

Efektivitas Terapi Rat Bone Marrow Stem Cell pada Tikus (*Rattus novvergicus*) Model Sindroma Ovarium Poli Kistik terhadap Keberhasilan Fertilisasi *in vitro* dan Viabilitas Embrio

Widjiati

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

ABSTRAK

Pemanfaatan stem cell untuk pengobatan berbagai macam penyakit meningkat dalam beberapa dekade terakhir ini. Pemanfaatan Rat Bone Marrow Stem Cell (RBMSC) untuk terapi digunakan karena stem cell ini mempunyai kemampuan mengekspresikan gen atau sel tertentu dalam tubuh. Pada kasus Sindroma Ovarium Poli Kistik (SOPK), pemberian Rat Bone Marrow Stem Cell mampu memperbaiki kualitas dan viabilitas embrio yang dihasilkan melalui proses fertilisasi *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan Stem Cell untuk pengobatan SOPK melalui peningkatan angka fertilitasi dan kualitas embrio yang dihasilkan. Manfaat penelitian ini adalah inovasi baru pemanfaatan stem cell untuk terapi SOPK. Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan posttest only control group design menggunakan 32 ekor tikus model SOPK yang secara acak dibagi dalam 2 kelompok, yaitu kelompok I (kontrol) adalah kelompok tikus model SOPK yang diberi medium engle minimum (MEM) sebagai pelarut RBMSC. Kelompok II (perlakuan) adalah kelompok tikus model SOPK yang diberi terapi RBMSC dosis 1.106/ekor. Hasil yang diamati adalah prosentase kualitas sel telur, angka fertilisasi dan viabilitas embrio yang dihasilkan secara melalui proses fertilisasi *in vitro*. Data yang diperoleh di analisis menggunakan Anova dan untuk menguji beda antar kelompok dengan menggunakan uji Tukey HSD. Hasil penelitian pemberian Rat Bone Marrow Stem Cell pada tikus model Polikistik Ovari dapat meningkatkan angka fertilisasi sebesar 64%. Selain itu pemberian Rat Bone Marrow Stem Cell pada tikus model Polikistik Ovari dapat meningkatkan viabilitas embrio sampai tahap blastosis sebesar 75%. Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian Rat Bone Marrow Stem Cell pada tikus model Polikistik Ovari dapat meningkatkan angka fertilisasi dan viabilitas embrio mencapai tahap blastosis. (MOG 2014;22:107-111)

Kata kunci: Sindroma Ovarium Poli Kistik, Folikulogenesis, Fertilisasi *in vitro*, viabilitas embrio

ABSTRACT

The utilization of stem cells for curing various diseases has increased for the last several years. Rat Bone Marrow Stem Cell (RBMSC) used for therapy because it can express gene or certain cells in the body. Rat Bone Marrow Stem Cell administration of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) can improve the quality and viability of embryo resulted from *in-vitro* fertilization. The objective of this research was to utilize stem cells for PCOS medication through increased fertilization rate and embryo quality. The significance of this research was an innovation in stem cells utilization for PCOS therapy. The research was an experimental research with post test only control group design using 32 rats of PCOS model randomly divided into 2 groups, that is, Group I (control group) was a rat group of PCOS model given with Medium Engle Minimum (MEM) as the solvent of RBMSC and Group II (treatment group) was a rat group of PCOS model given with RBMSC therapy with a dosage of 1.10/10/rat. The results revealed the percentage of ovary cell, fertilization rate, and embryo viability resulted from *in-vitro* fertilization. The data obtained were analyzed using Anova test and to differentiate groups, Tukey HSD test was used. The result of the experiment of Rat Bone Marrow Stem Cell administration on rats of polycystic ovary model showed ability to increase fertilization rate by 64%. Besides, the Rat Bone Marrow Stem Cell administration on rats of polycystic ovary model was also able to increase embryo viability up to blastocyst stage by 75%. In conclusion, Rat Bone Marrow Stem Cell administration on rats of polycystic ovary model is able to increase fertilization rate and embryo viability up to blastocyst stage. (MOG 2014;22:107-111)

Keywords: Polycystic Ovary Syndrome, folliculogenesis, *in-vitro* fertilization, embryo viability

Correspondence: Widjiati, Fakultas Kedokteran Hewan, Kampus C Universitas Airlangga, Jl. Mulyorejo, Surabaya 60115, Telp.031.5992785, Fax 0315993015, Email : widjiati@yahoo.com

