

## Aplikasi Sel Punca pada Uji Toksisitas

### Stem Cells Application in Toxicity Test

Wening Sari

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta

Jalan Letjen. Suprpto, Cempaka Putih, Jakarta 10510

Telephone. 021-4206674, 4206675, 4206676

Correspondence Email: wening.sari@yarsi.ac.id

#### Abstrak

Uji toksisitas penting dilakukan untuk memastikan suatu zat, khususnya calon obat, aman bagi manusia. Penggunaan hewan coba pada uji toksisitas saat ini dibatasi terkait hasil yang tidak sepenuhnya dapat diekstrapolasi pada manusia serta isu hak kesejahteraan hewan. Pengembangan uji toksisitas *in vitro* merupakan upaya *reduction*, *refinement* dan *replacement* penggunaan hewan coba pada penelitian laboratorium. Penggunaan kultur sel primer asal manusia untuk uji *in vitro* menghadapi keterbatasan dalam kesediaan dan konsistensi sumber sel. Sel punca memiliki kemampuan berproliferasi dan berdiferensiasi. Terdapat 3 jenis sel punca yang dapat digunakan sebagai model pada uji toksisitas, yakni sel punca embrional (*embryonic stem cells/ESCs*), sel punca dewasa (*non-embryonic/somatic/adult stem cells*), serta sel punca pluripoten hasil induksi dari sel somatik (*induced pluripotent stem cells/iPSCs*). Aplikasi sel punca pada uji toksisitas dapat digunakan untuk evaluasi toksisitas akut, embriotoksisitas, serta toksisitas terhadap fungsional sel.

**Kata Kunci:** sel punca, uji toksisitas, embriotoksisitas

#### Abstract

*The toxicity tests are important to ensure that a substance, especially a drug candidate, is safe for human. The use of experimental animals in this test is currently limited due to the results that cannot fully extrapolate to humans and the issues of animal welfare rights. The development of in vitro toxicity tests is an effort to reduce, refine and replace animals use in laboratory research. Primary human cells are considered a better option for in vitro toxicology, but they are limited in quantity and consistency of cell sources. Stem cells have the capacity for self-renewal and generation of differentiated cells. There are three types of stem cells that can be used as models in toxicity tests, embryonic stem cells/ESCs, adult stem cells, and induced pluripotent stem cells/iPSCs. Stem cells-based toxicological assay can be used to evaluate cytotoxicity assay, developmental toxicity assay, and cell functional assay.*

**Keywords:** stem cells, toxicity test, embriotoxicity

## Pendahuluan

Pengembangan obat merupakan proses yang sangat panjang, diawali dengan penapisan dan identifikasi zat aktif yang mempunyai potensi terapi hingga disetujui oleh Badan Regulator perijinan dan peredaran obat. Salah satu aspek penting dalam penapisan dan pengembangan zat kimia atau biologis sebagai kandidat obat adalah uji toksisitas preklinik, yang bertujuan mengevaluasi toksisitas dan keamanan zat tersebut pada manusia. Keseimbangan antara keamanan dan kemanjuran harus ditegakkan sebelum obat diaplikasikan pada populasi manusia. Uji toksisitas bertujuan menilai risiko yang mungkin ditimbulkan oleh suatu zat kimia, termasuk zat kimia calon obat, agar dapat menekan bahaya risiko tersebut. Uji toksisitas preklinik juga penting sebagai informasi dasar untuk uji klinik (Guha, 2016).

