

Perkembangan Sel Endometrium Domba setelah Inkubasi dalam Kolagenase dan Dikultur *In Vitro* dengan Estradiol dan Progesteron

*(DEVELOPMENT OF OVINE ENDOMETRIAL CELL
AFTER INCUBATING IN COLLAGENASE AND CULTURED
IN MEDIUM WITH ESTRADIOL AND PROGESTERONE IN VITRO)*

**Ananda¹, Ekayanti Mulyawati Kaiin²,
Ni Wayan Kurniani Karja^{1,3}, Mohamad Agus Setiadi^{1,3*}**

¹Program Studi Biologi Reproduksi,
Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor,
²Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia,
Jl. Raya Bogor km 46, Cibinong, Jawa Barat, Indonesia, 16911
³Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor,
Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia, 16680
Telp: (0251) 8626368, Fax: (0251) 8629461
*Penulis untuk korespondensi: setiadi03@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the optimal incubation time of collagenase on concentration, viability, quality of endometrial cell culture, and the role of estradiol and progesterone on ovine endometrial cells proliferation. Endometrium minced was incubated into collagenase with different duration of time: 1 hour, 3 hours, and 6 hours respectively. Cell concentration and viability were calculated after incubation. The quality of cell culture was observed on 1st, 3rd, and 5th day after seeding. The best incubation result was then continued with the addition of the E2 (100 pg/mL), P4 (100 ng/mL), E2:P4 (100 pg/mL : 10 ng/mL), and E2:P4 (10 pg/mL : 100 ng/mL) into the culture medium. After nine days, cell culture was harvested by trypsinization. Concentration and cell viability were analyzed using analysis of variance, followed by Duncan test. Quality of endometrial cell culture was analyzed descriptively. Results showed that there was a significant decreased in the concentration and cell viability obtained in each treatment of collagenase incubation time and optimum treatment of endometrial cell culture was found at 3 hours. Experiment on culture of endometrial cell revealed that proliferation rate treated by E2 and P4 was better than control ($P < 0.05$). Furthermore, additional of E2 into the culture medium even E2 alone (100 pg/mL or higher E2 combination with P4 (100 pg/mL : 10 ng/mL) showed better proliferation rate than P4 alone (100 ng/mL) or higher P4 combination (10 pg/mL : 100 ng/mL). In conclusion, supplementation of 100 pg/mL of estradiol (E2) could support better proliferation of ovine endometrial cells in vitro.

Keywords: endometrial cells; cells culture; collagenase; estradiol; progesterone

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu inkubasi yang optimal enzim kolagenase terhadap konsentrasi, viabilitas, kualitas kultur sel endometrium, serta peran estradiol dan progesteron pada proliferasi sel endometrium domba. Cacahan endometrium diinkubasi ke dalam kolagenase dengan durasi waktu yang berbeda: 1 jam, 3 jam, dan 6 jam. Konsentrasi sel dan viabilitas dihitung setelah inkubasi. Kualitas kultur sel diamati pada hari ke-1, ke-3, dan ke-5 setelah kultur. Hasil inkubasi terbaik kemudian dilanjutkan dengan penambahan E2 (100 pg/mL), P4 (100 ng/mL), E2:P4 (100 pg/mL : 10 ng/mL), dan E2:P4 (10 pg/mL : 100 ng/mL) ke dalam medium kultur. Setelah sembilan hari, sel dipanen dengan cara tripsinisasi. Konsentrasi dan

viabilitas sel dianalisis menggunakan sidik ragam, dilanjutkan dengan uji Duncan. Kualitas kultur sel endometrium dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat penurunan yang signifikan terhadap konsentrasi dan viabilitas sel yang diperoleh pada perlakuan waktu inkubasi kolagenase dan perlakuan optimum kultur sel endometrium ditunjukkan pada perlakuan 3 jam. Percobaan pada kultur sel endometrium mengungkapkan bahwa tingkat proliferasi sel endometrium yang disuplementasi oleh E2 dan P4 lebih baik daripada kontrol ($P < 0.05$). Selanjutnya, penambahan E2 ke dalam medium kultur baik dengan E2 tunggal (100 pg/mL) atau kombinasi E2 yang lebih tinggi dengan P4 (100 pg/mL : 10 ng/mL) menunjukkan tingkat proliferasi yang lebih baik daripada P4 tunggal (100 ng/mL) atau kombinasi P4 (10 pg/mL : 100 ng/mL). Dapat disimpulkan bahwa suplementasi 100 pg/mL estradiol (E2) dapat mendukung proliferasi sel endometrium domba yang lebih baik secara *in vitro*.

Kata-kata kunci: sel endometrium; kultur sel; kolagenase; estradiol; progesteron

PENDAHULUAN

Endometrium adalah salah satu lapisan pada uterus yang terus mengalami pertumbuhan dan diferensiasi dalam merespons hormon ovarium dalam peranannya sebagai media implantasi blastosis (Giudice 2003) dan meregenerasi jaringan endometrium untuk kembali bersiklus apabila tidak terjadi implantasi (Maruyama dan Yoshimura 2008). Terdapat dua jaringan utama penyusun endometrium yang sangat berperan penting terhadap keberhasilan endometrium dalam menjalankan fungsinya, yaitu jaringan epitel dan jaringan stroma (Senger 2003). Keberhasilan implantasi dipengaruhi oleh kemampuan penerimaan dan kesiapan jaringan epitel dan jaringan stroma endometrium (Simon *et al.*, 2000; Diedrich *et al.*, 2007).

