

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PERSETUJUAN.....	iii
SURAT PERNYATAAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xviii
DAFTAR GAMBAR.....	xxi
DAFTAR TABEL.....	xxiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxv
INTISARI.....	xxvii
ABSTRAK.....	xxviii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah.....	6
C. Keaslian Penelitian.....	6
D. Tujuan Penelitian.....	7
E. Manfaat Penelitian.....	8
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA DAN LANDASAN TEORI	9
A. Ovarium	9
1. Biologi Molekuler Gamet	16
2. Fungsi Ovarium	17
3. Proses Atresia Folikel	19
4. Kegagalan Ovarium dan Kualitas Hidup Wanita	20
5. Patofisiologi Kegagalan Ovarium	21
6. Penyebab Kegagalan Ovarium Prematur	22

B.	<i>4-Vinylcyclohexene Diepoxide (VCD)</i>	26
C.	Sel Punca	32
	1. Klasifikasi Sel Punca	32
	2. Karakteristik SPM	34
	3. Niche	35
	4. Oksigen sebagai Komponen Lingkungan Mikro Sel Punca	39
	5. Aspek Imunologi Sel Punca Mesenkim (SPM)	41
	6. Aspek Terapeutik	41
	7. Diferensiasi	42
	8. Sel fusi	42
	9. Efek Parakrin dan Media Terkondisi	43
D.	Sel Punca Selaput Amnion	45
	1. Potensi selaput amnion sebagai sumber SPM	45
	2. Aspek terapeutik SPM selaput amnion	50
E.	Kerangka Teori	52
F.	Kerangka Konsep	56
G.	Hipotesis	57
	BAB III. CARA PENELITIAN	57
A.	Rancangan Penelitian	58
	1. Tahap Satu, Pembuatan Media Terkondisi Sel Punca Mesensimal	58
	2. Tahap Dua, Perancangan Hewan Tikus Coba	58
	3. Tahap Tiga, Analisis Terapi MT-SPM pada tikus KOP	59
B.	Kerangka Operasional Penelitian	60
C.	Populasi dan Sampel	61
	1. Populasi dan Sampel	61
	2. Cara Pengambilan Sampel	61
	3. Kriteria Sampel Penelitian	61
	4. Besar Sampel	62

D.	Variabel Penelitian	63
	1. Variabel Bebas	63
	2. Variabel Tergantung	63
E.	Definisi Operasional	64
F.	Tempat dan Waktu Penelitian	64
G.	Bahan	66
	1.Instrumen untuk biakan sel	66
	2.Instrumen pengukuran	67
H.	Cara Kerja	68
	1. Medium terkondisi sel punca mesensimal selaput amnion	68
	a. Isolasi sel punca meseksimal selaput amnion	68
	b. Pelabelan dan <i>Imunomagnetic sorting</i>	69
	c. Biakan sel punca mesensimal selaput amnion CD105+	70
	d. Karakterisasi sel punca mesensimal	71
	e. Uji diferensiasi sel punca mesensimal selaput amnion	72
	f. Simpan beku sel punca mesensimal selaput amnion	73
	g. Subkultur sel punca selaput amnion	73
	h. Biakan spheroid 3D	74
	i. Biakan sel punca mesensimal sebagai feeder layer	75
	j. Pembuatan media terkondisi sel punca yang terinduksi	75
	2. Tikus Model KOP	76
	a. Persiapan subjek eksperimen	76
	b. Induksi KOP dengan VCD	76
	c. Diagnosis KOP Pada Tikus Model	76
	d. Perlakuan Pada Tikus Model	77
	e. Prosedur Penghitungan Folikel Ovarium	77
	f. Klasifikasi Morfologi Folikel	78
	g. Prosedur Pewarnaan Sampel Ovarium Dengan HE	79
	h. Prosedur Pewarnaan Sampel Ovarium Dengan Caspase-3	80
	i. Prosedur Pengukuran Kadar bFGF, VEGF, LIF Pada Media Terkondisi Sel Punca	81