## Jenis Uji Toksisitas

Uji toksisitas preklinik dapat dibedakan atas uji toksisitas akut, sub kronik dan kronik berdasarkan waktu pajanan bahan uji. Uji toksisitas akut berguna untuk menilai potensi toksisitas akut secara kuantitatif dan gejala toksik yang timbul setelah pemberian tunggal bahan uji. Salah satu parameter yang digunakan pada uji toksisitas akut adalah *lethal dose 50* ( $LD_{50}$ ), yakni dosis yang menyebabkan kematian pada 50% hewan uji. Namun harus diingat bahwa penilaian efek toksik yang ditimbulkan oleh suatu zat toksik tidak mungkin hanya berdasarkan atas  $LD_{50}$ , karena  $LD_{50}$  tidak dapat menyajikan informasi tentang mekanisme atau tipe toksisitas, serta kemungkinan toksisitas jangka panjang. Meskipun demikian penilaian  $LD_{50}$  dapat memberikan kesimpulan secara umum bahwa semakin kecil nilai  $LD_{50}$  maka

semakin toksik bahan yang diuji, demikian juga sebaliknya (Erhirhie *et al.*, 2018).

Uji toksisitas sub kronik bertujuan mendapatkan data tentang paparan berulang bahan uji untuk waktu yang cukup lama yakni 90 hari. Evaluasi hewan uji meliputi kondisi fisiologi (aktivitas lokomotor, tanda vital, berat badan serta interaksi dengan lingkungan), uji biokimia darah, hasil metabolisme, pemeriksaan darah, serta pemeriksaan otopsi kematian pada hewan uji yang menunjukkan gejala toksik. Adapun uji toksisitas kronik bertujuan menilai keamanan zat toksik pada pemberian jangka waktu panjang. Evaluasi hampir sama dengan evaluasi pada uji toksistas subkronik. Otopsi dilakukan setelah selesai pengujian. Uji toksisitas dapat juga dilakukan untuk menilai efek reproduksi, teratogenik, karsinogenik, mutagenik, efek imunologi atau pun toksisitas khusus misalnya pada kulit atau mata (Arome dan Chinedu, 2014).

Saat ini penggunaan hewan coba dalam pengujian efek terapi maupun efek toksik zat kimia semakin dibatasi. *European 7<sup>th</sup> Amendment to Cosmetics Directive* yang disahkan pada tahun 2003 telah membatasi penggunaan hewan coba untuk berbagai tujuan penelitian. Larangan uji toksisitas akut, termasuk uji genotoksisitas, pada hewan coba telah dikeluarkan pada tahun 2009. Pengujian zat penyusun kosmetik pada hewan coba, termasuk pengujian dosis berulang, uji toksisitas reproduksi serta karsinogenik, tidak boleh dilakukan pada produk kosmetik yang dipasarkan di Eropa (Bhattacharya *et al.*, 2011).

Penggunaan hewan coba membutuhkan biaya besar dan menghabiskan banyak waktu, serta untuk sebagian besar orang berpendapat ini bertentangan dengan etik dan hak kesejahteraan hewan. Hal lain yang cukup

penting adalah bahwa hasil yang diperoleh dari pengujian pada hewan coba tidak dapat sepenuhnya diekstrapolasikan pada manusia. Contoh kasus talidomid yang saat uji pra-klinik tidak terdeteksi adanya efek teratogenik pada berbagai spesies, namun saat dipaparkan pada wanita hamil yang berada pada fase kritis perkembangan janin, obat ini terdeteksi secara epidemiologik sebagai teratogen (Jin *et al.*, 2013).

Simpanses yang secara anatomis dan fisiologis paling dekat kemiripannya dengan manusia diharapkan dapat memberikan prediksi yang lebih akurat selama penelitian biomedik. Perbedaan nukleotida simpanses dengan manusia hanya 1-2%, namun perbedaan ini menghasilkan perbedaan 20% pada ekspresi protein dan menghasilkan ekspresi fenotif yang berbeda. Perbedaan-perbedaan ini dapat menyebabkan perbedaan kerentanan terhadap etiologi dan perkembangan penyakit, perbedaan farmakokinetika, efikasi dan toksisitas obat. Selain itu hewan coba mempunyai mekanisme pertahanan fisiologis tersendiri, seperti tipe sel epitel khusus dan enzim-enzim penginduksi, yang efektif mempertahankan diri dari zat toksik di sekitar lingkungan (Knight, 2008).

