

EFEK ESTROGENIK EKSTRAK ETANOL 70% KUNYIT (*Curcuma domestica* VAL.) TERHADAP MENCIT (*Mus musculus* L.) BETINA YANG DIOVARIIEKTOMI

Dadang Kusmana, R. Lestari, Setiorini, A.N. Dewi, P.R. Ratri, dan R.R.R. Soraya

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia

E-mail: retno.lestari@yahoo.com

Abstrak

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.) terhadap ketebalan endometrium, epitel vagina, kelenjar *mammae*, dan protein reseptor estrogen (RE) pada mencit-mencit yang telah diovariiektomi. Dua puluh lima mencit yang telah diovariiektomi yang dibagi menjadi lima kelompok, yaitu kelompok diberi perlakuan dengan etinilestradiol ($8,4 \times 10^{-3}$ g), akuades (10 ml), dan ekstrak rimpang kunyit dosis 230 mg/kg bb; 310 mg/kg bb; dan 390 mg/kg bb selama delapan hari. Mencit dibunuh pada akhir percobaan, kemudian uterus, vagina, dan *mamae* diambil, lalu berat basah uterus dicatat. Uterus, vagina, dan *mammae* diperiksa preparat histologisnya. Keberadaan protein reseptor estrogen (RE) pada uterus dianalisis menggunakan SDS-PAGE. Hasil uji anava 1-faktor menunjukkan bahwa ekstrak rimpang kunyit dosis 310 mg/kg bb dan 390 mg/kg bb memberikan efek estrogenik pada epitel vagina, ketebalan endometrium, dan diameter kelenjar *mammae*. Analisis SDS-PAGE menunjukkan adanya perbedaan konsentrasi protein antara kontrol dan kelompok perlakuan yang terlihat dari ketebalan pita-pita protein. Pita reseptor estrogen dapat dideteksi pada sampel kelompok perlakuan dengan berat molekul 45 kDa.

Abstract

Estrogenic Effect of 70% Ethanol Turmeric (*Curcuma domestica* Val.) extract on ovariectomized Female Mice (*Mus musculus* L.). The influence of extract turmeric (*Curcuma domestica* Val.) on endometrium thickness, vaginal epithelium, mammary gland, and protein of estrogen receptor of ovariectomized mice was examined. Twenty five ovariectomized mice which were divided into five groups, were treated by ethynilestradiol ($8,4 \times 10^{-3}$ g), aquades (10 ml), and turmeric extract at doses 230 mg/kg b.w.; 310 mg/kg b.w.; and 390 mg/kg b.w. for eight days. At the end of experiments the mice were killed, then the uterus, vagina, and *mammae* were removed and the wet weight of uterus was recorded. Uterus, vagina, and *mammae* were examined histologically. Estrogen receptor protein from uterus were analyzed by using SDS-PAGE. One way anava test showed that turmeric extract at doses 310 mg/kg b.w. and 390 mg/kg b.w give estrogenic effect on vaginal ephitelium, endometrium thickness, and diametre of mammary glands. SDS-PAGE analysis showed there were differences in protein concentration between control and treatment groups which were seen in the thickness of the bands. Estrogen receptor band could be detected in sampel of treatment groups at molecular weight 45 kDa.

Keywords: *Curcuma domestica* Val., estrogen, ovariectomy, *Mus musculus* L.

1. Pendahuluan

Curcuma domestica Val. (kunyit) merupakan salah satu tanaman obat yang sudah dikenal oleh masyarakat sebagai obat tradisional. *Curcuma domestica* memiliki banyak kegunaan, antara lain berkhasiat untuk meluruhkan, dan memperlancar haid, serta dapat meningkatkan produksi ASI [1]. Penelitian Maligalig *dkk.* pada tahun 1994 [1], telah membuktikan adanya aktivitas estrogenik dari infus rimpang *C. domestica*. Hal tersebut diduga berasal dari kandungan fitosteroid

berupa kampesterol, β -sitosterol, dan stigmasterol. Ketiga senyawa fitosteroid tersebut memiliki kemiripan struktur dengan kolesterol yang merupakan prekursor pembentukan hormon seks, salah satunya hormon estrogen [2].

Estrogen mempengaruhi pertumbuhan dan proliferasi duktus kelenjar *mammae*. Estrogen juga menyebabkan penebalan dinding endometrium dan lapisan epitel pipih berlapis vagina. Pemberian estrogen juga akan meningkatkan konsentrasi reseptor estrogen (RE) α pada organ reproduksi [3].

Defisiensi estrogen akibat peristiwa menopause, ovariectomi, dan kelainan sistem reproduksi (*amenorrhea*) dapat mempengaruhi sel-sel target. Defisiensi estrogen dapat menyebabkan terjadinya gangguan pada sistem urogenital, kardiovaskular, dan osteoporosis [4].

Keadaan defisiensi estrogen atau menopause umumnya dapat diobati dengan terapi sulih hormon. Terapi sulih hormon dapat dilakukan dengan pemberian hormon estrogen sintetis. Namun, pemberian hormon tersebut dalam jangka waktu panjang memiliki berbagai efek samping, seperti nyeri payudara, pendarahan pada vagina, dan memicu kanker payudara [5].

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mencari alternatif lain sebagai pengganti hormon sintetis yang memenuhi kriteria alami, mudah diperoleh, dan efektif. Salah satunya dengan memanfaatkan tanaman yang mengandung steroid (fitosteroid). Penggunaan fitosteroid relatif aman dengan efek samping yang lebih sedikit dan bersifat holistik [5].

