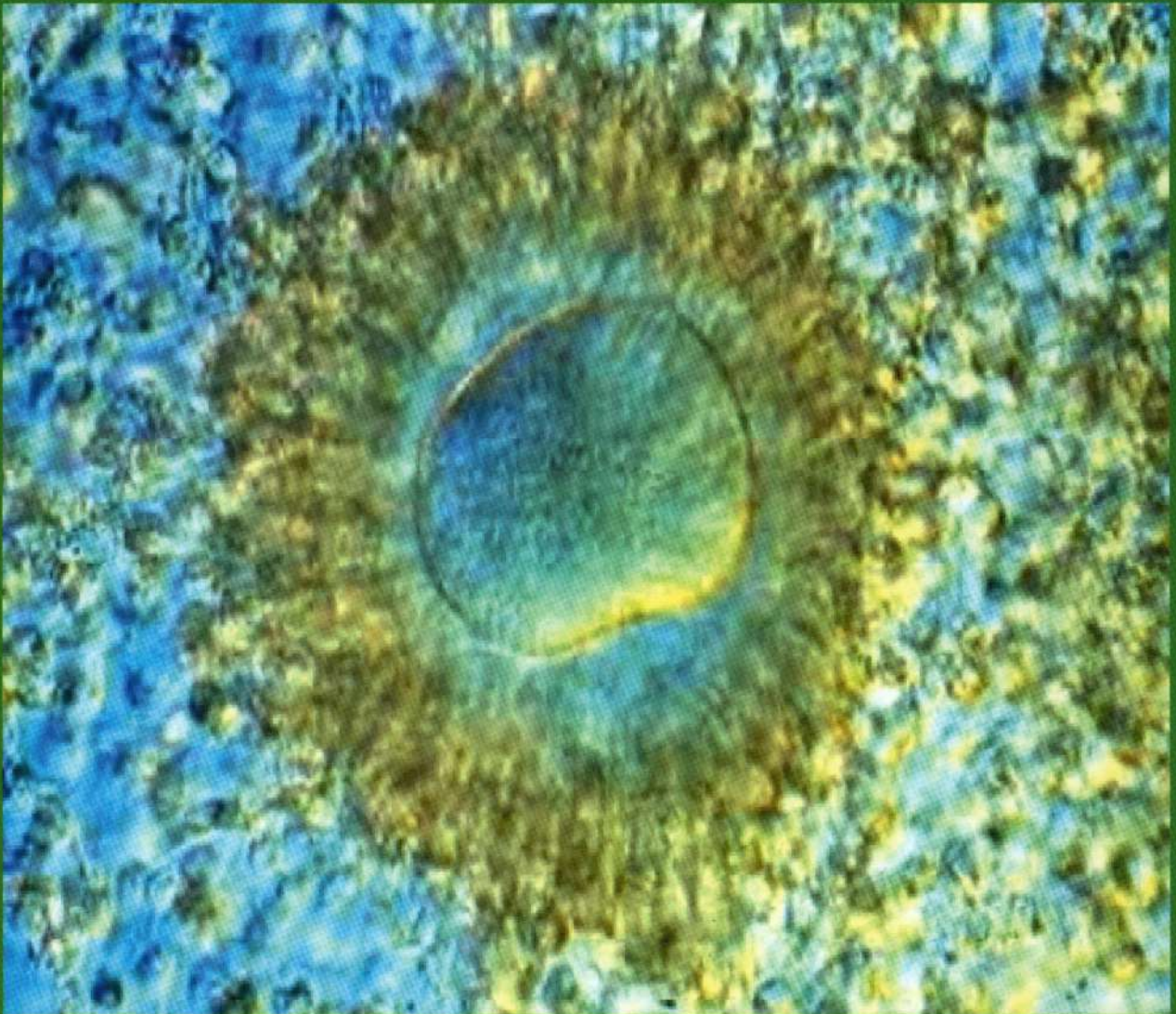


Majalah
Obstetri &
Ginekologi



MOG

Vol. 22

No. 2

Hlm. 53-

Mei - Ags 2014

ISSN
0854-0381

Transplantasi Bone Marrow Stem Cell Memperbaiki Maturasi Oosit pada Tikus Model Insufisiensi Ovarium Memakai Cisplatin