Secara umum endometrium mengalami berbagai perubahan meliputi proliferasi dan apoptosis sel sesuai dengan siklus reproduksinya (Senger, 2003). Kemampuan proliferasi dan regenerasi jaringan endometrium diduga berkaitan dengan keberadaan sel progenitor endometrium yang terdapat pada lapisan basal endometrium (Gargett, 2007). Kemampuan ini dapat dimanfaatkan sebagai terapi sel pada kasus disfungsi endometrium. Terapi sel dan jaringan endometrium sebelumnya telah dilakukan untuk mencari solusi terhadap kasus endometriosis (Hull *et al.*, 2005). Nisolle *et al.* (2000) sebelumnya telah melakukan percobaan transplantasi jaringan endometrium yang dibiakkan secara *in vitro* pada mencit. Namun demikian, penggunaan sel endometrium membutuhkan sumber sel endometrium yang akan ditransplantasikan dalam jumlah yang memadai.

Salah satu metode yang umum dipakai untuk mendapatkan sel dari jaringan hidup

adalah dengan menggunakan reaksi enzimatik. Enzim yang sering digunakan dalam memperoleh sel yang akan dikultur adalah enzim kolagenase. Kolagenase adalah enzim yang dapat memecah domain *triple helix* dari kolagen (Daboor *et al.*, 2010) sehingga menjadikan sel terpisah dari sel yang lain tanpa merusak membran sel (Alipour *et al.*, 2016). Freshney (2005) melaporkan bahwa penggunaan enzim kolagenase merupakan salah satu teknik isolasi sel terbaik yang digunakan dalam mengisolasi sel epitel dan sel stroma.

Beberapa peneliti lainnya juga menggunakan enzim kolagenase untuk mengisolasi sejumlah sel seperti sel kondrosit (Yonenaga *et al.*, 2017), sel mesenkim pada tali pusar anjing (Lee *et al.*, 2013), sel Leydig pada tikus (Kaiin *et al.*, 2013) sel germinal pada testis kuda (Jung dan Yoon 2016), sel Schwann (Jin *et al.*, 2008) serta progenitor sel otot (Ishii *et al.*, 2017). Sementara itu, penelitian tentang lama waktu inkubasi enzim kolagenase untuk mendapatkan sejumlah sel endometrium bervariasi baik tentang lama inkubasi maupun hasil yang dilaporkan seperti pada kelinci dengan lama waktu inkubasi 1,5 jam (Mulholland *et al.*, 1988), sapi dengan lama waktu inkubasi dua jam (Kimmins *et al.*, 2003), mencit dengan lama waktu inkubasi 20-30 menit (Wewer *et al.*, 1986) hingga 1,5 jam (Janzen *et al.*, 2013), anjing dengan lama waktu inkubasi 4-6 jam (Bartel *et al.*, 2013), babi dengan lama waktu inkubasi yang berbeda yaitu satu jam (Wang *et al.*, 2000), 1,5 jam (Blitek dan Ziecik, 2004), dan 2 jam (Aldarmahi, 2017).

Secara *in vivo* pengaturan endometrium tergantung pada hormon steroid (Zhu *et al.*, 2014). Endometrium pada hewan dan manusia cenderung memiliki persamaan dalam merespons hormon steroid (Janzen *et al.*, 2013). Pada manusia dan hewan primata, penurunan

progesteron pada fase luteal menyebabkan menstruasi (Brosens dan Gellersen 2006), sedangkan pada hewan dengan siklus estrus, penurunan progesteron menyebabkan sel endometrium mengalami apoptosis dan reabsorpsi (Wood *et al.*, 2007). Restorasi endometrium kembali dimulai pada siklus berikutnya seiring dengan kenaikan jumlah estrogen pada fase folikuler. Estrogen diketahui menyebabkan proliferasi sel-sel endometrium sehingga endometrium kembali mengalami regenerasi (Saleh *et al.*, 2011).

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel. Uterus dikoleksi pada fase folikular dengan memperhatikan terdapatnya folikel dominan pada ovarium. Uterus selanjutnya segera dibilas dengan menggunakan NaCl fisiologis kemudian ditransportasikan ke laboratorium dengan menggunakan termos *Cito Warm Water Thaw* (Minitube) yang telah berisi NaCl fisiologis dan mengandung 100 IU/mL penisilin (Sigma, P-3032) dan 0,1 mg/mL streptomisin (Sigma, S-6501) pada suhu 38°C.

