

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUAH NANAS MUDA  
TERHADAP KECACATAN FETUS MENCIT BETINA**

**Skripsi**

Untuk memenuhi sebagian persyaratan

Mencapai gelar Sarjana Kedokteran



diajukan oleh

**Arina Manasikana Dewi**

**30101900032**

FALKUTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG

SEMARANG

2023

SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUAH NANAS MUDATERHADAP  
KECACATAN FETUS MENCIT BETINA

Yang diarsipkan dan disusun oleh :

Arina Manasikana Dewi  
30101900032

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji  
Pada tanggal 20 Maret 2023  
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan tim penguji

Pembimbing I,

Drx. Israhanto Isradji, Msi

Anggota Tim Penguji I,

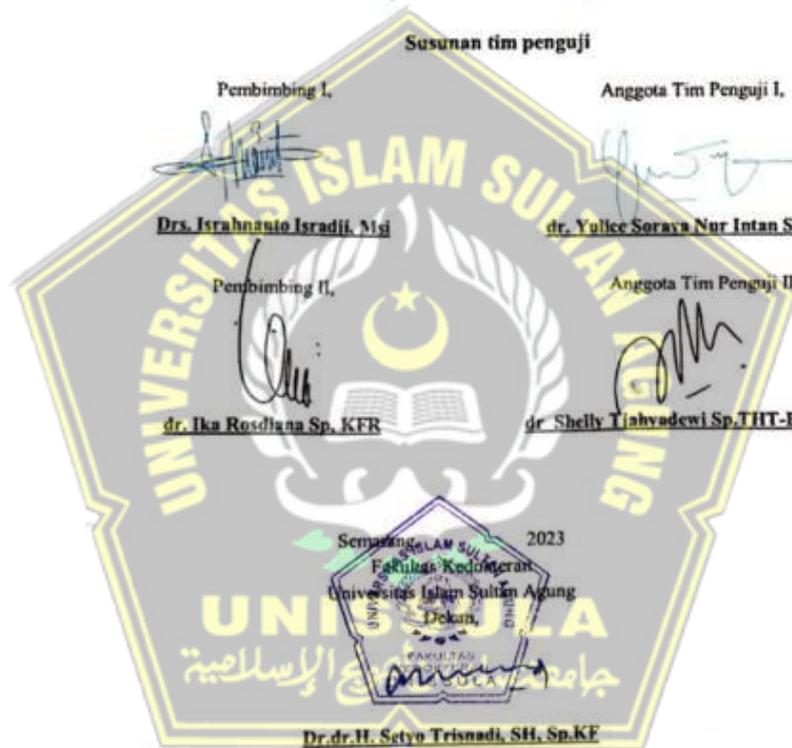
dr. Yulce Soraya Nur Intan Sp. OG

Pembimbing II,

dr. Ika Rosdiana Sp. KFR

Anggota Tim Penguji II,

dr. Shelly Tjahvadewi Sp. THT-BKL, M. Kes



## SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

**Nama : Arina Manasikana Dewi**

**NIM : 30101900032**

Dengan ini saya menyatakan bahwa Karya Tulis Ilmiah yang berjudul:

**“PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUAH NANAS MUDA TERHADAP  
KECACATAN FETUS MENCIT BETINA”**

Adalah benar hasil karya saya sendiri dan penuh kesadaran saya tidak melakukan tindakan plagiasi. Apabila saya terbukti melakukan tindakan plagiasi, saya siap menerima sanksi yang berlaku.



Semarang, 20 Maret 2023



(Arina Manasikana Dewi)

## PRAKATA

*Assalamu'alaikum Warrahmatullahi Wabarakatuh.*

*Alhamdulillah* rabbil'aalamiin, puji syukur kehadiran Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini tepat waktu dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Nanas Muda Terhadap Kecacatan Fetus Mencit Betina”

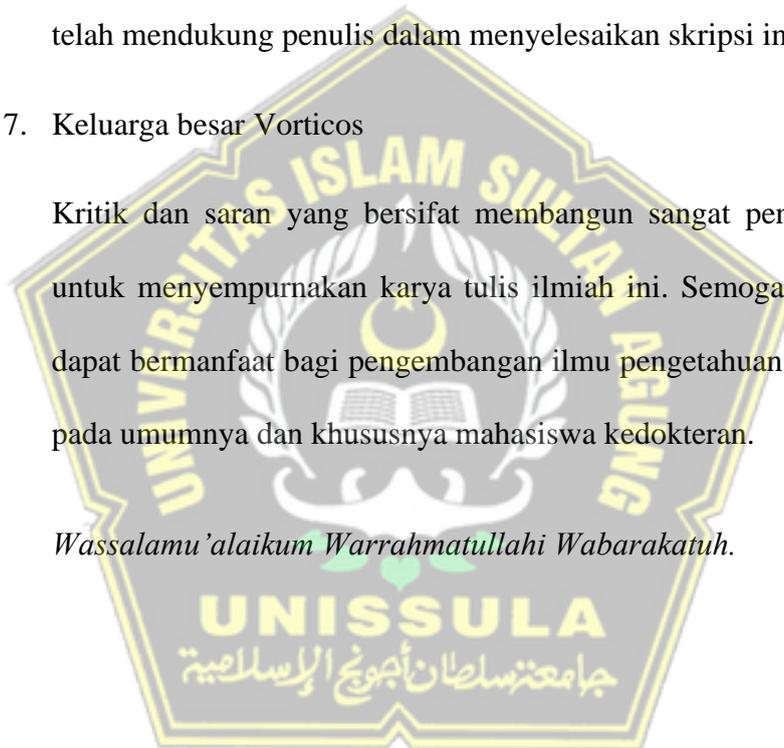
Dalam penyusunan dan penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, bimbingan serta dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

1. Dr. dr. Setyo Trisnadi, Sp. KF, SH., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang
2. Dr.Drs.Israhnanto Isradji,M.Si dan dr. Ika Rosdiana, Sp.KFR selaku dosen pembimbing I dan II yang telah banyak memberi ilmu dan meluangkan waktu untuk membimbing serta membantu penulis menyelesaikan skripsi ini.
3. dr.Yulice Soraya Nur Intan,Sp.OG dan dr.Shelly Tjahyadewi,Sp.THT-KL,M.Kes selaku dosen penguji I dan II yang telah meluangkan waktu untuk mengarahkan dan membimbing serta membantu penulis menyelesaikan skripsi ini.
4. Para Staff FMIPA Universitas Negeri Semarang yang telah mengizinkan dan membantu peneliti dalam pengambilan data penelitian skripsi ini.

5. Ayah Drs. Moh. Mukhsinin dan Ibu Susi Irmawati selaku orang tua penulis serta keluarga yang selalu mendukung, memberi motivasi, semangat dan memberi doa sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
6. Teman – teman seperjuangan penulis dalam menyelesaikan skripsi ini, Sherly, Azrial, Novenda serta teman-teman lainnya dan sahabat yang telah mendukung penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Keluarga besar Vorticos

Kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan untuk menyempurnakan karya tulis ilmiah ini. Semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan para pembaca pada umumnya dan khususnya mahasiswa kedokteran.

*Wassalamu'alaikum Warrahmatullahi Wabarakatuh.*



Semarang, 20 Maret 2023

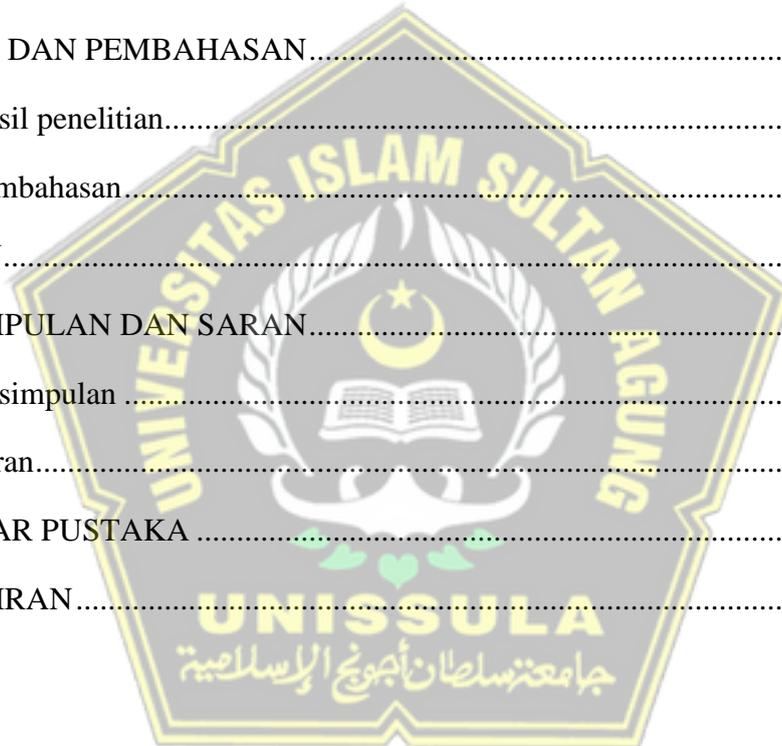
(Arina Manasikana Dewi)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
PRAKATA.....	iv
DAFTAR SINGKATAN .....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
INTISARI.....	xiii
BAB I.....	14
PENDAHULUAN .....	14
1.1. Latar Belakang .....	14
1.2. Rumusan Masalah .....	15
1.3. Tujuan Penelitian.....	16
1.3.1. Tujuan Umum.....	16
1.4. Manfaat penelitian.....	16
1.4.1. Manfaat teoritis .....	16
1.4.2. Manfaat praktis .....	16
BAB II.....	17
TINJAUAN PUSTAKA.....	17
2.1. Kehamilan mencit (Mus musculus).....	17
2.2. Embriologi mencit.....	23
2.3. Ekstrak buah nanas (Ananas comosus) .....	26
2.4. Kandungan nanas .....	27

2.5.	Hubungan nanas muda dengan kecacatan fetus yang dilahirkan mencit betina .....	31
2.6.	Kerangka Teori.....	34
2.7.	Kerangka Konsep .....	34
2.8.	Hipotesis.....	35
BAB III .....		36
METODE PENELITIAN .....		36
3.1.	Jenis penelitian dan rancangan penelitian .....	36
3.2.	Variabel .....	36
3.2.1	Variabel Bebas .....	36
3.2.2	Variabel Tergantung .....	36
3.3.	Definisi operasional.....	36
3.3.1.	Ekstrak Buah Nanas Muda.....	36
3.3.2.	Kecacatan fetus mencit yang dilahirkan mencit betina.....	37
3.4.	Populasi dan sampel .....	37
3.4.1.	Populasi.....	37
3.4.2.	Sampel .....	38
3.5.	Kriteria inklusi dan eksklusi.....	38
3.5.1.	Kriteria inklusi .....	38
3.5.2.	Kriteria eksklusi .....	38
3.6.	Alat dan Bahan Penelitian .....	38
3.6.1.	Alat Penelitian.....	38
3.6.2.	Bahan Penelitian .....	39
3.7.	Cara Penelitian .....	39
3.7.1.	Pengajuan ethical Clearance .....	39
3.7.2.	Cara pembuatan ekstrak buah nanas muda .....	40