Muhammad Yusuf¹, Hendy Hendarto¹, Suhatno¹, Widjiati²

¹Departemen Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, RSUD Dr. Soetomo Surabaya

²Laboratorium Embriologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya

ABSTRAK

Transplantasi Bone Marrow Stem Cell (BMSC) akan memperbaiki struktur dan fungsi sel yang rusak. Namun masih menjadi pertanyaan apakah folikel hasil transplantasi BMSC mempunyai kualitas dan kapasitas yang sama dengan folikel normal. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh transplantasi sel punca sumsum tulang terhadap maturasi oosit pada tikus model insufisiensi ovarium memakai cisplatin. Penelitian ini menggunakan uji klinik acak tersamar ganda. 27 tikus penelitian dibagi dalam tiga kelompok secara acak, kelompok pertama sebagai kontrol, diinjeksi placebo intraperitoneum. Kelompok kedua adalah kelompok tikus model insufisiensi ovarium yang mendapat suntikan cisplatin 5 mg/kgbb intraperitoneum. Kelompok ketiga adalah kelompok tikus model insufisiensi ovarium yang mendapat transplantasi 2 x 10⁷ sel punca sumsum tulang intravena. Pada ketiga kelompok dilihat gambaran maturasi oosit setelah 2 minggu intervensi terakhir dan dilakukan stimulasi ovarium dengan PMSG dan hCG. Studi ini dilakukan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga setelah dilakukan uji kelayakan etik. Didapatkan perbedaan bermakna gambaran maturasi oosit antara ketiga kelompok dengan p = 0,000 (p<0,05). Perbandingan gambaran maturasi oosit antara kelompok telah dibuat, terdapat perbedaan yang bermakna maturasi oosit antara kelompok 1 dan 2 (p=0.009) dan juga antara kelompok 2 dan 3 (p=0.009), namun tidak didapatkan perbedaan yang bermakna maturasi oosit antara kelompok 1 dan 3 (p=1.000). Simpulan, pada tikus model insufisiensi ovarium memakai cisplatin, transplantasi sel punca sumsum tulang akan memperbaiki maturasi oosit. (MOG 2014;22:66-70)

Kata kunci: maturasi oosit, sel punca sumsum tulang, cisplatin insufisiensi ovarium

ABSTRACT

Bone Marrow Stem Cell (BMSC) transplantation recovers damaged cell structure and function. However, it remains a question whether follicles produced from BMSC transplantation have similar quality and capacity as those of normal ones. The objective of this study was to evaluate the influence of bone marrow stem cell transplantation on oocyte maturation of cisplatin-induced ovarian insufficiency in rat. This was an experimental study with double blind randomized clinical trial design. Twenty seven rats were divided into three group at random, the group 1 as control, injected by placebo intraperitoneum. The group 2 was an ovarian insufficiency model group by using intraperitoneal cisplatin 5 mg/kg body weight for 1 week, the group 3 was an ovarian insufficiency model group transplanted with intravenous 2 x 10⁷ of bone marrow stem cell. All three groups were evaluated for oocyte maturation within two weeks after intervention, we collected oocyte after ovarian stimulation using PMSG and hCG. This study was performed at Faculty of Veterinary, University of Airlangga after eligibility test of ethic committee. The difference of oocyte maturation among three groups were significant p=0,000 (p<0,05). Comparison of oocyte maturation was made between each group, there were a significant differences of oocyte maturation between group 1 and 2 (p=0.009) and also between group 2 and 3 (p=0.009), but there was no significant difference of oocyte maturation between group 1 and 3 (p=1.000). In conclusion, In cisplatin-induced ovarian insufficiency in rat, bone marrow stem cell transplantation may enhances oocyte maturation. (MOG 2014;22:66-70)

