

**PENGARUH SEKRETOM SEL PUNCA MESENKIMAL
HIPOKSIA TERHADAP EKSPRESI TGF- β , KADAR HORMON
ESTROGEN DAN JUMLAH FOLIKEL**

**(Studi eksperimental *In vivo* pada Tikus Betina Galur Wistar
model *polycystic ovary syndrome-Like*)**

Tesis



Disusun Oleh:

Yuni Andriani

MBK.2219010305

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2023**

TESIS

**PENGARUH SEKRETOM SEL PUNCA MESENKIMAL HIPOKSIA
TERHADAP EKSPRESI TGF- β , KADAR HORMON ESTEROGEN DAN
JUMLAH FOLIKEL**

(Studi eksperimental *In vivo* pada Tikus Betina Galur Wistar model *polycystic ovary syndrome-Like*)

disusun oleh:

Yuni Andriani
MBK.2219010305

Menyetujui,
Pembimbing

Pembimbing I,

Pembimbing II,

Prof. Dr.dr.Dedy Hermansyah, Sp.B.Subsp.Onk(K)
NIK. 198107032009121003

Dr.dr. Chodidjan, M.Kes
NIK. 210186023

Mengetahui,
Ketua Progam Studi magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung



Prof.Dr. dr. H. Agung Putra, M.Si.Med
NIK. 210199050

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar Pustaka.



Jakarta, 15 Juni 2023




Yuni Andriani

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas Diri

Nama : dr Yuni Andriani
Tempat / tanggal lahir : Jakarta, 2 Juni 1983
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan Formal

SD : SDN 2 Pondok Ranggong Jakarta Timur
SMP : SMPN 230 Pondok Ranggong Jakarta Timur
SMA : SMA Hutama Pondok Gede Bekasi
Perguruan Tinggi : FK Universitas Islam Sultan Agung Semarang

C. Riwayat Keluarga

Nama Orang Tua
Ayah : Bp. Mitsuo Sawamura
Ibu : Ibu Riyani Sawamura

Nama Suami
Suami : dr. Dias Tito Nugroho MKK

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum wrwb, Bismillahirrahmanirahim...

Segala puji syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan yang Maha Esa, atas segala karunia dan ridho-NYA, tesis dengan judul “**Pengaruh Sekretom Sel Punca Mesenkimal Hipoksia Terhadap Ekspresi TGF- β , Kadar Hormon Estrogen dan Jumlah Folikel (Studi Eksperimental *In Vivo* Pada Tikus Betina Galur Wistar Model *Polycystic Ovary Syndrome-Like*)**” ini dapat terselesaikan.

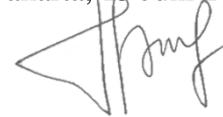
Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister bidang ilmu biomedik kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis ingin menyampaikan terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto., SH., M. Hum selaku rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rector yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF selaku Dekan Fakultas Kedokteran Masgister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Prof. Dr .dr.H. Agung Putra, M.Si. Med selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
4. Prof. Dr.dr.Dedy Hermansyah, Sp.B.Subsp.Onk(K) selaku dosen pembimbing I yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga selama proses penulisan tesis.

5. Dr. dr. Chodidjah, M.Kes selaku dosen pembimbing II yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulis hingga selama proses penulisan tesis.
6. Prof. Dr .dr. H. Agung Putra, M.Si. Med selaku penguji pertama yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
7. Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku penguji kedua yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
8. Bapak Dr. dr. H. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes selaku penguji ketiga yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
9. Seluruh tenaga pendidik dan staff di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah memberikan banyak dukungan selama proses penyusunan tesis.
10. Keluarga besar saya, Daddy, Mami, Suami, Adek dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan doa, support dan bantuan dalam hal apapun dalam penyusunan tesis ini, terimakasih atas dukungannya.
11. Sahabat saya yang sudah seperti keluarga sendiri drg. Angtyas Ergit Pratiwi, Sp.KG dan mba ina yang telah mendoakan, memberi support dan menemani saya selama pembuatan tesis ini.
12. Kepada segenap tim *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) yang telah ikut serta dalam kelancaran pelaksanaan penelitian tesis ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan penelitian ini. Oleh karena itu, saran-saran yang membangun dari manapun akan diterima dengan terbuka. Harapan penulis semoga penelitian ini bermanfaat untuk berbagai pihak.

Jakarta, 15 Juni 2023



(Yuni Andriani)



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
ABSTRAK	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1. Tujuan Umum	5
1.3.2. Tujuan Khusus	5
1.4. Originalitas Penelitian	6
1.5. Manfaat penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. <i>Transforming growth factor-β</i> (TGF- β)	9
2.1.1. Definisi TGF- β	9
2.1.2. Peran TGF- β Secara Umum	10
2.1.3. Sintesis TGF- β	12
2.2. Hormon Estrogen	13
2.2.1. Definisi Hormon Estrogen	13
2.2.2. Sintesis Hormon Estrogen.....	15
2.2.3. Transduksi Sinyal Hormon Estrogen.....	16
2.3. Folikel.....	17
2.4. <i>Polycystic Ovary Syndrome</i> (PCOS).....	18

2.4.1.	Definisi PCOS	18
2.4.2.	Karakteristik PCOS	20
2.5.	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>	21
2.5.1.	Definisi MSC	21
2.5.2.	Fungsi MSC	21
2.5.3.	Sumber MSC	22
2.5.4.	Karakteristik MSC	23
2.5.5.	Peran MSC	24
2.6.	Hipoksia	24
2.6.1.	Definisi Hipoksia	24
2.6.2.	Mekanisme Fisiologi Seluler	25
2.7.	Sekretom	26
2.7.1.	Definisi Sekretom	26
2.7.2.	Komposisi	27
2.7.3.	Modifikasi Pendorong MSC	27
2.8.	Dehydroepiandrosterone (DHEA)	28
2.9.	Hubungan Sekretom Hipoksia Mesenchymal terhadap ekspresi TGF- β , Kadar Hormon Estrogen, dan Jumlah Folikel	28
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS		31
3.1.	Kerangka Teori	31
3.2.	Kerangka Konsep	33
3.3.	Hipotesis	33
BAB IV METODE PENELITIAN		34
4.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	34
4.2.	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	35
4.2.1.	Variabel Penelitian	35
4.2.2.	Defenisi Operasional	36
4.3.	Subjek Penelitian dan Sampel Penelitian	37
4.3.1.	Subyek Penelitian	37
4.3.2.	Sampel Penelitian	38
4.3.3.	Besar Sampel	38

4.3.4.	Cara Pengambilan Sampel Penelitian	39
4.4.	Alat dan Bahan	39
4.4.1.	Alat.....	39
4.4.2.	Bahan.....	40
4.5.	Cara Penelitian	40
4.5.1.	Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	40
4.5.2.	Prosedur Isolasi MSC.....	40
4.5.3.	Proses Hipoksia.....	41
4.5.4.	Pembuatan Preparat dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan	42
4.5.5.	Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA	45
4.5.6.	Pembacaan ekspresi TGF- β dengan RT-PCR.....	47
4.5.7.	Pembacaan kadar hormon estrogen dengan ELISA.....	47
4.6.	Tempat dan Waktu Penelitian	49
4.6.1.	Tempat Penelitian.....	49
4.6.2.	Waktu Penelitian	49
4.7.	Analisa Data	49
4.8.	Alur Penelitian.....	50
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....		51
5.1.	Hasil Penelitian.....	52
5.1.1.	Validasi MSCs	52
5.1.2.	MSCs Hipoksia	54
5.1.3.	Kandungan Biomolekul SH-MSCs.....	55
5.1.4.	Validasi Hewan Coba PCOS.....	55
5.1.5.	Efek Pemberian SH-MSCs terhadap Ekspresi TGF- β , Kadar Hormon Estrogen, dan Jumlah Folikel.....	59
5.2.	Pembahasan	64
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		69
6.1.	Kesimpulan	69
6.2.	Saran.....	69

DAFTAR PUSTAKA	70
LAMPIRAN	75



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Tahapan Sintesis TGF- β	13
Gambar 2.2. Sintesis dan Pelepasan Hormon Estrogen	15
Gambar 2.3. Manifestasi Klinis PCOS	20
Gambar 2.4. Sumber MSCs	23
Gambar 2.5. Kemampuan Diferensiasi MSCs	23
Gambar 2.6. Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSCs.....	25
Gambar 3.1. Kerangka Teori.....	32
Gambar 3.2. Kerangka Konsep	33
Gambar 4.1. Gambar Rancangan Penelitian	35
Gambar 5.1. Morfologi MSCs menyerupai sel fibroblast pada perbesaran 200x	52
Gambar 5.2. Ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31 pada MSCs	53
Gambar 5.3. (A) MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan (B) adiposit setelah pemberian pewarnaan <i>Alizarin Red</i> dan <i>Oil Red O</i> pada perbesaran 200x (ditunjukkan dengan panah hitam).....	54
Gambar 5.4. (A) morfologi MSCs sebelum dikultur pada kondisi hipoksia, (B) morfologi MSCs setelah dikultur pada kondisi hipoksia 24 jam	54
Gambar 5.5. Bentuk makroskopis ovarium yang tidak diinduksi DHEA (Sehat) dan yang diinduksi DHEA (PCOS)	56
Gambar 5.6. Bentuk makroskopis ovarium yang tidak diinduksi DHEA (Sehat) dan yang diinduksi DHEA (PCOS).	56
Gambar 5.7. Gambar cystic follicle yang terlihat banyak menggunakan HE.....	57

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian.....	6
Tabel 4.1. Definisi Operasional	36
Tabel 5.1. Konsentrasi Hormon Testosteron Tikus Validasi	58
Tabel 5.2. Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada ekspresi TGF- β , kadar hormon estrogen dan jumlah folikel.....	59
Tabel 5.3. Perbedaan Ekspresi TGF- β Antar 2 Kelompok	61
Tabel 5.4. Perbedaan Kadar Hormon Estrogen Antar 2 Kelompok.....	62
Tabel 5.5. Perbedaan Jumlah <i>Cysticfollicle</i> Antar 2 Kelompok	64



DAFTAR SINGKATAN



AMH	: <i>Anti-Mullerian Hormone</i>
AMP	: <i>Anti Microbial Peptide</i>
ATP	: <i>Adenosin Triphospat</i>
BDNF	: <i>Brain-derived Neurotriphic Factor</i>
cAMP	: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CM	: <i>Conditional Medium</i>
CVD	: <i>Cardiovascular Disease</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
E1	: <i>Estron</i>
E2	: <i>Estradiol</i>
E3	: <i>Estriol</i>
FSH	: <i>Folicle Stimulating Hormone</i>
GnRH	: <i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
HE	: <i>Hematoksilin-Eosin</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hipoxic Induce Factor</i>
HPA	: <i>Hypothalamus-Pituitary-Adrenal</i>
HPG	: <i>Hypothalamus-Pituitary-Gonad</i>
HypMSC-scr	: <i>Hypoxia Preconditioned Mesenchymal Stem Cell Silicon Controlled Rectifier</i>
IFN	: <i>Interferon</i>

IGF-1	: <i>Insulin-Like Growth Factor-1</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IL-10	: <i>Interleukin-10</i>
LDL	: <i>Low Density Lipoprotein</i>
LH	: <i>Luteinizing Hormone</i>
LTBP	: <i>Latent TGFβ binding protein</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinases</i>
mRNA	: <i>Messenger RNA</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
NGF	: <i>Nerve Growth Factor</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
ODD	: <i>Oxygen-Dependent Degradation</i>
PCOS	: <i>Polycystic Ovary Syndrome</i>
RNA	: <i>Ribonucleat Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxigen Species</i>
SCCR	: <i>Stem Cell and Cancer Research</i>
SH-MSCs	: <i>Sekretom Hypoxic Mesenchymal Stem Cell</i>
SHBG	: <i>Sex Hormone Binding Globulin</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor β</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHL	: <i>Von Hippel-Lindau</i>

ABSTRAK

Latar Belakang: PCOS berkembang ketika ovarium distimulasi untuk memproduksi lebih banyak hormon androgen sehingga perkembangan jumlah folikel terganggu. Kenaikan level insulin berkontribusi secara langsung menyebabkan abnormalitas pada hipotalamus pituitari ovarium yang berdampak secara langsung pada terjadinya PCOS dengan mekanisme hiperinsulinemia yang meningkatkan frekuensi sekresi GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*), produksi LH (*Luteinizing Hormone*) melebihi FSH, meningkatnya produksi androgen ovarium, menurunnya pematangan jumlah folikel, dan meningkatnya ekspresi TGF- β (*transforming growth factor β*). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap ekspresi TGF- β , kadar hormon estrogen, dan jumlah folikel pada tikus betina galur Wistar dengan PCOS-like.

Metode Penelitian: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental in vivo dengan menggunakan rancangan penelitian *post test only control group design*. Subyek penelitian ini adalah tikus betina galur wistar yang dibagi menjadi 4 perlakuan yang terdiri dari 1 kelompok tikus sehat, 2 kelompok kontrol negatif, 3 kelompok perlakuan 1, dan kelompok perlakuan 2 dengan masing-masing dosis yang berbeda. Kemudian data di analisis menggunakan Uji *One Way Anova* untuk mengetahui pengaruh dari tiap kelompok.

Hasil : Uji One Way Anova menunjukkan hasil ekspresi TGF- β ($p= 0.000$), kemudian hasil kadar hormon estrogen ($p= 0.000$), kemudian uji Kruskal Wallis jumlah cystic follicle ($p=0.045$) pada seluruh kelompok terdapat perbedaan bermakna ($p<0.05$) kecuali cystic follicle.

Kesimpulan: Terdapat pengaruh pemberian SH-MSCs pada penurunan ekspresi TGF- β dan jumlah cystic follicle. Terdapat pengaruh pemberian SH-MSCs pada peningkatan kadar hormon estrogen.

Kata Kunci : *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs), Ekspresi TGF- β , Kadar Hormon Estrogen, Jumlah Folikel*

ABSTRACT

Background: PCOS develops when the ovaries are stimulated to produce more androgen hormones so that the development of follicle count is disrupted. Elevated insulin levels contribute directly to abnormalities in the pituitary hypothalamus of the ovaries which have a direct impact on the occurrence of PCOS by hyperinsulinemia mechanism that increases the frequency of GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) secretion, LH (Luteinizing Hormone) production exceeds FSH, increased ovarian androgen production, decreased follicle count maturation, and increased TGF- β (transforming growth factor β) expression. The purpose of this study was to determine the effect of SH-MSCs administration on TGF- β expression, estrogen hormone levels, and follicle count in female Wistar strain rats with PCOS-like

Research Method: This study is an in vivo experimental study using post test only control group design. The subjects of this study were female rats of wistar strain which were divided into 4 treatments consisting of 1 group of healthy mice, 2 negative control groups, 3 treatment groups 1, and treatment group 2 with each different dose. Then the data was analyzed using the One Way Anova Test to determine the influence of each group.

Results: One Way Anova test showed the results of TGF- β expression ($p = 0.000$), then the results of estrogen hormone levels ($p = 0.000$), then the Kruskal Wallis test the number of cystic follicles ($p = 0.045$) in all groups there was a significant difference ($p < 0.05$) except cystic follicle.

Conclusion: There is an effect of SH-MSCs sekretome administration on decreasing TGF- β expression and custic follicle count. There is an effect of SH-MSCs administration on increasing estrogen hormone levels.

Kata Kunci : *Sekretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs), Ekspresi TGF- β , Kadar Hormon Estrogen, Jumlah Folikel*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) merupakan gangguan endokrin yang ditandai dengan menstruasi yang tidak teratur, hiperandrogenisme, dan polikistik ovarium.¹ PCOS berkembang ketika ovarium distimulasi untuk memproduksi lebih banyak hormon androgen sehingga perkembangan jumlah folikel terganggu. Kenaikan level insulin berkontribusi secara langsung menyebabkan abnormalitas pada hipotalamus pituitari ovarium yang berdampak secara langsung pada terjadinya PCOS dengan mekanisme hiperinsulinemia yang meningkatkan frekuensi sekresi GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*), produksi LH (*Luteinizing Hormone*) melebihi FSH, meningkatnya produksi androgen ovarium, menurunnya pematangan jumlah folikel, dan meningkatnya ekspresi TGF- β (*transforming growth factor β*). Faktor-faktor ini berkontribusi dalam perkembangan PCOS.² Sel punca mesenkimal dalam kondisi hipoksia dapat meningkatkan sekresi berbagai macam *soluble molecule* atau sekretom yang mengandung sitokin antiinflamasi seperti Interlekin-10 (IL-10) dan faktor pertumbuhan regeneratif seperti TGF- β .³ Namun belum ada terapi standar PCOS yang efektif hingga saat ini masih sedikit data mengenai penelitian pengaruh Sekretom sel punca mesenkimal hipoksia terhadap ekspresi TGF- β , kadar hormon estrogen, dan jumlah folikel.