Berdasarkan hal tersebut maka ingin diketahui apakah pemberian ekstrak rimpang *C. domestica* dengan dosis 230 mg/kg bb, 310 mg/kg bb, dan 390 mg/kg bb dapat meningkatkan ketebalan lapisan endometrium, epitel vagina, dan diameter kelenjar *mammae*, serta ketebalan pita protein reseptor estrogen.

Tujuan. Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol 70% rimpang *C. domestica* terhadap ketebalan dinding endometrium, ketebalan lapisan epitel vagina, dan diameter duktus kelenjar *mammae* setelah *M. musculus* (mencit) tersebut diovariectomi. Manfaat penelitian untuk mengetahui adanya efek estrogenik rimpang *C. domestica* sebagai bahan alam yang dapat digunakan untuk terapi sulih hormon pada keadaan defisiensi estrogen.

2. Metode Penelitian

Waktu dan Lokasi Penelitian. Penelitian dilaksanakan selama 10 bulan di Laboratorium Biologi Perkembangan, Laboratorium Genetika Departemen Biologi FMIPA UI, Depok, dan Laboratorium Biopharming, BPPT, Serpong.

Alat dan Bahan. Peralatan yang digunakan adalah timbangan analitik Libror [Shimadzu AEL-200], *blender* [Philips], aspirator [Tokyo Rikakikai], kertas saring [Whatman No.1], corong buchner, labu Erlenmeyer 100 ml, gelas Beaker [Pyrex], gelas ukur [Pyrex], labu takar [Pyrex], batang pengaduk, kertas *tissue*, oven [Imperial III], mortar, dan *aluminium foil*, kandang plastik mencit ukuran (30 x 20 x 10) cm³, alas kandang (serutan gergaji), tutup kandang (anyaman kawat dengan jarak anyam 0,5 cm), *syringe* 1 ml, botol film, timbangan mencit [Ohaus GT 4000], botol minuman berpipet, jarum cekok [Terumo], kamera digital [Sony], *dissecting set*, peralatan bedah, botol kaca, mikrotom putar [820 Spencer], mikroskop medan terang [Swipf Instrument], mikroprojektor [Ken A Vision], mikrometer objektif (μ m), alat tulis, *microcentrifuge* [Tomy MX-301], *microcentrifuge tube* [Biorad], mikro pipet [Biorad], *cool box* [Marine cooler], sonikator [Tomy Seiko Co, LTD], dan lemari es -80^o C [Angelantoni Scientifica], elektroforesis *tank*, *power supply* [Biorad], *casting frame* [Biorad], *casting stand* [Biorad], *short plate* [Biorad], *spacer plate* [Biorad], *comb*, gelas Beaker, mikro pipet [Biorad], dan peralatan gelas yang umum digunakan di Laboratorium Genetika.

Bahan yang digunakan adalah bahan uji (*Curcuma domestica*), hewan uji (*Mus musculus*), makanan mencit berupa pelet, asam pikrat, alkohol 70%, eter, etinilestradiol [Lynoral], *olive oil* [Bertolli], alkohol teknis 70%, alkohol 96% [Merck], alkohol 100% [Merck], benzoat [Merck], benzol [Merck], albumin Mayer, parafin, spiritus, xilol, asam klorida 1%, hematoksilin Bohmer 1%, eosin Y 1%, entelan [Merck], DMSO (*dimethylsulfoxide*) 10%, *readyprep protein extraction kit* [Biorad], TEMED [Biorad], amonium persulfat (APS), ddH₂O, akrilamid 30% [Biorad], SDS 10%, *resolving buffer*, *stacking buffer*, isopropanol, *commasie brilliant blue*, *destaining solution* [Biorad], *6x loading dye*, dan *unstained protein marker* [Fermentas].

Rancangan Percobaan. Penelitian bersifat eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri atas 5 perlakuan. Setiap perlakuan terdiri atas 5 ulangan. Jumlah ulangan ditentukan dengan menggunakan rumus Frederer, yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$ [6], dengan t jumlah perlakuan dan n jumlah ulangan. Perlakuan yang dimaksud adalah:

- Kelompok kontrol 1 (KK1), yaitu kelompok *M. musculus* yang diovariektomi dan diberi akuades 10 ml/kg bb.
- Kelompok kontrol 2 (KK2), yaitu kelompok *M. musculus* yang diovariektomi dan diberi larutan etinilestradiol 8,4 mg/kg bb.
- Kelompok perlakuan 1 (KP1), yaitu kelompok *M. musculus* yang diovariektomi dan diberi ekstrak rimpang *C. domestica* dengan dosis 230 mg/kg bb.
- Kelompok perlakuan 2 (KP2), yaitu kelompok *M. musculus* yang diovariektomi dan diberi ekstrak rimpang *C. domestica* dengan dosis 310 mg/kg bb.
- Kelompok perlakuan 3 (KP3), yaitu kelompok *M. musculus* yang diovariektomi dan diberi ekstrak rimpang *C. domestica* dengan dosis 390 mg/kg bb.

