

## **Terapi Sel Punca Mesenkimal Sumsum Tulang Tikus dalam Meregenerasi Sel Sitotrofoblas Nekrosis yang Dipapar *Carbon Black***

*(RAT BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELL THERAPY  
IN REGENERATING NECROTIC CYTOTROPHOBLAST CELL FOLLOWING  
EXPOSED TO CARBON BLACK)*

**Widjiati<sup>1</sup>, Sri Pantja Madyawati<sup>2</sup>,  
Rimayanti<sup>2</sup>, Agung Budianto Achmad<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Departemen Anatomi Veteriner, <sup>2</sup>Departemen Reproduksi Veteriner,  
<sup>3</sup>Mahasiswa Program Magister Ilmu Biologi Reproduksi,  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga,  
Kampus-C Unair, Jln. Mulyorejo, Surabaya 60115  
Telp. (031) 5992785, 5993016; E-mail: widjiati1962@gmail.com

### **ABSTRAK**

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat potensi sel mesenkimal sumsum tulang tikus dalam meregenerasi sel sitotrofoblas nekrosis yang dipapar *carbon black* pada hari kebuntingan ke-6 dengan lama paparan berbeda (selama 6 hari dan 12 hari). Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial, yang terdiri faktor umur kebuntingan dan faktor perlakuan. Sebanyak 48 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina yang telah bunting dibagi menjadi enam kelompok perlakuan yang berbeda yaitu: kelompok tanpa dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-11 hari; kelompok dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-11 hari dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam; kelompok dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-11 hari dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam + sel punca mesenkimal 1x10<sup>7</sup>/0,1 mL secara intravena; kelompok tanpa dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-17 hari; kelompok dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-17 hari dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam; dan kelompok dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-17 dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam + sel punca mesenkimal 1x10<sup>7</sup>/0,1 mL secara intravena. Data yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan analisis univariat yang dilanjutkan dengan sidik ragam. Dari hasil analisis menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata (p>0,05) pada kelompok yang diterapi sel punca mesenkimal sumsum tulang tikus dengan kelompok yang dipapar *carbon black*. Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terapi sel mesenkimal sumsum tulang tikus pada tikus putih yang dipapar *carbon black* belum mampu meregenerasi sel sitotrofoblas nekrosis pada plasenta.

Kata-kata kunci : sel punca mesenchymal, *carbon black*, nekrosis, sel sitotrofoblas, plasenta

### **ABSTRACT**

The objective of this study is to find out the potency of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell (RBMMSC) in regenerating necrotic cytotrophoblast cells of rats (*Rattusnorvegicus*) following exposure to carbon black at day 6 of gestation at different time of exposure (6 days and 12 days). This study used randomized factorial design with two factors (gestation day and treatment). Forty-eight gravid female rats were divided into six treatment groups i.e. (i) animals at day 6-11 gestation and not expose to carbon black; (ii) 6-11 days gestation animals + 532mg/m<sup>3</sup> carbon black for 4 hours; (iii) 6-11 days gestation animals + 532mg/m<sup>3</sup> carbon black for 4 hours +1x10<sup>7</sup>/0.1ml RBMMSC intravenously; (iv) animals at day 6-17 gestation and not expose to carbon black; (v) 6-17 days gestation animals + 532mg/m<sup>3</sup> carbon black for 4 hours; (vi) 6-17 days gestation animals + 532mg/m<sup>3</sup> carbon black for 4 hours +1x10<sup>7</sup>/0.1ml RBMMSC intravenously, respectively. Data were analyzed using univariat analysis and analysis of variance. The results showed that there were no significance differences in regenerating necrotic cytotrophoblast between the groups treated with RBMMSC and carbon black exposure. The results indicated that the stem cell therapy following exposure to carbon black was incapable in regenerating the necrotic cytotrophoblast cells.

*Key words:* carbon black, stem cell therapy, rat bone marrow, cytotrophoblast.

## PENDAHULUAN

Pencemaran udara pada beberapa tahun terakhir ini telah memasuki tahap yang cukup mengkhawatirkan bagi kesehatan. Hampir semua parameter dalam baku mutu udara, pada beberapa kota di wilayah Jawa Timur telah melewati ambang batas yang ditentukan oleh pemerintah (BBTKL dan P<sub>2</sub>M Surabaya, 2009). Pencemaran udara tersebut terutama berasal dari kegiatan industri dan asap kendaraan bermotor. Jumlah kendaraan bermotor di Jawa Timur telah meningkat tajam dalam beberapa tahun terakhir ini. Data dari Dinas Pendapatan Daerah Jawa Timur menunjukkan bahwa jumlah kendaraan bermotor meningkat hingga 7,12% pada tahun 2012 (Umara, 2013). Peningkatan jumlah kendaraan bermotor, meningkatkan emisi yang dapat berakibat pada penurunan kualitas udara yang berdampak negatif terhadap kesehatan manusia (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2012).