Berdasarkan kriteria diagnostik *National Institutes of Health*, prevalensi PCOS 6 sampai 10% dari wanita usia reproduksi.⁴ Berdasarkan kriteria Rotterdam prevalensi PCOS sekitar 4–6% perempuan dari usia reproduksi, di Indonesia, sekitar 5,2% dan 4,7% dari perempuan usia reproduksi, dan 60% dari kasus infertilitas disebabkan PCOS.⁵ Pada tahun 2015, dari 8.612 wanita rentang usia 28-33 tahun, sebanyak 5,8% diantaranya mengalami PCOS dan sebanyak 309 wanita penderita PCOS tersebut mengalami infertilitas. Data tersebut membuktikan bahwa hampir 72% wanita penderita PCOS mengalami infertilitas.⁶ Infertilitas pada PCOS disebabkan karena anovulasi, dimana perkembangan folikel hanya mencapai ukuran 10 mm.⁷ PCOS sering bermanifestasi pada usia perimenars. Prevalensi wanita PCOS dengan obesitas sebesar 42% di wilayah Asia Tenggara, 30% di negara Spanyol, dan 38% di wilayah Yunani. Wanita PCOS di dunia dengan resistensi insulin memiliki prevalensi antara 25-70%.⁸

Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Han dkk menyebutkan bahwa kultur sel punca mesenkimal dengan kondisi hipoksia 2% dapat meningkatkan bioaktivitas dan regenerasi jaringan. Selain itu juga meregulasi superoksida dismutase dan aktivitas katalase sehingga mencegah stres oksidatif.⁹ Sebuah penelitian menunjukkan bahwa ekspresi mRNA *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) pada mencit model endometriosis yang mendapat sel punca mesenkimal lebih rendah daripada kelompok yang tidak. Sehingga tidak ada hubungan antara ekspresi

mRNA VEGF dan jumlah folikel primer terhadap infertilitas.¹⁰ Penelitian lain mengatakan bahwa sel punca mesenkimal medium dari jaringan lemak mensekresikan protein dalam jumlah yang lebih tinggi dibandingkan dengan protein yang dihasilkan oleh jaringan tali pusat. Semakin matang suatu sel, semakin banyak pula protein yang dihasilkan. Namun kondisi hipoksia dengan oksigen 2% belum memberikan perbedaan yang signifikan terhadap produksi protein terkait kebutuhan terhadap *cell survival*.¹¹ IL-10 merupakan salah satu kandungan yang terdapat pada sekretome, IL-10 produk monosit dan limfosit yang telah dianggap sebagai salah satu sitokin pengatur kekebalan antiinflamasi yang sangat penting, karena secara efektif mengatur sitokin pro-inflamasi ke bawah seperti IL-1, IL-6, dan TNF- α). Sitokin pro dan anti-inflamasi harus seimbang agar tidak berpartisipasi dalam PCOS. Selain itu gen polimorfik IL-10 dapat menjadi biomarker penting untuk kecenderungan PCOS.¹²

Secara normal, kadar hormon estrogen mencapai titik terendah pada saat seorang wanita dalam keadaan menstruasi. Pada waktu yang bersamaan, kadar LH dan FSH mulai meningkat dan merangsang pembentukan folikel ovarium yang mengandung ovum. Folikel yang matang memproduksi hormon androgen seperti testosteron dan androstenedion yang akan dilepaskan ke sirkulasi darah. Beberapa dari hormon androgen tersebut akan berikatan dengan *sex hormone binding globulin* (SHBG) di dalam darah. Peningkatan produksi androgen menyebabkan terganggunya perkembangan folikel sehingga tidak dapat

memproduksi folikel yang matang. Hal ini mengakibatkan berkurangnya estrogen yang dihasilkan oleh ovarium dan tidak adanya lonjakan LH yang memicu terjadinya ovulasi. Selain itu adanya resistensi insulin menyebabkan keadaan hiperinsulinemia yang mengarah pada keadaan hiperandrogen, karena insulin merangsang sekresi androgen dan menghambat sekresi SHBG hati sehingga androgen bebas berikatan. TGF- β juga dikaitkan dengan kondisi PCOS dan resistensi insulin, hal ini karena TGF- β merupakan regulator yang kuat untuk proliferasi dan diferensiasi banyak sel ekspresi gen target termasuk insulin.¹³

MSC merupakan molekul aktif yang dapat stabil dalam suhu 2-8°C dalam waktu yang lama.¹⁴ Terapi berbasis MSC telah menjanjikan sebagai pilihan pengobatan untuk PCOS karena sifat pembaruan diri, potensi diferensiasi, dan aktivitas imunomodulator, terutama pada penyakit terkait inflamasi. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa MSC memiliki potensi untuk memulihkan dan meningkatkan fungsi ovarium, yang dimediasi oleh jalur pensinyalan parakrin.¹⁵ Penelitian yang dilakukan oleh chug melaporkan bahwa sekretom terapi berbasis BM-hMSC, berfungsi sebagai terapi sel induk baru untuk pasien dengan PCOS.¹⁶ Penelitian lain juga menyatakan bahwa penggunaan sel punca mesenkimal dan sekresinya dalam mengurangi penanda inflamasi dalam pengobatan PCOS.¹⁵ Oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengungkap peran Sekretom Sel Punca Mesenkimal Hipoksia terhadap Ekspresi TGF-

β , Kadar Hormon Estrogen dan Jumlah Folikel terhadap tikus model PCOS.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

Apakah terdapat pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap ekspresi TGF- β , kadar Hormon Estrogen, dan Jumlah Folikel pada tikus betina galur Wistar dengan PCOS-like?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap ekspresi TGF- β , kadar hormon estrogen, dan jumlah folikel pada tikus betina galur Wistar dengan PCOS-like.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Membuktikan pengaruh pemberian SH-MSCs pada dosis 200 μ L dan dosis 400 μ L terhadap penurunan ekspresi TGF- β antar kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol.
2. Membuktikan pengaruh pemberian SH-MSCs pada dosis 200 μ L dan dosis 400 μ L terhadap peningkatan kadar hormon estrogen antar kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol.

3. Membuktikan pengaruh pemberian SH-MSCs pada dosis 200 μ L dan dosis 400 μ L terhadap penurunan jumlah *cystic follicle* antar kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol.

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1 Originalitas Penelitian

No.	Peneliti, Tahun	Judul	Variabel Bebas	Variabel Tergantung	Hasil
1	Wang, Liu, Fujino, Tong, Zhang, & Yan, 2019. ¹⁷	Stem Cell as a Resource for treatment of Infertility-related Disease	Stem Cell	Infertilitas	Stem Cell dapat mengobati infertilitas
2	Prayitno, Lestari, & Sartika, 2023. ¹⁵	Potential of Mesenchymal Stem Cells and Their Sekretomes in Decreasing Inflammation Markers in Polycystic Ovary Syndrome Treatment: A Systematic Review	Mesenchymal Stem Cells and Their Sekretomes	Inflammation Markers in Polycystic Ovary Syndrome	Penggunaan MSC dan sekresinya berpotensi mengobati pasien PCOS
3	Esfandyari Chugh, & Park, 2020. ¹⁸	Mesenchymal Stem Cells as a Bio Organ for Treatment of Female Infertility	Mesenchymal Stem Cells	Female Infertility	miRNA Eksosomal dapat mengendalikan gen ekspresi MSC peningkatan kesehatan reproduksi wanita.
4.	Santoso, Sulistyono, & Widjianti, 2013. ¹⁹	Efektivitas Terapi Rat Bone Marrow Stem Cell pada Tikus Model Sindroma Ovarium Poli Kistik terhadap Folikulogenesis dan Ekspresi Transforming Growth Factor- β	Rat Bone Marrow Stem Cell	Ekspresi Transforming Growth Factor- β	penyediaan RBMSC ke tikus PCOS dapat meningkatkan kesuburan, folikulogenesis dan peningkatan ekspresi TGF- β
5.	Chugh, Park, & Esfandyari, 2021. ¹⁶	Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Media Regulate Steroidogenesis and Inhibit Androgen Secretion in a PCOS	Mesenchymal Stem Cells	PCOS Model via BMP-2	Hasil menunjukkan bahwa BMP-2 adalah mediator utama dalam model PCOS

Berdasarkan tabel 1 penelitian terdahulu melaporkan bahwa stem cell dapat mengobati infertilitas.¹⁷ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana SH-MSCs akan ditreatment pada tikus PCOS-like dan di analisis ekspresi TGF- β , kadar hormon estrogen dan jumlah folikel. Penelitian terdahulu menyatakan bahwa penggunaan MSC dan sekresinya berpotensi mengobati pasien PCOS.¹⁵ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana SH-MSCs akan ditreatment pada tikus PCOS-like dan di analisis ekspresi TGF- β , kadar hormon estrogen dan jumlah folikel. Penelitian yang lain melaporkan bahwa miRNA Eksosomal dapat mengendalikan gen ekspresi MSC peningkatan kesehatan reproduksi wanita.¹⁸ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana SH-MSCs akan ditreatment pada tikus PCOS-like dan di analisis ekspresi TGF- β , kadar hormon estrogen dan jumlah folikel. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa penyediaan RBMSC ke tikus PCOS dapat meningkatkan kesuburan, folikulogenesis dan peningkatan ekspresi TGF- β .¹⁹ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana SH-MSCs akan ditreatment pada tikus PCOS-like dan di analisis ekspresi TGF- β , kadar hormon estrogen dan jumlah folikel. Penelitian lain membuktikan bahwa BMP-2 adalah mediator utama dalam model PCOS.¹⁶ Penelitian tersebut berbeda dengan penelitian ini dimana SH-MSCs akan ditreatment

pada tikus PCOS-like dan di analisis ekspresi TGF- β , kadar hormon estrogen dan jumlah folikel.

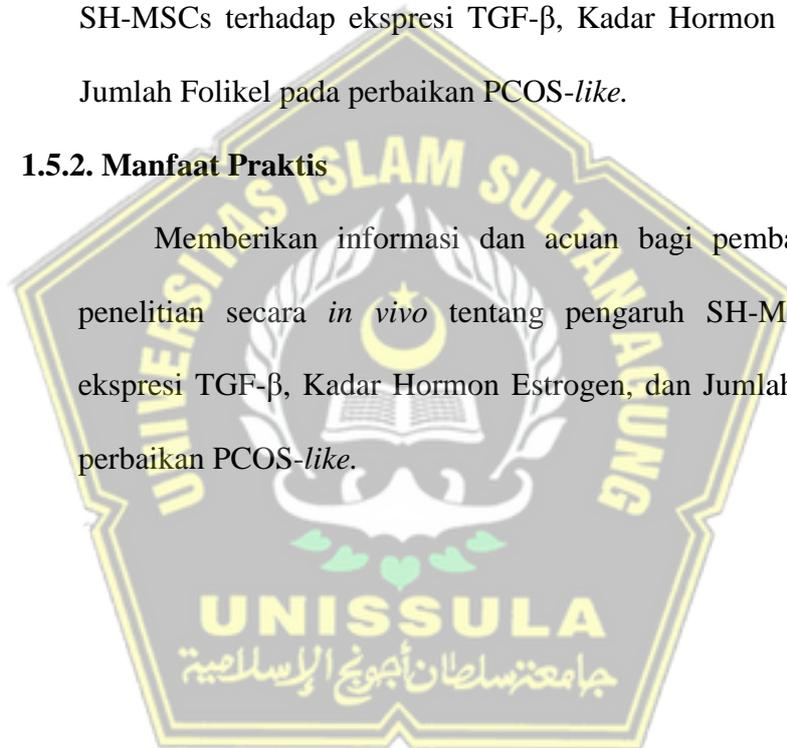
1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Memberikan sumbangan keilmuan medis tentang penggunaan SH-MSCs terhadap ekspresi TGF- β , Kadar Hormon Estrogen, dan Jumlah Folikel pada perbaikan PCOS-like.

1.5.2. Manfaat Praktis

Memberikan informasi dan acuan bagi pembaca mengenai penelitian secara *in vivo* tentang pengaruh SH-MSCs terhadap ekspresi TGF- β , Kadar Hormon Estrogen, dan Jumlah Folikel pada perbaikan PCOS-like.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Transforming growth factor-β* (TGF-β)

2.1.1. Definisi TGF-β

Transforming growth factor-β (TGF-β) merupakan protein yang disekresikan untuk meregulasi proliferasi, diferensiasi dan kematian dari berbagai jenis sel.²⁰ TGF-β dapat memicu pertumbuhan pembuluh darah (angiogenesis) meskipun dapat menghambat proliferasi endotelial, TGF-β juga termasuk senyawa kemotaktis yang kuat bagi makrofag. TGF-β dapat dihasilkan oleh bermacam jenis sel kekebalan seperti makrofag, sel dendritic, sel B, dan sel T. TGF-β adalah immunosuppressor yang utama yang berkaitan dengan peradangan, autoimun dan kanker.²¹

TGF-β ialah famili dari sitokin pluripoten yang terdiri dari tiga isoform yakni TGF-β 1, 2, dan 3. TGF-β memiliki tugas sebagai faktor regulasi transformasi beta superfamili, yang terdiri dari activin, inhibin, tulang morphogenic protein, anti-mullerian hormon, dan decapentaplegik. TGF-β juga dapat merangsang produksi sel molekul adhesi, molekul matriks ekstraselular, dan faktor pertumbuhan lainnya. Ketiga anggota famili TGF-β mempunyai struktur peptida yang sangat mirip. TGF-β1 mengandung 390 asam amino, dalam TGF-β2 mengandung 412 asam amino, dan dalam TGF-β3 juga mengandung

412 asam amino. Ketiga famili TGF- β memiliki terminal N-peptida yang meliputi 20 hingga 30 asam amino.²¹

2.1.2. Peran TGF- β Secara Umum

TGF- β adalah sitokin multifungsional dimana memiliki peran secara umum dalam beberapa proses seluler seperti proliferasi, diferensiasi, migrasi, dan apoptosis yang digunakan untuk menjaga homeostasis suatu jaringan.²² TGF- β dan reseptornya terekspresi dalam seluruh jaringan didalam tubuh dan transduksi sinyalnya memiliki fungsi penting dalam bermacam penyakit. Kehilangan fungsi dari TGF- β sebabkan kelainan didalam tubuh, beberapa inflamasi jaringan tumor dan jaringan normal, hiperproliferasi sel, penyakit autoimun. Ekspresi TGF- β yang berlebih pada dasarnya bersifat immunosupresi.

Berikut ini peran TGF- β pada beberapa kondisi dan penyakit yakni :

1. Kardiovaskuler

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa peran TGF- β dapat memproteksi atau bahkan menyebabkan progresi dari penyakit kardiovaskular tersebut. Hal ini disebabkan karena TGF- β merupakan salah satu sitokin immunomodulator yang aksi kerjanya berpengaruh terhadap banyak tipe sel yang menyusun dinding-dinding pembuluh darah jantung. TGF- β dapat berperan dalam migrasi, diferensiasi, proliferasi maupun apoptosis sel. Meskipun demikian, keberadaan TGF β -1 merupakan suatu petanda adanya aktivitas pada jaringan dimana TGF β -1 tersebut muncul.²³

2. Endometrosis

Beberapa faktor seperti TGF- β , IGF-1, HGF dan VEGF meningkat pada kondisi endometrosis. Sejumlah faktor diatas memiliki aktifitas mitogenik pada sel endometrium. Berbeda dengan endometrium normal, sel endometriosis mengeluarkan sitokin secara berbeda atau aberan. Produksi sitokin meningkat pada cairan peritonium dan memiliki ekspresi yang kurang terhadap reseptor progesteron. Diperkirakan abilitas endometrium yang rendah untuk mendukung prolifersi autologous limfosit berkontribusi terhadap perubahan sekresi sitokin.²⁴ Pada penelitian sebelumnya juga sudah dibuktikan bahwa famili TGF- β menunjukkan efek peningkatan pertumbuhan pada sel endometrium dan endometriosis.²⁵

3. *Polycystic Ovary Syndrome* (PCOS)

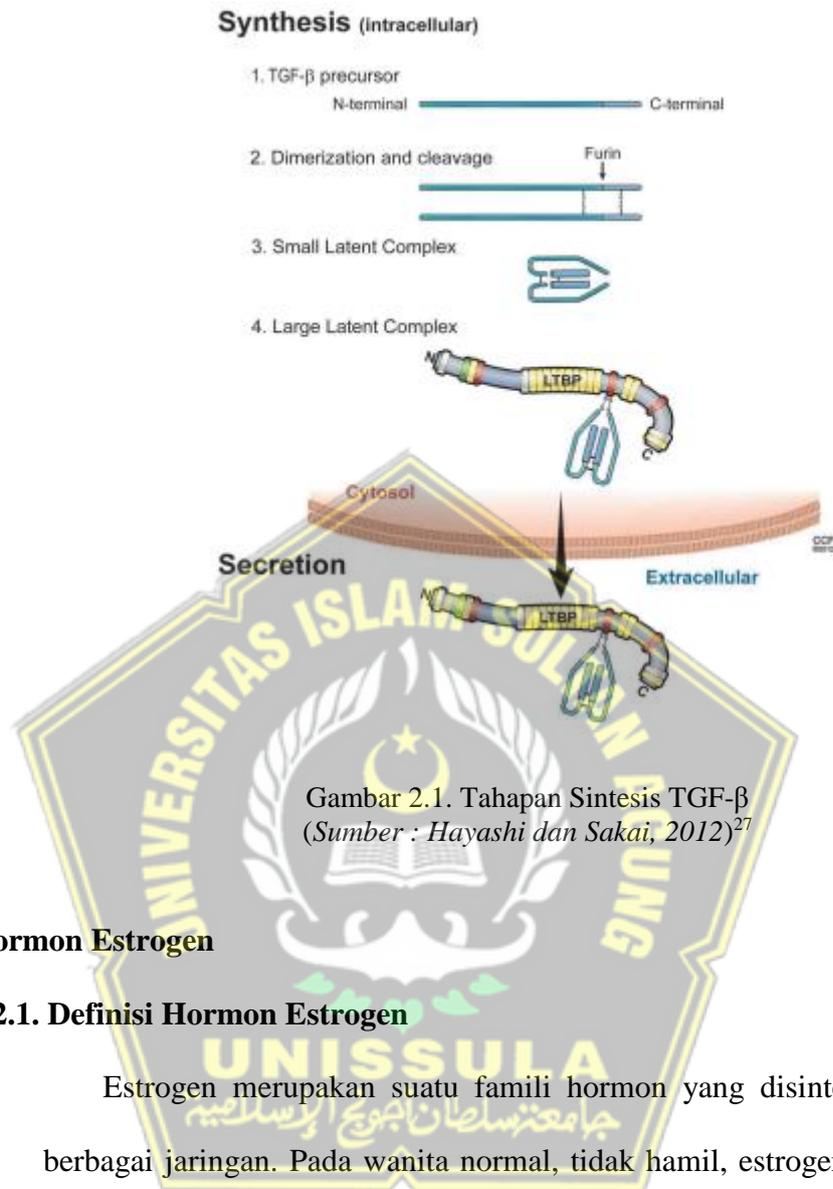
Implikasi langsung TGF- β dan jalur pensinyalannya pada kelainan reproduksi yang menjadi ciri PCOS, termasuk, anovulasi dan hiperandrogenisme ovarium / adrenal, terutama bersifat inferensial. Seperti dibahas di atas, peningkatan stroma ovarium dan stroma ovarium yang menebal mungkin merupakan tanda atau gejala sisa dari disregulasi TGF- β lokal. Ada beberapa penelitian pada manusia yang secara langsung menargetkan efek lokal atau sistemik dari disregulasi TGF- β pada wanita dengan PCOS. Mamalia mengekspresikan 3 dari 5 isoform TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2, dan TGF- β 3.⁷² Kami telah memeriksa tingkat sirkulasi TGF- β 1 dan TGF- β 2 pada wanita

dengan PCOS dan menemukan korelasi genotip yang signifikan dengan A8 dari D19S88.²⁶

2.1.3. Sintesis TGF- β

TGF- β dan reseptornya terekspresi secara luas di semua jenis sel, regulasi di setiap langkah sangat ketat, mulai dari sintesis, aktivasi, dan pensinyalan harus dilakukan untuk menjaga homeostasis jaringan. TGF- β disintesis dan di sekresikan sebagai kompleks laten dan diubah dari bentuk laten menjadi bentuk aktif untuk mengikat reseptor TGF- β berafinitas tinggi. Aktivasi TGF- β laten semakin dikenal sebagai langkah penting dalam pengendalian aktivitas TGF- β .²⁷ Menurut Hayashi dan Sakai (2012), tahapan sintesis TGF- β yakni:

1. TGF- β disintesis sebagai protein prekursor
2. Dua protein prekursor TGF- β dimerisasi melalui jembatan disulfida
3. Prekursor TGF- β -dimer dibelah oleh furin untuk menghasilkan kompleks TGF- β laten kecil, dimana peptida terkait latensi dan peptida TGF- β dewasa dihubungkan dengan ikatan non-kovalen
4. Kompleks laten besar dibentuk oleh hubungan kovalen antara kompleks laten kecil dan protein pengikat *Latent TGF β binding protein* (LTBP), kemudian disekresikan dan dimasukkan ke dalam matriks ekstraseluler.



