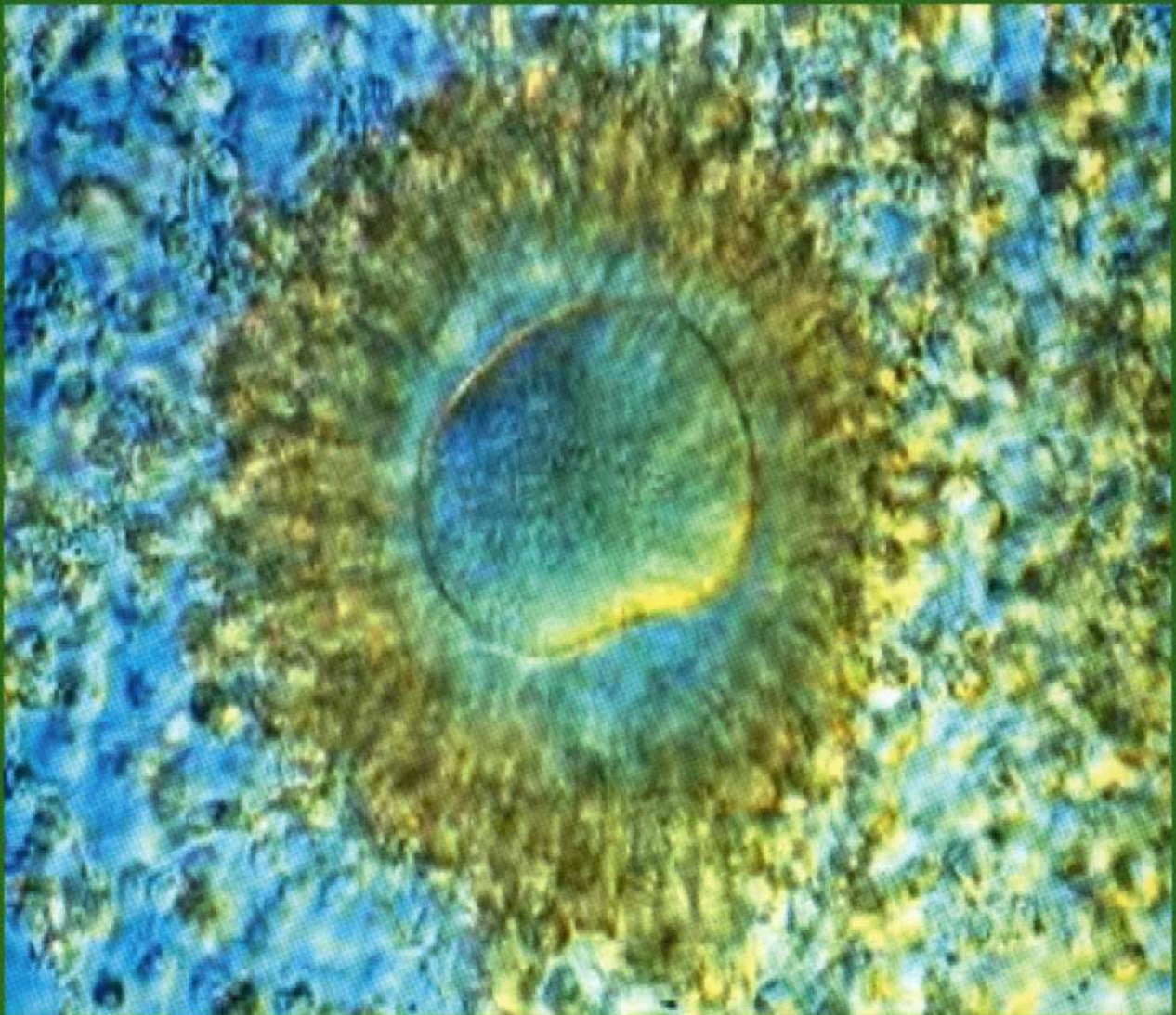


Majalah
Obstetri &
Ginekologi



MOG	Vol. 22	No. 2	Hlm. 53-	Mei - Ags 2014	ISSN 0854-0381
-----	---------	-------	----------	----------------	-------------------

