

Pengaruh Paparan Partikulat Jelaga terhadap Kejadian Apoptosis Plasenta pada Mekanisme Molekuler Gangguan Kebuntingan Tikus (*Rattus novergicus*)

Erry Gumilar Dachlan, Budi Santoso

Departemen Obstetri dan Ginekologi

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Surabaya

ABSTRAK

Pencemaran udara yang berasal dari produk sisa pembakaran diketahui dapat mempengaruhi kesehatan maternal perinatal melalui berbagai mekanisme. Jaringan plasenta dapat dijadikan indikator terjadinya peningkatan nekrosis dan apoptosis sel. Hal inilah yang berperan pada malinfasi trofoblas sehingga remodeling arteri spiralis uterus maternal menjadi terganggu dan peningkatan apoptosis sel menyebabkan penurunan ekspresi anti-apoptosis Bcl-2 sehingga ekspresi Bax berlebih. Penelitian ini menggunakan rancangan post test only control group design. Sampel diambil secara acak. Variabel independen adalah jelaga (carbon black powder). Variabel dependen adalah ekspresi anti-apoptosis Bcl-2 dan Bax. Analisis data untuk mengetahui perbedaan kelompok kontrol, kelompok perlakuan dosis 532mg/m³ dan 1064mg/m³ dengan lama paparan 4 jam dan 8 jam terhadap ekspresi anti apoptosis Bcl-2 dan pro-apoptosis Bax, Bcl-2/Bax pada plasenta tikus bunting usia kebuntingan ke hari ke 18 pada masing-masing kelompok perlakuan dilakukan dengan uji One Way Anova. Hasil analisis perbedaan antara kelompok perlakuan Bax dengan uji statistik One-Way Anova menunjukkan $p = 0,007 < \alpha 0,05$, ada perbedaan bermakna ekspresi Bcl-2 antar kelompok perlakuan. Hasil analisis perbedaan antar kelompok perlakuan Bcl-2 dengan uji statistik One Way Anova menunjukkan $p = 0,009 < \alpha 0,05$, ada perbedaan bermakna ekspresi Bax antar kelompok perlakuan. Hasil analisis perbedaan antar kelompok perlakuan Bcl-2/Bax dengan uji statistik One Way Anova menunjukkan $p = 0,011 < \alpha 0,05$, ada perbedaan bermakna ekspresi Bcl-2/Bax antar kelompok perlakuan. Hasil analisis perbedaan antar kelompok perlakuan Caspase 8 dengan uji statistik One Way Anova menunjukkan $p = 0,061 < \alpha 0,05$, tidak ada perbedaan bermakna ekspresi Caspase 8 antar kelompok perlakuan. Hasil analisis perbedaan antar kelompok perlakuan Caspase 3 dengan uji statistik One Way Anova menunjukkan ($p = 0,183 < \alpha 0,05$) tidak ada perbedaan bermakna ekspresi Caspase 3 antar kelompok perlakuan. (MOG 2014;22:1-8)

Kata kunci: Paparan partikulat jelaga, ekspresi Bcl-2 dan Bax, caspase 8, caspase 3

ABSTRACT

Air pollution from combustion products is known to affect perinatal maternal health through a variety of mechanisms. Placental tissue can be an indicator of an increase in necrosis and apoptosis of these cells that play a role in trophoblast malinvasion, so that remodeling of maternal uterine spiral arteries become distracted and causes an increase in apoptotic cells decreased expression of anti-apoptotic Bcl-2 to Bax expression excess. This study used post-test only control group design. Samples were taken in random. The independent variable was soot or carbon black powder. The dependent variables were the expression of anti-apoptotic Bcl-2 and Bax. Data analysis to determine differences in control group, the treatment group dose 532mg/m³ and 1064mg/m³ with a long exposure to 4 hours and 8 hours on the expression of anti- apoptotic Bcl-2 and pro-apoptotic Bax, Bcl-2/Bax pregnant rat placental gestation age to day 18 in each treatment group was performed by One Way Anova test. The results of comparative analysis between treatment groups Bax with One-Way ANOVA statistical test showed significant difference ($p = 0.007 < \alpha 0.05$) between the expression of Bcl-2 treatment groups. The results of comparative analysis between treatment groups Bcl- 2 with One-Way ANOVA statistical test showed the expression of Bax had significant difference ($p = 0.009 < \alpha 0.05$) between treatment groups. The results of the analysis of the differences between treatment groups Bcl-2/Bax with One Way ANOVA test showed that expression of Bcl-2/Bax had statistically significant differences ($p = 0.011 < \alpha 0.05$) between treatment groups. The results of comparative analysis between treatment groups Caspase 8 with One Way ANOVA statistical test showed no significant difference ($p = 0.061 < \alpha 0.05$) between the expression of Caspase 8 treatment groups. The results of comparative analysis between treatment groups Caspase 3 with One Way ANOVA statistical test showed no significant difference ($p = 0.183 < \alpha 0.05$) between the expression of Caspase 3 treatment groups. (MOG 2014;22:1-8)