Keywords: oocyte maturation, bone marrow stem cell, cisplatin, ovarian insufficiency

Correspondence: Hendy Hendarto, Departemen Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Email: hndhendy@yahoo.com

PENDAHULUAN

Kemajuan teknologi pengobatan kanker telah menyebabkan peningkatan harapan hidup penderita kanker secara bermakna¹. Target utama pengobatan kanker adalah menyelamatkan penderita dari kematian akibat keganasan tersebut, walaupun angka keberhasilan masih rendah tetapi dengan progres terkini dibidang

onkologi telah tercapai peningkatan angka kelangsungan hidup². Sebagai konsekuensi adalah bertambah panjang masa kehidupan bagi penderita yang bisa diselamatkan, perhatian tentu harus diberikan untuk meningkatkan kualitas hidup akibat pengaruh pengobatan kanker yang telah diberikan^{1,2}. Penderita kanker mempunyai pilihan sulit antara mengobati kanker atau mencegah pengaruh terapi kemo pada

organ reproduksinya. Terapi kemo telah terbukti merusak ovarium, organ reproduksi penting bagi perempuan. Kerusakan fungsi ovarium berupa infertilitas dan Premature Ovarian Insufficiency ditemukan pada 70-80% kasus setelah terapi anti kanker. Terapi kemo akan merusak membran sel granulosa dan oosit sehingga menyebabkan atresi folikel secara progresif. Destruksi pada folikel primordial akan berakibat kerusakan akut maupun kronis yang akan berakhir menjadi insufisiensi ovarium dan hilangnya kapasitas reproduksi^{3,4}.

Cisplatin, salah satu obat untuk terapi kemo dari golongan agen alkylating terbukti meningkatkan risiko insufisiensi ovarium, kadar estradiol menjadi turun dan pertumbuhan folikel terganggu serta proses maturasi menjadi terhambat⁵. Beberapa cara telah dicoba untuk mempertahankan fungsi ovarium tetapi belum memberikan hasil yang memuaskan, antara lain teknik preservasi krio jaringan ovarium, pemberian obat GnRHagonis dan transplantasi ovarium donor⁶.

Bone marrow stem cell (BMSC) mempunyai potensi regenerasi dan diferensiasi menjadi sel jaringan lain. Transplantasi BMSC akan memperbaiki struktur dan fungsi sel yang rusak, secara intravena BMSC akan homing dan berdiferensiasi dari sel progenitor menjadi sel target⁷.

Hendarto telah membuktikan transplantasi BMSC memperbaiki lingkungan oosit dengan mereparasi proses folikulogenesis yang ditandai dengan perbaikan ekspresi Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) dan Stem Cell factor (SCF) serta hitung folikel pada tikus model insufisiensi ovarium⁵. Sampai saat ini masih menjadi pertanyaan apakah folikel yang terdiri dari oosit, sel granulosa dan sel teka hasil transplantasi BMSC mempunyai kualitas dan kapasitas yang sama dengan folikel normal. Pada penelitian ini bertujuan melakukan evaluasi pengaruh transplantasi BMSC terhadap maturasi oosit pada tikus model insufisiensi ovarium memakai cisplatin.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain random secara buta ganda. Penelitian dilakukan pada bulan Juli – Agustus 2013, di Laboratorium Hewan Percobaan dan Laboratorium in vitro Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Subyek penelitian adalah tikus coba (*Rattus norvegicus*) yang dibagi dalam 3 kelompok, kelompok 1 sebagai kontrol, diinjeksi NaCl 0,9% intraperitoneum. Kelompok 2 adalah kelompok tikus model insufisiensi ovarium yang diberikan suntikan cisplatin 5 mg/kg bb

intraperitoneum (IP), seminggu kemudian mendapat injeksi placebo NaCl 0,9% IV. Kelompok 3 adalah kelompok tikus model insufisiensi ovarium yang setelah diberi cisplatin, seminggu kemudian mendapat transplantasi 2 x 10⁷ sel BMSC.