Koleksi dan Inkubasi Kolagenase. Teknik koleksi sel endometrium dilakukan dengan menggunakan metode enzimatik yang dimodifikasi dari Freshney (2005). Uterus dibilas dengan menggunakan *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS, Sigma, D-8537) yang mengandung 62,5 µg/mL gentamisin (Sigma, G-1272). Selanjutnya uterus dipotong secara longitudinal, bagian endometrium dan miometrium dipisahkan. Bagian endometrium yang diperoleh dibilas kembali dengan menggunakan DPBS (Sigma, D-8537) yang mengandung 62,5 µg/mL gentamisin (Sigma, G-1272) dan dicacah dengan menggunakan gunting dan pisau bedah steril. Hasil cacahan endometrium selanjutnya dimasukkan kedalam cawan petri steril dan diinkubasi dengan 1 mg/mL enzim kolagenase tipe I (Sigma, C-0130) dalam inkubator (Thermo Scientific) selama 1 jam, 3 jam, atau 6 jam. Selanjutnya dilakukan proses *pipetting* untuk memastikan sel terdisintegrasi dan disaring dengan menggunakan *Sterile Nylon Filter* 40 µm (Falcon, 2340). Proses enzimatik dihentikan dengan menggunakan DPBS (Sigma, D-8537) yang mengandung 1% *New Born Calf Serum* (NBCS, Gibco, 26010-074) dan disentrifugasi selama lima menit pada kecepatan 250 g

sebanyak tiga kali. *Pellet* dikoleksi dan diresuspensi dengan 5 mL *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Sigma, D-5523) yang mengandung 10% NBCS (Gibco, 26010-074) dan disentrifugasi kembali. *Pellet* diresuspensi dalam 1 mL DMEM (Sigma, D-5523) dan dilakukan penghitungan konsentrasi dan viabilitas sel pada kamar hitung hemositometer *improve Neaubeauer* dengan rumus, konsentrasi sel = jumlah sel dalam lima kotak x 25 x 10⁴; sedangkan viabilitas sel = [(jumlah sel hidup) x (total seluru sel)⁻¹] x 100%.

Sel yang diperoleh dikultur dengan konsentrasi 3×10⁶ sel/mL pada *cell culture dish* 35 mm (Corning, 430165) yang telah di-*coating* dengan 0,1% gelatin (Sigma, G-9391) di dalam inkubator (Thermo Scientific) pada suhu 38°C dan 5% CO₂.

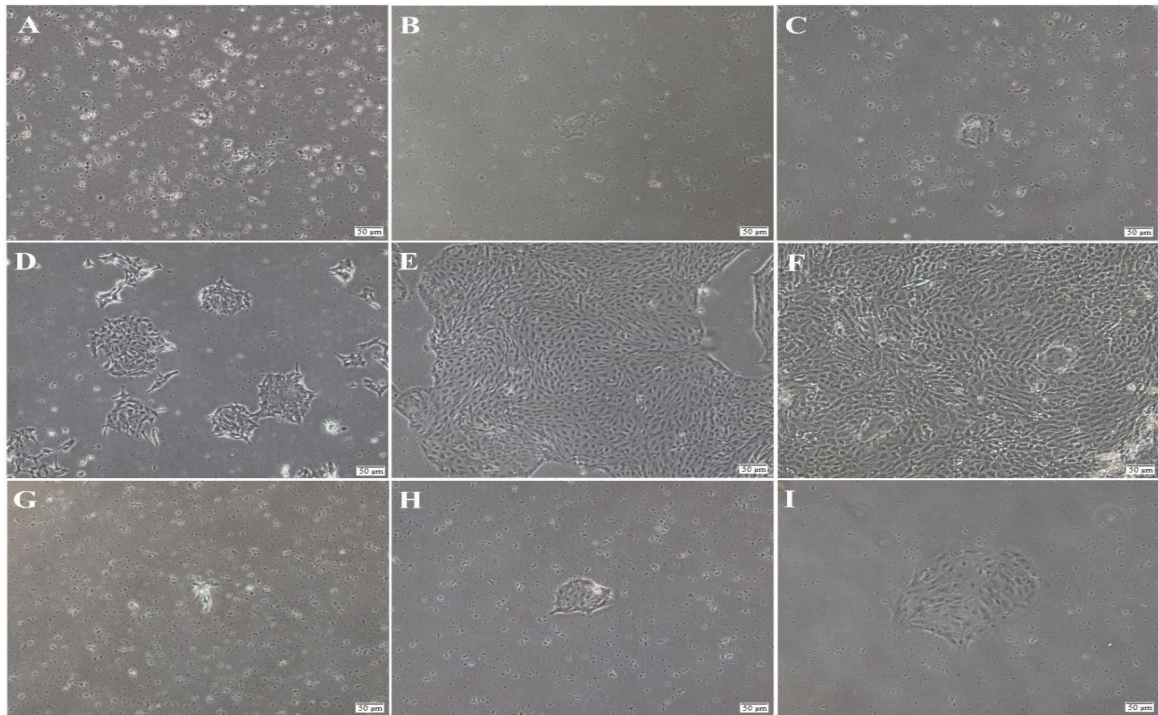
Suplementasi Estradiol dan/atau Progesteron. Sebanyak 10⁶ sel/mL suspensi sel endometrium diambil dengan metode terbaik pada tahap pertama dikoleksi dan dikultur dengan penambahan hormon estradiol (E2, Sigma, E-4389) dan progesteron (P4, Sigma, P-0130) dengan masing-masing perlakuan media kultur sebagai berikut; (1) DMEM + 10% NBCS (mDMEM) sebagai control; (2) mDMEM + 100 pg/mL E2; (3) mDMEM + 100 ng/mL P4; (4) mDMEM + 100 pg/mL E2 dan 10 ng/mL P4, dan (5) mDMEM + 10 pg/mL E2 dan 100 ng/mL P4. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 38°C dengan 5% CO₂. Sel yang telah konfluen pada sembilan hari kultur, kemudian dipanen dengan menggunakan 0,2% tripsin-EDTA (Gibco, 15400-054) pada suhu ruang selama 1-2 menit. Sel yang diperoleh kemudian disentrifugasi pada kecepatan 250 g selama lima menit dan diresuspensi dalam 1 mL mDMEM. Selanjutnya dilakukan penghitungan konsentrasi dan viabilitas sel.