Cara Kerja

Pemeliharaan *M. Musculus*. *Mus musculus* diadaptasikan dengan lingkungan kandang selama 2 minggu. Pemeriksaan keteraturan siklus estrus *M. musculus* dilakukan selama masa adaptasi dengan cara ulasan vagina. Setiap kandang berisi 5 ekor *M. musculus* yang mewakili 5 perlakuan dan diambil secara acak. Makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum* (tidak terbatas). Kandang *M. musculus* berupa kandang yang terbuat dari jeruji besi dan dialasi dengan serutan kayu. Kandang dibersihkan 2 minggu sekali dengan cara dicuci dengan sabun. Kandang diletakkan pada rak di dalam laboratorium hewan percobaan Departemen Biologi FMIPA-UI. Suhu di dalam ruangan berkisar pada suhu ruang (27--28° C). Penerangan ruang laboratorium menggunakan lampu fluoresens 20 watt. Lamanya penerangan (*daylength*) diatur selama 12 jam dari jam 6.00 sampai jam 18.00 setiap hari. Pertukaran udara dalam ruangan dibantu dengan *exhaust fan* [7].

Ovariektomi. *Mus musculus* yang akan diovariektomi dianestesi terlebih dahulu dengan menggunakan eter. *Mus musculus* diletakkan pada papan bedah, menghadap ke samping dan rambut *M. musculus* dicukur pada bagian atas kaki belakang ($\pm 0,5$ cm di atas kaki dan 0,5 cm dari tulang belakang). Selanjutnya *M. musculus* dibedah pada satu sisi tubuh, dan ovarium diambil. Bekas luka dijahit secara aseptik hingga luka tertutup sempurna. Pembedahan dilanjutkan pada sisi tubuh yang lain [8].

Pembuatan simplisia dan ekstrak rimpang *C. Domestica*. Simplisia dan ekstrak rimpang *C. domestica* diperoleh dari Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO), Jl. Tentara Pelajar no. 3, Bogor.

Pembuatan suspensi ekstrak rimpang *C. Domestica*. Pembuatan suspensi ekstrak rimpang *C. domestica* dosis 230 mg/kg bb, 310 mg/kg bb, dan 390 mg/kg bb dilakukan dengan cara memasukkan 0,23 g; 0,31 g; dan 0,39 g ekstrak rimpang *C. domestica* ke dalam masing-masing labu ukur 100 ml. Setelah itu, akuades ditambahkan ke dalam masing-masing labu ukur 100 ml tersebut sampai tanda batas. Larutan tersebut kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer* tanpa pemanasan selama ± 10 menit sampai terbentuk suspensi.

Pembuatan suspensi hormon etinilestradiol. Pembuatan suspensi hormon etinilestradiol dilakukan dengan cara melarutkan 0,0084 g tablet Lynoral ke dalam 10 ml minyak zaitun (*olive oil*). Perhitungan dosis hormon etinilestradiol untuk *M. musculus* (mencit) dapat dilihat pada.

Pembedahan dan pembuatan preparat histologis. *Mus musculus* dikorbankan dengan cara dislokasi serviks, kemudian organ uterus, vagina, dan *mammae* diambil dengan menggunakan *dissecting set*. Tahap selanjutnya adalah pembuatan preparat histologis organ uterus, vagina, dan *mammae* yang didasarkan pada metode Suntoro (1983) yang dimodifikasi.

Teknik SDS-PAGE. Metode SDS-PAGE dilakukan berdasarkan metode Sambrook & Russel [9]. Perangkat elektroforesis disiapkan. Larutan *resolving gel* dimasukkan di antara celah *short plate* dan *spacer plate* hingga dua per tiga bagian. Isopropanol ditambahkan hingga batas atas kaca dan ditunggu sekitar 20 menit hingga terbentuk agar. Larutan *stacking gel* kemudian dimasukkan sampai batas atas kaca diikuti dengan pemasangan *comb* dan ditunggu sekitar 20 menit hingga terbentuk agar.

Gel cassette sandwich diletakkan pada *electrode assembly* dan dimasukkan ke dalam *clamping frame*. *Lower inner chamber* selanjutnya dimasukkan ke dalam elektroforesis *tank* dan diisi dengan *working solution*.

Sebanyak 3 μL *unstained protein marker* serta 10 μL sampel dari setiap perlakuan yang telah ditambah *loading dye* 6X sebanyak 2 μL , masing-masing dimasukkan ke dalam sumur. Sampel protein standar RE α rekombinan sebanyak 1 μL juga dimasukkan ke dalam sumur. *Running gel* dilakukan pada tegangan 150 V selama 55 menit. Gel kemudian diangkat dan direndam dalam *commassie blue* selama 15 menit. Gel lalu dibilas dengan *destain solution* selama 30 menit beberapa kali. Setelah pita protein terlihat, gel dimasukkan ke dalam *plastic bag*. Gel kemudian difoto dengan menggunakan *scanner*.

Pengambilan data. Setiap sediaan terdiri atas 10 sayatan untuk masing-masing organ vagina, uterus, dan *mammae* kemudian diamati di bawah mikroproyektor. Data tambahan diperoleh berupa diameter dan berat basah organ uterus.

Pengolahan dan analisis data. Semua data dimasukkan dalam tabel dan diolah dengan menggunakan program komputer *statistical product and service solutions (SPSS) Base 10.0 for Windows*. Uji normalitas Shapiro-Wilk digunakan untuk mengetahui normalitas distribusi data. Uji homogenitas Levene digunakan untuk mengetahui homogenitas variansi data [10]. Analisis data dilanjutkan dengan uji parametrik anava 1-faktor untuk mengetahui adanya pengaruh pencekokan ekstrak etanol 70% rimpang *C. Domestica* terhadap ketebalan epitel vagina, endometrium serta diameter duktus *mammae M. musculus*. Pengujian kemudian dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda LSD untuk mengetahui perbedaan antar pasangan perlakuan [11].