Buangan partikel yang dikeluarkan oleh kendaraan bermotor (*diesel exhaust particles/DEP*) memiliki ukuran yang sangat kecil (*ultrafine*) kurang dari 0,05–0,2 µm (Hougaard *et al.*, 2008). Salah satu buangan partikel yang berasal dari mesin diesel kendaraan bermotor adalah *carbon black*. *Carbon black* merupakan partikel hasil pembakaran (*combustion-derived*) yang tersuspensi pada polusi udara (Barlow *et al.*, 2005; Shinde *et al.*, 2012) yang memiliki dampak merugikan terhadap kesehatan reproduksi, terutama pada masa kehamilan karena ukuran partikel *carbon black* yang sangat kecil dapat menyebabkan kerusakan pada sel-sel plasenta melalui proses stres oksidatif (Sudaryanti, 2010). Kerusakan pada plasenta dapat mengganggu kehamilan sehingga dapat menyebabkan terjadinya *Intra Uterina Growth Retardation/IUGD* (Dejmek *et al.*, 1999; Garza *et al.*, 2008; Wick *et al.*, 2009).

Perkembangan dalam dunia kedokteran pada beberapa tahun ini cukup pesat. Salah satu perkembangan tersebut adalah terapi menggunakan sel punca (*stem cell*). Sel punca mesenkimal sumsum tulang (*Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell*) merupakan salah satu jenis sel punca yang berasal dari sumsum tulang yang telah banyak diteliti manfaatnya. Sel punca mesenkimal memiliki kemampuan dalam meregenerasi jaringan yang rusak serta memiliki kemampuan sebagai imunomodulator (Han *et al.*, 2012). Sel mesenkimal merupakan

sel progenitor dari beberapa sel yang telah terspesialisasi (*specialized cell*), seperti sel adiposa, sel osteoblas, sel chondrosit, sel otot, dan sel astrosit (Crop *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2012). Sel punca mesenkimal telah banyak digunakan dalam mengobati berbagai penyakit degeneratif seperti, infark miokard, dan sirosis hati.

Sel punca memiliki potensi yang sangat menjanjikan dalam mengobati penyakit yang tidak dapat disembuhkan dengan menggunakan metode pengobatan biasa. Terapi dengan menggunakan sel punca memiliki kemampuan untuk menyembuhkan penyakit dengan mengganti komponen sel yang rusak (Halim *et al.*, 2010). Kerusakan pada plasenta akibat paparan *carbon black* bersifat *irreversibel*, sehingga terapi menggunakan obat-obatan konvensional hanya mampu memperlambat atau mencegah kerusakan jaringan yang lebih luas. Salah satu cara yang harus ditempuh dalam memperbaiki kerusakan tersebut dengan mengganti komponen sel atau jaringan yang rusak dengan yang baru. Berdasarkan pada pemikiran inilah diharapkan sel punca dapat mengembalikan fungsi jaringan plasenta yang rusak seperti semula, dengan penggantian komponen sel yang rusak (nekrosis). Pada kasus teratogenik, pemberian sel punca mesenkimal sumsum tulang dapat menekan terjadinya inflamasi, apoptosis, dan cacat konginental (Lee *et al.*, 2007). Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas terapi penggunaan sel punca mesenkimal sumsum tulang tikus dalam meregenerasi sel sitotrofoblas tikus putih yang nekrosis akibat induksi *carbon black*, sehingga dapat diungkap potensi terapi tersebut terhadap gangguan plasentasi selama kebuntingan.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan pada Kandang Hewan Coba Laboratorium Embriologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, dan Kandang Hewan Coba Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga. Tikus putih ditempatkan pada kandang plastik yang beralaskan sekam kayu dengan tutup kandang berupa kawat ayam. Kandang ditempatkan pada suhu ruang 25-28°C. Kotak paparan *particulate matter* disesuaikan dengan model kotak, suatu model paparan dengan memperhatikan kebutuhan dasar dan

kemampuan hirup tikus pada suatu area. Ukuran kotak paparan ditetapkan berdasarkan perhitungan kebutuhan tikus akan oksigen 2,68 mL/g/jam, bobot tikus 200 g, lama paparan, persentase oksigen di udara 21% dengan jumlah tikus dalam satu kotak maksimal delapan ekor (Sudaryanti, 2010; Dachlan *et al.*, 2011). Volume boks yang dibutuhkan adalah

$$\frac{2,68 \frac{\text{mL}}{\text{g.jam}} \times 200 \text{ g} \times 8 \text{ ekor} \times 4 \text{ jam}}{21\%} = 81,678 \text{ mL} \sim 0,08167 \text{ m}^3$$