Keywords: soot particulate exposure, Bcl-2 and Bax expression, caspase 8, caspase 3

Correspondence: Erry Gumilar Dachlan, Departemen Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jl. Mayjen Prof dr Moestopo 6-8, Surabaya 60286, Indonesia

PENDAHULUAN

Aktivitas transportasi, khususnya kendaraan bermotor, merupakan sumber utama pencemaran udara di daerah perkotaan. Menurut Soedomo, dkk 1990, transportasi darat memberikan kontribusi yang signifikan terhadap setengah dari total emisi PM₁₀, yang terdiri dari sebagian besar timbal, CO, HC, dan Nox di daerah perkotaan, dengan konsentrasi utama terdapat di daerah lalu lintas yang padat, dimana tingkat pencemaran udara sudah dan atau hampir melampaui standar kualitas udara ambient. Pencemaran udara adalah masuknya atau tercampurnya unsur-unsur berbahaya ke dalam atmosfer yang dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan lingkungan, gangguan pada kesehatan manusia, tidak terkecuali terhadap proses kehamilan serta menurunkan kualitas lingkungan. Pencemaran udara juga merupakan masalah besar bagi dunia karena pencemaran udara menyebabkan peningkatan suhu global yang dikenal dengan istilah global warming.

Di Indonesia sekarang ini lebih 70% pencemaran udara disebabkan emisi kendaraan bermotor yang merupakan penghasil emisi gas buang yang buruk, baik akibat perawatan yang kurang memadai ataupun dari penggunaan bahan bakar dengan kualitas kurang baik dan menyumbang hampir 100% timbal, sedangkan 30% pencemaran udara berasal dari sumber tidak bergerak yaitu kegiatan industri, rumah tangga, pembakaran sampah dan lainnya. Kondisi ini diperparah oleh semakin terdesaknya ruang terbuka hijau yang telah efektif mengurangi zat pencemar udara maupun efek kesehatan karena iklim. Dari data BPS tahun 1999, di beberapa propinsi terutama di kota-kota besar seperti Medan, Surabaya dan Jakarta, emisi kendaraan bermotor merupakan kontribusi terbesar terhadap konsentrasi NO₂ dan CO di udara yang jumlahnya lebih dari 50%. Balai Besar Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pemberantasan Penyakit Menular Surabaya melaporkan bahwa hampir semua parameter dalam baku mutu udara ambien pada beberapa kota di wilayah Jawa Timur telah melewati ambang batas yang ditentukan oleh pemerintah.⁵ Penurunan kualitas udara yang terus terjadi selama beberapa tahun terakhir menunjukkan betapa pentingnya digalakkan usaha-usaha pengurangan emisi

Unsur kandungan partikulat adalah karbon, SOF (*Soluble Organic Fraction*), debu, SO₄, dan H₂O. *Particulate matter* telah lama diketahui dapat menyebabkan inflamasi pada sistem pernafasan dan kardiovaskuler serta dapat melewati barier plasenta sehingga dapat mempengaruhi janin. Paparan partikulat jelaga menyebabkan peningkatan kadar MDA dan berpengaruh pada luaran kebuntingan pada plasenta tikus putih.^{1,7,12,23} Peningkatan kadar PM pada penelitian

terdahulu ternyata juga berhubungan dengan peningkatan kejadian *intra uterine growth restriction* (IUGR), yang terinduksi pada awal tahap perkembangan. Partikulat soot atau jelaga ini dapat melewati sawar plasenta dan mempengaruhi janin sehingga menyebabkan terjadinya IUGR.^{17,20,22,28,27}

IUGR merupakan penyebab utama terjadinya bayi berat lahir rendah (BBLR) di negara berkembang. Data yang dikeluarkan Direktorat Bina Kesehatan Ibu Departemen Kesehatan Republik Indonesia tahun 2005 menyatakan bahwa kematian bayi terbanyak terjadi pada usia kurang dari satu bulan yaitu sekitar 40% dengan penyebab kematian terbesar adalah BBLR yaitu sekitar 29%.¹⁶ Kejadian IUGR bervariasi antara 3% sampai 10%, tergantung pada populasi, geografi dan definisi yang digunakan. Sekitar sepertiga IUGR berasal dari kelompok kehamilan yang diketahui tidak mempunyai resiko.^{9,11,14,15,24,39}