Hasil SDS-PAGE dianalisis secara kualitatif. Analisis kualitatif dilakukan dengan membandingkan pola pita protein dan ketebalan pita protein yang terbentuk antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Ada tidaknya protein reseptor estrogen α dalam sampel ditentukan dengan membandingkannya dengan pita protein standar RE α rekombinan. Berat molekul protein reseptor estrogen ditentukan dengan menentukan nilai mobilitas relatif protein. Menurut Speicher [12], nilai mobilitas protein reseptor estrogen diperoleh dari hasil bagi antara jarak migrasi protein dan jarak migrasi larutan. Jarak migrasi protein diukur dari mulai dari permukaan *separating gel* sampai pita protein, sedangkan jarak migrasi larutan merupakan panjang gelnya.

3. Hasil dan Pembahasan

Ketebalan endometrium. Hasil perhitungan terhadap data ketebalan endometrium menunjukkan bahwa rerata pada KP1, KP2, KP3, KK1 dan KK 2 berturut-turut adalah ($13,57 \pm 1,76$) μm ; ($24,14 \pm 2,33$) μm ; ($31,03 \pm 3,75$) μm ; ($9,85 \pm 1,04$) μm ; dan ($27,59 \pm 2,56$) μm (Gambar 1a). Hasil uji perbandingan berganda LSD ($\alpha = 0,05$) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata ketebalan endometrium antara KK1 dan KP2, KK1 dan KP3, KK2 dan KP1, serta KK1 dan KK2 (Gambar 2a--f).

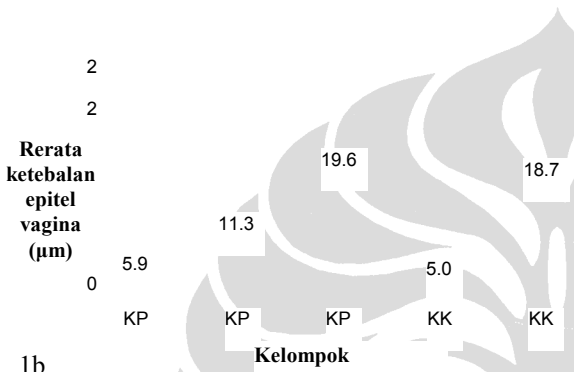
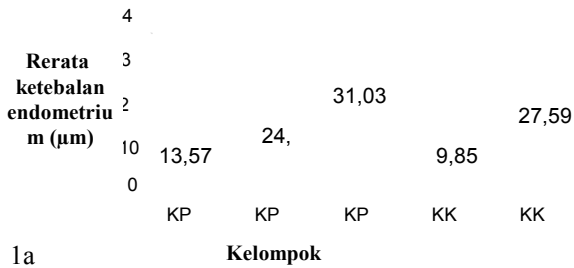
Diameter uterus. Hasil perhitungan terhadap data diameter uterus menunjukkan bahwa rerata pada KP1, KP2, KP3, KK1 dan KK2 berturut-turut adalah ($98,11 \pm 7,25$) μm ; ($114,65 \pm 6,67$) μm ; ($146,69 \pm 7,17$) μm ; ($65,36 \pm 4,27$); dan ($121,59 \pm 5,49$) μm . Hasil uji perbandingan berganda LSD ($\alpha = 0,05$) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata ketebalan endometrium antara KK1 dan KP1, KK1 dan KP2, KK1 dan KP3, serta KK1 dan KK2.

Berat basah uterus. Hasil perhitungan terhadap data berat basah uterus menunjukkan bahwa rerata pada KP1, KP2, KP3, KK1 dan KK 2 berturut-turut adalah ($47,49 \pm 23,672$) mg; ($67,70 \pm 11,13$) mg; ($118,22 \pm 71,80$) mg; ($35,12 \pm 25,97$) mg; dan ($106,02 \pm 84,92$) mg. Hasil uji parametrik anava 1-faktor ($\alpha = 0,05$) menunjukkan bahwa berat basah uterus *M. musculus* tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) antara KP1, KP2, KP3, KK1 dan KK2.