Analisis Data. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *software* SPSS 16.0 dengan ulangan sebanyak sembilan kali pada perlakuan kolagenase, serta lima kali ulangan untuk perlakuan penambahan hormone. Data kuantitatif (*variable dependen*) diuji kemaknaanya terhadap pengaruh kelompok perlakuan (*variable independence*). Urutan uji diawali dengan uji *analysis of variance*. Hasil uji yang menunjukkan signifikan ($p < 0,05$), terhadap data tersebut dilanjutkan dengan uji Duncan.

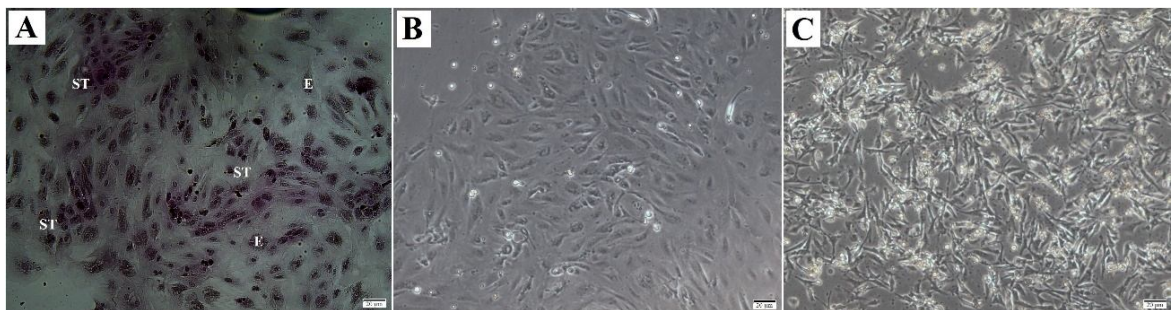
Tabel 1. Perbandingan kualitas sel endometrium terhadap paparan enzim kolagenase dengan lama waktu inkubasi yang berbeda

Parameter (n=9)	Lama inkubasi enzim kolagenase		
	1 jam	3 jam	6 jam
Konsentrasi (juta sel/mL)	12,17 ± 0,47a	8,68 ± 0,37b	6,24 ± 0,95c
Viabilitas(%)	54,64 ± 5,26a	45,52 ± 4,53b	41,79 ± 3,89b

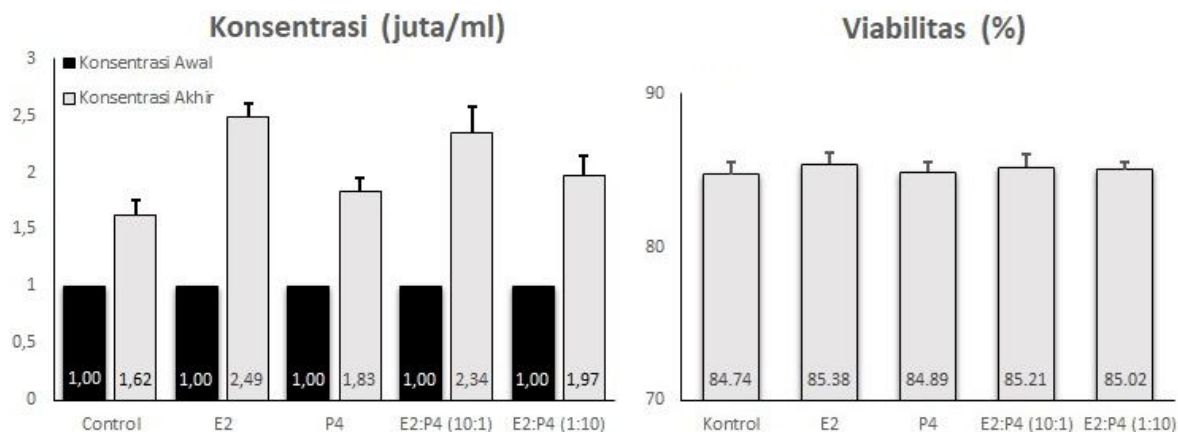
Keterangan: ^{abc} Huruf berbeda yang mengikuti angka menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05).