Pendekatan yang dilakukan adalah dengan mengembangkan metode pengujian secara *in vitro*, menggunakan bakteri, sel primer, sel punca atau jaringan. Kemajuan yang pesat di bidang biologi molekuler dan rekayasa genetika memungkinkan pengujian efek berbagai zat kimia pada jaringan, sel maupun komponen sel (Mori dan Hara, 2013).

### Uji Toksisitas *in vitro*

Pengembangan metode uji toksisitas secara *in vitro* meningkat sejak Russel dan Burch tahun 1959 mempresentasikan konsep 3R, yakni

*reduction*, *refinement* dan *replacement* untuk penggunaan hewan coba pada penelitian laboratorium. *Reduction* berarti penggunaan hewan coba seminimal mungkin untuk mendapatkan data keamanan bahan uji dengan kualitas memadai. *Refinement* mencakup semua pengukuran dan parameter pengujian harus mengurangi nyeri, stres dan ketidaknyamanan hewan coba. *Replacement* artinya metode alternatif yang dapat menggantikan penggunaan hewan coba (Ukelis *et al.*, 2008).

Salah satu metode untuk *replacement* adalah uji toksisitas secara *in vitro*. Uji toksisitas *in vitro* berguna sebagai penapisan awal efek bahan uji, mengurangi penggunaan hewan coba, serta membantu menetapkan rentang dosis yang akan diujikan lebih lanjut. Uji *in vitro* ini juga dapat digunakan untuk menilai integritas membran, reseptor, aktivitas metabolisme sel, aktivitas enzim, serta mekanisme kerja bahan uji dalam menyebabkan cedera atau pun kematian sel. Hal ini merupakan kelebihan dari metode *in vitro*, yakni dapat mendeteksi dengan cepat kerusakan tingkat seluler (Ukelis *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013).

Terdapat 2 jenis lini sel yang telah divalidasi *Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods* (ICCVAM) untuk memprediksikan sitotoksitas secara *in vitro*, yakni sel fibroblas mencit (BABL/c) 3T3 dan sel *Normal Human Keratinocyte* (NHK). Nilai IC50 dari kedua sel tersebut dapat digunakan untuk estimasi LD50 berdasarkan model regresi dari *European Centre for the Validation of Alternative Methods/ECVAM* (Ukelis *et al.*, 2008 dan Prieto *et al.*, 2013):

i) Model regresi *millimole*:

$$\text{Log LD50 (mmol/kg)} = 0,439 \text{ Log IC50 (mM)} + 0,621$$

ii) Model regresi berat:

$$\text{Log LD50 (mg/kg)} = 0,372 \text{ Log IC50} \\ (\mu\text{g/mL}) + 2,024$$

ICCVAM merekomendasikan bahwa korelasi antara metode *in vitro* dan *in vivo* harus dipastikan secara kuantitatif menggunakan paling sedikit 12 zat uji yang mewakili keenam klasifikasi zat berbahaya. Setiap lini sel baru yang akan digunakan dalam uji sitotoksisitas harus seakurat 3T3 dan NHK dalam menguji ke 12 zat uji tersebut (Ukelis, 2008).

