

**TESIS**

**EFEKTIVITAS PEMBERIAN HAEMOPOITIK STEM CELL PADA  
INDUK MENCIT (*Mus musculus*) BUNTING YANG DIPAPAR  
PLUMBUM TERHADAP PENURUNAN JUMLAH SEL  
NEKROSIT DAN EKPRESI CASPASE-3 PADA  
PLASENTA**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**



Oleh :

**KAMAL MUSTHOFA**

**NIM. 061141016**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOLOGI REPRODUKSI  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2015**

**EFEKTIVITAS PEMBERIAN HAEMOPOITIK STEM CELL PADA  
INDUK MENCIT (*Mus musculus*) BUNTING YANG DIPAPAR  
PLUMBUM TERHADAP PENURUNAN JUMLAH SEL  
NEKROSIT DAN EKPRESI CASPASE-3 PADA  
PLASENTA**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**

**TESIS**

**Untuk memperoleh gelar Magister  
Dalam Program Magister Ilmu Biologi Reproduksi Pada  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga  
Surabaya**

Oleh :

**KAMAL MUSTHOFA**

**NIM. 061141016**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOLOGI REPRODUKSI  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2015**

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul:

**EFEKTIVITAS PEMBERIAN *HAEMOPOITIK STEM CELL* PADA INDUK MENCIT (*Mus musculus*) BUNTING yang DIPAPAR *PLUMBUM* TERHADAP PENURUNAN JUMLAH SEL NEKROSIS dan EKSPRESI CASPASE-3 PADA PLASENTA**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang sepengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 03 Maret 2015



Kamal Musthofa  
NIM. 061141016

## Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
Tanggal 3 Maret 2015

Oleh

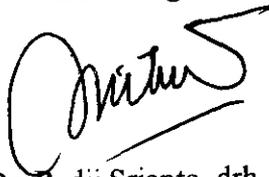
Pembimbing Ketua



Dr. Widjiati, drh., M.Si.

NIP. 196209151990022001

Pembimbing Serta

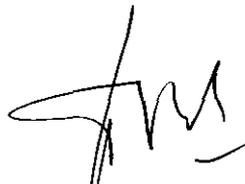


Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes

NIP. 195601051986011001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Prof. Dr. Wurlina, drh., M.S.

NIP. 1953196209151990022001

Hasil Penelitian Tesis ini Telah diuji dan dinilai pada

Tanggal : 09 Februari 2015

**PANITIA PENGUJI SEMINAR HASIL PENELITIAN TESIS**

**Ketua** : Prof. Dr. Wurlina, drh., M.S.

**Anggota** : 1. Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si.

2. Dr. Rimayanti, drh., M.Kes.

3. Dr. Widjiati, drh., M.Si.

4. Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes

Telah diuji dan dinilai pada

Tanggal : 03 Maret 2015

**PANITIA PENGUJI TESIS**

- Ketua** : Prof. Dr. Wurlina, drh., M.S.  
**Anggota** : 1. Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si.  
2. Dr. Rimayanti, drh., M.Kes.  
3. Dr. Widjiati, drh., M.Si.  
4. Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes

Surabaya, 03 Maret 2015

Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga  
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph. D., drh.  
NIP. 195312161978062001

## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah puji syukur kehadirat ALLAH SWT atas rahmat, ridho dan karunia-Nya yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan tesis untuk memperoleh gelar Magister di Program Studi Magister Ilmu Biologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dengan judul **“EFEKTIVITAS PEMBERIAN HEMOPOETIK STEM CELL PADA MENCIT (*MUS MUSCULUS*) BUNTING yang DIPAPAR *PLUMBUM* TERHADAP PENURUNAN JUMLAH SEL NEKROSIS dan EKSPRESI CASPASE-3 PADA PLASENTA”**.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada: Prof. Hj.Romziah Sidik, drh., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan, sehingga penulis dapat menempuh pendidikan di Program Studi Magister Ilmu Biologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Terima kasih Kepada Dr. Widjiati, drh., M.Si selaku pembimbing utama dan Prof. Dr. Pudji Sianto, drh., M.Kes. selaku pembimbing serta yang telah banyak menyempatkan waktu, membimbing, dan memberikan masukan pada penelitian hingga penyusunan tesis berakhir.

Terima Kasih kepada Prof. Dr. Wurlina, drh., M.Ş. selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga sekaligus sebagai Ketua Penguji, Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si. sebagai Sekretaris Penguji, Dr. Rimayanti, drh., M.Kes. sebagai Anggota Penguji.

Terima kasih juga penulis ucapkan kepada seluruh staf pengajar Program Studi Magister Ilmu Biologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan

keilmuan yang diberikan selama mengikuti pendidikan di Program Magister Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Penulis juga tak lupa menyampaikan ucapan terimakasih kepada seluruh anggota staf Laboratorium Embriologi Veteriner, serta Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

Ucapan terima kasih penulis ucapkan kepada Ayah dan Ibu serta Adik-adikku atas support dan dukungannya selama ini. Terima kasih juga kepada teman-teman Asisten Dosen Asisten Dosen Embriologi Veteriner dan Asisten Dosen Patologi Veteriner serta kawan-kawan Magister Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga angkatan 2011 atas support dan kebersamaan selama ini. Dan tak lupa juga ucapan terima kasih kepada Brigita Sendytia, Spd. yang telah memotivasi dan banyak membantu penulis selama proses penyusunan tesis ini. Serta terima kasih juga kepada teman-teman sepenanggungn Kartika Eka Paksi, drh., Rosida Achlis, drh., M.Vet., Bodhi Agustono, drh. M.Vet., Sheila Marty Yanestria, drh. M.Vet., Khususnya kepada Agung Budianto Achmad.drh., M.Si., yang telah banyak membantu dan memberikan semangat dalam penyusunan Tesis ini.

Ucapan terimakasih juga penulis ucapkan kepada keluarga besar PT. Japfa Comfeed Indonesia. Tbk. Dan terimakasih banyak kepada Bpk. Wiwoho Hertartiono,drh, Bpk H.Dalmi Triono.drh., Bpk H. Luluk E.L.drh., Bpk. Arief Mujahid.drh dan kolega atas pengertian dan memberikan semangat dalam Penulisan Tesis ini.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharap kritikan dan saran sebagai upaya penyempurnaan tesis ini. Semoga penelitian ini dapat menjadi informasi yang berharga bagi khalayak umum dan dapat berguna bagi

perkembangan ilmu pengetahuan terutama dalam bidang Ilmu Biologi Reproduksi. Akhir kata penulis mengucapkan terimakasih.

Surabaya, 12 Maret 2015

Penulis

## RINGKASAN

### EFEKTIVITAS PEMBERIAN *HEMOPOETIC STEM CELL* PADA INDUK MENCIT (*MUS MUSCULUS*) BUNTING yang DIPAPAR *PLUMBUM* TERHADAP PENURUNAN JUMLAH SEL NEKROSIS dan EKSPRESI *CASPASE-3* PADA PLASENTA

*Plumbum* merupakan salah satu polutan yang termasuk dalam logam berat. *Plumbum* merupakan salah satu partikel buangan dari pabrik baterai, pabrik cat, logam, karet dan mainan anak-anak. *Plumbum* diketahui bersifat sitotoksik dan genotoksik karena dapat memproduksi *Reactive Oxygen Species* (ROS), yang dapat bertranslokasi ke dalam darah, otak, ginjal, sumsum tulang dan hati serta dapat melalui plasenta dan air susu maternal sehingga berpengaruh pada perkembangan janin sebelum maupun sesudah kelahiran. Pemberian terapi *Hemopoetic stem cell* pada mencit yang dipapar oleh *plumbum* bertujuan untuk mengurangi apoptosis dan meningkatkan persentase sel trofoblas plasenta yang normal dengan cara mengganti jaringan plasenta yang rusak dengan jaringan baru.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efektivitas pemberian *Haemopoitik Stem Cell* (HSC) terhadap mencit (*Mus musculus*) yang dipapar *plumbum* selama proses kebuntingan.

Penelitian ini merupakan suatu studi eksperimental laboratorik, dengan empat kelompok perlakuan dan lima kali ulangan yang menggunakan (*Mus Musculus*) betina dengan umur tiga bulan, berat badan 20 -35 gram sebagai hewan coba penelitian. Penelitian ini dimulai dengan mengawinkan mencit betina lalu memapar dengan *plumbum* 1/12 LD50 (54,42 mg/ml) dan 1/16 LD50 (40,75 mg/ml) dimulai pada umur kebuntingan hari ke-9 s/d ke-15. Setelah diberikan paparan kemudian pada kelompok perlakuan tertentu (P<sub>3</sub> dan P<sub>4</sub>) akan diterapi dengan *Hemopoetic Stem Cell* 1x10<sup>7</sup>/0,1 ml secara intravena. Setelah semua diberikan perlakuan, tahap berikutnya adalah pembuatan sediaan preparat untuk pemeriksaan ekspresi *Caspase-3* pada sel trofoblas dengan metode pewarnaan Imunohistokimia dan pembuatan preparat dengan pewarnaan H.E untuk menghitung persentase sel trofoblas yang masih normal (sel sitotrofoblas dan sel sinsitiotrofoblas).

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Perhitungan ekspresi *caspace-3* dihitung dengan menggunakan Indeks Skala Remmele yang telah dimodifikasi. Data hasil perhitungan ekspresi *caspace-3* dilakukan analisis dengan Uji Kruskal-Wallis kemudian dilanjutkan dengan Uji Mann-Whitney untuk membandingkan antar kelompok perlakuan. Jumlah sel trofoblas yang nekrosis diuji dengan analisis Univariat untuk melihat adanya interaksi antar faktor perlakuan. Setelah dilihat adanya interaksi maka dilanjutkan dengan Analisis Varian (ANOVA).

Hasil penelitian membuktikan bahwa pada perlakuan yang diberikan terapi *Hemopotik Stem Cell* 1x10<sup>7</sup>/0,1 ml menunjukkan penurunan ekspresi *caspace-3* dan penurunan Jumlah sel trofoblas yang nekrosis (sel sitotrofoblas dan sel sinsitiotrofoblas) dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang tidak diberi terapi *Hemopoetic stem cell*.

Kesimpulan penelitian ini adalah Efektivitas terapi *Hemopoetic Stem Cell* dapat menurunkan jumlah sel trofoblas yang nekrosis (sel sitotrofoblas dan sel sinsitiotrofoblas) dan dapat menurunkan ekspresi *caspace-3* yang diberikan paparan *plumbum* sudah efektif.

## SUMMARY

### THE EFFECTIVENESS OF GIVING HAEMOPOETIC STEM CELLS IN PREGNANT MICE (*MUS MUSCULUS*) EXPOSED TO PLUMBUM TOWARDS THE DECREASING NUMBER OF NECROSIS CELLS AND EXPRESSION OF CASPASE-3 IN PLACENTA

Plumbum is the one of heavy metal pollutants and the waste particles from battery factories, paint factories, metal, rubber and children's toys. Plumbum is recognized to be cytotoxic and genotoxic as it can produce Reactive Oxygen Species (ROS), which can be translocated into the blood, brain, kidney, bone marrow and liver. In addition, it can cross the placenta and the maternal breast milk then affect on fetal development before and after birth. The purposes of haemopoetic stem cell therapy in pregnant mice exposed by plumbum are to reduce apoptosis and increase the percentage of normal trophoblast cells of placenta by replacing damaged placenta tissues with new tissues. Therefore, the aims of this study was to determine the effectiveness of Haemopoetic Stem Cell (HSC) on mice (*Mus musculus*) exposed to plumbum during pregnancy.

This research was a laboratory experimental study, with four treatment groups and five replications using females mice (*Mus musculus*) age three months, weight 20-35 grams as animal research. This study began with mating the female mice, then exposed to plumbum 1/12 LD50 (54.42 mg / ml) and 1/16 LD50 (40.75 mg / ml) on gestation days 9-15 . After treatment, group 3 dan group 4 were treated with HSC  $1 \times 10^7 / 0.1$  ml intravenously. After giving treatment, the next step was the preparation for the examining caspase-3 expression in trophoblast cells by applying *Immunohistochemistry* staining method and preparing with HE staining to calculate the percentage of remaining normal trophoblast cells (cytotrophoblast and syncytiotrophoblast cells).

The design of this study used completely randomized design. The expression of Caspase-3 was calculated by applying modified Remmele Scale Index. The data of was analyzed with Kruskal-Wallis test and it was followed by Mann-Whitney test to compare among the treatment groups. The number of necrosis trophoblast cells was tested by univariate analysis to know the interaction among treatment factors, and then proceeded by Analysis of Variant (ANOVA). The results indicated that the treatment of Haemopoetic Stem Cell  $1 \times 10^7 / 0.1$  ml showed a decrease in caspase-3 expression of trophoblast cells and a decreasing number of necrosis trophoblast cell (cytotrophoblast and syncytiotrophoblast cells) compared to the groups without treatment with HSC.

It can be concluded that Hemopoetic Stem Cells therapy was effective to reduce the number of necrosis trophoblast cell (cytotrophoblast and syncytiotrophoblast cells) and caspase-3 expression.

**THE EFFECTIVENESS OF GIVING HAEMOPOETIC STEM CELLS IN THE PREGNANT MICE (*MUS MUSCULUS*) EXPOSED TO PLUMBUM TOWARDS THE DECREASING NUMBER OF NECROSIS CELLS AND EXPRESSION OF CASPASE-3 IN PLACENTA**

**KAMAL MUSTHOFA**

**ABSTRACT**

The aim of this study to observe the effectiveness of Haemopoitic Stem Cell in pregnant mice exposed to plumbum, and the observed cases are the numbers of necrosis cells and caspase-3 expression in the placenta. Haemopoitic Stem Cells was expected to able to reduce the number of necrosis cells and was abled to reduce the expression of caspase- 3. This study used a randomized design, and the required samples in this study were 40 female mice and 40 male mice (*Mus musculus*). Each treatment utilized 10 male mice and 10 female mice with details as follow, (1) first treatment group (T1): pregnant mice were given a dose of plumbum 1/12 LD50 (54.42 mg / ml) during gestation days 9-15 and on day 16 distilled water was given orally. (2) second treatment group (T2): pregnant mice were given a dose of plumbum 1/16 LD50 (40.75 mg / ml) during gestation days 9-15 and on day 16 distilled water was given orally. (3) Third treatment group (T3): Plumbum pregnant mice were given a dose of 1/12 LD50 (54.42 mg / ml) during gestation days 9-15 and on day 9 Hemopoetic Stem Cell  $1 \times 10^7$  was given intravenously. (4) fourth treatment group (T4): pregnant mice were given a dose of Plumbum 1/16 LD50 (40.75 mg / ml) during gestation days 9-15 and on day 9 Hemopoetic Stem Cell  $1 \times 10^7$  was given intravenously. The obtained data were analyzed by non-parametric and parametric analysis. Non-parametric analysis used the Kruskal-Wallis test, if the data are significantly different, they will be followed by Mann Whitney Test. Analytical analysis used univariate analysis, if there was an interaction between the factors studied, it was then followed by one-way analysis of variance (ANOVA) / one-way ANOVA. The analysis was performed by assuming that the tested population was normally distributed, homogenous, and the samples were not related to each other. The results of the expression of caspase-3 between treatments are significant, especially the fourth treatment group (T4). Of all the treatments (T1, T2, T3) when compared to treatment P4 shows a significantly different result. T4 was treated by giving Hemopoetic Stem Cells on day 9 which coincided with the first day of plumbum exposure. Intended stem cells function properly because the homing process is good enough for stem cells.

**Keyword : *Plumbum, Hemopoetic Stem Cell, Caspase-3, Trophoblast Cell***

## DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DEPAN .....	i
SAMPUL DALAM.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
LEMBAR PERNYATAAN .....	iv
HALAMAN PANITIA PENGUJI.....	v
HALAMAN PERSETUJUAN.....	vi
UCAPAN TERIMAKASIH .....	vii
RINGKASAN .....	x
SUMMARY .....	xi
ABSTRACT.....	xii
DAFTAR ISI .....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR GAMBAR .....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG .....	xix
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Masalah .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	7
1.3. Tujuan Penelitian .....	7
1.3.1. Tujuan Umum .....	7
1.3.2. Tujuan Khusus .....	7
1.4. Manfaat Penelitian .....	8
1.4.1. Manfaat Teoritis .....	8
1.4.2. Manfaat Praktis .....	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	9
2.1. Mencit ( <i>Mus musculus</i> ).....	9
2.1.1. Sistem Reproduksi Mencit ( <i>Mus musculus</i> ).....	10
2.1.2. Plasentasi.....	12
2.2. Radikal bebas.....	17
2.3. Nekrosis .....	21
2.3.1 Mekanisme Nekrosis .....	26
2.4. Apoptosis.....	28
2.4.1 Caspase-3.....	29
2.4.2 Mekanisme Apoptosis.....	31

2.4.2.1 Jalur Ekstrinsik.....	32
2.4.2.2 Jalur Instrinsik.....	34
2.5. <i>Stem Cell</i> .....	37
2.5.1 Karakteristik <i>Stem Cell</i> .....	37
2.5.2 Jenis-Jenis <i>Stem Cell</i> .....	40
2.6. Mekanisme <i>Stem Cell</i> dalam regenerasi.....	41
2.6.1 <i>Homing</i> .....	41
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN ....</b>	<b>43</b>
3.1. Kerangka Konseptual.....	43
3.2. Hipotesis Penelitian .....	45
<b>BAB 4 MATERI DAN METODE.....</b>	<b>47</b>
4.1. Jenis Rancangan Penelitian.....	47
4.2. Populasi, Sampel dan Besar Sampel .....	47
4.2.1. Populasi .....	47
4.2.2. Sampel .....	48
4.2.3. Besar Sampel .....	48
4.2.4. Teknik Pengambilan Sampel .....	49
4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel .....	49
4.3.1. Variabel Bebas.....	49
4.3.2. Variabel Tergantung.....	50
4.3.3. Variabel Kendali .....	50
4.3.4. Definisi Operasional Variabel.....	50
4.4. Bahan Penelitian .....	51
4.5. Peralatan Penelitian .....	51
4.6. Waktu dan Tempat Penelitian .....	52
4.7. Prosedur Penelitian .....	52
4.7.1. Prosedur Sinkronisasi Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	52
4.7.2. Prosedur Pengawinan Mencit ( <i>Mus musculus</i> ). .....	53
4.7.3. Prosedur Pemberian Paparan <i>plumbum</i> .....	53
4.7.4. Prosedur pemberian HSC.....	53
4.7.5. Prosedur Pembedahan Hewan Coba.....	54
4.7.6. Pengamatan Ekspresi Caspase-3 dengan Metode Immunohistokimia.....	54
4.7.7. Pengamatan Gambaran Plasenta Tikus secara Histopatologis dengan Pewarnaan Hematoxilin-Eosin.....	55
4.8. Analisis Data.....	55
4.9. Kerangka Alur Penelitian.....	56

<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>57</b>
<b>5.1. Jumlah Sel Trofoblas Plasenta .....</b>	<b>57</b>
5.1.1 Jumlah Sel Sitotrofoblas Nekrosis .....	57
5.1.2 Jumlah Sel Sinsitiotrofoblas Nekrosis.....	58
<b>5.2. Ekspresi Caspase-3 pada Sel Trofoblas Plasenta.....</b>	<b>60</b>
<b>BAB 6 PEMBAHASAN.....</b>	<b>62</b>
<b>6.1. Sel Sitotropoblas .....</b>	<b>64</b>
<b>6.2. Sel Sinsitiotrofoblas .....</b>	<b>65</b>
<b>6.2. Ekspresi Caspase 3 .....</b>	<b>66</b>
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>68</b>
<b>7.1. Kesimpulan .....</b>	<b>68</b>
<b>7.2. Saran .....</b>	<b>68</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>69</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>73</b>

**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
Tabel 2.1. Klasifikasi Mencit.....	10
Tabel 5.1. Rerata dan Simpangan Baku Sel Sitotropoblas yang Mengalami Nekrosis .....	58
Tabel 5.2. Rerata dan Simpangan Baku Sel Sinsitiotropoblas yang Mengalami Nekrosis.....	58
Tabel 5.3. Hasil Uji Mann-Whitney Ekspresi Caspase-3 Pada Sel Tropoblas Plasenta .....	60

**DAFTAR GAMBAR**

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
Gambar 2.2. Struktur Elektron ROS .....	18
Gambar 2.3. Mekanisme Nekrosis.....	27
Gambar 2.4. Mekanisme Apoptosis.....	32
Gambar 2.5. Jalur Ekstrinsik Apoptosis .....	33
Gambar 2.6. Jalur Instrinsik Apoptosis.....	35
Gambar 5.1. Gambar Histopatologi Plasenta Mencit ( <i>mus musculus</i> ) bunting Pada tiap perlakuan .....	59
Gambar 5.2. Gambar Histopatologi Plasenta Mencit ( <i>mus musculus</i> ) bunting Dengan Pewarnaan Imunohistokimia .....	61

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
Lampiran 1. Metode pewarnaan H.E .....	73
Lampiran 2. Skala Semikuantitatif IRS .....	75
Lampiran 3. Perhitungan Jumlah Sel Tropoblas Nekrosis.....	76
Lampiran 4. Skoring Ekspresi Caspase-3 .....	78
Lampiran 5. Pengujian Data Sel Tropoblas Nekrosis.....	79
Lampiran 6. Pengujian Data Ekspresi Caspase-3 .....	81
Lampiran 7. Sertifikat Kode Etik.....	81

**SINGKATAN ARTI DAN LAMBANG**

<b>Apaf</b>	= Apoptotic Protease Activating Factor-1
<b>Bcl-2</b>	= B-cell Lymphoma-2
<b>Bak</b>	= Bcl-2 Homologous Antagonist Killer
<b>Bax</b>	= Bcl-2-Associated X Protein
<b>BSA</b>	= Bovine Serum Albumin
<b>Caspase</b>	= Cystein Aspartyl-Specific Protease
<b>CXCR-4</b>	= C-X-C Chemokine Receptor 4
<b>CO</b>	= Carbon Mono Oksida
<b>CO<sub>2</sub></b>	= Carbon Dioksida
<b>Cu</b>	= Cuprum (tembaga)
<b>DNA</b>	= Deoxyribose Nucleic Acid
<b>EPR</b>	= Electro Paramagnetic Resonance
<b>FADD</b>	= Fas-Associated Death Domain
<b>FasL</b>	= Fas Ligand
<b>Fe</b>	= Ferrum (Besi)
<b>GD</b>	= Gestation Days
<b>HSC</b>	= Hemopoetic Stem Cell
<b>hCG</b>	= Human Chorionic Gonadotropin
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	= Hydrogen Peroksida
<b>IGF-1</b>	= Insulin Growth Factor-1
<b>IUGR</b>	= Intra Uterine Growth Retardation
<b>MDA</b>	= Malondialdehyde
<b>NO</b>	= Nitrogen Oksida
<b>OH<sup>-</sup></b>	= Hidroksil
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	= Superoksida
<b>O<sub>3</sub></b>	= Ozon
<b>Pb</b>	= Plumbum (Timbal)

<b>PBS</b>	= Phospat Buffer Saline
<b>PDF-BB</b>	= Plateled Derived Factor-BB
<b>PGE<sub>2</sub></b>	= Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>PMSG</b>	= Pregnant Mare Serum Gonadotropin
<b>PTP</b>	= Permeability Transmembrane Pore
<b>ROS</b>	= Reactive Oxygen Spesies
<b>SA-HRP</b>	= Streptavidin Horseradish Peroxidase
<b>SH</b>	= Sulphydryl
<b>SPSS</b>	= Statistical Package for the Social Sciences
<b>TGC</b>	= Trophoblast Giant Cell
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	= Tumor Growth Factor- $\beta$ 1
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	= Tumor Necrosis Factor-Alfa
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	= Tumor Necrosis Factor-Beta

**BAB 1**  
**PENDAHULUAN**

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pencemaran lingkungan menjadi masalah yang serius beberapa tahun terakhir ini. Pencemaran yang terjadi adalah akibat perkembangan dari sektor industri, pertanian, serta peningkatan populasi manusia (Timbrell, 2002). Kemajuan dalam berbagai bidang, terutama industri selain memberikan dampak positif berupa peningkatan pertumbuhan ekonomi yang pesat, namun disisi lain juga memiliki dampak negatif berupa adanya pencemaran lingkungan, baik berupa pencemaran air, tanah dan udara. Pencemaran tersebut dapat mengakibatkan gangguan keseimbangan lingkungan hidup serta dapat menimbulkan gangguan kesehatan pada manusia (Sudaryanti, 2012).