j.	Prosedur Pemeriksaan SDS-PAGE Ultrafiltrasi	82
k.	Pengukuran Kadar FSH Dan Estradiol	84
I	Analisis Data dan Uji Statistik	84
	BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	85
A.	Hasil Penelitian	85
1.	Penelitian Tahap I	85
a.	Karakteristik Sel Punca Mesensimal	85
a.1.	Kemampuan Sel Untuk Menempel Pada Dasar Tabung Kultur	85
a.2.	Imunofenotip SPM: CD 44, CD 105 Dan CD45	87
a.3.	Kemampuan Diferensiasi Menjadi Osteosit	88
a.4.	Kemampuan Diferensiasi Menjadi Adiposit	89
b.	Pengukuran Kadar bFGF, VEGF Dan LIF pada MT-SPM dengan Metode ELISA	90
c.	Pemeriksaan SDS PAGE Metode Ultrafiltra	93
2.	Penelitian Tahap II. Rekayasa Tikus KOP Dengan VCD	97
3.	Penelitian Tahap III. Analisis Terapi MT-SPM Selaput Amnion Terhadap Folikulogenesis Pada Tikus KOP	98
3.a.	Analisa Statistik Kadar FSH	116
3.b.	Analisa Statistik Kadar Estradiol	118
B.	Pembahasan	121
1.	Penelitian Tahap I. Pembuatan Sel Punca dan MT-SPM	121
a.	Karakteristik Sel Punca Mesensimal	121
a.1.	Mekanisme Penempelan Sel Punca Mesensimalal Pada Cawan Petri	121
a.2.	Penanda Permukaan	122
a.3.	Kemampuan Diferensiasi Menjadi Osteosit Dan Adiposity	124
a.4.	Kemampuan Diferensiasi Menjadi Osteosit	125

b. Pengukuran kadar <i>Growth Factor</i> pada MT-SPM	125
c. Analisis SDS-PAGE Metode Ultrafiltrasi	126
2. Penelitian Tahap II. Rekayasa tikus KOP dengan VCD	129
3. Penelitian Tahap III. Analisis Terapi MT-SPM Selaput Amnion terhadap folikulogenesis pada tikus KOP	131
a. Efek pada Folikulogenesis	132
b. Perubahan Kadar FSH	134
c. Perubahan Kadar Estradiol	135
4. Keterbatasan Penelitian	136
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	137
A. KESIMPULAN	137
B. SARAN	137
KEPUSTAKAAN	140
LAMPIRAN	157
RINGKASAN	247
SUMMARY	255
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	262

DAFTAR SINGKATAN

AhR	: <i>Aryl hydrocarbon Receptor</i>
ANG II	: <i>Angiotensin II</i>
APS	: <i>Amonium persulfate</i>
BMP	: <i>Bone morphogenetic proteins</i>
CK	: <i>cytokeratin</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DMC-1	: <i>Disrupted meiotic cDNA-1</i>
E18,5	: <i>Estrus hari ke 18,5</i>
ECG	: <i>Equine chorionic gonadotrophin</i>
EGF	: <i>Epidermal growth factor</i>
EG-VEGF	: <i>Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor</i>
ELISA	: <i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
ET-1	: <i>Endothelin-1</i>
FGF	: <i>Fibroblast growth factor</i>
bFGF	: <i>basic fibroblast growth factor</i>
FSC	: <i>Forward scatter</i>
FSH	: <i>Follicle stimulating hormone</i>
GDF	: <i>Growthdifferentiation factor</i>
GF	: <i>Growth factor</i>
GnRH	: <i>Gonadotrophin releasing hormone</i>
GSTP	: <i>Glutathione S-Transferase gen P-1</i>
GVHD	: <i>Graft-versus-host disease</i>
HAEC	: <i>Humanamniotic epithelial cells</i>
HAMSC	: <i>Human amniotic mesenchymal stromal cells</i>

