



Protein yang terkait dengan teratogenesis anggota tubuh mencit Swiss Webster akibat perlakuan dengan asam metoksiasetat (MAA)

Aceng Ruyani, Sri Sudarwati, Lien A. Sutasurya, Sony H. Sumarsono

Departemen Biologi, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesha No.10, Labtek XI, Bandung 40132

Sari

Telah diteliti protein yang terkait dengan teratogenesis anggota tubuh mencit Swiss Webster akibat perlakuan dengan MAA. Mencit umur kebuntingan 11 hari diberi perlakuan dosis tunggal MAA 10 mmol/kg berat badan secara *gavage*, sedangkan kelompok kontrol hanya diberi pelarut akuabides steril. Mencit bunting dibunuh secara dislokasi leher 4 jam setelah perlakuan dengan MAA. Tunas anggota tubuh depan diisolasi dari kelompok kontrol dan perlakuan lalu dihomogenisasi. Ekstrak kasar kemudian difraksinasi dengan amonium sulfat dan masing-masing fraksi dianalisis dengan teknik 1-D dan 2-D SDS-PAGE. Elektroforegram 1-D dan 2-D menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan fraksi protein amonium sulfat 20-40 % (F-II), dapat dideteksi protein 31,0-36,5 kDa serta bercak protein 35,1 kDa, pI 6,2 yang tidak terdapat pada kontrol. Pada kelompok perlakuan fraksi protein amonium sulfat 40-60% (F-III), dapat dideteksi protein 66,3-97,4 kDa serta bercak protein 81,7 kDa, pI 7,3 yang tidak terdapat pada kontrol. Sedangkan pada kelompok kontrol F-III, protein 36,5-55,4 kDa serta bercak protein 41,6 kDa, pI 6,4 terdeteksi, tetapi tidak terdeteksi pada kelompok perlakuan. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pada tunas anggota tubuh depan mencit, perlakuan dengan MAA menginduksi ekspresi dua protein (35,1 kDa, pI 6,2 dan 81,7 kDa, pI 7,3) dan menghambat ekspresi satu protein (41,6 kDa, pI 6,4).

Kata kunci: embrio mencit, perkembangan anggota tubuh, asam metoksiasetat, profil protein.

Abstract

Proteins which are linked with Swiss Webster mouse limb teratogenesis as the effects of methoxyacetic acid (MAA) treatment

The analysis of proteins, which are linked with limb teratogenesis as the effects of MAA treated in Swiss Webster mouse has been investigated. A single dose of MAA 10 mmol/kg body weight was given by *gavage* on gestation day 11, whereas the control group were administered sterilized distilled water. Pregnant mice were sacrificed by cervical dislocation at 4 hours after MAA treatment. The forelimb buds were isolated from both control and treated group embryos and were then homogenized. The crude extracts were then fractionated with ammonium sulfate and each fraction was analyzed by 1-D and 2-D SDS-PAGE techniques respectively. The 1-D and 2-D electrophoregrams revealed that in the treated group of protein fraction 20-40 % ammonium sulfate (F-II), a protein of 31.0-36.5 kDa and a protein spot 35.1 kDa, pI 6.2 could be detected, which was not found in the control. In the treated group of protein fraction 40-60 % ammonium sulfate (F-III) a protein of 66.3-97.4 kDa and a protein spot 81.7 kDa, pI 7.3 could be detected which was not found in the control, whereas in the control group a protein of 36.5-55.4 kDa, which is a protein spot 41.6 and pI 6.4, was detected but not detected in the treated group. It could be concluded from this experiment that in the mouse forelimb buds, MAA treatment induce the protein expression of two proteins (35.1 kDa, pI 6.2 and 81.7 kDa, 7.3) and inhibit the expression of one protein (41.6, pI 6.4).

Keywords: mouse embryo, limb development, methoxyacetic acid, protein profile.

1 Pendahuluan

Embriotoksisitas dan teratogenesis MAA pada mencit telah dipelajari oleh beberapa peneliti (Rasjad *et al.*, 1991; Sudarwati *et al.*, 1993; Darmanto *et al.*, 1994; Sudarwati *et al.*, 1995). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa perlakuan dengan MAA terbukti paling banyak memunculkan kelainan anggota tubuh apabila diberikan pada umur kebuntingan (uk) 11 hari. Menurut Suripto *et al.* (1996), MAA yang diberikan pada mencit Swiss Webster (SW) uk 11 hari dapat memunculkan 95,5 % abnormalitas anggota tubuh yang

terutama disebabkan oleh kematian sel yang intensif pada bagian mesoderm keping anggota. Selain itu *apical ectodermal ridge* (AER) berperan juga, karena terjadi perubahan degeneratif struktur AER dan penyusutannya lebih cepat pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol (Sudarwati *et al.*, 1995).