Kemajuan dalam bidang industri dan peningkatan jumlah kendaraan bermotor yang menggunakan energi berbahan bakar fosil pada negara-negara berkembang merupakan sumber utama pencemaran udara. Namun selain pencemaran udara yang diakibatkan oleh manusia, juga dapat diakibatkan oleh peristiwa alam seperti kebakaran hutan, gunung meletus, dan gas alam beracun. Pembakaran bahan bakar fosil serta batu bara yang banyak digunakan pada beberapa proses industri meningkatkan kadar gas sulfur oksida, karbondioksida, karbon monoksida, nitrogen oksida, hidrogen sulfida, *volatile hydrocarbons* dan *particulate matter* seperti karbon dan abu (Timbrell, 2002). Diperkirakan pencemaran udara dan kebisingan akibat kegiatan industri dan kendaraan bermotor akan meningkat dua kali lipat pada tahun 2000 dari kondisi tahun 1990

dan sepuluh kali lipat pada tahun 2020 (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2012).

Menurut data dari Badan Pusat Statistik jumlah kendaraan bermotor di Indonesia pada tahun 2011 sebanyak 85.601.351 dan pada tahun 2012 meningkat menjadi 94.373.324, meningkat sebesar 9,29 % (Badan Pusat Statistik, 2013). Kemudian khusus di kota Surabaya berdasarkan data Dinas Pendapatan Daerah Jawa Timur (Umara, 2013), jumlah kendaraan bermotor meningkat hingga 7,12 %. Dari data di atas terlihat dari tahun ke tahun jumlah kendaraan bermotor akan terus meningkat. Peningkatan jumlah kendaraan yang ada sebanding dengan peningkatan jumlah emisi yang dihasilkan (Hickman, 1999). Peningkatan emisi yang dihasilkan akan berdampak pada udara. Dampak dari pencemaran udara yang berasal dari emisi gas buang kendaraan bermotor dan industri dapat menyebabkan penurunan kualitas udara, yang berdampak negatif terhadap kesehatan manusia (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2012).

Buangan partikel yang berasal dari mesin-mesin diesel (*diesel exhaust particles/DEP*), berkontribusi secara signifikan terhadap partikulat polusi udara pada udara di perkotaan. Buangan partikel yang berasal dari mesin diesel kendaraan memiliki ukuran yang sangat kecil (*ultrafine*) kurang dari 0.05–0.2  $\mu\text{m}$  (Hougaard *et al.*, 2008). Selain dari buangan partikel yang berasal dari kendaraan bermotor, kualitas udara juga dipengaruhi oleh logam dan hasil buangan pabrik, salah satunya adalah timah (Pb). Plumbum atau timah hitam merupakan logam berat yang terdapat di lingkungan sekitar kita, baik itu secara proses alami maupun buatan. Plumbum banyak digunakan dalam industri logam, baterai, cat,

kabel, karet dan mainan anak-anak. Manusia terkontaminasi dengan plumbum melalui udara, air dan makanan. Apabila plumbum terhirup atau tertelan oleh manusia, akan beredar mengikuti aliran darah dan terdistribusi di jaringan lunak dan tulang (Darmono, 2001). Plumbum adalah logam berat, dengan nomor atom 82 bersifat lunak dan berwarna biru keabu-abuan, plumbum merupakan senyawa anorganik dan umumnya dalam bentuk garam timbal anorganik, dan selebihnya berbentuk timbal organik. Senyawa plumbum organik ditemukan dalam bentuk senyawa tetraethyllead (TEL) Dan tetramethyllead (TML). Plumbum bersifat anti korosif, oleh karena sifat inilah maka plumbum digunakan secara luas dalam berbagai industri.

Plumbum masuk ke dalam tubuh dapat melalui berbagai cara antara lain melalui saluran cerna, saluran pernapasan dan melalui kulit. Setelah diabsorpsi, plumbum akan terikat dengan eritrosit yang kemudian akan di distribusikan secara luas ke jaringan lunak seperti sumsum tulang, otak, ginjal, hati, otot, dan gonad kemudian menuju ke matriks tulang. Plumbum dapat melewati sawar darah plasenta dan merupakan bahaya potensial bagi janin.

Absorpsi Pb dapat melalui saluran pernapasan, saluran cerna dan melalui kulit. Absorpsi melalui saluran pernapasan tergantung kepada besarnya diameter partikel Pb yang masuk ke dalam paru-paru, diameter sebesar 1 mikrometer akan diabsorpsi secara komplit di alveoli (Hariono.2008).

Absorpsi Pb melalui saluran cerna tergantung pada beberapa kondisi antara lain, besarnya konsentrasi Pb yang tertelan, adanya makanan di dalam lambung, status gizi pasien, usia dari pasien. Absorpsi Pb akan meningkat pada

keadaan defisiensi besi, zinc dan kalsium. Tingkat absorpsi yang tinggi terjadi pada anak-anak yaitu sekitar 50% dari jumlah Pb yang tertelan, sedangkan orang dewasa tingkat absorpsi Pb sekitar 10-20%. Plumbum organik seperti tetraethyl lead (TEL) yang digunakan sebagai *antiknock* pada bahan bakar bensin hampir seluruhnya diabsorpsi langsung melalui kulit (Hariono, 1991).

Plumbum yang diabsorpsi diangkut oleh darah ke jaringan lunak seperti otak paru, hati, limpa dan sumsum tulang, yang kemudian mengalami redistribusi dan disimpan dalam tulang. Sekitar 95% Pb dalam darah diikat oleh eritrosit dengan waktu paruh 25-40 hari, pada jaringan lunak waktu paruh Pb 40 hari, sedangkan pada tulang memiliki waktu paruh selama 28 tahun. Plumbum diekskresikan melalui melalui beberapa cara antara lain, melalui urin sebanyak, saluran empedu, rambut, kuku, keringat (Hariono.2008).

Keracunan Pb dapat merupakan hasil dari interaksi antara logam dengan kelompok donor elektron dalam sistem biologik, seperti dengan gugus SH (Sulphydryl) dalam enzim dan protein lainnya dengan ikatan kovalen sehingga akan menghalangi kerja enzim tersebut. Pb juga mampu membentuk ion-ion organometalik yang larut dalam lemak dan mampu menembus membran biologis dan berakumulasi dalam sel dan organel sel seperti mitokondria (Raharjo M, 2009). Pb berinteraksi dengan kation-kation penting terutama besi, kalsium dan zinc serta mengganggu pompa natrium-potassium-adenosine triphosphate ( $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATP}$ ) dengan demikian meningkatkan kerapuhan selular.

Manifestasi klinis dari keracunan plumbum dapat mengenai berbagai sistem organ antara lain sistem saraf pusat, ginjal, hematopoetik, gastrointestinal, kardiovaskuler, endokrin dan reproduksi.

Plumbum dapat melintasi barrier plasenta baik pada hewan dan manusia, dengan deposisi Pb pada jaringan tulang, darah dan hati fetus. Keracunan Pb pada manusia dapat menyebabkan sterilitas, aborsi spontan. Pada hewan percobaan, pada umumnya Pb menyebabkan sterilitas, aborsi, perubahan siklus estrus, efek teratogenik, abnormalitas spermatozoa, penurunan reproduksi spermatozoa, reduksi diameter dan edema tubulus seminiferus.

Pada rodensia, Pb mempengaruhi pembelahan sel dari embrio umur beberapa hari setelah proses fertilisasi. Plumbum menghambat perkembangan blastocyst dan tropoblast. Pada saat implantasi blastocyst, kandungan hormon progesteron dan 17-oestrodial mengalami penurunan nyata ( $r=0,995$  dan  $r=0,993$ ) pada mencit yang diberi senyawa Pb organik (triethyl lead) (Hariono, 2008).

Tubuh manusia mempunyai beberapa mekanisme untuk bertahan terhadap radikal bebas dan ROS lainnya. Pertahanan yang bervariasi saling melengkapi satu dengan yang lain karena bekerja pada oksidan yang berbeda atau dalam bagian seluler yang berbeda (Tuminah, 2000). Secara umum pengertian antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkal atau meredam efek negatif oksidan dalam tubuh, bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktifitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat (Winarsi, 2007).

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi dalam bidang medis mengalami perkembangan yang pesat. Salah satu perkembangan itu adalah penemuan metode terapi pengobatan dengan *stem cell*. Penggunaan *stem cell* memiliki potensi yang sangat menjanjikan dalam mengobati penyakit yang tidak dapat disembuhkan dengan menggunakan metode pengobatan konvensional. Kerusakan pada plasenta akibat paparan *plumbum* bersifat *irreversibel*, sehingga terapi menggunakan obat-obatan konvensional hanya mampu memperlambat atau mencegah kerusakan jaringan yang lebih luas. Satu-satunya cara yang harus ditempuh dalam memperbaiki kerusakan tersebut dengan mengganti komponen sel atau jaringan yang rusak dengan yang baru (Budianto, 2014). Terapi dengan menggunakan *stem cell* memiliki kemampuan untuk menyembuhkan penyakit dengan mengganti komponen sel yang rusak (Halim dkk, 2010). Sehingga dengan pemikiran inilah diharapkan *stem cell* dapat mengembalikan fungsi jaringan plasenta yang rusak seperti semula, dengan cara mengganti komponen sel yang rusak.

Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efektivitas terapi *Hemopoetic Stem Cell* (HSC) terhadap mencit (*Mus musculus*) bunting yang dipapar *plumbum*, berupa penurunan jumlah sel tropoblas nekrosis dan penurunan densitas caspase-3 sehingga dapat diungkap potensi terapi tersebut terhadap gangguan plasentasi selama kebuntingan.

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apakah pemberian *Haemopoitik Stem Cell* (HSC) pada mencit (*Mus musculus*) yang dipapar *plumbum* dapat menurunkan jumlah sel nekrosis pada plasenta?
2. Apakah pemberian *Haemopoitik Stem Cell* (HSC) pada Mencit (*Mus musculus*) yang dipapar *plumbum* dapat menurunkan ekspresi Caspase-3 pada plasenta ?

## 1.3. Tujuan Penelitian

### 1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah:

Untuk mengetahui efektivitas pemberian *Haemopoitik Stem Cell* (HSC) terhadap mencit (*Mus musculus*) yang dipapar *plumbum* selama proses kebuntingan.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah:

1. Untuk membuktikan adanya penurunan jumlah sel trofoblas yang nekrosis pada plasenta mencit (*Mus musculus*) betina bunting akibat dipapar *plumbum* yang kemudian dilakukan pemberian *Haemopoitik Stem Cell* (HSC).
2. Untuk mengidentifikasi ekspresi Caspase-3 sebagai indikator apoptosis pada sel tropoblast plasenta mencit (*Mus musculus*) betina bunting akibat

dipapar *plumbum* yang kemudian dilakukan pemberian *Haemopoitik Stem Cell* (HSC).

#### **1.4. Manfaat Penelitian**

##### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

Manfaat teoritis pada penelitian ini adalah:

1. Hasil dari penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah akan proses apoptosis akibat paparan *plumbum* dan regenerasi jaringan pada mencit (*Mus musculus*) betina bunting yang kemudian diberikan HSC.
2. Penelitian ini merupakan penelitian awal pemberian HSC pada mencit (*Mus musculus*) betina bunting yang dipapar dengan *plumbum*.

##### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Manfaat praktis pada penelitian ini adalah:

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran akan efektivitas pemberian *Haemopoitik Stem Cell* (HSC) terhadap paparan *plumbum* pada mencit betina bunting.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran mengenai bahaya yang ditimbulkan akibat paparan *plumbum* selama masa kebuntingan.

## **BAB 2**

# **TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Mencit (*Mus musculus*)

Mencit (*Mus musculus*) merupakan salah satu jenis hewan yang banyak digunakan dalam penelitian yang menggunakan hewan (*experimental animal*), hal ini dikarenakan secara fungsional memiliki karakteristik yang paling baik untuk model hewan mamalia.

Mencit membutuhkan makanan setiap harinya sekitar 3-5g, faktor yang perlu diperhatikan dalam memberi makanan kepada mencit diantaranya yaitu kualitas pakan bahan pangan terutama daya cerna dan palatabilitas. Hal ini dikarenakan kualitas makanan mencit akan berpengaruh terhadap kondisi mencit secara keseluruhan diantaranya kemampuan untuk tumbuh dan berkembang biak ataupun perlakuan terhadap pengobatan (Achlis, 2013 dikutip dari Alvernita, 2011).

Mencit digolongkan ke dalam ordo Rodensia (hewan pengerat), famili Muridae dari kelompok mamalia (hewan menyusui). Ordo rodensia merupakan ordo dari kelas mamalia yang terbesar yaitu 40% dari 5000 spesies mamalia. Mencit memiliki kemampuan menyesuaikan diri yang baik dengan lingkungannya, baik saat cuaca dingin maupun panas. Adapun klasifikasi Mencit (*Mus musculus*) dapat dilihat pada tabel 2.1 berikut :

**Tabel 2.1.** Klasifikasi Mencit (*Mus musculus*)

<b>TAKSONOMI</b>	
Kingdom	Animalia
Phylum	Chordata
Sub phylum	Vertebrata
Class	Mammalia
Ordo	Rodentia
Family	Muridae
Subfamili	Murinae
Genus	Mus
Species	<i>Mus musculus</i>

Sumber: [www.mjumani.com](http://www.mjumani.com)

### 2.1.1 Sistem Reproduksi Mencit (*Mus musculus*)

Mencit merupakan salah satu hewan coba yang paling sering digunakan dalam mempelajari fisiologi reproduksi. Salah satu keuntungan menggunakan tikus dibandingkan dengan hewan coba lain seperti domba dan monyet adalah telah diketahui fisiologi reproduksinya secara lengkap. Mencit memiliki siklus reproduksi yang lebih singkat dibandingkan dengan hewan besar lainnya. Tahap-tahap seperti pubertas, siklus birahi, fase luteal dan ovulasi yang spontan ketika mencit menerima rangsangan telah diketahui secara lengkap akan proses fisiologis reproduksinya. Hal inilah merupakan keuntungan lain penggunaan hewan coba mencit sebagai model percobaan reproduksi pada mamalia.

Mencit memiliki kemampuan untuk hidup selama 2,5 – 3 tahun. Mencit tergolong hewan menyusui yang dapat dikawinkan pada umur 8 minggu dengan lama kebuntingan antara 18 – 20 hari. Masa reproduksinya antara 2-14 bulan dan

memiliki masa estrus 4-5 hari. Siklus estrus biasanya dimulai mencit umur 6-7 minggu (Fajarwati, 2012 yang dikutip dari Taylor, 1986). Mencit rata-rata melahirkan pada umur kebuntingan 19 hari dengan rata-rata jumlah anak 10 ekor dan menyusui anaknya selama 21 hari (Fajarwati, 2012 yang dikutip dari Rugh, 1986).

Anak mencit yang baru lahir pada tubuhnya belum mempunyai bulu dengan mata dan telinga masih dalam keadaan tertutup. Rambut terlihat setelah berumur 2-3 hari yang disertai dengan membukanya telinga, tetapi matanya baru terbuka setelah umur 14 hari. Mencit jantan lebih agresif dengan perawakan yang lebih besar dan *glandulla mammae* yang tidak berkembang, sedangkan pada mencit betina *glandulla mammae* berkembang dengan papilla mammae berjumlah 5 pasang yaitu 3 pasang pada dada dan 2 pasang pada abdominal (Fajarwati, 2012 yang dikutip dari Rugh, 1968).

Siklus birahi pada mencit dapat dibagi menjadi 4 stadium yaitu proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Proestrus adalah stadium awal proses birahi ditandai dengan involusi fungsional korpus luteum serta pembengkakan folikel praovulasi. Epitel berinti besar bulat berbentuk sel teratur. Stadium estrus merupakan periode birahi dan kopulasi dimungkinkan hanya pada saat ini. Kondisi ini berakhir 9 sampai 15 jam. Pengaruh FSH menimbulkan folikel pada ovarium tumbuh cepat. Periode ini juga merupakan periode sekresi estrogen. Selama masa estrus ovulasi terjadi ditandai dengan perubahan histologi yang menunjukkan adanya luteinisasi awal. Sel berkornifikasi penuh, bentuk tidak teratur. Inti sel mengecil. Metestrus adalah stadium terjadi setelah ovulasi dan

merupakan saat antara estrus dan diestrus. Periode ini berakhir 10 sampai 14 jam dan biasanya kopulasi tidak terjadi. Ovarium mengandung korpus luteum dan folikel kecil. Sel epitel kornifikasi tampak adanya leukosit. Diestrus berakhir 60 sampai 70 jam, apabila pada siklus ini mencit tidak bunting karena oosit tidak dibuahi oleh spermatozoa, maka mati dan diabsorpsi oleh endometrium (Fajarwati., 2012).

### 2.1.2 Plasentasi

Mencit (*Mus Musculus*) memiliki tipe plasenta *discoidalis* dan interaksi fisik antara fetus dan jaringan induk dibatasi oleh area yang sirkuler (Maeda *et al*, 2000). Secara mikroskopis, mencit (*Mus musculus*) menunjukkan tipe plasenta *hemochorial* (darah induk berhubungan dengan chorion), dimana trofoblast menginvasi jaringan induk sehingga pembuluh darah induk tidak tampak (Maeda *et al*, 2000), dengan kata lain trofoblas mengadakan kontak langsung dengan darah induk. Mencit mempunyai dua struktur plasenta yaitu, *choriovitelline placenta* dan *chorioallantoic placenta*. *Choriovitelline placenta* terdiri dari sel trofoblas yang melekat pada dasar membran, yang berhubungan dengan desidua kapsularis. Plasenta ini akan mengalami degenerasi dan menghilang pada kebuntingan hari ke-14. *Chorioallantoic placenta*, yang bertempat pada region mesometrial dari uterus, berkembang sebelum terjadinya degenerasi *Choriovitelline placenta*. *Chorioallantoic placenta* terdiri dari dua daerah yang menonjol yang disebut zona *junction* dan labirin. Zona labirin terdiri dari sel trofoblas, saluran vaskular maternal dan pembuluh darah fetus yang bersandingan

dengan embrio. Beberapa trofoblas yang berdiferensiasi diobservasi pada bagian *junction* dan labirin (Budianto, 2014 yang dikutip dari Maeda *et al*, 2000).

Plasenta memiliki peranan berupa transport zat dari induk ke fetus, penghasil hormon yang penting selama kebuntingan serta sebagai *barrier* terhadap masuknya benda asing ke dalam aliran darah fetus. Melihat pentingnya peranan dari plasenta, bila terjadi kelainan pada plasenta akan menyebabkan kelainan pada fetus ataupun mengganggu proses partus. Proses pembentukan plasenta dimulai setelah terjadinya fertilisasi ovum oleh spermatozoa dan sel yang dihasilkan tersebut disebut zigot. Fertilisasi ini terjadi di dalam ampula tuba falopii dan *fertilized ovum* dalam bentuk *blastocyst*/blastokista akan menuju cavum uteri untuk kemudian tertanam dalam endometrium (nidasi). Nidasi atau implantasi ini biasanya terjadi pada daerah kornua uteri. Saat implantasi blastokista ini terjadi kira-kira 6-7 hari setelah ovulasi (Rahardjo, 2006).

Pada awal implantasi, *blastocyst* akan mengadakan kontak dengan endometrium, yang kemudian dikelilingi oleh lapisan terluar sinsitiotrofoblas yang merupakan massa sel multinukleat yang tidak dapat dilihat tepiannya, serta dikelilingi sebuah lapisan dalam dari sel individual, sitotrofoblas. Sinsitiotrofoblas akan mengikis endometrium, kemudian blastosit akan melakukan implantasi. Sirkulasi plasenta kemudian dibentuk dan fungsi dari trofoblas tetap berlangsung. Blastosit pada kebanyakan spesies mammalia kurang lebih enam sampai tujuh hari diikuti fertilisasi. Pada tahap ini, diferensiasi jaringan embrionik dan ekstraembrionik (trofoblastik) akan tampak. Jaringan trofoblastik akan berdiferensiasi menjadi sitotrofoblas dan sel sinsitiotropoblast. Sel

sinsitiotropoblast memproduksi *chorionic gonadotropin*, *chorionic growth hormones*, *placental lactogen*, estrogen, dan progesteron, yang dibutuhkan dalam menjaga kebuntingan (Budianto, 2013 yang dikutip dari Foster *et al.*, 2012).