**Sel Punca Mesenkimal Sumsum Tulang Tikus dan Carbon Black**

Sel punca mesenkimal sumsum tulang yang digunakan pada penelitian ini dikultur pada Pusat Penelitian Sel Punca, Institut Penyakit Tropis, Universitas Airlangga. Dosis sel punca mesenkimal sumsum tulang yang digunakan adalah  $1 \times 10^7$  sel dalam tiap 0,1 mL yang terdiri dari sel punca mesenkimal sumsum tulang tikus murni. Dosis tersebut diberikan lebih banyak dibandingkan dosis standar terapi, hal ini berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Kholodenko *et al.*, (2013), yang melakukan penelitian pada hewan coba model *infark miokard*, menemukan bahwa sel punca yang diinjeksikan intravena, banyak yang akan memenetrasi organ paru-paru, hati, dan limpa dibandingkan pada organ jantung. Sehingga dosis standar tersebut perlu ditambah agar nantinya jumlah sel yang melakukan *homing* cukup dalam melakukan regenerasi sel sitotrofoblas pada plasenta.

Paparan *particulate matter* menggunakan *carbon black powder*® (Degussa, United Kingdom) dengan dosis 532 mg/m<sup>3</sup>/ 4 jam. Dosis ini berdasarkan dosis konversi mencit (*Mus musculus*) yang digunakan pada penelitian sebelumnya sebanyak 19 mg/m<sup>3</sup> pada mencit sehingga bila diaplikasikan pada tikus menjadi 19 mg/m<sup>3</sup> x 7 = 133 mg/m<sup>3</sup> perjam, sehingga 133 mg/m<sup>3</sup> x 4 jam = 532 mg/m<sup>3</sup> (Hougaard *et al.*, 2008; Dachlan *et al.*, 2011).

**Kelompok Sampel**

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial 2x3, dengan faktor pertama adalah hari kebuntingan dan faktor kedua adalah perlakuan. Sebanyak 48 ekor tikus putih (*R. norvegicus*) betina, dilakukan sinkronisasi birahi terlebih dahulu menggunakan hormon *Pregnant Mare Serum*

*Gonadotropin* (PMSG) dosis 10 IU (Folligon® Intervet International BV, Netherland) dan hormon *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG) dosis 10 IU (Chorulon® Intervet International BV, Netherland). Setelah dilakukan sinkronisasi birahi, kemudian dikawinkan secara *monomating* (satu jantan untuk satu betina). Setelah 16 jam perkawinan, dilakukan pemeriksaan sumbat vagina (*vaginal plug*) untuk mengetahui terjadinya perkawinan dan ditetapkan sebagai kebuntingan hari ke-0 (Widjiati, 1997). Sebanyak 48 ekor tikus yang telah dikawinkan kemudian dibagi kedalam enam kelompok perlakuan antara lain:

- P<sub>1</sub>.K-1 : Tanpa dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-11 hari.
- P<sub>1</sub>.K-2 : Dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-11 hari dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam.
- P<sub>1</sub>.K-3 : Dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-11 hari dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam + sel punca mesenkimal  $1 \times 10^7/0,1$  mL intravena.
- P<sub>2</sub>.K-1 : Tanpa dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-17 hari.
- P<sub>2</sub>.K-2 : Dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-17 hari dosis 532 mg/m<sup>3</sup>selama empat jam.
- P<sub>2</sub>.K-3 : Dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-17 hari dosis 532 mg/m<sup>3</sup>selama empat jam + sel punca mesenkimal  $1 \times 10^7/0,1$  mL intravena

Pemberian bubuk *carbon black* disemprotkan menggunakan spuit 10 mL ke dalam kotak paparan. Perlakuan diberikan dalam kotak paparan berbeda yang dilengkapi monitor suhu udara, dengan kecepatan aliran udara 5,0-7,5 km/jam pada suhu kamar dengan tekanan satu atmosfer. Perlakuan diberikan secara bertahap sesuai dengan kelompok (Sudaryanti, 2010; Dachlan *et al.*, 2011).

Pada P<sub>1</sub>.K-3 setelah pemberian paparan *carbon black* pada hari ke-11 kemudian diterapi dengan sel punca mesenkimal sumsum tulang tikus secara intravena melalui vena *coccygealis*, begitu pula dengan P<sub>2</sub>.K-3 yang diterapi pada hari ke-17. Pemberian terapi diberikan selama satu hari, karena pemberian terapi dilakukan secara intravena sehingga sel punca mesenkimal sumsum tulang tikus memerlukan waktu *homing* secara cepat. Penelitian ini merupakan rangkaian penelitian dimaksudkan sebagai

terapi setelah proses organogenesis selesai diberikan untuk mencegah keguguran dini. Jika sebagai preventif sel punca diberikan pada kebunting hari ke-6 sebelum organogenesis terjadi. Hal ini juga berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hendy *et al.*, (2012) yang melaporkan bahwa terapi sel mesenkimal sumsum tulang tikus dapat memperbaiki endometriosis pada mencit.