Pencemaran udara yang berasal dari produk sisa pembakaran diketahui dapat mempengaruhi kesehatan maternal perinatal melalui berbagai mekanisme. Salah satu mekanisme yang diduga berperan adalah terjadinya stres oksidatif yang kemudian akan meningkatkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam tubuh yaitu hidrogen peroksida (H₂O₂) dan radikal hidroksil (OH). Radikal bebas terutama radikal hidroksil (OH) dapat menyebabkan kerusakan sel melalui suatu reaksi rantai yang disebut peroksidasi lipid dengan hasil akhir berupa senyawa yang bersifat toksik terhadap sel, salah satunya adalah malondialdehyde (MDA). Peningkatan kadar MDA pada plasma darah, darah umbilikus dan jaringan plasenta dapat dijadikan indikator terjadinya peningkatan nekrosis dan apoptosis sel inilah yang berperan pada malinsiasi trofoblas sehingga remodeling arteri spiral uterus maternal menjadi terganggu dan peningkatan apoptosis sel menyebabkan penurunan ekspresi anti apoptosis Bcl-2 sehingga ekspresi Bax berlebih. Bax yang diaktifkan oleh Bid menyebabkan *permeability transition pore* (PTP). Membran mitokondria menjadi terbuka sehingga Cytochrome C yang dilepaskan oleh mitokondria ke sitosol akan berinteraksi dengan protein Apaf-1 dan memacu aktivasi pro enzim caspase 9. Jalur intrinsik dan ekstrinsik ini saling berhubungan bila dilihat dari jalur ekstrinsik atau *Death Receptor Pathway* menyebabkan FADD (*Fas Associated Death Domain*) akan jadi satu dengan yang akan mengaktifasi caspase 8 yang akan mengaktifasi caspase 3, 6, 7 sebagai caspase eksekusiner. Beda intrinsik dan ekstrinsik, intrinsik melalui mitokondria (sitokrom c yang mengaktifkan caspase), sedang yang ekstrinsik karena keberadaan FADD/*death domain* yang bersatu membentuk kinase tertentu sehingga akan mengaktifkan caspase 8,9,10 dimana caspase 8,9,10 akan mengaktifkan eksekusiner caspase, selanjutnya

menginduksi aktivasi sisa cascade caspase dan terjadilah apoptosis yang selanjutnya menginduksi perubahan pada jaringan plasenta dan memberikan kontribusi terhadap berat plasenta menjadi lebih rendah serta luaran kehamilan berupa IUGR, berat badan lahir rendah maupun cacat bawaan.^{3,31,42}

Polusi udara merupakan salah satu permasalahan lingkungan yang serius di Indonesia saat ini. Penurunan kualitas udara yang terjadi akibat peningkatan partikulat jelaga dapat mengakibatkan penurunan berat janin dan angka kematian bayi yang juga semakin tinggi. Sampai saat ini belum banyak penelitian tentang pengaruh paparan partikulat jelaga terhadap peningkatan apoptosis pada plasenta. Untuk itu perlu dilakukan penelitian tentang ekspresi Bcl-2, Bax, caspase 8, caspase 3 pada plasenta dengan paparan partikulat jelaga. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dosis dan lama paparan partikulat jelaga terhadap mekanisme molekuler gangguan kebuntingan akibat paparan partikulat jelaga.

BAHAN DAN METODE

Pada penelitian ini dilakukan penelitian jenis eksperimental dengan desain *randomized post test only control group design*. Digunakan hewan coba tikus *Rattus novergicus* sebagai pengganti manusia untuk penelitian yang lebih invasif karena terhalang etis pada pelaksanaannya. Penelitian ini menggunakan bubuk *carbon black* sebagai paparan. Pada penelitian ini yang menjadi populasi adalah tikus (*Rattus novergicus*) yang diperoleh dari unit hewan coba laboratorium yang telah dibuntingkan dan pada hari ke 6-17 diberi paparan partikulat jelaga. Kemudian pada usia kebuntingan hari ke 17 diambil jaringan plasenta dan diperiksa dengan pewarnaan imunohistokimia.

Kriteria inklusi penelitian ini adalah umur dua bulan, berat badan 100 ± 20 gram. Selama satu minggu dimasukkan kandang dan boks paparan agar menyesuaikan dengan kelompok dan lingkungan yang stabil, sebelum digunakan pengujian penelitian. Kriteria eksklusi penelitian adalah tikus yang cacat atau pernah digunakan untuk penelitian lain. Kriteria drop out adalah tikus luka, sakit, atau mati, tidak berhasil di buntingkan. Penelitian ini dilakukan antara bulan April-September 2012 di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Kelaikan etik didapatkan dari komisis etik untuk penelitian di Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya.

