petridish* 90x90 mm (Corning®), pipet hisap modifikasi, *micro pipet* (Eppendorf®), tip 10-100 dan 1000 μ l, perangkat alat bedah, *microscope stereo* (Olympus SZ21®), *inverted microscope* (Zeiss®), *magnetic stirrer*, *laminar air flow horizontal* (Telstar BH 100®), dan *warming plate* HT 400 (minitube®).

Hewan coba

Penelitian ini menggunakan mencit (*Mus musculus*) betina strain DDY sebanyak 30 ekor. Mencit yang digunakan memiliki kriteria inklusi, yaitu mencit (*Mus musculus*) betina strain DDY, sedang tidak bunting, berat badan berkisar 20-25 gram dan berumur antara 2-3 bulan dengan keadaan normal dan sehat. Kriteria eksklusi, yaitu hewan coba tampak sakit, sedang bunting, dan terjadi peningkatan atau penurunan berat badan >10%. Kriteria *drop out*, yaitu mencit mati selama penelitian berlangsung. Hewan coba diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), dan telah mendapatkan persetujuan komite etika penelitian kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran.

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah hewan coba mencit strain DDY, ALA kaplet dengan komposisi Alpha Lipoic Acid 600 mg, aquades rokok dengan komposisi 5,31 mg, Pregnant Mare Serum Gonadotropine (PMSG) dan Human Chorionic Gonadotropine (HCG), serta medium M2. Medium M2 mengandung 94,6 mM Natrium Chloride (NaCl), 4,78 mM Kalium Chloride (KCl), 1,71 mM Calcium Chloride (CaCl₂), 1,19 mM Kalium Hidrogen Phosphate (KH₂PO₄), 1,19 mM Magnesium Sulfate (MgSO₄), 25,0 mM Natrium Asam Karbonat (NaHCO₃), 5,56 mM glucose, 23,28 mM sodium lactate, 0,33 mM sodium pyruvate, 4 mg/ml Bovine Serum Albumine (BSA) (A-7638; Sigma Chemical Co., St

Louis, MO), 75 µg/ml potassium penicillin G, 50 µg/ml streptomycin sulphate, 20 mM HEPES digunakan untuk koleksi embrio pada hari ke-3 kebuntingan.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *post test only with control group design* yang menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) betina strain DDY. Sebanyak 30 ekor mencit diambil secara acak sesuai dengan kriteria inklusi, selanjutnya dibagi menjadi 6 kelompok pola faktorial 2x3. Faktor A adalah perlakuan pemberian ALA (0; 16,5 µM; 49,5 µM) per oral, dan faktor B adalah perlakuan asap rokok (dengan dan tanpa asap rokok). Pemberian asap rokok dilakukan dengan menutup kandang dengan plastik memiliki dua lubang untuk asap rokok dan aliran udara. Setiap kelompok hewan coba ditempatkan pada kandang dengan ukuran, bentuk dan bahan yang sama 60 x 30 x 15 cm dengan alas sekam, mendapat makanan dan minuman dengan jenis, jumlah dan komposisi yang sama secara *ad libitum*, serta mendapatkan paparan radikal asap rokok dengan jumlah dan waktu yang sama. Paparan asap rokok diberikan selama 7 hari sebelum fertilisasi dan 3 hari setelah fertilisasi.

Superovulasi dan koleksi embrio

Superovulasi dilakukan dengan penyuntikan 5 IU PMSG diikuti penyuntikan 5 IU hCG secara intraperitoneal. Penyuntikan PMSG dilakukan pada pertengahan siklus terang, yaitu pada pukul 15.00, sedangkan penyuntikan hCG dilakukan 48 jam setelah PMSG. Selanjutnya mencit dikandangkan dengan mencit jantan dengan perbandingan 1 : 1. Mencit yang berhasil kawin ditandai dengan adanya sumbat vagina dipelihara secara terpisah sampai koleksi embrio dilakukan. Embrio dikoleksi setelah 84 jam (3,5 hari) pasca penyuntikan hCG. Mencit di terminasi dengan cara *dislokasi cervical* yang sebelumnya dilakukan anestesi dengan ketamin. Mencit yang telah di terminasi lalu dibedah dan diambil uterus untuk dilakukan koleksi embrio dengan cara *flushing* pada kedua kornu uterus menggunakan medium M2. Tahapan perkembangan pembelahan sel embrio yang terkoleksi kemudian diamati dan dicatat.

Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan statistik Rancangan Acak Lengkap (RAL) Pola Faktorial 2x3. Data hasil pengamatan sebelumnya diuji dengan uji *Saphiro-Wilk* untuk melihat normalitas distribusi data. Homogenitas data diuji menggunakan *Levene Test*. Jika data terdistribusi normal dan homogen, maka analisis data dilanjutkan dengan uji parametrik ANOVA dan *Independent Sample T-Test*. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* Duncan untuk melihat signifikansi perbedaan antar kelompok. Semua uji dilakukan dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) (Dahlan, 2011).

Hasil dan Pembahasan

Pengaruh ALA terhadap perkembangan embrio blastosis *in vivo* pada mencit

Efek ALA terhadap perkembangan embrio blastosis *in vivo* pada mencit (*Mus musculus*) dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa embrio hasil fertilisasi *in vivo* pada mencit yang terpapar asap rokok, setelah pemberian ALA mampu tumbuh dan berkembang hingga tahap blastosis. ALA dengan dosis 16,5 µM berpengaruh nyata lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif, dan tidak berpengaruh nyata dengan kelompok ALA dosis 49,5 µM. Molyneux *et al.* (2008) menjelaskan bahwa ALA memiliki peran dalam proses regenerasi dan perpanjangan masa aktif koenzim Q10. Koenzim Q10 merupakan komponen yang sangat penting dalam rantai transpor elektron mitokondria dan diperlukan untuk pembentukan ATP, sedangkan perkembangan blastosis membutuhkan energi yang tinggi (Feugang *et al.*, 2009). Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ALA dapat membantu memberikan energi dan embrio dapat berkembang menjadi blastosis dengan baik.

Rata-rata perkembangan folikel, maturasi oosit, dan perkembangan embrio lebih tinggi pada kelompok dengan pemberian ALA dibandingkan kelompok tanpa pemberian ALA (Hatami *et al.*, 2014). ALA dengan dosis 100 µM memiliki rata-rata perkembangan folikel, oosit, dan perkembangan embrio lebih tinggi dibandingkan kelompok lainnya serta dapat menurunkan ROS dan meningkatkan total antioxidant capacity (TAC) setelah dilakukan

Tabel 1. Pengaruh ALA terhadap perkembangan embrio blastosis *in vivo* pada mencit (*Mus musculus*)
(effect of ALA on embryo blastocyst development *in vivo* in mice (*Mus musculus*))

Perlakuan (<i>treatment</i>)	Jumlah embrio (<i>embryo total</i>) (n)	Perkembangan awal embrio (rerata ± SD) (<i>embryo development (average ± SD)</i>)		
		8-16 sel 8-16 Cel	Morula Morulae	Blastosis Blastocyst
Kontrol Negatif	81	1,50±1,29	5,25±1,26	13,50±1,73 ^a
ALA 16,5 µM	92	0,25±0,5	6,00±2,94	16,00±7,12 ^b
ALA 49,5 µM	102	0,5±0,58	5,55±2,08	19,25±4,03 ^b

^{a,b} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$) (*different superscripts at the same column indicate significant differences (p < 0.05)*).

kultur selama 96 jam (Talebi *et al.*, 2012). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ALA memiliki peran yang baik dalam proses oksidatif piruvat dalam mempersiapkan sumber energi yang dibutuhkan selama perkembangan embrio (Harris, 2002; Johnson *et al.*, 2007). Namun apabila ALA diberikan pada dosis tinggi dalam jangka waktu lama, dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak, penghancuran mitokondria, dan menghambat sintesis glikogen (Moini *et al.*, 2002; Cakatay, 2006).

Pengaruh asap rokok terhadap perkembangan embrio blastosis *in vivo* pada mencit

Efek radikal bebas asap rokok terhadap perkembangan embrio blastosis *in vivo* pada mencit dapat dilihat pada Tabel 2. Data tersebut di atas menunjukkan bahwa pemberian radikal bebas asap rokok secara signifikan ($p < 0,05$) berpengaruh negatif terhadap perkembangan embrio blastosis *in vivo*. Merokok merupakan pola hidup yang tidak sehat yang dapat mengakibatkan gangguan pada sistem reproduksi (Paine *et al.*, 2013), salah satu dampak terhadap reproduksi adalah infertilitas (Sumiati, 2012).