### **Pengembangan Uji Toksisitas dengan Sel Punca**

Kultur sel primer asal manusia telah lama menjadi preferensi pada uji toksisitas berbasis sel. Namun tantangan terbesar yang ditemui adalah kesediaan dan konsistensi sumber sel, serta variasi fenotif dalam viabilitas dan fungsi sel yang sulit dikontrol. Salah satu pengembangan uji toksisitas *in vitro* adalah penggunaan *stem cells* atau sel punca. Keuntungan aplikasi sel punca pada uji toksikologi berdasarkan pada kelebihan yang dimiliki oleh sel punca dibandingkan sel primer yakni kemampuan untuk berproliferasi yang tidak terbatas, berdiferensiasi menjadi tipe sel lain, serta tersedia dalam jumlah yang berlimpah sebagai sumber sel manusia. Sel punca dapat menjadi alternatif yang menjanjikan dan inovatif untuk mendapatkan sel dalam jumlah besar untuk pengujian efikasi maupun toksisitas. Teknologi sel punca memungkinkan para peneliti untuk mengetahui mekanisme yang terlibat dalam reaksi efek samping obat sehingga dapat memprediksikan dan menghindari toksisitas pada manusia (Hook, 2012 dan Jennings, 2015).

Saat ini dikenal 3 jenis sel punca yakni sel punca embrional (*embryonic stem cells/ESCs*), sel punca dewasa (*non-*

*embryonic/somatic/adult stem cells*), serta sel punca pluripoten hasil induksi dari sel somatik (*induced pluripotent stem cells/iPSCs*). ESCs berasal dari massa sel bagian dalam embrio (*inner mass cell embryo*) yang diambil saat fase blastosis embrio mamalia. Massa ini mengandung sel induk embrionik yang dapat diisolasi dan dikultur secara *in vitro*. ESCs bersifat pluripoten yakni dapat berdiferensiasi menjadi menjadi berbagai jenis sel yang diinginkan. Sel punca dewasa, dikenal juga sebagai sel progenitor multipoten dewasa (*multipotent adult progenitor cells*), merupakan sekelompok sel yang belum berdiferensiasi pada jaringan yang telah memiliki fungsi spesifik dalam tubuh individu. Sel punca ini ditemukan pada berbagai jaringan tubuh dan berfungsi untuk homeostasis dan memperbaiki kerusakan sel. Sel punca dewasa memiliki sifat multipoten, yakni kemampuan diferensiasinya terbatas pada beberapa jenis tipe sel khusus, tidak seperti pluripoten yang dapat berdiferensiasi menjadi semua jenis sel. Contoh populasi sel punca dewasa adalah sel punca hematopoietik, sel punca mesenkimal, sel punca jantung, sel punca jaringan kulit serta sel punca neural. iPSCs adalah sel dewasa yang diinduksi gen-gen yang memicu pluripotensi sehingga sel tersebut mengalami pemrograman ulang inti sel menjadi sel yang keadaannya mirip sel punca embrional dengan sifat pluripoten (Institute National Health, 2015).

Uji toksisitas berbasis sel punca diklasifikasikan dalam 3 kategori yakni: (i) evaluasi toksisitas akut dengan menilai viabilitas dan *survival rate* sel (*cytotoxicity assay*); (ii) evaluasi penghambatan diferensiasi sel punca menjadi tipe sel lain (*developmental toxicity assay*); (iii) evaluasi untuk menilai aspek

fungsional sel punca (*cell function assay*) (Mori and Hara, 2013).

**Cytotoxicity assay** digunakan untuk menilai viabilitas sel berdasarkan efek kerusakan sel. Parameter yang digunakan adalah nilai IC50, yakni konsentrasi yang menghasilkan hambatan proses biologi (kematian sel) sebesar 50%. Terdapat beberapa metode untuk menilai viabilitas sel antara lain pemeriksaan enzim laktat dehidrogenase, *trypan blue*, MTT dan ambilan *neutral red* (*Neutral Red Uptake/NRU*). Salah satu parameter kematian sel adalah integritas membran sel yang dapat dinilai dengan aktivitas enzim laktat dehidrogenase atau pun pewarnaan *trypan blue*. Laktat dehidrogenase merupakan enzim sitoplasma yang stabil. Saat sel rusak terjadi kebocoran membran dan enzim laktat dehidrogenase cepat dikeluarkan ke supernatan kultur sel. Pada uji sitotoksik *trypan blue*, sel yang mengalami kerusakan membran akan menyerap warna *trypan blue*. Perhitungan jumlah sel yang hidup dibandingkan sel mati dilakukan langsung secara manual pada *hemocytometer*. Metode MTT menggunakan garam kuning tetrazolium, seperti MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]. MTT akan direduksi oleh mitokondria pada sel yang hidup menjadi senyawa formazan berwarna ungu. Absorbansi larutan berwarna ini kemudian dapat diukur menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang antara 500 dan 600 nm. Pemeriksaan NRU berdasarkan kemampuan sel hidup untuk menyerap pewarna *neutral red* dan absorbansi diukur dengan spektrofotometer (Lochmann dan Zimmer, 2005 dan Repetto *et al.*, 2008).