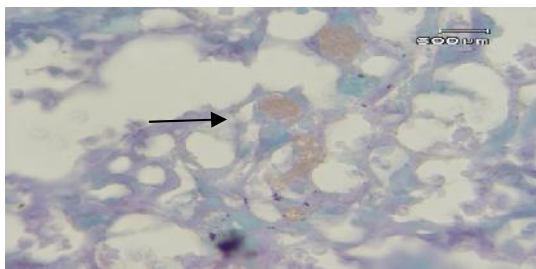
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan tingkat kemaknaan 0,005 (5%)., sehingga bila dalam uji statistik didapatkan $p < 0,05$ dapat dikatakan bermakna, sedangkan bila $p > 0,05$ dikatakan tidak bermakna. Sebelum dilakukan perhitungan untuk membandingkan rasio Bcl-2 dan Bax, Caspase 8, Caspase 3 pada kelima kelompok terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dengan Kolmogorov-Smirnov untuk menentukan uji parametrik atau non parametrik. Hasil uji normalitas ternyata semua variabel penelitian (Bcl-2, Bax, rasio Bcl-2/Bax, Caspase 8, Caspase 3) berdistribusi normal ($p > 0,005$), sehingga uji statistik yang digunakan adalah uji statistik parametrik. Ekspresi Bcl-2 pada kelompok kontrol, P1, P2 dan P3 lebih rendah dibandingkan P4. Hasil uji Anova didapatkan $p = 0,009$ yang berarti ada perbedaan bermakna jumlah ekspresi Bcl-2 antar kelompok perlakuan.

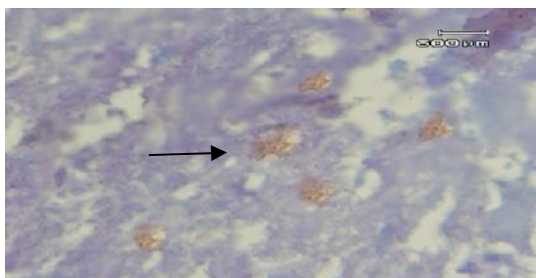
Selanjutnya dilakukan uji LSD (*Least Square Difference*) untuk melihat perbedaan antar lima kelompok. Hasil uji komparasi ganda dapat dilihat bahwa perbedaan antara kelompok kontrol Bcl-2 P0 dengan kelompok perlakuan Bcl-2 P1, P2, P3 tidak ada beda, kelompok kontrol P0 dengan kelompok perlakuan P4 ada perbedaan yang signifikan. Antara kelompok perlakuan Bcl-2 P1 dengan P0, P2, P3 tidak ada perbedaan yang signifikan. Antara kelompok perlakuan Bcl-2 P1 dengan P4 ada perbedaan yang signifikan. Antara kelompok P2 Bcl-2 dengan Kelompok Bcl-2 P0, P1, P3 tidak ada perbedaan yang signifikan. Antara kelompok perlakuan P1 dengan P4 ada perbedaan yang signifikan. Antara kelompok P3 Bcl-2 dengan kelompok P0, P1, P2, P4 tidak ada perbedaan yang signifikan. Antara kelompok P4 dengan kelompok P0 dan P1 ada perbedaan yang signifikan. Antara kelompok P4 dengan P2, P3 tidak ada perbedaan yang signifikan.



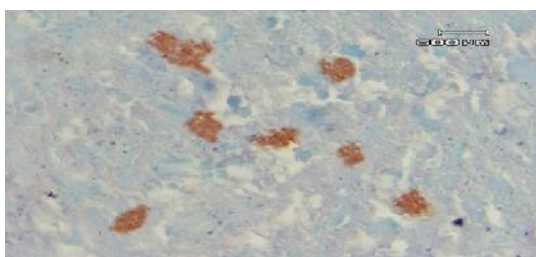
Gambar 1. Ekspresi Bcl-2 tidak nampak adanya sel immunoreaktif



Gambar 2. Menunjukkan ekspresi Bcl-2 dengan intensitas rendah (warna kekuningan)



Gambar 3. Menunjukkan ekspresi Bcl-2 dengan intensitas sedang (warna coklat muda)



Gambar 4. Menunjukkan ekspresi Bcl-2 dengan intensitas kuat (warna coklat tua)

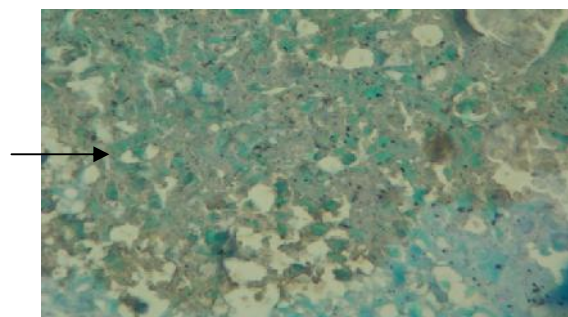
Jumlah ekspresi Bax pada P2 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, P1, P3, P4. Dari hasil uji One-Way Anova didapatkan harga $p = 0,007$ yang berarti ada perbedaan bermakna ekspresi Bax antar kelompok. Rerata Rasio ekspresi Bcl-2/Bax pada kelompok P4 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol, P1, P2, P3. Hasil uji One Way Anova didapatkan harga $p = 0,011$ yang berarti ada perbedaan bermakna rasio ekspresi Bcl-2/Bax antar kelompok. Selanjutnya, dilakukan uji komparasi ganda menggunakan LSD (*Least Square Difference*) untuk melihat perbedaan pada kelima kelompok. Hasil uji komparasi ganda LSD (*Least Square Difference*) dapat dilihat bahwa perbedaan antara kelompok kontrol P0 Bcl-2/Bax dengan kelompok perlakuan Bcl-2/Bax P1 tidak ada perbedaan bermakna rasio ekspresi Bcl-2/Bax. Antara kelompok kontrol P0 Bcl-2/Bax dengan kelompok perlakuan Bcl-2/Bax P2, P3, P4 ada perbedaan bermaknan rasio ekspresi Bcl-2/Bax. Antara