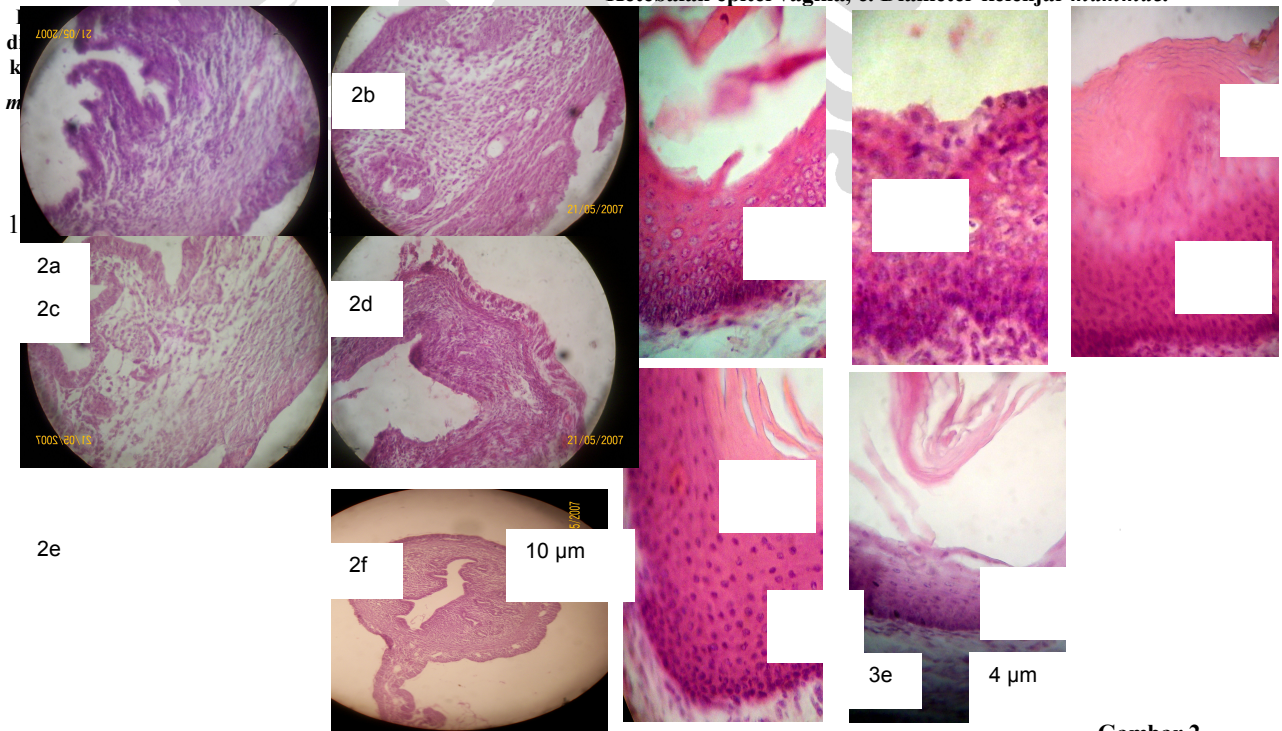
Ketebalan epitel vagina. Data rerata ketebalan epitel vagina *M. musculus* KP1, KP2, KP3, KK1, dan KK2 berturut-turut adalah ($5,91 \pm 0,65$) μm ; ($11,33 \pm 1,42$) μm ; ($19,60 \pm 1,50$) μm ; ($5,06 \pm 0,72$) μm ; dan ($18,75 \pm 1,90$) μm (Gambar 1b). Berdasarkan hasil uji LSD ($\alpha = 0,05$), menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara KK1 dan KP2 serta KP3, antara KK2 dan KP1 serta KP2, antara KP1 dan KP2 serta KP3, dan terdapat perbedaan antara KP2 dan KP3 (Gambar 3a--e).

Diameter duktus kelenjar mammae. Data rerata diameter duktus kelenjar *mammae M. musculus* KP1, KP2, KP3, KK1, dan KK2 berturut-turut adalah ($6,19 \pm 1,09$) μm ; ($8,73 \pm 1,44$) μm ; ($9,71 \pm 1,49$) μm ; ($6,19 \pm 1,07$) μm ; dan ($8,94 \pm 1,86$) μm (Gambar 1c). Berdasarkan hasil uji LSD ($\alpha = 0,05$), menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara KK1 dan KP2, KP3, serta KK2, antara KK2 dan KP1 serta KK1, antara KP1 dan KP2, KP3, serta KK2; dan terdapat perbedaan antara KP2 dan KP1 serta KK1 (Gambar 4a--e).

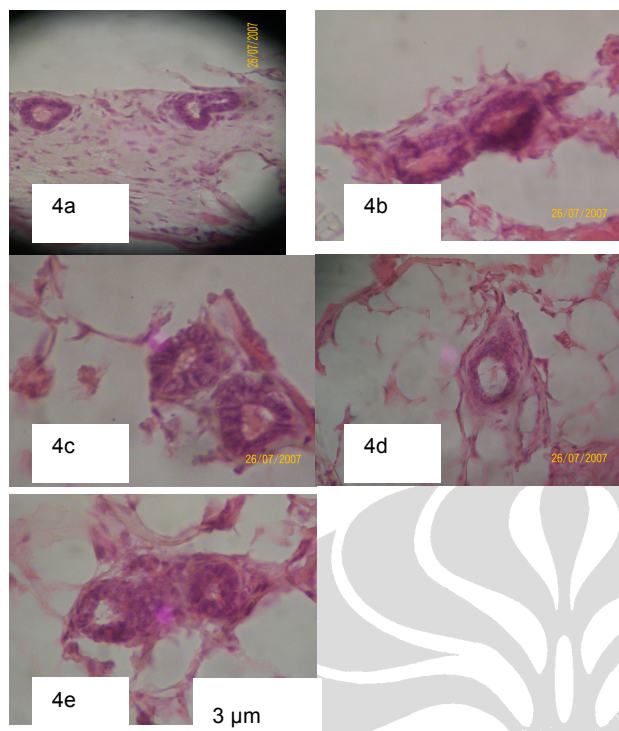
Analisis SDS-PAGE. Berdasarkan hasil SDS-PAGE, terdapat perbedaan pola pita protein dan intensitas warna pita protein antara sampel dari kelompok perlakuan dan kelompok kontrol positif serta kelompok



Gambar 1. Diagram rerata, a. Ketebalan endometrium, b. Ketebalan epitel vagina, c. Diameter kelenjar *mammae*.