**Developmental toxicity assay** bertujuan mengevaluasi efek embriotoksik suatu bahan uji. Peranan sel punca pada uji ini berguna untuk menilai risiko gangguan

diferensiasi sel punca karena paparan zat uji. Jenis sel punca terbaik untuk pengujian ini adalah ESCs. Sel punca ini menyerupai proses awal perkembangan embrio secara *in vivo* dan memperlihatkan ekspresi profil jaringan spesifik, sehingga dapat digunakan untuk memahami proses yang mendasari organogenesis. Hasil penelitian yang menilai gangguan diferensiasi sel yang disebabkan zat uji dapat digunakan untuk mendeteksi potensi teratogenik atau embriogenik. Sebagai contoh senyawa 5-FU menekan secara bermakna ekspresi gen *Oct4*, *Nanog*, *HDAC9* (berperan dalam diferensiasi sel neuron, sel otot dan sel adipose), *DLKI* (berperan dalam embriogenesis dan diferensiasi sel punca mesenkimal menjadi kondrosit), serta *NFE2 L3* (berperan dalam diferensiasi, inflamasi dan karsinogenesis) pada ESCs asal manusia, yang mengindikasikan bahwa paparan 5-FU menyebabkan multiple malformasi (Liu *et al.*, 2017).

Parameter hasil uji yang dapat dinilai pada pemeriksaan ini antara lain rasio tipe sel spesifik hasil diferensiasi, dan ID50 (*inhibition of differentiation-50*) yakni konsentrasi zat toksikan yang dapat menghambat perkembangan sampai 50%. ID50 dapat dihitung berdasarkan kurva konsentrasi-respon. Parameter hasil uji yang lain dapat berupa gambaran histopatologi, ekspresi gen dan protein spesifik untuk identifikasi tipe sel serta kadar enzim yang merupakan petanda sel hasil diferensiasi serta metabolomik (Seiler *et al.*, 2004; Estevan *et al.*, 2009).

Uji embriotoksisitas *in vitro* menggunakan ESCs (*ESCs test/EST*) dikenalkan oleh Spielmann *et al.* (2004). EST menggunakan 2 jenis lini sel asal mencit yakni ESCs, sebagai model *in vitro* untuk sebagian besar tahap perkembangan embrionik, dan fibroblas 3T3 yang dianggap mewakili sel

jaringan maternal. Data yang diperoleh dari EST adalah nilai konsentrasi zat uji yang menghasilkan hambatan diferensiasi ESCs menjadi kardiomyosit 50% (ID50), serta nilai konsentrasi zat uji yang menghambat proliferasi ESCs dan 3T3 50% (*the half maximal inhibitory concentration/IC50*). Berdasarkan data ID50 ESCs, IC50 ESCs serta IC50 3T3, ditetapkan kurva konsentrasi respon dan model prediksi biostatistik sehingga dihasilkan 3 kriteria zat uji yakni tidak embriotoksik, embriotoksik lemah dan embriotoksik kuat (Estevan *et al.*, 2009; Wobus dan Loser, 2011).