Proliferasi yang cepat dari sitotrofoblas berfungsi sebagai jangkar (*anchor*) pertumbuhan plasenta pada jaringan maternal. Perkembangan plasenta terdiri atas proliferasi trofoblas, yang akan mengekspansi secara cepat dan menginfiltrasi saluran vaskuler induk. Setelah implantasi, sinsitiotrofoblas akan terkena (*bathed*) darah vena induk, dimana darah tersebut mensuplai nutrisi dan pertukaran gas. Nutrisi histotropik melibatkan sirkulasi *yolk sac* dan nutrisi *hemotropic* melibatkan plasenta. Sirkulasi plasenta terbentuk lebih awal pada wanita dan primata serta relatif lebih akhir pada hewan rodensia dan kelinci. Salah satu perbedaan besar pada fungsi plasenta sebagai endokrin antara manusia dan rodensia adalah dalam hal produksi dan regulasi hormon progesteron yang dibutuhkan untuk menjaga kebuntingan. Pada hewan rodensia, *corpus luteum* pada ovarium memproduksi progesteron selama kebuntingan dan pada awalnya diregulasi oleh sekresi *prolaktin pituitary* dan pada pertengahan masa kebuntingan produksi *placental lactogens* dilakukan oleh trofoblas. Pada manusia kelenjar hipofisis tidak diperlukan untuk menginisiasi dan menjaga kebuntingan. Pada manusia hal tersebut bergantung pada proses penjagaan kebuntingan yang dilakukan oleh *corpus luteum* untuk memproduksi *dependent* progesteron yang akan mempengaruhi trofoblas untuk mensekresikan hormon *human chorionic gonadotrophin* (hCG) (Foster *et al.*, 2012).

Massa padat sel-sel di salah satu kutub blastokista yang disebut massa sel dalam (*inner cell mass*) adalah cikal bakal mudigah yang nantinya akan menjadi embrio sedangkan massa diluar akan menjadi trofoblas. Zona pelusida menghilang dan blastokista menyentuh permukaan endometrium sebelum berimplantasi. Pada saat aposisi ini blastokista terdiri dari 107 sampai 256 sel. Setelah terjadi erosi ringan pada sel-sel epitel permukaan endometrium, trofoblas akan terbenam di dalam endometrium dan blastokista seluruhnya berada di dalam endometrium (Rahardjo, 2006).

Perkembangan plasenta terjadi karena terbenamnya blastokista dalam endometrium. Trofoblas yang terbagi menjadi dua yaitu sitotrofoblas dan sintiotrofoblas. Kemudian dari permukaan sel trofoblast ini tumbuh *epitelial cord* yang meliputi seluruh permukaan blastokista dan tonjolan ini disebut *primary (primitif vili)*. Selanjutnya ke dalam *primary vili* ini masuk jaringan ikat embrio sehingga terbentuk *chorion*. Kemudian timbul jaringan ikat yang membawa pembuluh darah masuk ke dalam vili tersebut sehingga terbentuk *secondary chorionic vili* (Rahardjo, 2006).

Sel-sel trofoblas merupakan bagian penyusun plasenta yang terdiri dari berbagai tipe sel hasil differensiasinya. Sel trofoblas pertama kali berdiferensiasi menjadi sitotrofoblas, lalu sitotrofoblas berfusi dengan sesamanya membentuk sinsitiotrofoblas. Selain itu sitotrofoblas juga berdiferensiasi menjadi spongiotrofoblas. Pada manusia dan mencit, pada akhir kebuntingan sel-sel trofoblas berdiferensiasi menjadi sel-sel glikogen yang berperan sebagai penyimpanan energi (Hashash *et a.*, 2004).

Sel-sel trofoblas secara morfologi memiliki berbagai variasi bentuk, sitotrofoblas misalnya memiliki satu nukleus. Sel sitotrofoblas ini bersifat invasif dan proliferasif. Sedangkan sinsitiotrofoblas memiliki satu atau lebih nukleus dengan nukleolus di dalamnya yang banyak. Sel ini bersifat invasif tetapi tak proliferasif (Parast *et al.*, 2009). *Trophoblast Giant Cell* (TGC) berfungsi memelihara kebuntingan. Sel ini mengekskresi hormon-hormon selama periode kebuntingan, TGC juga berperan dalam pembentukan pembuluh darah antara maternal dan fetus pada bagian labirin. Susunan plasenta secara normal secara berurutan terdiri dari *metrial triangel* (MT), lapisan decidua basalis, lapisan *trophoblasts giant cell*, lapisan spongiotrofoblas, dan labirin. *Metrial triangel* dan decidua basalis merupakan tempat bertemunya uterus dengan plasenta. Lapisan spongiotrofoblas atau *Junction zone*, tersusun oleh sel dengan inti poliploid yang menandakan bahwa sel-sel pada lapisan spongiotrofoblas mengalami post-mitosis (Watson and Cross, 2005).

Lapisan labirin merupakan tempat bertemunya pembuluh darah maternal dan fetus, pada bagian lapisan ini tersusun dari sel sinsitiotrofoblas, mononuklear trofoblas, serta endotel pembuluh darah maternal dan fetal. Sel sinsitiotrofoblas berperan dalam transport nutrisi dan tersebar pada bagian labirin. Sel sinsitiotrofoblas memiliki inti sel *multiple* diploid. Pembuluh darah fetus ditandai dengan adanya sel darah merah yang berinti (*nucleated red blood cell*) dan pembuluh darah maternal ditandai dengan sel darah merah yang tidak berinti (Watson and Cross, 2005)

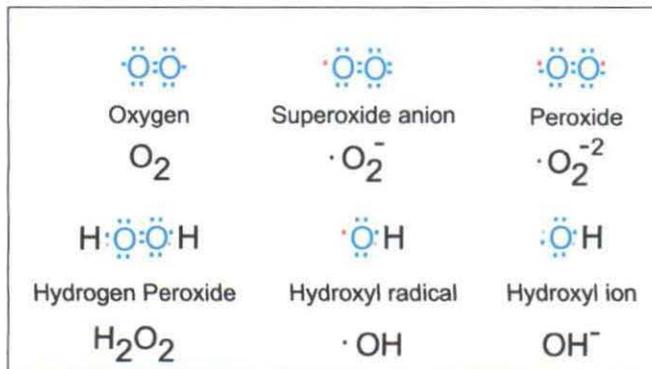
Plasenta mencit memiliki tiga lapisan trofoblas pada bagian maternal sebelum nutrisi memasuki sirkulasi darah fetus, lapisan darah fetus dilapisi oleh dua lapisan sel trofoblas (sinsitiotrofoblas) dan pada lapisan maternal terdapat lapisan mononuklear trofoblas, sehingga nutrisi, gas dan produk sisa metabolisme harus melalui lapisan tersebut untuk dapat bertukar antara fetus dan induk atau sebaliknya (Watson and Cross, 2005).

## 2.2 Radikal Bebas

Reaktif Oksigen Spesies merupakan istilah yang digunakan untuk mendeskripsikan sejumlah molekul reaktif dan radikal bebas yang berasal dari molekul oksigen. Oksigen yang dihasilkan dari radikal bebas merupakan musuh utama bagi organisme aerobik. Molekul tersebut diproduksi sebagai hasil sampingan (*by product*) saat transport elektron mitokondrial dari respirasi aerobik atau akibat enzim oksidoreduktase dan oksidasi katalase logam yang memiliki potensial menyebabkan kerusakan. Hampir seluruh reaktif oksigen terbentuk sebagai hasil sampingan pada saat transport elektron mitokondrial. Atom oksigen memiliki dua elektron yang tidak berpasangan dalam orbit yang berbeda pada bagian terluar dari kulit atom. Struktur elektron ini membuat oksigen sangat peka terhadap terbentuknya radikal bebas (Hancock *et al.*, 2001; Held, 2012).

Radikal bebas terpenting dalam tubuh adalah radikal derivat dari oksigen yang disebut kelompok oksigen reaktif (*reactive oxygen species/ROS*), termasuk didalamnya adalah triplet ( $3O_2$ ), tunggal (singlet/ $^1O_2$ ), anion superoksida ( $O_2^-$ ), radikal hidroksil ( $-OH$ ), nitrit oksida ( $NO^-$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ), asam hipoklorus ( $HOCl$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), radikal alkoxy ( $LO^-$ ), dan radikal

peroksil ( $LO_2$ ). Stress oksidatif (*oxidative stress*) merupakan suatu keadaan dimana tingkat oksigen reaktif intermediate (ROI) yang toksik melebihi pertahanan anti-oksidan endogen. Keadaan ini mengakibatkan kelebihan radikal bebas, yang akan bereaksi dengan lemak, protein, asam nukleat seluler, sehingga terjadi kerusakan lokal dan disfungsi organ tertentu. Lemak merupakan biomolekul yang rentan terhadap serangan radikal bebas (Arif, 2005).



**Gambar 2.2.** Struktur Elektron dari berbagai jenis *Reactive Oxygen Spesies*. Tanda • menunjukkan elektron yang tidak berpasangan. Sumber: Held, 2012 yang dikutip oleh Budianto., 2014

Kerusakan pada membran dan organel sel dapat terjadi dengan berbagai macam cara. Salah satu yang paling umum dan penting adalah kerusakan akibat radikal bebas. Radikal bebas merupakan molekul yang tidak memiliki pasangan elektron. Molekul tersebut sangat reaktif, dihasilkan oleh metabolisme sampingan oksidatif normal, atau yang disebabkan oleh radiasi, gas beracun, bahan kimia, dan beberapa bahan obat. Kebanyakan reaktif oksigen merupakan radikal tetapi tidak semuanya. Komponen selular yang sangat rentan terhadap radikal bebas termasuk protein, membran lipid dan asam nukleat (Myers and McGavin, 2007).

Kerusakan akibat radikal bebas biasanya dikendalikan oleh antioksidan intraselular seperti superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase, vitamin

E dan C, walaupun kerusakan dapat menjadi lebih parah ketika sistem antioksidan tersebut tidak aktif. Aktifitas antioksidan yang kurang mengakibatkan kerusakan sel yang berat dan dapat terjadi nekrosis sebagai akibat terbentuknya radikal bebas (Myers and McGavin, 2007).

Radikal hidroksil dapat merusak tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel yaitu asam lemak, DNA, dan protein struktural maupun protein fungsional. Membran plasma maupun membran internal organel sel dapat rusak oleh senyawa toksik dan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid. Fosfolipid, glikolipid, yang merupakan komponen dari membran sel mengandung asam lemak tak jenuh (asam linoleat, linolenat, arakhidonat) sangat rawan terhadap serangan radikal terutama radikal hidroksil. Membran mitokondria dan mikrosom sangat sensitif terhadap peroksidasi lipid karena kandungan *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) pada fosfolipid membran sangat tinggi (Suryohudoyo, 2007).

Malondealdehid (MDA) adalah salah satu golongan aldehid yang dihasilkan akibat peroksidasi lipid PUFA yang mempunyai lebih banyak ikatan rangkap seperti asam oleat, asam arakhidonat, dan *decoxahecanoid* (DHA) membrane. Sehingga pengukuran MDA sering digunakan sebagai indikator peroksidasi lipid jaringan (McKee, 2003). Senyawa Malondealdehid (MDA) pada keadaan normal dioksidasi secara cepat menjadi asetat atau malonat dan melalui siklus krebs diubah menjadi karbondioksida. Malondealdehid (MDA) dapat berikatan dengan asam amino bebas sehingga terjadi modifikasi protein yang akan menjadi antigen yang selanjutnya menjadi autoantibodi. Malondealdehid (MDA)

dapat berikatan dan berpolimerisasi dengan komponen membran sel dan membran organel sehingga merusak susunan dan fungsi membran seperti transport ion, aktifitas enzim, dan kemampuan permukaan sel dalam menentukan agregasi. Keadaan ini bisa merusak integritas sel dan jaringan karena Malondealdehid (MDA) dapat berdifusi maka akan bereaksi dengan basa nitrogen dari DNA sehingga Malondealdehid (MDA) mempunyai efek mutagenik, genotoksik, dan karsinogenik (Dachlan dkk., 2011).

Jumlah paparan polutan sangat mempengaruhi ROS, paparan dalam jumlah yang kecil akan berpengaruh pada aktivasi ROS dan juga respon antioksidan, seperti transkripsi enzim yang sangat penting dalam proses detoksifikasi, sitoprotektif, dan beberapa respon antioksidan lainnya (Revell, 2006; Hargiyanto, 2012). Paparan yang tinggi akan berpengaruh pada aktivasi dari transkripsi NF- $\kappa$ B dan respon protein-1, dan dimulailah proses signaling NF- $\kappa$ B dan aktivasi mitogen-protein kinase yang mana akan mengubah fungsi mitokondria atau NADPH dan meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-6 dan IL-8 dan gen yang mengkode adhesi molekul (Romieu *et al.*, 2007; Hargiyanto, 2012).

Jumlah paparan polutan sangat mempengaruhi ROS, paparan dalam jumlah yang kecil akan berpengaruh pada aktivasi ROS dan juga respon antioksidan, seperti transkripsi enzim yang sangat penting dalam proses detoksifikasi, sitoprotektif, dan beberapa respon antioksidan lainnya (Revell, 2006; Hargiyanto, 2012). Paparan yang tinggi akan berpengaruh pada aktivasi dari transkripsi NF- $\kappa$ B dan respon protein-1, dan dimulailah proses signaling

NF- $\kappa$ B dan aktivasi mitogen-protein kinase yang akan mengubah fungsi mitokondria atau NADPH dan meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-6 dan IL-8 dan gen yang mengkode adhesi molekul (Romieu *et al.*, 2007; Hargiyanto, 2012).

### 2.3 Nekrosis

Nekrosis merupakan salah satu pola dasar kematian sel. Nekrosis terjadi setelah suplai darah hilang atau setelah terpajan toksin dan ditandai dengan pembengkakan sel, denaturasi protein dan kerusakan organel. Hal ini dapat menyebabkan disfungsi berat jaringan (Kumar; Cotran & Robbins, 2007). Nekrosis adalah kematian sel dan kematian jaringan pada tubuh yang hidup. Nekrosis dapat dikenali karena sel atau jaringan menunjukkan perubahan-perubahan tertentu baik secara makroskopis maupun mikroskopis. Secara makroskopis jaringan nekrotik akan tampak keruh (*opaque*), tidak cerah lagi, berwarna putih abu-abu. Sedangkan secara mikroskopis, jaringan nekrotik seluruhnya berwarna kemerahan, tidak mengambil zat warna hematoksilin, sering pucat (Pringgoutomo, 2002).

Gambaran morfologik nekrosis merupakan hasil dari digesti enzimatik dan denaturasi protein yang terjadi secara bersamaan. Digesti enzimatik oleh enzimhidrolitik dapat berasal dari sel itu sendiri (*autolisis*) dapat juga berasal dari lisosom sel radang penginvasi (*heterolisis*) (Kumar; Cotran & Robbins, 2007).

Pada nekrosis, perubahan terutama terletak pada inti. Memiliki tiga pola, yaitu :

1. **Piknosis**

pengerutan inti, merupakan homogenisasi sitoplasma dan peningkatan eosinofil, DNA berkondensasi menjadi massa yang melisut padat.

2. **Karioreksis**

inti terfragmentasi (terbagi atas fragmen-fragmen) yang piknotik.

3. **Kariolisis**

pemudaran kromatin basofil akibat aktivitas DNase (Lestari, 2011).

Macam-macam nekrosis:

1. **Nekrosis koagulatif**

Terjadi akibat hilangnya secara mendadak fungsi sel yang disebabkan oleh hambatan kerja sebagian besar enzim. Enzim sitoplasmik hidrolitik juga dihambat sehingga tidak terjadi penghancuran sel (proses autolisis minimal). Akibatnya struktur jaringan yang mati masih dipertahankan, terutama pada tahap awal (Sarjadi, 2003).

Terjadi pada nekrosis iskemik akibat putusnya perbekalan darah. Daerah yang terkena menjadi padat, pucat dikelilingi oleh daerah yang hemoragik. Mikroskopik tampak inti-inti yang piknotik. Sesudah beberapa hari sisa-sisa inti menghilang, sitoplasma tampak berbutir, berwarna merah tua. Sampai beberapa minggu rangka sel masih dapat dilihat (Pringgoutomo, 2002). Contoh utama pada nekrosis koagulatif adalah

infark ginjal dengan keadaan sel yang tidak berinti, terkoagulasi dan asidofilik menetap sampai beberapa minggu (Kumar; Cotran & Robbins, 2007).

2. Nekrosis likuefaktif (*colliquativa*)

Perlunakan jaringan nekrotik disertai pencairan. Pencairan jaringan terjadi akibat kerja enzim hidrolitik yang dilepas oleh sel mati, seperti pada infark otak, atau akibat kerja lisosom dari sel radang seperti pada abses (Sarjadi, 2003).

3. Nekrosis kaseosa (sentral)

Bentuk campuran dari nekrosis koagulatif dan likuefaktif, yang makroskopik teraba lunak kenyal seperti keju, maka dari itu disebut nekrosis perkejuan. Infeksi bakteri tuberkulosis dapat menimbulkan nekrosis jenis ini (Sarjadi, 2003). Gambaran makroskopis putih, seperti keju didaerah nekrotik sentral. Gambaran mikroskopis, jaringan nekrotik tersusun atas debris granular amorf, tanpa struktur terlindungi dalam cincin inflamasi granulomatosa, arsitektur jaringan seluruhnya terobliterasi (tertutup) (Kumar; Cotran & Robbins, 2007).

4. Nekrosis lemak

Terjadi dalam dua bentuk:

a. Nekrosis lemak traumatik

Terjadi akibat trauma hebat pada daerah atau jaringan yang banyak mengandung lemak (Sarjadi, 2003).

#### b. Nekrosis lemak enzimatik

Merupakan komplikasi dari pankreatitis akut hemoragika, yang mengenai sel lemak di sekitar pankreas, omentum, sekitar dinding rongga abdomen. Lipolisis disebabkan oleh kerja lypolytic dan proteolytic pancreatic enzymes yang dilepas oleh sel pankreas yang rusak (Sarjadi, 2003).

Aktivasi enzim pankreatik mencairkan membran sel lemak dan menghidrolisis ester trigliserida yang terkandung didalamnya. Asam lemak yang dilepaskan bercampur dengan kalsium yang menghasilkan area putih seperti kapur (makroskopik) (Kumar; Cotran & Robbins, 2007).

#### 4. Nekrosis fibrinoid

Nekrosis ini terbatas pada pembuluh darah yang kecil, arteriol, dan glomeruli akibat penyakit autoimun atau hipertensi maligna. Tekanan yang tinggi akan menyebabkan nekrosis dinding pembuluh darah sehingga plasma masuk ke dalam lapisan media. Fibrin terdeposit disana. Pada pewarnaan hematoksilin eosin terlihat masa homogen kemerahan (Sarjadi, 2003).

Nekrosis dapat disebabkan oleh hal-hal sebagai berikut:

##### 1. Iskemia

Terjadi akibat anoksia (hambatan total pasokan oksigen) atau hipoksia seluler (kekurangan oksigen pada sel). Dapat disebabkan oleh berbagai hal seperti berikut ini (Sarjadi, 2003):

- a. Obstruksi aliran darah.
- b. Anemia (eritrosit pembawa oksigen berkurang jumlahnya).
- c. Keracunan karbon monoksida.
- d. Penurunan perfusi jaringan dari darah yang kaya oksigen.
- e. Oksigenasi darah yang buruk, sebagai akibat penyakit paru, obstruksi saluran nafas, konsentrasi oksigen udara yang rendah.

## 2. Agen biologik

Toksin bakteri dapat mengakibatkan kerusakan dinding pembuluh darah dan trombosis. Toksin biasanya berasal dari bakteri yang virulensinya tinggi baik endogen maupun eksogen. Virus dan parasit juga dapat mengeluarkan berbagai enzim dan toksin yang secara langsung maupun tidak langsung mempengaruhi jaringan dan menyebabkan nekrosis (Pringgoutomo, 2002).

## 2. Agen kimia

Natrium dan glukosa merupakan zat kimia yang berada dalam tubuh. Namun ketika konsentrasinya tinggi dapat menimbulkan nekrosis akibat gangguan keseimbangan osmotik sel. Beberapa zat tertentu dapat pula menimbulkan nekrosis ketika konsentrasinya rendah (Pringgoutomo, 2002)

Respon jaringan terhadap zat kimia berbeda. Misalnya, sel epitel pada tubulus ginjal dan sel beta pada pulau Langerhans mudah rusak oleh alloxan. Gas yang digunakan pada perang seperti mustard dapat merusak

jaringan paru, gas kloroform dapat merusak parenkim hati serta masih banyak lagi (Pringgoutomo, 2002).

#### 5. Agen fisik

Trauma, suhu yang ekstrim (panas maupun dingin), tenaga listrik, cahaya matahari, dan radiasi dapat menimbulkan kerusakan inti sehingga menyebabkan nekrosis (Pringgoutomo, 2002).

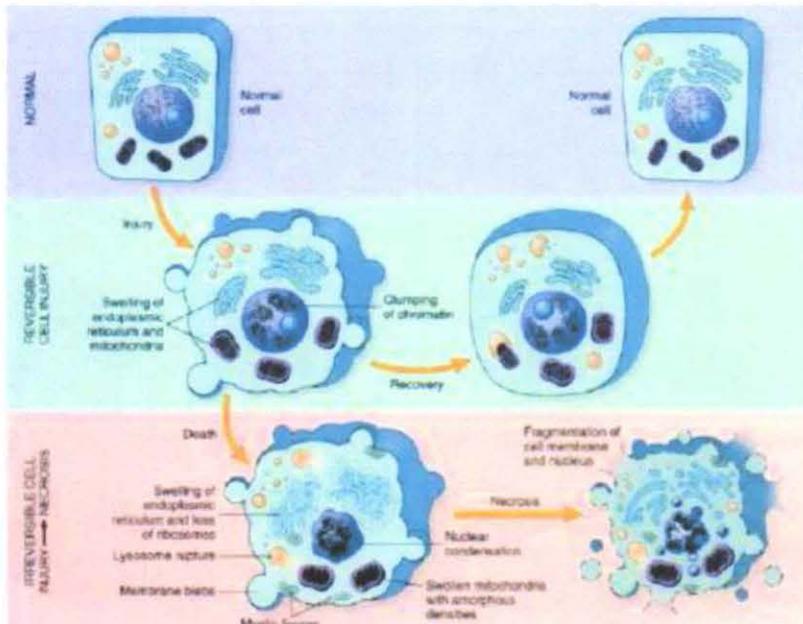
#### 6. Hipersensitivitas

Hipersensitivitas (kerentanan) pada seorang individu berbeda-beda. Kerentanan ini dapat timbul secara genetik maupun didapat (*acquired*) dan menimbulkan reaksi imunologik kemudian berakhir pada nekrosis. Sebagai contoh, seseorang yang hipersensitif terhadap obat sulfat ketika mengonsumsi obat sulfat dapat timbul nekrosis pada epitel tubulus ginjal (Pringgoutomo, 2002).

### 2.3.1 Mekanisme Nekrosis

Seperti yang dijelaskan sejak awal, nekrosis merupakan kematian sel akibat cedera (*jejas*) yang bersifat *irreversible*. Ketika sel mengalami gangguan, maka sel akan berusaha beradaptasi dengan jalan hipertrofi, hiperplasia, atrofi, dan metaplasia supaya dapat mengembalikan keseimbangan tubuh. Namun, ketika sel tidak mampu untuk beradaptasi, sel tersebut akan mengalami *jejas* atau cedera. *Jejas* tersebut dapat kembali dalam keadaan normal, apabila penyebab *jejas* hilang (*reversible*). Tetapi ketika *jejas* tersebut berlangsung secara kontinu, maka akan

terjadi jejas yang bersifat irreversible (tidak bisa kembali normal) dan selanjutnya akan terjadi kematian sel (Kumar; Cotran & Robbins, 2007).



