

# EFEKTIVITAS TERAPI *RAT BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELL* PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL TERATOGENIK *PARTICULATE MATTER* TERHADAP EKSPRESI $TNF-\alpha$ , BAX, DAN BCL-2 PLASENTA

## *Effectiveness of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Therapy on Rats (Rattus norvegicus) as Teratogenic Models of Particulate Matter on Expression of TNF- $\alpha$ , Bax, and Bcl-2 Placenta*

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

<sup>1</sup>Departemen Reproduksi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya

<sup>2</sup>Departemen Anatomi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya

<sup>3</sup>Program Magister Ilmu Biologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya

E-mail: sripantja\_madyawati@yahoo.com

### ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah membuktikan potensi dan efektivitas *rat bone marrow mesenchymal stem cell (rbmmsc)* sebagai terapi pada kasus teratogenik selama kebuntingan dengan melihat ekspresi *tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ )*, Bax, dan Bcl-2. Dua puluh empat ekor tikus bunting model teratogenik dibagi menjadi empat kelompok perlakuan yang berbeda yaitu P<sub>1</sub>-Kontrol (dipapar *carbon black* dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam pada umur kebuntingan ke-6 s/d ke-11 + Injeksi MEM 0,1 ml), P<sub>1</sub>-Terapi (dipapar *carbon black* dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam pada umur kebuntingan ke-6 s/d ke-11 + rbmmsc dengan dosis 1x10<sup>6</sup> sel/0,1 ml), P<sub>2</sub>-Kontrol (dipapar *carbon black* dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam pada umur kebuntingan ke-6 s/d ke-17 + Injeksi MEM 0,1 ml), P<sub>2</sub>-Terapi (dipapar *carbon black* dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam pada umur kebuntingan ke-6 s/d ke-11 + rbmmsc dengan dosis 1x10<sup>6</sup> sel/0,1 ml). Data yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan uji Mann-Whitney. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian terapi *rat bone marrow mesenchymal stem cell* pada tikus model teratogenik *particulate matter* tidak berpengaruh dalam menurunkan parameter ekspresi TNF- $\alpha$  dan Bax, serta meningkatkan ekspresi Bcl-2 pada plasenta.

Kata kunci: *rat bone marrow mesenchymal stem cell (rbmmsc)*, *carbon black*, TNF- $\alpha$ , Bax, Bcl-2, teratogenik

### ABSTRACT

The objective of this research is to prove potency and effectiveness of *rat bone marrow mesenchymal stem cell (rbmmsc)* therapy for teratogenic case during pregnancy by observing expression of *tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ )*, Bax and Bcl-2 in placenta. Twenty-four pregnant rats were divided into four treatment groups. Group P<sub>1</sub>-Control (exposed to 532 mg/m<sup>3</sup> carbon black for 4 hours + MEM injection 0.1 mL on 6-11 gestation days), P<sub>1</sub>-Treatment (exposed to 532 mg/m<sup>3</sup> carbon black for 4 hours + rbmmsc 1x10<sup>6</sup> cells/0.1 mL on 6-11 gestation days), P<sub>2</sub>-Control (exposed to 532 mg/m<sup>3</sup> carbon black for 4 hours + MEM injection 0.1 mL on 6-17 gestation days), P<sub>2</sub>-Treatment (exposed to 532 mg/m<sup>3</sup> carbon black for 4 hours on 6-11 gestation days + rbmmsc 1x10<sup>6</sup> cells/0.1 mL). Data were collected then analyzed using Mann-Whitney test. Conclusion of this research is *rat bone marrow mesenchymal stem cell therapy* on *Rattus norvegicus* teratogenic models showed has no effect in reducing the expression of TNF- $\alpha$  parameter and Bax, and increase expression Bcl-2 in the placenta.