EST divalidasi menggunakan 20 senyawa uji yang telah diketahui embriotoksisitasnya secara *in vivo*. Pada validasi tersebut akurasi EST dalam memprediksikan potensi embriotoksik sekitar 78% untuk senyawa dengan kategori tidak embriotoksik dan embriotoksik lemah, serta 100% untuk senyawa uji dengan kategori embriotoksik kuat. Namun menurut ECVAM hasil validasi ini belum memenuhi kualifikasi bagi metode EST untuk menggantikan uji pada hewan coba (Wobus dan Loser, 2011). Berbagai penelitian dilakukan untuk menyempurnakan EST dengan menambah parameter pengujian berupa diferensiasi SPE menjadi sel dari ketiga lapisan endoderm, mesoderm dan ektoderm, serta ekspresi gen spesifik dari sel pada ketiga lapisan tersebut.

zur Nieden *et al.* (2010) mengembangkan EST dengan menguji efek pensilin G (tidak teratogenik), 5-fluorourasil (teratogenik kuat) serta asam retinoat (osteoteratogenik) terhadap diferensiasi ESCs menjadi osteoblas dengan 4 parameter uji analisis morfometrik dengan program ImageJ, kuantifikasi kalsium, aktivitas alkaline fosfatase dan ekspresi mRNA osteokalsin. Dari keempat

parameter tersebut analisis ImageJ untuk morfometrik dan kuantifikasi kalsium dapat dipercaya sebagai parameter uji untuk menilai efek osteotoksik bahan uji. Pada penelitian tersebut diajukan 2 kategori embriotoksik yakni embriotoksik kuat bila  $\log ID50 < 1$  dan embriotoksik tidak kuat bila  $\log ID50 > 1$ .

Beberapa zat kimia yang telah diketahui bersifat toksik bagi manusia, terbukti bersifat toksik dan menghambat diferensiasi sel punca. Nash *et al.* (2012) membuktikan bahwa etanol menghambat diferensiasi astrosit pada sel punca embrional manusia. Penelitian Sun *et al.* (2012) menunjukkan timbal menghambat proliferasi sel punca mesenchymal asal tali pusat dan mengganggu hematogenesis melalui supresi gen Ang-1, Ang-2 dan VEGF, sedangkan arsen menghambat diferensiasi adiposit pada SPM melalui supresi PPAR- $\alpha$  (Yadav *et al.*, 2013). Hasil-hasil penelitian tersebut menunjukkan uji toksisitas suatu calon obat pada sel punca dapat digunakan untuk memprediksi keamanan calon obat tersebut terhadap proses perkembangan dan diferensiasi janin.

**Cell function assay** berguna untuk menilai ada tidaknya gangguan fungsi sel setelah pemaparan zat toksik. Tes ini dapat dilakukan menggunakan sel-sel primer dewasa yang mempunyai fungsi spesifik. Pengujian fungsi sel hanya dapat dilakukan pada sel dewasa yang fungsinya sudah terbukti dengan jelas. Kriteria lain yang dapat digunakan adalah perubahan bentuk sel dapat digunakan untuk mengevaluasi fisiologi sel (Bhattacharya *et al.*, 2011).

*Cell function assay* pada sel hati menggunakan kemampuan sel hati untuk memetabolisme obat, mensekresi albumin dan menyimpan glikogen. Adapun sel miokardial merupakan model *in vitro* yang sempurna

sebagai media untuk pengujian obat yang bersifat kardiotoxik. Sel miokardial dan sel neuron merupakan jenis sel yang dapat diuji fungsi elektrofisiologiknya dengan mengukur propagasi potensial aksi. Namun ketersediaan sel-sel primer tersebut sangat terbatas. Sel punca dapat berperan sebagai sumber sel-sel primer. Kemampuan sel punca untuk berdiferensiasi menjadi sel kardiomyosit sangat membantu untuk menapis zat-zat atau kandidat obat yang berisiko menyebabkan perpanjangan interval QT atau pun pro-aritmia. Fungsional kardiomyosit telah berhasil dikembangkan dari ESCs. Sel ini menunjukkan morfologi yang sesuai dengan kardiomyosit serta mengekspresikan sejumlah protein kardiomyosit seperti *cardiac actin*, *atrial myosin light chain*, *ventricular myosin light chain*, *myosin-HC*, *atrial natriuretic peptide* serta troponin T dan I. Sel ini juga menunjukkan kemampuan berkontraksi secara ritmis dengan durasi potensial aksi yang lebih panjang dibandingkan kardiomyosit. Kontroversi penggunaan sel punca embrional telah membatasi pengembangan sel kardiomyosit ini, namun masih membuka peluang untuk mengembangkan sel kardiomyosit asal iPSCs (Liu *et al.*, 2013).