Gambar 2. Histologis endometrium *M. musculus* yang diovariektomi, a. KP1, b. KP2, c. KP3, d. KK1, e. KK2, f. Periode estrus



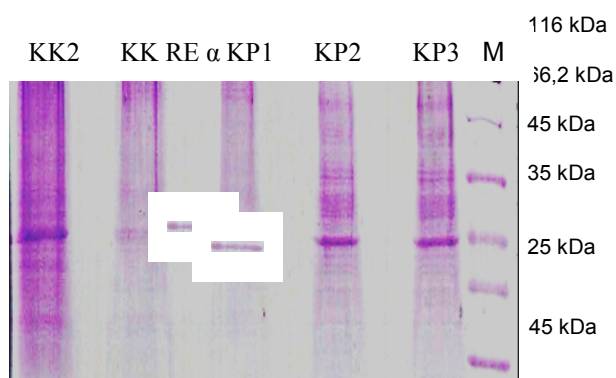
Gambar 4. Histologis duktus kelenjar *mammae M. musculus* yang diovariektomi, a. KP1, b. KP2, c. KP3, d. KK1, e. KK2.

kontrol negatif. Pola-pola pita protein pada KP1, KP2, dan KP3 terlihat lebih tipis apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (KK2). Namun, apabila dibandingkan dengan pola pita protein kelompok kontrol negatif, intensitas warna pita protein pada KP1, KP2, dan KP3 lebih tebal daripada pita protein yang terbentuk pada sampel KK1.

Protein rekombinan reseptor estrogen α mempunyai berat molekul sebesar 45 kDa. Reseptor estrogen α dengan berat molekul 45 kDa dapat ditemukan pada sampel uterus KP1, KP2, KP3, dan KK2. Pita protein dengan berat molekul 45 kDa dapat ditemukan pada kelompok KK1, namun sangat tipis (Gambar 5).

Hasil uji parametrik (anava 1-faktor) pada 25 organ uterus, vagina, dan *mammae M. musculus*, menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol 70% rimpang *C. domestica* berpengaruh secara nyata terhadap ketebalan endometrium uterus, ketebalan epitel vagina, dan diameter duktus kelenjar *mammae* dengan $\alpha = 0,05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak rimpang *C. domestica* dapat meningkatkan ketebalan endometrium dan diameter uterus, ketebalan epitel vagina, dan diameter duktus kelenjar *mammae M. musculus* yang diovariektomi secara bilateral.

Peningkatan ketebalan endometrium, ketebalan epitel vagina, dan diameter duktus kelenjar *mammae M. musculus* yang diovariektomi disebabkan oleh potensi



Keterangan:

M = *Unstained protein molecular weight marker*

KK2 = Kelompok kontrol positif

KK1 = Kelompok kontrol negatif

KP1 = Kelompok perlakuan 1

KP2 = Kelompok perlakuan 2

KP3 = Kelompok perlakuan 3

RE α = Protein rekombinan reseptor estrogen α

Gambar 5. Hasil SDS-PAGE ekstrak protein pada sampel uterus

estrogenik yang terdapat dalam rimpang *C. domestica*. Maligalig *dkk.* pada tahun 1994 [1], telah membuktikan bahwa rimpang *C. domestica* memiliki potensi estrogenik dan dapat meningkatkan kadar estrogen dalam darah. Selain itu, penelitian Ambiono [1] juga telah membuktikan bahwa infus rimpang *C. domestica* dapat meningkatkan produksi air susu induk *M. musculus*. Menurut Johnson & Everitt [13], hormon estrogen mampu menstimulasi pertumbuhan kelenjar *mammae* dan meningkatkan plasma prolaktin.

Potensi estrogenik rimpang *C. domestica* yang berasal dari kandungan senyawa fitosteroid berupa stigmasterol, sitosterol, dan kampesterol, dapat digunakan sebagai prekursor hormon seks steroid, salah satunya adalah estrogen. Hal tersebut disebabkan kemiripan struktur ketiga senyawa fitosteroid dengan kolesterol [2].

Efek estrogenik rimpang *C. domestica* terhadap epitel vagina dapat dilihat pada aktivitas mitogenik sel-sel epitel uterus, vagina, dan *mammae*. Aktivitas mitogenik tersebut berupa proliferasi maupun diferensiasi sel-sel epitel. Aktivitas mitogenik sel epitel dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung. Estrogen dapat berikatan langsung dengan RE α epitel ataupun secara tidak langsung dengan RE α stroma. Proliferasi yang terjadi pada sel-sel epitel endometrium uterus, epitel vagina, dan epitel duktus *mammae* terjadi secara tidak langsung yang dibantu oleh faktor parakrin yang dihasilkan sel stroma akibat induksi estrogen [14,15].

Faktor parakrin yang berperan memberikan sinyal untuk menginduksi proliferasi diduga berupa *growth factor* (GF). Berbagai macam GF yang diproduksi oleh sel stroma, salah satunya yaitu *epidermal growth factor* (EGF) yang diduga kuat berperan dalam proliferasi epitel endometrium, epitel vagina, dan duktus kelenjar *mammae*. Estrogen berikatan pada RE α stroma yang kemudian akan mengaktifkan faktor parakrin untuk menginduksi mitosis sel-sel epitel. Faktor parakrin berupa EGF akan teraktivasi oleh ikatan reseptor tirosin kinase yang terdapat pada epitel. Kompleks EGF dan reseptor tirosin kinase tersebut kemudian akan mengaktifkan protein-protein kinase yang terdapat dalam sitoplasma sel. Protein kinase yang teraktivasi diduga berupa *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) yang merupakan sinyal utama pengaktivasi transkripsi maupun translasi, sehingga terjadi sintesis protein [16]. Protein hasil sintesis tersebut diperlukan dalam proses mitosis pada sel-sel epitel. Mitosis yang terjadi pada setiap sel epitel kemudian akan menyebabkan epitel tersebut berproliferasi sampai batas optimum, dan dapat dilihat pada ketebalan epitel yang semakin meningkat.

