

EFFECT ON AUTO TRANSPLANTION TO ESTRADIOL LEVEL OF EARLY MENOPAUSE WISTAR RATS

Abdurahman Laqif ^a, Mufti Mushthafa ^{a,b}, Uki Retno Budihastuti ^b,

^a· Bagian Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret
RSUD Dr. Moewardi Surakarta

^{a,b} Bagian Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret
RSUD Dr. Moewardi Surakarta

^b Bagian Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret
RSUD Dr. Moewardi Surakarta

Abstrak

Latar Belakang : Modalitas pengobatan utama untuk tumor ganas adalah operasi, kemoterapi dan / atau radioterapi yang bersifat gonadotoksik. Terapi kanker dapat mempengaruhi fungsi ovarium, baik produksi hormon dan potensi reproduksi. Konsekuensi terburuk adalah insufisiensi ovarium prematur dan infertilitas. Salah satu cara mempertahankan fungsi reproduksi berupa simpan beku dan auto transplantasi ovarium. Metode: Penelitian eksperimental analitik ini dilakukan pada 27 tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang dibagi menjadi 3 kelompok. Kelompok 1 (K1) tidak dilakukan bilateral ooforektomi. Kelompok 2 (K2) dilakukan bilateral ooforektomi tanpa auto transplantasi. Kelompok 3 (K3) dilakukan bilateral ooforektomi dengan auto transplantasi. Pengambilan sampel dilakukan pada hari pertama, hari ke delapan (tujuh hari pasca bilateral ooforektomi, pada masa early menopause) dan hari ke 36 (28 hari setelah auto transplantasi). Pengukuran kadar estradiol menggunakan rat estradiol ELISA kit. Analisis data menggunakan ANOVA test dan Post Hoc test pada SPSS (Software Package for Social Science). Hasil : Rerata kadar estradiol yang diukur pada hari ke 36 pada K1=15,889 ng/mL, pada K2=14,879 ng/mL dan pada K3=22,664 ng/mL. Tidak didapatkan perbedaan signifikan antara K1 dan K2 ($p>0,05$). Didapatkan perbedaan bermakna antara K1 dan K3 ($p<0,05$), juga antara K2 dan K3 ($p<0,05$). Hal ini menunjukkan terdapat pengaruh auto transplantasi pada kadar estradiol. Kesimpulan : Ada pengaruh auto transplantasi terhadap kadar estradiol pada tikus Wistar early menopause. Kadar estradiol pada kelompok dengan auto transplantasi meningkat sangat signifikan ($p<0,05$) dibandingkan dengan kelompok tanpa auto transplantasi.

Kata Kunci : Kadar estradiol, Early menopause, Auto transplantasi

Abstract

*Background: The main treatment modalities for malignant tumors is surgery, chemotherapy and/or radiotherapy that are gonadotoxic. Cancer therapy can affect ovarian function, both the production of hormones and reproductive potential. The worst consequence is premature ovarian insufficiency, and infertility. One of the way to maintain reproductive function is in the form of freezing and auto transplantation of the ovary. Methods: This analytical experiment study was conducted on 27 Wistar rats (*Rattus norvegicus*) which were divided into 3 groups. Group 1 (G1) did not conduct bilateral oophorectomy. Group 2 (G2) conducted bilateral oophorectomy without auto transplantation. Group 3 (G3) conducted bilateral oophorectomy with auto transplantation. Sampling is done on the first day, the eighth day (seven days after bilateral oophorectomy, during early menopause) and day 36 (28 days after auto transplantation). Measurement estradiol levels using rat estradiol ELISA kit. Analysis of data using ANOVA test and Post Hoc test on SPSS (Software Package for Social Science). Results: Mean estradiol levels were measured at day 36 in G1=15.889 ng/mL, at G2=14.879 ng/mL and the G3=22.664 ng/mL. There were no significant differences between G1 and G2 ($p>0.05$). We found significant differences between G1 and G3 ($p<0.05$), also between G2 and G3 ($p<0.05$). This shows there is an influence of auto transplantation to estradiol levels. Conclusion: There is influence of auto transplantation to estradiol levels in early menopausal Wistar rats. Estradiol levels in the group with auto transplantation increased significantly ($P<0.05$) compared with the group without auto transplantation.*