### Pembuatan Sediaan Histopatologi

Setelah diterapi, tikus putih dikorbankan nyawanya (euthanasia) menggunakan eter kemudian diautopsi untuk diambil organ plasenta. Plasenta yang telah diambil kemudian difiksasi dengan larutan formalin 10% selama 24 jam. Proses berikutnya dilakukan *trimming* untuk selanjutnya dimasukkan kedalam tempat jaringan khusus (*tissue cassette*) dalam proses *tissue processor*. Plasenta yang telah dicuci dengan air kran selama 30 menit lalu dimasukkan ke reagen dengan larutan alkohol 70%, 80%, 95%, 96%, Alkohol absolut I, II, III, *xylol* I dan II masing-masing selama 30 menit. Jaringan dikeluarkan dari *tissue processor* kemudian dilakukan proses infiltrasi dan pembuatan blok parafin menggunakan alat Automatic *Tissue Embedding Apparatus Of Tissue-Tek*<sup>®</sup> (Sakura Corp. United States America). Setelah itu dilakukan pemotongan secara acak, yaitu tiap 10 kali pemotongan yang dilakukan seri, diambil satu dengan ketebalan 5-7  $\mu\text{m}$ , kemudian dicelupkan ke dalam air hangat dengan suhu 20-30°C sampai jaringan mengembang dengan baik, kemudian diletakkan pada kaca objek yang sebelumnya diolesi dengan albumin telur, lalu dikeringkan dengan *hot plate*. Setelah kering, dilakukan pewarnaan dengan metode Harris Haematoxylin-Eosin (HE). Pada pewarnaan HE, sediaan pada gelas objek direndam dalam *xylol* 1 selama tiga menit dan *xylol* 2 selama satu menit untuk dilakukan deparafinasi, kemudian didehidrasi dengan perendaman secara berurut dalam alkohol absolut I, alkohol absolut II, alkohol 96%, 90%, 80%, 70% dan air selama satu menit. Jaringan dimasukkan ke dalam pewarna HE selama 5-10 menit. Setelah itu jaringan dicelupkan ke dalam alkohol asam sebanyak 3-10 kali celupan dan kemudian dicelupkan ke dalam air kran sebanyak empat kali celupan. Setelah itu dicelupkan ke dalam amonia sebanyak empat kali celupan, lalu di masukkan ke dalam air kran selama 10 menit. Terakhir di masukkan ke dalam aquades selama lima

menit. Setelah itu di masukkan berturut-turut ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, alkohol absolut I, alkohol absolut II, masing-masing selama 30 detik dan masukkan ke dalam *xylol* I dan II, masing-masing selama dua menit. Kemudian bersihkan dari sisa-sisa pewarnaan. Jaringan yang telah diwarnai kemudian ditutup dengan kaca penutup yang sebelumnya telah ditetesi dengan *entellan* dan selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop cahaya.

### Pengamatan terhadap Nekrosis Sel Trofoblas Plasenta

Penilaian terhadap regenerasi sel sitotrofoblas nekrosis didasarkan pada persentase sel yang mengalami nekrosis. Keberhasilan regenerasi sel sitotrofoblas dapat terlihat dengan adanya penurunan persentase sel yang nekrosis. Penurunan persentase sel sitotrofoblas memiliki dua arti yaitu terjadinya peningkatan proliferasi sel trofoblas baru yang berasal dari sel punca mesenkimal sumsum tulang tikus serta dihambatnya kerusakan sel sitotrofoblas lebih jauh.

Preparat plasenta yang telah dibuat, kemudian dilakukan penghitungan jumlah sel trofoblas nekrosis, beserta sel yang masih normal. Proses penghitungan menggunakan mikroskop cahaya (*Nikon*<sup>®</sup> *Eclipse Ci*) tiap 10 lapang pandang berbeda dengan pembesaran 1000 kali. Hasil yang didapatkan pada satu lapang pandang kemudian dimasukkan ke dalam rumus berikut:

$$\text{Persentase Nekrosis Sel Sitotrofoblas} = \frac{\text{Jumlah Sel Nekrosis}}{\text{Jumlah Sel Nekrosis} + \text{Jumlah Sel Normal}} \times 100\%$$

Setelah didapatkan persentase sel sitotrofoblas nekrosis pada setiap lapang pandang, dilanjutkan dengan pembagian persentase yang didapatkan dengan jumlah lapangan pandang yang diamati. Adapun rumusnya adalah sebagai berikut:

$$\text{Rataan \% Nekrosis Sel Sitotrofoblas} = \frac{[\text{Persentase Lap.1} + \text{Persentase Lap. 2} + \dots + \text{Persentase N}]}{\text{Jumlah Lapangan Pandang (N)}}$$

### Analisis Data

Data yang didapatkan dianalisis menggunakan analisis univariat, apabila terdapat interaksi di antara faktor yang diteliti kemudian dilanjutkan dengan sidik ragam satu arah/*one way Anova* dan apabila terlihat adanya perbedaan diantara perlakuan maka dilanjutkan



dengan uji Duncan untuk mengetahui perbedaan di antara tiap perlakuan. Analisis dilakukan dengan asumsi populasi yang diuji berdistribusi normal, homogen, dan sampel tidak berhubungan satu sama lain. Data persentase sel sitotrofoblas nekrosis dilakukan transformasi arc sin  $\sqrt{y}$  agar berdistribusi normal. Untuk membantu menganalisis data digunakan program windows IBM SPSS *Statistic* Versi 22.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil pengamatan, terlihat adanya perubahan pada gambaran histopatologi plasenta antar perlakuan pada sel sitotrofoblas. Perubahan terlihat pada sel sitotrofoblas yang mengalami perubahan berupa piknotis dan karyolisis yang disajikan pada Gambar 1.