Ketebalan lapisan epitel vagina kemungkinan juga dipengaruhi oleh adanya diferensiasi sel-sel epitel vagina. Diferensiasi merupakan perubahan struktural maupun fungsional sel menuju kematangan (*maturity*). Diferensiasi dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung melalui pengikatan estrogen pada masing-masing RE α yang terdapat pada sel stroma dan sel epitel. Mekanisme diferensiasi sel-sel epitel lebih rumit dan belum jelas sampai saat ini, namun

diketahui bahwa rangkaian peristiwa diferensiasi epitel vagina memerlukan proses proliferasi epitel terlebih dahulu [14,15]. Diferensiasi sel dapat dilihat dari perubahan sitologi sel epitel vagina, yaitu sel-sel parabasal menjadi sel superfisial pada lapisan epitel vagina. Hal tersebut yang kemudian menyebabkan keratinisasi pada lapisan bagian atas epitel vagina [14,17].

Berdasarkan hasil SDS-PAGE, terdapat perbedaan pola pita protein dan intensitas warna pita protein antara sampel dari kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Pola-pola pita protein pada KP1, KP2, dan KP3 terlihat lebih tipis apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (KK2). Namun, pola pita protein pada KP1, KP2, dan KP3 terlihat lebih tebal daripada pola-pola pita protein yang terbentuk pada sampel KK1. Pita-pita protein yang paling tebal ditemukan pada pita protein pada sampel KK2.

Menurut penelitian Weihua *dkk.* [18], ditemukan perbedaan antara pola pita protein dari uterus pada *M. musculus knock out* RE β yang diberi estradiol dan yang tidak diberi perlakuan dengan estradiol baik secara kualitatif maupun kuantitatif dengan menggunakan analisis SDS-PAGE. Sampel uterus *M. musculus knock out* RE β yang diberi estradiol menunjukkan pola-pola pita protein yang lebih banyak dan tebal, dibandingkan dengan yang tidak diberi estradiol.

Hasil SDS-PAGE tidak hanya dianalisis berdasarkan ketebalan pita protein yang terbentuk melainkan juga dilihat dari ada atau tidaknya RE α di dalam sampel. Hasil perhitungan berat molekul menunjukkan bahwa pita protein RE α rekombinan memiliki berat molekul 45 kDa. Pita protein dengan berat molekul 45 kDa dapat ditemukan pada sampel uterus KP1, KP2, KP3, dan KK2. Pita protein dengan berat molekul 45 kDa dapat ditemukan pada kelompok KK1 namun sangat tipis. Hasil tersebut menunjukkan bahwa sampel KP1, KP2, KP3, dan KK2 mendapatkan asupan estrogen sehingga RE α menjadi aktif. Aktifnya reseptor estrogen α dalam sampel KP1, KP2, dan KP3 dapat dibuktikan dengan pita protein RE α yang jelas terlihat. Sebaliknya, tipisnya pita RE α pada sampel KK1 kemungkinan disebabkan oleh protein RE α tidak aktif.

Menurut Nikov *dkk.* [19], dalam keadaan tidak adanya hormon estrogen, reseptor estrogen akan bersifat inaktif dan berada di dalam inti sel target dan berikatan dengan *heat shock protein* hsp90. Hormon estrogen yang masuk ke dalam sel target akan berikatan dengan reseptor estrogen (RE) yang berada di inti dan menyebabkan reseptor estrogen menjadi aktif. Kompleks estrogen-reseptor kemudian menuju inti dan akan berikatan dengan *estrogen responsive element* (ERE). Perlekatan kompleks estrogen-reseptor dengan *estrogen responsive element* akan menginduksi terjadinya transkripsi mRNA. mRNA kemudian akan ditranslasi menjadi protein yang akan menghasilkan respons estrogenik pada sel target.

Berdasarkan hasil SDS-PAGE, pita protein RE α pada sampel dengan berat molekul 45 kDa terlihat lebih tebal dan jelas apabila dibandingkan dengan pita-pita lain yang terbentuk. Menurut Alarid *dkk.* [20], pemberian hormon estrogen dapat menginduksi degradasi protein reseptor estrogen. Degradasi tersebut menyebabkan protein reseptor estrogen terpotong pada asam amino 140--170 pada daerah N terminal oleh *proteasome* dan akhirnya menghasilkan pita RE α dengan berat molekul 45 kDa. Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa pita 45 kDa yang terdapat pada sampel uterus pada KP1, KP2, dan KP3 kemungkinan disebabkan oleh pengaruh estrogenik yang terdapat di dalam ekstrak rimpang *C. domestica*.

Mekanisme aksi hormon estrogen yang menginduksi degradasi protein reseptor estrogen (RE) terjadi melalui jalur proteasomal. Jalur proteasomal melibatkan sejumlah enzim protease yang bertanggung jawab dalam pergantian sejumlah protein di dalam sel. Kebanyak-an protein tersebut adalah protein yang mengatur proses transkripsi [20].