Key words: *rat bone marrow mesenchymal stem cell*, *carbon black*, TNF- $\alpha$ , Bax, Bcl-2

### PENDAHULUAN

Pencemaran udara pada beberapa kota di wilayah Jawa Timur sudah melewati ambang batas standar baku mutu udara yang ditentukan oleh pemerintah. Salah satu komponen polutan yang mencemari udara adalah *particulate matter (PM)*. *Particulate matter* dapat menyebabkan terjadinya inflamasi pada sistem pernafasan dan sistem kardiovaskuler. *Particulate matter* dapat melewati sawar plasenta sehingga dapat memengaruhi perkembangan fetus. Peningkatan kadar PM dapat meningkatkan kejadian *intra uterine growth retardation (IUGR)* pada tahap awal organogenesis (Dejmek *et al.*, 1999; Garza *et al.*, 2008; Wick *et al.*, 2009).

Paparan PM dapat memengaruhi kesehatan maternal perinatal melalui berbagai mekanisme, salah satunya melalui terjadinya stres oksidatif yang akan meningkatkan *reactive oxygen species (ROS)* dalam tubuh. Peningkatan ROS dapat menyebabkan putusannya rantai asam lemak tidak jenuh yang disebut peroksidasi

lipid dengan hasil akhir berupa senyawa yang bersifat toksik yaitu *malondialdehyde (MDA)*. Peningkatan kadar MDA dalam aliran darah umbilikus dan jaringan plasenta dapat menyebabkan peradangan yang selanjutnya menginduksi makrofag untuk mensekresi sitokin *tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ )*. Sitokin TNF- $\alpha$  yang meningkat akan mempercepat proses apoptosis pada plasenta (Kamath *et al.*, 2006; Biri *et al.*, 2007; Veras *et al.*, 2008).

Terapi menggunakan *stem cell* merupakan alternatif pengobatan terkini yang mempunyai kemampuan berdiferensiasi menjadi sel lain sehingga mampu berkembang menjadi berbagai jenis sel dewasa. Selain itu, *stem cell* mampu meregenerasi dirinya sendiri yaitu dapat membuat salinan sel yang persis sama dengan dirinya melalui pembelahan sel (Saputra, 2006). Karena mempunyai sifat *self renewing* maka terapi *stem cell* tidak perlu dilakukan berulang-ulang. *Stem cell* juga dapat berdiferensiasi menjadi bermacam-macam sel, sehingga sel tersebut dapat menetap di berbagai macam

sel dan memperbaiki sel yang mengalami kerusakan melalui proses pembelahan sel (Jamur *et al.*, 2001). Pemberian *rat bone marrow mesenchymal stem cell* (rbmmsc) dapat menekan terjadinya peradangan, apoptosis, dan cacat kongenital pada kejadian teratogenik (Lee *et al.*, 2007). Dengan dasar pemikiran ini, diharapkan pemberian terapi rbmmsc pada tikus model teratogenik, dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$ , Bax, serta meningkatkan ekspresi Bcl-2 pada plasenta, sehingga kejadian apoptosis pada plasenta dan cacat kongenital dapat ditekan.

**MATERI DAN METODE**

Penelitian ini menggunakan tikus betina sebanyak 24 ekor dengan bobot badan 100-150 g. Selanjutnya dilakukan induksi berahi dengan hormon *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG) dosis 10 IU (Folligon<sup>®</sup> Intervet International BV, Netherland) dan hormon *human chorionic gonadotropin* (hCG) dosis 10 IU (Chorulon<sup>®</sup> Intervet International BV, Netherland) untuk mendapatkan berahi yang bersamaan pada semua tikus. Kemudian tikus betina dikawinkan dengan tikus jantan menggunakan metode *monomating* (1:1). Tahap selanjutnya dilakukan pemeriksaan sumbat vagina untuk mengetahui terjadinya perkawinan dan ditetapkan sebagai kebuntingan hari ke-0 (Widjiati, 1997).