Suplementasi Kurkumin untuk Perbaikan Maturasi Oosit dan Hasil Fertilisasi in vitro pada Mencit Model Endometriosis

Hendarto H¹, Widjiati², Johari S¹

¹Departemen Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran

²Laboratorium Fertilisasi In Vitro, Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga, Surabaya

ABSTRAK

Endometriosis didefinisikan sebagai adanya jaringan seperti endometrium di luar rahim, yang menginduksi reaksi inflamasi kronis. Hasil pengobatan endometriosis terutama pada infertilitas tetap tidak memuaskan dengan tingkat kehamilan yang rendah. Curcumin, yang berpotensi anti-oksidan dan anti-inflamasi, berperan memperbaiki gangguan folikulogenesis. Namun peran kurkumin pada oosit dan embrio masih belum jelas. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi apakah kurkumin berperan pada maturasi oosit dan hasil fertilisasi in vitro. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium menggunakan hewan coba. Endometriosis diinduksi dengan pemberian siklosporin A, jaringan endometrium manusia oestradiol pada 76 ekor tikus. Subjek penelitian dibagi menjadi 2 kelompok: kurkumin dan suplemen plasebo. Stimulasi ovarium dilakukan dengan menggunakan PMSG dan hCG untuk mengevaluasi pematangan oosit dengan menganalisis GV, GVBD, metafase I dan metafase II. Fertilisasi in vitro dilakukan untuk mengklarifikasi polar body II sebagai evaluasi hasil fertilisasi. Data dibandingkan dengan student t -test. Jumlah ovum rata-rata kelompok kurkumin ($15,42 \pm 3,17$) secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok plasebo ($8,21 \pm 2,82$) ($p < 0,0001$). Maturasi oosit termasuk GV, GVBD, metaphase I dan II metafase lebih baik, terutama tingginya jumlah metafase II pematangan (37,2%) pada kelompok kurkumin. Hasil fertilisasi invitro pada kelompok kurkumin ($15,26 \pm 3,21$) secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok plasebo ($5,57 \pm 3,18$) ($p = 0,000$). Simpulan, pada percobaan tikus endometriosis, suplemen kurkumin dapat meningkatkan maturasi oosit dan hasil fertilisasi. (MOG 2014;22:53-57)

Kata kunci: curcumin, endometriosis, maturasi oosit, hasil fertilisasi

ABSTRACT

Endometriosis is defined as the presence of endometrial-like tissue outside the uterus, which induces a chronic inflammatory reaction. The outcome of endometriosis treatment especially in infertility remain unsatisfied with low pregnancy rate. Curcumin, a potent anti-oxidant and anti-inflammation turmeric, had role on improvement of folliculogenesis disturbance but the role of curcumin on oocyte and embryo still unclear. The purpose of this study was to evaluate whether curcumin had role on oocyte maturation and fertilization result in invitro fertilization. This was an animal laboratory experimental study. Endometriosis was induced by administration of cyclosporine A, human endometrium tissue and ethynil estradiol in 76 mice. Study subject was divided into 2 groups : curcumin and placebo supplementation. Ovarian stimulation was conducted using PMSG and hCG to evaluate oocyte maturation by analyzing GV, GVBD, metaphase I and metaphase II. In vitro fertilization was performed to clarify II polar body as fertilization result evaluation. Data were compared by student t-test. The mean ovum number of curcumin group (15.42 ± 3.17) was significantly higher than those of placebo group (8.21 ± 2.82) ($p < 0.0001$). Oocyte maturation including GV, GVBD, metaphase I and metaphase II was better, especially the high number of metaphase II maturation (37.2 %) on curcumin group. Fertilization result of invitro fertilization on curcumin group (15.26 ± 3.21) was significantly higher than those of placebo group (5.57 ± 3.18) ($p=0.000$). In conclusion, on experimental endometriosis in mice, curcumin supplementation may improve oocyte maturation and fertilization result. (MOG 2014;22:53-57)

Keywords: curcumin, endometriosis, oocyte maturation, fertilization result

Correspondence: Hendy Hendarto, Departemen Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, RSUD Dr. Soetomo, Jl Mayjen Prof Moestopo 6-8, Surabaya 60268, email : hndhendy@yahoo.com.