kelompok perlakuan Bcl-2/Bax P1 dengan Kelompok perlakuan Bcl-2/Bax P2 dan P4 ada perbedaan bermakna rasio ekspresi Bcl-2/Bax. Antara kelompok perlakuan P2 Bcl-2/Bax dengan kelompok perlakuan P0 dan P4 tidak ada perbedaan bermakna rasio ekspresi Bcl-2/Bax yang signifikan. Antara kelompok perlakuan P3 Bcl-2/Bax dengan Kelompok P0 Bcl-2/Bax ada perbedaan bermakna rasio ekspresi Bcl-2/Bax. Antara kelompok perlakuan P3 dengan kelompok perlakuan P1, P2, P4 Bcl-2/Bax tidak ada perbedaan bermakna rasio ekspresi Bcl-2/Bax. Antara kelompok perlakuan P4 dengan kelompok P0 dan P1 Bcl-2/Bax ada perbedaan bermakna rasio ekspresi Bcl-2/Bax. Antara kelompok perlakuan P4 dengan kelompok P2 dan P3 tidak ada perbedaan bermakna rasio ekspresi Bcl-2/Bax.

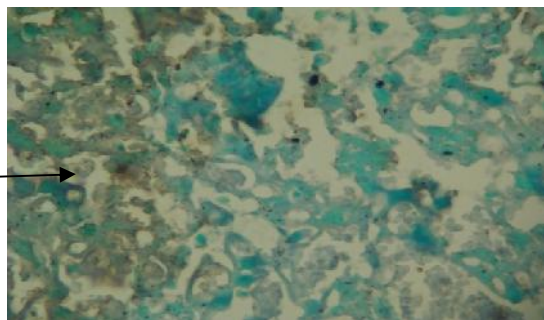


Gambar 5. Ekspresi Bax tidak nampak adanya sel immunoreaktif.

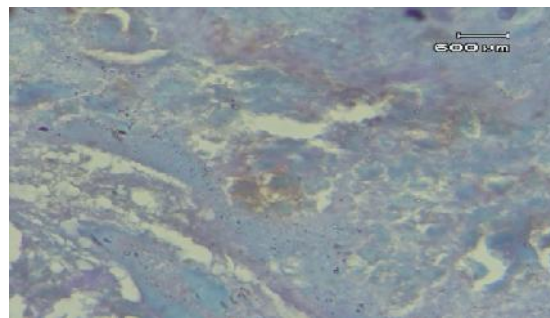
Rerata ekspresi caspase 8 pada kelompok P4 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, P1, P2, P3. Dari hasil uji One Way Anova di dapatkan harga $p = 0,061$ yang berarti tidak ada perbedaan yang bermakna jumlah ekspresi Caspase 8 antar kelompok perlakuan. Rerata ekspresi Caspase 3 pada kelompok P4 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, P1, P2, P3. Dari hasil uji One Way Anova didapatkan harga $p = 0,183$ yang berarti tidak ada perbedaan yang bermakna jumlah ekspresi Caspase 3 antar kelompok perlakuan.



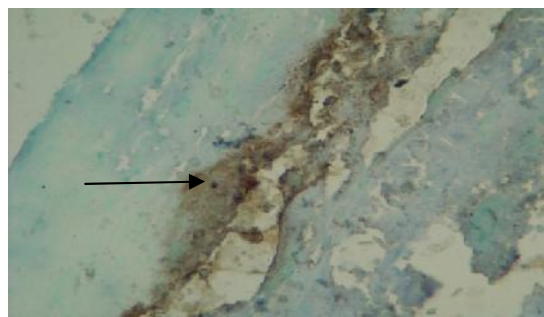
Gambar 6. Menunjukkan ekspresi Bax dengan intensitas rendah (warna kekuningan)



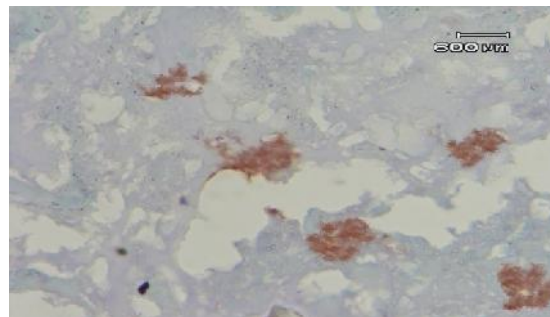
Gambar 7. Menunjukkan ekspresi Bax dengan intensitas sedang (warna coklat muda)