*Particulate matter* yang digunakan adalah *carbon black powder*<sup>®</sup> (Degussa, United Kingdom). Terapi *stem cell* yang digunakan adalah rbmmsc yang dikultur pada pusat sel punca Institut Penyakit Tropis, Universitas Airlangga Surabaya. Sebanyak 24 ekor tikus yang telah dikawinkan kemudian dibagi ke dalam empat kelompok perlakuan, yaitu: P<sub>1</sub>-Kontrol, dipapar *carbon black* dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam pada umur kebuntingan ke-6 sampai dengan ke-11 + injeksi MEM 0,1 ml; P<sub>1</sub>-Terapi, dipapar *carbon black* dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam pada umur kebuntingan ke-6 sampai dengan ke-11 + injeksi MEM 0,1 ml + rbmmsc dengan dosis 1x10<sup>6</sup> sel/0,1 ml; P<sub>2</sub>-Kontrol, dipapar *carbon black* dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam pada umur kebuntingan ke-6 sampai dengan ke-11 + injeksi MEM 0,1 ml; P<sub>2</sub>-Terapi, dipapar *carbon black* dosis 532 mg/m<sup>3</sup> selama 4 jam pada umur kebuntingan ke-6 sampai dengan ke-11 + rbmmsc dengan dosis 1x10<sup>6</sup> sel/0,1 ml.

Pada kelompok P<sub>1</sub>-Terapi setelah pemberian paparan *carbon black* pada hari ke-11 kemudian diterapi dengan rbmmsc secara intravena, begitu pula pada kelompok P<sub>2</sub>-Terapi yang diterapi pada hari ke-17. Sebelum penyuntikan bagian ekor dihangatkan terlebih dahulu supaya terjadi vasodilatasi vena *coccygealis*. Sehari setelah penyuntikan terapi, hewan coba kemudian dikorbankan.

**Pemeriksaan Ekspresi TNF- $\alpha$ , Bax, dan Bcl-2 dengan Metode Immunohistokimia**

Determinasi dilakukan pada hari ke-13 untuk kelompok P<sub>1</sub>-Kontrol dan P<sub>1</sub>-Terapi dan determinasi pada hari ke-18 untuk kelompok P<sub>2</sub>-Kontrol dan P<sub>2</sub>-Terapi. Selanjutnya dilakukan fiksasi jaringan plasenta, dan proses pewarnaan imunohistokimia dengan

*counterstaining* menggunakan *commasie blue*. Setelah dilakukan pewarnaan imunohistokimia, preparat plasenta kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya (Nikon Eclipse Ci<sup>®</sup>) untuk mengamati dan menilai ekspresi TNF- $\alpha$ , Bax, dan Bcl-2. Penilaian ekspresi pada preparat plasenta menggunakan metode Indeks Skala Remmele (IRS) yang dimodifikasi (Novak *et al.*, 2007).

**Analisis Data**

Data yang didapatkan dianalisis menggunakan uji Kruskal-Wallis, yang kemudian dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Untuk membantu menganalisis data digunakan program *windows IBM SPSS Statistic Version 22*.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Ekspresi TNF- $\alpha$**

Berdasarkan hasil perhitungan dengan skoring terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  pada plasenta dengan metode modifikasi semikuantitatif indeks skala Remmele yang kemudian diuji dengan Uji Kruskal-Wallis, didapatkan hasil yang berbeda nyata (P<0,05), kemudian dilanjutkan dengan Uji Mann-Whitney antar dua perlakuan masing-masing. Hasil perhitungan ekspresi TNF- $\alpha$  pada tikus model teratogenik yang dipapar PM *carbon black* setelah diterapi dengan rbmmsc disajikan pada Tabel 1.