Perlakuan dengan MAA menyebabkan penurunan sintesis RNA dan kemudian menghambat proliferasi serta diferensiasi sel pada embrio mencit yang sedang berkembang (Mebus dan Welsch, 1989). Penurunan sintesis RNA atau protein pada sel tertentu dapat pula

meningkatkan apoptosis (Ellis *et al.*, 1991; Umansky, 1996). Ku *et al.* (1995) dan Li *et al.* (1997) membuktikan bahwa perlakuan dengan MAA pada testis tikus menyebabkan peningkatan ion kalsium intraseluler, yang selanjutnya akan mengaktifkan enzim endonuklease untuk memotong DNA menjadi beberapa fragmen dengan rentangan 180-200 pasangan basa. Telah diketahui bahwa fragmentasi DNA adalah peristiwa awal sebelum terjadi kematian sel secara apoptotik (Quairrie *et al.*, 1995; Milligan dan Schwarts, 1996; Evan dan Littlewood, 1998).

Apoptosis dapat pula diinduksi oleh *stress protein*. *Stress protein* adalah protein sitoplasma atau inti yang muncul ketika organisme berada di bawah pengaruh hipertermia, beberapa logam berat, atau teratogen tertentu. *Stress protein* dapat dibagi ke dalam tiga kategori berat molekul (BM), yaitu (a) 20-30 kDa; (b) 66-75 kDa; dan (c) 80-90 kDa (Subjeck dan Shyy, 1986). Dypbukt *et al.* (1994) melaporkan bahwa kehadiran *stress protein* oksidatif merupakan suatu contoh kondisi awal sebelum terjadinya kematian sel secara apoptotik. Lebih lanjut telah diketahui bahwa perlakuan dengan MAA secara *in vitro* dan *in vivo* pada sel Sertoli tikus menyebabkan peningkatan ekspresi *stress protein* oksidatif dan penurunan ekspresi fosfodiesterase (PDE; Syed dan Hecht, 1998). Namun demikian, mekanisme proses kematian sel pada bagian mesoderm tunas anggota yang dipengaruhi MAA masih belum diketahui.

Perlakuan dengan MAA dapat menurunkan berat anggota tubuh embrio yang disertai dengan menurunnya kandungan total DNA dan protein (Martgrita, 1998). Hasil penelitian ini diperkuat oleh Ruyani *et al.* (2001) yang menyatakan bahwa dosis tunggal MAA 10 mmol/kg berat badan (bb) yang diberikan secara *gavage* pada uk 11 hari, 4 jam setelah perlakuan menurunkan kandungan total protein dan mengubah profil protein pada tunas anggota tubuh depan mencit. Karena protein adalah produk fungsional gen, maka perbedaan profil protein yang nyata antara kelompok kontrol dan perlakuan dapat diartikan sebagai respons ekspresi gen terhadap perlakuan dengan MAA.

Atas dasar itu, pada penelitian ini dilakukan isolasi dan pemurnian protein tunas anggota tubuh depan sebagai usaha awal untuk memahami pengaruh MAA terhadap mekanisme molekuler perkembangan anggota tubuh mencit.

2 Bahan dan cara kerja

1.1 Hewan percobaan

Mencit SW digunakan sebagai hewan percobaan. Pengembangbiakan hewan dilakukan dalam ruangan dengan suhu 23-27 °C dan kelembaban relatif 83 %. Pakan dan air diberikan secara *ad libitum*. Mencit betina umur dewasa seksual (10-12 minggu), dikawinkan dengan mencit jantan dengan perbandingan 1:1. Sumbat vagina yang terdeteksi keesokan harinya ditetapkan sebagai uk 0 hari (Sudarwati *et al.*, 1995).

1.2 Bahan, dosis, dan pengumpulan sampel

MAA ($\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{COOH}$) dalam bentuk cair dengan kemurnian 95 % (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) yang diencerkan dengan akuabides steril diberikan secara *gavage* dengan dosis 10 mmol/kg bb pada uk 11 hari. Sedangkan mencit kelompok kontrol hanya diberi pelarut (Sudarwati *et al.*, 1995).