Asap rokok mengandung berbagai senyawa kimia salah satunya adalah nikotin yang dapat menghasilkan radikal bebas serta menekan kadar antioksidan endogen

sehingga terjadi stres oksidatif (Oktavianis, 2011). Stres oksidatif dapat mengganggu mekanisme perbaikan diri mitokondria sehingga akan memicu proses autofagi. Autofagi yang terjadi terus menerus dapat menyebabkan kematian sel dan mitokondria tidak mampu lagi untuk menghasilkan energi yang dibutuhkan dalam proses fertilisasi dan implantasi, sehingga akan berdampak pada gangguan terbentuknya blastokista (Valavanidis *et al.*, 2009; Gannon, 2013).

Nikotin memiliki pengaruh terhadap penurunan fertilitas ovarium, peningkatan kejadian keguguran, proses pembelahan sel, menghambat pembentukan blastosis, dan mencegah terjadinya implantasi bahkan mengganggu masuknya embrio ke rongga rahim (Oktavianis, 2011). Hasil penelitian ini juga memperlihatkan kejadian degenerasi embrio setelah pemberian pengasapan nyata lebih tinggi ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol tanpa pengasapan. Hasil ini mengindikasikan bahwa pemberian asap rokok pada mencit meningkatkan kejadian degenerasi embrio.

Campbell *et al.* (2004) menyatakan bahwa perkembangan embrio membutuhkan oksigen dalam aktivitasnya atau kondisi aerobik. Asap rokok yang mengandung karbon monoksida akan mengurangi kerja haemoglobin yang memiliki fungsi mengikat oksigen ke seluruh tubuh, sehingga

Tabel 2. Efek radikal bebas terhadap perkembangan embrio blastosis *in vivo* pada mencit (*Mus musculus*)
(effect of free radical on blastocyst embryo development *in vivo* in mice (*Mus musculus*))

Perlakuan (<i>treatment</i>)	Jumlah embrio (<i>embryo total</i>) (n)	Perkembangan awal embrio (rerata ± SD) (<i>embryo development (average ± SD)</i>)		
		8-16 sel 8-16 Cel	Morula Morulae	Blastosis Blastocyst
Kontrol Negatif	81	1,50±1,29	5,25±1,26	13,50±1,73 ^a
Kontrol Positif	73	0,75±0,96	6,25±1,26	7,25±2,99 ^b

^{a,b} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$) (*different superscripts at the same column indicate significant differences (p < 0.05)*).

adanya asap rokok dapat mengganggu distribusi oksigen yang akan berpengaruh terhadap perkembangan embrio (Oktavianis, 2011). Stres oksidatif akibat asap rokok dapat menyebabkan terjadinya kegagalan mekanisme perbaikan diri mitokondria sehingga terjadi kematian sel granulosa folikel yang berdampak pada gangguan folikulogenesis (Gannon, 2013). Bordel *et al.* (2006) menyatakan bahwa nikotin terbukti dapat mempengaruhi folikulogenesis hamster setelah diberikan nikotin selama 7 hari. Penelitian serupa telah dilakukan oleh Marhaeni (2009), dijelaskan bahwa paparan asap rokok pada mencit betina selama 7 minggu dapat mengakibatkan gangguan folikulogenesis. Kelainan fertilitas lain yang disebabkan oleh paparan asap rokok adalah menebalnya zona pelusida dari sel telur sehingga sel telur sulit ditembus sperma saat proses fertilisasi. Hal ini dapat terjadi baik pada perokok aktif maupun pasif (Shiloh *et al.*, 2004).

Pengaruh ALA terhadap perkembangan embrio blastosis *in vivo* pada mencit terpapar asap rokok

Pengaruh ALA terhadap perkembangan embrio blastosis *in vivo* pada mencit (*Mus musculus*) yang dipapar asap rokok dapat dilihat pada Tabel 3.

Data pada Tabel 3 menunjukkan bahwa pemberian ALA dengan dosis 16,5 μM mampu secara signifikan memperbaiki kondisi perkembangan embrio blastosis. Hal ini mungkin disebabkan karena ALA yang berfungsi sebagai anti oksidan mampu menangkal radikal bebas dari asap rokok.