### Pemilihan Jenis Sel Punca

Pemilihan jenis sel punca untuk uji toksisitas tergantung pada jenis uji yang akan dilakukan. Sel punca embrional berperan penting dalam memprediksi efek embriotoksik dan teratogenik suatu obat, namun penggunaannya dilarang karena adanya alasan etik. Alternatif lain adalah menggunakan iPSCs. iPSCs mempunyai kemampuan membelah diri tanpa berdiferensiasi untuk periode waktu yang cukup lama. Sel jenis ini juga mempunyai potensi berdiferensiasi menjadi semua jenis sel tubuh.

Teknologi iPSCs memungkinkan untuk mewakili keragaman populasi manusia pada uji *in vitro* dengan membuat sel pluripotent yang personal untuk individu dengan faktor risiko serta predisposisi terhadap paparan penyakit yang berbeda. Selain itu penggunaan iPSCs pada uji toksisitas tidak bertentangan dengan etik (Liu *et al.*, 2017).

Sel punca mesenkimal dapat juga digunakan dalam uji toksisitas. Sel ini juga mempunyai kemampuan berdiferensiasi walau terbatas hanya pada sel-sel tertentu. Penelitian Scanu *et al.* (2011) menunjukkan sel punca mesenkimal asal sumsum tulang manusia mempunyai kemampuan yang sama bahkan lebih baik dibandingkan 3T3 dan NHK dalam memprediksi toksisitas ke 12 zat uji standar yang direkomendasikan ICCVAM. Hasil yang hampir sama ditunjukkan oleh Abud *et al.* (2015) untuk sel punca mesenkimal asal jaringan adiposa manusia.

### Simpulan

Teknologi pengembangan sel punca telah menawarkan peluang untuk pengembangan metode uji toksisitas *in vitro*. Penggunaan sel punca pada uji toksisitas akan mengurangi penggunaan hewan coba, waktu serta biaya penelitian. Kemampuan sel punca untuk berproliferasi dan berdiferensiasi memungkinkan sel punca untuk digunakan pada uji sitotoksitas, embriotoksitas serta fungsional sel.

### Daftar Pustaka

Abud APR, Zych J, Reus TL, Kuligovski C, de Moraes E, Dallagiovanna B, et.al. 2015. The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute

- toxicity test. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*; 73 (3): 992-998.
- Arome D, Chinedu E. The importance of toxicity testing. *J. Pharm. BioSci.* 2013; 4:146-148
- Bhattacharya S, Zhang Q, Carmichael PL, 2011. Boekelheide K, Andersen ME. Toxicity testing in the 21st century: Defining new risk assessment approaches based on perturbation of intracellular toxicity pathway. *Plos One*;6(6):e20887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020887> [cited 2018 October 5]
- Erhirhie EO, Ihekwereme CP, Ildigwe EE. 2018. Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. *Interdiscip Toxicol*;11(1): 5–12.
- Estevan C, Romero AC, Pamies D, Vilanova E, Sogorb MA. 2018. Embryonic stem cells. In Kallos M (Ed). *Toxicological studies, embryonic stem cells - Basic biology to bioengineering*. 2011. <http://www.intechopen.com/books/embryonic-stem-cells-basic-biology-to-bioengineering/embryonic-stem-cells-in-toxicological-studies>. [Cited October 5]
- Guha R. 2016. Preclinical pharmacology and toxicology: Important aspect in drug discovery. *Adv clin Toxic*;1(1):ACT-MS-ID 000101
- Hook LA. 2012. Stem cell technology for drug discovery and development. *Drug discovery today*; 17(7/8):336-41
- Institute National Health. Stem Cell Basics. 2015. Available from: <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics2.aspx> [cited 2018 June 27].
- Jennings P. 2015. The future of in vitro toxicology. *Toxicol in vitro*;29(6):1217-21
- Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon S, Jeon HB. 2013. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci*;14:17986-8001
- Knight A. 2008. Systematic reviews of animal experiments demonstrate poor contributions to human healthcare. *Recent Clinical Trials*;3(2):89–96
- Liu W, Deng Y, Liu Y, Gong W, Deng W. 2013. Stem Cell Models for Drug Discovery and Toxicology Studies. *J Biochem Molecular Toxicology*;27( 1):17 -26
- Liu S, Yin N, Faiola F. 2017. Prospects and frontiers of stem cell toxicology. *Stem Cells and Development*;28(21):1528-36
- Lochmann, D, Zimmer A. 2004. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;288:369–76. doi: 10.1016/j.ijpharm.09.018
- Mori H, Hara M. 2013. Cultured stem cells as tools for toxicological assays. *Journal of Bioscience and Bioengineering*;116(6): 647–52. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.05.028
- Nash R, Krishnamoorthy M, Jenkins A, Csete M. 2012. Human embryonic stem cell model of ethanol-mediated early developmental toxicity. *Exp Neurol*;12;234(1):127–35
- zur Nieden N, Davis LA, Rancourt DE. 2010. Comparing three novel endpoints for developmental osteotoxicity in the embryonic stem cell test. *Toxicology and Applied Pharmacology*;247(2): 91–97. doi: 10.1016/j.taap.2010.05.010
- Prieto P, Cole T, Curren R, Gibson RM, Liebsch M, Raabe H, Toumainen Am, Whelan M, 2013. Kinsner-Ovaskainen A. Assessment of the predictive capacity of the 3T3

- Neutral Red Uptake cytotoxicity test method to identify substances not classified for acute oral toxicity (LD 50 > 2000 mg / kg): Results of an ECVAM validation study. *Regul Toxicol Pharmacol.*;65(3):344-65
- Repetto G, del Peso A, Zurita J. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*; 3(7):1125-31
- Scanu M, Mancuso L, Cao G. 2011. Evaluation of the use of human mesenchymal stem cells for acute toxicity tests. *Toxicol in Vitro.*;25(8):1989–95
- Seiler A, Visan A, Buesen R, Genschow E, Spielmann H. 2004. Improvement of an in vitro stem cell assay for developmental toxicity: The use of molecular endpoints in the embryonic stem cell test. *Reproductive Toxicology*; 18:231–40
- Sun X, Xie Y, Wu L, Zhu W, Hu J, Lu R, Xu W. 2012. Lead acetate reduces the ability of human umbilical cord mesenchymal stem cells to support hematopoiesis in vitro. *Molecular Medicine Reports.*;6:827-32.
- Ukelis U, Kramer PJ, Olejniczak K, Mueller SO. 2008. Replacement of in vivo acute oral toxicity studies by in vitro cytotoxicity methods: Opportunities, limits and regulatory status. *Regul Toxicol Pharmacol.*;51:108-18
- Wobus AM, Loser P. 2011. Present state and future perspectives of using pluripotent stem cells in toxicology research. *Arch Toxicol.*;85:79–117.
- Yadav S, Anbalagan M, Shi Y, Wang F, Wang H. 2013. Toxicology in vitro arsenic inhibits the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells by down-regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma and CCAAT enhancer-binding proteins. *Toxicol in Vitro.*;27(1):211–9.