Mencit bunting dibunuh secara dislokasi leher empat jam setelah perlakuan dengan MAA (Ruyani *et al.*, 2001). Tunas anggota tubuh depan diisolasi, dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf, dan disimpan pada suhu -80 °C hingga akan digunakan.

1.3 Fraksinasi protein

Tunas anggota tubuh depan kelompok kontrol dan perlakuan dihomogenasi pada suhu 4 °C. Bufer natrium fosfat 40 mM pH 8 ditambahkan ke dalam sampel sebanyak tiga kali volume sampel, kemudian disentrifugasi pada 6.000 rpm, suhu 4 °C, selama 20 menit.

Ke dalam supernatan ditambahkan amonium sulfat hingga mencapai konsentrasi 20 %. Larutan diinkubasi pada suhu 4 °C selama 30 menit, kemudian disentrifugasi pada 12.000 rpm, suhu 4 °C, selama 20 menit. Endapan yang dihasilkan disebut sebagai fraksi protein amonium sulfat 0-20 % (F-I), sementara ke dalam supernatan ditambahkan amonium sulfat hingga mencapai konsentrasi 40 %. Tahapan itu kemudian diulang dengan cara yang sama untuk amonium sulfat 60, 80, dan 100 % (Bollag dan Edelstein, 1991) sehingga dihasilkan lima fraksi protein, yaitu: F-I; F-II; F-III; F-IV; dan F-V.

Masing-masing fraksi protein tunas anggota tubuh depan dilarutkan dalam natrium fosfat 40 mM pH 8, didialisis menggunakan membran selulosa (Klotz, 1990), kemudian disimpan pada suhu -20 °C sebagai sampel untuk elektroforesis satu- dan dua-dimensi.

1.4 Elektroforesis satu- dan dua-dimensi

Lima fraksi protein tunas anggota tubuh depan dari kelompok kontrol dan perlakuan dianalisis menggunakan teknik *one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (1-D SDS-PAGE) dengan sistem bufer Laemmli (1970, dalam Gestern, 1996). Sampel protein kontrol dan perlakuan, masing-masing sebanyak 15 µg, dimasukkan ke dalam sumur gel poliakrilamida 15 %. Protein dalam gel kemudian dideteksi dengan pewarna Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250; Merril, 1990). Protein dengan kisaran BM 6-200 kDa digunakan sebagai standar.

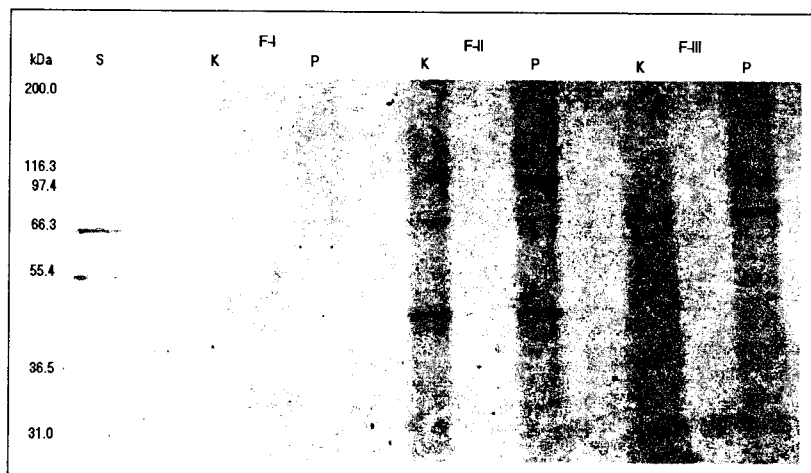
Fraksi protein yang menunjukkan perbedaan penampakan profil protein yang nyata antara kelompok kontrol dan perlakuan dianalisis lebih lanjut menggunakan teknik *two-dimensional* (2-D) SDS-PAGE. Sampel protein kontrol dan perlakuan masing-masing sebanyak 75 µg (Sarto *et al.*, 1999) dielektroforesis sesuai dengan cara kerja yang telah baku (BioRad). Separasi protein

pada dimensi pertama berdasarkan *point of isoelectrofocusing* (pI) menggunakan dua macam amfolit (pH 3,5-10 dan pH 5-7). Sedangkan pada dimensi kedua, protein dipisahkan berdasarkan BM menggunakan SDS-PAGE (Dunbar *et al.*, 1990; Gestern, 1996). Gel hasil elektroforesis dimensi pertama diinkubasi dalam bufer SDS selama 15 menit, kemudian dielektroforesis ulang dengan cara diletakkan di atas gel keping poliakrilamida 10 atau 12%, dan protein dalam gel kemudian dideteksi dengan pewarna CBB R-250 (Merril, 1990). Protein dengan kisaran BM 6.5-66.0 kDa atau BM 6.5-205 kDa digunakan sebagai standar.