3.7.3.	Prosedur Penelitian .....	41
3.7.4.	Persiapan Hewan Percobaan .....	42
3.7.5.	Pemberian Perlakuan.....	43
3.7.6.	Cara memberikan Ekstrak Buah Nanas Muda Dengan Sonde.....	43
3.8.	Alur penelitian.....	45
3.9.	Tempat dan waktu penelitian .....	46
3.10.	Analisa hasil .....	46
BAB IV .....		47
HASIL DAN PEMBAHASAN.....		47
4.1.	Hasil penelitian.....	47
4.2.	Pembahasan.....	51
BAB V.....		55
KESIMPULAN DAN SARAN.....		55
5.1.	Kesimpulan .....	55
5.2.	Saran.....	55
DAFTAR PUSTAKA .....		56
LAMPIRAN.....		58



## DAFTAR SINGKATAN

1. SDKI : Survey Demografi dan Kesehatan Indonesia
2. AKB : Angka Kematian Bayi
3. DNA : Deoxyribonucleatid Acid
4. G : Gram
5. DPC : Days Post Coitum
6. ICM : Inner Cell Mast
7. DVE : Distal Visceral Endoderm
8. MG : Milligram
9. GBB : Gram Berat Badan.



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.4. Kandungan gizi buah nanas dalam 100 gram .....	18
Tabel 4.1.1.1. Hasil pemeriksaan dan nilai rata-rata panjang ekor .....	34
Tabel 4.1.1.2. Hasil pemeriksaan dan nilai rata-rata ruas jari kaki .....	35
Tabel 4.1.1.3. Hasil pemeriksaan dan nilai rata-rata kelainan palatum .....	35
Tabel 4.1.2.1. Hasil uji <i>Kruskal-wallis</i> kelainan palatum .....	36
Tabel 4.1.2.2. Hasil uji <i>Kruskal-wallis</i> ruas jari kaki .....	36
Tabel 4.1.2.3. Hasil uji <i>Kruskal-wallis</i> panjang ekor .....	37



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.8. Kerangka teori.....	20
Gambar 2.9. Kerangka konsep.....	20
Gambar 3.8. Alur penelitian.....	28



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Deskripsi kelainan palatum, jumlah ruas kaki, dan Panjang ekor .....	58
Lampiran 2. Hasil uji normalitas Shapiro-wilk dan uji homogenitas Lavene test.	59
Lampiran 3. Hasil uji analisis perbedaan dengan Kruskal-wallis .....	60
Lampiran 4. Proses penelitian .....	61
Lampiran 5. Ethical clearance .....	62
Lampiran 6. Surat keterangan penelitian .....	63



## INTISARI

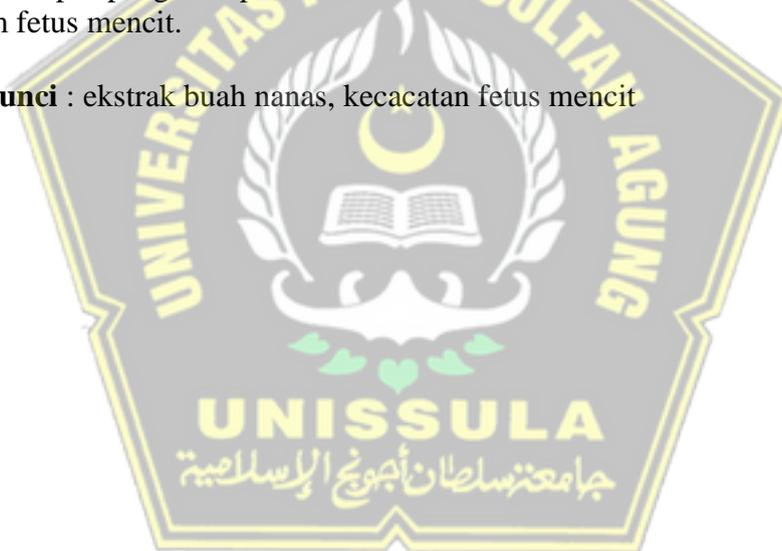
Angka kematian bayi (AKB) sebesar 24 per 1.000 kelahiran hidup, penyebab AKB terbanyak adalah kondisi berat badan lahir rendah (35,3%), kelainan kongenital (21,4%), asfiksia (27%), sepsis (12,5%), tetanus (3,5%) dan sisanya sekitar 0,36% dengan penyebab lain. Berdasarkan data tersebut kelainan kongenital memberikan distribusi sebagai salah satu penyebab tertinggi kematian pada bayi.

Post test only control group design dilakukan pada 24 ekor mencit hamil, kelompok kontrol (K1) dengan pakan standar, K2 dengan dosis nanas muda 0,02 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB, K3 dengan 0,04 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB, K4 dengan dosis 0,08 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB. Analisis dengan IBM Statistic SPSS 25 untuk melakukan uji hipotesis dengan kruskall-walis dengan nilai p-value <0,05.

Total dari 160 fetus mencit yang lahir didapatkan nilai p 0,088 pada kelainan palatum, p 0,021 ruas jari kaki mencit, dan p 0,000 pada Panjang ekor.

Kesimpulan Penelitian didapatkan Terdapat pengaruh pemberian ekstrak buah nanas muda terhadap kecacatan fetus mencit, terdapat pengaruh pemberian ekstrak buah nanas muda terhadap panjang ekor fetus mencit, terdapat pengaruh pemberian ekstrak buah nanas muda terhadap jumlah ruas jari kaki fetus mencit, Tidak terdapat pengaruh pemberian ekstrak buah nanas muda terhadap kelainan palatum fetus mencit.

**Kata kunci** : ekstrak buah nanas, kecacatan fetus mencit



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Kehamilan adalah suatu proses yang berkesinambungan yang diawali dengan ovulasi, migrasi sperma dan sel telur, pembuahan, implantasi rahim, pembentukan plasenta, dan pertumbuhan janin hingga dewasa. (Mustofa *et al.*, 2009) Menurut Survey Demografi dan Kesehatan Indonesia (SDKI) tahun 2017, angka kematian bayi (AKB) sebesar 24 per 1.000 kelahiran hidup, penyebab AKB terbanyak adalah kondisi berat badan lahir rendah (35,3%), kelainan kongenital (21,4%), asfiksia (27%), sepsis (12,5%), tetanus (3,5%) dan sisanya sekitar 0,36% dengan penyebab lain. Berdasarkan data tersebut, cacat lahir menjadikan pembagian tersebut sebagai penyebab utama kematian bayi. (RI, 2019)

Buah nanas (*Ananas comosus*) merupakan buah yang sering dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia. Buah nanas muda tidak hanya dapat menyebabkan keguguran, tetapi juga dapat menyebabkan cacat lahir. Kurangnya kesadaran akan kandungan dan efek samping buah nanas dapat meningkatkan resiko kematian ibu dan anak bila tetap dikonsumsi. (Apsari *et al.*, 2016) Pada penelitian yang dilakukan Astuti *et al.*, menunjukkan bahwa tiga janin dengan persentase 12,67% mengalami perdarahan setelah pemberian ekstrak buah nanas muda yaitu pada kerangka metatarsus dan metatarsus, hasil preparat menunjukkan keterlambatan proses pengerasan tulang karena konsentrasi enzim bromelain dalam kulit nanas 0,050-

0,075%. (Astuti *et al.*, 2019)

Penelitian sebelumnya menyimpulkan nanas sebagai salah satu tanaman yang diduga mempengaruhi mencit hamil selama organogenesis, mengubah kapasitas reproduksi mencit betina dan memberikan efek pada janin berupa kelainan morfologi dan perdarahan, penghambatan pengerasan pada tulang metakarpal dan metatarsal serta kelainan bentuk tulang rusuk. (Setyawati *et al.*, 2011) Namun penelitian terdahulu hanya terbatas pada penampilan reproduksi, malformasi dan perkembangan skleton fetus. Sementara itu, penelitian tentang ekstrak nanas muda terhadap keamanannya pada organ internal fetus mencit yang meliputi otak, mata, langit-langit rongga mulut, ginjal dan jantung belum diketahui efeknya. (Astuti *et al.*, 2019)

Berdasarkan latar belakang diatas maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian ekstrak buah nanas muda terhadap kecacatan fetus yang dilahirkan mencit betina.

## 1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah berdasarkan latar belakang diatas sebagai berikut  
“adakah pengaruh pemberian ekstrak buah nanas muda pada kecacatan fetus yang dilahirkan mencit betina?”

### **1.3. Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1. Tujuan Umum**

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak buah nanas muda terhadap kecacatan fetus yang dilahirkan mencit betina.

#### **1.3.2. Tujuan Khusus**

- a. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak buah nanas muda terhadap panjang ekor fetus mencit.
- b. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak buah nanas muda terhadap jumlah ruas-ruas jari.
- c. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak buah nanas muda terhadap kelainan palatum fetus mencit.

### **1.4. Manfaat penelitian**

#### **1.4.1. Manfaat teoritis**

Memberikan informasi pengembangan ilmu mengenai pengaruh pemberian ekstrak buah nanas muda terhadap kecacatan fetus yang dilahirkan mencit betina.