Isolasi sel punca sumsum tulang⁸

Dengan menggunakan anestesi lokal, dilakukan koleksi aspirat sumsum tulang yang berasal dari tulang tibia tikus dan selanjutnya ditaruh pada tabung Heparin 15 mL yang berisi -MEM 3 mL. Aspirat ditransfer kedalam tabung blue cap 15 mL dan didilusi dengan PBS, dicuci dengan 2 kali dengan PBS 5 mL. Mencampur dan melapisi setiap aspirat dengan Ficoll dan dilakukan sentrifugasi 1600 rpm selama 15 menit. Koleksi 'buffy coat' yang terletak pada Ficoll-PBS dengan pipet Pasteur dan dilakukan dilusi setiap sampel dengan PBS, campur sebanyak 3-5 kali. Sentrifugasi 1600 rpm selama 10 menit. Aspirasi supernatan dan resuspensi sel dengan dengan CCM 6 mL. Inkubasi sel pada suhu 37°C dengan kelembaban 5% CO₂ selama 24 jam. Tambahkan PBS 2 mL pada kultur, tambahkan CCM 10 mL, dilakukan inkubasi pada suhu 37°C dengan kelembaban 5% CO₂ selama 5-10 hari. Dilakukan pemeriksaan dengan mikroskop electron, Setiap 3 hari cuci sel dengan PBS 5 atau 10 ml dan tambahkan CCM 10 mL, dilanjutkan sampai sel antara 60-80% confluent.

Stimulasi ovarium dengan PMSG dan hCG

Tikus model insufisiensi ovarium disuntik PMSG 10 IU, 48 jam kemudian disuntik hCG 10 IU dan tikus langsung di kumpulkan dengan mencit pejantan vasektomi. Setelah 17 jam dilakukan pemeriksaan vaginal plug, jika positif dilakukan pembilasan. Uterus diprepare 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.

Evaluasi maturasi oosit

Diukur dengan cara meletakkan oosit pada obyek glas lalu dilakukan pengecatan Aceto-Orsein 1% untuk mengetahui gambaran maturasi oosit berupa GV, GVBD, Metafase I, Metafase II. Germinal Vesicle (GV): terlihat sel mengalami suatu ukuran yang disebabkan oleh adanya peningkatan cairan inti dalam jumlah yang banyak sehingga inti terlihat menggelembung dan membran inti masih utuh. Germinal Vesicle Break Down (GVBD) tampak nukleolus dan selaput inti menghilang dan kromosom berkondensasi menjadi suatu bentuk yang kompak.

Metafase I: tampak sitoplasmik mengalami kondensasi dengan benda kutub dan kromosom yang terletak dibidang equator. Metafase II: polar bodi I telah dilepaskan, secara morfologi dikelilingi oleh sel granulosa yang berlapis-lapis (kompak). Tanda pencapaian maturasi inti sel telur. Data yang didapat dilakukan uji normalitas menggunakan uji Kolmogorov Smirnov. Bila data berdistribusi normal dilanjutkan dengan uji parametrik (anova satu arah), bila data tidak berdistribusi normal akan dilanjutkan dengan uji non parametrik (Kruskal-Wallis tes). Kelayakan etik didapatkan dari Komisi Etik Penelitian/Animal Care and Use Committee (ACUC) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah diberi perlakuan, tikus penelitian dikorbankan dan dilakukan pembedahan. Tuba falopii diletakkan di cawan petri untuk dilakukan panen (flushing) sel telur dibawah mikroskop inverted dengan merobek kantong fertilisasi. Pada penelitian ini dilakukan evaluasi jumlah dan maturasi oosit pada tikus model insufisiensi ovarium setelah mendapatkan transplantasi BMSC. Didapatkan hasil: rerata jumlah oosit pada masing-masing kelompok adalah sebagai berikut kelompok 1(Kontrol): $4,55 \pm 3,29$; kelompok 2 (Cisplatin): $0,64 \pm 1,28$ dan kelompok 3(Cisplatin+BMSC): $6,36 \pm 4,24$. Terdapat perbedaan rerata jumlah oosit pada masing-masing kelompok ($p = 0,002$).