2 Hasil

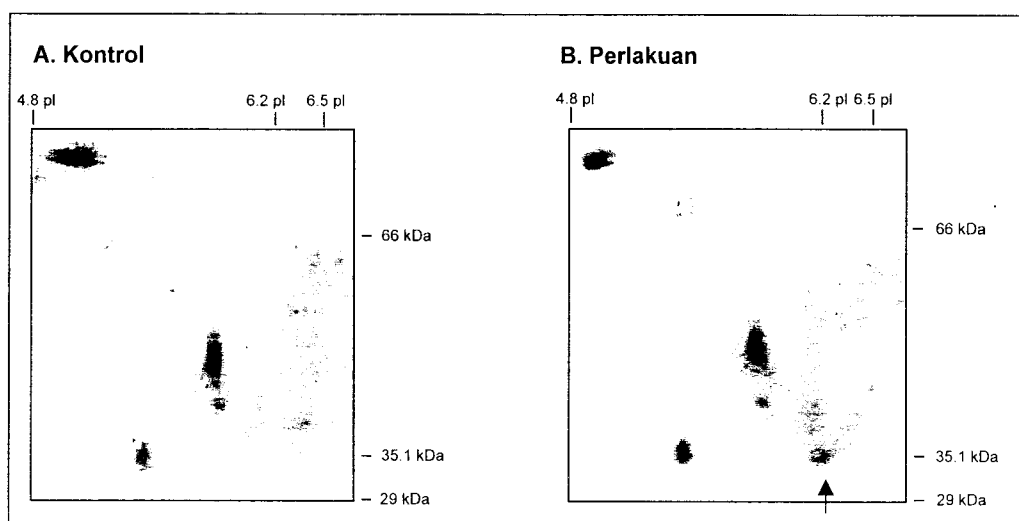
Sampel tunas anggota tubuh depan untuk penelitian ini berasal dari 65 ekor induk mencit SW uk 11 + 4 jam kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan.

Hasil analisis fraksi protein amonium sulfat 20-40 % (F-II) tunas anggota tubuh depan dengan teknik 1-D SDS-PAGE menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan ditemukan pita protein dengan kisaran berat molekul (BM) 31,0-36,5 kDa (Gambar 1). dan bila analisis ini dilanjutkan dengan 2-D SDS-PAGE didapat bercak protein dengan BM 35,1 kDa dan pI 6,2 (Gambar 2) yang tidak terdapat pada kontrol.



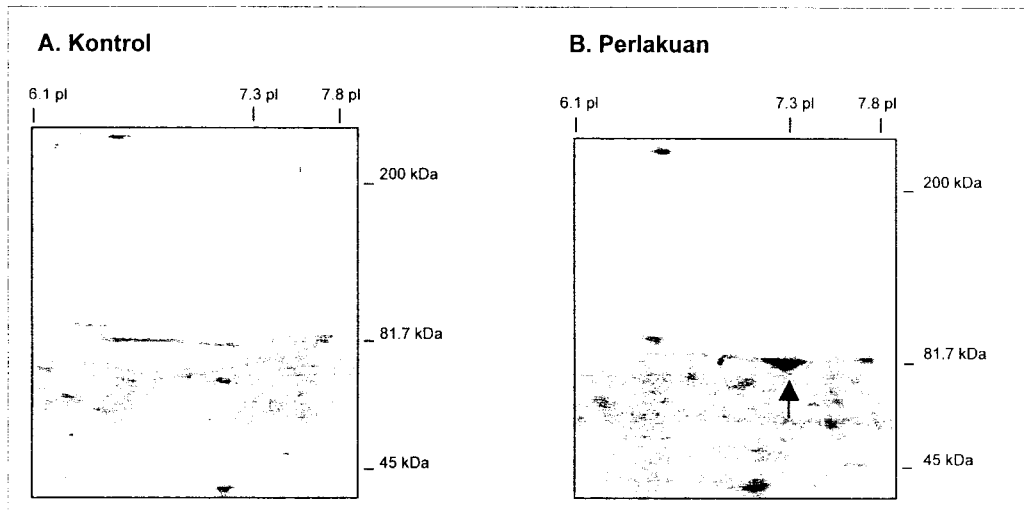
Gambar 1 Hasil 1-D SDS-PAGE protein ekstrak tunas anggota tubuh depan mencit SW umur kebuntingan 11 hari + 4 jam. Protein dalam gel dideteksi dengan pewarna CBB R-250. Pada kelompok perlakuan F-II ditemukan pita protein dengan kisaran berat molekul (BM) 31,0-36,5 kDa yang tidak terdapat pada kontrol. Pada kelompok perlakuan F-III ditemukan pita protein dengan kisaran BM 66,3-97,4 kDa yang tidak terdapat pada kontrol. Sedangkan pada kelompok kontrol F-III ditemukan pita protein dengan kisaran BM 36,5-55,4 kDa yang tidak terdapat pada perlakuan.