Gambar 1. Kultur sel endometrium domba. A. inkubasi kolagenase 1 jam setelah 24 jam kultur. B. inkubasi kolagenase 1 jam setelah 3 hari kultur. C. inkubasi kolagenase 1 jam setelah 5 hari kultur. D. inkubasi kolagenase 3 jam setelah 24 jam kultur. E. inkubasi kolagenase 3 jam setelah 3 hari kultur. F. inkubasi kolagenase 3 jam setelah 5 hari kultur. G. inkubasi kolagenase 6 jam setelah 24 jam kultur. H. inkubasi kolagenase 6 jam setelah 3 hari kultur. I. inkubasi kolagenase 6 jam setelah 5 hari kultur.



Gambar 2. Kultur sel endometrium dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin. A. Sebaran sel epitel (E) dan sel stroma (ST) pada pewarnaan hematoksilin-eosin, B. koloni sel epitel, C. koloni sel stroma



Gambar 3. Proliferasi sel endometrium (*in vitro*) pasca pemberian hormon estradiol dan/atau progesteron selama 10

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi, Viabilitas, dan Perkembangan Sel Endometrium Secara *In Vitro* Pascainkubasi Enzim Kolagenase

Hasil yang diperoleh menunjukkan terjadinya penurunan secara signifikan ($p < 0,05$) kualitas sel yang dikoleksi pascainkubasi dengan enzim kolagenase. Konsentrasi sel hidup yang diperoleh mengalami penurunan sejalan dengan semakin lamanya waktu inkubasi. Hal yang sama juga terlihat pada persentase viabilitas sel yang mengalami penurunan seiring dengan semakin lamanya waktu inkubasi yang digunakan (Tabel 1).

Kolagenase adalah enzim yang dihasilkan dari *Clostridium histolyticum* (Bond dan Wart 1984) yang merupakan enzim hidrolitik non-sitotoksik dan bekerja secara maksimum pada kisaran pH 6,5-7,8 dalam medium isotonis (Limon *et al.*, 1986) serta mampu mendegradasi kolagen (Toyoshima *et al.*, 2001). Bakteri *C. histolyticum* memproduksi dua jenis kolagenase: kolagenase 1 (clostridiopeptidase A) dan kolagenase 2 (clostridiopeptidase B). Limon *et al.* (1986) menyatakan bahwa enzim kolagenase merupakan enzim non-sitotoksik yang memecah protein matriks ekstraselular tanpa merusak membran sel. Namun, kolagenase murni yang diisolasi dari bakteri diketahui tidak efisien dalam memisahkan jaringan karena tingginya konsentrasi protein non kolagen dan makromolekul lain yang ditemukan dalam matriks ekstraseluler pada jaringan konektif dan jaringan epitel, sehingga diperlukan kombinasi dengan enzim protease lainnya (Worthington Biochemical Corporations).

Beberapa tipe kolagenase yang umum digunakan untuk mendapatkan sejumlah sel hewan, seperti kolagenase tipe I untuk mengisolasi sel epitel, sel stroma, sel adrenal, sel paru-paru, dan sel lemak; tipe II untuk mengisolasi sel jantung, sel tiroid, sel kelenjar ludah, sel hati, sel tulang, sel tulang rawan; tipe IV untuk mengisolasi sel reseptor insulin (Gibco Life Technologies Corporation). Pada penelitian ini enzim yang digunakan adalah enzim kolagenase tipe I yang spesifik dalam mengisolasi sel epitel dan sel stroma yang merupakan jaringan utama pada endometrium. Kolagenase tipe I memiliki komposisi yang terdiri dari beberapa enzim protease lainnya selain kolagenase seperti caseinase, clostripain, dan tripsin (Sigma C-0130). Laporan hasil penelitian Pevet *et al.* (1976) menunjukkan bahwa tripsin memprovokasi perubahan ultrastruktural pada permukaan sel, melepaskan glikoprotein dan gula dari membran sel serta mencegah pembentukan glikoprotein yang berdampak kepada kerusakan membran sel. Huang *et al.* (2010) mengungkapkan hal yang sama bahwa tripsin memberikan dampak yang signifikan terhadap jumlah apoptosis sel subkultur, sehingga waktu inkubasi yang optimum penting diperhatikan untuk menghindari apoptosis pada sel.

Hasil yang berbeda diperoleh terhadap kultur *in vitro* sel endometrium domba pada masing-masing perlakuan lama waktu inkubasi enzim kolagenase (Gambar 1). Pertumbuhan sel tampak lebih baik pada perlakuan dengan lama waktu inkubasi kolagenase tiga jam, pada kultur tersebut sel terlihat membentuk koloni setelah 24 jam kultur dan terus tumbuh hingga kultur hari ke-5. Sementara itu pertumbuhan

sel sangat rendah pada perlakuan waktu inkubasi kolagenase 6 jam dan baru membentuk koloni pada hari ke-5. Panjang waktu inkubasi yang digunakan diduga mengakibatkan sejumlah enzim protease pada kolagenase tipe I merusak membran sel dan menyebabkan apoptosis pada sel (Huang *et al.*, 2010), sedangkan untuk inkubasi kolagenase satu jam hanya tampak beberapa sel fibroblast dan beberapa koloni kecil yang baru tampak pada kultur hari ke-5. Hal ini diduga enzim kolagenase tipe I belum bekerja secara optimum dalam memecah kolagen (Helling *et al.*, 2016), sehingga belum terdapat sel yang menempel pada cawan petri kultur meskipun viabilitas sel cukup tinggi.