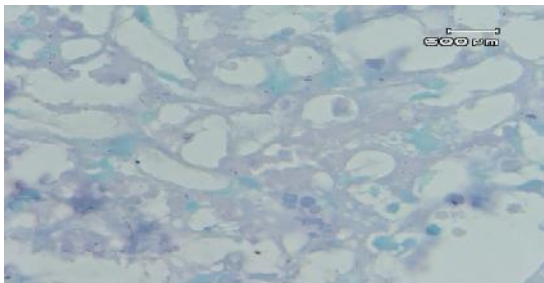
Gambar 11. Menunjukkan ekspresi caspase 8 dengan intensitas sedang (warna coklat muda)



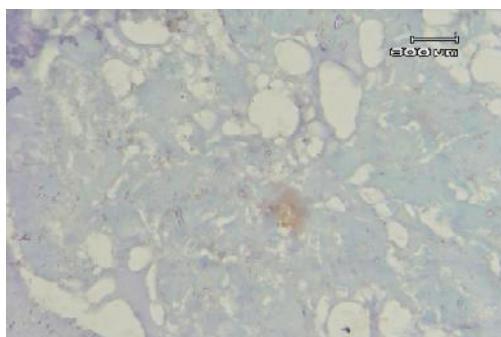
Gambar 8. Menunjukkan ekspresi Bax dengan intensitas kuat (warna coklat tua)



Gambar 12. Menunjukkan ekspresi caspase 8 dengan intensitas kuat (warna coklat tua)

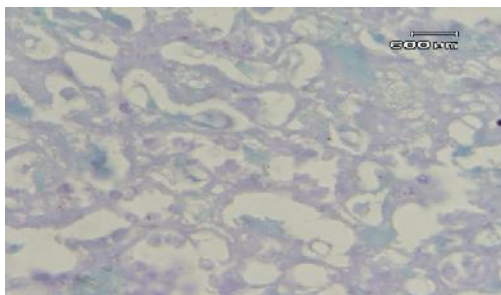


Gambar 9. Ekspresi caspase 8 tidak tampak adanya sel Imunoreaktif

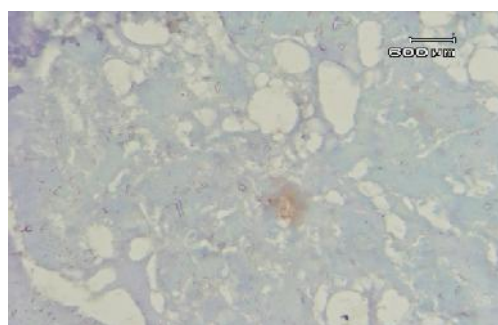


Gambar 10. Ekspresi caspase 8 ekspresi caspase 8 dengan intensitas rendah (kekuningan)

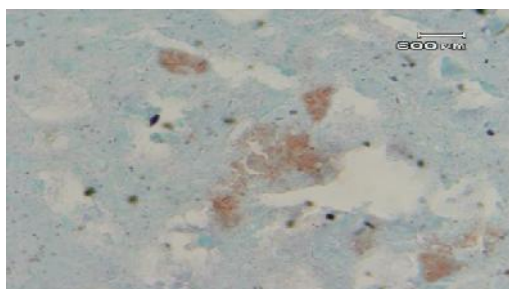
Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan adanya perbedaan rasio ekspresi protein Bcl-2/Bax, ekspresi Caspase 8 dan Caspase 3 yang menunjukkan perubahan molekuler yang mengawali terjadinya apoptosis pada plasenta. Adanya suatu sinyal kematian sel, protein pro-apoptosis melakukan modifikasi *post-translation* termasuk defosforilasi dan pemecahan yang mengakibatkan aktivasi dan tranlokasi mitokondria untuk memacu apoptosis. Respon dari stimulasi apoptosis, menyebabkan membran luar mitokondria menjadi permeabel, yang akan memacu pelepasan sitokrom c dan pemacu caspase. Kedua jalur penginduksi akan bertemu dalam sel dan berubah menjadi famili protein pengeksekusi utama yang dikenal sebagai caspase yang diaktifkan melalui proteolisis dari zymogen. Caspase terbagi atas 2 golongan, caspase 8, 9, 10 sebagai inisiator dalam proses kematian sel, sedangkan caspase 3, 6, 7 sebagai efektor, anggota pro-apoptosis bekerja sebagai promotor. Efek ini lebih tergantung pada keseimbangan antara Bcl-2 dan Bax dibandingkan pada Bcl-2 sendiri.^{25,33,34}



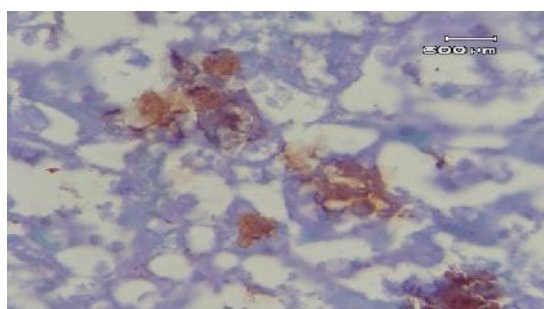
Gambar 13. Ekspresi caspase 3 tidak nampak adanya sel immunoreaktif.