PENDAHULUAN

Endometriosis merupakan penyakit ginekologi yang sering dijumpai pada perempuan usia reproduksi dengan memberikan keluhan nyeri dan infertilitas sehingga menyebabkan penurunan kualitas hidup. Endometriosis ditandai dengan adanya jaringan seperti endometrium

berada diluar kavum uteri yang akan menginduksi reaksi inflamasi kronis.¹ Walaupun patogenesis masih diperdebatkan terutama pada stadium minimal dan ringan, endometriosis akan menyebabkan infertilitas yang sulit diatasi. Hal ini terbukti pada penelitian Barnhart yang mendapatkan bahwa angka kehamilan dengan fertilisasi in vitro pada pasien endometriosis

lebih rendah dibandingkan dengan pasien infertilitas karena faktor tuba. Pada penelitian tersebut didapatkan juga bahwa angka fertilisasi, angka implantasi dan jumlah oosit yang didapat pada pasien endometriosis saat fertilisasi in vitro lebih rendah secara bermakna.^{2,3} Penatalaksanaan endometriosis dapat dilakukan melalui beberapa cara, yaitu terapi medisinalis, bedah, dan Medically Assisted Reproduction, yang dapat berupa inseminasi intra uteri atau fertilisasi in vitro.^{4,5} Hughes dkk menyimpulkan bahwa terapi medisinalis dengan menggunakan obat hormon misal pil kontrasepsi, Danzol dan GnRH agonist untuk supresi ovarium pada pasien endometriosis dengan infertilitas ternyata tidak efektif.⁶ Disamping tidak efektif, terapi medisinalis dengan obat hormon membuat suasana hipoestrogen dan tidak terjadi ovulasi. Suasana hipoestrogen menyebabkan pemberian terapi medisinalis menjadi sangat terbatas karena supresi ovarium jangka panjang akan mengurangi masa tulang hingga berisiko terjadi osteoporosis.⁷ Karena itu mendapatkan strategi alternatif terapi medisinalis yang ideal untuk endometriosis perlu dipikirkan.

Curcumin, kandungan penting dari curcuminoid suatu herbal turmeric, mempunyai sejarah panjang sebagai obat tradisional yang mempunyai potensi anti proliferasi, anti inflamasi dan anti oksidan.⁸ Terdapat sedikit data tentang penggunaan Curcumin untuk menekan perkembangan penyakit endometriosis, salah satu adalah Swarnakar dan Paul melaporkan khasiat anti endometriosis pada Curcumin melalui jalur MMP-9, sedangkan Jana mendapatkan Curcumin dosis 48 mg/kg bb akan menekan aktivitas MMP-2 melalui peningkatan ekspresi TIMP-2.^{9,10}

Pada penelitian kami sebelumnya telah dibuktikan bahwa curcumin mampu memperbaiki folikulogenesis abnormal pada mencit model endometriosis melalui perubahan ekspresi Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) dan KitLigand,¹¹ namun sampai saat ini khasiat Curcumin pada oosit dan hasil fertilisasi masih belum ada. Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari pengaruh suplementasi kurkumin terhadap maturasi oosit yang meliputi bentuk Germinal Vesicle (GV), Germinal Vesicle Break Down (GVBD), Metaphase-1 dan Metaphase-2 serta hasil fertilisasi berupa gambaran Polar body 2 pada ovarium hewan coba model endometriosis yang dilakukan fertilisasi in vitro.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain random secara buta ganda. Populasi pada penelitian ini adalah mencit coba (mus