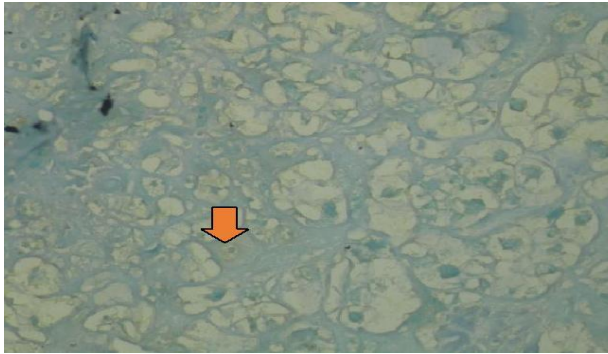
**Tabel 1.** Ekspresi TNF- $\alpha$  pada tikus model teratogenik yang dipapar *particulate matter carbon black* setelah diterapi dengan *rat bone marrow mesenchymal stem cell*

Imunohistokimia TNF- $\alpha$	Kelompok	Kelompok banding	Signifikansi
		P <sub>1</sub> -Kontrol	
	P <sub>2</sub> -Kontrol	P <sub>2</sub> -Terapi	0,004*

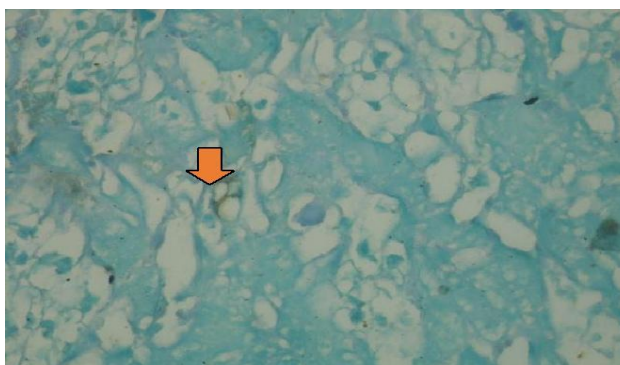
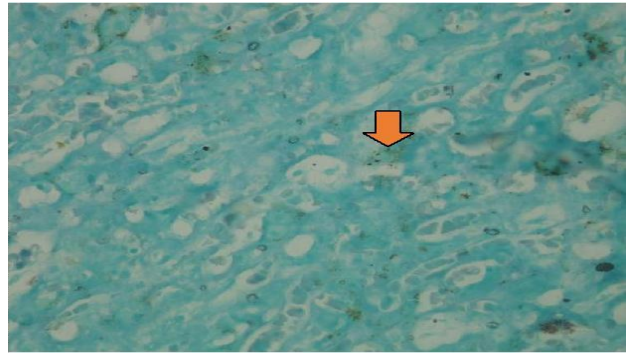
\*Signifikan P<0,05

Berdasarkan Tabel 1 menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata (P>0,05) pada kelompok P<sub>1</sub>-Kontrol dan P<sub>1</sub>-Terapi. Hal ini menunjukkan tidak adanya penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  setelah diberikan terapi *rbmmsc*. Pada kelompok P<sub>2</sub>-Kontrol dan P<sub>2</sub>-Terapi menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata (P<0,01), namun hal ini diakibatkan karena absorpsi yang terjadi pada kelompok P<sub>2</sub>-Terapi, sehingga berbeda sangat nyata (P<0,01). Terdapatnya perbedaan yang nyata pada perlakuan diakibatkan oleh pengaruh dari paparan PM *carbon black*, faktor lama kebuntingan serta akibat terjadinya reabsorpsi fetus. Akibat paparan *carbon black* akan merangsang terjadinya proses inflamasi sehingga akan terjadi peningkatan TNF- $\alpha$  yang selanjutnya akan mempercepat proses apoptosis pada plasenta.

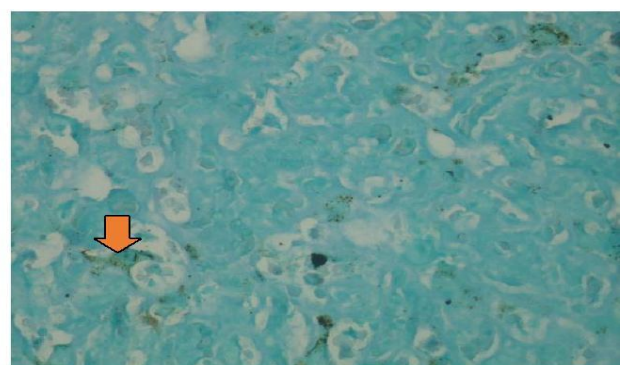
Dari Gambar 1, terlihat adanya ekspresi TNF- $\alpha$  pada plasenta akibat dari paparan PM *carbon black*. Paparan tersebut akan merangsang terjadinya proses peradangan sehingga terjadi peningkatan TNF- $\alpha$  yang dihasilkan oleh makrofag (Hougaard *et al.*, 2008), yang memengaruhi sel-sel pada plasenta. Peningkatan TNF-