Rokok merupakan salah satu sumber utama radikal bebas yang mengandung 4000 senyawa kimia yang diantaranya yaitu

nikotin, tar, mutagen atau karsinogen, dan konstituen lainnya (Claudia *et al.*, 2013). Nikotin merupakan salah satu kandungan bahan kimia dalam asap rokok yang dapat mempengaruhi implantasi dengan cara menekan kadar estrogen yang berpengaruh terhadap penurunan fertilitas ovarium, menghambat proses pembelahan sel, menghambat pembentukan blastosis, dan mencegah terjadinya implantasi bahkan mengganggu masuknya embrio ke rongga rahim (Oktavianis, 2011).

Pemberian antioksidan merupakan salah satu cara untuk menangkal radikal bebas yang dihasilkan oleh asap rokok. Antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas yaitu dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas (Utami *et al.*, 2009).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ALA tidak hanya memperbaiki perkembangan embrio mencapai blastosis, tetapi juga mengurangi kejadian degenerasi embrio. Goraca *et al.* (2011) mengatakan bahwa ALA dapat menghancurkan ROS dan *reactive nitrogen species* (RNS) akan tetapi ALA dan *dihydrolipoic acid* (DHLLA) tidak dapat menetralkan hidrogen peroksida. ALA juga berfungsi sebagai antioksidan dalam bentuk tereduksi dan dapat bekerja di semua bagian sel termasuk mitokondria. Pada kondisi *in vivo*, antioksidan enzimatis maupun non enzimatis *in vitro* memiliki proteksi yang baik untuk stres oksidatif yang disebabkan perubahan patologis dan mempertahankan kadar optimal dari ROS. Sedangkan pada kondisi tingginya kadar oksigen dan kurangnya mekanisme pertahanan secara

Tabel 3. Pengaruh ALA terhadap perkembangan embrio blastosis *in vivo* pada mencit (*Mus musculus*) yang dipapar asap rokok
 (effect of ALA on blastocyst embryo development *in vivo* in mice (*Mus musculus*) exposed in cigarette smoke)

Perlakuan (<i>treatment</i>)	Jumlah embrio (<i>embryo total</i>) (n)	Perkembangan awal embrio (rerata \pm SD) (<i>embryo development (average \pm SD)</i>)		
		8-16 sel 8-16 Cel	Morula Morulae	Blastosis Blastocyst
Kontrol Negatif	81	1,50 \pm 1,29	5,25 \pm 1,26	13,50 \pm 1,73 ^a
Kontrol Positif	73	0,75 \pm 0,96	6,25 \pm 1,26	7,25 \pm 2,99 ^b
ASAP + ALA 16,5 μM	88	0,50 \pm 0,58	6,25 \pm 3,59	14,00 \pm 1,63 ^a
ASAP + ALA 49,5 μM	17	0,75 \pm 0,96	4,75 \pm 1,5	14,5 \pm 1,91 ^a

^{a,b} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$) (*different superscripts at the same column indicate significantly differences (p < 0.05)*).

fisiologis terhadap ROS akan mengakibatkan stres oksidatif (Talebi *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2010).

Glutathione merupakan antioksidan endogen yang memiliki fungsi untuk detoksifikasi dan eliminasi berbagai macam karsinogen dan toksin, juga berfungsi dalam sistem pertahanan dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai radikal bebas atau dengan menangkapnya sehingga dapat mencegah terjadinya stres oksidatif (Winarsi, 2007). Glutathione pada reproduksi wanita berperan penting dalam maturasi oosit terutama maturasi sitoplasma yang sangat penting dalam perkembangan embrio preimplantasi (Adnyana, 2012). ALA merupakan salah satu antioksidan yang dapat meningkatkan kadar glutathione pada sel yang dikultur dan jaringan hewan (Higdon, 2006; Shay *et al.*, 2009). Kim *et al.* (2013) menyatakan bahwa ALA berperan dalam regenerasi antioksidan lain, seperti vitamin C dan E, koenzim Q, dan glutathione.