musculus) unit hewan coba laboratorium. Untuk membuat model endometriosis, mencit disuntik siklosporin A 10 mg/kg/hari IM pada paha mencit. Selanjutnya dilakukan penyuntikan jaringan endometrium wanita pada mencit secara membuta pada rongga peritoneum dengan perlahan selama 60 detik. Jaringan endometrium diambil dari bahan uterus tumor jinak, yang disimpan di PBS (phosphate buffered saline). Dilakukan washing 2 x dengan alat sentrifugal dengan putaran 2500 rpm. Supernatan dibuang kemudian ditambahkan PBS, penicillin 200 IU/ml dan streptomisin 200 µgr/ml. diambil dengan syringe 3 ml jaringan basah endometrium. Dosis yang diberikan pada mencit adalah 0,1 ml. Berikutnya dilakukan pemberian estrogen 5,4 µgr IM pada femur pada hari 1 dan 5 setelah perlakuan penyuntikan endometrium wanita. Pada hari ke 14 diharapkan telah menjadi mencit model endometriosis.

Pada stimulasi ovarium dengan PMSG dan hCG mencit model endometriosis disuntik PMSG 5 IU, 48 jam kemudian disuntik hCG 5 IU dan mencit langsung dikumpulkan dengan mencit pejantan vasektomi. Setelah 17 jam dilakukan pemeriksaan vaginal plug, jika positif dilakukan pembilasan. Uterus dipreparir dan tuba falopii diangkat dilakukan pembilasan dengan PBS. Tuba falopii diletakkan di cawan petri untuk dilakukan panen (flushing) sel telur dibawah mikroskop inverted dengan merobek kantong fertilisasi. Dengan metode pewarnaan Aceto Orcein 1% dilakukan penilaian maturasi oosit stadium: Germinal Vesicle (GV), Germinal Vesicle Break Down (GVBD), Metafase I dan Metafase II.

Pada fertilisasi in vitro, sel telur yang sudah dikoleksi dicuci dengan medium PBS 3 kali, kemudian dicuci dengan medium M16 sebanyak 3 kali. Selanjutnya sel telur dipindahkan didalam medium M16 drop. Spermatozoa yang sudah dipreparasi dimasukan ke dalam medium drop yang berisi sel telur dengan dosis 200.000. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator CO2 5% selama 24 jam. Kemudian diamati jumlah zigot yang terbentuk.

Pemeriksaan viabilitas embrio dilakukan dengan pengamatan dibawah mikroskop untuk melihat adanya Polar Body 2 atau tidak. Adanya Polar Body 2 menunjukkan telah terjadi proses fertilisasi pada oosit oleh sperma, yang sekaligus untuk penelitian ini menunjukkan viabilitas embrio yang baik. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Oktober 2010 di Laboratorium Fertilisasi In Vitro Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Kelaikan etik penelitian ini didapatkan pada Komisi Etik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan adalah 76 ekor mencit yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Penelitian ini melihat hasil perbaikan folikulogenesis karena suplementasi kurkumin terhadap jumlah dan maturasi ovum serta viabilitas embrio hasil fertilisasi in vitro. Pada tabel 1 tampak jumlah kumulatif ovum pada tiap lapang pandang mikroskop pembesaran 40x, hasilnya ada perbedaan yang bermakna rerata jumlah ovum antara kelompok kurkumin dan kelompok plasebo.

Tabel 1. Perbedaan jumlah ovum antara kelompok kurkumin dan kelompok plasebo

	Rerata jumlah ovum	
Perlakuan (Kirkumin)	15,42 ± 3,17	p < 0,0001
Kontrol (Plasebo)	8,21 ± 2,82	

Pada penelitian ini dievaluasi juga gambaran maturasi ovum yang terdiri dari GV, GVBD, Metafase I dan Metafase II pada kelompok perlakuan kurkumin dibandingkan dengan kelompok plasebo. Jumlah gambaran maturasi GV didapat dari kumulatif ovum yang telah melalui proses pengecatan aceto-orsein 1% pada tiap lapang pandang mikroskop pembesaran 400x, didapatkan rata-rata jumlah ovum GV pada kelompok kurkumin 3,37 ± 1,34 lebih rendah dibanding kelompok plasebo 8,21 ± 2,82. Dengan p < 0,001 yang berarti ada perbedaan yang bermakna rerata jumlah gambaran maturasi GV antara kelompok kurkumin dan kelompok plasebo

Tabel 2. Perbedaan maturasi ovum berupa GV antara kelompok kurkumin dan kelompok plasebo