**Gambar 1.** Ekspresi TNF- $\alpha$  pada plasenta tikus putih (*Rattus norvegicus*). Pada tanda panah terlihat ekspresi positif dengan intensitas warna kuning kecoklatan (IHC, 400x)



**Gambar 2.** Ekspresi Bax pada plasenta tikus putih (*Rattus norvegicus*). Pada tanda panah terlihat ekspresi positif dengan intensitas warna kuning kecoklatan (IHC, 400x)



$\alpha$  pada sel-sel plasenta mempercepat proses apoptosis pada plasenta (Lee *et al.*, 2007). *Rat bone marrow mesenchymal stem cell* memiliki sifat immunosupresif yang mampu mengeluarkan sitokin IL-10. Interleukin-10 telah diketahui dapat menurunkan kadar TNF- $\alpha$  (Kresno, 2013), yang mampu menurunkan sitokin TNF- $\alpha$  yang dikeluarkan oleh sel radang. Ketidakmampuan rbmmsc dalam menurunkan TNF- $\alpha$  ini disebabkan oleh pemberian terapi hanya sehari, sehingga rbmmsc belum mampu bekerja secara optimal dalam menurunkan kadar TNF- $\alpha$ .

**Ekspresi Bax dan Bcl-2**

Hasil perhitungan terhadap ekspresi Bax dan Bcl-2 pada plasenta, berdasarkan nilai skoring ekspresi yang terlihat pada sel-sel plasenta (Gambar 2 dan Gambar 3), akibat paparan PM *carbon black* yang diuji dengan Uji Kruskal-Wallis, didapatkan hasil yang berbeda nyata ( $P < 0,05$ ), kemudian dilanjutkan dengan Uji Mann-Whitney antar dua perlakuan masing-masing seperti yang disajikan pada Tabel 2 dan Tabel 3.

**Tabel 2.** Ekspresi Bax pada tikus model teratogenik yang dipapar *particulate matter carbon black* setelah diterapi dengan *rat bone marrow mesenchymal stem cell*

Imunohistokimia	Kelompok	Kelompok Banding	Signifikansi
Bax	P <sub>1</sub> -Kontrol	P <sub>1</sub> -Terapi	0,055
	P <sub>2</sub> -Kontrol	P <sub>2</sub> -Terapi	0,004*

\*Signifikan  $P < 0,05$

Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa pada kelompok P<sub>1</sub>-Kontrol dan P<sub>1</sub>-Terapi tidak terdapat perbedaan yang

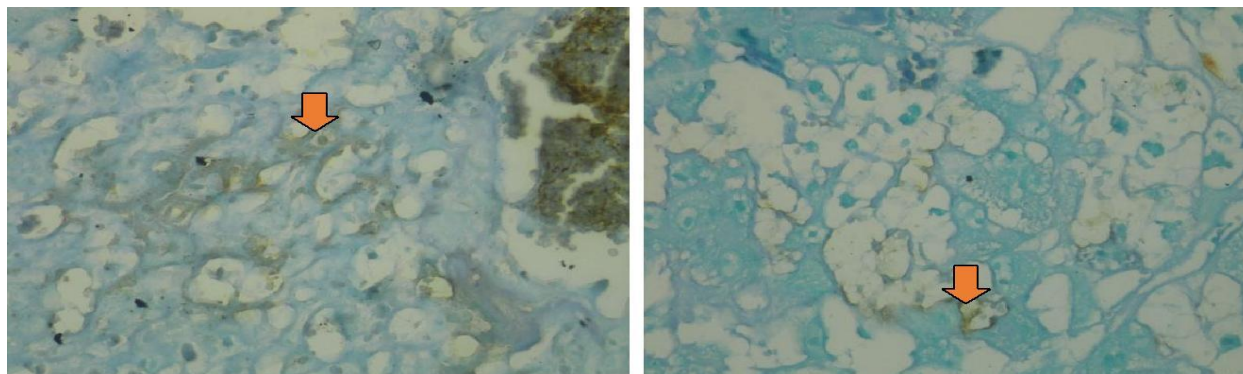
nyata. Namun pada kelompok P<sub>2</sub>-Kontrol dan P<sub>2</sub>-Terapi menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ( $P < 0,01$ ) yang diakibatkan karena absorpsi yang terjadi pada kelompok P<sub>2</sub>-Terapi. Pada Tabel 3 menunjukkan ekspresi Bcl-2 memiliki perbedaan yang sangat nyata antara semua perlakuan. Perbedaan pada kelompok P<sub>2</sub>-Kontrol dan P<sub>2</sub>-Terapi diakibatkan absorpsi yang terjadi pada P<sub>2</sub>-Terapi.