Keywords : Levels of estradiol, Early menopause, Auto transplantation

I. PENDAHULUAN

Modalitas pengobatan utama untuk tumor ganas adalah operasi, kemoterapi dan / atau radioterapi. (Brannstrom,2010) Kemoterapi atau radiasi untuk kanker bersifat gonadotoksik dapat mempengaruhi fungsi ovarium, baik produksi hormon dan potensi reproduksi. Konsekuensi terburuk adalah insufisiensi ovarium prematur dan infertilitas, menyebabkan masalah kualitas hidup yang besar. (Kondapalli, 2012)

Saat ini usaha untuk mempertahankan fungsi ovarium pada wanita yang akan menjalani kemo / radio terapi berupa terapi bedah dengan transposisi ovarium, terapi adjuvan yang melindungi kesuburan dan dengan simpan beku. (Mahajan, 2015)

Upaya pengembalian fungsi reproduksi dengan obat dan terapi bedah terbukti tidak efektif dalam melindungi ovarium dari kerusakan selama terapi kanker sehingga dikembangkanlah teknik simpan beku dengan hasil memuaskan. (Andriyana, 2015)

II. LANDASAN TEORI

1. Upaya Preservasi Fungsi Reproduksi

Walaupun angka kejadian kanker pada wanita berusia kurang dari 50 tahun terus meningkat, angka kematian menurun secara dramatis karena kemajuan pengobatan. Pada tahun 1990 prevalensi penyintas kanker satu di antara 1000 penderita berusia 15 - 45 tahun. Pada tahun 2010, satu di antara 250 penderita kanker akan bertahan hidup (Stroud JS *et al*, 2009).

Kemajuan terbaru dalam onkologi telah memperbaiki tingkat kelangsungan hidup secara signifikan pada penderita kanker. Sayangnya, pengobatan kanker seperti kemoterapi/radioterapi dapat sangat berbahaya bagi ovarium, sering mengakibatkan hilangnya fungsi endokrin dan reproduksi pada wanita (Dath C *et al*, 2010). Ovarium sangat sensitif terhadap sitostatika dan radiasi, maka pemberian kemoterapi atau radioterapi dapat menyebabkan kerusakan ovarium (Donnez J, 2006).

Saat ini dikembangkan berbagai metode untuk preservasi fungsi reproduksi pada penderita kanker yang akan menjalani kemoterapi atau radioterapi. Teknik simpan

beku sperma, embrio, oosit atau jaringan ovarium merupakan metode yang dapat digunakan dalam preservasi fungsi reproduksi. Karena itu semua metode preservasi fungsi reproduksi perempuan pada penderita kanker perlu dijelaskan sebelum pasien menjalani kemoterapi atau radiasi (Wiweko B, 2014).

Tujuan simpan beku adalah mengurangi kerusakan dan membantu sel untuk berdegenerasi. Pilihan teknik simpan beku sangat bergantung pada dua faktor yaitu larutan pelindung beku dan laju pembekuan-pelelehan (*thawing*). Laju pembekuan yang terkontrol tidak akan menghambat pertukaran cairan ekstrasel dan intrasel serta tidak menyebabkan efek osmotik yang serius dan deformasi sel. Larutan pelindung beku dibutuhkan untuk melindungi sel dari kerusakan saat proses pembekuan yang disebabkan oleh perbedaan tekanan osmotik antara intraseluler dan ekstraseluler yang dapat berakibat pada kerusakan membran plasma dan organ subseuler (Andriyana H, 2015).

Prosedur ini dapat diterapkan tanpa menunda pengobatan kanker dan memungkinkan pasien untuk memulihkan fungsi ovarium setelah mengatasi penyakit mereka. Selain itu, dapat diterapkan pada pasien sebelum memasuki usia pubertas. Laporan awal tentang transplantasi jaringan ovarium setelah disimpan beku dan menjalani proses *thawing* cukup menjanjikan (Dath C *et al*, 2010).