Selanjutnya oosit yang dihasilkan, diletakkan pada obyek glas lalu dilakukan pengecatan Aceto-Orsein 1% untuk mengetahui gambaran maturasi oosit berupa GV, GVBD, Metafase I, Metafase II. Didapatkan hasil: rerata maturasi oosit pada masing-masing kelompok adalah sebagai berikut kelompok 1 (Kontrol): $100 \pm 0,00$; kelompok 2 (Cisplatin): $72,91 \pm 21,94$ dan kelompok 3 (Cisplatin+BMSC): $100 \pm 0,00$. Terdapat perbedaan bermakna rerata maturasi oosit pada masing-masing kelompok ($p = 0,000$).

Berikutnya perlu dibandingkan gambaran maturasi oosit kelompok yang satu dibandingkan dengan kelompok yang lain digunakan uji statistik Mann Whitney, didapatkan hasil sebagai berikut : terdapat perbedaan gambaran maturasi oosit antara kelompok 1 (kontrol) dengan kelompok 2 yang mendapat injeksi Cisplatin 5 mg/kgbb ($p = 0,009$), namun tidak didapatkan perbedaan maturasi oosit antara kelompok kontrol dengan kelompok tikus model insufisiensi ovarium yang mendapat transplantasi BMSC ($p = 1,000$). Sedangkan untuk maturasi oosit kelompok 2 dan kelompok 3 didapatkan hasil terdapat perbedaan bermakna ($p = 0,009$).

Pada penelitian ini dilakukan uji statistik untuk melihat perbedaan jumlah oosit pada masing-masing kelompok percobaan. Tampak bahwa pemberian obat terapi khemo Cisplatin yang dilakukan pada kelompok 2 akan menyebabkan penurunan jumlah oosit dibandingkan dengan kelompok kontrol. Cisplatin akan merusak membran sel granulosa dan oosit sehingga komunikasi kedua sel tersebut terganggu^{3,4}. Sesuai dengan penelitian Hendarto terjadi penurunan ekspresi GDF-9 pada oosit dan SCF pada sel granulosa sehingga terjadi gangguan folikulogenesis yang menyebabkan jumlah oosit menurun⁵. Transplantasi BMSC yang dilakukan pada kelompok 3 ternyata mendapatkan hasil jumlah oositnya lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok 2 yang tanpa dilakukan transplantasi BMSC. Keadaan ini menimbulkan pemikiran bahwa BMSC memperbaiki folikulogenesis melalui regenerasi sel yang rusak sehingga jumlah oosit yang dihasilkan menjadi bertambah lagi.

Tabel 1. Rerata maturasi oosit pada masing-masing kelompok

Kelompok	Mean	Median	SD	Min	Max	P
1(kontrol)	100,00	100,00	0,000	100	100	-
2(Cisplatin)	72,91	75,00	21,94	50	93,75	1,000
3(Cisplatin+BMSC)	100,00	100,00	0,000	100	100	-

Stem Cell mempunyai keistimewaan yaitu mampu berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel somatik. Dengan kemampuan ini setelah sampai pada lokasi kerusakan sel dalam jaringan tubuh akan mampu berdiferensiasi menjadi sel somatik jaringan tubuh tersebut, sehingga mampu menggantikan sel-sel yang telah rusak. Johnson membuktikan bahwa transplantasi sumsum tulang dapat mengembalikan fungsi produksi oosit pada tikus percobaan yang dibuat steril dengan kemoterapi, serta pada tikus dengan penyakit genetik tidak mampu memproduksi oosit. Mekanisme yang diduga melatarbelakangi adalah menyatunya stem cell mesenkim dengan jaringan dan menggantikan sel yang rusak, dibantu oleh mediator yang dihasilkan ini mungkin terlibat dalam pencegahan apoptosis sel dan membantu proses penyembuhan^{4,9}.