	Rerata maturasi ovum berupa GV	
Perlakuan (kirkumin)	3,37 ± 1,34	p < 0,0001
Kontrol (plasebo)	8,21 ± 2,82	

Jumlah gambaran maturasi GVBD pada kelompok kurkumin didapatkan median jumlah ovum 1 (0-6) lebih tinggi dibanding kelompok plasebo yang tidak ditemukan ovum GVBD. Dengan harga p < 0,0001 berarti ada perbedaan bermakna gambaran maturasi ovum GVBD antara kelompok kurkumin dibanding kelompok plasebo.

Jumlah gambaran maturasi Metafase I didapatkan median jumlah ovum pada kelompok kurkumin 5 (2-7)

lebih tinggi dibanding kelompok plasebo yang tidak ditemukan ovum Metafase I. Dengan harga p < 0,05 berarti ada perbedaan bermakna gambaran maturasi ovum MI antara kelompok kurkumin dibanding kelompok plasebo.

Tabel 3. Perbedaan maturasi ovum berupa GVBD antara kelompok kurkumin dan kelompok plasebo

	Median maturasi ovum berupa GVBD	
Perlakuan (kirkumin)	1 (0 – 6)	p < 0,0001
Kontrol (plasebo)	0 (0)	

Tabel 4. Perbedaan maturasi ovum berupa Metafase I antara kelompok kurkumin dan kelompok plasebo

	Median maturasi ovum berupa M I	
Perlakuan (kirkumin)	5 (2 – 7)	p = 0,001
Kontrol (plasebo)	0 (0)	

Gambaran maturasi ovum Metafase II didapatkan median jumlah pada kelompok kurkumin 6 (2-8) lebih tinggi dibanding kelompok plasebo yang tidak ditemukan ovum Metafase II.

Tabel 5. Perbedaan maturasi ovum berupa Metafase II antara kelompok kurkumin dan kelompok plasebo.

	Median maturasi ovum berupa M II	
Perlakuan (kirkumin)	6 (2 – 8)	p = 0,001
Kontrol (plasebo)	0 (0)	

Dengan harga p < 0,05 berarti ada perbedaan bermakna gambaran maturasi ovum M II antara kelompok kurkumin dibanding kelompok plasebo.

Rerata jumlah Polar Bodi 2 pada kelompok kurkumin adalah 15,26±3,21 sedangkan pada kelompok plasebo 5,57±3,18 dengan p = 0,000 berarti terdapat perbedaan bermakna rerata jumlah Polar Bodi antara kelompok perlakuan kurkumin dan plasebo. Suplementasi kurkumin yang mempunyai potensi anti-inflamasi dan anti-oksidan pada penelitian ini akan memperbaiki folikulogenesis melalui penghambatan proses apoptosis sel granulosa. Hal ini dapat dibuktikan bahwa suplementasi kurkumin selama 14 hari ternyata

menghasilkan jumlah ovum yang lebih banyak saat dilakukan stimulasi ovarium dibandingkan dengan pemberian plasebo. Makin banyak banyak jumlah ovum pada program FIV diharapkan akan meningkatkan kemungkinan terjadinya kehamilan. Pada kelompok kurkumin didapatkan ovum dengan tingkat maturasi GVBD (11,3%) dan metafase I (29,7%) menandakan bahwa siklus sel meiosis telah dimulai kembali.

Tabel 6. Perbedaan rerata hasil ferilisasi dengan gambaran Polar Bodi 2 antara kelompok perlakuan kurkumin dan kelompok plasebo

	Rerata Hasil Fertilisasi (Polar Bodi 2)
Perlakuan (Kurkumin)	15,26 ± 3,21
Kontrol (Plasebo)	5,57 ± 3,18