K: kontrol; P: perlakuan; S: standar; kDa: kilo Dalton; F-I: fraksi protein amonium sulfat 0-20%; F-II: fraksi protein amonium sulfat 20-40%; F-III: fraksi protein amonium sulfat 40-60%; →: pita protein yang diperhatikan.

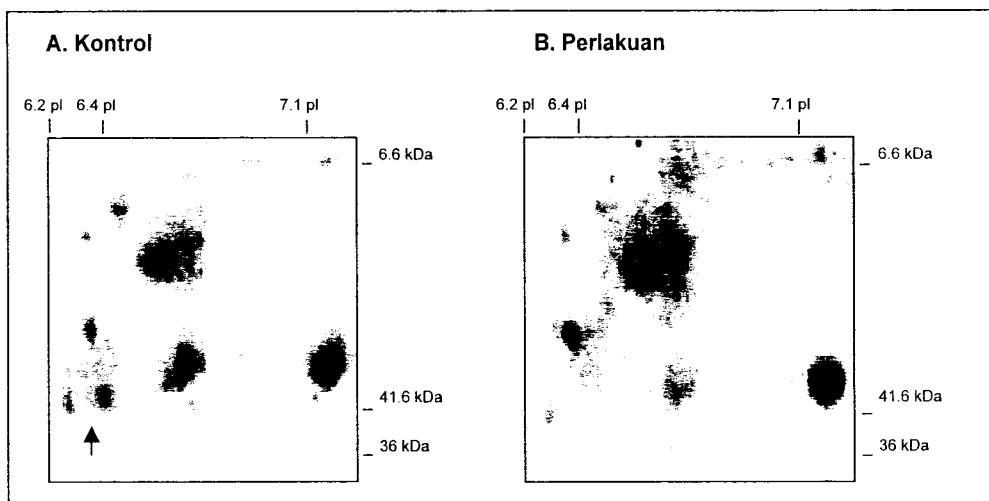


Gambar 2 Hasil 2-D SDS-PAGE protein fraksi amonium sulfat 20-40 % dari tunas anggota tubuh depan mencit SW umur kebuntingan 11 hari + 4 jam. Protein dalam gel dideteksi dengan pewarna CBB R-250. Anak panah menunjukkan pada kelompok perlakuan ditemukan bercak protein dengan berat molekul 35,1 kDa dan pI 6,2 yang tidak terdapat pada kontrol.

kDa: kilo Dalton; pI: *point of isoelectrofocusing*.



Gambar 3 Hasil 2-D SDS-PAGE protein fraksi amonium sulfat 40-60 % dari tunas anggota tubuh depan mencit SW umur kebuntingan 11 hari + 4 jam. Protein dalam gel dideteksi dengan pewarna CBB R-250. Anak panah menunjukkan pada kelompok perlakuan ditemukan bercak protein dengan berat molekul (BM) 81,7 kDa dan pI 7,3 yang tidak terdapat pada kontrol. kDa: kilo Dalton; pI: point of isoelectrofocusing.



Gambar 4 Hasil 2-D SDS-PAGE protein fraksi amonium sulfat 40-60 % dari tunas anggota tubuh depan mencit SW umur kebuntingan 11 hari + 4 jam. Protein dalam gel dideteksi dengan pewarna CBB R-250. Anak panah menunjukkan pada kelompok kontrol ditemukan bercak protein dengan berat molekul 41,6 kDa dan pI 6,4 yang tidak terdapat pada perlakuan. kDa: kilo Dalton; pI: point of isoelectrofocusing.