PENDAHULUAN

Sindroma Ovarium Poli Kistik (SOPK) merupakan kelainan endokrin yang paling sering dijumpai pada wanita usia reproduksi dengan prevalensi 4-12%. SOPK sendiri merupakan suatu masalah heterogen dengan

gejala yang sangat kompleks.¹ Semenjak diperkenalkan oleh sarjana Stein dan Leventhal pada tahun 1925-1935 sampai sekarang belum diketahui secara pasti penyebab utamanya. Kemungkinan penyebabnya multifaktorial serta poligenik. Angka kejadian ovarium polikistik tertinggi adalah 52% pada para imigran Asia Selatan, di

Inggris 41,9% diantaranya mengeluhkan gangguan menstruasi yang tidak teratur.²

Saat ini, minat terhadap *stem cell* untuk pengobatan berbagai macam penyakit meningkat dalam beberapa dekade terakhir ini. Hal itu disebabkan potensi *stem cell* yang sangat menjanjikan untuk terapi berbagai penyakit sehingga menimbulkan harapan baru dalam perbaikan berbagai penyakit.³

Stem cell mempunyai kemampuan berdiferensiasi menjadi sel lain sehingga mampu berkembang menjadi berbagai jenis sel matang. Selain itu *stem cell* mampu meregenerasi dirinya sendiri yaitu dapat membuat salinan sel yang persis sama dengan dirinya melalui pembelahan sel.⁵

Pemanfaatan *Bone Marrow Stem cell* untuk terapi digunakan sebagai alat pembawa transgen ataupun sel ke dalam tubuh karena *stem cell* ini mempunyai kemampuan mengekspresikan gen atau sel tertentu dalam tubuh. *Bone Marrow Stem cell* mempunyai sifat self renewing, sehingga pemberian terapi tidak perlu dilakukan berulang-ulang. Selain itu sifat hematopoietic *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.⁴

Pada kasus SOPK, dengan pemberian *Bone Marrow Stem cell* terjadi peningkatan sekresi kit ligand sebagai inisiasi perkembangan primordial folikel sehingga proses folikulogenesis kembali normal. Berjalannya proses folikulogenesis ini secara langsung akan meningkatkan sekresi beberapa sitokin lokal yang ada di ovarium antara lain *Transforming Growth Factor β* dan hyaluronan sehingga akan menyebabkan terjadinya ekspansi sel kumulus yang akan menginisiasi mekanisme proses maturasi sel telur.⁵ Perbaikan pada proses folikulogenesis secara langsung akan meningkatkan jumlah sel telur, angka fertilisasi dan viabilitas embrio.

Oleh karena itu, pemanfaatan *Bone Marrow Stem cell* untuk terapi SOPK perlu kajian secara biomolekuler reproduksi untuk mengetahui perbaikan proses folikulogenesis, fertilisasi dan viabilitas embrio tahap blastosis sebagai dasar pembuktian kajian secara ilmiah. Penelitian ini menggunakan tikus sebagai hewan model SOPK semata-mata karena faktor etika dan kemudahan penelitian berlangsung.

BAHAN DAN METODE

Pembuatan tikus model SOPK dilakukan dengan penyuntikan hormon testosteron provionat dengan dosis 100 mg/kg bb badan selama 14 hari. Awal penyuntikan

dilakukan pada tahap proestrus. Pada hari ke 15 dilakukan pemeriksaan ulas vagina untuk mengetahui status siklus birahi tikus. Tikus yang mengalami SOPK, pemeriksaan ulas vagina pada hari ke 15 akan menunjukkan tahap diestrus.⁶

Tikus model SOPK dilakukan ulas vagina dengan cara *cutton* dibasahi kemudian dimasukkan dalam vagina diputar-putar, selanjutnya dioleskan pada obyek *glass*, kemudian difiksasi dengan alkohol 70% selama 5 menit. Selanjutnya obyek *glass* ditetesi dengan pewarna giemsa, dibiarkan selama 2-3 menit, kemudian dicuci dengan air dan dikeringkan. Selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop untuk menentukan tahapan siklus birahi yaitu proestrus, estrus, metestrus dan diestrus.

Pada isolasi sumsum tulang tikus, ditambahkan medium MEM, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama selama 10 menit dan diulang sampai 2 kali. Endapan kemudian dikultur dalam medium MEM dan ditambahkan dengan antibiotik, anti jamur dan *Fetal Calf Serum* (FCS) 15%. Dilakukan pasase berulang sampai terbentuk *cell line*.