**Gambar 2.3.** Mekanisme nekrosis. Sumber: Kumar *et al.*, 2007.

Mekanisme cedera secara biokimia adalah sebagai berikut:

### 1. Depleksi ATP

ATP penting bagi setiap proses yang terjadi dalam sel, seperti mempertahankan osmolaritas seluler, proses transport, sintesis protein, dan jalur metabolik dasar. Hilangnya sintesis ATP menyebabkan penutupan segera jalur homeostasis.

### 2. Deprivasi oksigen

Kekurangan oksigen mendasari patogenesis jejas sel pada iskemia.

### 3. Hilangnya homeostasis kalsium

Kalsium bebas sitosol normalnya dipertahankan oleh transpor kalsium yang bergantung pada ATP. Iskemia atau toksin menyebabkan

masuknya kalsium ekstrasel diikuti pelepasan kalsium dari deposit intrasel. Peningkatan kalsium sitosol akan mengaktivasi fosfolipase (pencetus kerusakan membran), protease (katabolisator protein membran dan struktural), ATPase (mempercepat deplesi ATP), dan endonuklease (pemecah materi genetik).

#### 4. Defek permeabilitas membran plasma

Membran plasma dapat langsung dirusak oleh toksin bakteri, virus, komponen komplemen, limfosit sitolitik, agen fisik maupun kimiawi. Perubahan permeabilitas membran dapat juga disebabkan oleh hilangnya sintesis ATP atau aktivasi fosfolipase yang dimediasi kalsium.

#### 5. Kerusakan mitokondria

Peningkatan kalsium sitosol, stress oksidatif intrasel dan produk pemecahan lipid menyebabkan pembentukan saluran membran mitokondria interna dengan kemampuan konduksi yang tinggi. Pori nonselektif ini memungkinkan gradien proton melintasi membran mitokondria sehingga mencegah pembentukan ATP.

### 2.4 Apoptosis

Apoptosis dan kematian sel yang terprogram (*programmed cell death*) merupakan istilah yang digunakan untuk mengartikan kematian sel dengan berbagai proses. Persamaan dari keduanya adalah inisiasi dari induksi kematian selnya sendiri. Walaupun masih banyak mekanisme seluler yang tumpang tindih, istilah *programmed cell death* dapat digunakan untuk kematian sel secara fisiologis yang terjadi pada perkembangan hewan (embriogenesis dan

pertumbuhan normal). Produksi keratin pada lapisan terluar dari kulit, melibatkan kematian sel yang terprogram. Untuk kejadian yang diakibatkan kematian sel secara patologis pertama kali yang terjadi adalah pengkerutan (*shrinkage*), istilah apoptosis atau apoptosis nekrosis sering digunakan. Apoptosis dapat terjadi pada berbagai situasi, termasuk infeksi penyakit viral, involusi kelenjar yang diikuti penyumbatan saluran kelenjar, kerusakan akibat immunologis yang disebabkan oleh sel T limfosit dan beberapa agen kimia dan obat-obatan (Myers and McGavin, 2007).

#### 2.4.1 Caspase-3

Caspase-3 dikenal juga sebagai CPP32/Yama/apopain (Alnemri *et al.*, 1994; Tewari *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 2008), secara khusus dibentuk dari zymogen 32 kDa yang membelah menjadi sub units 17 kDa dan 12 kDa. Ketika procaspase membelah pada residu tertentu, heterotetramer yang aktif akan membentuk struktur *12-stranded beta-sheet* yang dikelilingi *alpha-helices* yang unik menjadi caspase (Nicholson *et al.*, 1995; Stennicke *et al.*, 2000).

Caspase-3 memiliki banyak kesamaan karakteristik pada jenis protein caspase lainnya yang telah diketahui saat ini. Caspase 3 memiliki *activ site* yang terdiri dari residu sistein (Cys-163) dan residu histidine (His-121) yang menstabilkan ikatan peptida yang membelah urutan protein *carboxy-terminal* pada sisi asam aspartat (Harrington *et al.*, 2008). Protein caspase di dalam sel terdapat dalam bentuk zymogen, yang disebut procaspase, yang berada dalam bentuk inaktif hingga perubahan biokimia menyebabkan perubahan akibat aktivasi caspase. Setiap caspase memiliki subunit besar N-terminal kira-kira 20 kDa yang

disebut p20 dan sub unit kecil yang disebut p10 yang memiliki berat molekul berkisar 10 kda (Stennicke *et al.*, 2000).

Caspase-3 merupakan protein yang berinteraksi dengan protein caspase-8 dan caspase-9. Caspase-3 di kode oleh gen CASP3. Protein CASP 3 merupakan anggota dari famili the *cysteine-aspartic acid protease (caspase)* (Alnemri *et al.*, 1996). Aktifasi caspase memainkan peran yang penting pada tahap eksekusi sel apoptosis. Caspase eksis sebagai proenzim yang inaktif yang melakukan proses proteolitik pada residu aspartat untuk memproduksi dua sub unit, besar dan kecil yang terdimerisasi untuk membentuk enzim yang aktif. Protein akan membelah dan akan mengaktifai caspase-6 dan caspase-7, dan protein itu sendiri akan diproses dan diaktifasi oleh caspase-8, 9 dan 10 (National Center for Biotechnology Information, 2014).

Aktifasi caspase pada sel yang mengalami apoptosis dapat melalui dua cara yaitu, melalui jalur ekstrinsik (*death ligand*) dan melalui jalur intrinsik (mitokondria) (Stennicke *et al.*, 2000). Zymogen caspase-3 sangat dibutuhkan, apabila jika tidak diregulasi, aktifitas caspase akan membunuh sel tanpa pandang bulu (Ghavami *et al.*, 2009). Sebagai caspase eksekutor, zymogen caspase-3 tidak memiliki aktifitas hingga caspase-3 membelah akibat inisiator caspase yang memperoleh signal apoptosis (Boatright *et al.*, 2003).

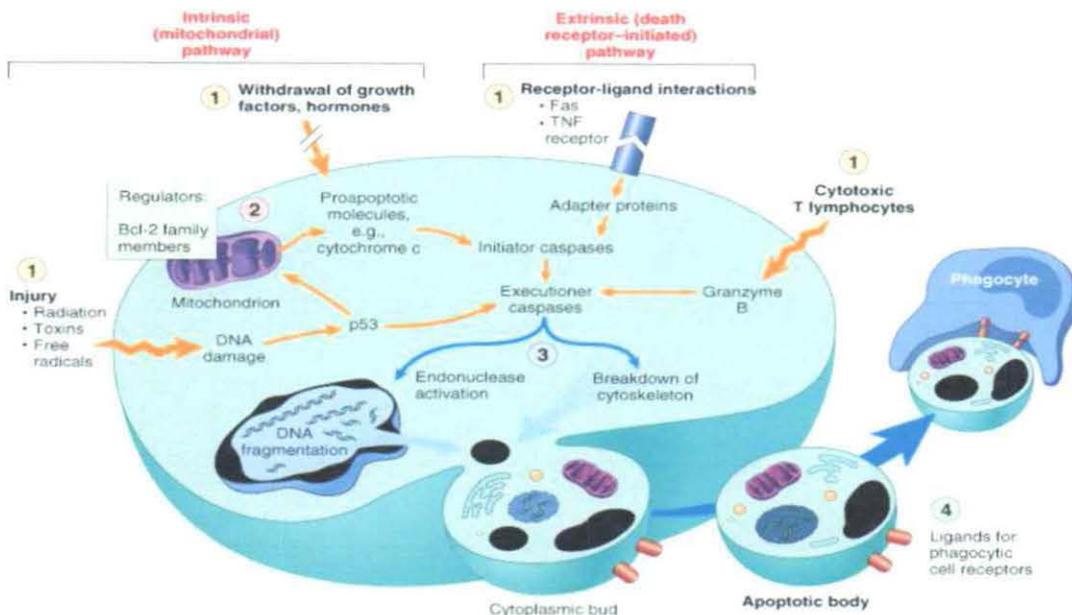
Caspase dapat dihambat melalui keluarga protein IAP (*inhibitor of apoptosis*), dimana termasuk c-IAP1, c-IAP2, XIAP, dan ML-IAP (Nicholson *et al.*, 1995). XIAP mengikat dan menghambat inisiator caspase-9, dimana secara langsung terlibat pada aktifasi eksekusi caspase-3 (Katunuma *et al.*, 2001). Pada

saat cascade caspase, walaupun fungsi caspase-3 dihambat oleh aktifitas XIAP dengan membelahnya caspase-9 pada tempat yang spesifik, mencegah XIAP untuk mengikat dan menghambat aktifitas caspase-9 (Moongkarndi *et al.*, 2010).

#### 2.4.2 Mekanisme Apoptosis

Mekanisme kematian sel yang terprogram atau apoptosis telah diteliti pada beberapa dekade terakhir ini. Berbagai macam stimulasi yang mengakibatkan kematian sel secara terprogram, secara genetik telah ditentukan, *energy-dependent sequence* dari kejadian molekuler yang melibatkan inisiasi dari signaling sel, kontrol dan integrasi oleh molekul regulator, merupakan fase eksekusi umum oleh famili caspase. Beberapa dari mekanisme diinisiasi oleh mediator inflamasi seperti TNF (*tumor nekrosis faktor*) dan fas Ligan (FasL). Dan mekanisme lainnya melibatkan pengurangan dari faktor pertumbuhan (*growth factor*), kerusakan mitokondrial, kerusakan DNA atau stimulasi Imun ( Budianto., 2014 yang dikutip dari Myers and McGavin., 2007).

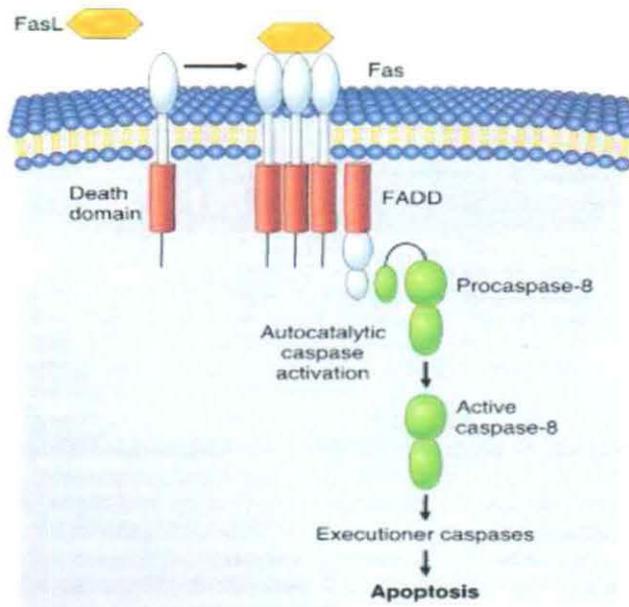
Proses apoptosis dibagi menjadi fase inisiasi dan fase eksekusi. Fase inisiasi terjadi pada saat caspase secara katalitik aktif (*catalytically active*). Fase eksekusi terjadi ketika enzim tersebut dapat bertindak menyebabkan kematian sel. Inisiasi apoptosis secara prinsipnya terjadi dikarenakan sinyal yang terbentuk dari dua jalur yang berbeda tetapi konvergen. Jalur ekstrinsik biasa disebut juga jalur reseptor yang diinisiasi dan jalur intrinsik disebut jalur mitokondria. Kedua jalur tersebut akan bertemu untuk mengaktifkan caspase (Myers and McGavin, 2007).



**Gambar 2.4.** Mekanisme apoptosis secara Instrinsik dan Ekstrinsik. Sumber: Budianto., 2014 yang dikutip dari Kumar *et al.*, 2005.

#### 2.4.2.1 Jalur Ekstrinsik (*Death Receptor-Initiated*)

Jalur ini diinisiasi oleh keterlibatan reseptor permukaan sel dari berbagai macam sel. Reseptor kematian (*death reseptor*) merupakan anggota dari famili reseptor TNF yang berisi sejumlah domain sitoplasmik yang terlibat di dalam interaksi protein yang disebut domain kematian (*death domain*), hal ini dibutuhkan untuk menyampaikan sinyal apoptosis. Beberapa reseptor famili TNF tidak memiliki domain kematian sitoplasmik, peran mereka dalam memacu apoptosis kurang diketahui. Reseptor kematian yang paling diketahui saat ini adalah tipe 1 TNFreseptor (TNFR1) dan protein yang berkaitan yang disebut Fas (CD95), tetapi beberapa jenis lainnya juga telah dideskripsikan mekanisme apoptosis yang diinduksi oleh reseptor kematian (*death reseptor*) dapat dilihat pada gambar dibawah ini (Myers and McGavin, 2007).



**Gambar 2.5.** Jalur Ekstrinsik (*death receptor-initiated*) apoptosis. Sumber: Budianto., 2014 yang dikutip dari Kumar *et al.*, 2005.

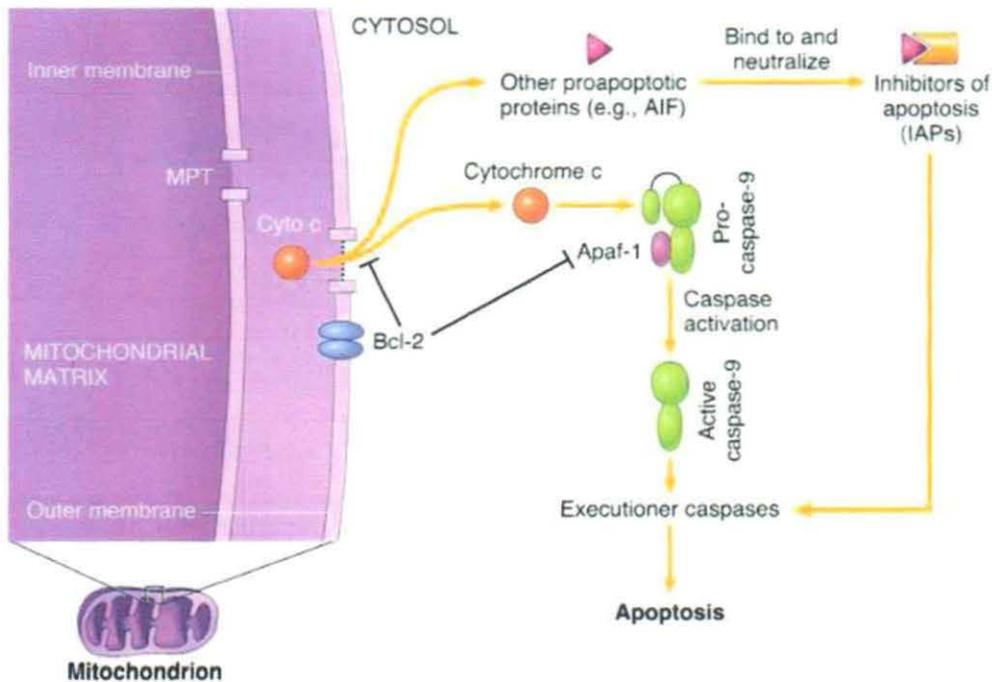
Ketika Fas menempel pada ligannya (pada gambar 2.4), membran akan mengikat FasL, tiga atau lebih molekul Fas akan bersatu dan sitoplasmik *death domain* akan membentuk tempat berikatan (*binding site*) untuk adapter protein yang juga memiliki *death domain*, yang disebut FADD (*Fas-associated death domain*). FADD akan menempel pada reseptor kematian, dimana akan mengikat bentuk tidak aktif dari caspase-8 (pada manusia caspase-10), melalui *death domain*. Beberapa molekul caspase-8 akan dibawa ke permukaan dan molekul tersebut antara satu dengan yang lainnya akan membelah (*cleavage*) dan mengaktifkan caspase lainnya. Dan enzim yang aktif akan memediasi fase eksekusi apoptosis (Myers and McGavin, 2007).

Jalur apoptosis ini dapat dihambat oleh protein yang disebut FLI<sub>p</sub>, dimana akan mengikat procaspase-8, sehingga tidak dapat membelah dan mengaktifasi enzim, dikarenakan kurangnya aktifitas enzimatik. Beberapa virus dan sel normal

memproduksi FLIP dan menggunakan ini sebagai inhibitor untuk melindungi sel yang terinfeksi dan sel normal dari apoptosis yang dimediasi FAS (Myers and McGavin, 2007).

#### **2.4.2.2 Jalur intrinsik**

Jalur apoptosis ini sebagai akibat dari peningkatan permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul pro-apoptosis ke dalam sitoplasma, tanpa peran dari *death receptor*. *Growth factor* dan sinyal survival lainnya menstimulasi produksi anggota anti-apoptosis keluarga Bcl-2. Famili ini dinamakan setelah Bcl-2, yang diidentifikasi sebagai onkogen pada B limfosit limphoma dan homolog terhadap *Caenorhabditis elegans* protein, Ced-9. Terdapat lebih dari 20 protein yang termasuk dalam famili ini, yang semua fungsinya untuk meregulasi apoptosis. Terdapat dua jenis utama anti-apoptosis, salah satunya adalah Bcl-2 dan Bcl-x. Protein anti apoptosis tersebut secara normal akan berada pada membran mitokondrial dan sitoplasma. Ketika sel berkurang dalam memberikan sinyal survival atau subjek dalam keadaan stress, Bcl-2 dan Bcl-x akan hilang dari membran mitokondrial dan digantikan oleh anggota pro-apoptotik, dari family Bax, Bak dan Bim. Ketika kadar Bcl-2/Bcl-x menurun, permeabilitas membran mitokondrial meningkat dan beberapa protein yang dapat mengaktifasi caspase akan keluar seperti pada gambar 2.5.



**Gambar 2.6.** Jalur Intrinsik (Mitokondrial) Apoptosis. Sumber: Budianto., 2014 yang dikutip dari Kumar *et al.*, 2005.

Salah satu protein tersebut adalah sitokrom c, yang dikenal akan perannya dalam respirasi mitokondrial. Di dalam sitosol, sitokrom c akan mengikat sebuah protein yang disebut Apaf-1 (*apoptosis activating factor-1*), kompleks tersebut akan mengaktifasikan caspase-9, Bcl-2 dan Bcl-x juga dapat secara langsung menghambat invasi Apaf dan ketiadaan mereka pada membran mitokondria secara otomatis akan mengizinkan aktifasi Apaf-1. Protein mitokondrial lainnya seperti *apoptosis inducing factor* (AIF), akan masuk ke dalam sitoplasma dan akan mengikat dan menetralsasi berbagai macam inhibitor apoptosis yang fungsi normalnya untuk memblok aktifasi caspase. Esensi dari jalur intrinsik adalah keseimbangan antara pro-apototik dan molekul protektif yang mengatur permeabilitas mitokondrial dan pelepasan induksi kematian (*death inducer*) yang secara normal terasing di dalam mitokondria. Banyak bukti yang menunjukkan

apoptosis dapat dipicu tanpa peran dari mitokondria. Apoptosis dapat diinisiasi oleh aktivasi caspase *upstream* mitokondria dan peningkatan permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul pro-apoptosis akan meningkatkan sinyal kematian. Walaupun demikian, jalur apoptosis ini melibatkan inisiasi *mitochondria-independent* yang masih belum dapat dijelaskan ( Budianto, 2014 yang dikutip dari Myers and McGavin, 2007).

Fase eksekusi merupakan fase akhir apoptosis yang dimediasi oleh proteolitik cascade, yang memiliki berbagai macam mekanisme inisiasi yang berbeda. Protease yang memediasi fase eksekusi sangat dilindungi antar lintas spesies dan termasuk ke dalam famili caspase, sebagai mana sebelumnya telah dijelaskan. Istilah caspase berdasarkan dua bagian dari jenis family enzim ini, “c” merujuk pada *acysteine protease* (enzim dengan sistein pada aktif *site*-nya) dan “aspase” yang merujuk pada kemampuan unik dari enzim tersebut untuk membelah sebagai bagian dari residu asam. Famili caspase sekarang memiliki lebih dari 10 anggota yang dapat dibagi secara fungsional menjadi dua grup dasar yaitu inisiator dan eksekutor, berdasarkan perintah dimana mereka aktif ketika apoptosis. Inisiator caspase termasuk caspase-8 dan caspase-9. Beberapa caspase seperti caspase-3 dan caspase-6 adalah eksekutor. Seperti protease lainya, keberadaan caspase terdapat dalam bentuk proenzim inaktif atau zymogen dan harus dilakukan aktivasi pembelahan agar apoptosis diinisiasi. Caspase memiliki tempat pembelahan sendiri yang dapat dihidrolasi tidak hanya oleh caspase lainnya tetap juga secara autokatalitik. Setelah inisiator caspase membelah untuk meregenerasikan menjadi bentuk yang aktif, program kematian enzimatik diatur

dalam gerakan cepat dan aktivasi berurutan caspase lainnya. Caspase eksekutor bertindak pada banyak komponen seluler. Mereka membelah sitoskeletal dan matriks nuklear protein dan juga mengganggu sitoskeletal dan menyebabkan kerusakan nukleus. Pada nukleus, target caspase yang aktif termasuk protein yang terlibat dalam transkripsi, replikasi DNA dan Repair DNA. Secara khusus, aktivasi caspase 3 akan mengkonversikan DNAase menjadi bentuk aktif dengan membelah. Inhibitor sebuah enzim DNAase menginduksi karakteristik pembelahan intranukleosomal DNA (Myers and McGavin, 2007).

## **2.5 Stem Cell**

Sel Punca atau *stem cell* adalah sel yang tidak/belum terspesialisasi dan mempunyai kemampuan/potensi untuk berkembang menjadi berbagai jenis sel-sel yang spesifik yang membentuk berbagai jaringan tubuh (Jusuf, 2008). Istilah *stem cell* mulai populer digunakan di dunia kedokteran sejak tahun 1950-an, yaitu sejak ditemukannya sel penyusun sumsum tulang yang mampu membentuk seluruh jenis sel darah dalam tubuh. Sesuai dengan kata yang menyusunnya (*stem* = batang; *cell* = sel), *stem cell* adalah sel yang menandai awal mula dari pertumbuhan sel lain yang menyusun keseluruhan tubuh organisme, termasuk manusia (Halim dkk., 2010).