Dari hasil uji Duncan sel sitotrofoblas nekrosis disajikan pada Tabel 1. Dari tabel tersebut ditunjukkan bahwa sel sitotrofoblas yang mengalami nekrosis pada perlakuan tikus betina tanpa paparan pada umur kebuntingan hari 6-11 hari, memiliki rata-ran nilai yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok lainnya. Hal ini terlihat dari hasil uji yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok tikus betina dengan paparan *carbon black* 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam pada kebuntingan umur 6-11 hari, dan kelompok tikus betina dengan paparan *carbon black* 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam, kebuntingan umur 6-11 hari + sel punca mesenkimal 1x10<sup>7</sup>/0,1 mL. Namun, rata-ran nilai sel sitotrofoblas yang mengalami nekrosis antara kelompok perlakuan yang dipapar *carbon black* pada kebuntingan umur 6-11 hari, dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam dan kelompok yang dipapar *carbon black* pada kebuntingan umur 6-11 hari, dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam + sel punca mesenkimal 1x10<sup>7</sup>/0,1 mL intravena, tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) di antara perlakuan tersebut. Perlakuan kelompok tikus betina tanpa paparan pada umur kebuntingan 6-17 hari, sel sitotrofoblas nekrosis berbeda nyata dengan kelompok tikus betina dengan paparan *carbon black* 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam pada umur kebuntingan 6-17 hari, dan kelompok tikus betina dengan paparan *carbon black* 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam pada umur kebuntingan 6-17 hari + sel punca mesenkimal 1x10<sup>7</sup>/0,1 mL. Pada Tabel 1 juga disajikan bahwa kelompok yang dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-17 hari dosis

532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam dan kelompok dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-17 hari dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam + sel punca mesenkimal 1x10<sup>7</sup>/0,1 mL intravena, tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ).

Dari hasil analisis yang dilakukan pada semua kelompok perlakuan terapi sel punca mesenkimal sumsum tulang tikus yang bertujuan untuk meregenerasi sel sitotrofoblas dengan cara menurunkan persentase sel sitotrofoblas nekrosis akibat paparan *carbon black* baik pada umur kebuntingan 12 hari dan 18 hari menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) dengan kelompok perlakuan lainnya, kecuali dengan kelompok tanpa dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-11 hari dan kelompok tanpa dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-17 hari yang hanya sebagai kontrol tanpa diberikan paparan *carbon black*.