Penelitian ini menggunakan 32 ekor tikus model SOPK yang secara acak dibagi dalam 2 kelompok terdiri atas kelompok I (kontrol) dan kelompok II (perlakuan). Kelompok I (kontrol) adalah kelompok tikus model SOPK yang diberi *medium engle minimum* (MEM) sebagai pelarut RBMSC. Kelompok II (perlakuan) merupakan kelompok tikus model SOPK yang diberi terapi RBMSC.

Tikus model SOPK diterapi dengan *Rat Bone Marrow Stem cell* yang diperoleh dari hasil kultur sumsum tulang belakang tikus yang dilakukan di Tropical Disease Centre, Universitas Airlangga. Penyuntikan diberikan secara *single dose* dengan dosis 1.106/ekor. Penyuntikan dilakukan secara intra vena pada ekor. Sebelum penyuntikan bagian ekor dihangatkan supaya terjadi vasodilatasi pembuluh darah ekor.

Tikus disuntik dengan hormon *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG) sebanyak 10 IU, 48 jam kemudian disuntik dengan hormon *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG) sebanyak 10 IU, selanjutnya dicampur dengan tikus jantan vasektomi untuk induce ovulation, 17 jam kemudian dilakukan pemeriksaan *vaginal plug*, bila *vaginal plug* positif dilakukan panen sel telur.

Sel telur yang sudah dipanen kemudian dicuci dalam medium PBS sebanyak 3 kali, kemudian dicuci dalam medium M16 sebanyak 3 kali. Sel telur kemudian dipindahkan dalam medium kultur yaitu MEM. Spermatozoa dikapasitasi, kemudian dibenamkan dalam medium kultur yang sudah berisi sel telur dengan dosis

10⁶. Sel telur dan spermatozoa yang sudah dicampur selanjutnya akan dikultur dalam inkubator CO₂ 5% suhu 37°C selama 24 jam untuk mengamati jumlah sigot yang terbentuk. Medium kultur kemudian diganti untuk mencegah kontaminasi embrio. Perkembangan embrio diamati sampai hari kelima sampai embrio mencapai tahap blastosis. Tiap hari dilakukan penghitungan jumlah embrio yang berkembang mencapai tahap 1 sel, 2 sel, 4 sel, morula dan blastosis

Pengumpulan data dilakukan dalam lingkungan yang terkontrol dan terkendali dengan asumsi semua kondisi diusahakan sama. Data yang diperoleh dari folikulogenesis, angka fertilisasi dan viabilitas embrio diuji dengan Anova.⁷

HASIL DAN PEMBAHASAN

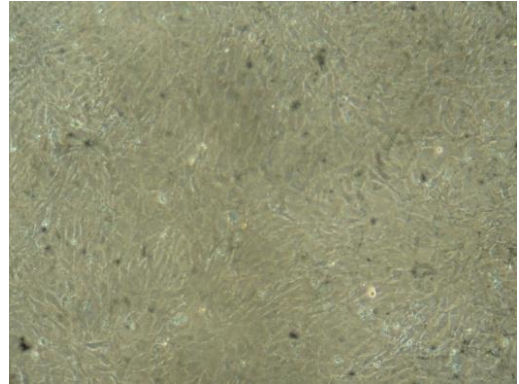
Hewan Model SOPK setelah diterapi dengan *Rat Bone Marrow Stem cell* dosis 1x10⁶/ekor mampu memperbaiki proses folikulogenesis, hal ini dapat dilihat dengan peningkatan jumlah sel telur yang diovulasikan. Terapi *Rat Bone Marrow Stem cell* mampu memperbaiki kualitas sel telur tikus model SOPK. Demikian juga terhadap tingkat fertilisasi menunjukkan bahwa kelompok tikus model SOPK yang tidak mendapat terapi *Rat Bone Marrow Stem cell* tidak ada sel telur yang berhasil terfertilisasi.

Data pada Tabel 1 dan Gambar 4 terlihat perbedaan jumlah sel telur yang terfertilisasi secara *in vitro* antara kelompok tikus model SOPK yang mendapat terapi *Rat Bone Marrow Stem cell* dan tikus model SOPK yang tidak mendapat terapi *Rat Bone Marrow Stem cell*. Angka SOPK Ovari yang mendapat terapi *Rat Bone Marrow Stem cell* lebih tinggi dibandingkan tikus model SOPK yang tidak mendapat terapi *Rat Bone Marrow Stem cell*. Pada gambar 2 menunjukkan hasil fertilisasi *in vitro*, tampak embrio mampu membelah menjadi tahap 2 sel, artinya embrio menciit mampu melewati *cell block* yang merupakan hambatan terbesar setelah terbentuknya sigot.