Hasil analisis fraksi protein amonium sulfat 40-60 % (F-III) tunas anggota tubuh depan dengan teknik 1-D SDS-PAGE menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan ditemukan pita protein dengan kisaran BM 66,3-97,4 kDa (Gambar 1) dan bila analisis ini dilanjutkan dengan 2-D SDS-PAGE didapat bercak protein dengan BM 81,7 kDa dan pI 7,3 (Gambar 3), yang tidak terdapat pada kontrol. Sedangkan pada kelompok kontrol F-III ditemukan pita protein dengan kisaran BM 36,5-55,4 kDa (Gambar 1) serta bercak protein dengan BM 41,6 kDa dan pI 6,4 (Gambar 4) yang tidak terdapat pada perlakuan.

3 Pembahasan

Sifat protein termodifikasi dalam suatu kondisi patologis tertentu dapat dipelajari dengan teknik 2-D SDS-PAGE (Sarto *et al.*, 1999). Secara teoritis teknik ini mampu memisahkan sekaligus ratusan polipeptida berdasarkan pI dan BM dari ekstrak kasar protein (Dunbar *et al.*, 1990; Gestern, 1996). Namun demikian, agar gambaran bercak protein dalam elektroforegram 2-D lebih mudah diamati, ekstrak kasar protein tersebut sebaiknya dibagi menjadi beberapa fraksi protein (Bollag dan Edelstein, 1991).

Telah diketahui bahwa perlakuan dengan tunggal MAA 10 mmol/kg bb yang diberikan secara *gavage* pada uk 11 hari mencit A/J, menyebabkan kematian sel yang intensif

pada bagian mesoderm keping anggota depan (Sudarwati *et al.*, 1995). Pada penelitian ini, protein dengan BM 35,1 kDa dan pI 6,2 (Gambar 2) diduga muncul sebagai akibat kematian sel pada mesoderm keping anggota tubuh depan setelah mendapat perlakuan dengan MAA. Asumsi ini juga didasarkan pada laporan yang menyatakan bahwa enzim poli (ADP-ribosa) polimerase (BM 116 kDa) pada kematian sel nekrotik akan terpecah menjadi beberapa fragmen peptida dengan BM 50, 40, atau 35 kDa (Shah *et al.*, 1996; Pieper *et al.*, 1999).

Menurut Syed dan Hecht (1998), perlakuan dengan MAA secara *in vitro* dan *in vivo* menyebabkan ekspresi *stress protein* oksidatif meningkat pada sel Sertoli tikus. *Stress protein* memiliki kisaran BM 80-90 kDa (Subjeck dan Shyy, 1986) dan dapat dideteksi sekitar 2-4 jam setelah perlakuan (Goering *et al.*, 1993). Atas dasar itu, maka protein dengan BM 81,7 kDa dan pI 7,3 (Gambar 3) yang ditemukan 4 jam setelah perlakuan dengan MAA pada penelitian ini, sebagai reaksi terhadap MAA fetus mensintesis *stress protein*. Oleh karena itu dalam keadaan tidak terdedah terhadap MAA *stress protein* ini tidak ada.

Telah dilaporkan bahwa perlakuan dengan MAA secara *in vitro* dan *in vivo* menyebabkan ekspresi fosfodiesterase (PDE) menurun pada sel Sertoli tikus (Syed dan Hecht, 1998). Salah satu *isoform* PDE pada mencit memiliki BM 40 kDa dan dapat dideteksi dengan antibodi PDE4A (Lugnier, 2000; komunikasi pribadi). Protein dengan BM 41,6 kDa dan pI 6,4 (Gambar 4) yang ditemukan pada penelitian ini diduga termasuk PDE. Menurut Aharoni *et al.* (1995), penurunan aktivitas PDE akan meningkatkan jumlah cAMP intraseluler yang kemudian menginduksi kematian pada sel granulosa. Kemungkinan lain dari protein dengan BM 41,6 kDa dan pI 6,4 adalah *laminin binding protein p40* (LBP-p40). LBP-p40 diketahui memiliki kisaran BM 40-43 kDa (Sato *et al.*, 1996; Sorokin *et al.*, 2000). Informasi cukup rinci tentang protein tersebut telah dilaporkan oleh Kaneda *et al.* (1998) yang antara lain menyatakan bahwa apoptosis pada sel HeLa dapat diinduksi oleh hilangnya LBP-p40.