Pada awal perkembangan embrio, GSH maternal berfungsi dalam membantu menangkal ROS pada embrio. Genom embrio mencit akan aktif pada perkembangan 2 sel (Neganova, 2000). Aktifnya genom embrio menyebabkan gen maternal tidak diekspresikan, sehingga embrio membutuhkan peningkatan ATP untuk proses perkembangannya. Stres oksidatif yang berlebihan dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan embrio. Penelitian ini menunjukkan bahwa mencit yang terpapar asap rokok tidak mampu menghasilkan energi yang cukup untuk perkembangan embrio. Namun setelah pemberian ALA mampu menangkal radikal bebas akibat paparan asap rokok ditandai dengan perkembangan embrio normal mencapai tahap blastosis. Ali *et al.* (2003) dan Kitagawa *et al.* (2004) menyebutkan bahwa stres oksidatif berdampak terhadap kerusakan sel, oksidasi asam amino, apoptosis dan nekrosis sehingga menurunkan produksi embrio *in vitro*.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, didapatkan simpulan bahwa (1) ALA dosis 16,5 μM dan 49,5 μM per oral berpengaruh positif terhadap perkembangan embrio blastosis pada mencit (*Mus musculus*), (2) asap rokok berpengaruh negatif terhadap

perkembangan blastosis dan meningkatkan kejadian embrio degeneratif pada mencit (*Mus musculus*), dan (3) pemberian ALA 16,5 μM dan 49,5 μM per oral mampu menurunkan kejadian degenerasi embrio pada mencit yang terpapar asap rokok.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kami ucapkan kepada Pimpinan Puslit Bioteknologi-LIPI yang telah memberikan dukungan pendanaan sehingga penelitian dapat terlaksana dengan baik.

Daftar Pustaka

- Adnyana, I. B. P. 2012. Perbedaan Kadar Serum Glutathione Peroxidase (Gpx) pada Blighted Ovum dan Kehamilan Normal. Universitas Udayana, Denpasar.
- Ali, A. A., J. F. Bilodean, and M. A. Sirard. 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization, and development. *Theriogenology* 59: 939-949.
- Anggraini, D. 2006. Pengaruh pemberian vitamin E terhadap motilitas spermatozoa mencit jantan strain BALB/C yang diberi paparan asap rokok. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.
- Bordel, R., M. W. Laschke, M. D. Menger and B. Volmar. 2006. Nicotine does not effect vascularization but inhibit growth of freely transplanted ovarian follicles by Inducing Granulosa Cell Apoptosis. *Hum. Reprod.* 21: 610-616.
- Cakatay, U. 2006. Pro-oxidant Actions of Alpha Lipoic Aid and Dihydrilipoic Acid. *Med. Hypothesis* 66: 110-117.
- Campbell, A., J. B. Neil, Reece and L. G. Mitchell. 2004. Biologi. Edisi kelima Jilid III. Diterjemahkan oleh: Prof. Dr. Ir. Wasmen Manalu. Erlangga, Jakarta.
- Card, J. P. and J. A. Mitchell. 1979. The effects of nicotine on implantation rat. *Biol. Reprod.* 20: 532-539.
- Carlson, D. A., A. R. Smith, S. J. Fisher, K. L. Young and L. Packer. 2007. The plasma pharmacokinetics of R(+) lipoic acid administered as sodium (R+) lipoate to healthy human subjects. *Alter. Med. Rev.* 12: 343-351.