### **2.5.1 Karakteristik Stem Cell**

*Stem cell* memiliki sejumlah karakteristik, antara lain:

1. **Undifferentiated** (belum berdiferensiasi). *Stem cell* merupakan sel yang belum memiliki bentuk dan fungsi spesifik seperti sel lainnya pada organ tubuh. Sel otot jantung (kardiomyosit), neuron dan sel  $\beta$  pankreas adalah jenis-jenis sel

tubuh yang memiliki bentuk dan fungsi yang spesifik. Berbeda dengan ketiga jenis sel tersebut, stem cell adalah sel yang belum memiliki fungsi khusus, seperti berdenyut, menghantarkan impuls, menghasilkan hormon ataupun fungsi lainnya. Bukti ilmiah bahkan menunjukkan bahwa populasi *stem cell* di dalam suatu jaringan dewasa tampak sebagai suatu populasi sel inaktif, yang fungsinya baru terlihat dalam waktu dan kondisi tertentu (Halim dkk., 2010).

2. ***Self renewal*** (mampu memperbanyak diri). *Stem cell* dapat melakukan replikasi dan menghasilkan sel-sel berkarakteristik sama dengan sel induknya. Kemampuan memperbanyak diri dan menghasilkan sel-sel yang sama seperti sel induknya ini tidak dimiliki oleh sel-sel tubuh lainnya seperti sel jantung, otak ataupun sel pankreas. Dengan demikian apabila terjadi kerusakan pada organ-organ tersebut, maka pada umumnya kerusakan tersebut bersifat *irreversible* (Halim dkk., 2010).

3. **Multipoten/Pluripoten** (dapat berdiferensiasi menjadi lebih dari satu jenis sel). Keberadaan *stem cell* yang belum berdiferensiasi ternyata dimaksudkan untuk menjaga kontinuitas regenerasi populasi sel yang menyusun jaringan dan organ tubuh. Hal ini dapat dilakukan dengan kemampuan stem cell untuk berdiferensiasi menjadi sel-sel tubuh yang dibutuhkan. Kemampuan stem cell dalam ber-diferensiasi juga dinilai lebih istimewa dibandingkan sel-sel lain yang jauh lebih matur, karena *stem cell* mampu berdiferensiasi menjadi lebih dari satu jenis sel tubuh. Hal ini berarti *stem cell* bersifat multipoten atau pluripoten bergantung pada jenis dari stem cell itu sendiri (Halim dkk., 2010).

Berdasarkan pada kemampuannya untuk berdifferensiasi stem cell dikelompokkan menjadi:

1. **Totipoten** yaitu *stem cell* yang dapat berdifferensiasi menjadi semua jenis sel. Yang termasuk dalam sel punca totipoten adalah zigot dan morula. Sel-sel ini merupakan sel embrionik awal yang mempunyai kemampuan untuk membentuk berbagai jenis sel termasuk sel-sel yang menyusun plasenta dan tali pusat. Karenanya sel punca kelompok ini mempunyai kemampuan untuk membentuk satu individu yang utuh.

2. **Pluripoten** yaitu *stem cell* yang dapat berdifferensiasi menjadi 3 lapisan germinal (ektoderm, mesoderm, dan endoderm) tetapi tidak dapat menjadi jaringan ekstraembrionik seperti plasenta dan tali pusat. Yang termasuk sel punca pluripoten adalah sel punca embrionik (*embryonic stem cells*).

3. **Multipoten** yaitu *stem cell* yang dapat berdifferensiasi menjadi berbagai jenis sel misalnya sel punca hemopoetik (*hemopoetic stem cells*) yang terdapat pada sumsum tulang yang mempunyai kemampuan untuk berdifferensiasi menjadi berbagai jenis sel yang terdapat di dalam darah seperti eritrosit, leukosit dan trombosit. Contoh lainnya adalah sel punca saraf (*neural stem cells*) yang mempunyai kemampuan berdifferensiasi menjadi sel saraf dan sel glia.

4. **Unipotent** yaitu *stem cell* yang hanya dapat berdifferensiasi menjadi satu jenis sel. Berbeda dengan non sel punca, sel punca mempunyai sifat masih dapat memperbaharui atau meregenerasi diri (*self-regenerate/self renew*). Contohnya *erythroid progenitor cells* hanya mampu berdifferensiasi menjadi sel darah merah (Jusuf, 2008).

### 2.5.2 Jenis-Jenis *Stem Cell*

Berdasarkan tingkat maturasi tubuh yang menjadi sumber keberadaannya, *stem cell* dibagi menjadi dua jenis (Halim dkk., 2010), yaitu:

a. ***Stem cell embrionik (embryonic stem cell)***

*Stem cell* embrionik adalah *stem cell* yang didapatkan saat perkembangan individu masih berada dalam tahap embrio. Lebih tepatnya, *stem cell* ini adalah massa sel dalam (*inner mass cell*) yang terdapat dalam tahap blastosis. Terbentuk dan akan mengimplantasikan dirinya ke dinding rahim. *Stem cell* embrionik merupakan awal dari seluruh jenis sel dalam tubuh manusia. *Stem cell* embrionik tergolong sebagai *stem cell* yang bersifat pluripotent dan keistimewaan *stem cell* embrionik ini yang sulit disaingi oleh *stem cell* jenis lain.

b. ***Stem cell dewasa (adult stem cell)***

*Stem cell* dewasa adalah *stem cell* yang ditemukan di antara sel-sel lain yang telah berdiferensiasi, dalam suatu jaringan yang telah mengalami maturasi. Dengan kata lain, *stem cell* dewasa adalah sekelompok sel yang belum berdiferensiasi, bahkan terkadang ditemukan dalam keadaan inaktif, pada suatu jaringan yang telah memiliki fungsi spesifik dalam tubuh individu. Keberadaan *stem cell* ini diperkirakan bertujuan untuk menjaga homeostasis jaringan tempatnya berada. Kemampuan diferensiasi *stem cell* dewasa tergolong multipotent. *Stem cell* dewasa memiliki kemampuan berdiferensiasi yang lebih rendah dibandingkan *stem cell* embrionik, yaitu hanya berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel yang umumnya tergolongan.

## 2.6 Mekanisme *Stem Cell* dalam Regenerasi

Sebagai sel yang diharapkan mampu memperbaiki fungsi jaringan/organ tubuh yang telah rusak, *stem cell* yang sebelumnya telah diisolasi dan mengalami sejumlah perlakuan di laboratorium. Akan ditransplantasikan dalam tubuh pasien yang membutuhkan. Secara garis besar, terdapat dua metode transplantasi *stem cell* ke dalam tubuh pasien yang membutuhkannya. Metode pertama adalah secara langsung mengimplantasikan *stem cell* tersebut ke dalam jaringan/organ tubuh pasien yang rusak. Metode kedua adalah mengimplantasikan *stem cell* melalui pembuluh darah, baik yang berada dekat dengan lokasi jaringan/ atau organ yang telah rusak, atau pembuluh darah manapun yang terdapat dalam tubuh penderita (Halim dkk., 2010).

### 2.6.1 *Homing*

*Homing* dalam teknologi stem cell berasal dari kata *home* yang berarti rumah. Sekalipun bukan berasal dari kata kerja, namun penambahan akhiran *-ing* dalam *homing* memang dilakukan untuk mendefinisikan homing sebagai aktifitas stem cell untuk kembali ke rumahnya, yaitu jaringan yang rusak dan hendak diperbaiki. Sejumlah faktor memegang peranan penting untuk membantu keberlangsungan proses *homing* ini. Aktifitas *stem cell*, pada jaringan tubuh yang rusak dipengaruhi oleh adanya protein spesifik yang dilepaskan oleh sel-sel tubuh yang rusak sebagai bentuk komunikasi seluler. Protein ini bersifat kemoatraktif, sehingga mampu menarik stem cell yang berada di peredaran darah, untuk menuju ke arah proteinnya (Halim dkk., 2010).

Dalam kaitanya dengan konsep *homing*, kemampuan *stem cell* dalam merespons sinyal seluler sel-sel yang mengalami kerusakan dapat dimanfaatkan untuk mengoptimalkan aplikasi klinis terapi *stem cell*. Saat ini, bukti juga telah ada yang menjelaskan bahwa efisiensi *homing stem cell* pada transplantasi dipengaruhi oleh usia individu resipien. Riset yang dilakukan menggunakan mencit muda berusia enam sampai dengan delapan minggu dibandingkan dengan mencit tua berusia di atas delapan minggu menunjukkan bahwa efisiensi *homing stem cell* hematopoietik pada mencit yang muda tiga kali lipat lebih baik dibandingkan pada mencit yang berumur tua (Halim dkk., 2010).

**BAB 3**  
**KERANGKA KONSEPTUAL DAN**  
**HIPOTESIS PENELITIAN**

## BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL dan HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1. Kerangka Konseptual

Masuknya paparan *plumbum* dapat berpengaruh terhadap fetus melalui beberapa mekanisme diantaranya, secara langsung masuk ke dalam plasenta melalui aliran darah sehingga menyebabkan perubahan fungsi pada plasenta dan secara tidak langsung melalui sitokin inflamasi yang masuk ke dalam aliran darah (Hougraad *et al.*, 2008). Pada saat kebuntingan aliran darah uteroplasenta akan meningkat, sehingga banyak pula *plumbum* dan sitokin yang dikeluarkan oleh sel-sel radang yang masuk ke dalam plasenta.

Pada saat *plumbum* masuk ke dalam tubuh, tubuh akan melakukan mekanisme pertahanan dalam bentuk peningkatan produksi sitokin proinflamasi oleh sel-sel radang. *Plumbum* dapat menembus membran sel, *plumbum* yang masuk ke dalam sel dapat menginduksi terbentuknya ROS. Terbentuknya ROS pada sel trofoblas akibat interaksi antara Pb dengan ion besi (Fe) akan menyebabkan rusaknya membran mitokondria dan sel kehilangan energi. Rusaknya membran mitokondria membuat *cytochrome-c* lepas menuju sitoplasma. Pelepasan *cytochrome-c* dari mitokondria melalui porus yang dibentuk oleh *Mitochondrial Permeability Transition Pore* (PTP) dan protein pro-apoptosis Bax. Asosiasi antara Bax dan PTP dalam pembentukan porus dicegah oleh protein anti-apoptosis Bcl-2 (Mudjahid, 2011). Pelepasan *cytochrome-c* mitokondria ke dalam sitoplasma akan berinteraksi dengan *Apaf-1* dan membentuk kompleks yang disebut '*apoptosome*'. Apoptosome direkrut dan mengaktifkan caspase-9 dan

nantinya akan menginduksi aktivasi Caspase-3. Aktivasi caspase tersebut akan menyebabkan fragmentasi DNA dalam sel dan kemudian sel tersebut mengalami (Apoptosis).

Rusaknya membran mitokondria dan sel kehilangan energi menyebabkan disfungsi pompa Natrium dan Kalium yang mengakibatkan tekanan osmotik terganggu. Ketidakseimbangan ini mengakibatkan sel trofoblas mengalami pembengkakan (swelling) yang kemudian sel trofoblas mengalami degenerasi atau kerusakan sel (Nekrosis).

Terapi dengan pemberian HSC berfungsi untuk menurunkan sel trofoblas yang mengalami apoptosis dan menggantikan sel trofoblas yang mengalami kerusakan akibat induksi *Plumbum*. *Stem cell* yang diberikan melalui vena *coccygealis* akan menuju jaringan plasenta yang mengalami kerusakan. Jaringan plasenta yang mengalami kerusakan akan mengeluarkan senyawa kemokin yang akan menarik HSC untuk migrasi ke plasenta lalu akan berproliferasi, berdiferensiasi dan mengganti jaringan yang rusak. Sehingga nantinya diharapkan dapat meningkatkan persentase sel trofoblas yang normal pada perlakuan yang diberikan HSC.

*Hemopoitik Stem Cell* memiliki sifat immunosupresor. Sifat tersebut dikarenakan HSC mampu mengeluarkan sitokin yang dapat menekan sistim imun di dalam tubuh. Dengan kemampuan tersebut HSC akan mengurangi apoptosis pada sel trofoblas. Selain itu HSC mengurangi apoptosis secara intrinsik dengan cara menurunkan ekspresi protein Bax dan meningkatkan protein Bcl-2 di dalam

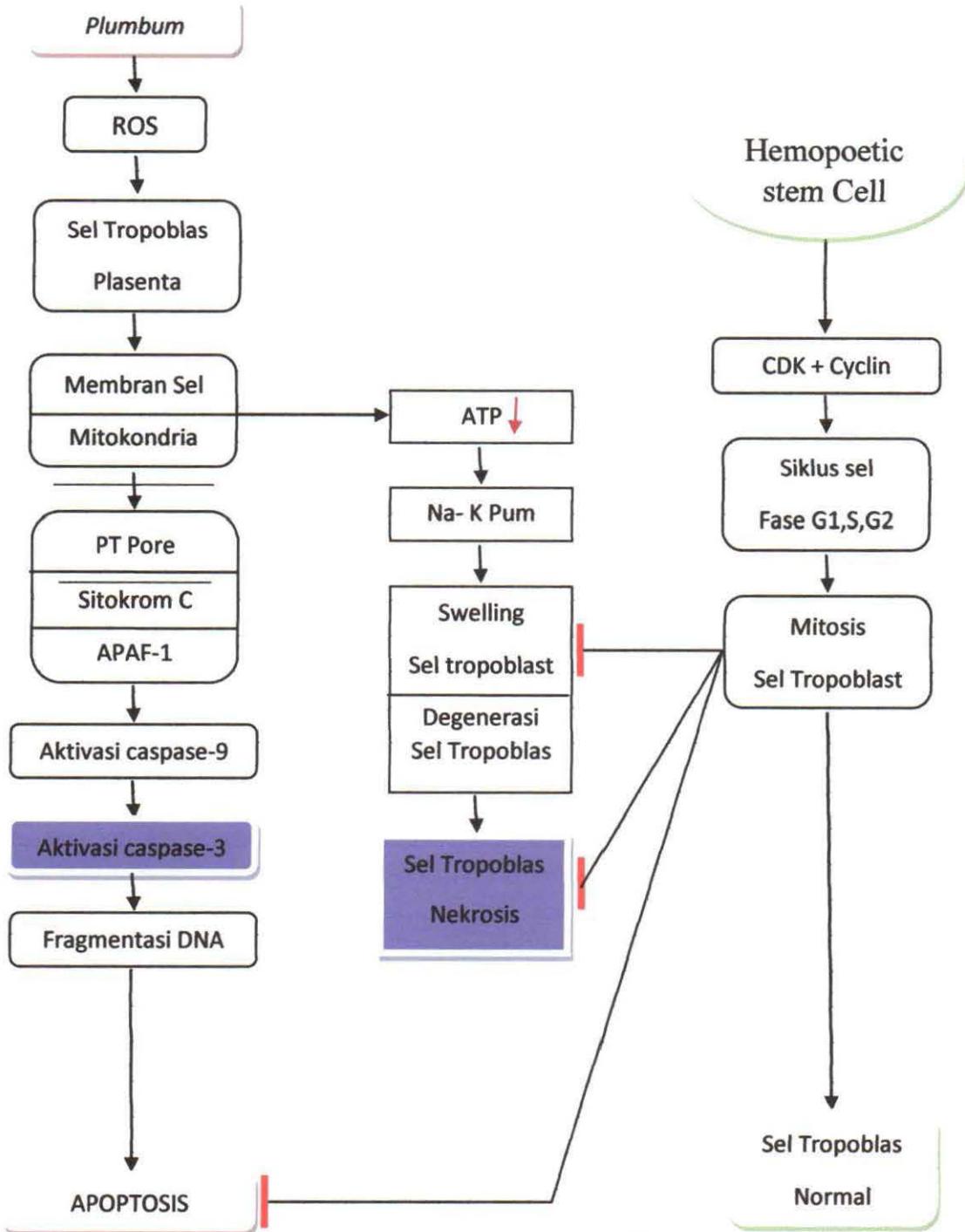
sel (Xiang *et al.*, 2009). Dengan adanya penurunan protein Bax di dalam sel trofoblas akan menurunkan ekspresi protein Caspase-3 pada sel trofoblas plasenta. Sehingga dengan terapi HSC apoptosis sel akan berkurang dan sel trofoblas yang normal akan meningkat. Stem cell secara umum perkembangannya diatur oleh CDK (Cyclic Dependent Kinase) yang bersama dengan cyclins sebagai pengatur pada saat siklus memasuki interphase (G1, S, G2). Fase G1 adalah dimana sel mengalami penambahan ukuran dan persiapan untuk sintesis DNA, sedangkan pada fase S ini DNA disintesis, kemudian pada fase G2 sel mengalami penambahan ukuran dan bersiap untuk mengalami pembelahan (Mitosis). Setelah sel mengalami pembelahan mitosis sel akan regenerasi menjadi sel trofoblas yang Normal (Barta., 2012).

### **3.2. Hipotesis Penelitian**

Berdasarkan kerangka konsep di atas, maka dapat ditarik hipotesis dari penelitian ini adalah:

1. Pemberian *Hemopoetic Stem Cell* (HSC) dapat menurunkan jumlah sel trofoblas nekrosis pada plasenta mencit (*Mus musculus*) yang dipapar *plumbum*.
2. Pemberian *Hemopoetic Stem Cell* (HSC) dapat menurunkan ekspresi Caspase-3 sel trofoblas pada plasenta mencit (*Mus musculus*) yang dipapar *plumbum*.

### Skema Kerangka Konseptual Penelitian



**Keterangan :**

- : Alur yang diteliti
- | : Hambatan
- █ : Parameter penelitian

**BAB 4**  
**MATERI DAN METODE**

## **BAB 4. MATERI DAN METODE**

### **4.1 Jenis Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian rancangan acak lengkap (RAL). Penelitian ini bersifat eksperimental laboratoris dengan asumsi semua populasi sama dan memiliki kriteria yang homogen serta karakteristik yang sama. Pengukuran awal tidak dilakukan karena asumsi semua kelompok berasal dari satu populasi dan objek yang diteliti adalah plasenta mencit yang telah dikorbankan.

### **4.2 Populasi, Sampel dan Besar Sampel**

#### **4.2.1 Populasi**

Populasi dalam penelitian ini menggunakan mencit (*Mus musculus*) betina sebanyak 40 ekor sebagai hewan coba. Adapun kriteria subjek penelitian yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) betina yang sehat, berusia 3 bulan dengan berat badan berkisar 20 gram -35 gram dengan tidak adanya bekas luka, bulu halus dan mengkilap, mata bersinar dan tidak pincang serta belum pernah digunakan sebagai hewan coba pada penelitian sebelumnya. Hewan coba yang telah memiliki kriteria tersebut kemudian dikawinkan dengan hewan jantan yang sehat yang juga memiliki kriteria yang sama.

Untuk membuntingkan mencit betina yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan 40 ekor mencit jantan berusia antara 5 bulan dengan berat berkisar antara 35-40 gram dan sudah mencapai dewasa kelamin.

#### 4.2.2 Sampel

Sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini sebanyak 40 ekor mencit betina dan 40 ekor mencit jantan (*Mus musculus*), masing-masing perlakuan menggunakan 10 ekor mencit jantan dan 10 ekor mencit betina dengan rincian perlakuan sebagai berikut ini:

- a. Kelompok perlakuan 1 (P1) : mencit bunting yang diberi Plumbum dosis 1/12 LD50 (54,42 mg/ml) selama kebuntingan hari ke 9-15.
- b. Kelompok perlakuan 2 (P2) : mencit bunting yang diberi Plumbum dosis 1/16 LD50 (40,75 mg/ml) selama kebuntingan hari ke 9-15.
- c. Kelompok perlakuan 3 (P3) : mencit bunting yang diberi Plumbum dosis 1/12 LD50 (54,42 mg/ml) selama kebuntingan hari ke 9-15 dan pada hari ke 9 diberikan *Hemopoetic Stem Cell*  $1 \times 10^7$  secara intra vena.
- d. Kelompok perlakuan 4 (P4) : mencit bunting yang diberi Plumbum dosis 1/16 LD50 (40,75 mg/ml) selama kebuntingan hari ke 9-15 dan pada hari ke 9 diberikan *Hemopoetic Stem Cell*  $1 \times 10^7$  secara intra vena.

#### 4.2.3 Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan empat perlakuan, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>. Maka besar sampel minimum yang digunakan untuk pengujian hipotesis ini menggunakan rumus:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$n \geq 6$$

$$\text{Faktor koreksi} \rightarrow \frac{1}{(1-f)} = \frac{1}{(1-0.2)} = 1.2$$

Simbol  $t$  adalah jenis perlakuan serta  $n$  adalah replikasinya (Kusningrum, 2008) dan  $f$  adalah proporsi unit eksperimen yang diperkirakan akan mati (Sudaryanti, 2010). Dengan menggunakan rumus tersebut diperoleh  $n$  sebanyak 4, sehingga replikasinya paling sedikit adalah 6 ekor mencit betina bunting (*Mus musculus*) pada setiap kelompok percobaan. Dengan menggunakan estimasi kematian hewan coba dalam penelitian ini sebesar 20 %, didapatkan faktor koreksi sebesar 1,2.

#### 4.2.4 Teknik Pengambilan Sampel

Pada penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap. Pengambilan sampel tiap perlakuan dilakukan dengan metode undian. Setiap hewan coba mencit betina diberikan tanda pada tubuh sesuai dengan nomor yang telah ditentukan. Setelah dilakukan penandaan, undian yang berupa nomor kemudian dimasukkan ke dalam wadah. Peneliti kemudian mengambil nomor yang berada di dalam wadah secara acak. Nomor yang keluar, maka mencit dengan nomor tersebut dimasukkan ke dalam kelompok perlakuan secara berurutan  $P_1, P_2, P_3, P_4$ .

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis paparan *plumbum* pada mencit (*Mus musculus*) yang diberikan pada umur kebuntingan hari ke-9 s/d hari ke-15 dengan dosis 54,42 mg/ml dan 40.75 mg/ml diberikan secara peroral. Serta dosis Pemberian HSC sebanyak  $1 \times 10^7$  sel/0,1 ml (Widjiati dan Kuncoro, 2013).

### 4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah intensitas warna hasil pembuatan preparat imunohistokimia ekspresi Caspase-3 dan persentase sel trofoblas yang sudah Nekrosis.

### 4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali pada penelitian ini adalah jenis hewan coba, strain mencit, umur mencit, jenis kelamin mencit, pakan dan minum yang digunakan, kondisi/karakteristik kandang, cara pemberian paparan *plumbum* dan perawatan hewan coba.

### 4.3.4. Definisi Operasional

1. Paparan *Plumbum* adalah *Plumbum* yang diberikan pada mencit (*Mus musculus*) secara peroral betina pada umur kebuntingan hari ke-9 s/d hari ke-15
2. Dosis paparan adalah konsentrasi *plumbum* yaitu sebesar 54,42 mg/ml dan 40.75 mg/ml. Dosis *plumbum* ditimbang menggunakan timbangan analitik digital.
3. Dosis terapi adalah konsentrasi HSC yang disuntikkan melalui vena *coccygealis* sebanyak  $1 \times 10^7$  sel.
5. Ekspresi Caspase-3 adalah ekspresi yang diperlihatkan oleh sel trofoblas plasenta pada mencit betina dengan menggunakan teknik pewarnaan imunohistokimia. Penghitungan ekspresi caspase-3 dihitung dengan menggunakan Indeks Skala Remmele yang telah dimodifikasi (Nowak *et al.*, 2007).