Hal ini membuktikan tingkat kematangan sel telur yang dihasilkan sangat baik sehingga dapat dibuahi secara *in vitro*. Hasil kultur *Rat Bone Marrow Stem cell* (Gambar 1) yang diberikan pada tikus model SOPK dapat meningkatkan angka fertilisasi *in vitro*. Hasil fertilisasi *in vitro* terlihat pada tabel 1 pada perlakuan Kontrol dan perlakuan RBMSC terlihat adanya perbedaan yang sangat signifikan diantara telur yang tidak terfertilisasi dan yang terfertilisasi ($p < 0,05$).

Perkembangan embrio hasil fertilisasi *in vitro* pada kelompok tikus model SOPK yang mendapat terapi *Rat*

Bone Marrow Stem cell mampu meningkatkan perkembangan embrio secara signifikan. Pada Tabel 2 dan Gambar 5 menunjukkan prosentase daya hidup (viabilitas) embrio yang berkembang mencapai tahap sigot sangat tinggi sekitar 93% dan yang berkembang mencapai tahap blastosis masih sangat tinggi yaitu sekitar 75%.

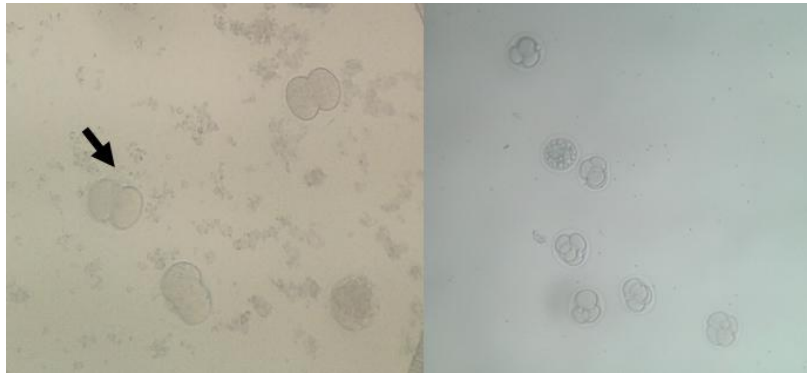


Gambar 1. *Rat Bone Marrow Stem cell* yang akan digunakan sebagai terapi.