Kultur *in vitro* dilanjutkan hingga hari ke-9 nampak tidak terjadi perkembangan sel yang dikultur pada masing-masing kelompok, selain kelompok perlakuan dengan lama waktu inkubasi tiga jam seperti terlihat pada Gambar 1. Hasil tersebut menunjukkan bahwa waktu optimum inkubasi kolagenase tipe I adalah tiga jam sehingga waktu inkubasi tersebut digunakan pada penelitian tahap berikutnya.

Perkembangan Sel Endometrium Domba dengan Penambahan Hormon Estradiol dan/atau Progesteron

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap tingkat proliferasi sel pada pemberian hormon E2 dan/atau P4 dibandingkan dengan kontrol ($1,62 \pm 0,13$). Kemampuan proliferasi sel endometrium paling tinggi ditemukan pada sel yang dikultur dalam medium yang ditambahkan 100 pg/mL estradiol tunggal ($2,49 \pm 0,12$). Hasil serupa juga menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) pada sel yang dikultur dalam medium yang ditambahkan 100 pg/mL estradiol yang dikombinasikan dengan 10 ng/mL progesteron ($2,34 \pm 0,24$), meskipun tidak sebaik pada pemberian E2 tunggal. Sebaliknya, penambahan 100 ng/mL P4 tunggal dalam medium tidak menunjukkan induksi proliferasi sel endometrium ($1,83 \pm 0,12$). Hal yang hampir sama juga terlihat pada pemberian 100 ng/mL P4 yang dikombinasikan dengan 10 pg/mL E2 ($1,97 \pm 0,18$). Meskipun peningkatan proliferasi terjadi secara signifikan ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan kontrol ($1,62 \pm 0,13$), namun tidak berbeda jika dibandingkan dengan perlakuan E2 tunggal. Selanjutnya, tidak ada perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) pemberian

hormon E2 dan/atau P4 terhadap viabilitas sel pada masing-masing perlakuan (Gambar 3).

Secara umum hasil penelitian ini dapat menggambarkan kondisi sel endometrium secara *in vivo* yaitu aktivitas proliferasi sel endometrium akan sangat tinggi pada saat jumlah estradiol naik seperti pada saat proestrus dan estrus, dan akan menurun pada saat progesteron naik seperti pada saat metestrus dan diestrus (Cruchten *et al.*, 2004). Hal ini disebabkan terdapatnya sejumlah reseptor hormon steroid pada nukleus sel-sel endometrium (*nuclear receptors*) yaitu *estrogen receptors* (ERs) dan *progesterone receptor* (PR). *Estrogen receptors* (ERs) terdiri dari dua bentuk yaitu ER α dan ER β . Namun, ER α lebih banyak terekspresi pada saluran reproduksi dan lebih efektif daripada ER β dalam merespon estrogen untuk mentranskripsi sejumlah faktor penting pendukung sel (Heldring *et al.*, 2007). Ikatan antara E2 dengan ER α menyebabkan proliferasi sel pada endometrium, seperti yang telah dijelaskan oleh Pan *et al.* (2006) bahwa ikatan tersebut memicu sintesis *minichromosome maintenance protein 2* (MCM2) dan senyawa tersebut berperan untuk mereplikasi DNA pada fase-S dalam siklus sel. Ikatan antara E2 dan ER α pada sel epitel dan sel stroma endometrium juga turut mengekspresikan *CCAAT/enhancer binding protein beta* (C/EBP β) yang penting dalam meningkatkan aktivitas mitosis dan aktivitas fase-S pada sel epitel endometrium (Mantena *et al.*, 2006). Selain itu, ikatan antara E2 dan ER α pada sel stroma mengakibatkan terekspresinya *fibroblast growth factor* (FGF) dan beberapa faktor parakrin lainnya mendukung peningkatan proliferasi sel melalui induksi *extracellular regulated kinase* (ERK) dan aktivitas ER α pada sel epitel endometrium (Li *et al.*, 2011).

Satterfield *et al.* (2008) memperlihatkan bahwa sel epitel dan sel endometrium domba mengekspresikan sejumlah reseptor progesteron (PR). Namun, pada sapi dan domba, sel stroma endometrium diketahui mengekspresikan PR dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan dengan sel epitel endometrium (Spencer dan Bazer, 2002). Penelitian yang telah dilakukan oleh Chung dan Das (2011) mendapati bahwa kultur sel endometrium yang diberikan P4 tunggal pada mencit tidak menunjukkan efek apapun terhadap peningkatan proliferasi sel endometrium, namun jika dikombinasikan dengan E2 terjadi efek penghambatan aktifitas