2.2. Hormon Estrogen

2.2.1. Definisi Hormon Estrogen

Estrogen merupakan suatu famili hormon yang disintesis dalam berbagai jaringan. Pada wanita normal, tidak hamil, estrogen disekresi terutama oleh ovarium, walaupun dalam jumlah kecil juga disekresi oleh korteks adrenal. Pada kehamilan, dalam jumlah besar juga disekresi oleh plasenta, tentu saja sampai 100 kali jumlah yang disekresi oleh ovarium selama siklus bulanan normal.²⁸ Terdapat tiga jenis hormon estrogen yaitu sebagai berikut :

1. *Estron* (E1)

Pada beberapa spesies, estron yang disintesis dalam sejumlah jaringan terdapat dengan jumlah yang lebih berlimpah.

2. *Estradiol* (E2)

Estradiol merupakan jenis yang terpenting karena memiliki kekuatan estrogenic 12 kali kekuatan estron dan 80 kali estriol. Sehingga efek estrogenic estradiol biasanya beberapa kali kekuatan kedua hormon lainnya (estron dan estriol). Estradiol merupakan senyawa steroid, disintesis dari kolesterol atau asetil CoA di dalam ovarium.

3. *Estriol* (E3)

Pada kehamilan estriol diproduksi dalam jumlah yang relatif lebih banyak karena hormone ini berasal dari plasenta.

Estrogen sebenarnya bukan hanya sekedar hormon pada wanita, tetapi diketahui juga bahwa estrogen dapat menjalankan fungsi sebagai antioksidan. Kolesterol *Low Density Lipoprotein* (LDL) lebih mudah menembus plak di dalam dinding nadi pembuluh darah apabila dalam kondisi teroksidasi. Peranan estrogen sebagai antioksidan adalah mencegah proses oksidasi LDL, sehingga kemampuan LDL untuk menembus plak akan berkurang. Peranan estrogen yang lain adalah sebagai pelebar pembuluh darah jantung sehingga aliran darah menjadi lancar dan jantung memperoleh suplai oksigen secara cukup. Pada saat menopause estrogen mulai berkurang akan tetapi, seiring dengan meningkatnya usia, khususnya menjelang masa menopause, kadar hormon estrogen dalam organ kaum wanita akan terus menurun,

sehingga dapat menimbulkan beberapa efek, di antaranya hot flash, berkeringat pada waktu tidur, dan kecemasan yang berlebihan, termasuk meningkatnya resiko mengidap berbagai penyakit.²⁹

2.2.2. Sintesis Hormon Estrogen

Sintesis hormon estrogen terjadi di dalam sel-sel theka dan sel-sel granulosa ovarium, dimana kolesterol merupakan prekursor dari hormon ini, dan pembentukannya melalui serangkaian reaksi enzimatik.



Gambar 2.2. Sintesis dan Pelepasan Hormon Estrogen
(Sumber : Aditia et al, 2018)³⁰

Kerja sama antara sel theka dan sel granulosa dalam pembentukan hormon. LH diketahui berperan dalam sel theka untuk meningkatkan aktivitas enzim pembelah rantai sisi kolesterol melalui pengaktifan Adenosin Triphospat (ATP) menjadi Cyclic adenosine monophosphate (cAMP), dan dengan melalui beberapa proses reaksi enzimatik

terbentuklah androstenedion, kemudian androstenedion yang dibentuk dalam sel theka berfungsi ke dalam sel granulosa, selanjutnya melakukan aromatisasi membentuk estron dan estradiol 17β . Kolesterol sebagai pembakar (prekursor) steroid disimpan dalam jumlah yang banyak di sel-sel theka. Pematangan folikel yang mengakibatkan meningkatnya biosintesa steroid dalam folikel diatur oleh hormon gonadotropin.³⁰ Pada proses pembentukan hormon steroid dapat terjadi reaksi-reaksi sebagai berikut :

- a. Reaksi desmolase : pemecahan / pembelahan rantai samping.
- b. Konversi kelompok hidroksi menjadi keton atau kelompok keton menjadi kelompok hidroksil : reaksi dehidrogenase.
- c. Reaksi hidroksilasi : perubahan kelompok OH.
- d. Pemindahan hidrogen : terbentuknya ikatan ganda
- e. Saturasi : penambahan hidrogen untuk mengurangi ikatan ganda.

2.2.3. Transduksi Sinyal Hormon Estrogen

Estradiol memasuki sel-sel bebas dan berinteraksi dengan target sitoplasma sel reseptor. Setelah reseptor estrogen yang telah mengikat ligan, estradiol dapat memasukkan inti dari sel target, dan mengatur transkripsi gen, yang mengarah ke pembentukan messenger RNA (mRNA). mRNA berinteraksi dengan ribosom untuk memproduksi protein tertentu yang mengekspresikan efek estradiol pada sel target.³¹

Setelah estrogen di sekresi oleh ovarium, estrogen bersirkulasi dalam darah hanya selama beberapa menit sebelum mereka di kirim ke

sel sasaran. Waktu masuk dalam sel ini, estrogen berikatan dalam 10 sampai 15 detik dengan protein “reseptor” dalam sitoplasma dan kemudian, dalam ikatan dengan protein ini, bermigrasi ke inti. Ia akan segera memulai proses transkripsi DNA-RNA dalam area kromosom dan spesifik, dan *Ribonucleat Acid* (RNA) mulai dalam beberapa menit. Selain itu, setelah beberapa jam, *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA) dihasilkan juga, akhirnya mengakibatkan pembelahan sel.³¹ RNA berdifusi ke sitoplasma, tempat ia menyebabkan peningkatan pembentukan protein yang besar dan selanjutnya mengubah fungsi sel. Salah satu perbedaan utama antara estrogen dan testosteron adalah bahwa efek estrogen hampir seluruhnya pada organ sasaran tertentu, seperti uterus, kelenjar mammae, rangka, dan daerah lemak tubuh tertentu; sedangkan testosteron mempunyai efek yang lebih umum di seluruh tubuh.³⁰

2.3. Folikel

Fungsi reproduksi wanita memiliki siklus aktivitas yang ditandai dengan pertumbuhan dan perkembangan dari folikel dominan. Normalnya ovarium akan memproduksi satu folikel dominan yang akan mengalami ovulasi pada setiap siklus menstruasi. Folikel dominan akan memproduksi estradiol pada saat fase folikuler dari siklus ovarium. Setelah ovulasi, folikel akan berubah menjadi corpus luteum yang akan mensekresi progesteron dalam jumlah besar saat fase luteal dari siklus menstruasi. Estradiol dan progesteron bekerja pada

uterus untuk mempersiapkan kondisi uterus sebagai tempat implantasi embrio.³² Folikel dibagi menjadi 2, yaitu sebagai berikut :

1. Folikel Primer

Folikel primer ditandai dengan adanya satu atau lebih sel granulosa kuboid yang tersusun dalam satu lapis sel yang mengelilingi oosit. Proses perkembangan utama yang terjadi pada folikel primer termasuk ekspresi reseptor FSH dan pertumbuhan serta diferensiasi oosit.

2. Folikel Sekunder

Dengan berlanjutnya folikulogenesis preantral, struktur folikel mulai mengalami perubahan. Perubahan yang utama selama perkembangan folikel sekunder yaitu peningkatan jumlah sel granulosa dan penambahan sel theca. Perkembangan folikel primer menjadi folikel sekunder yang berkembang sempurna merupakan hasil dari proses aktif pengaturan autokrin atau parakrin termasuk faktor-faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh oosit.

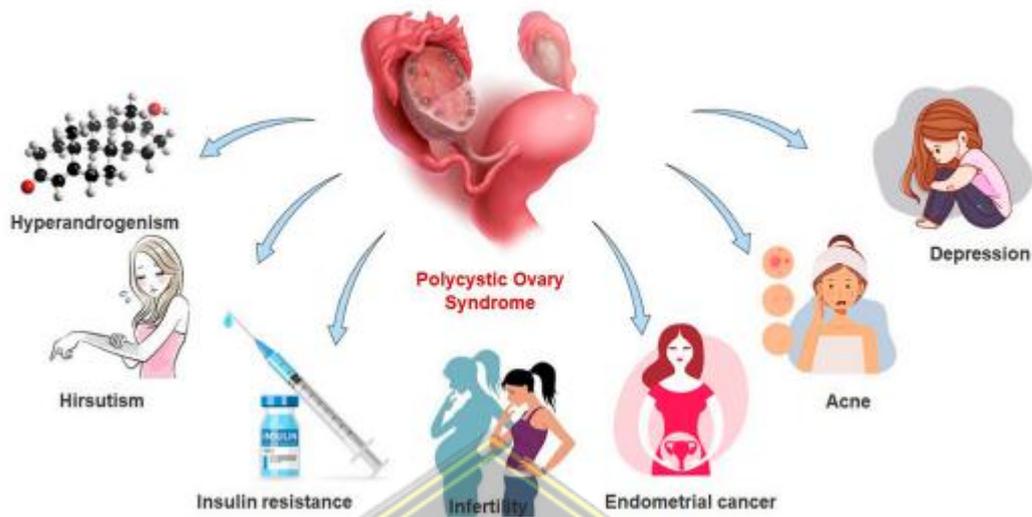
Perkembangan berbagai tahapan folikel juga sangat dipengaruhi oleh banyak faktor diantaranya interaksi antara hormon steroid intrafolikel dengan faktor-faktor pertumbuhan, faktor diluar ovarium dan sistem hipotalamus dan hipofisa.³³

2.4. *Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)*

2.4.1. Definisi

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) dianggap sebagai penyakit endokrinologis yang berkaitan dengan disregulasi psikologis,

metabolisme, dan sistem reproduksi dan merupakan salah satu masalah masyarakat. PCOS memiliki sifat anovulasi yaitu kondisi yang memiliki pengaruh pada kesuburan wanita. Secara ultrasonografi, ovarium memiliki peningkatan volume jumlah folikel yang belum matang atau biasa disebut polikista. Ciri utamanya adalah kadar hormon seks yang tidak seimbang dan anovulasi kronis karena peningkatan hormon androgen (hiperandrogenisme) tanpa adanya penyakit adrenal dan penyakit hipofisis yang spesifik. PCOS meningkatkan risiko dalam jangka pendek maupun jangka panjang terjadinya kanker endometrium, masalah psikologis (kecemasan dan depresi), pre-eklamsia, aborsi berulang, kematian perinatal dan kemungkinan kanker payudara dan risiko obesitas jangka panjang, diabetes tipe 2, sindrom metabolik, hipertensi, makrosomia janin, penyakit kardiovaskular, tiroid, dan hiperplasia. Komplikasinya termasuk infertilitas hirsutisme, uterus disfungsi perdarahan, komplikasi kehamilan, siklus menstruasi tidak teratur, alopecia, dan jerawat.³⁴



Gambar 2.3. Manifestasi Klinis PCOS
(Sumber : Yasmin et al, 2022)³⁴

2.4.2. Karakteristik PCOS

PCOS ditandai dengan tingkat *folicle stimulating hormone* (FSH), *Luteinizing hormone* (LH), estradiol, serum androgen (testosteron dan androstenedione), hormon anti-mullerian (AMH) yang tinggi, prolaktin, dan hiperprolaktinemia. Selain itu, resistensi insulin juga berkaitan dengan penyakit PCOS, dimana kelebihan hormon androgen menyebabkan berkurangnya SHBG dengan menghambat sintesisnya di hati. Namun kadar SHBG yang rendah dianggap sebagai biomarker kelainan metabolik dan berkaitan dengan resistensi insulin, hiperandrogenisme, dan metabolisme glukosa abnormal pada penderita PCOS.³⁵

2.5. Mesenchymal Stem Cell

2.5.1. Definisi

Mesenchymal stem cell (MSC) adalah sel punca yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel, termasuk sel adiposity, osteoblast, kondrosit, neuronal, miosit, β -pankreas. Memiliki dua karakteristik, yaitu pembaruan diri secara terus menerus (*self renewal*) dan kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi tipe sel dewasa yang terspesialisasi.³⁶ Beberapa klasifikasi MSC sebagai berikut :

2.5.1.1. Berdasarkan plastisitas

- a. Totipoten adalah sel yang dapat berdiferensiasi menjadi semua jenis sel
- b. Pluripoten adalah sel-sel yang dapat berdiferensiasi menjadi semua jenis sel dalam tubuh, namun tidak dapat membentuk organisme baru
- c. Multipotent adalah sel yang dapat berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel dewasa.

2.5.1.2. Berdasarkan Sumber Asal

- a. Sel punca embrionik
- b. Sel punca dewasa

2.5.2. Fungsi MSC

2.5.2.1. Imunomodulator

MSC mampu meregulasi system imun dan mempercepat perbaikan jaringan yang mengalami kerusakan

melalui mekanisme parakrin. MSC memberikan efek immunosupresif pada sel B, sel *Natural killer* (NK), sel dendritik dan netrofil.³⁶

2.5.2.2. Kemampuan Diferensiasi

MSC mempunyai kemampuan untuk memperbarui diri dan mempertahankan multipotensi yang artinya dapat berdiferensiasi menjadi osteoblast, adipositas, kondrosit dan miosit.³⁷

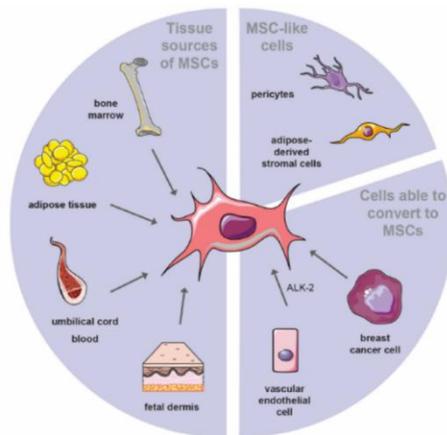
2.5.2.3. Antimikrobal

Efek antimikrobal MSC sangat kuat baik melalui mekanisme langsung atau tidak langsung, sebagian besar dimediasi oleh *Anti Microbial Peptide* (AMP). Sekresi AMP yang diekspresikan oleh MSC : cathelicidin LL-37, human defensins, hepcidin dan lipocalins.³⁸

2.5.3. Sumber MSC

Sumber utama dari stem cell berasal dari embrio dan sumsum tulang, tetapi beberapa penelitian melaporkan berbagai jaringan yang mengandung MSC sebagai berikut³⁹:

- a. Jaringan *dental pulp*
- b. Jaringan adiposa
- c. Sel somatik (kulit)
- d. Jaringan plasenta
- e. Jaringan endometrial

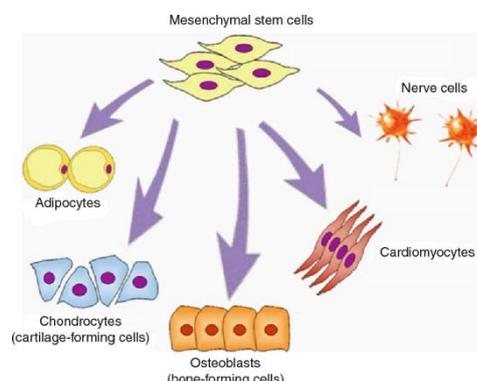


Gambar 2.4. Sumber *mesenchymal stem cell* (MSCs).⁴⁰

2.5.4. Karakteristik MSC

MSC memiliki tiga karakteristik biologis yang memenuhi syarat sebagai terapi seluler³⁹:

- a. Dapat mengekspresikan penanda permukaan sel tertentu seperti CD73, CD90 dan CD105 dan tidak memiliki ekspresi penanda lain termasuk molekul permukaan CD45, CD34, CD14, atau CD11b, CD79alpha atau CD19 dan HLA-DR;
- b. Mempunyai sifat perlekatan pada plastic kultur
- c. Memiliki kapasitas untuk berdiferensiasi menjadi osteoblas, adiposit dan kondroblas dalam kondisi *in vitro*.