Penelitian ini juga mengevaluasi gambaran maturasi oosit pada tikus model insufisiensi ovarium setelah mendapat transplantasi BMSC. Hasilnya adalah terdapat perbedaan bermakna pada masing-masing tahapan maturasi oosit pada masing-masing kelompok penelitian. Pada kelompok 2 yang mendapat perlakuan dengan Cisplatin didapatkan maturasi oosit yang lebih sedikit dibandingkan kelompok kontrol tanpa pemberian Cisplatin. Kelompok 3 yang mendapatkan transplantasi BMSC didapatkan maturasi oosit yang lebih tinggi

dibandingkan dengan kelompok 2 yaitu kelompok model insufisiensi ovarium tanpa diberi transplantasi BMSC, namun maturasi oosit kelompok 3 tersebut tidak berbeda bermakna dengan maturasi oosit pada kelompok kontrol.

Seperti diketahui maturasi oosit meliputi dua proses yang saling berkaitan yaitu maturasi dari nukleus dan sitoplasma. Supaya oosit berhasil dibuahi dan membentuk individu baru, nukleus dan sitoplasma oosit harus matang pada waktu yang sama. Setelah meiosis berhenti, proses maturasi nukleus dimulai menjelang ovulasi dimana dimulai dengan adanya selaput inti yang utuh atau disebut Germinal Vesicle (GV). Lonjakan gonadotropin sebelum ovulasi memulai terjadinya reinisiasi meiosis yaitu dengan terjadinya Germinal Vesicle Break Down (GVBD) dan berlanjut menjadi Metafase 1 dan Metafase 2¹⁰. Sedangkan maturasi sitoplasma memegang peranan penting pada perkembangan kompetensi oosit, yaitu penggabungan proses memodifikasi sitoplasma untuk fertilisasi dan kompetensi pertumbuhan embrionik pre implantasi¹⁰.

Pemberian Cisplatin tampaknya merusak oosit sendiri maupun lingkungan mikronya. Cisplatin, cisplatinum, atau cis-diammine dichloroplatinum (CDDP) merupakan kemoterapi golongan alkylating agent yang berbasis platinum. Antineoplastik kelas ini bekerja terutama berinteraksi dengan DNA namun bisa juga pada target non DNA. Selain difusi pasif, cisplatin juga diambil secara aktif melalui transporter tembaga CTR1¹¹. Pemberian kemoterapi Cisplatin pada korteks ovarium menyebabkan perubahan apoptosis dan fibrosis pada sel granulosa folikel primordial, dengan akibat peningkatan jumlah folikel yang rusak. Kerusakan folikel ini tentu merusak pula nukleus dan sitoplasma oosit sehingga mengganggu proses maturasi.

BMSC yang ditransplantasikan akan homing menuju sel yang mengalami kerusakan. Pada proses homing ini BMSC diduga dipengaruhi oleh adanya protein spesifik yang dilepaskan oleh folikel yang rusak tersebut sebagai bentuk komunikasi seluler. Protein ini bersifat kemoatraktif, sehingga mampu menarik sel punca yang berada di peredaran darah, untuk menuju ke arah keberadaan proteinnya.¹²