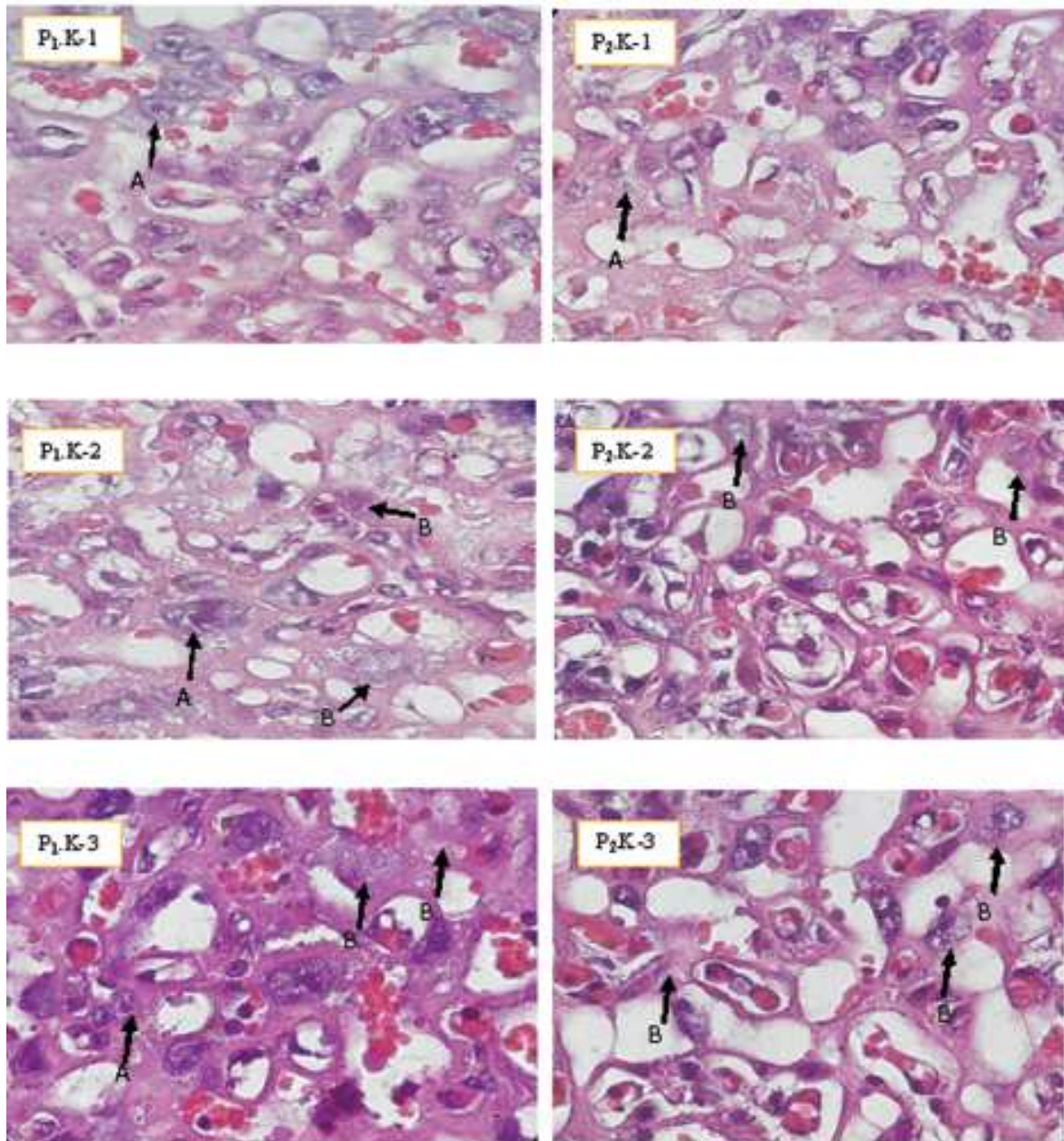
Pemberian *carbon black* pada sel sitotrofoblas plasenta menunjukkan terjadinya nekrosis. Nekrosis yang terjadi pada sel sitotrofoblas terjadi akibat *carbon black* yang dapat mengikuti aliran darah hingga menuju

Tabel 1. Rataan sel sitotrofoblas nekrosis

Perlakuan	Persentase Sel Sitotrofoblas Nekrosis
P <sub>1</sub> .K-1	10,59 <sup>a</sup> ±2,95
P <sub>1</sub> .K-2	41,38 <sup>c</sup> ±2,88
P <sub>1</sub> .K-3	40,95 ±0,89
P <sub>2</sub> .K-1	27,70 <sup>b</sup> ±2,72
P <sub>2</sub> .K-2	46,24 <sup>d</sup> ±0,84
P <sub>2</sub> .K-3	45,40 <sup>d</sup> ±1,47

Keterangan:

- Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )
- P<sub>1</sub>.K-1 : Tanpa dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-11 hari.
- P<sub>1</sub>.K-2 : Dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-11 hari dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam.
- P<sub>1</sub>.K-3 : Dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-11 hari dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam + sel punca mesenkimal 1x10<sup>7</sup>/0,1 mL intravena.
- P<sub>2</sub>.K-1 : Tanpa dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-17 hari.
- P<sub>2</sub>.K-2 : Dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-17 hari dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam.
- P<sub>2</sub>.K-3 : Dipapar *carbon black* pada umur kebuntingan 6-17 hari dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama empat jam + sel punca mesenkimal 1x10<sup>7</sup>/0,1 mL intravena.



Gambar 1. Histopatologi plasenta tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada tiap perlakuan. Keterangan: A.) menunjukkan sitotrofoblas yang normal, B.) menunjukkan sel sitotrofoblas yang mengalami nekrosis. (Pewarnaan HE; 1000x).

plasenta (Hougraad *et al.*, 2008), serta dapat menginduksi terbentuknya *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) di dalam sel trofoblas. *Reactive Oxygen Spesies* yang terbentuk akan mengakibatkan kerusakan membran sel. Akibat kerusakan dari membran sel menyebabkan penurunan aktivitas pompa natrium-kalium, disregulasi volume sel, dan peningkatan kalsium secara intraseluler yang masif sehingga menyebabkan kematian sel (nekrosis).

Peningkatan kalsium intraseluler dapat mengaktifkan beberapa enzim yang berperan dalam kematian sel seperti enzim protease, fosfolipase, ATPase, dan endonuklease (Myers dan Zachry, 2007).