Gambar 2.5. Kemampuan diferensiasi dari MSCs ⁴¹

2.5.5. Peran MSCs

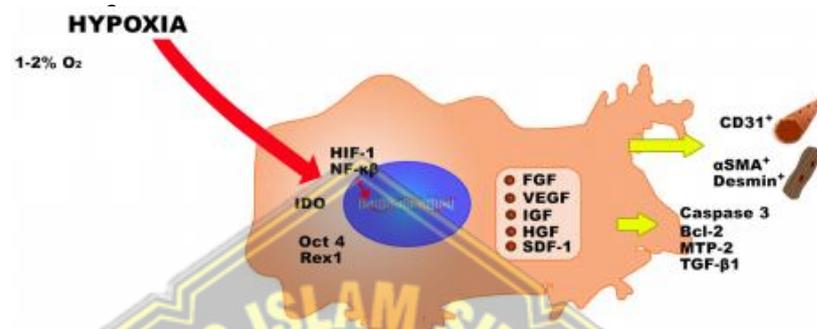
Secara *in-vivo*, MSCs berfungsi dalam proses regenerasi suatu jaringan. Peran MSCs dalam regenerasi jaringan berkaitan dengan kemampuan MSCs dalam berdiferensiasi dan meregulasi kondisi imun dalam tubuh. Kemampuan diferensiasi MSCs memungkinkan untuk dapat mengganti jaringan yang rusak. Sedangkan kemampuan MSCs sebagai imunoregulator berkaitan dengan kemampuan MSCs untuk berubah menjadi MSCs tipe 1 yang bersifat pro-inflamasi atau menjadi MSCs tipe 2 yang bersifat anti-inflamasi. MSCs tipe 1 berperan dalam memicu proses inflamasi yang menyebabkan beberapa komponen inflamasi segera menuju ke lokasi inflamasi. Hal ini menyebabkan proses inflamasi akan berlangsung lebih cepat dibandingkan dengan kondisi normal. Ketika proses inflamasi selesai, MSCs akan berubah peran menjadi MSCs tipe 2 yang bersifat anti-inflamasi dan memiliki kemampuan dalam mengekskresikan sitokin-sitokin yang berperan dalam menghentikan proses inflamasi.^{42,43}

2.6. Hipoksia

2.6.1. Definisi Hipoksia

Hipoksia merupakan keadaan tidak tersedianya suplai oksigen pada jaringan. Hipoksia bersifat merusak bagi berbagai jenis sel dan pada kondisi hipoksia jangka panjang dapat memicu terjadinya apoptosis sel. Namun menurut beberapa penelitian kondisi hipoksia dapat

meningkatkan kemampuan proliferasi, self renewal, dan pelekatan MSCs⁴². Selain itu kondisi hipoksik memicu produksi molekul *Hipoxic Induce Factor* (HIF) yang berperan dalam peningkatan produksi sitokin-sitokin dari MSCs.⁴³



Gambar 2.6. Lingkungan hipoksia mengaktivasi MSC³⁸

2.6.2. Mekanisme Fisiologi Seluler

Ketergantungan kuat pada oksigen untuk homeostasis metabolik dan kelangsungan hidup menyebabkan evolusi awal mekanisme molekuler yang memungkinkan sel, jaringan, dan organisme untuk beradaptasi dengan hipoksia. Respon adaptif ini terutama diatur oleh keluarga faktor transkripsi yang disebut *hypoxia-inducible factors* (HIFs)⁴⁴.

HIF adalah heterodimer yang terdiri dari subunit protein HIF α , yang hanya diekspresikan selama hipoksia, dan subunit protein HIF1 β yang diekspresikan secara konstitutif. Selama normoksia, subunit HIF α dihambat oleh kompleks *Von Hippel-Lindau* (VHL) dan ditargetkan untuk degradasi proteasomal. Interaksi yang bergantung pada normoksia antara subunit HIF α dan kompleks VHL membutuhkan hidroksilasi dari

dua residu prolin dalam domain *oxygen-dependent degradation* (ODD) dari HIF α . Reaksi hidroksilasi ini, yang dikatalisis oleh *HIF-regulating prolyl-4-hydroxylases*, digabungkan dengan dekarboksilasi oksidatif-ketoglutarat menjadi suksinat dan karbon dioksida⁴⁵.

Hipoksia terjadi apabila adanya subunit HIF- α lolos dari degradasi konstitutif, menjadi stabil di sitoplasma, dimerisasi dengan HIF-1 β dan heterodimer inti mengatur ulang pola ekspresi gen sel hipoksia. Hal ini terutama, menginduksi gen yang memediasi peralihan dari metabolisme bergantung oksigen ke metabolisme anaerobik⁴⁴. HIF-1 α diekspresikan di sebagian besar jaringan manusia, sementara HIF-2 α dan HIF-3 α diekspresikan pada jaringan yang lebih terbatas dan pada tahap perkembangan, seperti paru-paru janin atau endotel vaskular yang berkembang. Dalam merefleksikan pola ekspresi jaringan spesifik mereka, HIF-1 α memainkan peran secara luas dalam regulasi transkripsi semua sel sebagai respons terhadap hipoksia, sedangkan HIF-2 α dan HIF-3 α memainkan peran yang lebih terbatas atau terspesialisasi dalam homeostasis oksigen⁴⁵.

2.7. Sekretom

2.7.1. Definisi Sekretom

Sekretom merupakan zat yang dihasilkan MSC mengandung faktor parakrin larut yang bertanggung jawab untuk perkembangan jaringan, homeostasis, regenerasi. Sekretom mampu mengeluarkan molekul neuroregulasi penting, seperti: *Brain-derived Neurotrophic Factor*

(BDNF), *Nerve Growth Factor* (NGF), *Insulin-Like Growth Factor-1* (IGF-1), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), faktor pertumbuhan transformasi beta (TGF- β), faktor neurotropik turunan glial (GDNF), faktor pertumbuhan fibroblas 2 (FGF-2), faktor sel induk (SCF), faktor perangsang koloni granulosit (G-CSF) dan faktor turunan sel stroma (SDF-1) baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.⁴⁶

2.7.2. Komposisi

Komposisi sekretom yang telah diteliti dan dapat digunakan untuk terapi tanpa sel : anti inflamasi (IL-4, IL-10, IL-3 dan TGF β), pro-inflamasi (IL2, IL12, IFN, TNF α , IL1 α), chemokines (MCK2, IL-8, MIK2b), hemopoetik (G-SCF dan GM-CSF), faktor pleiotropik (IL-6).⁴⁷

2.7.3. Modifikasi Pendorong MSC

Terdapat beberapa bukti yang menunjukkan bahwa modifikasi MSC dapat meningkatkan efek terapeutik sekretomnya. Berbagai rangsangan dan kondisi yang telah dikembangkan antara lain.⁴⁸

- a. Kultur sel dalam kondisi hipoksia, meningkatkan produksi faktor pertumbuhan dan molekul anti-inflamasi; rangsangan pro-inflamasi, menginduksi sekresi lebih tinggi dari faktor-faktor yang berhubungan dengan imunitas;
- b. Kultur pada sistem tiga dimensi, yaitu kultur sferoid, meningkatkan produksi faktor anti-inflamasi dan anti-tumor
- c. Rekayasa mikropartikel.

2.8. Dehydroepiandrosterone (DHEA)

Dehydroepiandrosterone (DHEA) adalah prohormon steroid. Pada usia 70 hingga 80 tahun, kadarnya mungkin serendah 10% hingga 20% dari yang ditemui pada individu muda. Mekanisme yang mendasari penurunan fisiologis ini tidak diketahui. Namun, penurunan kadar DHEA yang berkaitan dengan usia ini dapat berkorelasi dengan banyak fenomena terkait usia atau penurunan berbagai fungsi fisiologis.⁴⁴ DHEA adalah hormon steroid yang paling melimpah pada manusia. DHEA pada dasarnya adalah molekul manusia yang diproduksi di zona retikuler korteks kelenjar adrenal, gonad dan otak, dan disintesis dari DHEAS dan disekresikan sebagai respons terhadap pelepasan hormon adrenokortikotropik (ACTH) dalam menghadapi agen stres, seperti nyeri, hipotermia, hipoglikemia, hipoksia dan trauma. Tidak seperti hormon lain yang disekresikan oleh kelenjar adrenal, seperti kortisol dan aldosteron, pola sekresi DHEA tergantung pada usia.⁴⁵

2.9. Hubungan Sekretom Sel Punca *Mesenchymal* Hipoksia terhadap Ekspresi TGF- β , Kadar Hormon Estrogen dan Jumlah Folikel

Sekret dari MSC, yaitu sekretom mengandung berbagai faktor pertumbuhan dan sitokin, sehingga dapat digunakan sebagai terapi alternatif yang baik untuk terapi berbasis *stem cell*.⁴⁷ MSC telah diketahui perannya dalam meningkatkan regenerasi jaringan yang terluka dengan kapasitasnya untuk berdiferensiasi menjadi beberapa jenis jaringan. Namun, dibanding diferensiasinya menjadi jaringan baru, aktivitas parakrin lah yang paling mungkin terlibat besar dalam efek terapeutik MSC. Penelitian terbaru telah

melaporkan bahwa MSC yang dikondisikan dengan hipoksia meningkatkan kemampuan parakrin mereka⁵³.

MSC dapat memperbaiki dan mengganti sel yang rusak. Efek farmakologi akan tercapai apabila dosis, jalur pemberian dan kualitas sel punca yang digunakan telah memenuhi syarat. Faktor pertumbuhan merupakan hal yang dapat memicu terjadinya pembelahan sel dalam proses kultur.⁴⁶ *Conditional Medium* (CM) yang diperoleh dari modifikasi kultur hipoksia MSC mengandung sitokin dan faktor pertumbuhan yang cukup tinggi. Sitokin dan faktor pertumbuhan yang terdapat pada MSC salah satunya TGF- β .⁴⁷ Pada penderita PCOS Kenaikan kadar estron dan estradiol akan memberi umpan balik positif terhadap LH sehingga kadar LH lebih meningkat lagi. Sedangkan FSH tetap rendah tetapi masih terjadi pertumbuhan folikel sampai stadium antral dengan penampang kurang lebih 8 mm. Terjadilah penumpukan folikel kecil berjajar di tepi ovarium tetapi tidak membesar apalagi ovulasi. Pada sisi yang lain kadar testosterone yang meningkat menyebabkan hirsutisme dan atresia folikel karena suasana intra folikuler yang dominan adalah androgen bukan estrogen.⁴⁸

Terapi inflamasi dapat mengurangi sekresi androgen ovarium dan menginduksi ovulasi, sensititas insulin pada wanita dengan PCOS. Hal tersebut membuktikan bahwa mekanisme inflamasi yang menyebabkan disfungsi ovarium yang mana menyebabkan indung telur tidak mampu memproduksi estrogen.⁴⁹

Prekondisi hipoksia berpengaruh dalam meningkatkan kemampuan bertahan hidup dan proliferasi MSCs. MSCs hipoksia akan mengekspresikan *soluble molecule* berupa sitokin, kemokin dan *growth* faktor lebih banyak dari pada kondisi normal. Sitokin dan mediator yang muncul sebagai respon terhadap adanya hipoksia salah satunya IL-10 yang selanjutnya disebut sekretom hipoksia *mesenchymal stem cells* (SH-MSCs).⁵⁰



BAB III

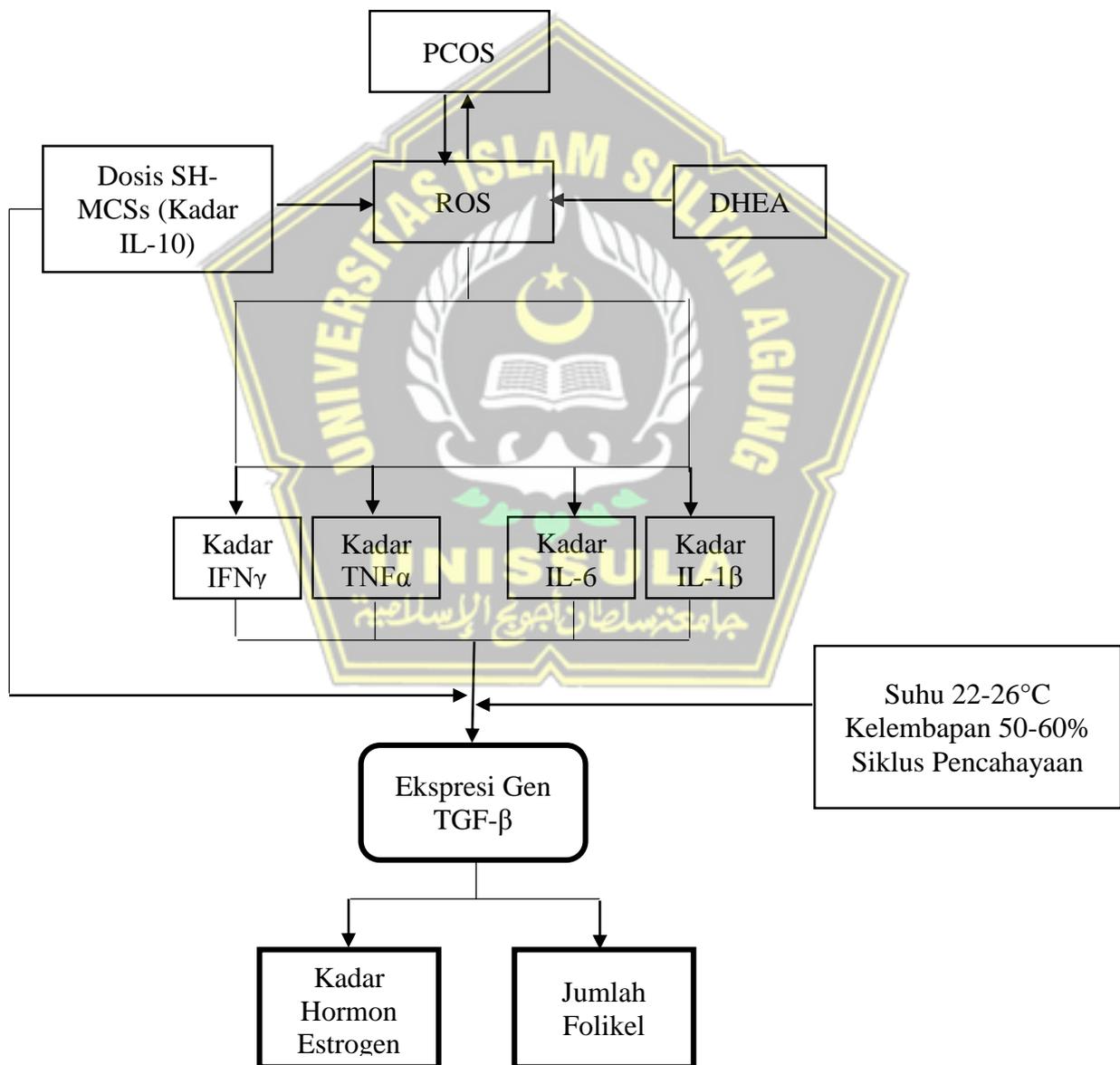
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Peran penting aksis *hypothalamus-pituitary-gonad* (HPG) pada patofisiologi *polycystic ovary syndrome* (PCOS) dapat dijelaskan akibat hiperandrogenisme dan resistensi insulin yang diperantarai oleh *low grade chronic inflammation*. Aktivasi *hypothalamus-pituitary-adrenal* (HPA) oleh stres memberikan efek inhibisi pada sistem reproduksi wanita.⁵¹ Hal ini menyebabkan sekresi androgen dari ovarium bertambah karena ovarium pada penderita sindrom ini lebih sensitif terhadap stimulasi gonadotropin.⁵² Peningkatan produksi androgen menyebabkan terganggunya perkembangan folikel sehingga tidak dapat memproduksi folikel yang matang. Hal ini mengakibatkan berkurangnya estrogen yang dihasilkan oleh ovarium dan tidak adanya lonjakan LH yang memicu terjadinya ovulasi.⁵¹ Anggota keluarga *transforming growth factor β* (TGF- β) adalah yang berperan dalam pertumbuhan folikel dan perkembangan oosit. Pada penderita PCOS juga akan mengalami penurunan ekspresi TGF- β .

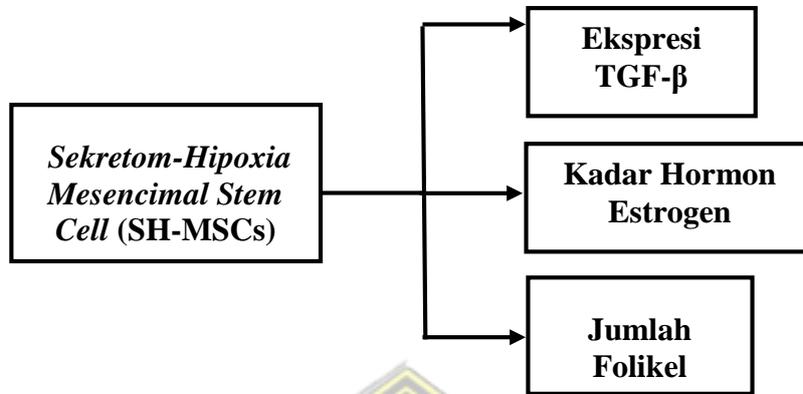
Prekondisi hipoksia berpengaruh dalam meningkatkan kemampuan bertahan hidup dan proliferasi MSCs. MSCs hipoksia akan mengekspresikan *soluble molecule* berupa sitokin, kemokin dan *growth* faktor lebih banyak dari pada kondisi normal. Sitokin-sitokin dan mediator–mediator yang muncul sebagai respon terhadap adanya hipoksia antara lain IL-10 dan HGF yang

selanjutnya disebut sekretom hipoksia *mesenchymal stem cells* (SH-MSCs).⁵⁰ Terapi berbasis sel punca mesenkimal (MSC) telah menjanjikan sebagai pilihan pengobatan untuk PCOS karena memiliki sifat pembaruan diri, potensi diferensiasi, dan aktivitas imunomodulator, terutama pada penyakit terkait inflamasi. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa MSC memiliki potensi untuk membantu memulihkan dan meningkatkan fungsi ovarium.¹⁵



Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.1. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap ekspresi TGF- β , kadar Hormon Estrogen, dan Jumlah Folikel pada tikus betina galur Wistar dengan PCOS-like.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan rancangan penelitian *post test only control group design*.