#### **1.4.2. Manfaat praktis**

Menambah pengetahuan pada profesi mengenai pengaruh bromelain terhadap morfologi fetus yang dilahirkan mencit betina.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Kehamilan mencit (*Mus musculus*)

Mencit merupakan hewan yang sering menjadi objek penelitian. Mencit banyak digunakan sebagai hewan laboratorium karena memiliki kelebihan seperti siklus hidup, jumlah anak yang banyak, variatifnya sifat mencit, dapat dikendalikan dengan mudah, serta system reproduksi memiliki kemiripan dengan mamalia lain seperti domba, kambing, babi, dan sapi. Selain kelebihan diatas, usia mencit dapat bertahan dari usia 1 tahun hingga 3 tahun. Dibawah ini merupakan beberapa klasifikasi dari mencit (*Mus musculus*). (Kasmawaty *et al.*, 2020)

1. Kingdom : Animalia
2. Fillum : Chordata
3. Sub filum : Vertebrata
4. Class : Mamalia
5. Orto : Rhodentia
6. Sub orto : Myomorpha
7. Famili : Muridae
8. Sub family : Murinae
9. Genus : Mus
10. Species : *Mus musculus*

Selain persamaan dari segi fisiologis dan anatomis, mencit adalah mamalia yang tidak asing bagi para peneliti, pengetahuan mengenai karakter genetik dan kemudahan didapat, maka tidak dapat dipungkiri apabila mencit sering digunakan dalam penelitian tentang genetik. Dari beberapa mamalia, mencit merupakan hewan yang termasuk dalam kategori mamalia dengan tingkat kemiripan tinggi terhadap manusia. Terlebih lagi pada penelitian-penelitian tentang rekayasa genetik dan manipulasi genetik. Penelitian ini hampir selalu menggunakan mencit sebagai bahan percobaan. (Kasmawaty *et al.*, 2020)

Sistem reproduksi pada betina mencit terdiri dari uterus, ovarium, dan oviduct. Untuk alat reproduksi jantan mencit yaitu testis dan beberapa saluran seperti duktus ejakulatorius, duktus deferens, dan beberapa kelenjar aksesori. Organ dan sistem reproduksi pada mencit dapat berfungsi di usia 10 minggu hingga usia 12 minggu. Mencit betina hanya akan berkembang biak dengan jantan ketika berada pada masa estrus, masa estrus biasanya digambarkan pada saat sel telur ovarium benar-benar matang dan menunggu dibuahi. Kopulasi terkadang terjadi pada waktu kurang lebih 5 jam hingga 8 jam pasca fase ovulasi. Masa estrus mencit sendiri dapat ditentukan dengan cara melihat kelamin bagian luar seperti terjadinya pembengkakan vulva dan warna vulva lebih kemerahan. Agar dapat dipastikan tahapan fase siklus estrus, para peneliti juga dapat melakukan swab vagina kemudian dianalisa tahapan fase estrusnya. Tingginya jumlah sel epitel bertanduk di apusan vagina menandakan mencit sedang berada pada masa estrus. Masa estrus rata-rata dimulai saat tengah malam dan kopulasi murni biasanya

pada jam 2 dini hari menjelang fajar. Sperma diejakulasikan ke vagina pada waktu kopulasi dan dalam beberapa menit akan mencapai lumen oviduct. Viabilitas dan mobilitas sperma mencit bertahan selama kurang lebih 8 jam setelah terjadinya ovulasi. Efek kopulasi mencit ditandai dengan adanya vaginal plug dan warna kemerahan di vagina, ini menandakan bahwa mencit sedang hamil usia 0 hari yang kemudian terbentuk embrio dari perkembangan zigot. Semua kebutuhan embrio mencit didapat dari supply induk mencit melalui plasenta. Plasenta terbentuk pada usia kehamilan 8 hingga 9 jam. Masa kehamilan mencit dapat berlangsung kurang lebih selama 18 hari hingga 22 hari. Embrio mencit adalah multisel diploide ukariota pada tahap awal perkembangan biakan secara kopulasi. DNA Embrio yang merupakan hasil pembelahan zigot mendapat seluruh DNA dari mencit betina dan jantan. Dalam hewan, perkembangan zigot menjadi embrio terjadi pada tahapan yang biasa dikenal dengan sel blastula, sel gastrula, dan pembentukan organ atau organogenesis. Semua hal yang dibutuhkan seperti oksigen, nutrisi, darah, dan proses metabolisme bergantung pada plasenta. (Nugroho, 2018)

Periode persiapan embrio dimulai dari mencit betina dan jantan yang sudah mencapai kematangan seksual untuk melakukan perkawinan. Periode pembuahan merupakan masa dimana mencit betina dan jantan sudah melakukan perkawinan yang selanjutnya menghasilkan gamet berjalan menuju tempat pembuahan dan terjadi fertilisasi. Setelah fertilisasi terjadi, zigot melakukan implantasi pada endometrium dan dalam hal ini endometrium sedang berada pada tahap sekresi. Fase sekresi pada

endometrium ditandai dengan banyaknya kelenjar dan duktus di uterus. Kadangan kelenjar tersebut yaitu glikogen dan glikoprotein, pelebaran pembuluh darah, serta lamina propia yang membengkak. Tahapan selanjutnya adalah proses penebalan dinding endometrium yang dapat mencapai 5 mm. Penebalan ini adalah hasil dari korpus luteum yang mengekskresikan progesteron yang dapat dikenali pada 2-3 hari setelah ovulasi. (Nugroho, 2018)

Masa gestasi mencit umumnya terjadi selama 19-21 hari yang terjadi secara langsung ketika dalam masa postpartum dan masa laktasi. Pada fase gestasi akan terhambat oleh fase laktasi, hal ini dikarenakan terdapat masa implantasi yang terhambat. Proses ini berakibat pada masa gestasi yang memanjang dari 12 hingga 13 hari, namun ini terjadi pada strain inbred tertentu. Masa gestasi juga dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti ukuran indukan dan jenis strain inbred. Beberapa peneliti mencontohkan bahwa strain inbred mencit mempunyai masa gestasi yang lebih lama dari pada mencit dengan strain non inbred, dan ukuran mencit yang lebih besar memiliki kecenderungan lahir lebih cepat. Perpanjangan gestasi mencit biasanya mencapai 1 minggu dan proses kelahiran dapat kembali terjadi setelah hari ke 16. (Srinivasulu *et al.*, 2012)

Jumlah fetus mencit dalam sekali lahir merupakan jumlah total fetus mencit yang mati maupun hidup dalam periode lahir. Fetus mencit yang lahir rata-rata berjumlah sekitar 6 sampai 15 ekor. Berikut beberapa faktor yang memengaruhi jumlah fetus mencit sekali lahir :

1. Jenis pakan yang diberikan pada mencit bunting.

Pakan adalah faktor yang paling berpengaruh terhadap siklus hidup hewan. Menurut penelitian sebelumnya, pakan mencit seharusnya sesuai dengan kebutuhan mencit dari serat 5%, protein 12%, lemak 5% terdapat kadungan vitamin A, vitamin D, vitamin B12, vitamin B7, asam linoleate, dan biolin. Selain itu mencit juga memerlukan pakan yang mengandung asam amino esensial. Dengan supply pakan yang bagus akan memengaruhi jumlah fetus mencit yang lahir. (Mutiarahmi *et al.*, 2021)

2. Jumlah sel telur.

Jumlah sel telur dipengaruhi oleh hormone estrogen yang diproduksi ovarium dari indukan mencit. Pembengkakan system dalam melalui system reproduksi dipengaruhi oleh jumlah pasokan darah oleh hormone estrogen.

3. Musim kawin

Mencit yang lebih agresif dan gelisah merupakan tanda dari mencit yang masuk pada masa kawin. Masa ini dapat disebut fase estrus. Fase estrus sendiri ditandai oleh hormon GnRH yang lepas setelah mendapat stimulasi dari kelenjar hipotalamus. (Nugroho, 2018)

4. Lingkungan

Kelembapan, suhu, cahaya dan sirkulasi udara merupakan faktor-faktor yang memengaruhi jumlah anakan mencit yang lahir, lingkungan yang bising dan dekat dengan keramaian termasuk dalam lingkungan yang dapat meningkatkan stressor mencit. (Mutiarahmi *et al.*, 2021)

Pakan yang tercemar dan jumlah kandungan pakan yang minimal dan mengakibatkan pada kematian fetus mencit maupun kecacatan fetus mencit yang lahir. Selain itu, spermatozoa dari mencit yang mendapat pakan kurang memadai juga dapat berpengaruh. Sedangkan berat badan fetus mencit yang lahir dipengaruhi oleh pakan induk mencit pada saat lahir dan kualitas sel telur yang dimiliki induk mencit. Beberapa faktor yang memengaruhi pertumbuhan fetus mencit sebelum lahir. Beberapa faktor yang memengaruhi pertumbuhan fetus mencit sebelum lahir yaitu mutu genetik, pakan, dan lingkungan sekitar mencit yang hamil.

Mutu genetic hewan terdapat beberapa istilah seperti perkawinan luar, perkawinan dalam atau tertutup. Perkawinan tertutup merupakan perkawinan yang berlangsung antara mencit betina dan jantan dengan hubungan darah cukup dekat. Begitupun dengan perkawinan luar dimana mencit jantan dan betina tidak memiliki hubungan darah. Efek dari perkawinan tertutup yang paling sering terjadi yaitu kualitas telur yang jelek, fetus mencit yang lahir cacat hingga mati. (Hasanah *et al.*, 2015)

Proses kehamilan merupakan proses yang membutuhkan supply makanan yang lebih daripada sebelum hamil. Selain supply makanan yang dibutuhkan induk, namun makan tersebut juga harus memenuhi kebutuhan perkembangan fetus yang sedang berkembang. Kurangnya supply pakan mencit akan memengaruhi berat badan mencit yang lahir. Selain bobot kekuatan fetus mencit yang lahir diengaruhi kurangnya supply vitamin dan mineral pada masa kehamilan. (Mutiarahmi *et al.*, 2021)

## 1. Suhu lingkungan selama kebuntingan

Bobot lahir mencit yang rendah secara tidak langsung dipengaruhi oleh lingkungan, dimana suhu lingkungan memengaruhi tingkat nafsu makan. Dengan tingginya suhu akan mengakibatkan turunnya nafsu makan mencit. Sebaliknya dengan suhu yang lebih rendah akan meningkatkan nafsu makan mencit terutama mencit dengan kondisi hamil atau bunting. Maka secara tidak langsung bobot mencit yang lahir sangat dipengaruhi oleh suhu maupun lingkungan. (Nugroho, 2018)

## 2.2. Embriologi mencit

Mencit banyak digunakan dalam studi embriologi dan umumnya berfungsi sebagai model untuk perkembangan embrio mamalia. Selain memiliki masa kehamilan yang singkat yaitu 19-21 hari, mencit memiliki keturunan relatif besar berjumlah kurang lebih 6 hingga 12 ekor mencit. Di bawah ini adalah gambaran tahapan embrio mencit yang berkembang dari zigot hingga partus. (Herlina *et al.*, 2021)

Pada perkembangan awal mencit, proses embriogenesis diawali dengan sel ovum mencit yang dibuahi. Sel ovum tersebut adalah sel tunggal yang kemudian membelah menjadi 2 sel. pembelahan pertama terjadi dalam 2 jam pertama. Usia embrio saat ini adalah 1 hari *post coitus* (dpc). Pada hari ke-2, morula muncul di saluran telur di persimpangan tuba dan usia kehamilan 2 hari setelah koitus. Penampilan *Inner cell mass* (ICM) blastokista dengan total 16 sel. Perubahan Embrio dimulai dari morula menjadi blastula yang ditandai

dengan munculnya *blastocel*. Pada hari ke 3 stadium blastokista, terdapat celah dari *inner cell mass* dengan sel trofektoderm. Biasanya blastokista terletak pada lumen rahim dan usia embrio saat ini adalah 3 dpc. Pada hari selanjutnya, meskipun zona pelusida tidak lagi terlihat, implantasi blastokista telah terjadi dan sel endoderm embrio menutupi permukaan blastokista ICM.