Proses *homing* dan proliferasi pada organ spesifik melibatkan beberapa tahap seperti penempelan sel punca (*cell attachment*), proses *rolling* sel punca pada lumen pembuluh darah, proses adhesi, proses ekstravasasi sel punca pada

endotel pembuluh darah, dan migrasi melalui stroma jaringan. Kemampuan migrasi sel punca juga dipengaruhi oleh sinyal dari area yang mengalami injuri, *reception system*, dan kemampuan sel untuk melakukan kemotaksis (Barbash *et al.*, 2003; Zonta *et al.*, 2010; Kholodenko *et al.*, 2012). Sel punca mesenkimal sumsum tulang dapat mengekspresikan banyak reseptor dan molekul adhesi sel yang berfungsi dalam migrasi dan *homing* pada sel target (Sohni dan Verfaillie, 2013). Sitokin dan faktor pertumbuhan (*growth factor*) memainkan peran penting dalam *homing* sel punca. Saat terjadinya inflamasi pada plasenta, jaringan yang rusak akan mengeluarkan sitokin dalam jumlah besar seperti IL-6, *Platelet-derived growth factor-BB* (PDGF-BB), dan IGF-1 (Spaeth *et al.*, 2008; Kholodenko *et al.*, 2013). Namun PDGF-BB memiliki potensial yang lebih besar dalam menarik (*attracting*) sel punca mesenkimal sumsum tulang dibandingkan dengan sitokin lainnya. Pada sel sitotrofoblas akan mengekspresikan *stromal cell-derived factor-1 $\alpha$*  (SDF-1 $\alpha$ ), yang akan berikatan dengan *CXC chemokine receptor-4* (CXCR-4) yang diekspresikan pada permukaan sel trofoblas. Sitokin inflamasi yang lain seperti TGF- $\alpha$ 1, interleukin (IL)-1 $\alpha$ , dan TNF- $\alpha$ , menstimulasi produksi matriks metalloproteinases (MMPs) pada RBMMSC, sehingga akan menjadi stimulasi yang kuat dalam migrasi kemotaktik (*chemotactic migration*) melalui matriks ekstraseluler (Ries *et al.*, 2007; Kholodenko *et al.*, 2013), dan dalam hal ini MMPs memiliki fungsi dalam *remodelling* jaringan (Kang *et al.*, 2012).

Namun, dalam penelitian ini belum teramati terjadinya penurunan sel sitotrofoblas nekrosis pada perlakuan yang diberikan terapi sel punca. Seluruh proses *homing* terjadi antara 1-14 hari, sehingga pemberian untuk *homing* membutuhkan waktu yang lebih dari satu hari agar regenerasi sel sitotrofoblas plasenta dapat dilakukan. Dengan demikian waktu yang hanya sehari setelah diberikan terapi sel punca mesenkimal sumsum tulang tikus kemudian hewan coba lalu dikorbankan, belum cukup untuk melakukan regenerasi sel sitotrofoblas yang mengalami nekrosis. Berdasarkan hasil penelitian ini untuk perbaikan penelitian ke depan penggunaan terapi sel punca harus lebih dari satu hari.

## SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terapi sel punca mesenkimal sumsum tulang tikus pada tikus bunting yang dipapar *carbon black* belum menunjukkan adanya regenerasi sel sitotrofoblas plasenta

## SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang dosis sel punca mesenkimal sumsum tulang tikus yang berbeda, serta pemberian terapi sel punca mesenkimal sumsum tulang tikus yang lebih lama (lebih dari satu hari), untuk melihat potensi regenerasi jaringan yang rusak akibat paparan *carbon black*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Direktorat Pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian ini melalui Dana Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi tahun 2013.

## DAFTAR PUSTAKA

- Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pemberantasan Penyakit Menular /BBTKL dan P<sub>2</sub>M. 2009. Laporan: Situasi dan kecenderungan parameter pencemar udara dan air minum serta potensi resiko gangguan kesehatan di Jawa Timur 2006-2008. Surabaya.
- Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes LH, Kloner RA, Leor J. 2003. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *J Circulation* 108(7): 863-8.
- Barlow PG, Baker AC, Donaldson K, MacCallum J, Stone V. 2005. Carbon Black Nanoparticles Induce Type II Epithelial Cells to Release Chemotaxins for Alveolar Macrophages. *J Particle and Fibre Toxicol* 2 (11): 1-14.