Penelitian ini menggunakan kelompok dengan rincian sebagai berikut :

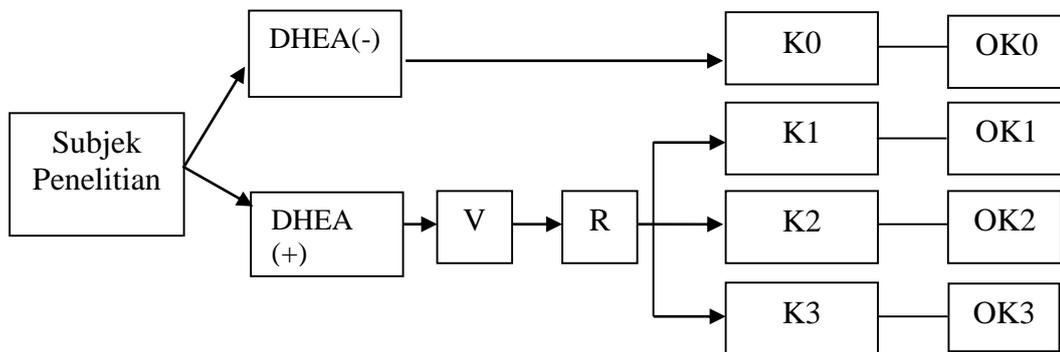
1. Kelompok K0: Sham (tikus sehat) selama 33 hari
2. Kelompok K1: Kontrol Negatif (PCOS diinduksi DHEA 6mg/100gBB selama 23 hari secara intraperitoneal yang tidak mendapat pengobatan)
3. Kelompok: K2 (Tikus model PCOS dengan DHEA 6mg/100gBB secara intraperitoneal dengan pemberian SH-MSCs dosis 200 μ L),
4. Kelompok: K3 (Tikus model PCOS dengan DHEA 6mg/100gBB secara intraperitoneal dengan pemberian SH-MSCs dosis 400 μ L).

DHEA : Induksi DHEA

V : Validasi

R : Randomisasi

O : Observasi



Gambar 4.1. Gambar Rancangan Penelitian

4.2. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.2.1. Variabel Penelitian

4.2.1.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah SH-MSCs dosis 200 μ L dan 400 μ L.

4.2.1.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi TGF- β , kadar hormon estrogen, dan jumlah folikel.

4.2.1.3. Variabel Pengganggu

a. Variabel terkontrol

1. Usia

Memilih subyek yang berumur 2 – 3 bulan.

2. Berat badan

Memilih subyek dengan berat badan antara 200 – 250 gram.

3. Waktu pemeriksaan hormon

Melakukan pengukuran kadar hormon pada waktu yang sama.

4. Dosis perlakuan dan lama perlakuan

Dikendalikan dengan pemberian dosis perlakuan yang sama disesuaikan pada masing-masing kelompok tikus dan memberikan perlakuan selama 33 Hari

5. Penyesuaian lingkungan

Dikendalikan dengan melakukan adaptasi pada subyek penelitian terlebih dahulu selama 3-7 hari.

b. Variabel Perancu

Jumlah pemberian pakan standar dapat mempengaruhi variabel dependen.

4.2.2. Defenisi Operasional

Tabel 4.1. Definisi Operasional

No.	Variabel	Deskripsi	Unit	Skala
1	Sekretom Hipoksia MSCs (SH-MSCs)	adalah molekul larut dan vesikel ekstraseluler yang disekresikan oleh MSCs. Molekul larut meliputi faktor biologis aktif seperti sitokin, kemokin dan faktor pertumbuhan. Sekretom diperoleh dari medium hasil prekondisi MSCs secara hipoksia. Kemudian dilakukan filtrasi dengan menggunakan <i>Tangential Flow Filtration</i> . SH-MSCs kemudian diinjeksikan secara intraperitoneal kepada beberapa kelompok yaitu	cc	Rasio

		kelompok K2 di berikan SH- MSCs 200 μ L dan kelompok K3 di berikan S-hMSCs 400 μ L.		
2	Ekspresi gen TGF- β	merupakan salah satu mediator inflamasi yang dilepaskan oleh platelet, neutofil, makrofag, dan fibroblast yang berfungsi dalam kemotaksis, proses differensiasi fibroblast menjadi myofibroblas, pembentukan matriks kolagen, menstimulasi angiogenesis, kontraksi luka, dan melepaskan factor pertumbuhan lainnya dalam stimulasi <i>matriks</i> <i>metalloproteinase</i> (MMP)	Ekspresi Relatif	Rasio
3	Kadar Hormon Estrogen	Hormon estrogen terdiri dari tiga jenis hormon yang berbeda, yaitu estron, estradiol, dan estriol. Pada wanita normal, estrogen banyak diproduksi oleh folikel selama proses ovulasi dan korpus luteum selama kehamilannya.	ng/ml	Rasio
4	Jumlah Folikel	memproduksi estradiol pada saat fase folikuler dari siklus ovarium. Setelah ovulasi, folikel akan berubah menjadi corpus luteum yang akan mensekresi progesteron dalam jumlah besar saat fase luteal dari siklus menstruasi	<i>Haugh</i> <i>Unit</i> (HU)	Rasio

4.3. Subyek Penelitian dan Sampel Penelitian

4.3.1. Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah tikus betina galur *wistar* berusia 2-3 bulan dengan bobot badan 200-250 gram yang dinyatakan layak digunakan untuk penelitian oleh *Stem Cell and Cancer Research Center* (SCCR) kota Semarang Jawa Tengah.

4.3.2. Sampel Penelitian

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi sampel penelitian adalah tikus betina galur *wistar* dengan kriteria sebagai berikut:

1. Umur 2-3 bulan.
2. Kondisi sehat dan tidak cacat.
3. Bobot badan 200-250 gram.
4. Tikus betina galur *wistar* yang terbukti PCOS setelah diinduksi

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

1. Tikus betina galur *wistar* dengan kriteria sudah pernah digunakan untuk penelitian sebelumnya.
2. Tidak terjadi PCOS

4.3.2.3. Kriteria *Drop Out*

1. Tikus mengalami infeksi atau mati selama penelitian.
2. Tikus yang sakit selama masa penelitian.

4.3.3. Besar Sampel

Sampel minimal dihitung dengan menggunakan kriteria WHO sebanyak 5 ekor sampel per kelompok. Penelitian ini setiap kelompok diberi tambahan 1 ekor tikus.

Pada penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus betina galur *Wistar* dengan masing-masing 5 ekor sampel per kelompok.

Kelompok sampel dalam penelitian disebar menjadi empat kelompok, maka besar sampel dapat dirumuskan:

Besar sampel = Jumlah kelompok penelitian x 5 ekor/kelompok
= 4 x 5 ekor = 20 ekor tikus betina galur Wistar. Ditambah 1 ekor tikus cadangan di setiap kelompok sehingga total sampel sebanyak 24 ekor tikus.

4.3.4. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Berdasarkan besar sampel menurut kriteria WHO didapatkan jumlah sampel tiap perlakuan ≥ 5 sehingga total hewan coba yang diperlukan untuk penelitian ini adalah 20 ekor tikus betina galur *Wistar*. Teknik Pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan cara *Randomized Sampling*. Sampel penelitian terbagi dalam 4 kelompok perlakuan yaitu perlakuan Sham (tidak diberi perlakuan), Kontrol (hanya diberi induksi DHEA 6mg/100gBB selama 33 hari), K2 (Pemberian SH-MSCs secara intra peritoneum dengan dosis 200 μ L), dan K3 (Pemberian SH-MSCs secara intra peritoneum dengan dosis 400 μ L).⁵³ Untuk cadangan setiap kelompok ditambah 1 ekor tikus sehingga total sampel setelah ditambah cadangan adalah 24.

4.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan berupa perlengkapan kultur sel yang terdiri *Biosafety Cabinet* (BSC), mikropipet, inkubator CO₂,

dissecting kit, dan flask 75T. Kondisi kultur hipoksia didapatkan dengan menggunakan *hypoxic chamber*. Oxygen meter digunakan untuk mengukur kadar oksigen di dalam *hypoxic chamber*. Selain itu penelitian ini menggunakan untuk induksi DHEA dan pemberian SH-MSCs yaitu spuit 3 ml, jarum suntik 23-G, kandang tikus, tabung microcentrifuge 1,5ml, sentrifugator, mikroskop, microplate reader, dan RT-PCR, yang digunakan untuk analisis ekspresi TGF- β , kadar hormon estrogen dan jumlah folikel.

4.4.2. Bahan

Bahan dari penelitian ini terdiri dari bahan kultur yang tersusun atas tali pusat tikus, NaCl 0.9%, PBS, DMEM, FBS, fungizone, dan penstrep. Sedangkan bahan yang digunakan untuk proses perlakuan adalah gel berbasis air, alcohol 70%, PBS, Ketamin, Xylazine. Makanan standard hewan pengerat (Harlan), Natrium sitrat 50 mM pH 4,5 (ezzyme grade, Fisher), DHEA 6mg/100gBB

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian didapatkan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.5.2. Prosedur Isolasi *Mesenchymal Stem Cells*

Seluruh proses dilakukan di dalam *biosafety cabinet class 2*, menggunakan peralatan yang steril dan dikerjakan dengan teknik sterilitas yang tinggi.

1. Tikus betina dengan usia kebuntingan 19 hari dianastesi menggunakan ktamin dan xylazine
2. Pembedahan dilakukan pada bagian abdomen, kemudian fetus tikus beserta *umbilical cord* (fetoplacental unit) diambil dan ditaruh dalam wadah steril yang berisi NaCl 0,9%
3. Dengan menggunakan pinset, fetoplacental unit diletakkan ke petri dish dan dicuci sampai bersih menggunakan PBS
4. *Umbilical cord* dipisahkan dari fetus tikus dan pembuluh darah dibuang
5. Medium komplit yang terdiri dari DMEM, fungizon, penstrep, dan FBS) ditambahkan secara pelan-pelan hingga menutupi jaringan.
6. Eksplan diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO₂.
7. Sel akan muncul setelah kurang lebih 14 hari dari awal proses kultur.
8. Penggantian medium dilakukan setiap 3 hari sekali dengan cara membuang separuh medium dan diganti dengan medium komplit baru.
9. Pemeliharaan sel dilakukan hingga sel mencapai konfulensi 80%.

4.5.3. Proses Hipoksia

1. MSC yang telah mencapai 80% konfluensi ditambahkan medium komplit hingga 10 mL.

2. Flask yang telah berisi MSC kemudian masukkan ke dalam *hypoxic chamber*.
3. Gas nitrogen disalurkan melalui katup inlet dan oxygen meter ditempatkan pada lubang sensor untuk mengukur konsentrasi oksigen di dalam chamber.
4. Nitrogen ditambahkan hingga jarum indicator menunjukkan konsentrasi 5% oksigen.
5. Chamber yang telah berisi flask diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
6. Setelah 24 jam, media kultur diambil dan saring dengan menggunakan TFT untuk mendapatkan *Hypoxia Preconditioned Mesenchymal Stem Cell Silicon Controlled Rectifier* (HypMSC-Scr) yang selanjutnya dicampurkan dengan gel berbasis air sesuai dengan dosis K2 dan K3.

4.5.4. Pembuatan Preparat dan Pemberian Perlakuan pada Subjek Percobaan

1. Tikus diinduksi dengan DHEA (6 mg/100 g BB) dalam 0,2 ml olive oil (vehicle) secara subkutan selama 23 hari berturut-turut.
2. Hari ke 18-23 dilakukan apusan vagina untuk validasi secara sitologi. Pengambilan data dilakukan pada pukul 08.00-10.00 pagi. Penentuan fase estrus dilakukan dengan cara pembuatan preparat apus vagina. Ujung cotton bud dibasahi dengan larutan NaCl fisiologis, secara perlahan cotton bud tersebut dimasukkan

kedalam vagina mencit (5 mm) dan diputar perlahan searah dengan jarum jam sebanyak tiga rotasi. Ujung cotton bud dioleskan memanjang pada objek gelas menjadi tiga baris. Apusan dipastikan menempel dan dikering anginkan 5 menit. Apusan difiksasi menggunakan alkohol 70% dan diwarnai menggunakan methylen blue selama 5 menit. Pewarna yang berlebih dibersihkan dengan air mengalir. Amati pada perbesaran 400x guna evaluasi panjang dan fase siklus estrus. Yang dilihat adalah adanya epitel terkornifikasi yang menandakan fase estrus.

3. Hari ke 23 dilakukan validasi hormon testosterone menggunakan metode ELISA untuk melihat peningkatan hormon testosterone.

Prosedur pengujian:

a) Siapkan semua reagen, larutan standar dan sampel sesuai instruksi. Bawa semua reagen ke suhu ruang sebelum digunakan. Pengujian dilakukan pada suhu ruang.

b) Tentukan jumlah strip yang diperlukan untuk pengujian.

Masukkan strip yang tersisa ke dalam aluminium zip untuk disimpan..

c) Strip yang tidak digunakan harus disimpan pada suhu 2-8°C.

d) Tambahkan 50µl standar ke sumuran standar. Catatan: Jangan menambahkan antibodi ke standar karena larutan standar mengandung antibodi terlabel biotin.

- e) Tambahkan 40 μ l sampel ke sumuran sampel lalu tambahkan 10 μ l antibodi anti-IL-10 ke sumuran sampel, lalu tambahkan 50 μ l streptavidin-HRP ke sumuran sampel dan sumur standar (Bukan sumuran blanko). Campur dengan baik. Tutupi plate dengan sealer. Inkubasi 60 menit pada suhu 37°C
- f) Lepaskan sealer dan cuci sumuran 5 kali dengan wash buffer setidaknya 0,3 ml selama 30 detik hingga 1 menit untuk setiap pencucian.
- g) Tambahkan 50 μ l larutan substrat A ke masing-masing sumuran dan kemudian tambahkan 50 μ l larutan substrat B ke setiap sumuran.
- h) Inkubasi plate yang ditutup dengan sealer baru selama 10 menit pada suhu 37°C di tempat gelap.
- i) Tambahkan 50 μ l Stop Solution ke masing-masing sumuran, warna biru akan langsung berubah menjadi kuning
- j) Tentukan nilai OD masing-masing sumuran menggunakan microplate reader yang diset pada 450 nm dalam waktu 10 menit setelah menambahkan stop solution.
4. Hari ke 23 tikus di validasi struktur folikel ovarium. Tikus dibius dengan campuran ketamine (60mg/kgbb) dan xylazine (20mg/kgbb). Validasi jaringan ovarium diamati dengan pengecatan HE untuk melihat folikel ovarium yang atresia, kista ovarium dan peningkatan jumlah korpus luteum.

5. Selanjutnya injeksi DHEA diteruskan sampai hari ke 30 secara subcutan (untuk menghindari ovarian self recovery) dibarengi dengan pemberian SH-MSCs (hari ke 23-30 diberikan di hari 23-25-28-30) yang mengandung dosis 200 μ L dan dosis 400 μ L secara intraperitoneal. Tikus kontrol negatif diberikan perlakuan NaCl.
6. Pada hari ke 27-32, dilakukan pemeriksaan sitologi untuk mengetahui siklus estrus.
7. Pada hari ke 33, dilakukan pemeriksaan kadar testosterone, pemeriksaan PCR dan pemeriksaan sampel ovarium pada semua kelompok untuk dibuat preparat histologi dengan metode parafin dan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE).

4.5.5. Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

1. Sampel ovarium sebanyak 100mg kemudian dipotong menjadi bagian-bagian kecil dimasukkan ke dalam tube yang telah terisi 50mL RNA Iso Plus
2. Sisi lain, PBMCs sebanyak 10^7 sel masing-masing di transfer ke mikro tube dan diberi 50mL RNA Iso Plus.
3. Potongan ovarium ditumbuk menggunakan *micropastle* dan ditambahkan lagi RNA Iso Plus sebanyak 50mL dan disimpan di suhu ruang selama 5 menit.
4. Ditambahkan 20 ml *chloroform* dan divortex hingga larutan menjadi putih susu.

5. Inkubasi pada suhu ruang selama 2-3 menit, serta disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 40°C hingga larutan dalam tube terlihat memiliki 3 lapisan. Lapisan yang paling atas berupa RNA (fase liquid), lapisan kedua berupa DNA (fase semisolid) dan lapisan bawah mengandung debris-debris sel.
6. Lapisan paling atas dipindahkan ke tabung sentrifuge baru dan volumenya diukur, dan ditambahkan isopropanol dengan volume yang sama dengan RNA yang diambil dari lapisan paling atas.
7. Tabung Eppendorf digoyang-gyangan hingga muncul benang-benang putih, kemudian disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 10 menit pada suhu 40°C. Supernatan dibuang sampai terlihat pelet berwarna putih di dasar tabung.
8. Setelah kering ditambahkan 100 mL etanol 70% dalam larutan (Diethyl pyrocarbonat) DEPC lalu bolak balikkan berulang kali serta disentrifugasi kembali pada 15.000 rps selama 5 menit pada suhu 40°C.
9. Supernatan dibuang dan ditambahkan DEPC sebanyak 30-50µm. Campuran diinkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit. Selanjtnya didapatkan total RNA solution disimpan pada suhu -80°C. RNA dikuantifikasi dengan Nanodrop. Hasil kuantifikasi dihitung untuk dijadikan 3000ng.
10. Sintesis cDNA dengan membuat campuran A dengan mencampurkan sampel RNA yang telah dihitung, 1µL OligoDT

serta PCR water hingga mencapai volume 10 μ L, kemudian diinkubasi selama 5 menit dalam suhu 70°C.

11. Campuran A ditambah dengan campuran B yang terdiri dari 5X buffer 4 μ L, DEPC-Treated H₂O 5 μ L, ReverTraAce 1 μ L. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 menit, 42°C selama 50 menit dan 85°C selama 5 menit.

4.5.6. Pembacaan ekspresi gen TGF- β dengan *Real Time- Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

1. Ekspresi gen TGF- β dianalisis menggunakan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).
2. Campuran dari 3 μ L cDNA sampel, Taq master mix (dNTPs, Taq DNA polymerase, reaction buffer, dan MgCl₂) sebanyak 12,5 μ L, primer spesifik pada masing-masing gen target sebanyak 0,6 μ L untuk primer forward dan reverse dan 8,3 μ L *Nuclease Free Water*.
3. PCR produk kemudian dianalisis menggunakan WRT-PCR illumine.
4. Peningkatan ekspresi gen dianalisis dalam rasio peningkatan terhadap *house keeping* gen dengan menggunakan *software EcoStudy*.