Hasil studi teratogenisitas MAA pada mencit menunjukkan bahwa perlakuan dengan MAA terbukti paling banyak memunculkan kelainan anggota tubuh apabila diberikan pada uk 11 hari (Rasjad *et al.*, 1991; Sudarwati *et al.*, 1993; Darmanto *et al.*, 1994). Abnormalitas anggota tubuh itu terutama disebabkan oleh kematian sel yang intensif pada bagian mesoderm keping anggota (Sudarwati *et al.*, 1995). Hasil studi teratogenisitas tersebut tampak sejalan dengan penemuan tiga protein pada penelitian ini yang diduga ada hubungannya dengan proses kematian sel.

Informasi yang didapat dari hasil 2-D SDS-PAGE terbatas pada memperoleh BM dan pI dari suatu protein. Oleh karena itu untuk mendapatkan keterangan yang lebih pasti, maka identifikasi dan karakterisasi bagi ketiga protein tersebut sedang dilakukan.

4 Kesimpulan

Dosis tunggal MAA 10 mmol/kg bb yang diberikan secara *gavage* pada uk 11 hari mencit SW, pada 4 jam setelah perlakuan terjadi ekspresi protein dengan BM 35,1 kDa dan pI 6,2 serta ekspresi protein dengan BM 81,7 kDa dan pI 7,3, namun sebaliknya menghilangkan ekspresi protein dengan BM 41,6 dan pI 6,4 pada tunas anggota tubuh depan.

5 Ucapan terimakasih

Penelitian ini dibiayai oleh *Graduate Team Research Grant, University Research for Graduate (URGE) Project Batch III*. Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. Muliawati Sindumarta yang telah banyak memberi saran aspek biokimia, dan Bapak Yayat atas bantuan teknik yang diberikan.

6 Daftar pustaka

- Aharoni, D., Dantes, A., Oren, M., & Amsterdam, A. (1995), cAMP-mediated signals as determinants for apoptosis in primary granulosa cells. *Exp. Cell Res.*, **218**: 271-282.
- Bollag, D.M. & Edelman, S.J. (1991), *Protein methods*. Wiley Liss. New York. pp.79-81.
- Darmanto, W., Sudarwati, S. & Sutasurya, L.A. (1994), Effects of methoxyacetic acid on prenatal development of mice. *Environ. Med.*, **38** (1): 25-28.
- Dyrbukt, J.M., Ankarcona, M., Burkitt, M., Sjöholm, A., Strom, K., Orrenius, S. & Nicotera, P. (1994), Different prooxidant levels stimulate cell growth, activate apoptosis, or produce necrosis in insulin-secreting RINm5F cells. *J. Biol. Chem.*, **269**: 30553-60.
- Dunbar, B.S., Kimura, H. & Timmons, T.M. (1990), Protein analysis using high resolution two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Dalam: *Guide to protein purification*. Deutscher, M.P (ed). Academic Press Inc. San Diego. pp. 441-459.
- Ellis, R.E., Yuan, J. & Horvitz, H.R. (1991), Mechanism of functions of cell death. *Ann.Rev.Cell Biol.* **7**: 663-693.
- Evan, G. & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*, **281**:1317-1322.
- Gestern, D.M. (1996), Gel electrophoresis protein. Dalam: *Essential techniques series*. D. Rickwood (ed). John Wiley & Sons. Toronto. pp.1-111.
- Goering, P.L., Fisher, B. & Kish, C.L. (1993), Stress protein synthesis induced in rat liver by cadmium precedes hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **122**: 139-148.
- Kaneda, Y., Kaneda, Y., Kinoshita, K., Sato, M., Saeki, R.Y., Wataya-Kaneda, M., Tanaka, K.