**Tabel 3.** Ekspresi Bcl-2 pada tikus model teratogenik yang dipapar *particulate matter carbon black* setelah diterapi dengan *rat bone marrow mesenchymal stem cell*

Imunohistokimia	Kelompok	Kelompok banding	Signifikansi
Bcl-2	P <sub>1</sub> -Kontrol	P <sub>1</sub> -Terapi	0,016*
	P <sub>2</sub> -Kontrol	P <sub>2</sub> -Terapi	0,006*

\*Signifikan  $P < 0,05$

*Particulate carbon black* dapat menyebabkan terjadinya reabsorpsi fetus. *Carbon black* dapat memiliki ukuran yang sangat kecil (nanopartikel) yang dapat menginduksi terbentuknya ROS. Terbentuknya ROS pada sel-sel plasenta menyebabkan rusaknya membran mitokondria dan sel kehilangan energi. Rusaknya membran mitokondria membuat cytochrome-c lepas menuju sitoplasma. Pelepasan *cytochrome-c* mitokondria ke sitosol, kemudian menyebabkan oligomerisasi *Apaf-1* ke kompleks yang disebut *apoptosome*. *Apoptosome* direkrut dan mengaktifkan *caspase-9*, yang pada gilirannya menginduksi aktivasi *caspase-3* (Juliprihanto, 2012). *Particulate matter carbon black* dapat menginduksi terbentuknya ROS di dalam sel-sel



**Gambar 3.** Ekspresi Bcl-2 pada plasenta tikus putih (*Rattus norvegicus*). Pada tanda panah terlihat ekspresi positif dengan intensitas warna kuning kecoklatan (IHC, 400x)

plasenta. Terbentuknya ROS dapat meningkatkan permeabilitas mitokondria dan melepaskan molekul pro-apoptosis ke dalam sitoplasma. Protein anti-apoptosis Bcl-2 secara normal berada pada membran mitokondria dan sitoplasma. Ketika terjadi peningkatan permeabilitas membran mitokondria akibat terbentuknya ROS, Bcl-2 akan hilang dari membran mitokondria dan digantikan dengan molekul pro-apoptosis dari famili Bax, Bak dan Bim (Myers dan Gavin, 2007). Dengan demikian akan menyebabkan apoptosis plasenta dan reabsorpsi.

Terapi rbmmsc pada penelitian ini berfungsi dalam menjaga keseimbangan protein pro-apoptosis Bax dan protein anti-apoptosis Bcl-2. Pada perlakuan ini menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata antara pemberian rbmmsc dengan berbagai umur kebuntingan yang berbeda. Penelitian yang dilakukan oleh Xiang *et al.* (2011) menunjukkan bahwa rbmmsc memiliki kemampuan dalam mempertahankan keseimbangan antara protein pro-apoptosis Bax dan protein anti-apoptosis Bcl-2. Kemampuan ini belum dapat dilihat pada penelitian ini karena rbmmsc yang diberikan belum mampu bekerja secara optimal, dikarenakan terapi yang diberikan hanya sehari sebelum hewan coba dikorbankan.

### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa pemberian rbmmsc sebagai terapi pada kasus teratogenik selama kebuntingan belum mampu menurunkan ekspresi positif pada parameter TNF- $\alpha$  dan Bax serta meningkatkan ekspresi Bcl-2 pada plasenta.

### UCAPAN TERIMA KASIH

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

### DAFTAR PUSTAKA

Biri, A., N. Bozkurt, A. Turp, M. Kavutcu, O. Himmetoglu, and I. Durak. 2007. Role of oxidative stress in intrauterine growth

- restriction. *J. Gynecol. Obstet. Invest.* 64(4):187-192.
- Dejmek, J., S.G. Selevan, I. Benes, I. Solansky, and R.J. Sram. 1999. Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. *J. Envir. Health Persp.* 107(960):475-80.
- Garza, K.M., K.F. Soto, and L.E. Murr. 2008. Cytotoxicity and reactive oxygen spesies generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials. *Inter. J. Nanomed.* 3(1):83-94.
- Hougaard, K.S., K.A. Jensen, P. Nordly, C. Taxvig, U. Vogel, A. Saber, and H. Wallin. 2008. Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on development, behaviour, genotoxicity and inflammation in mice. *J. Particle Fibre Toxicol.* 5(3):1-15
- Jamur, M.C., A.C.G. Grodzki, A.N. Moreno, L.F.C. deMello, M.V.D. Pastor, E.H. Berenstein, R.F.P. Siraganian, and C. Oliver. 2001. Identification and isolation of rat bone marrow-derivet mast cells using the mast cell-specific monoclonal antibody AA4. *J. Histochem. Cytochem.* 49(2):219-28
- Juliprihanto, A. 2012. Ekspresi Caspase-9 dan Jumlah Sel Trophoblast pada Tikus Putih yang Dipapar Carbon Black *Tesis.* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Kamath, U., G. Rao, S.U. Kamath, and L. Rai. 2006. Maternal and fetal indicators of oxidative stress during ntra uterine growth retardation (IUGR). *Ind. J. Clin. Biochem.* 21(1):111-115.
- Kresno, S.B. 2013. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium.* Edisi 5. Badan Penerbit FKUI, Jakarta.
- Lee, H.J., K. Selesmiami, Y. Niikura, T. Niikura, R. Klein, D.M. Dombkowski, and J.L. Tilly. 2007. Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy induced premature ovarian failure. *J. Clin. Oncol.* 25(22):3198-3204.
- Myers, R.K. and M.D.M Gavin.2007. Pathologic Basic of Veterinary Medicine. 4<sup>th</sup> ed. In *Cellular and Respond Tissue Injury.* McGavin M.D.M and J.F. Zachry (Eds.). Mosby Elsevier, USA
- Novak, M., J.A. Madej, and P. Dzialek. 2007. Intensity of Cox 2 expression in cell of soft tissue fibrosarcomas in dog as related to grade of tumor malignation. *J. Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 51:275-279.
- Saputra, V. 2006. Dasar-dasar *stem cell* dan potensi aplikasinya dalam ilmu kedokteran. *Cermin Dunia Kedokteran.* 153:21-25.
- Veras, M.M., N.R. Rodrigues, E.G. Caldini, A.M. Ribeiro, T.M. Mayhew, P.H.N. Saldiva, and M. Dolhnikoff. 2008. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *J. Biol. Reproduct.* (79):578-584.
- Wick, P., A. Malek, P. Manser, D. Meili, X.M. Althaus, L. Diener, P.A. Diener, A. Zisch, H.F. Krug, and U.V. Mandagh. 2009. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *J. Envir. Health Persp.* 118(3):432-436.
- Widjiati. 1997. Pengaruh Fosfat, Glukosa dan Kombinasinya dalam Medium Kultur In-Vitro terhadap Perkembangan Embrio Mencit. *Tesis.* Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- 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.