proliferasi sel. Hal ini serupa pada hasil penelitian ini bahwa pemberian hormon P4 dominan yang dikombinasikan dengan E2 dengan perbandingan 100:10 (1.97 ± 0.18) tidak menunjukkan adanya peningkatan proliferasi sel. Ray dan Pollard (2012) menunjukkan bahwa P4 akan menyebabkan penghambatan replikasi DNA pada sel epitel endometrium yang sebelumnya diinduksi oleh E2. Ikatan antara P4 dan PR pada sel stroma endometrium akan mengekspresikan *Krupple-like transcription factor 4* (KLF4) dan menekan KLF5. Peningkatan KLF4 akan menyebabkan sel epitel endometrium kehilangan MCM2 dan menyebabkan terhambatnya replikasi DNA pada fase-S. Li et al. (2011) menyatakan bahwa ikatan antara P4 dan PR pada sel stroma akan memicu peningkatan proliferasi sel stroma, namun akan menghambat proliferasi sel epitel endometrium. Ikatan ini menyebabkan ekspresi *heart and neural crest derivatives expressed 2* (Hand2) dan sejumlah faktor parakrin lainnya yang akan menghambat ikatan antara FGF dan reseptornya yang terdapat pada sel epitel endometrium.

SIMPULAN

Waktu inkubasi kolagenase selama tiga jam menunjukkan hasil yang lebih efektif dan penambahan hormon estradiol 100 pg/mL secara signifikan mampu meningkatkan proliferasi sel endometrium domba yang lebih baik.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kombinasi enzim kolagenase dengan enzim lain untuk mendapatkan sel secara optimal, serta perlu dilakukannya pemisahan antara sel epitel endometrium dan sel stroma endometrium untuk mempelajari lebih mendalam peran hormon estradiol dan progesteron terhadap proliferasi sel.

DAFTAR PUSTAKA.

Aldarmahi A. 2017. Establishment and characterization of female reproductive tract epithelial cell culture. *J Microsc Ultrastruct* 5: 105-110.
Alipour H, Raz A, Zakeri S, Djadid ND. 2016. Therapeutic applications of collagenase

(metalloprotease): A review. *Asian Pac J Trop Biomed* 6(11): 975-981.

Bartel C, Tichy A, Schoenkypf S, Aurich C, Walter I. 2013. Effects of steroid hormones on differentiated glandular epithelial and stromal cells in a three dimensional cell culture model of the canine endometrium. *BMC Vet Res* 9(86): 1-16.

Blitek A, Ziecik AJ. 2004. Prostaglandins F2 α and E2 secretion by porcine epithelial and stromal endometrial cells on different days of the oestrous cycle. *Reprod Domest Anim* 39: 340-346.

Bond MD, Wart WV. 1984. Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry* 23(13): 3085-91.

Brosens JJ, Gellersen B. 2006. Death or survival – progesterone-dependent cell fate decision in the human endometrial stroma. *J Mol Endocrinol* 36: 389-398.

Chung D, Das SK. 2011. Mouse primary uterine cell coculture system revisited: ovarian hormones mimic the aspects of in vivo uterine cell proliferation. *Endocrinology* 152(8): 3246-58.

Cruchten SV, Broeck WV, D'Haeseleer M, Simons P. 2004. Proliferation patterns in the canine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology* 62(3): 631-641.

Daboor SM, Budge SM, Ghaly AE, Brook SL, Dave D. 2010. Extraction and purification of collagenase enzyme: a critical review. *Am J Biochem Biotech* 6: 239-263.

Diedrich K, Fauser BCJM, Devroey P, Griesinger G. 2007. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update* 13: 365-377.

Freshney RI. 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Fifth Edition, John Wiley & Sons, Inc.

Gargett CE. 2007. Uterine stem cells: what is the evidence? *Hum Reprod Update* 13: 87-101.

Gibco, Life Technologies Corporation (US).

Giudice LC. 2003. Elucidating endometrial function in the post-genomic era. *Hum Reprod* 9: 223-235.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson J. 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87: 905-31.