Mekanisme jalur *proteasome* diawali dengan pengenalan substrat oleh *proteasome*. Pengenalan *proteasome* terhadap substrat memerlukan perlekatan *ubiquitin* terlebih dahulu terhadap protein target. *Ubiquitin* adalah protein sederhana yang terdiri atas 76 asam amino, yang terlibat dalam proses kerusakan protein. *Ubiquitin* akan melekat pada reseptor estrogen (RE), setelah itu *ubiquitin* akan mengaktifkan *ubiquitin activating enzymes* (UBA) dan *ubiquitin conjugating enzymes* (UBCs), yang akan memberi sinyal pada *proteasome* untuk mendegradasi protein reseptor estrogen. Protein reseptor estrogen akan terpecah menjadi peptida-peptida, dan akan menghasilkan pita RE dengan berat molekul 45 kDa [20].

Hasil SDS-PAGE menunjukkan ketebalan pita protein dengan berat molekul 45 kDa pada setiap kelompok perlakuan meningkat seiring dengan penambahan dosis ekstrak rimpang kunyit. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak rimpang kunyit dapat meningkatkan ketebalan pita protein reseptor estrogen (RE) α .

4. Kesimpulan dan Rekomendasi

Berdasarkan hasil penelitian terhadap *M. musculus* betina galur DDY yang diovariectomi dan diberi ekstrak rimpang *C. domestica* dosis 230 mg/kg bb, 310 mg/kg bb, dan 390 mg/kg bb selama 8 hari berturut-turut dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 70% rimpang *C. domestica* berpengaruh terhadap ketebalan endometrium, ketebalan epitel vagina, dan diameter duktus kelenjar *mammae*. Ekstrak rimpang *C. domestica* dosis 230 mg/kg bb, 310 mg/kg bb, dan 390 mg/kg bb berpengaruh terhadap ketebalan pita reseptor estrogen (RE) α . Pita reseptor estrogen (RE) α menunjukkan berat molekul 45 kDa.

Saran yang diajukan adalah perlu dilakukan penelitian efek estrogenik ekstrak rimpang *C. domestica* terhadap ketebalan endometrium, ketebalan epitel vagina, dan diameter kelenjar *mammae* *M. musculus* dengan dosis yang optimum. Selain itu, perlu dilakukan pengukuran konsentrasi reseptor estrogen (RE) α dengan menggunakan teknik *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), dan uji keamanan dari ekstrak etanol 70% rimpang *C. domestica*.

Daftar Acuan

- [1] L. Ambiono, Skripsi S-1 Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok, 2002.
- [2] M. Ismadi, S.D. Ismadi, In: R. Montgomery, R.L. Dryer, T.W. Conway, A.A. Spector, *Biochemistry: A case-oriented approach*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 1993, p.1377.
- [3] H.Wang, B. Masironi, H. Eriksson, L.Sahlin, *Biology of Reproduction* (1999) 955-964.
- [4] M.K. Lindberg, Z. Weihua, Andersson, S. Moverare, H. Gao, O. Vidal, M. Erlandsson, S. Windahl, G. Andersson, D.B. Lubahn, H. Carlslen, K. Dalma Wright, J.A. Guftasson, C. Ohlsson. *Endocrinology* (2002) 174:167-178.
- [5] K. Agustini, W. Sumali, D. Kusmana, *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2 (2) (2005) 74-83.
- [6] K.A. Hanafiah, *Rancangan percobaan: Teori dan aplikasi*. Ed. ke-2, PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta, 1997, p. 238.
- [7] Harmita, M. Radji. *Buku ajar analisis hayati*. Departemen Farmasi, FMIPA-UI, Depok, 2004.
- [8] B. Hogan, R. Beddington, F. Constanitini, E. Lacy, *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994, p.273-274.
- [9] J. Sambrook, D.W. Russell. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed., Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- [10] S. Santoso, *SPSS versi 10: Mengolah data statistik secara profesional*. PT. Media Elex Komputindo, Jakarta, 2003.
- [11] Djarwanto, *Mengenal beberapa uji statistik dalam penelitian*, Liberti, Yogyakarta, 2000.
- [12] D.W. Speicher, In: J.E.Coligan, B.M. Dun, H.L. Ploegh, D.W. Speicher, P.T. Wingfield (Eds.), *Current protocol in protein science*. Volume 1. John Willey & Sons, Inc., USA, 1997.
- [13] H.M. Johnson, B.J. Everitt, *Essential reproduction*, 5th ed., Blackwell Scientific Ltd., London, 2000.
- [14] D.L. Buchanan, T. Kurita, J.A. Taylor, D.B. Lubahn, G.R. Cunha, P.S. Cooke, *Endocrinology* 139 (10) (1998) 4345-4352.
- [15] P.S. Cooke, D.L. Buchanan, D.B. Lubahn, G.R. Cunha, *Biology of Reproduction* 59(1) (1998) 470-475.
- [16] R. Clarke, F. Leonessa, J.N. Welch, T.C. Skaar, *Pharmacological Reviews* 53(1) (2001) 25-71.
- [17] T.J.M. Daly, B. Kramer, *Journal of Anatomy* 193 (1998) 467-472.
- [18] Z. Weihua, S. Soji, S. Makinen, G. Cheng, E.V. Jensen, M. Warner, J. A. Guftasson, *Estrogen receptor β , a modulator of estrogen receptor α in the uterus* PNAS 97, 2000, p.5936-5941.
- [19] G.N. Nikov, N.E. Hopkins, S. Boue, W.L. Alworth, *Environmental Health Perspectives* 108(9) (2000) 1-9.
- [20] E.T. Alarid, N. Bakopoulos, N. Solodin, *Molecular Endocrinology* 13 (1999) 1522-1534.