6. Jumlah sel trofoblas nekrosis adalah jumlah sel trofoblas nekrosis yang dibagi dengan total jumlah sel trofoblas (nekrosis), pada plasenta mencit betina yang dipapar *plumbum* dengan perhitungan pada 5x lapangan pandang berbeda menggunakan pewarnaan H.E dengan pembesaran 1000x.

#### 4.4. Bahan Penelitian

Bahan untuk pemeliharaan mencit berupa: air minum (*adlibitum*) dan makanan hewan coba mencit berupa pellet (BR-1 *Charoen phokphand*®). Bahan untuk sinkronisasi birahi menggunakan hormon PMSG (*Folligon, 1000 IU-Intervet*) diberikan secara intra-peritoneal sebanyak 5 IU kemudian hCG (*Chorulon, 500 IU-Intervet*) untuk superovulasinya diberikan sebanyak 5 IU diberikan 48 jam sesudahnya. Bahan terapi *stem cell* menggunakan *Hemopoetic Stem Cell* dengan dosis  $1 \times 10^7$  sel/ 0,1 ml (Widjiati dan Kuncoro, 2013).

Bahan untuk pembedahan: alkohol 70%. Bahan untuk fiksasi jaringan: alkohol 70%, 80% dan 96%, xylene dan parafin cair. Bahan kimia untuk ekspresi caspase-3 dengan teknik immunohistokimia: antibodi Caspase-3, PBS 10%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, antibodi sekunder berlabel biotin, *streptavidin*®, DAB (*Diaminobenzidine*), eter, aquades, NaCl fisiologis, *metil blue and green* dan *blocking buffer ultra V block*. Dan bahan untuk pewarnaan histologis menggunakan bahan Hematoksilin-Eosin.

#### 4.5. Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan meliputi: kandang hewan coba, boks paparan, kipas angin, tempat makan, tempat minum, termometer, hygrometer, *dissecting set*, papan seksi, timbangan digital analitik *Denver Instrument*®, timbangan

analog, *object glass*, *cover glass*, mikroskop cahaya Nikon Eclipse Ci®. Termometer dan hygrometer untuk memantau suhu dan kelembaban udara pada boks paparan. *Dissecting set* dan papan seksi untuk pembedahan. Timbangan digital analitik dengan skala miligram untuk menimbang dosis *plumbum*. Timbangan analog untuk menimbang berat badan mencit.

#### **4.6. Waktu dan Tempat Penelitian**

Pemeliharaan hewan coba, sinkronisasi birahi, pengawinan, serta pembedahan dilakukan di kandang hewan coba Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Proses pemberian paparan *plumbum* melalui peroral dilakukan di unit hewan coba Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Pembuatan preparat histologi dan preparat plasenta untuk melihat ekspresi Caspase-3 dengan teknik Immunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Waktu penelitian dilakukan pada bulan September-Desember 2014.

#### **4.7. Prosedur Penelitian**

##### **4.7.1. Prosedur Sinkronisasi Mencit**

Pada Penelitian prosedur induksi birahi mencit menggunakan hormon *Pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG) dan *human chorionic gonadotropin* (hCG) untuk sinkronisasi birahi dan superovulasi. Preparat hormon PMSG diberikan secara intraperitoneal sebanyak 5 IU kemudian hCG diberikan 48 jam sesudahnya sebanyak 5 IU (Widjiati, 1997; Madyawati dan Rimayanti, 2013)

#### 4.7.2. Prosedur Pengawinan Mencit

Mencit dikawinkan secara bertahap sesuai dengan kelompok perlakuan, dengan cara dikumpulkan dengan mencit jantan dalam satu kandang (*monomating*). Mencit betina yang sudah kawin bisa diketahui dengan memeriksa adanya vaginal plug 17 jam sesudah mencit dikawinkan. Sumbat vagina terdiri dari gelatin yang sudah menggumpal dan berfungsi agar spermatozoa tidak tumpah keluar. Apabila terdapat sumbat vagina maka dianggap kopulasi telah terjadi dan pada saat itu dianggap kebuntingan hari ke-1. Mencit yang bunting ini kemudian diberi nomor, dengan cara pemberian zat warna pada bagian tubuh sesuai dengan kelompok.

#### 4.7.3. Prosedur Pemberian Paparan *Plumbum*

*Plumbum* digunakan sebagai paparan yang diberikan secara peroral dengan dosis 1/12 dan 1/16 LD50. Hewan coba ditempatkan dalam kandang pemeliharaan sampai perlakuan dimulai dan perlakuan diberikan sejak kebuntingan hari ke-9 s/d hari ke-15. pada kebuntingan hari ke-9 pada P<sub>3</sub> dan P<sub>4</sub> diberikan terapi HSC.

#### 4.7.4. Prosedur Pemberian *Hemopoitik Stem Cell*

Mencit yang telah diinduksi *plumbum* pada kelompok P<sub>3</sub> dan P<sub>4</sub>, masing-masing pada kebuntingan hari ke-9 dan kebuntingan diterapi dengan HSC dengan dosis  $1 \times 10^7$  sel (Widjiati dan Kuncoro, 2013).

Mencit yang akan diterapi, pada bagian ekornya terlebih dahulu dibersihkan dan diberikan alkohol, hal ini bertujuan agar terjadi vasodilatasi pada

vena coccygealis serta agar pada saat terapi dilakukan dengan aseptis. Setelah semua prosedur dilaksanakan HSC diinjeksikan melalui vena coccygealis.

#### **4.7.5 Prosedur Pembedahan Hewan Coba dan Pengambilan Sampel**

Pembedahan dimulai dengan mengorbankan hewan coba dengan mengeutanasia mencit menggunakan eter. Desinfeksi dengan alkohol 70% kemudian dilakukan pembedahan dengan cepat untuk mengambil uterus. Pembedahan dimulai dari vagina menuju ke arah perut menggunakan gunting bedah kecil. Dilakukan eksplorasi untuk mencari uterus, lalu fetus dikeluarkan. Jaringan plasenta dipisahkan dari uterus mencit, kemudian plasenta disimpan dalam formalin untuk pembuatan preparat immunohistokimia dan pemeriksaan histopatologis.

#### **4.7.6. Pengamatan Ekspresi Caspase-3 Dengan Metode Immunohistokimia**

Preparat plasenta yang telah dibuat dengan menggunakan metode pewarnaan immunohistokimia (cara pembuatan preparat dapat dilihat pada lampiran 1), kemudian dilakukan penilaian ekspresi caspase-3 pada sel sitotrofoblas plasenta dengan menggunakan metode Indeks Skala Remmele yang telah dimodifikasi (lampiran 2.). Penilaian ekspresi Caspase-3 dilakukan dengan 10 lapangan pandang berbeda dengan pembesaran 1000x. Setiap hasil penilaian ekspresi caspase-3 pada setiap lapangan pandang dihitung dan kemudian dimasukkan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Ekspresi Caspase-3} = \frac{[\text{Ekspresi Lapangan pandang 1} + \dots + \text{Ekspresi Lapangan pandang N}]}{\text{Jumlah Lapangan Pandang yang diperiksa}}$$

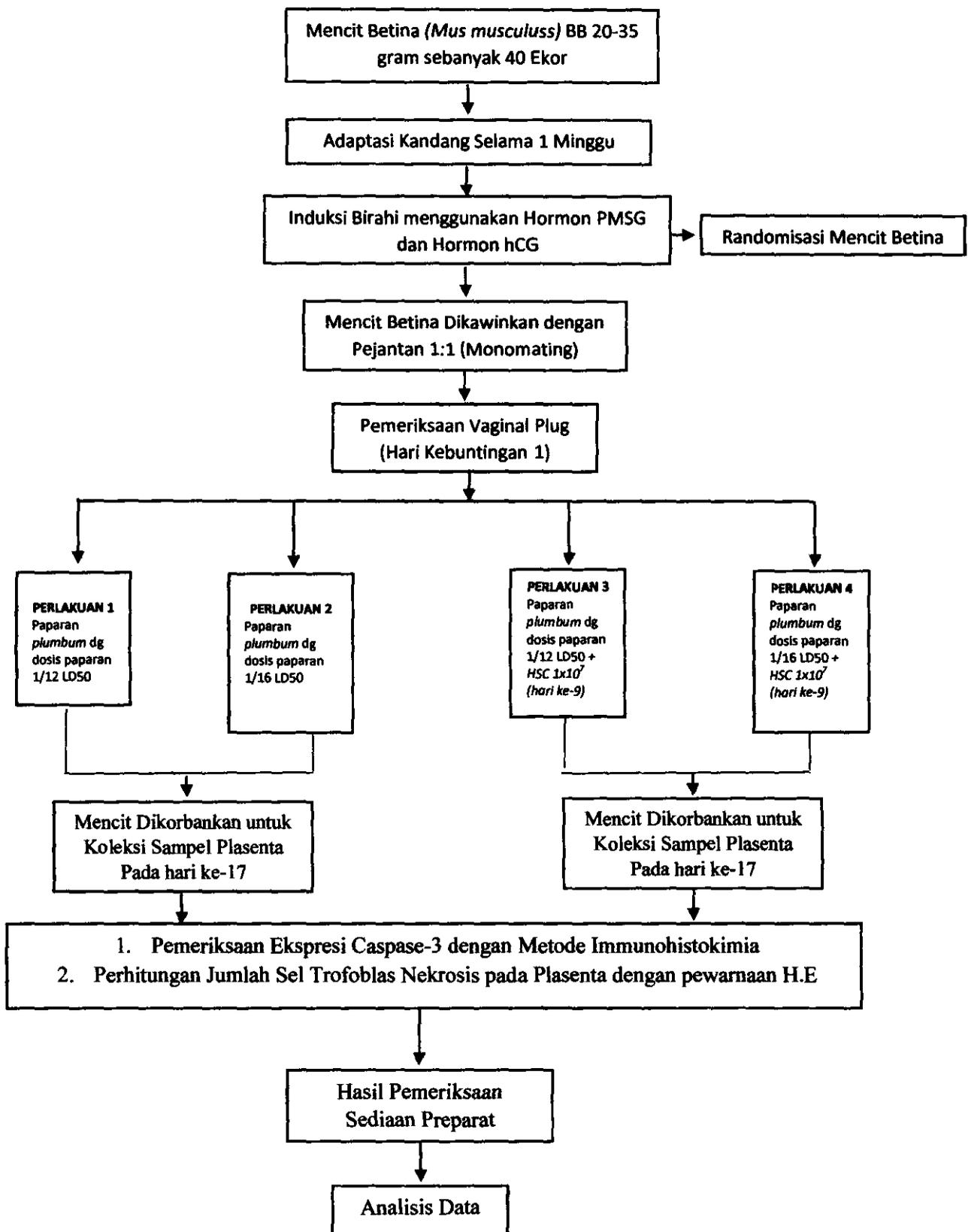
#### **4.7.6. Pengamatan Gambaran Histopatologis Plasenta Mencit dengan Pewarnaan Hematoxilin-Eosin**

Penilaian pada plasenta dilakukan untuk menghitung jumlah sel yang trofoblas yang nekrosis. Preparat plasenta yang telah dibuat kemudian dilakukan penghitungan jumlah sel trofoblas yang nekrosis. Proses penghitungan dilakukan dengan 5 lapangan pandang berbeda dengan pembesaran 1000x.

#### **4.8. Analisis Data**

Data yang didapat dianalisis secara non parametrik dan analisis parametrik. Analisis non parametrik menggunakan Uji Kruskal-Wallis, apabila data tersebut berbeda nyata, dilanjutkan dengan Uji Mann Whitney. Analisis analitik dengan menggunakan analisis Univariat, apabila terdapat interaksi diantara faktor yang diteliti kemudian dilanjutkan dengan analisis varian (ANOVA) satu arah / *one way ANOVA*. Analisis dilakukan dengan asumsi populasi yang diuji berdistribusi normal, homogen, dan sampel tidak berhubungan satu sama lain.

#### 4.9 Kerangka Alur Penelitian



## **BAB 5**

# **HASIL PENELITIAN**

## BAB 5. HASIL PENELITIAN

Dari penelitian menggunakan mencit (*Mus musculus*) yang dilakukan dengan empat perlakuan percobaan P<sub>1</sub>.Kelompok-(1-5), P<sub>2</sub>.Kelompok-(1-5), P<sub>3</sub>.Kelompok-(1-5) , P<sub>4</sub>.Kelompok-(1-5), menunjukkan hasil sebagai berikut:

### 5.1 Jumlah Sel Trofoblas Yang Mengalami Nekrosis

Dari hasil perlakuan pada berbagai kelompok, dapat dilihat persentase sel trofoblas yang sudah Mati dengan menggunakan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (H.E). Sel trofoblas yang dihitung adalah sel sitotrofoblas dan sel sinsitiotrofoblas. Data hasil perhitungan yang telah didapatkan kemudian di uji dengan analisis varian (ANOVA) dan dilanjutkan dengan Pos Hoc Test apabila signifikansi  $p < 0,05$ .

#### 5.1.1 Sel Sitotrofoblas Yang Mengalami Nekrosis

Dari hasil pengamatan dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 1000x, terlihat adanya perubahan pada gambaran histopatologi plasenta antar perlakuan pada sel sitotrofoblas. Sel sitotrofoblas yang mengalami kematian sel (nekrosis). Hasil analisis Univariat yang terlihat pada tabel sidik ragam (Lampiran. 3), menunjukkan bahwa faktor hari kebuntingan dan perlakuan pada kelompok berpengaruh nyata terhadap sel sitotrofoblas yang nekrosis ( $p < 0,05$ ).

Dengan adanya interaksi antara faktor paparan *plumbum* pada umur kebuntingan hari ke-9 s/d hari ke-15 yang di papar *plumbum* dosis 1/12 dan 1/16 LD<sub>50</sub> dengan yang diterapi *Hemopoetic Stem Cell*, maka dilanjutkan dengan analisis varian

(ANOVA). Data hasil perhitungan sel sitotropoblas dapat dilihat pada lampiran 3.

Adapun tabel hasil uji Anova tersebut dapat dilihat pada tabel 5.1 dibawah ini :

**Tabel 5.1.** Rerata dan Simpangan Baku Sel Sitotropoblas yang Mengalami Nekrosis

<b>PERLAKUAN</b>	<b>Jumlah Sel Sitotropoblas Yang Nekrosis (<math>\bar{X} \pm SD</math>)</b>
P1	72.400 <sup>b</sup> ± 8.849
P2	69.800 <sup>b</sup> ± 4.324
P3	39.200 <sup>a</sup> ± 3.033
P4	32.600 <sup>a</sup> ± 4.775

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

### 5.1.2 Sel Sinsitiotropoblas Yang Mengalami Nekrosis

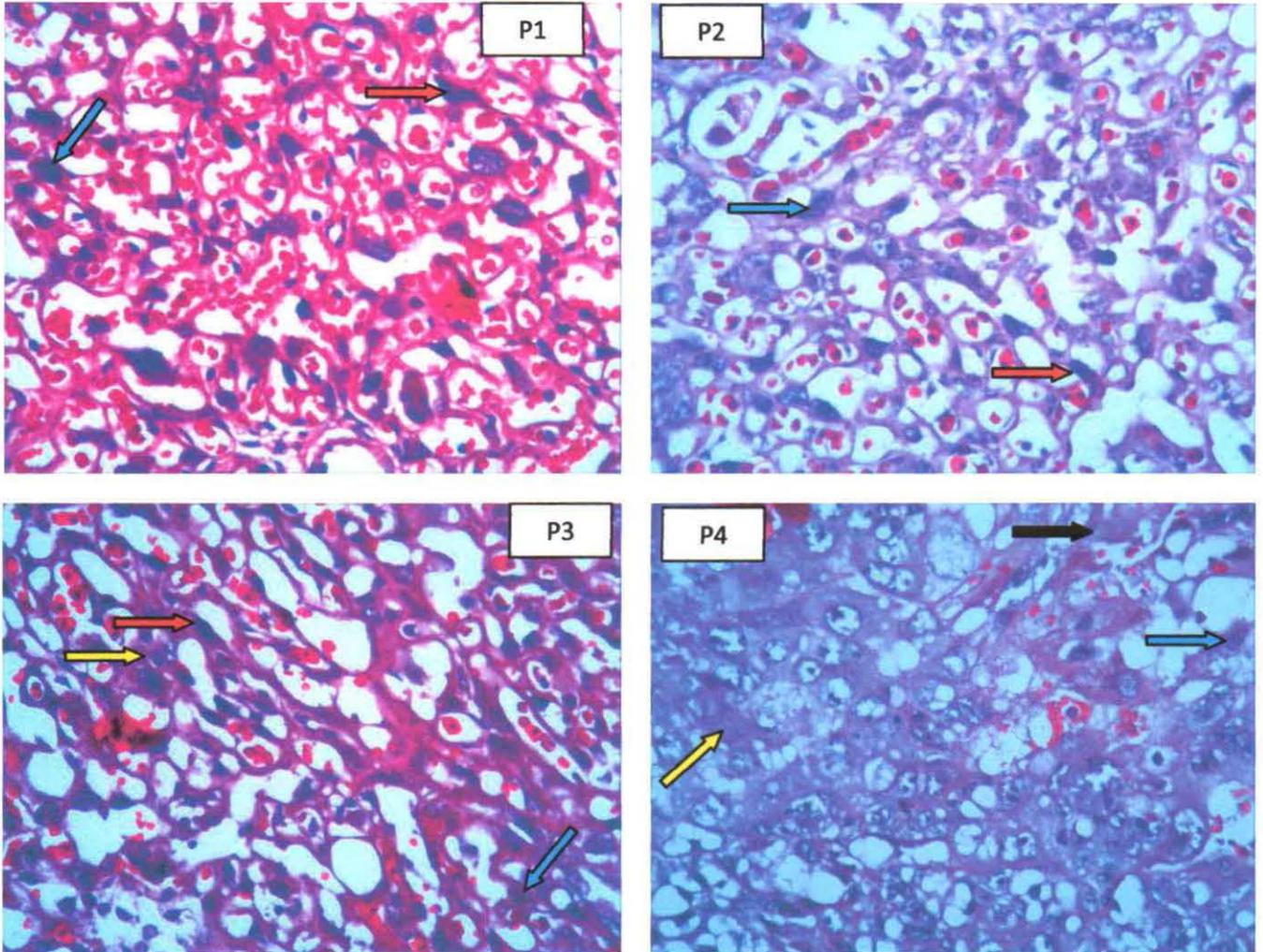
Selain dilihat persentase sel sitotrofoblas, juga dilakukan pengamatan persentase sel sinsitiotrofoblas yang normal. Preparat juga diamati menggunakan mikroskop cahaya (Nikon) dengan pembesaran 1000x. Dari hasil pengamatan juga diketahui terdapat perubahan pada gambaran histopatologi sel sinsitiotrofoblas. Data hasil perhitungan sel sinsitiotropoblas dapat dilihat pada lampiran 3 dan hasil analisis Univariat yang dilakukan dapat dilihat pada lampiran 6. Adapun tabel hasil uji Anova tersebut dapat dilihat pada tabel 5.2 dibawah ini:

**Tabel 5.2.** Rerata dan Simpangan Baku Sel Sinsitiotropoblas yang Mengalami Nekrosis

<b>PERLAKUAN</b>	<b>Jumlah Sel Sinsitiotropoblas Yang Nekrosis (<math>\bar{X} \pm SD</math>)</b>
P1	23.400 <sup>b</sup> ± 6.107
P2	23.600 <sup>b</sup> ± 4.393
P3	17.400 <sup>a</sup> ± 2.881
P4	13.400 <sup>a</sup> ± 1.817

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

Gambaran hasil histopatologi dari sel tropoblas yang di warnai dengan Hematosilin Eosin akan tampak jelas dengan perbesaran 1000x. Adapun gambarannya bisa dilihat pada gambar 5.1 dibawah ini :



**Gambar 5.1** Gambaran Histopatologi plasenta mencing (*mus musculus*) bunting dengan pewarnaan HE.

**Keterangan :** Tanda (  ) menunjukkan sel sitotropoblas nekrosis, tanda (  ) menunjukkan sel sinsitiotropoblas nekrosis, tanda (  ) menunjukkan sel sitotropoblas normal dan tanda (  ) menunjukkan sel sinsitiotropoblas normal.