Didapatkannya ovum dengan tingkat maturasi Metafase II tidak 100% pada kelompok kurkumin menandakan bahwa meiosis telah berjalan kembali tetapi masih tertahan kembali oleh karena suatu sebab. Kami menduga TNF- turut berperan atas terjadinya penurunan cadangan cyclin B dalam oosit, sehingga siklus sel terganggu dan pada oosit siklus sel terhenti sebelum metafase II. Kami duga, kumulus sel granulosa penderita endometriosis tidak mampu menyalurkan signal Ca²⁺ ke dalam oosit sehingga tidak terjadi regresi gap junction, hal ini mungkin peran dari banyaknya apoptosis yang terjadi pada sel granulosa. Akibat tidak optimalnya signal Ca²⁺ yang berasal dari sel granulosa penderita endometriosis menyebabkan meiosis tertahan sehingga tampak dari hasil penelitian ini tingkat maturasi ovum pada mencit model endometriosis di kelompok plasebo semuanya berhenti pada maturasi tingkat GV. Pada kelompok yang mendapat suplementasi kurkumin terdapat perbaikan pada apoptosis sel granulosa sehingga meiosis bisa berjalan kembali walaupun masih belum sepenuhnya normal. Diduga kuat bahwa kurkumin dapat mencegah apoptosis sel granulosa dan menurunkan protein kinase A, sehingga MPF dapat teraktivasi dan proses pembelahan meiosis dimulai kembali.

Pengamatan hasil fertilisasi in vitro dilakukan dengan cara melihat gambaran Polar Body 2. Bila terlihat gambaran Polar Body 2 berarti telah terjadi fertilisasi ovum oleh sperma, yang pada penelitian ini dianggap telah terjadi embrio dengan viabilitas yang baik. Polar Body adalah sel yang terdapat didalam ovum, yang merupakan hasil dari proses oogenesis dan meiosis. Pada penelitian ini telah dibuktikan bahwa rerata jumlah gambaran Polar Body 2 pada mencit model endometriosis yang diberi suplementasi kurkumin lebih banyak, yang berarti menghasilkan lebih banyak embrio

dengan viabilitas yang lebih baik dibandingkan diberi plasebo pada fertilisasi in vitro.

SIMPULAN

Pada akhirnya dengan berakhirnya penelitian ini dapat disimpulkan bahwa suplementasi kurkumin pada endometriosis akan memperbaiki maturasi oosit pada stimulasi ovarium dan pada fertilisasi in vitro akan menghasilkan embrio dengan viabilitas yang lebih baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010,

DAFTAR PUSTAKA

- Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 20:2698–2704.
- Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002;77:1148–55.
- ASRM. Endometriosis and infertility: a committee opinion, The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. *Fertil Steril* 2012;98:591–8
- ESHRE Endometriosis Guideline Development Group. Management of women with endometriosis, Guideline of the European Society of Human Reproduction and Embryology. September 2013
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, van der Poel S, The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum Reprod* 2009; 24:2683–2687
- Hughes E, Brown J, Collins JJ, Farquhar C, Fedorkow DM and Vandekerckhove P. Ovulation suppression for endometriosis for women with subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2007
- Nasu K, Nishida M, Ueda T, Yuge A, Takai N, Narahara N. Application of Nuclear-kB inhibitor BAY11-7085 for the treatment of endometriosis: an in vitro study. *American Journal Physiology of Endocrinology and Metabolism* 2007, 293: 16-23.
- Akram M, Shahab-Uddin, Ahmed A, Usmanghani K, Hannan A, Mohiuddin E M. Asif S. Curcuma

- longa and curcumin: a review article. Rom. J. Biol. – Plant Biol., 2010, 55, 2: 65–70
9. Swarnakar S, Paul S. Curcumin arrests endometriosis by downregulation of matrix metalloproteinase-9 activity. Indian J Biochem Biophys. 2009, 46(1):59-65.
 10. Jana S, Rudra DS, Paul S, Snehasikta S. Curcumin delays endometriosis development by inhibiting MMP-2 activity. Indian J Biochem Biophys 2012, 49(5):342-8
 11. Kuswojo H, Sa'adi A, Hendarto H, Samsulhadi, Widjiati. Pengaruh curcumin terhadap ekspresi VEGF dan luas implant endometriosis. Penelitian departemen/SMF Kebidanan dan Penyakit Kandungan FK Unair /RSUD dr Soetomo Surabaya, 2009.