hCG	: <i>Human chorionic gonadotrophin</i>
HGF	: <i>Hepatocyte growth factor</i>
HIF	: <i>Hypoxia inducible factor</i>
HPF	: <i>Human placental factor</i>
HRT	: <i>Hormone replacement therapy</i>
IGF	: <i>Insulin like growth factor</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
KOA	: Kegagalan ovarium akut
KOP	: Kegagalan ovarium prematur
LH	: <i>Luteinizing hormone</i>
LIF	: <i>Leukemia inhibitory factor</i>
MACS	: <i>Magnetic activated cell sorting</i>
MHC	: <i>Major histocompatibility complex</i>
MIF	: <i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
mRNA	: <i>Messenger ribonucleic acid</i>
MSH-5	: <i>Muts E Coli homolog-5</i>
MT	: Media terkondisi
NA/VIP	: Nor adrenaline/ Vasoactive intestinal protein
PACAP	: <i>Pituitary adenylate cyclase activating peptide</i>
PBS	: <i>Phosphate buffer saline</i>
PDGF	: <i>Plateletderived growth factor</i>
PGC	: <i>Primordial germ cell</i>
SD	: <i>Sprague-Dawley</i>
SDF-1	: <i>Stromal derived growth factor-1</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SE	: <i>Superficial epithel</i>
SGP	: Sel germinal primordial

SPM	: Sel punca mesensimal
SPO-11	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> homologue of SPO11
SSC	: <i>Side scatter</i>
TA	: <i>Tunica albuginea</i>
TEMED	: <i>Tetramethyl-1,2-ethandiamin</i>
TGF- α	: <i>Transforming growth factor- α</i>
TIMPs	: <i>Tissue inhibitors of metalloproteinase</i>
TNF	: <i>Tumor necrosis factor</i>
TRAIL	: <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
VCD	: <i>4-Vinyl cyclohexene diepoxide</i>
VE	: <i>Visceral endoderm</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VPF	: <i>Vascular permeability factor</i>
VYS	: <i>Visceral yolk sac</i>
ZP	: <i>Zona pellucida</i>

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Skema Pembentukan Sel Germinal Primordial Tikus	10
Gambar 2.	Model Jalur Pembentukan Folikel Primer di Ovarium Manusia Dewasa.....	10
Gambar 3.	Perubahan Morfologi Utama Pada Folikulogenesis.....	12
Gambar 4.	Stadium Perkembangan Ovarium.....	13
Gambar 5.	Pengaturan Fungsi Reproduksi Wanita.....	18
Gambar 6.	Apoptosis pada Folikel Reantral.....	19
Gambar 7.	Struktur kimia <i>4-Vinyl Cyclohexene Diepoxide</i> (VCD).....	26
Gambar 8.	Kesamaan Morfologi antara Atresia Folikel Alamiah Dengan Apoptosis Folikel yang Disebabkan oleh VCD	28
Gambar 9.	Mekanisme Perusakan Ovarium oleh VCD.....	31
Gambar 10.	Klasifikasi Sel Punca.....	32
Gambar 11.	Sinyal Ekstraseluler pada SPM.....	37
Gambar 12.	Lingkungan Hipoksia dalam Sel Punca di Tubuh Manusia....	39
Gambar 13.	Metabolit Bioaktif yang Disekresikan Kultur SPM dalam Media Terkondisi Sel Punca.....	44
Gambar 14.	Histologi Amnion.....	49
Gambar 15.	Isolasi SPM dari Berbagai Produk Kehamilan.....	47
Gambar 16.	Kerangka Teori.....	52
Gambar 17.	Kerangka Konsep.....	54
Gambar 18.	Kerangka Operasional Penelitian	58
Gambar 19.	Variabel Penelitian.....	61
Gambar 20.	Kemampuan Sel untuk Menempel pada Dasar Tabung Kultur.....	84
Gambar 21.	Hasil <i>Flow Cytometry</i> CD44+ dan CD 105+.....	85
Gambar 22.	Hasil <i>Flow Cytometry</i> CD45- dan CD44+.....	86
Gambar 23.	Kemampuan Diferensiasi Menjadi Osteosit.....	86
Gambar 24.	Kepadatan Osteosit dalam Koloni Uji Diferensiasi.....	87
Gambar 25.	Diferensiasi Menjadi Adiposit.....	88