Sejumlah penelitian pada tikus menunjukkan keberhasilan, dalam hal folikulogenesis dan kembalinya fungsi endokrin, setelah transplantasi avaskular ovarium tikus ke tempat yang berbeda. Metode simpan beku ovarium tikus dengan DMSO (Dimetil Sulfoksida) dan transplantasi avaskular orthotopik menghasilkan pemulihan siklus, meskipun dengan tingkat kesuburan yang lebih rendah dibandingkan dengan transplantasi ovarium segar (Brannstrom M *et al*, 2010).

2. Pilihan Cara Preservasi Fungsi Reproduksi

Saat ini usaha untuk mempertahankan fungsi ovarium pada wanita yang akan

menjalani kemo/radio terapi berupa (Mahajan N, 2015):

1. Terapi bedah, dengan transposisi ovarium. Pada cara ini ovarium dipindahkan dari tempatnya ke tempat yang tidak terpapar radiasi. Pada radiasi kraniospinal, ovarium dipindah ke lateral menjauhi vertebra spinalis. Pada radiasi pelvis, ovarium dipindah ke luar pelvis, biasanya ditempatkan di para kolika atau abdomen bagian depan. Prosedur ini tidak melindungi dari obat sitotoksik.
2. Terapi adjuvan yang melindungi kesuburan. Pada cara ini dilakukan pemberian terapi adjuvan sebelum kemoterapi dengan obat yang dapat mencegah kehilangan cadangan ovarium. Sayangnya, belum ada obat yang sesuai walaupun beberapa penelitian telah mengidentifikasi obat yang cukup menjanjikan. Beberapa di antaranya adalah:
 - a. Sphingosine 1 Phosphate dan imatinib yang mencegah apoptosis
 - b. Thalidomide dengan mekanisme stimulasi koloni granulosit
 - c. Tamoksifen, yang bekerja sebagai antioksidan
 - d. AS101 yang sebabkan modulasi jalur stimulasi folikel
 - e. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) agonist, banyak digunakan pada praktek klinik. GnRH agonis bekerja dengan cara menekan kadar gonadotropin hingga ke tingkat pre pubertas dan mengurangi perfusi utero-ovarium. Mekanisme ini dipercaya melindungi folikel dari kerusakan.
3. Dengan simpan beku, di antaranya:
 - a. Simpan beku embrio
 - b. Simpan beku oosit, memiliki kekurangan serupa dengan simpan beku embrio; tidak dapat ditawarkan pada pasien pre pubertas, perawatan kanker harus ditunda beberapa minggu untuk simulasi ovarium dan pada keganasan yang bergantung hormon, protokol simulasi ovarium sebaiknya dilakukan dengan letrozole atau tamoxifen untuk menghindari naiknya kadar estradiol di atas

normal, serta oosit lebih rentan terhadap prosedur simpan beku. Kelebihannya adalah tidak membutuhkan pasangan atau donor sperma saat dilakukan perawatan (Olmos *et al*, 2013).

- c. Simpan beku jaringan ovarium.

Simpan beku ovarium memiliki keunggulan dibandingkan simpan beku embrio atau oosit terutama karena 90 % folikel pre-antral terdapat di dalam korteks ovarium sehingga tidak diperlukan waktu untuk dilakukan stimulasi terlebih dahulu. Hal itu menyebabkan simpan beku ovarium dapat dilakukan pada pasien yang ingin segera mendapatkan kemoterapi atau radiasi serta bila pasien belum mempunyai pasangan (Wiweko B, 2014).