- (1998), The induction of apoptosis in HeLa cells by the loss of LBP-p40. *Cell Death Differ.*, **5**: 20-28.
11. Klotz, I.M. (1989), Ligand-protein binding affinities. Dalam: Protein function, a practical approach. T.E. Creighton (ed). IRL Press. Oxford. pp. 25-35.
 12. Ku, W.W., Wine, R.N., Chae, B.Y., Ghanayem, B.I. & Chapin, R.E. (1995), Spermatocyt toxicity of 2-methoxyethanol (ME) in rats and guinea pigs: Evidence for the induction of apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **134**: 100-110.
 13. Li, L.H., Wine, R.N., Miller, D.S., Reece, J.M., Smith, M. & Chapin, R.E. (1997), Protection against methoxyacetic acid induced spermatocyte apoptosis with calcium channel blockers in cultured rat seminiferous tubules: possible mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **144**: 105-119.
 14. Martgrita, M.M. (1998), Efek asam metoksiasetat terhadap kandungan DNA, protein, serta profil protein anggota badan embrio mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster. Tesis Magister Program Studi Biologi, Program Pascasarjana ITB. Bandung.
 15. Mebus, C.A. & 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.
 16. Merril, C.R. (1990), Gel-staining techniques. Dalam: *Guide to protein purification*. Deutscher, M.P (ed). Academic Press Inc. San Diego. pp.477-488.
 17. Milligan, C.E. & Schwartz, L.M. (1996), Programmed cell death during development of animals. In: *Cellular aging and cell death*. N.J.Holbrook, G.R.Martin & R.A.Lochshin (ed). Wiley Liss. New York. pp.181-208.
 18. Pieper, A.A., Verma, A., Zhang, J. & Snyder, S.H. (1999), Poly(ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *TIPS*, **20**: 171-181.
 19. Quairrie, L.H., Addey, C.V.P. & Wilde, C.J. (1995), Apoptosis in lactating and involuting mouse mammary tissue demonstrated by nick-end DNA labelling. *Cell Tissue Res.*, **281**: 413-419.
 20. Rasjad, C., Yamashita, K., Datu, A.R. & Yasuda, M. (1991), Pathogenesis of limb malformation in mice induced by methoxyacetic acid. *Hiroshima J. Med. Sci.*, **40**(3): 101-107.
 21. Ruyani, A., Sudarwati, S., Sutasurya, L.A. & Sumarsono, S.H. (2001), Perubahan profil protein tunas anggota tubuh depan mencit (*Mus musculus*) akibat perlakuan dengan asam metoksiasetat (MAA). *Medika*, **27**: 363-367.
 22. Sarto, C., Frutiger, S., Cappellano, F., Sanchez, J.C., Doro, G., Catanzaro, F., Hughes, G.J., Hochstrasser, D.F. & Mocarelli, P. (1999), Modified expression of plasma glutathione peroxidase and manganese superoxidase dismutase in human renal cell carcinoma. *Electrophoresis*, **20**: 3458-3466.
 23. Sato, M., Kinoshita, K., Kaneda, Y., Saeki, Y., Iwamatsu, A. & Tanaka, Y. (1996), Analysis of nuclear localization of laminin binding protein precursor p40 (LBP-p40). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **299**: 896-901.
 24. Shah, G.M., Shah, R.G. & Poireir, G.G. (1999). Different cleavage pattern for poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis and necrosis in HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **229**: 838-844.
 25. Sorokin, A.V., Mikhailov, A.M., Kachko, A.V., Protopopova, E.V., Konovalova, S.N., Andrianova, M.E., Netesov, S.V., Kornev, A.N. & Loktev, V.B. (2000), Human recombinant laminin-binding protein: isolation, purification, crystalization. *Biochemistry (Mosc)*, **65**(5): 546-53.
 26. Subjeck, J. & Shyy, T.T. (1986), Stress protein systems of mammalian cells. *Amer. J. Physiol.*, **250**: 1-17.
 27. Sudarwati, S., Suryono, T.W. & Yusuf, A.T. (1993), Efek "methoxyacetic acid" (MAA) terhadap perkembangan anggota mencit (*Mus musculus*) galur A/J. *JMS*, **1**: 11-19.
 28. Sudarwati, S., Suryono, T.W. & Yusuf, A.T. (1995), Kelainan perkembangan awal anggota depan mencit A/J yang diinduksi asam metoksiasetat (MAA). *JMS*, Supplement **H**: 60-70.
 29. Suropto, Sjamrizal, Surjono, T.W. & Kamal, A. (1996), Pengaruh asam metoksiasetat terhadap kandungan DNA pada anggota badan embrio mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster. Laporan Penelitian OPF-ITB No.1676096 1995/1996.
 30. Syed, V. & Hecht, N.B. (1998), Rat pachytene spermatocytes down-regulate a polo-like kinase and up-regulate a thiol-specific antioxidant protein, whereas sertoli cells down-regulate a phosphodiesterase and up-regulate an oxidative stress protein after exposure to methoxyethanol and methoxyacetic acid. *Endocrinology*, **139**: 3503-3511.
 31. Umansky, S.R. (1996), Apoptosis: molecular and cellular mechanisms (a review). *Mol.Biol.*, **30** : 285-295.