

EKSPRESI CYCLOOXYGENASE (COX-2) AKIBAT PEMBERIAN KURKUMIN
PADA *RATTUS NORVEGICUS* STRAIN *SPRAGUE DAWLEY* SETELAH
MENDAPAT STIMULASI LUTEINIZING HORMON

Ery Purwanti ¹, Sri Kadarsih S ², Djaswadi Dasuki ³

¹Stikes Muhammadiyah Gombong

^{2, 3} Pasca Sarjana Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis, Fakultas Kedokteran
UGM

ABSTRAK

Kurkumin merupakan bahan alam yang mempunyai berbagai aktivitas biologis, diantaranya sebagai antifertilitas. Belum ada penelitian tentang efek kurkumin khususnya yang berkaitan dengan stimulasi LH di endometrium. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui ekspresi enzim COX-2 pada sel epitel luminal dan epitel glandular uterus, akibat pemberian kurkumin setelah stimulasi LH.

Dilakukan penelitian dengan rancangan eksperimental *post-test control randomized group design* terhadap 30 ekor tikus *Rattus norvegicus* Strain *Sprague Dawley* betina, berusia 28 hari, dibagi menjadi 6 kelompok, diinduksi ovulasi dengan PMSG, kemudian diberi perlakuan sebagai berikut : (K1) aquades, (K2) LH 10 IU + aquades, (K3) CMC 1 ml, (K4) LH 10 IU + CMC 1ml , (K5) kurkumin 100mg/kg BB + CMC 1 ml dan K6) LH 10 IU + kurkumin 100 mg/kg BB + CMC 1 ml. Kurkumin diberikan secara oral selama 4 hari dan LH diberikan dengan injeksi intramuscular satu kali pada hari pertama ovulasi. Hari ke 5 tikus dikorbankan untuk diambil uterusnya dan dibuat preparat IHC untuk pengukuran ekspresi COX-2

Analisis statistik menggunakan Anova satu jalan, dilanjutkan dengan DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*). Untuk mengetahui perlakuan yang berpengaruh menggunakan *multiple comparison analysis*. Analisis statistik ekspresi COX-2 menunjukkan peningkatan yang bermakna antara kelompok K5 dengan kelompok K6 ($p < 0,05$). Penurunan yang bermakna ($p < 0,05$) ditunjukkan antara kelompok K4 dengan kelompok K6. Hasil analisis *multiple comparison* menunjukkan yang berpengaruh terhadap ekspresi COX-2 di epitel luminal adalah LH, kurkumin, kurkumin + LH dan di epitel glandular, LH dan kurkumin. Dari hasil tersebut disimpulkan bahwa kurkumin 100 mg/kg BB setelah stimulasi LH 10 IU menurunkan ekspresi COX-2 baik di epitel luminal maupun epitel glandular uterus *Rattus norvegicus* Strain *Sprague Dawley*. melalui salah satu jalur dari jalur rangsangan LH

Kata kunci : Siklooksigenase, Kurkumin, Luteinizing Hormon

PENDAHULUAN

Cyclooxygenase (COX) merupakan enzim yang berperan terhadap sintesis prostaglandin. Enzim tersebut akan mengkatalisis

perubahan asam arakhidonat menjadi bentuk endoperoksid yaitu PGH_2 yang kemudian dikonversikan menjadi prostaglandin. (Kelly, *et al.*, 2001). Salah satu hormon yang

mengatur COX-2 dan sintesis prostanooid pada saluran reproduksi seperti endometrium, miometrium, cervik dan vena uterus adalah LH (*Luteinizing hormone*). Mekanisme aksi ini mirip dengan mekanisme aksi yang terjadi di ovarium dan testis yaitu mengaktifkan *second messenger* melalui jalur pengikatan protein G (Shemesh *et al.*, 2000). Dari penelitian yang dilakukan Shemesh *et al.* (2000) diketahui bahwa pada sapi aktivitas LH di endometrium mencapai maksimal selama fase luteal. Pada fase tersebut, induksi LH dengan dosis 20 ng/ml meningkatkan produksi cAMP sebesar 2,5 kali lipat. Berbeda pada jaringan dengan fase proestrus-estrus dan postovulatory yang menunjukkan kondisi kurang *responsive*.

Menurut Mizrachi dan Shemesh (1999a), LH akan menginduksi secara cepat produksi cAMP di endometrium dan *Inositol Phosphat* (IP1, IP2 dan IP3). Peningkatan sejumlah cAMP tersebut berhubungan dengan peningkatan konsentrasi COX-2 dan metabolitnya yaitu PGF di endometrium (Rodrigues dan Segaloff, 1990). Ekspresi COX-2 pada manusia selama fase luteal ditemukan pada epitel luminal dan sel-sel perivascular (Marion & Danielson, 1999). Parent *et al.* (2003) menyatakan bahwa lokasi COX-2 pada biri-biri saat fase estrus, pada sel-sel epitel luminal uterus dan epitel glandular. Kekurangan COX-2 pada tikus menunjukkan kelainan pada fungsi reproduksi termasuk ovulasi, fertilisasi, implantasi dan desidualisasi melalui peran prostaglandin selama proses tersebut (Dubois *et al.*, 1998). Dari penelitian yang dilakukan Shemes *et*