4.5.7. Pembacaan kadar hormom estrogen dengan ELISA

Semua reagen dan sampel harus berada di temperatur ruang. Larutan working reagent dipersiapkan dengan menambahkan 0,1

mL progesteron-HRP konjugat dengan 0,9 mL pengencer progesteronHRP konjugat (pengenceran 1:10) kemudian dihomogenkan. Sampel plasma darah diencerkan dalam aquabidestilata dengan perbandingan pengenceran bertingkat dimulai dari 1:0 (orisinal plasma)-1:16. Sebanyak 25 μ L duplo larutan standar, kontrol, dan sampel dimasukkan ke dalam sumur terpilih. Setelah itu masing-masing larutan enzim konjugat (kit ELISA estradiol) dan larutan siap pakai progesteron-HRP konjugat (kit ELISA progesteron) sebanyak 100 μ L dimasukkan ke dalam setiap sumur dilanjutkan masing-masing dengan memasukkan 50 μ L rabbit anti-estradiol (kit ELISA estradiol) dan rabbit anti-progesteron (kit ELISA progesteron) ke dalam setiap sumur kecuali blank, kemudian ditutup dengan cling film dan dihomogenkan dengan cara digoyangkan secara perlahan selama 30 detik dan diinkubasikan selama 90 menit pada temperatur ruang. Setelah diinkubasi, setiap sumur dicuci dengan milli-Q water masingmasing 400 μ L selama 3-4 kali pencucian, kemudian dihentak-hentakan secara perlahan di atas kertas (absorbence paper). Larutan substrat TMB sebanyak 100 μ L dimasukkan ke dalam setiap sumur kemudian ditutup dengan cling film dan diinkubasi selama 20 menit pada temperatur ruang. Reaksi enzimatis dihentikan dengan menambahkan stop solution 1N HCl sebanyak 100 μ L ke dalam setiap sumur kemudian dihomogenkan

secara perlahan selama 30 detik dan pembacaan absorbance menggunakan ELISA *reader* otomatis dalam waktu 15 menit dengan panjang gelombang 450 nm dan referensi filter dengan panjang gelombang 630 nm.⁵⁴

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

4.6.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR), Fakultas Kedokteran Unissula Semarang.

4.6.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan 25 Juli – 14 September 2023.

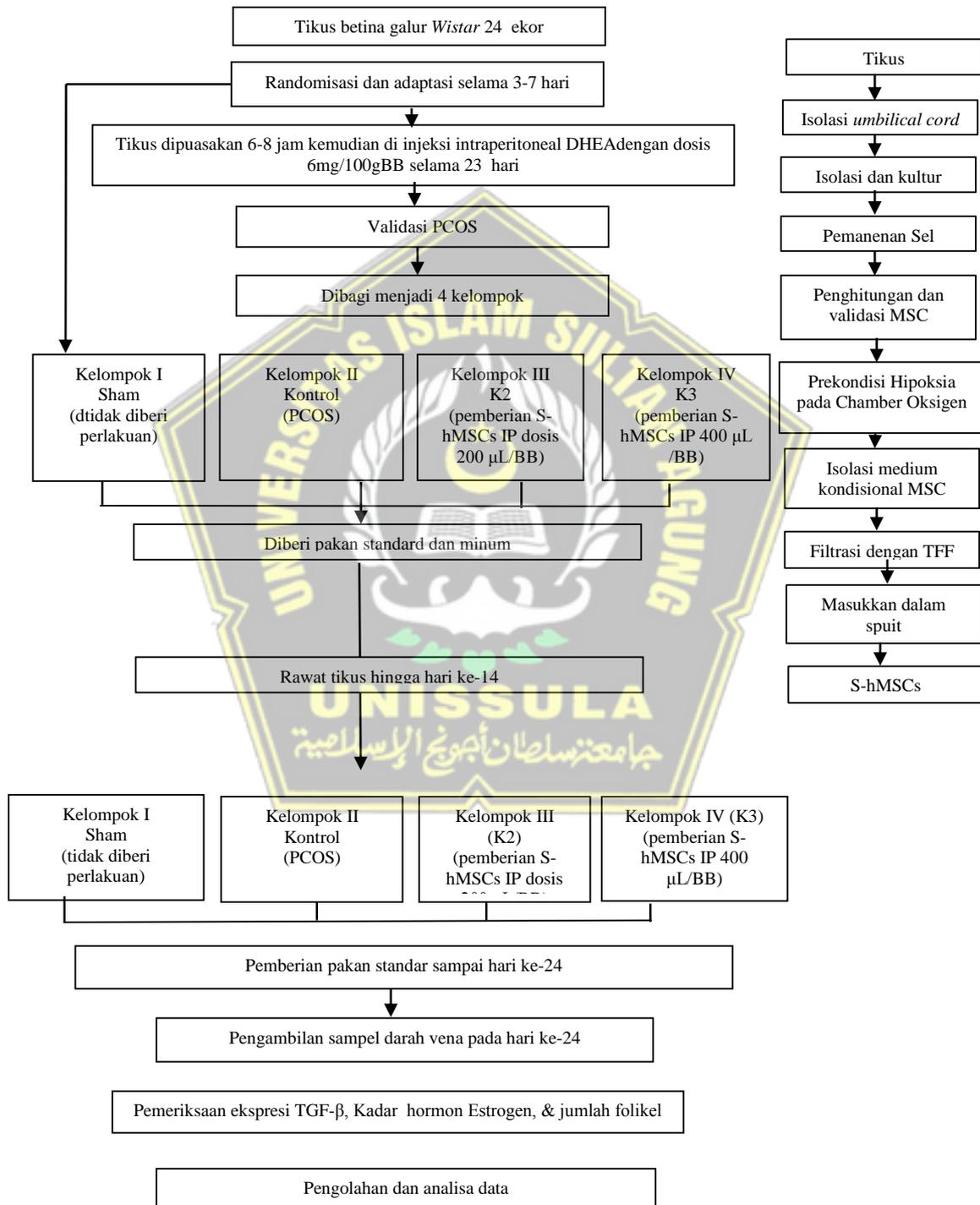
4.7. Analisa Data

Data rerata ekspresi TGF- β , kadar hormon estrogen, dan jumlah folikel disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel (grafik). Kemudian data diuji normalitas dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas data dengan uji *Levene test*. Bila distribusi data normal dan homogen dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*. Bila hasil uji *One Way Anova* $p < 0,05$ dilanjutkan dengan uji *post hoc* dengan uji *Tukey* untuk mengetahui hubungan antar kelompok perlakuan.

Bila hasil uji *One Way Anova* tidak memenuhi syarat (distribusi data normal dan tidak homogen atau distribusi data tidak normal dan homogen atau tidak normal dan tidak homogen) dipakai uji non parametrik uji *Kruskal Wallis*. Bila hasil uji *Kruskal Wallis* $p < 0,05$ dilanjutkan dengan uji non parametrik dua kelompok menggunakan uji *Man Whitney*. Pengolahan analisis data

dilakukan dengan menggunakan SPSS 26.0.

4.8. Alur Penelitian



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

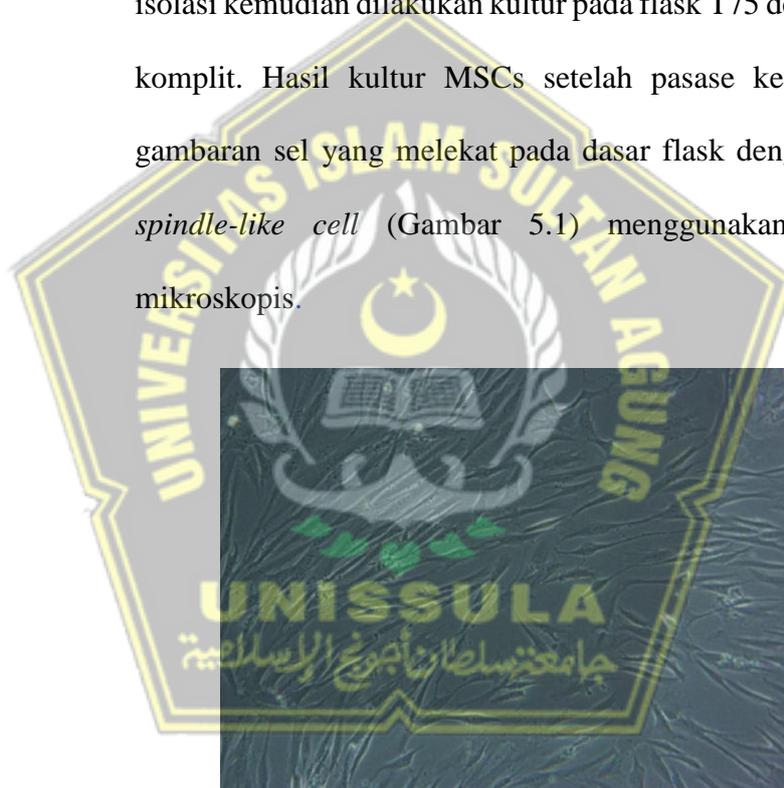
Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vivo* yang dilakukan pada bulan Juli – 14 September 2023 di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Indonesia, Semarang, Jawa Tengah. Tujuan umum penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian SH-MSCs terhadap ekspresi TGF- β , kadar hormon estrogen, dan jumlah folikel pada tikus betina galur *Wistar* model PCOS-*like*. Penelitian ini menggunakan tikus betina galur *Wistar* model PCOS-*like* sebagai subjek penelitian. Jumlah tikus yang digunakan adalah 24 ekor tikus sesuai kriteria *Federer*. Tikus pada penelitian ini dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu tikus sehat (Sham), tikus model PCOS-*like* tanpa perlakuan (kontrol negatif), tikus model PCOS-*like* dengan perlakuan SH-MSCs dosis 200 μ L (K2), dan tikus model PCOS-*like* dengan perlakuan SH-MSCs dosis 400 μ L (K3). SH-MSCs yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari *Umbilical Cord* tikus usia kebuntingan 21 hari. Validasi SH-MSCs dilakukan dengan menggunakan analisis morfologi, marker permukaan sel, dan potensi diferensiasi. Analisis morfologi menggunakan mikroskop *inverted*, analisis marker permukaan sel menggunakan *flow cytometry*, dan analisis potensi diferensiasi adipogenik dan osteogenik menggunakan *Oil Red O* dan *Alizarin Red Staining*. Sel yang telah tervalidasi kemudian dikultur dan diinkubasi pada kondisi hipoksia (5% O₂). Medium kultur dikumpulkan dan difiltrasi dengan metode *Tangential Flow Filtration* (TFF).

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Validasi MSCs

5.1.1.1. Morfologi MSCs

Isolasi SH-MSCs dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Research* (SCCR) Indonesia, Semarang, menggunakan *umbilical cord* tikus bunting usia 21 hari. Hasil isolasi kemudian dilakukan kultur pada flask T75 dengan medium komplit. Hasil kultur MSCs setelah pasase ke-5 didapatkan gambaran sel yang melekat pada dasar flask dengan morfologi *spindle-like cell* (Gambar 5.1) menggunakan pengamatan mikroskopis.

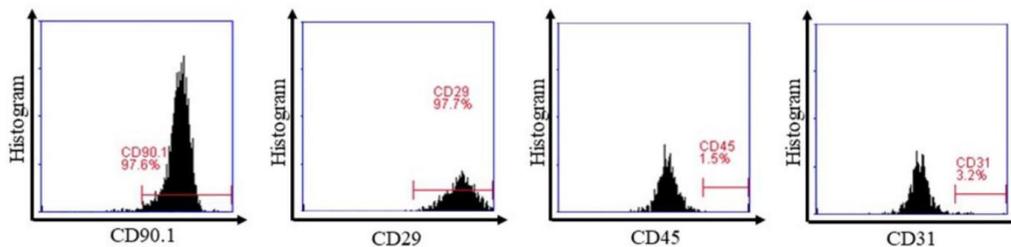


Gambar 5.1 Morfologi MSCs menyerupai sel fibroblast pada perbesaran 200x.

5.1.1.2. Surface Marker MSCs

Hasil isolasi MSCs divalidasi menggunakan *flow cytometry* untuk menunjukkan kemampuan MSCs dalam mengekspresikan berbagai *surface marker* khusus. Hasil secara kuantitatif berupa persentase ekspresi positif CD 90.1 (97,6%),

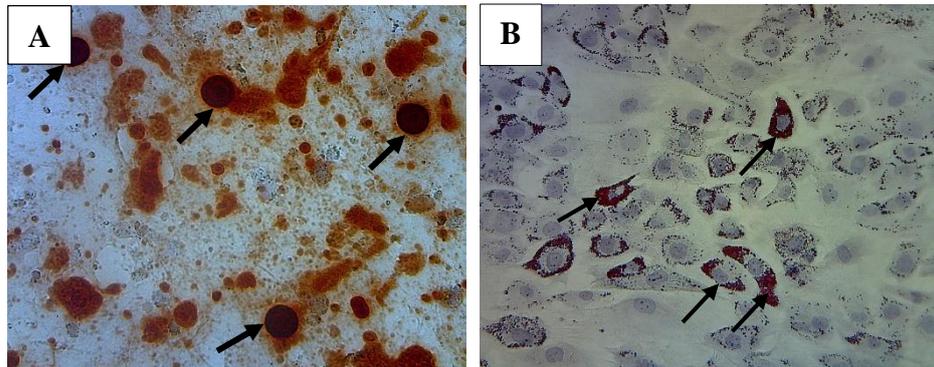
CD 29 (97,7%), dan ekspresi negatif dari CD 45 (1,5%), dan CD 31 (3,2%) (Gambar 5.2).



Gambar 5.2 Ekspresi CD90, CD29, CD45, dan CD31 pada MSCs.

5.1.1.3 Diferensiasi Osteogenik dan Adipogenik MSCs

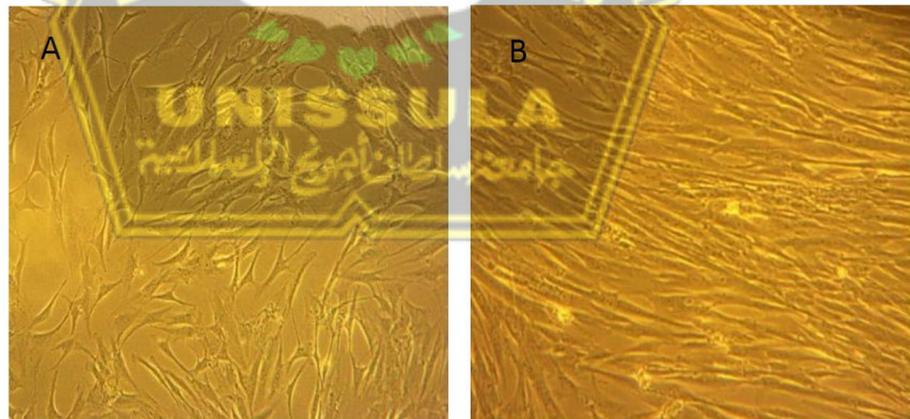
Sel MSCs dikultur dalam medium induksi osteogenik dan adipogenik selama 21 hari untuk mengetahui kemampuan diferensiasi menjadi osteosit dan adiposit. Gambaran diferensiasi osteogenik MSCs ditunjukkan oleh anak panah pada sel yang berisi deposit kalsium dengan pewarnaan *Alizarin Red* Gambar (5.3A). Diferensiasi adipogenik MSCs ditunjukkan oleh anak panah pada sel yang berisi akumulasi droplet lipid dengan pewarnaan *Oil Red O* (Gambar 5.3B). Deposisi kalsium dan lemak hasil diferensiasi MSCs menjadi osteosit dan adiposit ditunjukkan dengan warna merah pada masing-masing kultur.



Gambar 5.3 (A) MSCs mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan (B) adiposit setelah pemberian pewarnaan *Alizarin Red* dan *Oil Red O* pada pembesaran 200x (ditunjukkan dengan panah hitam).

5.1.2. MSCs Hipoksia

MSCs diinkubasi dalam kondisi hipoksia dengan konsentrasi 5% O₂ selama 24 jam menggunakan *hypoxic chamber*. MSCs yang dihipoksik terlihat lebih tumbuh rapat dibandingkan dengan ketika sebelum dikultur pada kondisi hipoksia seperti yang terlihat pada Gambar 5.4



Gambar 5.4 (A) morfologi MSCs sebelum dikultur pada kondisi hipoksia, (B) morfologi MSCs setelah dikultur pada kondisi hipoksia 24 jam

Medium kultur MSCs yang mengandung sekretom kemudian dikumpulkan dan difiltrasi menggunakan metode *Tangential Flow*

Filtration (TFF) berdasarkan *molecular weight cut off* tertentu hingga diperoleh molekul berukuran 10-50 kDa yang mengandung sitokin *Interleukin-10* (IL-10) dan *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β). IL-10 merupakan molekul antiinflamasi monomer berukuran ~18kDa yang berfungsi dominan dalam proses immunosupresi dan dapat disekresikan oleh MSCs pada kondisi hipoksia.

5.1.3 Kandungan Biomolekul SH-MSCs

Setelah inkubasi UC-MSCs dalam kondisi hipoksia 24 jam, *conditioned media* (CM) dikoleksi dari medium pertumbuhan H-MSCs. Pada penelitian ini, peneliti mengisolasi sitokin dan *growth factor* yang terkandung dalam H-MSC-CM untuk memperoleh SH-MSCs murni. Peneliti menggunakan strategi TFF berdasarkan kombinasi kategori batas berat molekul mengenai penelitian sebelumnya. Peneliti mengisolasi molekul menggunakan kaset filter 10-50 kDa 50%, 50-100 kDa 25%, dan 100-300 kDa 25%. Setelah penyaringan, peneliti mengkarakterisasi tingkat sitokin dan *growth factor* yang terkandung dalam SH-MSCs menggunakan uji ELISA.

5.1.4 Validasi Hewan Coba PCOS

5.1.4.1. Validasi Hewan Coba PCOS secara Makroskopis

Induksi DHEA pada tikus berdasarkan pengamatan secara makroskopis terlihat adanya benjolan yang lebih banyak dibandingkan dengan tikus sehat yang diduga cystic follicle yang menjadi salah satu tanda PCOS.