III. METODE PENELITIAN

Metode simpan beku jaringan ovarium yang dipilih pada penelitian ini adalah vitrifikasi. Pada penelitian eksperimental analitik ini, kami menggunakan 27 tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) berusia 10-12 minggu dengan berat 200-250 gr. Kami bagi hewan coba ke dalam tiga kelompok, sinkronisasi dengan cara mendekati tikus jantan. Pengukuran kadar estradiol kami lakukan dalam 3 tahap :

1. Hari ke 1 dilakukan pengukuran kadar estradiol pada seluruh kelompok, dilakukan bilateral ooforektomi pada kelompok 2 dan 3, kemudian dilakukan vitrifikasi, Simpan beku pada kelompok 3.
2. Hari ke 8 dilakukan pengukuran kadar estradiol pada seluruh kelompok, dilakukan *Thawing* dan auto transplantasi pada kelompok 3.
3. Hari ke 36 dilakukan pengukuran kadar estradiol pada seluruh kelompok.

Pengukuran kadar estradiol menggunakan E2 (Estradiol) ELISA *kit* merk Fine Test® produksi Wuhan Fine Biological Technology dari Cina dengan penghitungan satu - satu (single). Analisis data menggunakan SPSS (*Software Package for Social Science*).

IV. HASIL

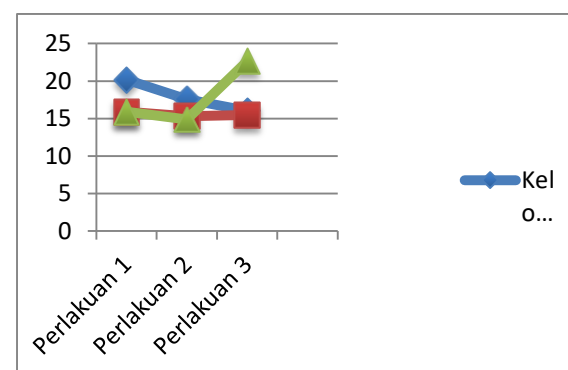
Penelitian ini dilakukan di LPPT (Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu) Yogyakarta, berlangsung November 2016

sampai Januari 2017. Didapatkan 80 sampel, tidak ada hewan coba yang mati selama penelitian.

Tabel 1. Kadar estradiol hewan coba setelah penelitian (pg/mL, x1000)

Nilai Estradiol		Hari 1	Hari 8	Hari 36
Kelompok 1	Tikus 1	20.1100	15.8437	16.0377
	Tikus 2	20.1100	15.6141	15.5762
	Tikus 3	20.1590	16.2735	15.4253
	Tikus 4	20.4554	16.0377	15.6141
	Tikus 5	20.5053	15.9987	15.9210
	Tikus 6	19.9637	15.8823	16.0767
	Tikus 7	20.1590	15.8437	16.2339
	Tikus 8	19.9152	15.6521	16.3131
	Tikus 9	21.0103	15.3504	14.8725
Kelompok 2	Tikus 1	17.8933	Pasca bilateral ooforek tomi	Pasca bilateral ooforek tomi
			15.2759	15.2759
	Tikus 2	17.6340	15.2018	14.6927
	Tikus 3	17.8933	15.4629	14.9450
	Tikus 4	17.5058	15.5762	14.9450
	Tikus 5	17.1683	15.0545	15.2388
	Tikus 6	17.3785	15.4629	14.4797
	Tikus 7	17.7200	15.2759	15.6903
	Tikus 8	17.5912	15.3504	15.0179
Kelompok 3	Tikus 1	15.8052	Pasca bilateral ooforektomi	Pasca auto transplan tasi
			15.1279	20.6555
	Tikus 2	15.6521	15.3878	21.2674
	Tikus 3	15.9598	15.3131	22.7668
	Tikus 4	15.9210	15.6141	22.7668
	Tikus 5	15.9987	15.5383	22.4369
	Tikus 6	16.4326	15.8823	23.8440
	Tikus 7	16.5128	15.2388	23.7861
	Tikus 8	16.1159	15.6903	23.7861
Tikus 9	18.0244	16.1159	22.7668	

Dilakukan Uji homogenitas dengan Levenetest, didapatkan nilai signifikan sebesar 0,616 ($p > 0,05$) yang menunjukkan kelompok kontrol mempunyai varian yang sama (homogen).