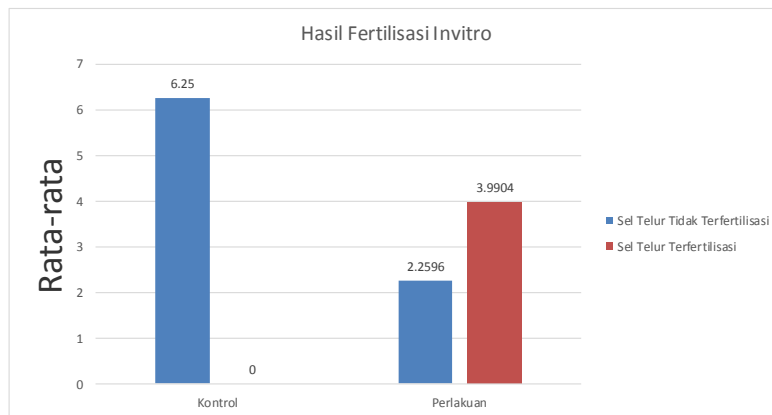


Gambar 2. Penyuntikan *Rat Bone Marrow Stem cell*

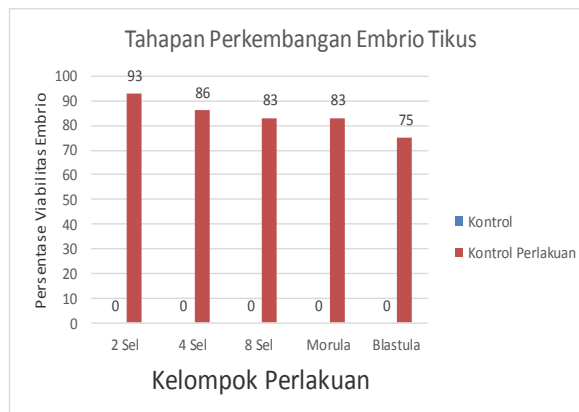
Walaupun dalam perjalanan viabilitas embrio dari tahap sigot sampai tahap blastosis terjadi penurunan jumlah embrio yang berkembang, namun viabilitas embrio mencapai tahap blastosis masih sangat baik. Perkembangan dan viabilitas embrio mencapai tahap blastosis sangat dipengaruhi nutrisi yang ada didalam medium kultur. Oleh karena itu penggantian medium sangat diperlukan untuk mencukupi kebutuhan nutrisi, sehingga embrio mempunyai kemampuan untuk berkembang mencapai tahap berikutnya. Pemberian *Rat Bone Marrow Stem cell* pada tikus model SOPK dapat meningkatkan viabilitas embrio mencapai tahap blastosis.



Gambar 3. Embrio menciit hasil fertilisasi in vitro



Gambar 4. Hasil Fertilisasi in vitro antara kelompok tikus model SOPK yang mendapat terapi dengan *Rat Bone Marrow Stem cell* dan kelompok yang tidak mendapat terapi dengan *Rat Bone Marrow Stem cell*



Gambar 5. Perkembangan embrio hasil Fertilisasi in vitro antara kelompok tikus model SOPK yang mendapat terapi dengan *Rat Bone Marrow Stem cell* dan kelompok yang tidak mendapat terapi dengan *Rat Bone Marrow Stem cell*

Tabel 1. Data hasil fertilisasi *in vitro* tikus model SOPK setelah diterapi dengan *Rat Bone Marrow Stem cell*

Kelompok	Jumlah sel telur yang difertilisasi secara <i>in vitro</i>	Hasil Fertilisasi <i>in vitro</i> (X ±SD)		Signifikansi
		Tidak Terfertilisasi	Fertilisasi	
Kontrol	15	6,25 ± 6,65 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,024
Perlakuan	130	2,26 ± 0,71 ^b	3,99 ± 1,52 ^b	0,000

Keterangan : Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama berbeda nyata

Tabel 2. Rerata viabilitas embrio tahap blastosis hasil kultur *in vitro* pada tikus model SOPK setelah diterapi dengan *Rat Bone Marrow Stem cell*

Kelompok	Jumlah sigot	Tahapan Perkembangan Embrio Tikus				
		2 sel	4 sel	8 sel	Morula	blastosis
Kontrol	0	0	0	0	0	0
Perlakuan	83	77(93%)	71(86%)	70 (83%)	70 (83%)	62 (75%)

SIMPULAN

Pemberian *Rat Bone Marrow Stem cell* pada tikus model Polikistik Ovari dapat meningkatkan angka fertilisasi dan viabilitas embrio mencapai tahap blastosis

DAFTAR PUSTAKA

1. Sheehan MT. Polycystic Ovarian Syndrome: Diagnosis and management. *Clinical Medecine and Research*. 2006;2(1):13-27.
2. Balen AH, Conway G, Hombarg R, Legro RS. Polycystic Ovary Simdrome, a Guide to Clinical Management. Taylor and Francis Boca Raton. 2005;1-142.
3. Saputra V. Dasar-dasar *Stem cell* dan potensi aplikasinya dalam ilmu kedokteran. *Cermin dunia kedokteran*. 153:21-5.
4. Jamur MC, GrodzkiACG, Moreno AN, deMello LFC, Pastor MVD, Berenstein EH, Siraganian RFP, Oliver C. Identification and isolation of rat *Bone Marrow*-derivet mast cells using the mast cell-specific monoclonal antibody AA4. *J of Histochemistry and Cytochemistry*. 2001;49920: 219-28.
5. Le HJ, selesmiami K, Niikura Y, Niikura T, Klein R, Dombkowski DM, Tilly JL. *Bone Marrow* transplantation generates immature oocytes and rescues long term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy indued premature ovarian failure. 2007;25(22):3198-204.
6. Budi Santoso, Prajitno Prabowo R, Soetjipto, Widjiati. The Comparison of MMP-9 Activity and TIMP-1 activity to increasing Collagen-4 Expresion in Model Polycystic Ovary Syndrome and the one with normal estrus cyclephase. National Seminar of Translational, Fakultas of Medicine Airlangga University. 2008;126.
7. Steel RGD, Torrie JH. Prinsip dan prosedur Statistika. Jakarta: PT. Gramedia; 1991.