Pada hari ke-5 kehamilan, terdapat sinyal node yang berasal dari epiblast yang memicu proses pembentukan *distal visceral endoderm* (DVE) dimana DVE ini berperan besar dalam pembentukan aksis posterior dan aksis anterior embrio. Saya mengalami reaksi endometrium pada hari ke-6. Secara morfologis, ektoderm embrionik dan endoderm embrionik dapat dibedakan. Proses gastrulasi untuk menghasilkan sel mesodermal awal juga dimulai pada titik ini. Sel-sel progenitor jantung mulai terbentuk antara hari ke-6 dan ke-7, dan kantung ketuban serta calon *allantois* mulai terbentuk pada hari ke-7. Proses gastrulasi berlanjut dan nodul dan lempeng saraf yang menonjol mulai muncul. Terdapat stadium presomit, kuncup alantois tampak memanjang, lempeng notokord dan sulkus saraf dapat diamati, lipatan sefalik muncul dan berlanjut, usus depan mulai terbentuk, dan lempeng anterior mesoderm bergerak ke arah tengah jantung. (Herlina *et al.*, 2021;Kasmawaty *et al.*, 2020)

Minggu kedua hari kedelapan dimulai ketika somit 1-4 terlihat, allantoicum meluas ke exocoelom, lempeng kardiogenik dan kantung antegut terlihat jelas, komponen rahang atas dan lengkungan cabang pertama muncul. Sulkus preotik terdapat pada somit 2-3 dan plakoda optik terlihat sebagai fosa optik. Pertumbuhan somit berlangsung 1-7 dan 8-12. Neuropori

anterior terbentuk, tungkai muncul, jantung mengalami "putaran". Pada hari kesembilan, neuropori posterior mulai terbentuk, menjadi tungkai depan, vesikel otak depan terpisah dari telencephalon dan diafragma. Kaki belakang mengikuti somit 23-28. Ekor masa depan terlihat sebagai tonjolan kecil, formasi kantong Rathke juga terlihat. Pada akhir hari kesembilan terjadi proses penutupan neuropori posterior, dan pada tahap ini jumlah somit adalah 30-34. Pada hari kesepuluh, ekor menjadi lebih panjang, puncak saraf mengalami perkembangan lebih besar. Sel-sel pada telinga termasuk ganglion vestibular, selanjutnya pembentukan utrikula makula serta sakular dan krista kanal setengah lingkaran. Perkembangan saluran pencernaan berlanjut, migrasi sel germinal primitif terjadi dan mesenkim terbentuk dari metanefrik, yang berkontribusi pada pembentukan ginjal metanefrik. (Nwankudu *et al.*, 2015)

Pada hari kesebelas, somit tidak terlihat di daerah serviks, otak tumbuh pesat, pembentukan rongga hidung terlihat, ujung neuron saraf eferen mulai mendekati sel rambut. Vesikel dipisahkan dari endoderm dan ektoderm. Kaki anterior berkembang. Kelanjat gonad mulai terbentuk pada kedua jenis kelamin, kemudian septa atrium dan ventrikel mulai terbentuk di jantung. Pada hari kedua belas, terbentuk telapak kaki depan dan belakang dengan jelas, pigmen retina muncul melalui kornea. Proses perkembangan alat kelamin menjadi lebih matang, tunica albuginea berkembang. Pada usia ketiga belas, lengan dan pergelangan tangan mulai terpisah. Lima baris vibrissae terlihat dan rongga vesikel lensa hilang. Struktur ovarium terbentuk, yang nantinya terkait dengan perkembangan sel telur. Satu lapisan hepatoblas

terbentuk di dekat mesenkim portal. Pada hari keempat belas, jari kaki dipisahkan secara distal, setiap jari kaki terlihat di bagian depan kaki, organ-organ ekstremitas berkembang, di dinding daad sudah ditemukan folikel rambut, panggul, batang tubuh, serta di telinga ditemukan juga folikel rambut yang lebih banyak.(Sani, 2018)

Pada hari kelima belas, saat jari kaki terpisah, di kepala terdapat folikel rambut, akan tetapi folikel tersebut tidak di berada dekat dengan *vibrissa*. Usia embrio keenam belas hari menunjukkan kuku di jari kaki. Kulit mulai terlihat berkerut dan menebal pada hari ketujuh belas, selanjutnya jari-jari tangan dan kaki lebih sejajar, mulai hilangnya hernia umbilikalisis, serta kelopak mata menyatu. Pertumbuhan sel epitel dari rongga urogenital terlihat jelas dan kelenjar prostat terbentuk. Pada hari kedelapan belas terjadi peningkatan permukaan, mata terlihat hampir menembus kelopak mata. Pulau sel *langerhans* terbentuk dan puting susu terbentuk melalui sel mesenkim. Jenggot dan kumis berkembang dan terlihat terjadi pemanjangan. Hari kesembilan belas adalah proses kelahiran tikus, diikuti oleh perkembangan pascakelahiran. Hari ke-20 dan ke-21 merupakan perkembangan sistem auditori dan vestibular, persarafan sistem vestibular berkembang baik secara morfologis maupun fisiologis. (Nugroho, 2018)

### 2.3. Ekstrak buah nanas (*Ananas comosus*)

Nanas atau *Ananas comosus* dalam bahasa Latin. Nanas untuk pertama kali diidentifikasi tahun 1398 di Brazil dan Paraguay yang selanjutnya para peneliti dari Eropa pada tahun 1664 menyebut nanas atau ananas karena dari segi bentuk yang hamper sama dengan cemara. Columbus menemukan nanas

di Kepulauan Hindia kemudia membawanya ke Eropa. Bangsa Spanyol membawa nanas ke Hawaii dan Filipina di tahun 1800-an. Buah nanas (*Ananas comosus*) sangat populer karena mudah ditemukan. Buah nanas bisa dibilang bisa dijadikan makanan penutup. (Cahyo *et al.*, 2017)

Nanas (*Ananas comosus*) adalah tanaman dengan proses tanam tahunan. Komposisi yang terkandung di dalam buah nanas seperti buah, daun, akar, batang, dan bunga. Akar nanas melekat pada pangkal batang dan mengandung akar serabut, penanaman akar nanas yang ideal adalah sekitar 30 cm hingga 50 cm kedalam tanah. Bagian batang nanas berukuran panjang 20cm hingga 25 cm, dengan ketebalan hingga 4 cm, bercuping pendek. Daun nanas memiliki panjang 130-150 cm, lebar 3-5 cm dan memiliki duri yang tajam, meskipun ada juga yang tidak berduri dan tidak memiliki tangkai daun. Jumlah daun per batang sangat bervariasi antara 70 hingga 80 helai. Nanas memiliki serangkaian paku di ujung batangnya. Bunganya hermafrodit dan terletak di ketiak daun pelindung daun. Musim tanam bunga dari pangkal ke atas berlangsung sekitar 10 sampai 20 hari. Waktu dari tanam hingga berbunga adalah 6 hingga 16 bulan. (Cahyo *et al.*, 2017)

#### **2.4. Kandungan nanas**

Buah nanas (*Ananas comosus*) mengandung nutrisi seperti kaslsium, kalium, fosfor, vitamin A, magnesium, besi, natrium, kalium, dekstroza, sukrosa dan enzim protease sistein yaitu enzim bromelain dengan jumlah 95%. Ini merupakan enzim yang dapat memecah protein yang tahan panas (proteolisis). Manfaat enzim bromelain antara lain pereda nyeri, anti bengkak, mempercepat penyembuhan luka, meregenerasi kulit pasca terbakar,

meningkatkan efektifitas antibiotik, dan sangat bermanfaat pada penutupan luka pasca operasi. pengaruh antiinflamasi enzim bromelain dapat mengurangi ekspresi mRNA yang kemudian diekspresikan dengan peningkatan jumlah leukosit darah. (Jančić *et al*, 2022)

Bromelain adalah enzim proteolitik eksogen dari kelompok proteinase sistein, yang bersama dengan enzim papain dari pepaya, banyak digunakan dalam industri sebagai pelunak daging. Perlunakan daging sebagian besar disebabkan oleh kerusakan jaringan ikat. Dibandingkan dengan protein myofibrillar lainnya, enzim bromelain menunjukkan aktivitas hidrolitik dalam jaringan ikat, terutama melawan kolagen. Aktivitas kolagenase bromelain mungkin disebabkan oleh akumulasi hidroksiprolin dengan menghidrolisis kolagen. (Ionescu *et al.*, 2008) Jaringan ikat kolagen yang sudah dipecah oleh enzim bromelain dapat berakibat perlunakan pada janin. Kolagen merupakan protein pembentuk tubuh manusia maupun hewan. Kolagen terdapat sebanyak 30% ditubuh manusia dan hewan. Kolagen ditemukan pada jaringan seperti kulit, sistem muskuloskeletal, dan juga ditemukan dalam darah. Kolagen dapat disebut dengan inti jaringan ikat pada tubuh manusia. Hidrolisis kolagen yang abnormal karena enzim bromelain nanas muda dapat berakibat fatal, mulai dari peredaran darah yang tidak mencukupi kebutuhan jaringan, penurunan berat badan yang signifikan, serta perkembangan dan pertumbuhan janin Ketika didalam kandungan. (Setyawati *et al.*, 2011)

Kandungan bromelain yang tinggi dengan berat molekul potensial (BM) < 600 dalton memungkinkan enzim melewati penghalang plasenta.

Akumulasi bromelain pada plasenta mencegah transfer nutrisi dari ibu ke janin dan mencegah metabolisme nutrisi penting untuk pertumbuhan dan perkembangan organ janin, termasuk mineral untuk proses pengapuran. Selain itu, akibat aksi bromelain, kerusakan kolagen pada dinding pembuluh darah dapat menghambat pengiriman oksigen dan nutrisi yang dibutuhkan janin untuk pertumbuhan, perkembangan, dan osteogenesis. Kolagen dan mineral yang ada pada tubuh membentuk tulang dengan proses hidroksiapatit, kolagen dan mineral tersebut memberikan efek kelenturan, struktur dan kekuatan tulang. Didalam tubuh manusia tulang sangat banyak membentuk struktur tubuh, peran tulang yaitu 30% dari struktur tubuh manusia, dan kolagen sendiri terdapat sekitar 90% didalam tulang. (Sherwood, 2018) pemecahan kolagen yang disebabkan oleh enzim bromelain dapat menyebabkan kelainan morfologi, kelainan darah, pencegahan kalsifikasi tulang rawan pada segmen metacarpal dan metatarsal janin, dan kelainan bentuk tulang rusuk pada mencit. (Astuti *et al.*, 2019)

Kandungan buah nanas (*Ananas comosus*) sangat beragam seperti yang dijelaskan pada table 2.4.