Sesampai di target organ BMSC diduga mengeluarkan sitokin in vitro, sehingga menghambat apoptosis yang dicetuskan Cisplatin. BMSC mensekresikan VEGF, IGF-I dan HGF dalam jumlah besar secara in vitro sehingga meningkatkan kemampuan pertumbuhan folikel. Keadaan ini akan memperbaiki kerusakan pada folikel akibat pemberian Cisplatin, sehingga diduga BMSC yang ditransplantasikan akan memperbaiki lingkungan sekitar oosit dan selanjutnya terjadi

perbaikan proses folikulogenesis yang ditandai peningkatan ekspresi GDF-9 dan SCF dan hitung folikel pada tikus model insufisiensi ovarium⁵. Semua di atas akan berlanjut dengan berjalan kembali proses maturasi oosit, yang terbukti dengan gambaran maturasi yang lebih bagus pada kelompok 3 yaitu yang mendapatkan transplantasi BMSC. Dengan didapatkan hasil tidak ada perbedaan maturasi oosit dibandingkan dengan kelompok kontrol, bisa dikatakan bahwa perbaikan maturasi oosit dengan transplantasi BMSC bisa berhasil sama dengan maturasi normal.

SIMPULAN

Pada tikus model insufisiensi ovarium dengan memakai Cisplatin, transplantasi BMSC akan memperbaiki maturasi oosit.

DAFTAR PUSTAKA

1. Simon B, Lee SJ, Partridge AH and Runowicz CD. Preserving Fertility After Cancer. *Cancer J Clin* 2005;55: 211–228
2. Kokcu A. Premature ovarian failure from current perspective. *Gynecological Endocrinology* 2010;26;8: 555–562
3. Hendarto, H., Jimmy, Y.A., Widjiati. Khasiat Curcumin Terhadap Perubahan Ekspresi TNF α , Kit-Ligand, GDF 9 Dan Petraxin 3 Sebagai Gambaran Perbaikan Folikulogenesis Pada Mencit Model Endometriosis. Laporan Penelitian Hibah Strategis Nasional, Universitas Airlangga, 2009
4. Xu M, Barrett S L, Farrell EW, Kondapalli LA., Kiesewetter SE., Shea LD, Woodruff TK. In vitro grown human ovarian follicles from cancer patients support oocyte growth. *Human Reproduction* 2009; 24; 10:2531–2540
5. Hendarto, H., Komarhadi, MK., Darmawanti, E., Widjiati., Suhatno., Rantam, FA. 2013. The Effect of Bone Marrow Transplantation on Oocyte-Granulosa Cell Interaction and Follicular Development of Cisplatin-Induced Ovarian Failure in Rat. *Stem Cell Research & Therapy* 2013; 3:1
6. Sonmezer M and Oktay K, 2006. Fertility Preservation in Female Patients. *Human Reproduction Update* 2006;10;3:251-266
7. Goussetis E, Theodosaki M, Paterakis G, Tsecuora C and Graphakos S,. In Vitro Identification of a Cord Blood CD133+CD34⁺Lin⁺ Cell Subset that Gives Rise to Myeloid Dendritic Precursors. *Stem Cells* 2006; 24; 4 :1137-1140
8. Rantam FA, Ferdiansyah, Nasronudin, Purwati, 2009. Isolation and culture of stem cells from human bone marrow, In *Stem Cell exploration*,

- Methods of isolation and culture, 1st edition, Surabaya: Airlangg University Press 2009: 11-25.
9. Johnson, J. Stemcell support of ovary fuction and fertility. In (Simon C & Pellicer A) Stemcell in Human Reproduction: Basic Science and Therapeutic Potential. Informa Healthcare 2007: 21-44
 10. Marteil G, Richard-Parpaillon L, Kubiak JZ. 2009. Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. Rennes.France. Reproductive Biology 2009; 9 (3) : 203-224
 11. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C and Pérez JM, 2007. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry 2007; 7; 1: 3-18
 12. Halim D, Murti H, Sandra F. Stem Cell : Dasar teori dan aplikasi klinis. Erlangga Medikal Series. Jakarta 2010, 4-75