Gambar 1. Grafik rerata hasil kadar estradiol (pg/mL, x 1000)

Dari analisis data dengan menggunakan Oneway ANOVA dan Post Hoc test didapatkan rerata kadar estradiol tikus Wistar seperti pada tabel berikut:

Tabel 2. Rerata kadar estradiol tikus Wistar (pg/mL, x1000), *signifikansi $p < 0,05$

	Hari 1 (n=9)	Hari 8 (n=9)	Hari 36 (n=9)	p
Kelompok 1	20.17	15.89		0.000*
Kelompok 1	20.17		15.89	0.000*
Kelompok 1		15.89	15.89	1.000
Kelompok 2	17.59	15.33		0.000*
Kelompok 2	17.59		14.87	0.000*
Kelompok 2		15.33	14.87	0.894
Kelompok 3	16.04	15.47		0.684
Kelompok 3	16.04		22.66	0.000*
Kelompok 3		15.47	22.66	0.000*

Dari tabel 4.1 didapatkan perbedaan bermakna kadar estradiol kelompok 1 antara hari 1 dan hari 8, juga antara hari 1 dan 36 dengan nilai $p < 0,05$. Tidak didapatkan perbedaan bermakna kelompok 1 pada hari 8 dan 36. Didapatkan perbedaan bermakna kelompok 2 pada hari 1 dan hari 8, juga antara hari ke 8 dan 36 dengan nilai $p < 0,05$. Tidak didapatkan perbedaan bermakna kelompok 2 pada hari 8 dan 36. Pada kelompok 3 tidak didapatkan perbedaan bermakna antara hari 1 dan 8. Didapatkan perbedaan bermakna antara hari 1 dan 36, juga antara hari 8 dan 36 dengan nilai $p < 0,05$.

V. PEMBAHASAN

Pada tahun 2015 diperkirakan terdapat 810.170 kasus baru pada wanita di Amerika Serikat. Kanker merupakan penyebab kematian terbanyak di Amerika Serikat setelah penyakit jantung, merupakan 25% dari penyebab kematian. (American Cancer Society, 2015) Kemajuan terbaru dalam onkologi telah memperbaiki tingkat kelangsungan hidup secara signifikan pada penderita kanker. Sayangnya, pengobatan kanker seperti kemoterapi/radioterapi dapat

sangat berbahaya bagi ovarium, sering mengakibatkan hilangnya fungsi endokrin dan reproduksi pada wanita. (Dath et al, 2010) Ovarium sangat sensitif terhadap sitostatika dan radiasi, maka pemberian kemoterapi atau radioterapi dapat menyebabkan kerusakan ovarium. (Donez et al, 2006)

Saat ini dikembangkan berbagai metode untuk preservasi fungsi reproduksi pada penderita kanker yang akan menjalani kemoterapi atau radioterapi. Teknik simpan beku sperma, embrio, oosit atau jaringan ovarium merupakan metode yang dapat digunakan dalam preservasi fungsi reproduksi. (Wiweko, 2014) Tujuan simpan beku adalah mengurangi kerusakan dan membantu sel untuk berdegenerasi. Vitrifikasi merupakan teknik simpan beku dengan pendinginan cepat yang menghasilkan pematatan tanpa kristalisasi, menghindari cedera beku yang dihasilkan dari pembentukan es. (Posillico et al, 2010). Simpan beku korteks ovarium dinilai lebih mudah dilakukan daripada simpan beku ovarium utuh. Hal ini disebabkan semakin tipisnya jaringan ovarium, maka permeasi larutan pelindung beku dengan konsentrasi yang tepat dan perpindahan cairan intrasel ke ekstrasel akan lebih cepat sehingga dapat mencegah formasi kristal es. (Andriyana, 2015)

Kadar estradiol pada fase awal folikular dapat menjadi informasi tambahan yang berguna untuk mengevaluasi cadangan ovarium. (Wiweko, 2014) Dapat diantisipasi bahwa produk langsung hormon ovarium akan menjadi penanda baik dari respon ovarium dibandingkan penanda tidak langsung seperti usia dan FSH. (Yakass, 2013)