Tabel 2.4. Kandungan Gizi Buah Nanas dalam 100 gram

Kandungan gizi	Unit	Nilai Per 100 Gram
Air	G	87.24
Energi	Kcal	45
Energi	kJ	190
Protein	G	0.55
Lemak total	G	0.13
Ash	G	0.27
Karbohidrat	G	11.82
Gula	G	8.29
Sucrosa	G	4.59
Glucosa (dextrosa)	G	1.76
Fructosa	G	1.94
Lactosa	G	0.00
Maltosa	G	0.00
Galactosa	G	0.00
Calcium, Ca	Mg	13
Besi, Fe	Mg	0.25
Magnesium, Mg	Mg	12
Phosphor, P	Mg	9
Potassium, K	Mg	125
Sodium, Na	Mg	1
Seng, Zn	Mg	0.08
Copper, Cu	Mg	0.081
Mangan, Mn	Mg	1.593
Selenium, Se	Mcg	0.0
Vitamin C	Mg	16.9
Thiamin	Mg	0.078
Riboflavin	Mg	0.029
Niacin	Mg	0.470
Asam Pantothenic	Mg	0.193
Vitamin B-6	Mg	0.106
Asam folat	Mcg	11
Kolin	Mg	5.6
Betaine	Mg	0.1
Vitamin A, RAE	mcg_RAE	3

## 2.5. Hubungan nanas muda dengan kecacatan fetus yang dilahirkan mencit betina

Penelitian ini bertujuan untuk menyelidiki lebih lanjut efek pemberian ekstrak buah nanas terhadap jumlah cacat morfologi eksternal janin yang lahir pada mencit betina. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya pada peneliti sebelumnya, buah nanas (*Ananas comosus*) dengan kandungan bromelain tinggi yang telah dimakan mencit dapat melewati sawar plasenta sehingga mempengaruhi enzim kolagen pada embrio tikus. Hal ini dapat mempengaruhi perkembangan sistem ekstremitas janin pada mencit karena jumlah pergelangan kaki tungkai depan dan belakang, perbedaan berat badan dan panjang mencit antara kontrol dan perlakuan, banyaknya kelainan pada daerah mulut. pada mencit (Palate Durum), panjang ekor mencit dan jumlah kematian mencit yang dilahirkan. (Sharma *et al.*, 2018)

Nanas muda (*Ananas comosus*) banyak mengandung nutrisi, salah satunya adalah enzim bromelain. Enzim bromelain dapat merubah struktur peptida dalam tubuh, proses pemecahan ini bertujuan untuk memecah ikatan protein dan polipeptida menjadi ikatan yang berukuran lebih kecil dan terbentuk asam amino. Penelitian menunjukkan bahwa enzim bromelain telah terbukti menyebabkan cacat pada bayi tikus. Cacat ini termasuk kelainan darah, kelainan morfologi seperti berat dan panjang janin tikus, penghambatan osifikasi metakarpal dan metatarsal, dan kelainan bentuk tulang rusuk. (Astuti *et al.*, 2019) Enzim bromelain yang terkandung dalam nanas muda dengan dosis 8,70 dan 13,05 g/ekor/hari diduga dapat menyebabkan perdarahan. Perdarahan disebabkan oleh gangguan tekanan

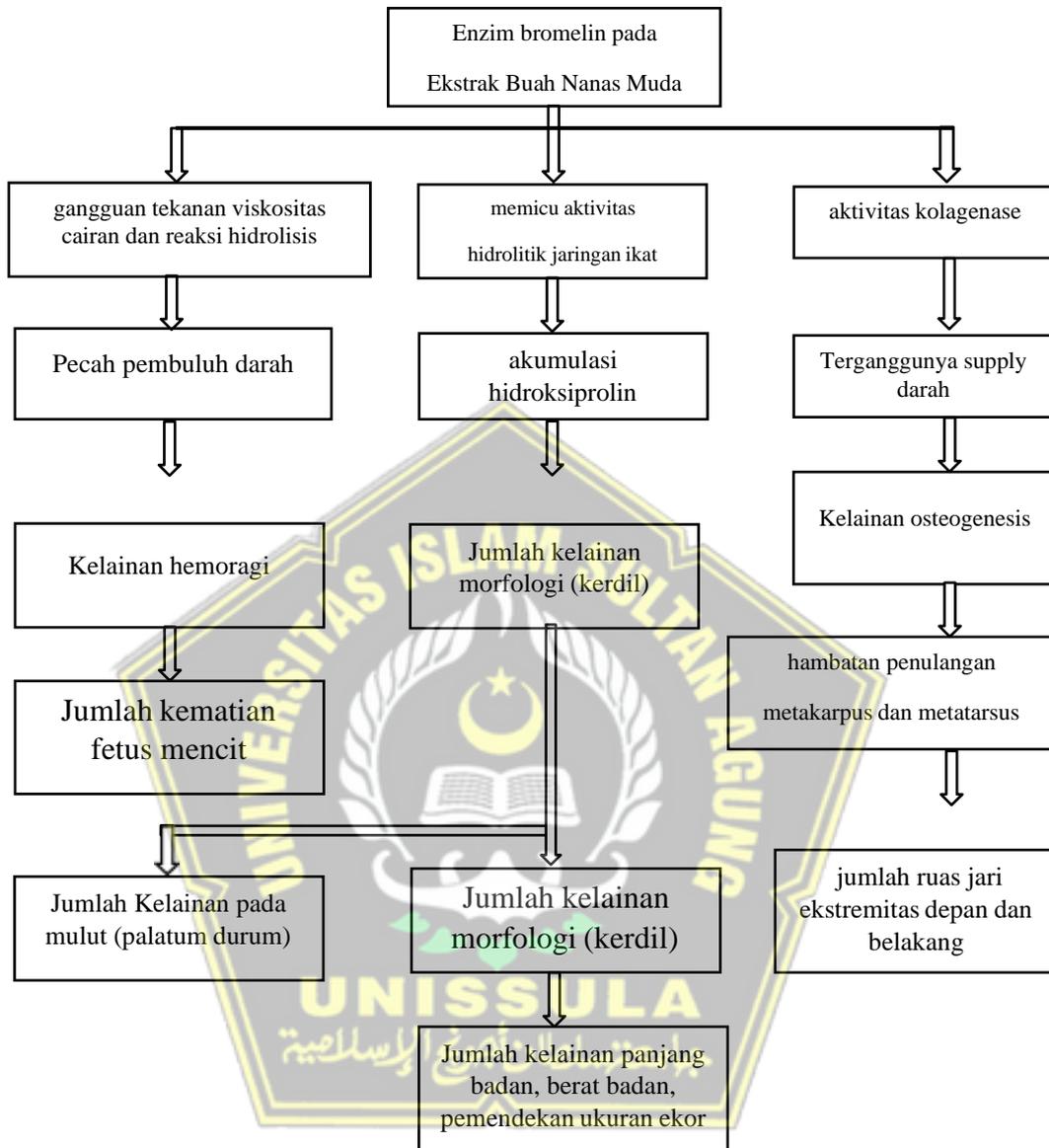
kekentalan cairan di berbagai bagian janin, yaitu antara plasma darah dan ruang ekstraseluler. Selain itu, enzim bromelain mampu menghidrolisis kolagen, dari kolagen tipe I hingga kolagen tipe III yang kemudian mempengaruhi epitel pembuluh darah sehingga pembuluh darah menjadi lebih mudah pecah.. (Setyawati *et al.*, 2011) Proses lain yang menyebabkan perdarahan pada janin tikus adalah vasokonstriksi yang menyebabkan peningkatan tekanan darah dan pecahnya pembuluh darah. (El-Gazar, 2022) Studi lain menjelaskan bahwa kelainan morfologi pada bayi tikus disebabkan oleh aktivitas enzim bromelain pada nanas muda (*Ananas comosus*), yang menginduksi enzim hidrolisis pada jaringan ikat, terutama pada jaringan ikat kolagen dan beberapa protein myofibrillar lainnya. (Ionescu *et al.*, 2008) Aktivitas kolagenase bromelain kemungkinan disebabkan oleh akumulasi hidroksiprolin melalui hidrolisis kolagen. Jaringan ikat kolagen yang dihidrolisis oleh bromelain membuat struktur protein janin menjadi lebih lunak. (Silaban *et al.*, 2016)

Enzim bromelain diketahui memiliki kemampuan memecah kolagen dari jaringan ikat. Pada saat yang sama, kolagen sendiri memainkan peran yang sangat penting dalam membentuk struktur tulang. Jaringan ikat kolagen terdiri dari 90 persen, dimana hingga 30 persen kolagen membentuk tulang. (Sherwood, 2018) Kolagen yang telah terhidrolisis disebabkan oleh aksi kolagenase bromelain yang terdapat pada pembuluh darah, sehingga dapat menyebabkan rapuhnya pembuluh darah. Struktur pembuluh darah yang jelek secara tidak langsung mengganggu supply darah dari ibu ke janin. Gangguan aliran darah yang membawa oksigen dan nutrisi

yang dibutuhkan janin dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan, termasuk osteogenesis janin dalam kandungan. Kelainan osteogenesis pada janin tikus biasanya bermanifestasi sebagai kelainan kerangka apendikular pada metakarpal, metatarsal, dan vertebra. (Silaban *et al*, 2016)

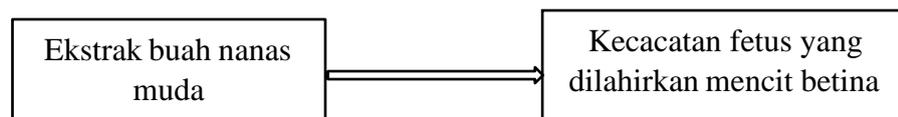


## 2.6. Kerangka Teori.



Gambar 2.6. Kerangka teori

## 2.7. Kerangka Konsep



Gambar 2.7. Kerangka konsep

## 2.8. Hipotesis

Berdasarkan uraian diatas, hipotesis sementara yaitu terdapat pengaruh pemberian ekstrak buah nanas muda (*Ananas comosus*) terhadap kecacatan fetus yang dilahirkan mencit betina (*Mus musculus*).



## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Jenis penelitian dan rancangan penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental menggunakan hewan coba di laboratorium dengan desain penelitian “post test only control group design”, yaitu penelitian dengan memberikan ekstrak buah nanas muda pada mencit betina bunting dengan menyertakan kelompok kontrol(mencit tanpa pemberian ekstra buah nanas muda).

#### 3.2. Variabel

##### 3.2.1 Variabel Bebas

Ekstrak buah nanas muda.

##### 3.2.2 Variabel Tergantung

Kecacatan fetus yang dilahirkan mencit betina.