Gambar 5.5 Bentuk makroskopis ovarium yang tidak diinduksi DHEA (Sehat) dan yang diinduksi DHEA (PCOS).



Gambar 5.6 Bentuk makroskopis ovarium yang tidak diinduksi DHEA (Sehat) dan yang diinduksi DHEA (PCOS).

5.1.4.2. Validasi Hewan Coba PCOS dengan Hematoksin Eosin

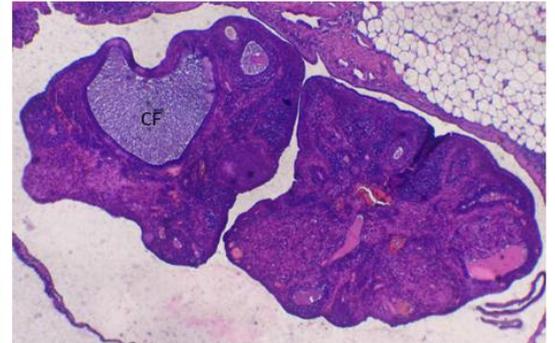
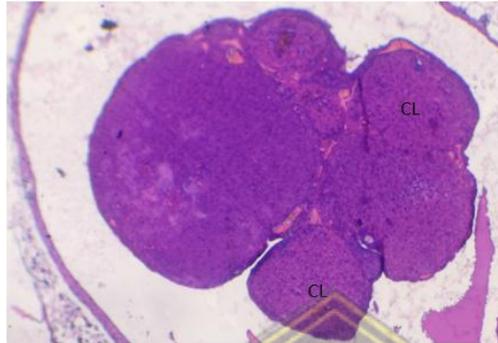
Induksi DHEA pada tikus berdasarkan pengamatan secara makroskopis terlihat adanya *cystic follicle* yang menjadi salah satu tanda PCOS seperti yang terlihat pada gambar 5.7.

HE

CL = Corpus Luteum
CF = Cystic Follicle

Sehat

PCOS



Sehat = Banyak CL, no CF
PCOS = Ada/banyak CF, CL rendah

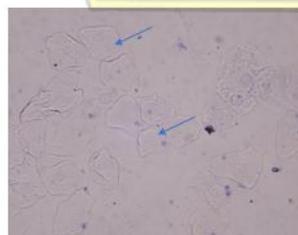
Gambar 5.7 Gambar cystic follicle yang terlihat banyak menggunakan HE

5.1.4.3. Validasi Hewan Coba PCOS dengan Siklus Estrus

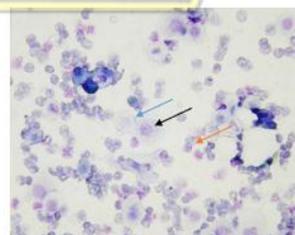


Proestrus

Metestrus

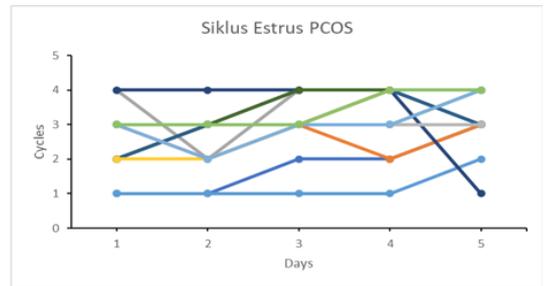
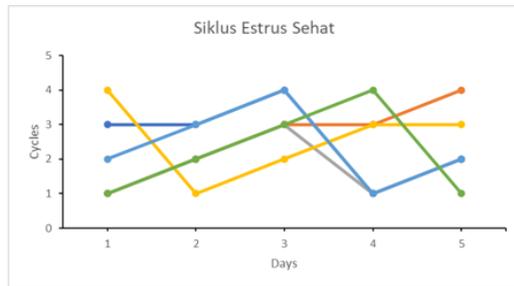


Estrus



Diestrus

Arrow :
Black = nucleated epithelial cell
Blue = Cornified epithelial cell
Orange = Immune cell



1 = Proestrus
 2 = Estrus
 3 = Metestrus
 4 = Diestrus



5.1.4.4. Validasi Hewan Coba PCOS dengan Hormon Testosteron

Pemberian DHEA pada tikus menyebabkan adanya peningkatan testosteron yang merupakan salah satu ciri terbentuknya PCOS seperti yang terlihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Konsentrasi Hormon Testosteron Tikus Validasi

<u>Kelompok</u>	<u>Rerata Testosteron (pg/mL)</u>	<u>Stdev (pg/mL)</u>
Sehat	46.67	20.82
PCOS	80	26.46

5.1.5 Efek Pemberian SH-MSCs terhadap Ekspresi TGF- β , Kadar Hormon Estrogen, dan Jumlah Folikel

Penelitian pengaruh sekretom sel punca mesenkimal hipoksia terhadap ekspresi TGF- β , kadar hormon estrogen dan jumlah folikel pada Tikus Betina Galur Wistar yang di induksi DHEA telah dilakukan selama 33 hari sehingga tikus menjadi Model *Polycystic Ovary Syndrome-Like*. Hasil penelitian tersebut tertera pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 Hasil Analisis Rerata, Uji Normalitas, Uji Homogenitas pada ekspresi TGF- β , kadar hormon estrogen dan jumlah folikel

Variabel	Kelompok			Sig (p)
	K1 N=6	K2 N=6	K3 N=6	
Ekspresi TGF-β				
Mean	3.226	0.920	0.784	
Std.deviasi	1.598	0.313	0.388	
<i>Shapiro Wilk</i>	0.111*	0.981*	0.059*	
<i>Levene Test</i>				0.000
<i>One Way Anova</i>				0.000***
Kadar Estrogen				
Mean	77.386	93.300	121.405	
Std.deviasi	12.684	27.002	18.008	
<i>Shapiro Wilk</i>	0.968*	0.274*	0.279*	
<i>Lavene Test</i>				0.136**
<i>One Way Anova</i>				0.000***
Cysticfollicle				
Mean	2.333	2.333	1.166	
Std.deviasi	1.032	0.816	0.408	
<i>Shapiro Wilk</i>	0.001	0.091*	0.000	
<i>Kruskall Wallis</i>				0.045
Keterangan: *Normal $p > 0,05$ **Homogen $p > 0,05$ ***Signifikan $p < 0,05$				

Tabel 5.2 menunjukkan bahwa rerata ekspresi TGF- β terendah yaitu pada kelompok perlakuan K3 tikus model PCOS dengan pemberian SH-MSCs dosis 400 μ L, dan diikuti oleh kelompok perlakuan K2 yaitu tikus model PCOS

dengan pemberian SH-MSCs dosis 200 μ L. Rerata ekspresi TGF- β tertinggi adalah kelompok kontrol negatif yaitu tikus model PCOS diinduksi DHEA 6mg/ yang tidak mendapat pengobatan. Seluruh kelompok kadar ekspresi TGF- β berdasarkan uji *shapiro wilk* berdistribusi normal dengan nilai p-value>0.05 dan uji homogenitas dengan menggunakan *levene test* hasilnya tidak homogen nilai p-value 0.000 ($p>0.05$) maka analisis data menggunakan uji parametrik *One Way Anova*. Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan perbedaan bermakna semua kelompok dengan nilai pvalue 0.001 ($p<0.05$), kemudian dilanjutkan dengan uji *Pos Hoc Tukey* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berpengaruh.

Rerata kadar hormon estrogen terendah pada tabel 5.2 yaitu pada kelompok kontrol negatif yaitu kelompok tikus PCOS yang tidak diberi SH-MSCs, kemudian diikuti oleh kelompok perlakuan K2 yaitu tikus model PCOS dengan pemberian SH-MSCs dosis 200 μ L. Rerata kadar hormon estrogen tertinggi adalah perlakuan K3 yaitu tikus model PCOS dengan pemberian SH-MSCs dosis 400 μ L. Seluruh kelompok kadar hormon estrogen berdasarkan uji *shapiro wilk* berdistribusi normal dengan nilai p-value>0.05 kemudian uji homogenitas menggunakan *lavene test* seluruh data dinyatakan homogen 0.136. Maka selanjutnya data di analisis menggunakan uji parametrik *One Way Anova*. Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan perbedaan bermakna semua kelompok dengan nilai pvalue 0.000 ($p<0.05$). Kemudian dilanjutkan menggunakan uji *Pos Hoc LSD* untuk mengetahui kelompok mana yang paling berpengaruh.

Rerata jumlah *cysticfollicle* terendah pada tabel 5.2 yaitu pada kelompok perlakuan K3 tikus model PCOS dengan pemberian SH-MSCs dosis 400 μ L, kemudian pada kelompok perlakuan K2 yaitu tikus model PCOS dengan pemberian SH-MSCs dosis 200 μ L dan kelompok kontrol negatif yaitu tikus model PCOS diinduksi DHEA 6mg/ yang tidak mendapat pengobatan memiliki rerata jumlah *cysticfollicle* paling tinggi. Seluruh kelompok jumlah *cysticfollicle* berdasarkan uji *shapiro wilk* terdapat dua kelompok yang tidak berdistribusi normal yaitu kelompok kontrol negatif dengan nilai 0.001 dan kelompok perlakuan K3 dengan nilai 0.000 p -value $>$ 0.05. Maka analisis data menggunakan uji non-parametrik *Kruskal Wallis*. Hasil uji *Kruskal Wallis* menunjukkan perbedaan bermakna semua kelompok dengan nilai p value 0.045 (p $<$ 0.05). Kemudian dilanjutkan menggunakan uji Mann-Whitney untuk mengetahui kelompok mana yang paling berpengaruh.

5.1.5.1. Perbedaan Ekspresi TGF- β Antar Kelompok

Ekspresi TGF- β antar 2 kelompok diketahui uji *Post Hoc* dengan uji *Tukey* seperti yang disajikan di tabel 5.2.

Tabel 5.3 Perbedaan Ekspresi TGF- β Antar 2 Kelompok

Kelompok	<i>p</i>-Value
K1 vs K2	0.001*
K1 vs K3	0.000*
K2 vs K3	0.992

*Uji *Tukey* dengan nilai signifikan p $<$ 0.05

Hasil uji *Post Hoc* dengan Uji *Tukey* pada tabel 5.3 menunjukkan ekspresi TGF- β pada kelompok (K1) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok (K2) dengan nilai p -value

0.001 ($p < 0.05$) dan terdapat perbedaan signifikan pada kelompok (K1) terhadap kelompok (K3) dengan nilai p -value 0.000 ($p < 0.05$). Sedangkan tidak terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok (K2) terhadap kelompok (K3) dengan nilai p -value 0.992. Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian SH-MSCs dosis 200 mL dan SH-MSCs dosis 400 mL tidak berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan ekspresi TGF- β pada tikus betina galur wistar yang diinduksi PCOS sehingga pernyataan hipotesis diterima.



5.1.5.2. Perbedaan Kadar Hormon Estrogen Antar 2 Kelompok

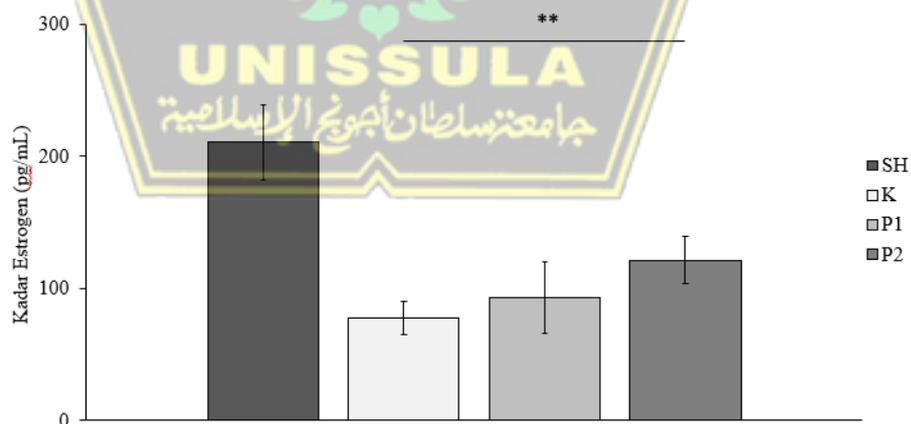
Kadar hormon estrogen antar 2 kelompok diketahui dengan uji *Pos Hoc LSD* seperti yang disajikan di tabel 5.4.

Tabel 5.4 Perbedaan Kadar Hormon Estrogen Antar 2 Kelompok

Kelompok	<i>p</i> -Value
K1 vs K2	0.234
K1 vs K3	0.003*
K2 vs K3	0.042*

**Post Hoc LSD* dengan nilai signifikan $p < 0.05$

Hasil uji *Post Hoc LSD* pada tabel 5.4 menunjukkan kadar hormon estrogen pada kelompok (K1) tidak terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok (K2) dengan nilai p-value 0.234 ($p < 0.05$). Namun terdapat perbedaan signifikan pada kelompok (K1) terhadap kelompok (K3) dengan nilai p-value 0.003 ($p < 0.05$) dan kelompok (K2) terhadap (K3) dengan nilai p-value 0.042. Walau demikian berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian SH-MSCs dosis 200 mL tidak berpengaruh signifikan terhadap peningkatan hormon estrogen dan SH-MSCs dosis 400 mL berpengaruh secara signifikan terhadap peningkatan kadar estrogen pada tikus betina galur wistar yang diinduksi PCOS sehingga pernyataan hipotesis diterima.



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

5.1.5.3. Perbedaan Jumlah *Cysticfollicle* Antar 2 Kelompok

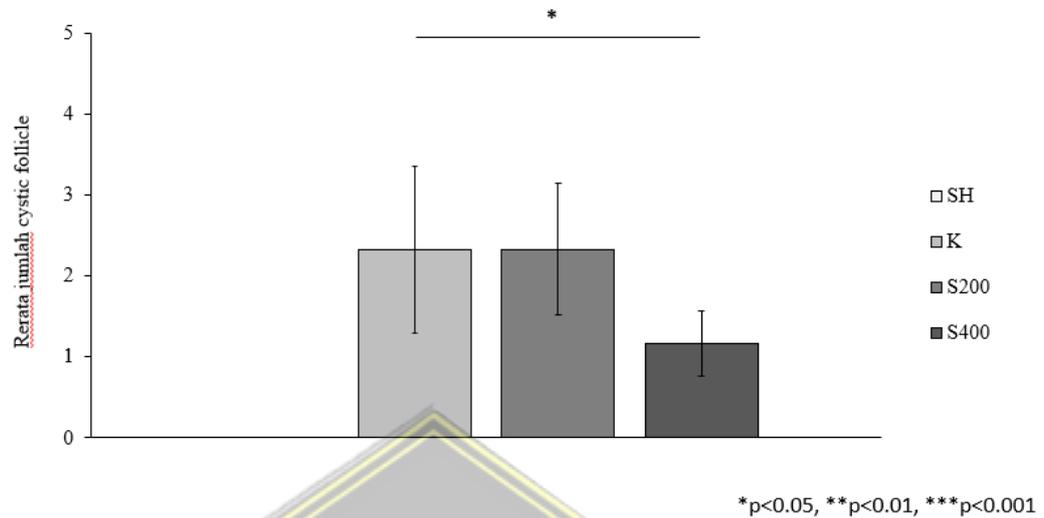
Jumlah *cysticfollicle* antar 2 kelompok diketahui dengan uji *Mann Whitney* seperti yang disajikan di tabel 5.5.

Tabel 5.5 Perbedaan Jumlah *Cysticfollicle* Antar 2 Kelompok

Kelompok	<i>p-Value</i>
K1 vs K2	0.724
K1 vs K3	1.000
K2 vs K3	0.694

**Uji Mann Whitney dengan nilai signifikan $p < 0.05$*

Hasil uji *Mann Whitney* pada tabel 5.5 menunjukkan kadar hormon estrogen pada kelompok (K1) tidak terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok (K2) dengan nilai *p-value* 0.724 ($p < 0.05$), pada kelompok (K1) terhadap kelompok (K3) tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai *p-value* 1.000 ($p < 0.05$), kemudian pada kelompok (K2) terhadap kelompok (K3) juga tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai *p-value* 0.694. Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian SH-MSCs dosis 200 mL dan SH-MSCs dosis 400 mL tidak berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan jumlah *cysticfollicle* pada tikus betina galur wistar yang diinduksi PCOS sehingga pernyataan hipotesis diterima.



5.2. Pembahasan

Kemajuan terbaru dalam penelitian sel punca, terutama MSC telah membuka cakrawala baru dalam angiogenesis untuk pemulihan serta penyelamatan jaringan iskemik.⁵⁵ Faktor-faktor angiogenik yang dikeluarkan oleh MSC meliputi *Basic Fibroblast Growth Factor* (BFGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), *Angiopoietin-1* (ANG-1), *Placental Growth Factor* (PIGF), *interleukin 6* (IL-6), dan *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1). Sekretom MSC secara positif merangsang angiogenesis *in vitro* dan *in vivo*.⁵⁶

MSC secara aktif berpartisipasi dalam angiogenesis melalui diferensiasi langsung, interaksi kontak sel dengan turunan sel endotel, dan melepaskan faktor pro-angiogenik secara parakrin. Faktor parakrin dapat meningkatkan suplai darah dari jaringan yang rusak melalui aktivasi dan rekrutmen sel punca dan sel progenitor. MSC memiliki beberapa faktor

angiogenesis, termasuk *interleukin-8* (IL-8), *Insulin-Like Growth Factor 1* (IGF-1), dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Faktor-faktor pro-angiogenik ini mampu membentuk jaringan pembuluh darah dan meningkatkan migrasi turunan sel endotel in vitro. Selain sekresi faktor angiogenik oleh MSC, terungkap bahwa berbagai faktor yang ada dalam sekretom dapat mengaktifkan sifat angiogenik dalam sel endotel. Sebagai contoh, MSC angiokrin darah tepi ditemukan mampu merangsang sifat fungsional endotel dengan menginduksi jalur pensinyalan VEGF-A melalui beberapa faktor seperti endotelin-1, IL-8, *Platelet-Derived Growth Factor-AA* (PDGF-AA), dan IGF-2. Penggunaan *Mesenchymal Stem Cell* kandungan miRNA Eksosomal juga dapat mengendalikan gen ekspresi MSC peningkatan kesehatan reproduksi wanita.¹⁸

Pada penelitian ini tidak terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok (K2) terhadap kelompok (K3) dengan nilai p-value 0.889. Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian SH-MSCs dosis 200 mL dan SH-MSCs dosis 400 mL berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan ekspresi TGF- β pada tikus betina galur wistar yang diinduksi PCOS sehingga pernyataan hipotesis ditolak. Hal ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang menyatakan pemberian Umbilical Stem Cell pada tikus model Polikistik Ovari dapat mengembalikan ekspresi TGF- β sesuai dengan kelompok kontrol.⁵⁷ Hal ini menunjukkan bahwa terdapat pengaruh SSMPH terhadap penurunan ekspresi TGF- β .