Sejumlah penelitian pada tikus menunjukkan keberhasilan, dalam hal folikulogenesis dan kembalinya fungsi endokrin, setelah transplantasi avaskular ovarium tikus ke tempat yang berbeda. Metode simpan beku ovarium tikus dengan DMSO (Dimetil Sulfoksida) dan transplantasi avaskular orthotopik menghasilkan pemulihan siklus, meskipun dengan tingkat kesuburan yang lebih rendah

dibandingkan dengan transplantasi ovarium segar. (Brannstrom, 2010)

Didapatkannya kadar estradiol yang tinggi pada kelompok 2 setelah dilakukan bilateral ooforektomi, yang mendekati kadar estradiol kelompok kontrol, dapat disebabkan karena dihasilkannya estradiol dari ekstra gonadal. Hal ini juga dapat menjadi penyebab kadar estradiol yang melebihi kontrol setelah dilakukan auto transplantasi pada kelompok 3.

Penelitian ini menunjukkan bahwa metode vitrifikasi, dilanjutkan simpan beku, *thawing* untuk selanjutnya dilakukan auto transplantasi dapat dilakukan pada hewan coba berupa tikus Wistar. Hal ini ditunjukkan dengan peningkatan kadar estradiol yang berbeda secara signifikan pada kelompok yang dilakukan auto transplantasi dan yang tidak.

Pemelitian ini merupakan penelitian pendahuluan, sehingga masih ada keterbatasan pada penelitian ini. Dari data yang kami dapatkan, ditemukannya kadar estradiol yang tinggi pada pengukuran awal kelompok kontrol dan pasca auto transplantasi masih belum diketahui penyebabnya. Diperlukan penelitian lanjutan untuk menyempurnakan hasil dari penelitian kami. Diharapkan pada penelitian selanjutnya dapat dilakukan sinkronisasi kadar estradiol yang menghasilkan hasil yang seragam, misalnya dengan cara kimia dengan pemberian PMSG (*Pregnant Mare's Serum Gonadotropin*).

VI. KESIMPULAN

Kadar estradiol lebih tinggi pasca auto transplantasi dibandingkan dengan tanpa auto transplantasi. Di mana kami dapatkan kadar estradiol pada kelompok dengan auto transplantasi berbeda secara signifikan ($p < 0.05$) dengan kadar estradiol kelompok tanpa auto transplantasi.

DAFTAR PUSTAKA

Andriyana H. Simpan Beku Korteks Ovarium Sebagai Pilihan Dalam Upaya Mempertahankan Fungsi Reproduksi Wanita Penderita Kanker. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. 2015.

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2015. Atlanta: American Cancer Society. 2015.

Brannstrom M, Milenkovic M. Whole ovary cryopreservation with vascular transplantation, A future development in female oncofertility. Middle East Fertility Society Journal. 2010. 15, 125–38.

Dath C, Van Eyck AS, Dolmans MM, Romeu L, Vigne LD, Donnez J, Van Langendonck A. Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites. Human Reproduction. 2010. 25: 7. 1734–43

Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonck A, Demylle D, Dolmans MM. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. Human Reproduction Update. 2006. 12: 5. 519 – 35.

Kondapalli LA. Ovarian Tissue Cryopreservation and Transplantation. Oncofertility Medical Practice: Clinical Issues and Implementation. 2012.

Mahajan N. Fertility preservation In Female Cancer Patients: An Overview. Journal Of Human Reproductive Sciences. 2015. 8: 3-13.

Posillico S, Kader A, Falcone T, Agarwal A. Ovarian Tissue Vitrification: Modalities, Challenges and Potentials. Current Women's Health Reviews. 2010. 6, 352-66.

Wiweko B. Upaya Preservasi Fungsi Ovarium Dengan Melakukan Vitrifikasi Korteks Dan Folikel Pre Antral. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. 2014.

Yakass MB. Possible Causes Of Infertility In Patients Visiting An IVF Clinic And The Use Of Basal Gonadotrophins As Predictive Markers Of Ovarian Response In IVF Clients. Department Of Molecular Medicine, School Of Medical Sciences, Kwame Nkrumah University Of Science & Technology. Kumasi, Ghana. 2013