#### 3.3. Definisi operasional

##### 3.3.1. Ekstrak Buah Nanas Muda

Ekstrak buah nanas muda yaitu hasil dari ekstraksi buah nanas mudayang diperoleh melalui proses ekstraksi dengan pelarut etanol 90%. Ekstrak buah nanas yang diberikan pada kelompok 2 (K2) yang diberi ekstrak buah nanas muda dengan 0,02 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB. Kelompok 3 (K3) diberi perlakuan dengan dosis 0,04 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB, sedangkan kelompok 4 (K4) dengan dosis 0,08 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB. Volume pemberian tetap sebanyak 0,25 ml/mencit setiap perlakuan yang diberikan

setiap hari sebanyak 2 kali yaitu pagi dan sore dari hari ke-1 sampai hari ke-17 kehamilan.

Skala: Ordinal

### **3.3.2. Kecacatan fetus mencit yang dilahirkan mencit betina**

Kecacatan fetus mencit dilihat dari jumlah jari yang terbentuk pada ekstremitas depan dan belakang mencit pada kelompok yang sudah diberikan ekstrak nanas muda dan pada kelompok kontrol. Normal ruas jari setiap kaki adalah 5 jari.

Skala ordinal

Panjang ekor fetus mencit pada kelompok yang sudah diberikan ekstrak nanas muda dan pada kelompok kontrol. Kemudian diukur menggunakan penggaris dengan satuan milimeter. Panjang ekor normal 6 mm-10 mm. kelainan pertumbuhan jika <6mm atau > 10 mm

Skala ordinal

Mengetahui ada atau tidaknya kelainan mulut mencit yang dilihat pada jumlah palatum durum durum dari fetus mencit yang lahir pada kelompok yang sudah diberikan ekstrak nanas muda dan pada kelompok kontrol. Normal akan terbentuk palatum, tidak normal jika palatum tidak terbentuk.

Skala ordinal

## **3.4. Populasi dan sampel**

### **3.4.1. Populasi**

Mencit betina yang berumur  $\pm$  2-3 bulan, berat badan  $\pm$  25-30

mg ,dan tampak aktif bergerak, makan dan minum normal.

### **3.4.2. Sampel**

Sampel pada penelitian ini diambil secara acak sesuai standar yang diterapkan WHO tahun 2000 terkait penentuan besar sampel yaitu 5 ekor disetiap kelompok. Untuk menghindari loss to follow up maka setiap kelompok akan ditambahkan 1 ekor sehingga total sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 24 ekor mencit yang dibagi menjadi 4 kelompok dengan masing-masing 6 ekor setiap kelompok.

## **3.5. Kriteria inklusi dan eksklusi**

### **3.5.1. Kriteria inklusi**

1. Mencit betina hamil
2. Mencit sehat pada penampilan luar: gerak aktif, makan dan minum normal, tidak ada lika, tidak cacat

### **3.5.2. Kriteria eksklusi**

- a. Mencit betina yang tidak hamil.

## **3.6. Alat dan Bahan Penelitian**

### **3.6.1. Alat Penelitian**

- a. Kandang mencit lengkap dengan tempat makan dan minum
- b. Timbangan hewan coba
- c. Sonde oral
- d. Vaccum rotary evaporator
- e. Oven
- f. Kertas whatman

- g. Rak dan tabung reaksi
- h. Beker glass, gelas ukur , batang pengaduk , pipet tetes
- i. Sentrifuge
- j. Maserator
- k. Kapas steril
- l. Nampan bedah
- m. Penggaris
- n. Center
- o. Handscoon

### 3.6.2. Bahan Penelitian

- 1 Mencit Betina (*Mus musculus*)
- 2 Ekstrak buah nanas muda
- 3 Pakan standar
- 4 Aquadest
- 5 Etanol 90%

## 3.7. Cara Penelitian

### 3.7.1. Pengajuan ethical Clearance

Permohonan izin etik dilakukan setelah proposal penelitian lolos proses review dan disetujui oleh supervisor dan reviewer. Izin etik telah diajukan kepada Komite Bioetika penelitian Medis/Kesehatan, Fakultas Kedokteran Semarang, Universitas Islam Sultan Agung (Unissula).

### 3.7.2. Cara pembuatan ekstrak buah nanas muda

Nanas yang digunakan adalah jenis nanas yang berasal dari Pemalang yaitu nanas madu (Cayenne) dengan ciri - ciri daun halus tidakberduri dan buah besar, Buah nanas yang digunakan berumur 2,5 bulan. Buah nanas yang digunakan mempunyai berat  $\pm 1$  kg. Ekstrak yang dibuat adalah Ekstrak buah nanas muda yang sudah dikupas dan sudah dibersihkan, lalu dipotong dengan ukuran kecil. Setelah itu buah nanas yang sudah terpotong dikeringkan di oven dengan suhu 30-40C , setelah kering , potongan buah nanas diblender sampai halus dan dimaserasi selama 72 jam dengan menggunakan larutan methanol 90% sambil dikocok. Setelah 72 jam saring menggunakan kertas *whatman* yang bertujuan untuk zat solven dengan zat terlarut menjadi terpisah. Setelah itu, solven hasil pemisahan kemudian dilakukan evaporasi menggunakan Vacuum Rotary Evaporator sehingga didapatkan ekstrak kasar yang selanjutnya dapat dilarutkan didalam aquadest. Lalu selanjutnya ekstrak akan diberikan pada kelompok hewan perlakuan dengan tingkat dosis Kelompok kontrol (K1) tidak beri perlakuan dan kelompok 2 (K2) yang diberi ekstrak buah nanas muda dengan 0,02 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB. Kelompok 3 (K3) diberi perlakuan dengan dosis 0,04 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB , sedangkan kelompok 4 (K4) dengan dosis 0,08 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB. Volume pemberian tetap sebanyak 0,2 ml/mencit setiap perlakuan yang diberikan setiap hari sebanyak 2 kali yaitu pagi dan sore

(Huang, 2010).

### 3.7.3. Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium

1. Mencit betina (*Mus musculus*) di adaptasikan selama 5 hari supaya mencit betina dan jantan terbiasa dengan suhu dan lingkungan yang baru sehingga penelitian tidak terpengaruh oleh mencit yang stress.
2. Mencit betina dikawinkan dengan mencit jantan di kandang khusus perkawinan.
3. Setelah mencit betina dan mencit jantan kawin, cek dari vaginal plug mencit betina, jika terjadi sumbat vagina artinya mencit betina sudah hamil.
4. Setelah mencit betina hamil, mencit betina dipisahkan dari mencit jantan ke kandang khusus penelitian yang sudah dibagi menjadi 4 kelompok.
5. Subjek uji mencit dirandom menjadi 4 kelompok, setiap kelompok terdiri dari 6 ekor mencit betina bunting.
6. Semua mencit diberikan pakan / minum sesuai dengan standart.
7. Mencit kemudian diberikan perlakuan sesuai kelompok masing masing, yaitu :
  - a. Kelompok 1 (K1): Merupakan kelompok kontrol dimana mencit hanya diberi pakan standart.
  - b. Kelompok 2 (K2): Merupakan kelompok yang diberi pakan

standardan diberi ekstrak buah nanas muda dengan dosis 0,02 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB. Menggunakan jarum gavage setiap pagi hari dan sore hari selama hamil pada hari ke-1 sampai hamil hari ke-17.

c. Kelompok 3 (K3): Merupakan kelompok yang diberi pakan standardan diberi ekstrak buah nanas muda dengan dosis 0,04 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB. Menggunakan jarum gavage setiap pagi hari dan sore hari selama hamil pada hari ke-1 sampai hamil hari ke-17.

d. Kelompok 4 (K4): Merupakan kelompok yang diberi pakan standardan diberi ekstrak buah nanas muda dengan dosis 0,08 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB. Menggunakan jarum gavage setiap pagi hari dan sore hari selama hamil pada hari ke-1 sampai hamil hari ke-17.

#### **3.7.4. Persiapan Hewan Percobaan**

Kandang mencit berukuran 25 cm x 20 cm x 15 cm dengan penutupkawat, dasar bak diberikan sekam untuk menyerap kotoran mencit. kandang dibedakan menjadi kandang perkawinan dan kandang pemeliharaan untuk masing – masing perlakuan. makan dan minuman mencit tersedia setiap saat. Mencit betina dalam masa subur dilatakkan dalam kandang yang sama dengan mencit jantan agar terjadi perkawinan. jika ditemukan sumbat vagina (vaginal plug) atau sisasperma dalam vagina saat itu ditentukan sebagai hari ke 0 kehamilan.

### 3.7.5. Pemberian Perlakuan

Besar sampel pada penelitian ini, jumlah kelompok adalah 4 dan subyek yang digunakan 6 ekor mencit tiap kelompok. Sehingga jumlah total sampel adalah 24 ekor mencit. Setiap pagi mencit betina harus selaludiperiksa vaginal plugnya, jika mencit betina positif hamil kemudian dipindahkan ke dalam kandang pemeliharaan dan diberi tanggal kapan harike 0 hamil. Kelompok kontrol (K1) tidak beri perlakuan dan kelompok 2 (K2) yang diberi ekstrak buah nanas muda dengan 0,02 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB. Kelompok 3 (K3) diberi perlakuan dengan dosis 0,04 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB , sedangkan kelompok 4 (K4) dengan dosis 0,08 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB yang diberikan setiap hari yaitu pagi dansore hari ekstrak diberikan secara oral dengan menggunakan sondase dengan cara dicekockkan sampai ke lambung. Perlakuan uji teratogenic diberikan selama periode organogenesis, dimulai dari hamil hari ke-1 sampai hari ke-17. Setiap hari dilakukan penimbangan berat badan mencit. Pada hari ke-18 yaitu sehari sebelum lahir normal mencit dibedah bagian perut untuk melakukan penelitian.