- Crop MD, Baan CC, Weimar W, Hoogduijn MJ. 2009. Potential of mesenchymal stem cells as immune therapy in solid organ transplantation. *J Transplant Inter* 22(4): 365-376
- Dachlan EG, Widjiati, Santoso B. 2011. Pengaruh paparan partikulat jelaga terhadap peningkatan lipid peroksidase, kejadian apoptosis plasenta dan luaran kebuntingan pada mekanisme molekuler gangguan kebuntingan tikus (*Rattus novergicus*). [Laporan Penelitian]. Surabaya. Universitas Airlangga.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2002. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 1407/Menkes/Sk/Xi/2002 Tentang Pedoman Pengendalian Dampak Pencemaran Udara. Jakarta. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dejmek J, Selevan SG, Benes I, Solansky I, Sram RJ. 1999. Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. *J Envir Health Persp* 107(6): 475-480
- Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, Macnee W, Stone V. 2005. Combustion derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *J Part and Fibre Toxicol* 2(10): 10-14
- Garza KM, Soto KF, Murr LE. 2008. Cytotoxicity and reactive oxygen spesies generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials. *Inter J of Nanomed* 3(1): 83-94.
- Halim D, Murti H, Sandra F, Boediono A, Djuwantono T, Setiawan B. 2010. *Stem Cell: Dasar teori dan Aplikasi Klinis*. Edisi:1. Jakarta. Penerbit Erlangga. Hal:1-30.
- Han Z, Jing Y, Zhang S, Liu Y, Shi Y, Wei L. 2012. The role of immunosuppression of mesenchymal stem cells in tissue repair and tumor growth. *J Cell & Bioscience* 2(1): 8. doi:10.1186/2045-3701-2-8
- Hendarto H, Muhammad FK, Eva D, Widjiati R, Suhatno, Fedik AR. 2013. The Role of Bone Marrow Transplantation on Oocyte-Granulosa Cell Interaction and Follicular Development of Cisplatin-Induced Ovarian Failure in Rat. *J Stem Cell Res Ther* 3(8) : 13-19
- Hougaard KS, Jensen KA, Nordly P, Taxvig C, Vogel U, Saber A, Wallin H. 2008. Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on development, behaviour, genotoxicity and inflammation in mice. *J Part and Fibre Toxicol* 5(3): 1-15
- Kang SK, Il SS, Myung SK, Jung YJ, Jeong CR. 2012. Journey of mesenchymal stem cells for homing: strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. *J Stem Cells Inter* 1-11
- Kholodenko IV, Konieva AA, Lupatov AY, Yegorov YE, Yarygin KN. 2012. Transplantation of human mesenchymal stem cells and syngeneic macrophages into mice with contusive spinal cord injury. *J Tissue Eng Regen Med* 6(1): 86-87
- Kholodenko IV, Konieva AA, Kholodenko RV, Yarygin KN. 2013. Molecular mechanisms of migration and homing of intravenously transplanted mesenchymal stem cells. *J Reg Med & Tiss Enginer* 2(1): 1-11
- Lee HJ, Selesmiami K, Niikura Y, Niikura T, Klein R, Dombkowski DM, Tilly JL. 2007. Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy induced premature ovarian failure. *J Clin Oncol* 25(22): 3198-3204
- Madyawati SP, Rimayanti. 2013. Efektivitas Terapi *Rat Bone Marrow Stem Cell* pada Tikus (*Rattus novergicus*) Model Teratogenik *Particulat Matter* Terhadap Cacat Kongenital, Ekspresi TNF- $\alpha$ , Kadar Progesteron, dan Apoptosis plasenta [Laporan Penelitian]. Surabaya. Universitas Airlangga.
- Myers MDM, Zachry JF. 2007. *Pathologic Basic of Veterinary Medicine*. 4<sup>th</sup> Ed. In: McGavin MDM, Zachry JF (ed). USA. Mosby Elsevier.
- Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. 2007. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are Essential For The Invasive Capacity Of Human Mesenchymal Stem Cells: Differential Regulation By Inflammatory Cytokines. *J Blood* 109: 4055-4063
- Shinde SK, Grampurohit ND, Gaikwad DD, Jadhav SL, Gadhav MV, Shelke PK. 2012. Toxicity Induced by Nanoparticles. *J Trop Dis* 2(4): 331-334.



- Sohni A, Verfaillie CM. 2013. Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking. *J Stem Cells Inter* 1-8
- Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. 2008. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 15: 730-738.
- Sudaryanti L. 2012. Pengaruh paparan partikulat jelaga terhadap kadar *Malondialdehyde* plasenta dan luaran kebuntingan pada tikus (*Rattus norvegicus*) [Tesis]. Surabaya. Universitas Airlangga.
- Umara R. 2013. Jalanan Jawa Timur Sudah Jenuh. <http://kelanakota.suarasurabaya.net/news/2013/127503-Jalanan-Jawa-Timur-Sudah-Jenuh>. [20 Februari 2013].
- Widjiati. 1997. Pengaruh Fosfat, Glukosa dan Kombinasinya dalam Medium Kultur *in-vitro* terhadap Perkembangan Embrio Mencit [Tesis]. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Wick P, Malek A, Manser P, Meili D, Althaus XM, Diener L, Diener PA, Zisch A, Krug HF, Mandagh UV. 2009. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *J Envir Health Persp* 118(3): 432-436
- Zonta S, De Martino M, Bedino G, Piotti G, Rampino T, Gregorini M, Frassoni F, Dal Canton A, Dionigi P, Alessiani M. 2010. Which is the most suitable and effective route of administration for mesenchymal stem cell-based immunomodulation therapy in experimental kidney transplantation: endovenous or arterial?. *Transplant Proc* 42: 1336-1340.