## 5.2 Ekspresi Caspase-3 pada sel Trofoblas Plasenta.

Hasil perhitungan ekspresi Caspase-3 pada sel trofoblas plasenta, dengan menggunakan metode semikuantitatif Indeks Skala Remmele yang dimodifikasi (Lampiran. 2). Data hasil perhitungan kemudian dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis, pada setiap faktor (hari paparan kebuntingan dan perlakuan) yang mempengaruhi ekspresi Caspase-3. Dari hasil uji Kruskal-Wallis didapatkan hasil berbeda sangat nyata ( $p < 0,01$ ). Hasil yang berbeda sangat nyata pada tiap faktor menunjukkan adanya interaksi faktor yang mempengaruhi ekspresi Caspase-3 pada setiap kelompok. Dengan adanya interaksi setiap faktor, kemudian dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney setiap kelompok perlakuan untuk melihat adanya perbedaan antar dua perlakuan. Adapun hasil uji Mann-Whitney antar dua perlakuan dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

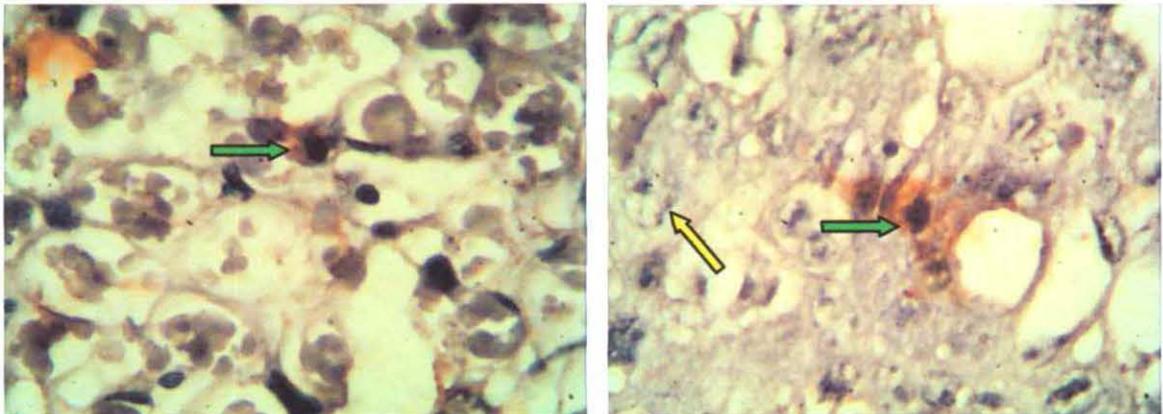
**Tabel. 5.3** Hasil Uji Mann-Whitney Ekspresi Caspase-3 pada Sel Trofoblas Plasenta

EKSPRESI	KELOMPOK	KELOMPOK BANDING	SIGNIFIKANSI
CASPASE-3	P1	P2	0.151
		P3	0.032 *
		P4	0.008 **
CASPASE-3	P2	P3	0.222
		P4	0.056 *
CASPASE-3	P3	P4	0.421

Keterangan : \*Signifikansi pada  $p < 0,05$  ; \*\*Signifikansi pada  $p < 0,01$

Dari tabel diatas dapat terlihat bahwa pada perlakuan P<sub>1</sub>. (mencit betina dengan paparan *plumbum* dosis 1/12 LD50 pada umur kebuntingan hari ke-9 s/d hari ke-15) terlihat berbeda nyata dibandingkan kelompok perlakuan P<sub>3</sub> dan berbeda sangat nyata dibandingkan kelompok perlakuan P<sub>4</sub> ( $p < 0,01$ ). Begitu juga

dengan perlakuan P<sub>2</sub> (mencit betina dengan paparan *plumbum* 1/16 LD50 pada umur kebuntingan hari ke-9 s/d hari ke-15) yang terlihat berbeda nyata dengan perlakuan P<sub>4</sub> (mencit betina dengan paparan *plumbum* dosis 1/16 LD50 pada umur kebuntingan hari ke-9 s/d hari ke-15 dan pada hari ke-9 juga diberikan *Hemopoetic stem cell dosis*  $1 \times 10^7$  secara intravena). Pada perlakuan P<sub>1</sub> tidak terdapat perbedaan yang nyata antara kelompok P<sub>2</sub>. Dan Pada perlakuan P<sub>2</sub> tidak terdapat perbedaan yang nyata antara kelompok P<sub>3</sub> (mencit betina dipapar *plumbum* 1/12 LD50 pada hari ke-9 s/d hari ke-15 dan pada hari ke-9 juga diberikan *Hemopoetic stem cell dosis*  $1 \times 10^7$  secara intravena). Berdasarkan hasil diatas menunjukkan bahwa efek terapi *Hemopoetic stem Cell* terhadap mencit betina yang dipapar *plumbum* dapat menurunkan ekspresi Caspase-3 pada sel trofoblas plasenta umur kebuntingan hari ke-9 s/d hari ke-15 dengan paparan *plumbum* 1/16 LD50 dan diterapi dengan HSC dosis  $1 \times 10^7$ . Adapun gambaran hasil dari Imunohistokimia caspase-3 adalah sebagai berikut :



**Gambar 5.2** Gambaran Histopatologi plasenta mencit (*mus musculus*) bunting dengan pewarnaan Imunohistokimia.

**Keterangan :** Tanda (  ) menunjukkan sel tropoblas yang terwarnai (nekrosis), dan tanda (  ) menunjukkan sel tropoblas yang tidak terwarnai (normal).

**BAB 6**  
**PEMBAHASAN**

## BAB 6. PEMBAHASAN

Plumbum atau timah hitam merupakan logam berat yang terdapat di lingkungan sekitar kita, baik itu secara proses alami maupun buatan. Plumbum banyak digunakan dalam industri logam, baterai, cat, kabel, karet dan mainan anak-anak. Manusia terkontaminasi dengan plumbum melalui udara, air dan makanan. Apabila plumbum terhirup atau tertelan oleh manusia, akan beredar mengikuti aliran darah dan terdistribusi di jaringan lunak dan tulang (Darmono, 2001). Senyawa plumbum organik ditemukan dalam bentuk senyawa tetraethyllead (TEL) Dan tetramethyllead (TML). Plumbum bersifat anti korosif, oleh karena sifat inilah maka plumbum digunakan secara luas dalam berbagai industri .

Plumbum masuk kedalam tubuh dapat melalui berbagai cara antara lain melalui saluran cerna, saluran pernapasan dan melalui kulit. Setelah diabsorpsi, plumbum akan terikat dengan eritrosit yang kemudian akan di distribusikan secara luas ke jaringan lunak seperti sumsum tulang, otak, ginjal, hati, otot, dan gonad kemudian menuju ke matriks tulang. Plumbum dapat melewati sawar darah plasenta dan merupakan bahaya potensial bagi janin.

Absorpsi Pb dapat melalui saluran pernapasan, saluran cerna dan melalui kulit. Absorpsi melalui saluran pernapasan tergantung kepada besarnya diameter partikel Pb yang masuk kedalam paru-paru, diameter sebesar 1 mikrometer akan diabsorpsi secara komplit di alveoli (WHO, 1977).

Absorpsi Pb melalui saluran cerna tergantung pada beberapa kondisi antara lain, besarnya konsentrasi Pb yang tertelan, adanya makanan didalam

lambung, status gizi pasien, usia dari pasien. Absorpsi Pb akan meningkat pada keadaan defisiensi besi, zinc dan kalsium. Tingkat absorpsi yang tinggi terjadi pada anak-anak yaitu sekitar 50% dari jumlah Pb yang tertelan, sedangkan orang dewasa tingkat absorpsi Pb sekitar 10-20%. Plumbum organik seperti tetraethyl lead (TEL) yang digunakan sebagai *antiknock* pada bahan bakar bensin hampir seluruhnya diabsorpsi langsung melalui kulit (Hariono, 1991).

Plumbum dapat melintasi barrier plasenta baik pada hewan dan manusia, dengan deposisi Pb pada jaringan tulang, darah dan hati fetus. Keracunan Pb pada manusia dapat menyebabkan sterilitas, aborsi spontan. Pada hewan percobaan, pada umumnya Pb menyebabkan sterilitas, aborsi, perubahan siklus estrus, efek teratogenik, abnormalitas spermatozoa, penurunan reproduksi spermatozoa, reduksi diameter dan edema tubulus seminiferus

*Plumbum* mempengaruhi pembelahan sel dari embrio umur beberapa hari setelah proses fertilisasi pada hewan rodensia. Plumbum menghambat frekuensi perkembangan blastocyst dan tropoblast. pada saat implantasi blastocyst, kandungan hormon progesteron dan 17-oestrodinol mengalami penurunan nyata ( $r=0,995$  dan  $r=0,993$ ) pada mencit yang diberi senyawa Pb organik (triethyl lead).

. Pb yang berikatan dengan besi (Fe) bisa menimbulkan ROS dan merusak membran sel dan organel sel seperti mitokondria, hasilnya dengan rusaknya membran sel dan organel mitokondria dapat memicu terjadinya apoptosis yang dipacu dengan meningkatnya Bax dan menurunnya BCL-2 (antiapoptosis).

Manifestasi klinis dari keracunan plumbum dapat mengenai berbagai sistem organ antara lain sistem saraf pusat, ginjal, hematopoetik, gastrointestinal, kardiovaskuler, endokrin dan reproduksi.

### 6.1 Sel Sitotrofoblas

Sel sitotrofoblas memiliki fungsi utama pada awal implantasi pada uterus. Sel sitotrofoblas pada awal implantasi akan mengeluarkan enzim proteolitik yang akan melisiskan matriks ekstraseluler uterus, sehingga embrio dapat melakukan implantasi. Sel sitotrofoblas dapat melakukan fusi dengan sesamanya membentuk sinsitiotrofoblas (Budianto., 2014 yang dikutip dari Hashash *et al.* 2004). Sel sitotrofoblas rentan akibat induksi *Plumbum* dikarenakan berhubungan langsung dengan darah yang berasal dari induk (Furukawa *et al.* 2011).

Pada preparat plasenta dengan pewarnaan H.E kelompok perlakuan paparan *plumbum* umur kebuntingan hari ke-9 s/d hari ke-15, menunjukkan adanya penurunan persentase sel sitotrofoblast yang nekrosis. Dengan uji Duncan pada perlakuan P<sub>1</sub> dibandingkan dengan perlakuan P<sub>3</sub> yang diberikan paparan *plumbum* dengan dosis yang sama pada umur kebuntingan hari ke-9 s/d hari ke-15, menunjukkan adanya perbedaan yang nyata. Hal ini disebabkan karena pada perlakuan P<sub>3</sub> pada hari ke-9 diberikan terapi dengan *Hemopoetic stem cell* namun dosis dari *stem cell*. Penurunan jumlah nekrosis dikarenakan tidak adanya sitokin inflamasi TNF- $\alpha$  yang dapat menyebabkan apoptosis pada sel sitotrofoblas. Pada perlakuan P<sub>2</sub> yang dipapar *plumbum* pada umur kebuntingan hari ke-9 s/d ke-15, terlihat banyaknya jumlah sel sitotrofoblas yang nekrosis dibandingkan dengan perlakuan P<sub>4</sub>, dimana P<sub>4</sub> yang dipapar *plumbum* pada umur kebuntingan hari ke-9

s/d ke-15 hari dengan dosis yang sama dan kemudian diterapi dengan *Hemopoetic Stem Cell*  $1 \times 10^7$ /ml. Hasil yang ditunjukkan berbeda nyata ( $> 0.05$ )

Uji Duncan secara keseluruhan pada perlakuan  $P_1$  dan  $P_2$  terhadap  $P_3$  dan  $P_4$  menunjukkan adanya penurunan sel nekrosis. Tetapi pada perlakuan  $P_3$  dan  $P_4$  tidak ada perbedaan yang nyata. perlakuan  $P_3$  dan  $P_4$  yang dipapar *plumbum* mulai umur kebuntingan hari 9-15 tidak menunjukkan perbedaan penurunan jumlah sel nekrosis yang signifikan. Pada kelompok  $P_2$  terhadap  $P_3$  tidak menunjukkan perbedaan diantara kedua perlakuan tersebut. Pada perlakuan  $P_3$  yang diinjeksikan HSC terlihat adanya perbedaan yang nyata dengan perlakuan  $P_1$  yang tidak diterapi dengan HSC. Pada perlakuan  $P_4$  yang diinjeksikan HSC  $1 \times 10^7$ /ml menunjukkan perubahan yang nyata terhadap  $P_1$  dan  $P_2$ .

Dari hasil analisis dapat dilihat bahwa terapi HSC pada perlakuan  $P_3$  dan  $P_4$  terjadi perbedaan yang signifikan yang diterapi HSC terhadap paparan plumbum dengan dosis masing-masing  $1/12$  dan  $1/16$  LD<sub>50</sub>. Dengan demikian HSC secara umum mampu meregenasi sel yang terpapar plumbum dengan dosis tersebut.

## 6.2 Sel Sinsitiotrofoblas

Sel sinsitiotrofoblas yang diinduksi oleh *plumbum* menunjukkan adanya penurunan jumlah sel yang nekrosis setelah terapi, tetapi tidak signifikan. Sel yang nekrosis pada sel sinsitiotrofoblas ditunjukkan dengan adanya perbedaan afinitas dalam menyerap zat pewarna H.E dibandingkan dengan sel sinsitiotrofoblas yang normal. Sel sinsitiotrofoblas merupakan sel yang berasal dari sel sitotrophoblas yang melakukan fusi (penggabungan) dengan sel

sitotrofoblas lainnya. Fungsi sel sinsitiotrofoblas memiliki fungsi yang penting yaitu sebagai *plasenta barrier* bersama-sama dengan sel sitotrofoblas (Furukawa *et al.* 2011). Dengan rusaknya sel penyusun *plasenta barrier*, kemungkinan masuknya *plumbum* ke dalam fetus lebih besar, sehingga dapat mengganggu perkembangan dari fetus.

Hasil uji Duncan menunjukkan adanya perbedaan antara perlakuan P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> dan P<sub>4</sub>. Pada perlakuan P<sub>1</sub> dan P<sub>2</sub> yang di papari *plumbum* namun tidak diterapi dengan HSC menunjukkan jumlah sel sinsitiotrofoblas nekrosis yang tinggi, hal ini normal dikarenakan adanya *plumbum* yang dapat memicu terbentuknya ROS. Pada perlakuan P<sub>4</sub> yang diterapi dengan *Hemopoetic Stem Cell* 10<sup>7</sup>/ml tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kelompok P<sub>3</sub>. Tetapi secara umum dari hasil uji tersebut perlakuan P<sub>1</sub> dan P<sub>2</sub> yang tidak diterapi dengan HSC berbeda nyata dengan perlakuan P<sub>3</sub> dan P<sub>4</sub> yang diterapi dengan HSC.

Dari hasil analisis dapat dilihat bahwa terapi HSC pada perlakuan P<sub>3</sub> dan perlakuan P<sub>4</sub> terjadi perbedaan yang signifikan dengan melakukan terapi HSC terhadap paparan *plumbum* guna menurunkan sel sinsitiotrofoblas yang nekrosis.

### 6.3 Ekspresi Caspase-3

Ekspresi caspase-3 pada sel trofoblas plasenta merupakan salah satu penanda (*marker*) terjadinya apoptosis. Apoptosis pada sel trofoblas plasenta terjadi melalui dua jalur, yaitu jalur intrinsik dan jalur ekstrinsik. .

Ekspresi caspase-3 yang meningkat menunjukkan adanya gangguan pada kebuntingan. Hal ini dapat dilihat pada perlakuan P<sub>1</sub> dan P<sub>2</sub> yang dipaparkan *Plumbum* pada umur kebuntingan hari ke-9 s/d hari ke-15. Pada perlakuan P<sub>3</sub> dan

P<sub>4</sub> kedua kelompok kontrol tersebut menunjukkan ekspresi caspase-3 yang sangat rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain dengan umur paparan kebuntingan yang sama.

Dengan pewarnaan immunohistokimia sel trofoblas yang mengalami apoptosis akan mengekspresikan caspase-3. Caspase-3 ini diekspresikan akibat paparan *plumbum* maupun secara fisiologis menjelang kelahiran. Pada kelompok perlakuan P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub> dengan paparan umur kebuntingan yang sama terlihat ekspresi caspase-3. Hal ini normal terjadi, karena pada kebuntingan yang normal kejadian apoptosis pada kebuntingan awal akan lebih rendah dibandingkan pada kebuntingan akhir (Straszewski-Chaves and Gil Mor, 2005). Pada perlakuan P<sub>3</sub> yang diterapi dengan *Hemopoetic Stem Cell*  $1 \times 10^7$ / ml, tidak mengalami perbedaan yang nyata dengan perlakuan P<sub>2</sub> (tanpa terapi HSC). Hal ini menunjukkan bahwa HSC dengan dosis tersebut belum mampu menurunkan ekspresi caspase-3 pada sel trofoblas plasenta.

Dari hasil uji Mann Whitney menunjukkan perbedaan antara dosis paparan kebuntingan umur hari ke-9 s/d hari ke-15. Pada setiap paparan *plumbum* umur kebuntingan hari ke-9 s/d hari ke-15 menunjukkan adanya ekspresi caspase-3. Pada kelompok perlakuan P<sub>4</sub> perlakuan pemaparan *plumbum* menunjukkan ekspresi caspase-3 yang lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok yang perlakuan lainnya dalam kelompok hari kebuntingan yang sama (diberikan terapi HSC pada hari ke-9), ekspresi ini normal terjadi ketika semakin mendekati hari kelahiran (Straszewski-Chaves and Gil Mor, 2005).

**BAB 7**  
**KESIMPULAN DAN SARAN**

## BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Pemberian *Hemopoetic Stem Cell* terhadap mencit bunting yang dipapar *plumbum*, menunjukkan penurunan jumlah sel trophoblast nekrosis (sel sitotrophoblast dan sel sinsitiotrophoblast) plasenta.
2. Pemberian *Hemopoetic Stem Cell* terhadap mencit bunting yang dipapar *plumbum*, menunjukkan penurunan ekspresi caspase-3 yang signifikan pada sel trophoblast plasenta.

### 7.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui :

1. Pemberian terapi HSC yang lebih lama (lebih dari satu hari) dan dengan dosis yang lebih varian, untuk melihat potensi regenerasi jaringan yang rusak akibat paparan *plumbum*.
2. Pemberian *Hemopoetic Stem Cell* dengan waktu pemberian sebelum pemaparan (sebagai terapi preventif), sehingga potensi pencegahan kerusakan sel trophoblast plasenta dan regenerasi jaringan akibat *plumbum* bisa diketahui lebih dalam.

# DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Achlis, R. 2013. Potensi Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) Terhadap Tel spermatogenik, diameter tubulus seminiferus, dan kadar malondialdehid (MDA) testis mencit (*mus musculus*) yang diinduksi 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Tesis. Universitas Airlangga. Surabaya
- Alnemri, E.S., D.J. Livingston, D.W. Nicholson, G. Salvesen, N.A. Thornberry, W.W. Wong, and J. Yuan. 1996. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *J. Cell* **87** (2): 171
- Arief, S. 2005. Radikal Bebas. //www.pediatrik.com/buletin/06224113752-x0zu6l.pdf. [22 November 2013]
- Badan Pusat Statistik (BPS). 2013. Jumlah Pesawat dan Kendaraan Bermotor Menurut Jenisnya, 1949 – 2012. [http://www.bps.go.id/tab\\_sub/view.php?kat=2&tabel=1&daftar=1&id\\_subyek=17&notab=25](http://www.bps.go.id/tab_sub/view.php?kat=2&tabel=1&daftar=1&id_subyek=17&notab=25). [20 Februari 2013].
- Barta, T., 2012. Human Embryonic Stem Cell : Cell Cycle Regulation and Reaction to DNA Damage. Departement Of Biology, Faculty Of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic.
- Budianto, A., A. 2014. Efektivitas Terapi *Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar *Carbon Black* Terhadap Ekspresi Caspase-3 dan Persentase Sel Trofoblas Plasenta. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Boatright, K.M., and G.S Salvesen. 2003. Mechanisms of Caspase Activation. *J.Curr. Opin. Cell Biol.* **15** (6): 725–31
- Dachlan, E.G., Widjiati dan B. Santoso. 2011. Pengaruh Paparan Partikulat Jelaga Terhadap Peningkatan Lipid Peroksidase, Kejadian Apoptosis Plasenta Dan Luaran Kebuntingan Pada Mekanisme Molekuler Gangguan Kebuntingan Tikus (*Rattus norvegicus*). [Laporan Penelitian] Universitas Airlangga
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2002. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 1407/Menkes/Sk/Xi/2002 Tentang Pedoman Pengendalian Dampak Pencemaran Udara. Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Foster, L. and G. Earl Jr. 2008. Toxic Responses of The Reproductive System. In: Curtis D. Claasen (Ed.). *Cassarets and Doull's: Toxicology, the Basic Science of Poison*. 7<sup>th</sup> ed. Mc Graw-Hills. New York. 784-785
- Fajarwati. R. 2012. Efek Rodhamine B Pada Mencit (*Mus musculus*) Bunting terhadap cacat congenital eksternal dan kelainan tulang. Tesis. Universitas Airlangga. Surabaya
- Furukawa, S., S. Hayashi, K. Usuda, M. Abe, S. Hagio and I. Ogawa. 2011. Toxicological Pathology in the Rat Placenta. *J Toxicol Pathol* 2011; 24: 95–111

- Ghavami, S., M. Hashemi, and S.R Ande. 2009. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J. Med. Genet.* **46** (8): 497–510.
- Hariono, B. 1991. A Study of lead (Pb) levels in animals and the environment with particular reference to the fruit bat (*Pteropus* sp.). Ph.D. thesis, The University of Queensland, Brisbane, Australia.
- Hariono. B. 2008. Polusi Logam Berat *Plumbum* (Pb) Di Lingkungan : Perubahan Patologik Dan Pemantauannya. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Hargiyanto, W. 2012. Peningkatan Jumlah Sel Hofbauer dan Ekspresi Nuclear Factor Kappa Beta (Nf-Kb) Pada Plasenta Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Carbon Black [Tesis]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya
- Hashash, A.H.K El and S. J Kimber. 2004. Tropoblast Differentiation In Vitro: Establishment and Characterisation of A Serum-Free Culture Model for Murine Secondary Tropoblast Giant Cells. *J. Reproduction.* **128** : 53–71.
- Halim, D., H. Murti, F. Sandra, A. Boediono, T. Djuwantono, dan B. Setiawan. 2010. Stem Cell: Dasar teori & Aplikasi Klinis. Edisi:1. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Hickman, A.J. 1999. Methodology for Calculating Transport Emissions and Energy Consumption. Transport Research Laboratory.
- Hougaard, K. S., K. A. Jensen., P. Nordly., C. Taxvig., U. Vogel1., A. T. Saber and H. Wallin. 2008. Effects of Prenatal Exposure to Diesel Exhaust Particles on Postnatal Development, Behavior, Genotoxicity and Inflammation in Mice. *Particle and Fibre Toxicology* **5**:3.
- Jusuf, A.A. 2008. Aspek Dasar Sel Punca Embrionik (*embryonic stem cells*) dan Potensi Pengembangannya. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta
- Kang, S.K., S.S II, S.K Myung, Y.J Jung and C.R Jeong. 2012. Journey of Mesenchymal Stem Cells for Homing: Strategies to Enhance Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy. Hindawi Publishing Corp. *Stem Cells Inter.* Vol. 2012. Pp.1-12.
- Kumar, Vinay; Ramzi S. Cotran; Stanley L. Robbins. 2007. Buku Ajar Patologi Robbins, Ed.7, Vol.1. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kusriningrum, R.S. 2008. Perancangan Percobaan. Airlangga University Press. Surabaya.
- Kresno, S.B. 2013. Imunologi: Diagnosis dan Prosedur laboratorium. Ed:5. Badan Penerbit FKUI. Jakarta.
- Lestari, Ajeng S.P. dan Agus Mulyono. 2011. Analisis Citra Ginjal untuk Identifikasi Sel Piknosis dan Sel Nekrosis. *Jurnal Neutrino* Vol.4, No.1, p:48-66. Diakses dari [http://ejournal.uin\\_malang.ac.id/index.php/NEUTRINO/article/download/1658/pdf](http://ejournal.uin_malang.ac.id/index.php/NEUTRINO/article/download/1658/pdf). [ 2 November 2014].