### 3.7.6. Cara memberikan Ekstrak Buah Nanas Muda Dengan Sonde

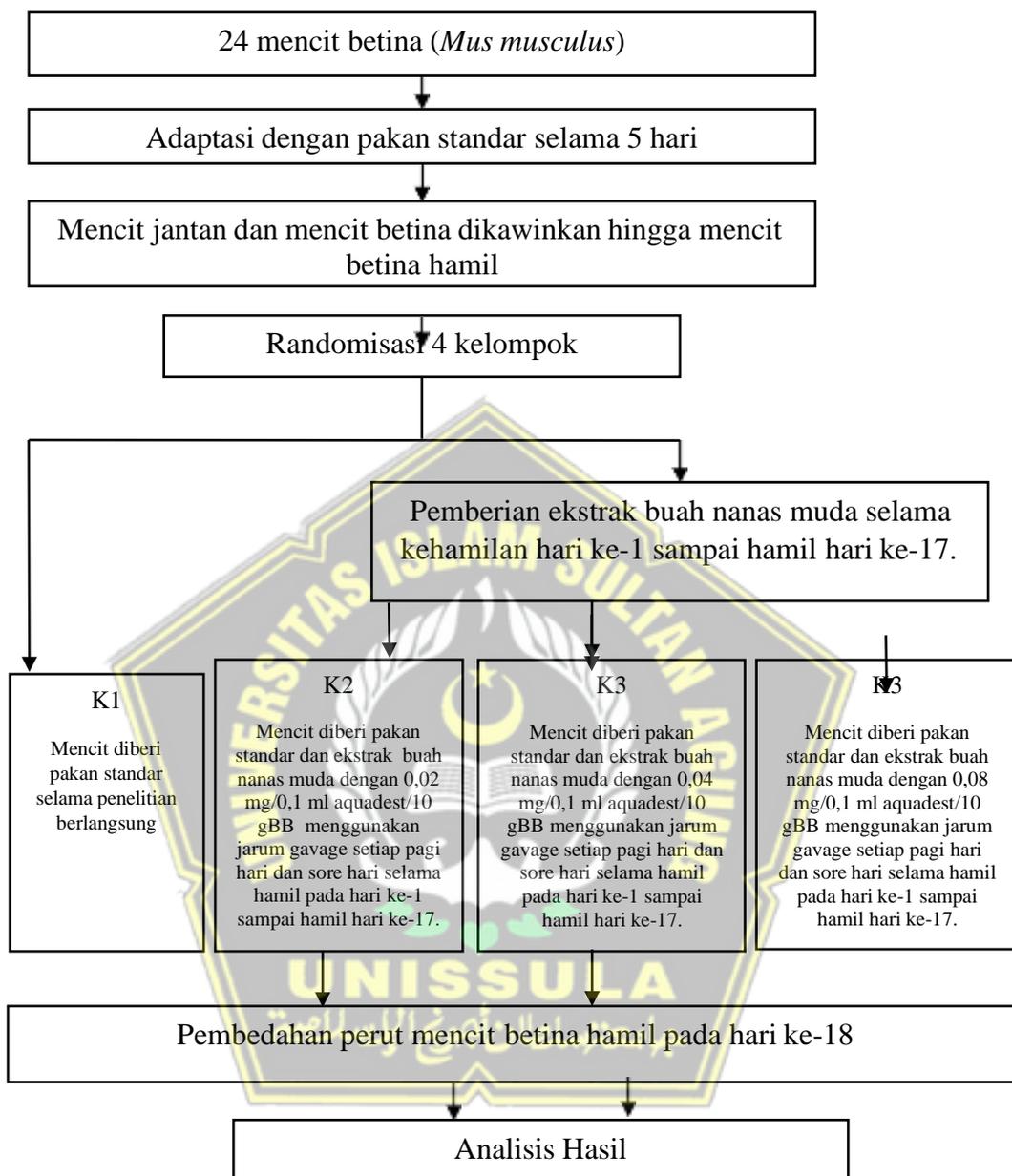
- 1 Mencit diambil terlebih dahulu dari kandang dengan cara memegang ekornya, kemudian diletakkan diatas kawat kasa dan ekor mencit sedikit ditarik. Cubit bagian kulit belakang kepala mencit dan ekornya menggunakan jar manis dan kelingking.
- 2 Ambil ekstrak nanas muda yang sudah diencerkan menggunakan

sprit disposable 1 cc sesuai dengan dosis yang ditentukan.

- 3 Masukkan sonde oral dan sprit disposable 1 cc yang sudah berisi cairan ekstrak buah nanas muda melalui tepi palatum menuju kebelakang sampai esofagus mencit. Setelah sonde masuk dalam esofagus, tahan dan dorong cairan dengan pelan sampai habis sesuai dosis.



### 3.8. Alur penelitian



**Gambar 3.8. Alur Penelitian**

### 3.9. Tempat dan waktu penelitian

#### 3.9.1. Tempat penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang.

#### 3.9.2. Waktu penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan September 2022.

#### 3.10. Analisa hasil

Sampel yang ditemukan kemudian dilakukan uji normalitas untuk melihat distribusi dan dilakukan uji homogenitas sebagai syarat uji parametri. Uji normalitas yang digunakan adalah *Shapiro Wilk*. Uji homogenitas yang digunakan adalah uji varians (*Lavene's test*). Jika tidak memenuhi syarat uji parametri, dilakukan transformasi data. Data yang dilakukan transformasi tidak memenuhi uji parametri maka dilakukan uji non parametri menggunakan *Kruskal Wallis*. Jika hasil data homogen dan berdistribusi normal baru dilakukan *one way anova*.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Hasil penelitian

#### 4.1.1. Karakteristik penelitian

Penelitian pengaruh ekstrak buah nanas muda terhadap kecacatan fetus mencit betina ini telah dilaksanakan dari bulan November 2022 sampai bulan Januari 2023. Jumlah keseluruhan sampel adalah 24 mencit (*Mus musculus*) betina yang dibagi kedalam 4 kelompok. Kelompok kontrol (K1) yaitu kelompok mencit tanpa diberi perlakuan saat bunting. Kelompok kedua (K2) diberikan perlakuan ekstrak buah nanas muda dengan 0,02 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB. Kelompok ketiga (K3) diberi perlakuan diberi ekstrak buah nanas muda dengan dosis 0,04 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB. Kelompok keempat (K4) yaitu kelompok dengan perlakuan ekstrak buah nanas muda dengan dosis 0,08 mg/0,1 ml aquadest/10 gBB. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang. Hasil penelitian dapat dilihat pada tabel berikut.

**Tabel 4.1.1.1** Hasil pemeriksaan dan nilai rata-rata panjang ekor.

Kelompok	N	mean	Std. Deviation
K1	54	5.89	0.317
K2	44	5.89	0.321
K3	28	5.32	0.670
K4	34	5.82	0.387

Dari pengamatan dihasilkan rata-rata dari pengukuran panjang

ekor kelompok kontrol adalah 5,89 mm dengan standart deviasi 0,317.



Kelompok kedua didapatkan hasil rata-rata 5,89 mm dengan nilai standart deviasi sebesar 0,321. Kelompok ketiga didapatkan hasil rata-rata 5,32 mm dengan standart deviasi 0,670 dan kelompok keempat dengan rata-rata 5,82 mm dengan standart deviasi 0,387.

**Tabel 4.1.1.2** Hasil pemeriksaan dan nilai rata-rata jumlah ruas jari kaki.

Kelompok	N	mean	Std. Deviation
K1	54	5.00	0.000
K2	44	5.00	0.000
K3	28	4.93	0.262
K4	34	4.91	0.288

Hasil pengamatan pada jumlah kaki yang terbentuk pada fetus menciit kelompok kontrol dengan nilai rata-rata 5,00 ruas dengan standart deviasi 0,000. Untuk rata-rata kelompok kedua yaitu 5,00 ruas dan standart deviasi 0,000. Kelompok ketiga dengan rata-rata 4,93 ruas dengan standart deviasi 0,262 dan kelompok keempat dengan rata-rata 4,91 ruas dengan standart deviasi 0,288.

**Tabel 4.1.1.3** Hasil pemeriksaan dan nilai rata-rata kelainan palatum.

Kelompok	N	mean	Std. Deviation
K1	54	1.00	0.000
K2	44	1.00	0.000
K3	28	1.00	0.000
K4	34	1.00	0.000

Pengamatan pada palatum durum fetus menciit dihasilkan rata-rata pada kelompok kontrol, kelompok kedua, ketiga dan keempat yaitu 1,00 dengan standart deviasi 0,00.

Data sampel kemudian dilakukan uji distribusi menggunakan uji normalitas (*Kolmogorov-smirnov*) dengan nilai  $p < 0,000$  uji pada data sampel pengukuran panjang ekor, jumlah jari kaki dan kelainan palatum. Kemudian dilakukan uji homogenitas varians (*Levene Statistic test*) pada setiap kelompok pengukuran panjang ekordan jumlah ruas jari kaki yaitu 0,000. Sedangkan pada kelainan palatum yaitu 0,23.

#### 4.1.2. Uji non parametrik

Hasil uji normalitas data pada penelitian ini memiliki hasil significancy  $< 0,05$  atau tidak terdistribusi normal, maka perlu dilakukan uji non parametrik *Kruskal wallis*. Hasil pengujian menggunakan *Kruskal wallis* dapat dilihat pada tabel dibawah.

**Tabel 4.1.2.1** Hasil uji *Kruskal-wallis* kelainan palatum

	Fetus mencit
Kruskal-wallis H	6.538
df	3
Asymp.sig.	.088

Dari pengamatan tabel diatas dengan hasil uji non parametrik *Kruskal-wallis* yaitu 0,088 maka dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat pengaruh pemberian ekstrak nanas muda terhadap kelainan palatum fetus mencit.

**Tabel 4.1.2.2** Hasil uji *Kruskal-wallis* jumlah ruas jari kaki fetus mencit

	Fetus mencit
Kruskal-wallis H	9.701
df	3

Asymp.sig. .021

Hasil diatas menunjukkan bahwa uji *Kruskal-wallis* terhadap jumlah kaki fetus mencit yaitu 0,21 dimana hasil ini kurang dari 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh pemberian ekstrak nanas muda terhadap jumlah kaki fetus mencit yang dilahirkan mencit betina.

**Tabel 4.1.2.3** Hasil uji *kruskal-wallis* panjang ekor mencit Fetus mencit

Kruskal-wallis H	29.691
df	3
Asymp.sig.	.000

Hasil diatas menunjukkan bahwa uji *Kruskal-wallis* terhadap Panjang ekor mencit yaitu 0,000 maka dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh pemberian ekstrak nanas muda terhadap panjang ekor fetus mencit yang dilahirkan mencit betina.

## 4.2. Pembahasan

### 4.2.1 Pengaruh ekstrak buah nanas muda terhadap kelainan palatum

Ekstrak buah nanas muda tidak memberikan pengaruh terhadap kelainan palatum pada fetus mencit yang lahir. Dari keempat kelompok penelitian didapatkan nilai  $p$  0,088. Maka dapat disimpulkan bahwa hipotesis ditolak. dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pemberian ekstrak buah nanas muda terhadap kelainan palatum fetus yang dilahirkan mencit betina.

Penelitian diatas sesuai penelitian yang dilakukan oleh (Lee et al., 2018) dimana efek enzim bromelain yang terdapat dalam nanas

yang terpurifikasi sangat bermanfaat pencegahan penyakit mulut yang terkait dengan radikal bebas seperti ABTS radical, DPPH radical, dan ROS. Kelainan karena radikal ini dapat dicegah karena adanya efek kuat antioksidan melalui SOD enzyme.