Gambar 26.	Kepadatan Osteosit dalam Koloni Uji Diferensiasi.....	88
Gambar 27.	Pengukuran Kadar bFGF Media Terkondisi Sel Punca.....	89
Gambar 28.	Pengukuran Kadar VEGF-A Media Terkondisi Sel Punca....	90
Gambar 29.	Pengukuran Kadar LIF Media Terkondisi Sel Punca Mesensimal.....	91
Gambar 30.	Gambar dan Analisis SDS-PAGE Metode Ultrafiltrasi	92
Gambar 31.	Protein yang Diekspresikan oleh SDS PAGE Metode Ultrafiltrasi Berdasar Perhitungan Berat Molekul.....	93
Gambar 32.	Daftar Nama dan Berat Molekul Protein yang Diekspresikan pada Pemeriksaan SDS-PAGE.....	94
Gambar 33.	Kerusakan Folikel Primordial Akibat VCD pada Kelompok I, II dan III.....	96
Gambar 34.	Kerusakan Folikel Primordial Akibat VCD pada Hari Ke 0, 30,50 dan 60.....	99
Gambar 35.	Rerata Folikel Primordial Utuh pada Kelompok I,II dan III	101
Gambar 36.	Rerata Folikel Primordial Utuh pada Hari ke 0, 30,50 dan 60.....	103
Gambar 37.	Rerata Folikel Primordial Caspase 3+ pada kelompok I,II dan III.....	105
Gambar 38.	Folikel Primordial Caspase 3+ pada Hari Ke 0, 30,50 dan 60	107
Gambar 39.	Rerata Jumlah Folikel Primordial Caspase 3- pada Kelompok I, II dan III.....	109
Gambar 40.	Folikel Primordial Caspase 3- pada Hari Ke 0, 30,50 dan 60.....	111
Gambar 41.	Rerata Jumlah Folikel Sekunder Utuh Setelah Pemberian VCD pada Kelompok I,II dan III.....	114
Gambar 42	Rerata Folikel Tersier Utuh pada Hari ke 0, 30,50 dan 60.....	117
Gambar 43.	Rerata Jumlah Folikel Tersier Caspase3- pada Kelompok I, II dan III.....	118

Gambar 44.	Rerata Jumlah Folikel Tersier Caspase 3- pada Hari Ke 0, 30,50 dan 60.....	119
Gambar 45.	Kadar FSH pada Kelompok I, II dan III.....	120
Gambar 46.	Kadar FSH Serum Tikus pada Hari ke 0, 30,50 dan 60.....	122
Gambar 47.	Kadar Estradiol pada Kelompok I, II dan III.....	124
Gambar 48.	Kadar Estradiol pada Hari Ke 0, 30,50 dan 60.....	126
Gambar 49.	Histogram Dua Parameter.....	130

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Faktor yang berperan pada perkembangan folikel ovarium	14
Tabel 2	Kronologi dan Kontroversi Penelitian Sel Punca.....	33
Tabel 3.	Pengukuran kadar bFGF, VEGF-A dan LIF Media Terkondisi Sel Punca Mesensimal dengan Metode ELISA	91
Tabel 4.	Tabel Karakteristik Subyek Penelitian	96