- Madyawati, S.P dan 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]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Maeda, K., S. Ohkura, and H. Tsukamura. 2000. Physiology of Reproduction. In: The Laboratory Rat. Georg J Krinke (Ed.). 1<sup>st</sup> ed. AP publishing. USA
- Mc Kee, T., and J.R. Mc Kee. 2003. Aerobic metabolism II: Electron Transport and Oxidative Phosphorylation In: Biochemistry the Molecular Basis of Life. 3rd ed. McGraw-Hill, NY 10020. 319-326.
- Moongkarndi, P., C. Srisawat, P. Saetun, J. Jantaravinid, C. Peerapittayamongkol, R. Soi-ampornkul, S. Junnu, S. Sinchaikul, S.T. Chen, P. Charoensilp, V. Thongboonkerd, and N. Neungton. 2010. Protective Effect Of Mangosteen Extract Against Beta-Amyloid-Induced Cytotoxicity, Oxidative Stress And Altered Proteome In SK-N-SH Cells. *J. Proteome Res.* 9 (5): 2076–86
- Mudjahid. 2011. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Batang Sarang Semut (Myrmecodia Pendens Merr & Perry) Terhadap Ekspresi P21 Dan Ekspresi Ki67 Pada Galur Sel Karsinoma Mammae T47d* [Tesis]. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Bandung
- Myers and M.D.M. McGavin. 2007. Pathologic Basic of Veterinary Medicine. 4<sup>th</sup> Edition. In: McGavin M.D.M and Zachry J.F (ed). Mosby Elsevier. USA.
- NCBI. 2014. CASP3 Caspase 3, Apoptosis-Related Cysteine Peptidase *Homo sapiens* (human). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=836>.
- Parast, M.M., H. Yu, A. Ciric, M.W. Salata, and V. Davis. 2009. PPARc Regulates Trophoblast Proliferation and Promotes Labirinthine Trilineage Differentiation. *PLoS ONE* Vol.4. 11
- Pringgoutomo, S.; S. Himawan; A. Tjarta. 2002. Buku Ajar Patologi I. Jakarta: Sagung Seto.
- Rahardjo, I.B. 2006. Sistema Reproduksi Wanita. Hand Out Histologi. Paket-II. Lab. Anatomi-Histologi. FK Universitas Airlangga. Surabaya.
- Revell, P. 2006. The Biological Effects of Nanoparticles. *Nanotechnology Perceptions* 2 : 283–298.
- Ries, C., V. Egea, M. Karow, H. Kolb, M. Jochum and P. Neth. 2007. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are Essential For The Invasive Capacity Of Human Mesenchymal Stem Cells: Differential Regulation By Inflammatory Cytokines. *Blood*; 109:4055-63.
- Romieu, I., S. C. Giner., N. Kunzli and J. Sunyer. 2007. Air Pollution, Oxidative Stress and Dietary Supplementation. *Eur Res J* 31:179–196.
- Sarjadi. 2003. Patologi Umum. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro.

- Sudaryanti, Lestari. 2012. Pengaruh Paparan Partikulat Jelaga Terhadap Kadar *Malodialdehyde* Plasenta dan Luaran Kebuntingan Pada Tikus (*rattus novergicus*) [Tesis]. Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya.
- Stennicke, H.R., M. Renatus, M. Meldal, and G.S. Salvesen. 2000. [Internally Quenched Fluorescent Peptide Substrates Disclose The Subsite Preferences Of Human Caspases 1, 3, 6, 7 And 8.](#) *Biochem. J.* **350** (2): 563–8.
- Straszewski-Chaves S.L and G. More. 2005. The Regulation of Human Trophoblast Apoptosis and Survival During Pregnancy. In: Immunology Pregnancy. Ed: Gill More. Eureka.com and Springer Science+Bussiness Media.
- Suryohudoyo, P. 2007. *Kapita Selektta Ilmu Kedokteran Molekuler*. Sagung seto. Jakarta.
- Sohni, A. and C.M. Verfaillie. 2013. Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking. Hindawi Publishing Corp. Stem Cells Inter. Vol.2013. Pp.1-8
- Timbrell, Jhon. 2002. Introduction to Toxicology. 3<sup>rd</sup> ed. Taylor & Francis Publisher. USA and Canada. 121-122.
- Umara, Rangga. 2013. Jalanan Jawa Timur Sudah Jenuh. <http://kelanakota.suarasurabaya.net/news/2013/127503-Jalanan-Jawa-Timur-Sudah-Jenuh>. [20 Februari 2013].
- Wani, M.Y., M.A. Hashim, F. Nabi, and M.A. Malik. 2011. Nanotoxicity: Dimensional and Morphological Concern. Hindawi Publishing Corp. 8:1-11
- Watson, E.D. and J.C. Cross. 2005. Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta. *J.Physiol.* 20:180-193.
- Widjiati. 1997. Pengaruh Fosfat, Glukosa dan Kombinasinya Dalam Medium Kultur in-Vitro Terhadap Perkembangan Embrio Mencit [Tesis]. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Widjiati. Kuncorojakti. S 2014. Efektivitas Pemberian Hemopoetic Stem Cell Pada Iduk Mencit Bunting Yang Dipapar Timbal Asetat Terhadap Apoptosis Plasenta. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya
- WHO- World Health Organization. 1997. Lead Enviromental Health Criteria. No.3. Geneva
- Xiang, Mei-xiang., H.E Ai-na, Wang Jian-an and Gui Chun. 2009. Protective Paracrine Effect Of Mesenchymal Stem Cells On Cardiomyocytes. *J Zhejiang Univ. Sci. B.* 10(8):619-624

# LAMPIRAN

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Prosedur Pembuatan Preparat Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, dengan cara sebagai berikut:

#### a. Fiksasi dan Pencucian

**Reagen** : Formalin 10%

**Cara Kerja** : Segera setelah hewan percobaan dikorbankan kemudian dilakukan seksi, plasenta diambil dan dimasukkan ke dalam Formalin 10% sekurang-kurangnya selama 24 jam. Kemudian plasenta dipotong dengan ketebalan 0,5 cm.

#### b. Dehidrasi dan Clearing

**Reagen** : Alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, Alkohol Absolute I,II,III, Xylol I &II

**Cara kerja** : Plasenta yang telah dicuci dengan air kran selama 30 menit lalu dimasukkan ke reagen dengan larutan alkohol 70%, 80%, 95%, 96%, Alkohol Absolute I,II,III, Xylol I dan II masing-masing selama 30 menit.

#### c. Infiltrasi dan Pembuatan Blok Parafin

**Reagen** : Parafin I dan II

**Cara kerja** : Proses Infiltrasi dan Pembuatan Blok Parafin menggunakan alat *Automatic Tissue Embedding Apparatus Tissue-Tek®*

#### d. Pengirisan tipis

**Alat** : Mikrotom

**Cara kerja** : Pemotongan dilakukan secara random yaitu tiap 10 kali pemotongan yang dilakukan seri, diambil satu dengan ketebalan 5-7  $\mu\text{m}$ , kemudian dicelupkan air hangat dengan suhu 20°C-30°C sampai jaringan mengembang dengan baik, kemudian diletakkan pada *object glass* yang sebelumnya diolesi dengan *egg albumin*, lalu dikeringkan dengan hot plate.

**e. Pewarnaan**

Bertujuan untuk memudahkan melihat perubahan pada jaringan. Sediaan organ plasenta diwarnai dengan pewarnaan hematoksin-eosin, sehingga dapat dengan jelas bentuk masing-masing selnya.

- Cara kerja** : 1. Jaringan yang telah dikeringkan, dimasukkan ke dalam xylol I selama 3 menit.
2. Masukkan ke dalam xylol II selama 1 menit
  3. Masukkan berturut-turut ke dalam alkohol absolute I, alkohol absolute II, alkohol 96%, 90%, 80%,70% dan air selama 1 menit.
  4. Masukkan jaringan ke dalam zat warna H.E selama 5-10 menit
  5. Celupkan kedalam alkohol asam sebanyak 3-10 kali celupan
  6. Celupkan ke dalam air kran sebanyak 4 kali celupan
  7. Celupkan ke dalam amonia sebanyak 4 kali celupan
  8. Masukkan ke dalam air keran selama 10 menit
  9. Masukkan ke dalam aquadest selama 5 menit
  10. Masukkan berturut-turut ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, alkohol absolute I, alkohol absolute II, masing-masing selama 30 detik.
  11. Masukkan ke dalam Xylol I dan II, masing-masing selama 2 menit
  12. Bersihkan dari sisa-sisa pewarnaan.

**f. Mounting**

Jaringan yang telah diwarnai kemudian ditempatkan pada kaca obyek (*object glass*) yang ditutup dengan kaca penutup (*cover glass*) yang sebelumnya telah ditetesi dengan *entellan*.

**g. Pemeriksaan dengan mikroskop**

Jaringan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali.

**Lampiran 2. Skala Semikuantitatif Indeks Skala Remmele.**

<b>A</b>	<b>B</b>
Skor 0 : tidak ada sel positif	Skor 0 : tidak ada reaksi warna
Skor 1 : Sel positif kurang dari 10%	Skor 1 : Intensitas warna rendah
Skor 2 : Sel positif antara dari 11% - 50%	Skor 2 : Intensitas warna sedang
Skor 3 : Sel positif antara dari 51% - 80%	Skor 3 : Intensitas warna kuat
Skor 4 : Sel positif antara dari lebih dari 80%	

Sumber: (Nowak, *et al.*, 2007)

**Lampiran 3. Perhitungan Jumlah Sel Tropoblas Nekrosis**

	<b>SEL NEKROSIS</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>jumlah</b>	<b>rata-rata</b>
<b>P1.1</b>	<b>Sito</b>	<b>24</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>16</b>	<b>15</b>		
	<b>Sinsitio</b>	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>33</b>	<b>6</b>
	<b>SEL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P1.2</b>	<b>Sito</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>64</b>	<b>12</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>19</b>	<b>4</b>
	<b>SEL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P1.3</b>	<b>Sito</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>64</b>	<b>12</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>20</b>	<b>4</b>
	<b>SEL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P1.4</b>	<b>Sito</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>21</b>	<b>85</b>	<b>17</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>26</b>	<b>5</b>
	<b>SEL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P1.5</b>	<b>Sito</b>	<b>18</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>73</b>	<b>14</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>19</b>	<b>4</b>
	<b>SEL NEKROSE</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P2.1</b>	<b>Sito</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>69</b>	<b>13</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>20</b>	<b>4</b>
	<b>SEL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P2.2</b>	<b>Sito</b>	<b>13</b>	<b>19</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>69</b>	<b>13</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>28</b>	<b>5</b>
	<b>SEL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P2.3</b>	<b>Sito</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>76</b>	<b>15</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>18</b>	<b>3</b>
	<b>SEL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P2.4</b>	<b>Sito</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>71</b>	<b>14</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>27</b>	<b>5</b>
	<b>SEL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P2.5</b>	<b>Sito</b>	<b>11</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>64</b>	<b>12</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>25</b>	<b>5</b>

	<b>SEL NEKROSE</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P3.1</b>	<b>Sito</b>	<b>12</b>	<b>17</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>66</b>	<b>13</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>13</b>	<b>2</b>

	<b>SEL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P3.2</b>	<b>Sito</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>14</b>	<b>11</b>	<b>53</b>	<b>10</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>17</b>	<b>3</b>

	<b>SEL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P3.3</b>	<b>Sito</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>51</b>	<b>10</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>17</b>	<b>3</b>

	<b>SEL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P3.4</b>	<b>Sito</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>49</b>	<b>9</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>20</b>	<b>4</b>

	<b>SEL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P3.5</b>	<b>Sito</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>13</b>	<b>50</b>	<b>10</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>20</b>	<b>4</b>

	<b>SEL NEKROSE</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P4.1</b>	<b>Sito</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>46</b>	<b>9</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>2</b>

	<b>SEL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P4.2</b>	<b>Sito</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>46</b>	<b>9</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>15</b>	<b>3</b>

	<b>SEL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P4.3</b>	<b>Sito</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>44</b>	<b>9</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>3</b>

	<b>SEL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P4.4</b>	<b>Sito</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>45</b>	<b>9</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>15</b>	<b>3</b>

	<b>SEL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
<b>P4.5</b>	<b>Sito</b>	<b>10</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>51</b>	<b>10</b>
	<b>Sinsitio</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>2</b>

**Lampiran 4. Skoring Ekspresi caspase-3.**

	1	2	3	4	5	rata-rata
<b>P1.1</b>	3	9	0	6	4	<b>4.4</b>
<b>P1.2</b>	8	0	0	6	3	<b>3.4</b>
<b>P1.3</b>	0	0	0	3	12	<b>3</b>
<b>P1.4</b>	0	0	2	2	2	<b>1.2</b>
<b>P1.5</b>	0	2	0	3	0	<b>1</b>

<b>P2.1</b>	0	3	0	2	3	<b>1.2</b>
<b>P2.2</b>	6	0	6	0	0	<b>2.4</b>
<b>P2.3</b>	0	0	0	6	3	<b>1.8</b>
<b>P2.4</b>	0	0	0	3	0	<b>0.6</b>
<b>P2.5</b>	3	0	0	0	0	<b>0.6</b>

<b>P3.1</b>	3	0	0	0	0	<b>0.6</b>
<b>P3.2</b>	3	0	0	0	0	<b>0.6</b>
<b>P3.3</b>	0	0	0	0	0	<b>0</b>
<b>P3.4</b>	2	4	0	0	0	<b>1.2</b>
<b>P3.5</b>	3	2	0	0	0	<b>1</b>

<b>P4.1</b>	2	0	0	0	2	<b>0.8</b>
<b>P4.2</b>	2	0	0	0	0	<b>0.4</b>
<b>P4.3</b>	0	0	3	0	0	<b>0.6</b>
<b>P4.4</b>	0	0	0	0	3	<b>0.6</b>
<b>P4.5</b>	2	0	2	0	0	<b>0.8</b>

**Lampiran 5. Pengujian Data Sel Tropoblas Nekrosis.**

ONEWAY jumlah\_sitotrofoblas jumlah\_sinsitiotrofoblas BY kelompok

/MISSING ANALYSIS

/POSTHOC=DUNCAN ALPHA(0.05).

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
oblas	P1	5	72.4000	8.84873	3.95727	61.4129	83.3871	64.00	85.00
	P2	5	69.8000	4.32435	1.93391	64.4306	75.1694	64.00	76.00
	P3	5	39.2000	3.03315	1.35647	35.4338	42.9662	34.00	41.00
	P4	5	32.6000	4.77493	2.13542	26.6711	38.5289	28.00	38.00
	Total	20	53.5000	18.96950	4.24171	44.6220	62.3780	28.00	85.00
otrofoblas	P1	5	23.4000	6.10737	2.73130	15.8167	30.9833	19.00	33.00
	P2	5	23.6000	4.39318	1.96469	18.1452	29.0548	18.00	28.00
	P3	5	17.4000	2.88097	1.28841	13.8228	20.9772	13.00	20.00
	P4	5	13.4000	1.81659	.81240	11.1444	15.6556	11.00	15.00
	Total	20	19.4500	5.80812	1.29873	16.7317	22.1683	11.00	33.00

Test of Homogeneity of Variances				
	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
jumlah_sitotrofoblas	2.162	3	16	.132
jumlah_sinsitiotrofoblas	3.547	3	16	.039

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
jumlah_sitotrofoblas	Between Groups	6321.000	3	2107.000	65.333	.000
	Within Groups	516.000	16	32.250		
	Total	6837.000	19			
jumlah_sinsitiotrofoblas	Between Groups	368.150	3	122.717	7.197	.003
	Within Groups	272.800	16	17.050		
	Total	640.950	19			

## Post Hoc Tests

### Homogeneous Subsets

jumlah_sitotrofobias			
Duncan <sup>a</sup>			
kelompok	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
P4	5	32.6000	
P3	5	39.2000	
P2	5		69.8000
P1	5		72.4000
Sig.		.085	.480
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

jumlah_sinsitotrofobias			
Duncan <sup>a</sup>			
kelompok	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
P4	5	13.4000	
P3	5	17.4000	
P1	5		23.4000
P2	5		23.6000
Sig.		.145	.940
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

**Lampiran 6. Pengujian Data Ekspresi Caspase-3.**

NPAR TESTS

/K-W=skoring\_caspase BY kelompok(1 4)

/MISSING ANALYSIS.

**NPar Tests**

Notes		
Output Created	23-JAN-2015 15:34:52	
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	20
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each test are based on all cases with valid data for the variable(s) used in that test.
Syntax	NPAR TESTS  /K-W=skoring_caspase BY kelompok(1 4)  /MISSING ANALYSIS.	
Resources	Processor Time	00:00:00.00
	Elapsed Time	00:00:00.00
	Number of Cases Allowed <sup>a</sup>	112347
a. Based on availability of workspace memory.		

**Kruskal-Wallis Test**

Ranks			
	kelompok	N	Mean Rank
skoring_caspase	P1	5	16.50
	P2	5	12.00
	P3	5	8.10
	P4	5	5.40
	Total	20	

Test Statistics <sup>a,b</sup>	
skoring_caspase	
Chi-Square	10.345
df	3
Asymp. Sig.	.016
a. Kruskal Wallis Test	
b. Grouping Variable: kelompok	

NPAR TESTS

/M-W= skoring\_caspase BY kelompok(1 2)

/MISSING ANALYSIS.

**NPar Tests**

Notes		
Output Created	23-JAN-2015 15:35:15	
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	20
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each test are based on all cases with valid data for the variable(s) used in that test.
Syntax	NPAR TESTS  /M-W= skoring_caspase BY kelompok(1 2)  /MISSING ANALYSIS.	
Resources	Processor Time	00:00:00.00
	Elapsed Time	00:00:00.00
	Number of Cases Allowed <sup>a</sup>	112347
a. Based on availability of workspace memory.		

**Mann-Whitney Test**

Ranks				
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
skoring_caspase	P1	5	6.90	34.50
	P2	5	4.10	20.50
	Total	10		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	skoring_caspase
Mann-Whitney U	5.500
Wilcoxon W	20.500
Z	-1.471
Asymp. Sig. (2-tailed)	.141
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.151 <sup>b</sup>
a. Grouping Variable: kelompok	
b. Not corrected for ties.	

NPAR TESTS

/M-W= skoring\_caspase BY kelompok(1 3)

/MISSING ANALYSIS.

**NPar Tests**

Notes		
Output Created	23-JAN-2015 15:35:30	
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	20
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each test are based on all cases with valid data for the variable(s) used

		in that test.
Syntax		NPAR TESTS /M-W= skoring_caspase BY kelompok(1 3) /MISSING ANALYSIS.
Resources	Processor Time	00:00:00.00
	Elapsed Time	00:00:00.00
	Number of Cases Allowed <sup>a</sup>	112347
a. Based on availability of workspace memory.		

### Mann-Whitney Test

Ranks				
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
skoring_caspase	P1	5	7.60	38.00
	P3	5	3.40	17.00
	Total	10		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	skoring_caspase
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	17.000
Z	-2.214
Asymp. Sig. (2-tailed)	.027
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 <sup>b</sup>
a. Grouping Variable: kelompok	
b. Not corrected for ties.	

NPAR TESTS

/M-W= skoring\_caspase BY kelompok(1 4)

/MISSING ANALYSIS.

**NPar Tests**

Notes		
Output Created	23-JAN-2015 15:35:43	
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	20
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each test are based on all cases with valid data for the variable(s) used in that test.
Syntax	NPAR TESTS  /M-W= skoring_caspase BY kelompok(1 4)  MISSING ANALYSIS.	
Resources	Processor Time	00:00:00.00
	Elapsed Time	00:00:00.00
	Number of Cases Allowed <sup>a</sup>	112347
a. Based on availability of workspace memory.		

**Mann-Whitney Test**

Ranks				
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
skoring_caspase	P1	5	8.00	40.00
	P4	5	3.00	15.00
	Total	10		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	skoring_caspase
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.627
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>b</sup>
a. Grouping Variable: kelompok	
b. Not corrected for ties.	

NPAR TESTS

/M-W= skoring\_caspase BY kelompok(2 3)

/MISSING ANALYSIS.

**NPar Tests**

Notes		
Output Created	23-JAN-2015 15:36:18	
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	20
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each test are based on all cases with valid data for the variable(s) used in that test.
Syntax	NPAR TESTS  /M-W= skoring_caspase BY kelompok(2 3)  /MISSING ANALYSIS.	
Resources	Processor Time	00:00:00.00

Elapsed Time	00:00:00.00
Number of Cases Allowed <sup>a</sup>	112347

a. Based on availability of workspace memory.

### Mann-Whitney Test

Ranks				
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
skoring_caspase	P2	5	6.70	33.50
	P3	5	4.30	21.50
	Total	10		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	skoring_caspase
Mann-Whitney U	6.500
Wilcoxon W	21.500
Z	-1.297
Asymp. Sig. (2-tailed)	.195
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.222 <sup>b</sup>
a. Grouping Variable: kelompok	
b. Not corrected for ties.	

NPAR TESTS

/M-W= skoring\_caspase BY kelompok(2 4)

/MISSING ANALYSIS.

### NPar Tests

Notes		
Output Created	23-JAN-2015 15:36:32	
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>

	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	20
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each test are based on all cases with valid data for the variable(s) used in that test.
Syntax		NPAR TESTS  /M-W= skoring_caspase BY kelompok(2 4)  /MISSING ANALYSIS.
Resources	Processor Time	00:00:00.00
	Elapsed Time	00:00:00.00
	Number of Cases Allowed <sup>a</sup>	112347
a. Based on availability of workspace memory.		

### Mann-Whitney Test

Ranks				
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
skoring_caspase	P2	5	7.20	36.00
	P4	5	3.80	19.00
	Total	10		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	skoring_caspase
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	19.000
Z	-1.838
Asymp. Sig. (2-tailed)	.066
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.095 <sup>b</sup>
a. Grouping Variable: kelompok	
b. Not corrected for ties.	

NPAR TESTS

/M-W= skoring\_caspase BY kelompok(3 4)

/MISSING ANALYSIS.

**NPar Tests**

Notes		
Output Created		23-JAN-2015 15:36:49
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	20
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each test are based on all cases with valid data for the variable(s) used in that test.
Syntax		NPAR TESTS  /M-W= skoring_caspase BY kelompok(3 4)  /MISSING ANALYSIS.
Resources	Processor Time	00:00:00.00
	Elapsed Time	00:00:00.00
	Number of Cases Allowed <sup>a</sup>	112347
a. Based on availability of workspace memory.		

**Mann-Whitney Test**

Ranks				
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
skoring_caspase	P3	5	6.40	32.00
	P4	5	4.60	23.00
	Total	10		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	skoring_caspase
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	23.000
Z	-.983
Asymp. Sig. (2-tailed)	.326
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.421 <sup>b</sup>
a. Grouping Variable: kelompok	
b. Not corrected for ties.	

## Lampiran 7. Keterangan Kelayakan Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
*Animal Care and Use Committee (ACUC)*

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK**  
 - ETHICAL CLEARANCE -

No : 289-KE

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,**  
**TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG**  
**DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :**

- PENELITIAN BERJUDUL** : Efektifitas Terapi Rat Bone Marrow Stem Cell Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Teratogenik Particulat Matter Terhadap Cacat Kongenital, Ekspresi TNF  $\alpha$ , Kadar Progesteron dan Apoptosis Plasenta
- PENELITI UTAMA** : Rr. Sri Pantja Madyawat
- UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN** : Departemen Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
- DINYATAKAN** : LAIK ETIK

Surabaya, 25 September 2013

Mengetahui,  
 Dekan FKH-Unair,

Prof. Romziah Sisk, Ph.D., drh.  
 NIP. 195312161978062001

Ketua,

Dr. E. Bimo Aksono, M.Kes., Drh.  
 NIP. 196608201992031003