Hasil ini tidak sesuai dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya dimana dari penelitian tersebut didapatkan ekstrak buah nanas secara signifikan meningkatkan paparan oral tikus, paparan oral didapatkan dari fexofenadine dengan cara menghambat penghabisan P-glicoprotein selama pencernaan.(Cecilia et al, 2018)

#### **4.2.2 Pengaruh ekstrak buah nanas muda terhadap jumlah ruas jari kaki fetus mencit.**

Penelitian mengenai pengaruh ekstrak buah nanas muda terhadap jumlah ruas jari kaki fetus mencit dengan dengan uji *Kruskal-wallis* didapatkan nilai  $p$  0,021. Maka dapat disimpulkan bahwa hipotesis diterima. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dari pemberian ekstrak buah nanas muda terhadap jumlah ruas jari kaki fetus mencit. Penelitian ini tidak ditemukan kelainan jumlah ruas jari pada kelompok kontrol dan kelompok 2 walaupun pemberian ekstrak buah nanas antara kontrol, K2, K3, dan K4 dengan dosis yang berbeda.

Hasil ini sama dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh (Silaban et al, 2016), dimana terdapat pengaruh teratogenik dari enzim bromelain pada nanas terhadap mencit, pengaruh ini

dikarenakan enzim bromelain yang berasal dari nanas merupakan enzim dengan tingkat hidrolisis kolagen tertinggi dari berbagai jenis kolagen seperti  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , dan  $\beta$  yang terhidrolisis menjadi polipeptida yang berukuran lebih kecil pada saat terpapar enzim bromelain. Micropolipeptida tersebut kemudian akan berfungsi sebagai antioksidan, antiaging, antiosteoporosis, antitumor, dan penyembuh luka. (Renu et al, 2019) Kelainan ekstremitas pada fetus mencit ditandai dengan terhambatnya penulangan pada metatarsus dan metakarpus, hal ini dikarenakan enzim bromelain yang terkandung dalam nanas dapat melewati sawar plasenta sehingga akan terjadi hambatan transfer nutrisi dari induk ke janin terutama mineral dan kolagen. (Lee et al., 2018)

#### **4.2.3 Pengaruh ekstrak buah nanas muda terhadap panjang ekor mencit.**

Penelitian ekstrak buah nanas muda yang mengandung enzim bromelain terhadap panjang ekor fetus mencit dengan nilai  $p$  sama dengan 0,021 kurang dari  $p$  0,005. Maka dapat disimpulkan bahwa hipotesis diterima. Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan dari pemberian ekstrak buah nanas muda memengaruhi panjang ekor fetus mencit yang dilahirkan mencit betina. Dapat diamati pada kelompok kontrol terdapat fetus mencit dengan panjang ekor <6mm sebanyak 6 fetus, jika dibandingkan dengan kelompok 2 dengan perlakuan menggunakan dosis minimal, kelompok kontrol masih lebih banyak terlihat hambatan

pertumbuhan ekor.

Penilaian fetus dengan kecacatan dapat dilihat bahwa enzim bromelain yang terdapat pada buah nanas dapat berfungsi sebagai hidrolitik pada jaringan ikat terutama terhadap jaringan ikat kolagen. Pada penelitian yang dilakukan oleh (Setyawati et al 2011) menjelaskan bahwa enzim bromelain selain mempunyai efek hidrolitik namun juga dapat menjadi enzim proteolitik golongan proteinase dimana enzim ini biasa digunakan pada pelunak daging. Pada penelitian ini ditemukan adanya kelainan pertumbuhan ekor pada beberapa mencit. Ekor mencit dapat difungsikan sebagai termoregulator dimana sangat dipengaruhi oleh panjang dan lebarnya ekor. (Saft P, 2014) Proses hambatan pertumbuhan disebabkan oleh terganggunya somit, chorda dorsalis, dan diferensiasi sklerotom. Selain itu, kelainan ekor juga dapat disebabkan karena malformasi vertebrae pada proses segmentasi di awal perkembangan. (Setyawati et al, 2011)



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

- 5.1.1. Terdapat pengaruh pemberian ekstrak buah nanas muda terhadap kecacatan fetus mencit.
- 5.1.2. Terdapat pengaruh pemberian ekstrak buah nanas muda terhadap panjang ekor fetus mencit.
- 5.1.3. Terdapat pengaruh pemberian ekstrak buah nanas muda terhadap jumlah ruas jari kaki fetus mencit.
- 5.1.4. Tidak terdapat pengaruh pemberian ekstrak buah nanas muda terhadap kelainan palatum fetus mencit.

#### 5.2. Saran

- 5.2.1. Bagi peneliti selanjutnya disarankan untuk penggunaan ekstrak diganti dengan jus nanas muda dengan tambahan ethanol.
- 5.2.2. Pemberian dosis yang berbeda agar terdapat perbedaan pengaruh terhadap kelainan palatum.

## DAFTAR PUSTAKA

- Apsari, D. D., Purwantiningrum, D. A., & Soeharto, S. (2016). Perbandingan Efek Pemberian Ekstrak Buah Nanas Muda dan Ekstrak Buah Nanas Tua Terhadap Kontraktilitas Uterus Terpisah Marmut ( *Cavia porcellus*). *Jurnal Kesehatan*, 1(1), 117–124.
- Astuti, N., Setyawati, I., & Narayani, I. (2019). Morfologi dan Perkembangan Skeleton Fetus Tikus (*Rattus norvegicus* L.) yang Diberi Pakan Mengandung Kulit Nanas (*Ananas comosus* Merr.) selama Kebuntingan. *The Journal of Ecology*, 6(1), 123–130.  
<https://doi.org/10.2307/2257356>
- Cahyo, S., & Susiana, R. (2017). *Grow your own fruits panduan praktis menanam 28 tanaman buah populer di pekarangan*. Yogyakarta Lily Publisher.
- Cecilia, N. A., & Lemon, K. B. (2018). Effect of pineapple (*Ananas comosus*) and uziza (*Piper guineense*) extracts on fexofenadine bioavailability: possible role of p-glycoprotein(p-gp) and organic anion transporting polypeptides (OATPS). *International Research Journal Of Pharmacy*, 9(3), 17–21. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.09337>
- El-Gazar, A. E. A. R. G. R. D. (2022). *Mentha pulegium* L. (Pennyroyal, Lamiaceae) Extracts Impose Abortion or Fetal-Mediated Toxicity in Pregnant Rats; Evidenced by the Modulation of Pregnancy Hormones, MiR-520, MiR-146a, TIMP-1 and MMP-9 Protein Expressions, Inflammatory State, Certain Relate. *Toxins*, 1–28.
- Hasanah, U., & Masri, M. (2015). *Prosiding Seminar Nasional Mikrobiologi Kesehatan dan Lingkungan Makassar* (Vol. 29).
- Herlina, M., Manurung, Sarida S., & Noradina. (2021). *Histologi Testis dan Jumlah Sel Sperma Mencit* (1st ed.). Penerbit ADAB.
- Ionescu, R. M., Vlasak, J., Price, C., & Kirchmeier, M. (2008). Contribution of variable domains to the stability of humanized IgG1 monoclonal antibodies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(4), 1414–1426. <https://doi.org/10.1002/jps.21104>
- Jančić, U., & Gorgieva, S. (2022). Bromelain and Nisin: The Natural Antimicrobials with High Potential in Biomedicine. *Pharmaceutics*, 14(1), 1–39.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010076>
- Kasmawaty, H., Malik, F., Yusuf MI, & Parawansah. (2020). Buku Panduan Praktikum farmakologi II. In *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952. (pp. 1–20).
- Lee, J.-H., Lee, J.-B., Lee, J.-T., Park, H.-R., & Kim, J.-B. (2018). Medicinal effects of bromelain (*Ananas comosus*) targeting oral environment as an anti-oxidant and anti-inflammatory agent. *Journal of Food and Nutrition Research*, 6(12), 773–784.  
<https://doi.org/10.12691/jfnr-6-12-8>
- Mustofa, S., Susmiarsih, T., & Wikaningrum, R. (2009). Prevalensi Bayi Lahir Cacat (Malformasi Kongenital) di Rumah Sakit Pendidikan Fakultas Kedokteran Universitas YARSI. *Garut General Hospital in Garut, and Gunung Jati General Hospital in Cirebon*, 17(2), 101–110.

- Mutiarahmi, C. N., Hartady, T., & Lesmana, R. (2021). Use of Mice as Experimental Animals in Laboratories that refer to The Principles of Animal Welfare: a Literatur Review. *Indonesia Medicus Veterinus*, 10(1), 134–145. <https://doi.org/10.19087/imv.2020.10.1.134>
- Nugroho, R. (2018). *Mengenal Mencit Sebagai Hewan Laboratorium* (A. Khanz, Ed.). Mulawarman University Press.
- Nwankudu, N., Ndibe, N., & Ijioma, S. (2015). Oxytocic Effect of Ananas Comosus Fruit Juice on Isolated Pregnant Rats Uteri. *Nigerian Veterinary Journal*, 36(4), 1318–1326.
- Renu, I. C., & Kumaran Thampi, H. (2019). Studies on collagen hydrolysis by pineapple (Ananas comosus) stem bromelain. *Int J Pharm Biol Sci.*, 9(1-NCBTIL), 118–126. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.29822.13126>
- RI, K. (2019). *profil kesehatan Indonesia 2018*. 1–556. [https://pusdatin.kemkes.go.id/resources/download/pusdatin/profil-kesehatan-indonesia/PROFIL\\_KESEHATAN\\_2018\\_1.pdf](https://pusdatin.kemkes.go.id/resources/download/pusdatin/profil-kesehatan-indonesia/PROFIL_KESEHATAN_2018_1.pdf)
- Saft P, T. C. C. A. P. P. B. B. H. M. M. J. (2014). *Characterization of four types of tail abnormalities in rats treated prenatally with valproic acid*. <http://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2014/9/9.html>
- Sani, F. (2018). *Metodologi Penelitian Farmasi Komunitas dan Eksperimental* (1st ed.). Deepublish.
- Setyawati, I., & Yulihastuti, D. A. (2011). *Penampilan Reproduksi dan Perkembangan Skeleton Fetus Mencit Setelah Pemberian Ekstrak Buah Nanas Muda*. 12(3), 192–199.
- Sharma, M., & Sharma, R. (2018). Implications of designing a bromelain loaded enteric nanoformulation on its stability and anti-inflammatory potential upon oral administration. *RSC Advances*, 8(5), 2541–2551. <https://doi.org/10.1039/c7ra13555f>
- Sherwood, L. (2018). *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem Edisi 9* (9th ed.). EGC.
- Silaban, I., & Rahmanisa, S. (2016). Pengaruh Enzim Bromelin Buah Nanas ( Ananas comosus L.) Terhadap Awal Kehamilan. *Majority*, 5(4), 80–85.
- Srinivasulu, C., & Bhargavi, S. (2012). *South Asian Mammals* (3rd ed.). Springer.