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Pengukuran Kadar bFGF, VEGF-A dan LIF Media Terkondisi Sel Punca Mesensimal dengan Metode ELISA	163
Lampiran 2.	Protein yang Diekspresikan oleh SDS PAGE Metode Ultrafiltrasi Berdasar Perhitungan Berat Molekul	165
Lampiran 3.	Kerusakan Folikel Primordial dan Folikel Primer Akibat VCD pada Kelompok I, II dan III.....	166
Lampiran 4.	Kerusakan Folikel Primordial dan Folikel Primer Akibat VCD pada Hari Ke 0, 30,50 Dan 60.....	169
Lampiran 5.	Rerata Folikel Primordial Utuh pada Kelompok I,II dan III	173
Lampiran 6.	Rerata Folikel Primordial Utuh pada Hari ke 0, 30,50 dan 60.....	177
Lampiran 7.	Rerata Folikel Primordial dan Folikel Primer Caspase 3+ pada Kelompok I,II dan III.....	180
Lampiran 8.	Folikel Primordial dan Folikel Primer Caspase 3+ pada Hari Ke 0, 30,50 dan 60.....	184
Lampiran 9.	Rerata Jumlah Folikel Primordial dan Folikel Primer Caspase 3- pada Kelompok I, II dan III.....	187
Lampiran 10.	Folikel Primordial dan Folikel Primer Caspase 3- pada Hari Ke 0, 30,50 dan 60.....	191
Lampiran 11.	Kerusakan Folikel Sekunder pada Kelompok I,II dan III.....	195
Lampiran 12.	Kerusakan Folikel sekunder Akibat VCD Pada Hari Ke 0, 30, 50 dan 60.....	199
Lampiran 13.	Rerata jumlah Folikel Primordial Utuh Setelah Pemberian VCD pada Kelompok I,II dan III	203
Lampiran 14.	Rerata Jumlah Folikel Sekunder Utuh pada Hari ke 0, 30,50 dan 60.....	207
Lampiran 15.	Jumlah Folikel Primordial dan Folikel Primer Caspase3+ pada Kelompok I,II dan III Setelah Pemberian VCD.....	211
Lampiran 16.	Rerata Folikel Sekunder Caspase 3+ Pada Hari Ke 0, 30,50 dan 60.....	215

Lampiran 17.	Rerata Folikel Sekunder Caspase3- pada kelompok I,II dan III Setelah Pemberian VCD.....	219
Lampiran 18.	Rerata Folikel Sekunder Caspase 3- pada Hari Ke 0, 30,50 dan 60.....	222
Lampiran 19.	Kerusakan Folikel Tersier Akibat VCD pada Kelompok I,II dan III	226
Lampiran 20.	Kerusakan Folikel Tersier Pada Hari Ke 0, 30,50 dan 60	230
Lampiran 21.	Rerata jumlah Folikel Tersier Utuh Pada Kelompok I,II dan III	234
Lampiran 22.	Rerata Jumlah Folikel Tersier Utuh pada Hari ke 0, 30,50 dan 60	238
Lampiran 23.	Rerata Jumlah Folikel Tersier Caspase 3+Pada Hari Ke 0, 30,50 dan 60	242
Lampiran 24.	Rerata Jumlah Folikel Tersier Caspase 3+ Pada Hari Ke 0, 30,50 dan 60	246
Lampiran 25.	Rerata jumlah Folikel Tersier Caspase3- pada kelompok I, II dan III	250
Lampiran 26.	Rerata jumlah Folikel Tersier Caspase 3- Pada Hari Ke 0, 30,50 dan 60.....	254
Lampiran 27.	Kadar FSH pada Kelompok I, II dan III.....	259
Lampiran 28.	Kadar FSH Serum Tikus pada Hari ke 0, 30,50 dan 60.....	263
Lampiran 29.	Kadar Estradiol pada Kelompok I, II dan III.....	267
Lampiran 30.	Kadar Estradiol pada Hari ke 0, 30,50 dan 60.....	271
Lampiran 31.	<i>Ethical clearance</i> Perlakuan Hewan CobaTikus.....	275
Lampiran 32.	<i>Ethical clearance</i> Pengambilan Jaringan Amnion Manusia.....	276
Lampiran 33	<i>Informed Conccent</i> Pengambilan Amnion.....	277
Lampiran 34.	Pemeriksaan <i>Rapid Test</i> HIV	278
Lampiran 35	Pemeriksaan HbSAg.....	279