Gambar 14. Menunjukkan ekspresi caspase 3 dengan intensitas rendah (warna kekuningan)



Gambar 15. Menunjukkan ekspresi caspase 3 dengan intensitas sedang (warna coklat muda)



Gambar 16. Menunjukkan ekspresi caspase 3 dengan intensitas kuat (warna coklat tua)

SIMPULAN

Rasio ekspresi Bcl-2/Bax pada plasenta lebih rendah pada kelompok paparan partikulat jelaga dosis 1064 mg/m³ dengan lama paparan 8 jam dibandingkan kelompok kontrol, kelompok dosis 532 mg/m³ lama paparan 4 jam dan 8 jam, kelompok dosis 1064 mg/m³ lama paparan 4 jam. Ekspresi caspase 8 plasenta setelah pemberian paparan partikulat jelaga menunjukkan taraf signifikan nilai $p = 0,061$ ($p > 0,05$) tidak terdapat perbedaan antar kelompok perlakuan. Ekspresi caspase 3 plasenta setelah pemberian paparan partikulat jelaga menunjukkan taraf signifikan nilai $p = 0,183$ ($p > 0,05$) Tidak terdapat perbedaan antar kelompok perlakuan. Pada penelitian ini telah terbukti bahwa dosis paparan partikulat jelaga 1064 mg/m³/4 jam dapat menyebabkan rasio ekspresi Bcl-2/Bax rendah dibandingkan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan P1, P2 dan P3. Oleh karena itu perlu penelitian lanjutan tentang pengaruh paparan partikulat jelaga melalui mekanisme inflamasi dan ekspresi sitokin pro-inflamasi pada plasenta untuk mengetahui jalur yang lebih berpengaruh terhadap mekanisme apoptosis yang terjadi akibat paparan partikulat jelaga.

DAFTAR PUSTAKA

1. Aban M, Cinel L, Arslan M, Dilek U, Kaplanoglu M, Arpachi R and Dilek S. Ekspression of nuclear factor kappa B and placental apoptosis in pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and preeclampsia: An immunohistochemical study. *Tohoku J Exp Med.* 2004;204:195-202
2. Allen RG, Tressini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biol Med.* 2000;28:463-99
3. Biri A, Bozkurt N, Turp A, Kavutcu M, Himmetoglu O and Durak I. Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction. *Ginecol obstet invest.* 2007;64(4):187-92
4. Bailie J. Comprehensive rodent service: breeding systems. Yale animal resources center. Yale University. 2000
5. Balai Besar Teknik Kesehatan Dan Pemberantasan Penyakit Menular (BBTKL dan P2M). Situasi dan kecenderungan parameter pencemar udara dan air minum serta potensi resiko gangguan kesehatan di Jawa Timur 2006-2008. Surabaya. 2009
6. Berhman RE. Nelson textbook of pediatrics. WB Saunders. 14th Eds. USA:Philadelphia;1992
7. Blasio MJ, Gattford K.L, Robinson J and Owens, JA. Placental restriction of fetal growth reduces size at birth and alters postnatal growth, feeding activity, and adiposity in the young lamb. *Am J*