Kadar hormon estrogen tertinggi pada tabel 5.2 yaitu pada kelompok perlakuan K3 tikus model PCOS dengan pemberian SH-MSCs dosis 400 μ L, dan diikuti oleh kelompok perlakuan K2 yaitu tikus model PCOS dengan pemberian SH-MSCs dosis 200 μ L. *Polycystic ovary syndrome* adalah suatu anovulasi kronik yang menyebabkan infertilitas dan bersifat hiperandrogenik, di mana terjadi gangguan hubungan feedback antara pusat (*hipotalamus-hipofisis*) dan ovarium sehingga kadar estrogen selalu tinggi yang mengakibatkan tidak pernah terjadi kenaikan kadar FSH yang cukup adekuat. Penelitian ini menunjukkan bahwa produksi estrogen (konversi testosteron menjadi estrogen) dipengaruhi oleh FSH, enzim aromatase, AMH. Sedangkan pada kondisi PCOS, terjadi lonjakan LH dibandingkan FSH, sehingga terjadi ketidakseimbangan dan berakibat pada produksi estrogen.⁵⁸ Androgen tidak hanya zat antara obligat dalam biosintesis estradiol. Mereka juga memiliki efek kompleks pada pertumbuhan folikel, termasuk up-regulasi aktivitas aromatase. Sangat penting untuk fungsi ovarium bahwa sekresi androgen ovarium dikoordinasikan dengan pembentukan estrogen sehingga keduanya dioptimalkan untuk ovulasi. Meskipun proses ini sangat tergantung pada konsentrasi LH dan FSH, berbagai modulator intrafollicular sangat penting untuk fungsi terkoordinasi folikel ovarium.⁵⁹ Hal tersebut juga dikarenakan Stem Cell telah memberikan efek terapi yang diduga berupa penghentian laju apoptosis sehingga meningkatkan ekspresi GDF-9. Stem cell juga berasal dari lokasi ekstragonad ini telah melepaskan sel germ progenitor ke sirkulasi dan selanjutnya “homing” menuju ovarium dan engraft sebagai oosit baru di dalam

folikel, namun bisa juga menjadi mekanisme transformasi untuk memperbaiki lingkungan mikro di folikel ovarium.⁶⁰ Keterbatasan penelitian ini adalah :

1. tidak dilakukan pengukuran kadar hormon LH dan FSH.
2. Secara statistik *cystic follicle* tidak mengalami perbedaan bermakna antar kelompok, namun secara klinis terdapat perbedaan sehingga perlu diteliti lebih lanjut.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Terdapat pengaruh pemberian SH-MSCs pada dosis 200 μ L dan dosis 400 μ L terhadap penurunan ekspresi TGF- β antar kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol.
2. Terdapat pengaruh pemberian SH-MSCs pada dosis 200 μ L dan dosis 400 μ L terhadap peningkatan kadar hormon estrogen antar kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol.
3. Terdapat pengaruh pemberian SH-MSCs pada dosis 200 μ L dan dosis 400 μ L terhadap penurunan jumlah *cystic follicle* antar kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol.

6.2. Saran

1. Peneliti selanjutnya diharap melakukan pengukuran kadar hormon LH dan FSH.
2. Peneliti selanjutnya diharap dapat meneliti lebih lanjut pengaruh SH-MSCs terhadap jumlah *cystic follicle*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sirmans SM, Pate KA. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Epidemiol.* 2013;6(1):1-13. doi:10.2147/clep.s37559
2. Maggyvin E, Barliana MI, Central B, Therapy TD. Literature Review : Inovasi Terapi Polycystic Ovary Syndrome (Pcos) Menggunakan Targeted Drug Therapy GEN CYK29 RS2414096. 2019;17:107-118.
3. Widyaningsih W. Pengaruh Pemberian Sekretom Sel Punca Mesenkimal Hipoksia Terhadap Kadar C- Peptide , Il-6 Dan Polarisasi Makrofag. *Tesis.* 2022;2.
4. Mota P, Bø K. Physical Activity and Exercise During Pregnancy and the Postpartum Period. *Obstet Gynecol.* 2021;137(2):376. doi:10.1097/AOG.0000000000004267
5. Zainiyah Z, Susanti E, Suhron M, et al. Yoga Is a Solution for Weight Loss and Stress in Insulin Resistance Polycystic Ovary Syndrome (Pcos). *J Paradig.* 2021;3(1):54-62.
6. Joham AE, Teede HJ, Ranasinha S, Zoungas S, Boyle J. Prevalence of infertility and use of fertility treatment in women with polycystic ovary syndrome: Data from a large community-based cohort study. *J Women's Heal.* 2015;24(4):299-307. doi:10.1089/jwh.2014.5000
7. Barbosa G, Bianca L, Cunha P, Rosso D, Wanderley T, Arbex AK. Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and Fertility. 2016;6(January):58-65.
8. Hardita WA. Hiperandrogenemia, Hiperinsulinemia, dan Pengaruhnya terhadap Kesuburan pada Polycystic Ovary Syndrome. *J Agromed Unila.* 2015;2(3):223-224.
9. Han YS, Lee JH, Yoon YM, Yun CW, Noh H, Lee SH. Hypoxia-induced expression of cellular prion protein improves the therapeutic potential of mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis.* 2016;7(10):1-11. doi:10.1038/cddis.2016.310
10. Dwiningsih SR, H. Hendarto, F. A. Rantam, E. G. Dachlan, W. A. Wiyasa, Widjiati. Mesenchymal Stem Cells Transplantation in Endometriosis Model Mice on VEGF mRNA Expression to Improve Infertility. *J Int Dent Med Res.* 2021;14(3):1196-1201.
11. Oktaviani DJ, Widiyastuti S, Maharani DA, Amalia AN, Ishak AM, Zuhrotun A. Farmaka Farmaka. *Farmaka.* 2020;18(1):1-15.
12. Talaat RM, Mohamed YA, Mohamad EH, Elsharkawy M, Guirgis AA. Interleukin 10 (-1082 G/A) and (-819 C/T) gene polymorphisms in Egyptian women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Meta Gene.* 2016;9:254-258. doi:10.1016/j.mgene.2016.08.001
13. Anisya V, Graharti R, Kedokteran F, et al. Polycystic Ovary Syndrome : Resiko Infertilitas yang dapat Dicegah melalui Penurunan Berat Badan Pada Wanita Obesitas Polycystic Ovary Syndrome : Risk of Infertility that Can be Prevented Through Weight Loss in Obese Women. 2019;9(1):267-275.

14. Yustianingsih V, Sumarawati T, Putra A. Hypoxia enhances self-renewal properties and markers of mesenchymal stem cells. 2019;38(3):164-171. doi:10.18051/UnivMed.2019.v38.164-171
15. Prayitno GD, Lestari K, Sartika CR, et al. Potential of Mesenchymal Stem Cells and Their Sekretomes in Decreasing Inflammation Markers in Polycystic Ovary Syndrome Treatment : A Systematic Review. *Medicines*. 2023;10(3):6-11.
16. Chugh RM, Park HS, Esfandyari S, Elsharoud A, Ulin M, Al-Hendy A. Mesenchymal stem cell-conditioned media regulate steroidogenesis and inhibit androgen secretion in a PCOS cell model via BMP-2. *Int J Mol Sci*. 2021;22(17). doi:10.3390/ijms22179184
17. Wang J, Liu C, Fujino M, Tong G, Zhang Q, Yan H. Stem Cells as a Resource for Treatment of Infertility-related Diseases. 2019;19(8):539-546. doi:10.2174/1566524019666190709172636
18. Esfandyari S, Chugh RM, Park H, Hobeika E, Ulin M. Mesenchymal Stem Cells as a Bio Organ for Treatment of Female Infertility. *Stem Cell*. 2020;9(2253):1-19.
19. Budi Santoso, Agus Sulistyono W. Efektivitas Terapi Rat Bone Marrow Stem Cell pada Tikus Model Sindroma Ovarium terhadap Folikulogenesis dan Ekspresi Transforming Growth Factor- β . 2013;21(3):115-120.
20. Hermendy B. Peran Transforming Growth Factor Beta (Tgf-B) Pada Rinitis Alergi. *Dep/SMF Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok, Fak Kedokt Univ Airlangga*. 2017;10(1):27-36.
21. Aster KA. *Robbins Basic Pathology*. Vol 13.; 2018.
22. Oshimori N, Fuchs E. The Harmonies Played by TGF- β in Stem Cell Biology. *Cell Stem Cell*. 2013;11(6):751-764. doi:10.1016/j.stem.2012.11.001.The
23. Tyasasmaya T, Adji D. Peranan TGF β -1 dalam Perkembangan Penyakit Jantung Akibat Induksi Diet Lemak Tinggi.pdf. *Sain Vet*. 2012;30(1):8-13.
24. Smith V, Osianlis T, Vollenhoven B. A review of luteinizing hormone and its role in ovarian reserve testing. *Int J Reprod Contraception, Obstet Gynecol*. 2014;3(1):11-18. doi:10.5455/2320-1770.ijrcog20140302
25. Islam Y, Aboulghar MM, Alebrashy AE, Abdel-aziz O. The value of different ovarian reserve tests in the prediction of ovarian response in patients with unexplained infertility. *Middle East Fertil Soc J*. 2016;21(2):69-74. doi:10.1016/j.mefs.2015.08.005
26. Raja-khan N, Urbanek M, Rodgers RJ, Legro RS. The Role of TGF- b in Polycystic Ovary Syndrome. 2014;21(1):20-31. doi:10.1177/1933719113485294
27. Hayashi H, Sakai T. Biological significance of local TGF- β activation in liver diseases. *Front Physiol*. 2012;3 FEB(February):1-11. doi:10.3389/fphys.2012.00012
28. Suparman E, Suparman E. Peran Estrogen Dan Progesteron Terhadap Kanker Payudara. *J Biomedik*. 2014;6(3):141-148. doi:10.35790/jbm.6.3.2014.6319
29. Pratama NR, Yunita E, Ayuning R, Fannasi F, Mada UG. Ekstraksi Kulit

- Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* L.) Sebagai Fitoestrogen Pada Perkembangan Kelenjer Payudara Tikus Terovariektomi Melalui Peningkatan Ekspresi C-Myc. *J Saintifika*. 2011;3(1):19-25.
30. Aditia K, Utukaman C, Dani MIR. Farmakologi Molekuler “Efek Estrogen”. 2018;(5418220021).
 31. Widhiasih NKA, Dewi IgASM. Peranan Estrogen Receptor Pada Karsinogenesis Organ Tiroid. *J Ilm Kedokt*. 2015;46(2):112-118.
 32. Mustari, A. D., Rostini, T., Indrati, A. R., Bayuaji, H., & Rachmayati S. Korelasi Jumlah Folikel Antral dengan Kadar 25 (OH) D Serum pada Penderita Sindrom Ovarium Polikistik Correlation between Antral Follicles Count and Serum 25 (OH) D Levels in Polycystic Ovary Syndrome Patients. 2018;50(4):4-9.
 33. Hamny, Priyono SA, Djuwita I, Nasution I. Karakteristik Histologi Perkembangan Folikel ovarium Fase Luteal pada Kancil. Published online 2010:30.
 34. Yasmin A, Roychoudhury S, Paul Choudhury A, et al. Polycystic Ovary Syndrome: An Updated Overview Foregrounding Impacts of Ethnicities and Geographic Variations. *Life*. 2022;12(12):1-14. doi:10.3390/life12121974
 35. Tuorila K, Ollila MM, Järvelin MR, et al. Hyperandrogenemia in Early Adulthood Is an Independent Risk Factor for Abnormal Glucose Metabolism in Middle Age. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(11):E4621-E4633. doi:10.1210/clinem/dgab456
 36. Li Z, Hu X, Zhong JF. Mesenchymal stem cells: Characteristics, function, and application. *Stem Cells Int*. 2019;2019:2-4. doi:10.1155/2019/8106818
 37. Putra A, Pertiwi D, Milla MN, et al. Hypoxia-preconditioned MSCs Have Superior Effect in Ameliorating Renal Function on Acute Renal Failure Animal Model the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0). *Maced J Med Sci*. 2019;7(3):305-310. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.049>
 38. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med*. 2014;12(1):1-14. doi:10.1186/s12967-014-0260-8
 39. Terzic A, Behfar A. Stem cell therapy for heart failure: Ensuring regenerative proficiency. *Trends Cardiovasc Med*. 2016;26(5):395-404. doi:10.1016/j.tcm.2016.01.003
 40. Dittmer J, Oerlecke I, Leyh B. Involvement of Mesenchymal Stem Cells in Breast Cancer Progression. *Breast Cancer - Focus Tumor Microenviron Stem cells Metastasis*. 2011;(December 2011). doi:10.5772/21325
 41. Naguib YW, Cui Z. Nanomedicine: The Promise. Published online 2014:135-156. doi:10.1007/978-94-017-8739-0
 42. Sargent A, Miller RH. MSC Therapeutics in Chronic Inflammation. *Curr Stem Cell Reports*. 2016;2(2):168-173. doi:10.1007/s40778-016-0044-6
 43. Scuteri A, Monfrini M. Mesenchymal stem cells as new therapeutic approach for diabetes and pancreatic disorders. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9). doi:10.3390/ijms19092783

44. El-Sakka AI. Dehydroepiandrosterone and Erectile Function: A Review. *World J Mens Health*. 2018;36(3):183. doi:10.5534/wjmh.180005
45. Brauer VS, Zambuzi FA, Espíndola MS, et al. The influence of dehydroepiandrosterone on effector functions of neutrophils. *Brazilian J Pharm Sci*. 2021;57:1-15. doi:10.1590/s2175-97902020000419139
46. Yamazaki K, Kawabori M, Seki T, Houkin K. Clinical trials of stem cell treatment for spinal cord injury. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11). doi:10.3390/ijms21113994
47. Lin HD, Fong CY, Biswas A, Bongso A. Hypoxic Wharton's Jelly Stem Cell Conditioned Medium Induces Immunogenic Cell Death in Lymphoma Cells. *Stem Cells Int*. 2020;2020. doi:10.1155/2020/4670948
48. Santoso B, Sulistyono A, Widjiati. Efektivitas Terapi Rat Bone Marrow Stem Cell pada Tikus Model Sindroma Ovarium Poli Kistik terhadap Folikulogenesis dan Ekspresi Transforming Growth Factor- β . Published online 2013:115-120. [https://repository.unair.ac.id/72164/3/Bukti C 12 Efektivitas Terapi Rat Bonepdf](https://repository.unair.ac.id/72164/3/Bukti_C_12_Efektivitas_Terapi_Rat_Bone_....pdf)
49. Chugh RM, Park H soo, El Andaloussi A, et al. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates metabolic dysfunction and restores fertility in a PCOS mouse model through interleukin-10. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):1-19. doi:10.1186/s13287-021-02472-w
50. Jiang CM, Liu J, Zhao JY, et al. Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of human gingiva-derived mesenchymal stem cells. *J Dent Res*. 2015;94(1):69-77. doi:10.1177/0022034514557671
51. Anisya V, Rodiani, Graharti R. Resiko Infertilitas yang dapat Dicegah melalui Penurunan Berat Badan Pada Wanita Obesitas Polycystic Ovary Syndrome : Risk of Infertility that Can be Prevented Through Weight Loss in Obese Women. *Fak Kedokteran, Univ Lampung*. 2019;9:267-275. <http://juka.kedokteran.unila.ac.id/index.php/medula/article/view/2380>
52. Yuliadha A, Setyaningrum RH. Psikoneuroimunologi Depresi pada Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Smart Med J*. 2022;5(1):38. doi:10.13057/smj.v5i1.43238
53. Sazli BI, Lindarto D, Hasan R, Putra A. Sekretome of Hypoxia-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis in Diabetic Rats with Peripheral Artery Disease. *Orig Pap*. 2023;77(2):90-96. doi:10.5455/medarh.2023.77.90-96
54. Setiadi dedi rahmat. Validasi Kit Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Komersial untuk Analisis Hormon Estradiol dan Progesteron Darah Kambing Kacang. *J Vet*. 2015;15(4):446-453.
55. Rezaie J, Heidarzadeh M, Hassanpour M, et al. The Angiogenic Paracrine Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Updat Mesenchymal Induc Pluripotent Stem Cells*. Published online 2020. doi:10.5772/intechopen.84433
56. Kehl D, Generali M, Mallone A, et al. Proteomic analysis of human mesenchymal stromal cell sekretomes: a systematic comparison of the angiogenic potential. *npj Regen Med*. 2019;4(1). doi:10.1038/s41536-019-0070-y

57. Li Y, Guo J, Deng S, Gao Z, Liu Y, Gu Q. Fibrin facilitates mesenchymal stem cells to ameliorate rats with polycystic ovary syndrome. *Appl Sci.* 2020;10(10). doi:10.3390/apK20103598
58. Lebbe M, Woodruff TK. Involvement of androgens in ovarian health and disease. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(12):828-837. doi:10.1093/molehr/gat065
59. Rosenfield RL, Ehrmann DA. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The hypothesis of PCOS as functional ovarian hyperandrogenism revisited. *Endocr Rev.* 2016;37(5):467-520. doi:10.1210/er.2015-1104
60. Hendy Hendarto, Komarhadia MF, Widjiati, Suhatno, Rantam FA. Transplantasi Stem Cell Sumsum Tulang Untuk Perbaikan Folikulogenesis Pada Mencit Model Kecagalan Ovarium Dengan Pemberian Kemoterapi. *J UNNAIR.* 2020;(July):1-23.