- Claudia, V., E. D. Queljoe and L. Tendean. 2013. Perbedaan kualitas spermatozoa mencit jantan (*Mus Musculus L*) yang diberikan vitamin C setelah pemaparan asap rokok. *J. e-Biomedik*, 1: 1.
- Dahlan, S. 2011. Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan. Edisi 5. Salemba Medika, Jakarta.
- Feugang, J. M., O. Camargo-Rodríguez and E. Memili. 2009. Culture systems for bovine embryos. *Lives. Sci.* 121:141-149.
- Gannon, A. M. 2013. Exposure to cigarette smoke and its impact on the ovarian follicle population: mechanisms of follicle loss. Thesis. Mc Master University, Canada.
- Goraca, A., H. Huk-Kolega, A. Piechota, P. Kleniewska, E. Ciejska and B. Skibska. 2011. Lipoic Acid-Biological Activity and Therapeutic Potential. *Pharm. Rep.* 63: 849-858.
- Gupta, S., L. Sekhon, Y. Kim and A. Agarwak. 2010. The role of antioxidant stress and antioxidant in assisted reproduction. *Woman's Health Rev.* 6: 227-238.
- Harris, S. 2002. Experimental and clinical investigation into mammalian oocyte metabolism, nutrition, and fertility. Dissertation. University of Leeds.
- Hatami, S., S. Zavareh, M. Salehnia, T. Lashkarbolouki, M. T. Ghorbanian and I. Karimi. 2014. The impact of alpha lipoic acid on developmental competence of mouse vitrified pre-antral follicles in comparison to those isolated from vitrified ovaries. *Iran J. Reprod. Med.* 12: 57-64.
- Johnson, M., E. Freeman, D. Gardner and P. Hunt. 2007. Oxidative metabolism of pyruvate is required for meiotic maturation of murine oocyte in vivo. *Biol. Reprod.* 77: 2-8.
- Kim, D. C., D. W. Jun, E. C. Jang, E. Kim, S. P. Lee, K. N. Lee, and H. L. Lee. 2013. Lipoic acid prevents the changes of intracellular lipid partitioning by free fatty acid. *Gut. and Liv.* 7: 221-227.
- Kitagawa, Y., K. Suzuki, A. Yoneda and T. Watanabe. 2004. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS) and DNA fragmentation in Porcine embryos. *Theriogenology* 62: 1186-97.
- Marhaeni, G. A. 2009. Paparan Asap Rokok Menghambat Folikulogenesis Dan Perilaku Seksual Mencit. Thesis. Universitas Udayana, Denpasar.
- Medicinus. 2011. Anti aging. *Scientific J. Pharm. Develop. Med. Appl.* 2: 5-7.
- Moini, H., L. Packer and N. E. Saris. 2002. Antioxidant and prooxidant activities of alpha lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 96: 41-48.
- Molyneux, S. L., C. M. Florkowski and P. M. George. 2008. Coenzyme q10 an independent predictor of mortality in chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52: 1435-1441.
- Neganova, I. G., G. Sekirina and U. E. Ritter. 2000. Surface-expressed E-cadherin, and mitochondrial and microtubule distribution in rescue of mouse embryos from 2-cell block by Aggregation. *Mol. Hum. Reprod.* 6 : 454-46.
- Oktavianis. 2011. Efek pemberian asap rokok terhadap kehamilan tikus putih (*Rattus norvegicus*). Tesis. Program Studi Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Andalas, Palembang.
- Paine, M. A., E. H. Ruder, T. J. Hartman, J. Blumberg and M. B. Goldman. 2013. Chapter 4. Oxidative Stress, Oogenesis and Folliculogenesis, In: *Studies on Women's Health*. A. Agarwal, N. Aziz, B. Rizk (Ed.). Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. Springer Science Business Media, New York.
- Said, S., O. P. Astirin, dan S. Wahyuningsih. 2011. Tingkat fertilitas dan perkembangan embrio mencit yang diberi ekstrak buah merah. *Media Peternakan* 6: 112-116.
- Shay, K. P., R.F. Moreau, E. J. Smith, A. R. Smith and T.M. Hagen. 2009. Alpha-Lipoic Acid as A Dietary Supplement : Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Biochem. Biophys. Acta.* 1790 (10) : 1149-1160.
- Shiloh, H., R. L. Baratz, M. Koifman, D. Ishai, D. Bidder, Z. Wener-Meganz and M. Dirnfeld. 2004. The impact of cigarette smoking on zona pellucida thickness of oocyte and embryos prior to transfer

- into uterine cavity. Hum. Reprod. 19: 157-159.
- Sumiati. 2012. Pengaruh nikotin terhadap kadar malonildialdehid (MDA) serum dan keberhasilan fertilitas in vitro pada *Rattus norvegicus* di FK Unair Surabaya. Embrio Jurnal Kebidanan 1: 1-4.
- Talebi, A., S. Zavarch, M. H. Kashani, T. Lashgarbluki and I. Karimi. 2012. The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. J. Ass. Reprod. Gen. 29: 175-183.
- Utami, T. S., R. Arbianti, H. Hermansyah and A. Reza. 2009. Perbandingan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun simpur (*Dillenia indica*) dari berbagai metode ekstraksi dengan uji ANOVA. Seminar Nasional Teknik Kimia Indonesia, 19-20.
- Valavanidis, A., T. Vlachoggiani and K. Fiotakis. 2009. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. Int. J. Environ. Res. Public Health 6: 445-462.
- Winarsi, H. 2007. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas: Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.