- Physiol regul integr comp physiol. 2006;292:875-86
8. Bobak M. Outdoor air pollution, low birth weight and prematurity. *Environment health perspective*. 2000;108:173-6
 9. Brauner EV, Forchhammer L, Meller P, Simonsen J, Glasius M, Wahlin P, Nielsen OR and Loft S. Exposure to fine particles air and oksidative, stress-induced DNA damage. *Environment Health Perspective*. 2007;115(8):1177-82
 10. Brown DM, Donalson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, Jimenez LA and Stone V. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- α cytokine gene ekspression in macrophages exposed to ultrafine paticles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286:344-53
 11. Carter JD, Ghio AJ, Samet JM and Devlin RB. 'Cytokine production by human airway epitalial cell after exposure to an air pollution particle is metal dependent. *Toxycol. Appl. Parmacol*.1997;146:180-8
 12. Cetin I and Alvino G. Intrauterine growth restriction: Implication for placental metabolism and transport. *A Review. Plecenta* 2009;23:77-82
 13. Chavez SLS, Abrahams VM and Mor G. The role of apoptosis in thr regulation of tropoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocrine reviews*. 2005;26(7):877-97
 14. Cotran RS, Kumar VK and Collins T. *Pathologic basis of desease*.6th Eds. WB Saunder company: Philadelphia; 1999.p. 1-112
 15. Cuningham FG, Mc Donald PC, Gant NF, Levend KJ, Gilstrap LC, Hankins GDV and Clark SL. *William Obstetrics*. 21steds. Prentice Hall International Inc., Stamfoord, USA; 2001.p.69-93, 95-123, 579-605, 745-746, 1309-1311
 16. Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI). *Percepatan penurunan angka kematian ibu, bayi baru lahir dan anak balita*. Direktorat Bina Kesehatan Ibu. Jakarta.2005.
 17. Dejmek J, Selevan SG, Benes I and Sram RJ. Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. *Environmental health perspectives*. 1999;960:475-80
 18. Donalson K., Stone V, Clouter A, Renwick L and Macnee W. Ultrafines particles. *Occupational environment medicine*. 2001;58:211-6
 19. Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, DuffinR, Newby DE, Mills N, Macnee W and Stone V. Combustion derived nanoparticles: A review af their toxicology following inhalation exposure. *Particle and fibre toxicology*. 2005;2:10
 20. Duvekot JJ, Cherix EC and Pieters FAA. Severely impaired growth is preceded by maternal hemodynamic maladaptation in very pregnancy. *Acta. Obtetri Gynecology. Scand*. 1995;74:639-97
 21. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82:47-95
 22. Energy, the environment and health. *World energy assesment: Energy and the challenge of sustainability*.2000. <http://www.undp.org/seed/eap/activities/wea>. Diakses tanggal 5 Mei 2012.
 23. Ere ICT, Dane B, Calay Z, Kaleli S and Aydinli K. Apoptosis in the placenta of pregnancies complicated with IUGR. Presented at the XVI FIGO World Congress of Obstretics and Gynecology, Washington DC. 2000
 24. Folkmann JK, Risom L, Jacobsen NR, Wallin H, LoftS and Meller P. Oksidatively damaged DNA in rat by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes. *Environment health perspective*. 2009;117:703-8
 25. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:178-94
 26. Gupta S, Agarwal A, Benerjee J and Alvares JG. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a Systemic review. *Obtetrical and gynecological survey*. 2007;62(5): 335-45
 27. Halliwell B and Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanismm, measurement, and significance. *Am J Clinical nutrition*. 1993;57:715-255
 28. Hafest ESE. *Reproduction and breeding technic for laboratory animals*. 3rd Eds. Philadelphia; 1970. p. 305
 29. Kaufmann SH, Hengartner MO. Programed cell death : alive and well in the millineum. *Trend cell boil*. 2001;11:526-34
 30. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Cellular adaptations, cell injury, and cell death. In: Robbins and cotran *pathologic basis of disease*. 7th Eds. Philadelphia: Elsevier; 2005. p. 21-30
 31. National Institute of Enviromental Health Science/NIEHS. *Global environment health conference*. San Fransisco California.2007
 32. Proctor PH, Reynolds ES. Free radicals and disease in man. *Physiol Chem Phys Med*. 1984;16:175-95
 33. Tamm I, Schriever F, Dorken B. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet oncol*. 2001;2:33-42
 34. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J cell biol* 1994;124:1-6
 35. Riawan W, Keman K, Wibowati S, Ali M. Peningkatan insiden apoptosis pada sel-sel trofoblas jaringan plasenta preeklampsi berkaitan dengan peningkatan ekspresi p53 dan penurunan PPAR teraktivasi. *Jurnal kedokteran Brawijaya*. 2004;20(3):136-41

36. Ritz B, Yu F, Fruin S, Chapa G, Shaw GM and Harris JA. Ambient air pollution and risk of birth defects in southern California. *American journal of epidemiology*. 2002;155(1):17-25
37. Ritz B and Wilhelm M. Air pollution impacts on infant and children. *UCLA Institute of the environment*. 2005
38. Ritz B and Wilhelm M. Ambient air pollution and adverse birth outcomes: methodologic issues in emerging field. *Basic and clinical pharmacology and toxicology*. 2008;102:182-92
39. Wiknjosastro H. Ilmu kandungan. Edisi kedua. Yayasan bina pustaka Sarwono Prawirohardjo. Jakarta. 1994
40. Soedomo M. Pencemaran udara (kumpulan karya ilmiah). Penerbit ITB. Bandung. 2001.
41. Sudarso. Pengaruh partikel pb yang terkandung dalam gas buang motor bahan bakar premium terhadap respon imun saluran nafas. Disertasi. Universitas air Langga Surabaya. 2003
42. Suryohudoyo P. Kapita selekta ilmu kedokteran molekuler. Sagung seto. Jakarta. 2007
43. Shi T, Schins RF, Knaapen AM, Kuhlbusch T, Pitz M, Heinrich J and Borm JA. Hidroxil radical generation by electron paramagnnetik resonance as a new methode to monitor ambient partikulate matter composition. *J. Environment monitor*. 2003;5:550-6
44. Zainudin A. Methode penelitian program pasca sarjana unair. 2000:73-4