- Helling AL, Tsekoura EK, Biggs M, Bayon Y, Pandit A, Zeugolis DI. 2016. In vitro enzymatic degradation of tissue grafts and collagen biomaterials by matrix metalloproteinases: improving the collagenase assay. *ACS Biomater Sci Eng* 3(9): 1922-1932.
- Huang HL, Hsing HW, Lai TC, Chen YW, Lee TR, Chan HT, Lyu PC, Wu CL, Lu YC, Lin ST, Lin CW, Lai CH, Chang HT, Chou HC, Chan HL. 2010. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci* 17(36): 1-10.
- Hull ML, Prentice A, Wang DY, Butt RP, Philips SC, Smith SK, Jones DSC. 2005. Nimesulide, a COX-2 inhibitor, does not reduce lesion size or number in a nude mouse model of endometriosis. *Hum Reprod* 20: 350-358.
- Ishii K, Suzuki N, Mabuchi Y, Sekiya I, Akazawa C. 2017. Technical advantage of recombinant collagenase for isolation of muscle stem cells. *Regenerative Therapy* 7: 1-7.
- Janzen DM, Cheng D, Schafenacker AM, Paik DY, Goldstein AS, Witte ON, Jaroszewicz A, Pellegrini M, Memarzadeh S. 2013. Estrogen and progesterone together expand murine epithelial progenitor cells. *Stem Cells Int* 31: 808-822.
- Jin YQ, Liu W, Hong TH, Cao Y. 2008. Efficient Schwann cell purification by differential cell detachment using multiplex collagenase treatment. *J Neurosci Methods* 170: 140-148.
- Jung H, Yoon M. 2016. Isolation of germ cells from testes of stallions using collagenase and trypsin ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). *J Equine Vet Sci* 43: 82-87.
- Kaiin EM, Djuwita I, Yusuf TL, Setiadi MA. 2013. Development of in vitro culture of rat Leydig cells after purification with Nycodenz gradient. *Open J Anim Sci* 7(1): 75-80.
- Kimmins S, Lim HC, Parent J, Fortier MA, McLaren LA. 2003. The effects of estrogen and progesterone on prostaglandins and integrin beta 3 (β 3) subunit expression in primary cultures of bovine endometrial cells. *Domest Anim Endocrinol* 25: 141-154.
- Lee KS, Nah JJ, Lee BC, Lee HT, Lee HS, So BJ, Cha SH. 2013. Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion. *Res Vet Sci* 94: 144-151.
- Li Q, Kannan A, DeMayo FJ, Lydon JP, Cooke PS, Yamagishi H, Srivastava D, Bagchi MK, Bagchi IC. 2011. The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2. *Science* 331: 912-6.
- Limon J, Cin PD, Sandberg AA. 1986. Application of long-term collagenase disaggregation for the cytogenetic analysis of human solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 23: 305-313.
- Mantena SR, Kannan A, Cheon YP, Li Q, Johnson PF, Bagchi IC, Bagchi MK. 2006. C/EBP α is a critical mediator of steroid hormone-regulated cell proliferation and differentiation in the uterine epithelium and stroma. *Proc Natl Acad Sci* 103: 1870-1875.
- Maruyama T, Yoshimura Y. 2008. Molecular and cellular mechanism for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. *Endocrinology* 55: 795-810.
- Mulholland J, Winterhager E, Beier HM. 1988. Changes in proteins synthesized by rabbit endometrial epithelial cells following primary culture. *Cell Tissue Res* 252: 123-132.
- Nisolle M, Roux FC, Marbaix E, Jadoul P, Donnez J. 2000. Transplantation of cultured explants of human endometrium into nude mice. *Hum Reprod* 15: 572-577.
- Pan H, Deng Y, Pollard JW. 2006. Progesterone blocks estrogen-induced epithelial cell proliferation by inhibition of DNA replication licensing. *Proc Natl Acad Sci* 103: 14021-6.
- Pevet MM, Jongsma HJ, Bruijine J. 1976. Collagenase and trypsin dissociated heart cells: A comparative ultrastructural study. *J Mol Cell Cardiol* 8: 747-757.
- Ray S, Pollard JW. 2012. KLF15 negatively regulates estrogen-induced epithelial cell proliferation by inhibition of DNA replication licensing. *Proc Natl Acad Sci* 109: 1334-43.
- Saleh L, Otti GR, Fiala C, Pollhelmer J, Knofler M. 2011. Evaluation of human first trimester decidual and telomerase-transformed endometrial stromal cells as model system of in vitro decidualization. *Reprod Biol Endocrinol* 9: 1-15.
- Satterfield MC, Song G, Hayashi K, Bazer FW, Spencer TE. 2008. Progesterone regulation of the endometrial WNT system in the ovine uterus. *Reprod Fertil Dev* 20: 935-946.
- Senger PL. 2003. *Pathways to Pregnancy and Parturition*, 2nd Edition. Washington State University Research and Technology Park, Washington.

- Simon C, Martin JC, Pellicer A. 2000. Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynecol* 14: 815-826.
- Spencer TE, Bazer FW. 2002. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front Biosci* 7: 1879-98.
- Toyoshima T, Matsushita O, Minami J, Nishi N, Okabe A, Itano T. 2001. Collagen binding domain of a *Clostridium histolyticum* collagenase exhibits a broad substrate spectrum both in vitro and in vivo. *Connect Tissue Res* 42: 281-290.
- Wang G, Johnson GA, Bazer FW. 2000. Isolation, immortalization, and initial characterization of uterine cell lines: an in vitro model system for the porcine uterus. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36: 650-65.
- Wewer UM, Damjanov A, Weiss J, Liotta LA, Damjanov I. 1986. Mouse endometrial stromal cells produce basement-membrane components. *Differentiation* 32: 49-58.
- Wood GA, Fata JE, Watson KLM, Khoka R. 2007. Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction* 133: 1035-44.
- Worthington, Worthington Biochemical Corporations Lakewood (US).
- Yonenaga K, Nishizawa S, Nakagawa T, Fujihara Y, Asawa Y, Hikita A, Takato T, Hoshi K. 2017. Optimal condition of collagenase treatment for isolation of articular chondrocytes from aged human tissues. *Regenerative Therapy* 6: 9-14.
- Zhu H, Hou C, Luo L, Hu Y, Yang W. 2014. Endometrial stromal cells and decidualized stromal cells: Origins, transformation and function. *Gene* 14: 1-14.