al (2000) diketahui bahwa LH meningkatkan ekspresi COX pada semua jaringan hewan coba yang diuji, tetapi terdapat perbedaan prostanooid yang dihasilkan. Prostaglandin E₂ merupakan produk yang paling banyak dihasilkan di cervik dengan adanya stimulasi LH dan Oxytocin. Sedangkan pada endometrium, produk yang paling banyak dihasilkan adalah PGF_{2α}. Sel-sel epitel terutama menghasilkan PGF_{2α} dan sel-sel stroma terutama menghasilkan PGE₂ (Parent *et al.*, 2003).

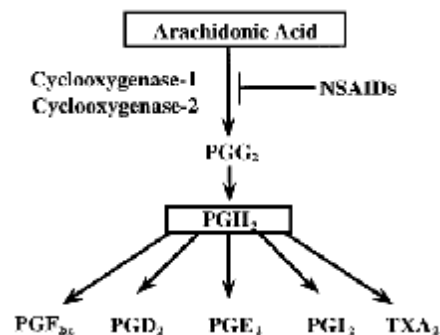
Kurkumin merupakan bahan alam yang diekstraksi dari risoma tanaman *Curcuma xanthorrhiza*, Roxb (temulawak) maupun *Curcuma longa*, Val (kunyit), mempunyai aktivitas biologis dan banyak digunakan sebagai obat tradisional (jamu) seperti mengatur siklus menstruasi dan menjarangkan siklus kehamilan, khususnya masyarakat Madura (Jordan, 1995; Meiyanto, 1999; Nurcahyo, 2004). Struktur dan reseptor kurkumin mempunyai kemiripan dengan struktur dan reseptor protaglandin, sehingga kurkumin mempunyai efek sebagai penghambat enzim COX (Mukhopadhyay *et al.*, 1982). Seperti dilaporkan oleh Huang *et al.*, (1991) bahwa sintesis prostaglandin dihambat oleh kurkumin melalui penghambatan COX. Peneliti lain menyatakan bahwa kurkumin merupakan inhibitor spesifik untuk COX-2 (Meiyanto, 1999). Sehubungan dengan hal tersebut peneliti ingin mengetahui bagaimana efek pemberian kurkumin setelah pemberian LH pada ekspresi COX-2 di sel epitel luminal dan epitel glandular uterus dari *Rattus norvegicus strain Sprague Dawley*.

TINJAUAN PUSTAKA

A. Enzim COX

Cyclooxygenase (COX) merupakan enzim yang bertanggungjawab terhadap sintesa prostaglandin. Enzim tersebut merupakan enzim kunci dalam

metabolisme asam arakhidonat menjadi prostaglandin (PG) G₂ dan PGH₂ yang selanjutnya akan dikonversikan menjadi PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ dan TXA₂ (Dubois *et al.*, 1998) (Gambar 1)



Gambar 1 . Mekanisme perubahan asam arakhidonat menjadi prostaglandin dan eicosanoid yang lain (Dubois *et al.*, 1998).

Enzim COX terdapat dalam bentuk 2 isoform yaitu bentuk *constitutive* (COX-1) dan bentuk *inducible* (COX-2). Dari penelitian terhadap hewan percobaan, didapatkan data bahwa COX-1 diatur oleh hormon-hormon steroid, sedang COX-2 dipicu oleh berbagai stimulus, dan pada proses implantasi memerlukan kehadiran blastosis aktif (Marion dan Danielson, 1999). Secara umum COX-1 berperan dalam berbagai fungsi fisiologis untuk mempertahankan homeostasis sedangkan COX-2 bersifat *inducible*. Selanjutnya diketahui bahwa COX-2 berperan penting dalam fungsi reproduksi termasuk proses ovulasi, fertilisasi, implantasi dan desidualisasi Sales dan Jabbour (2003) dan prostaglandin yang dihasilkan juga berperan dalam

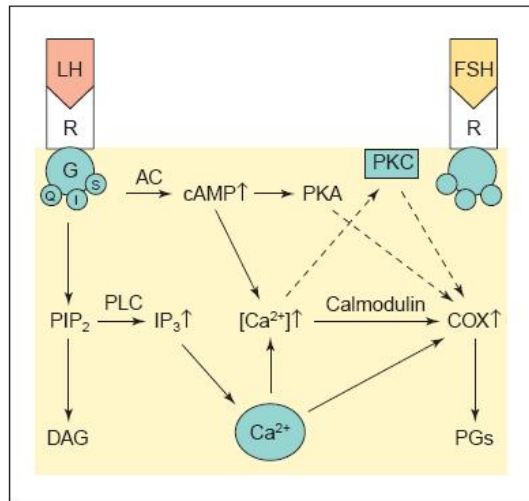
kontraksi otot-otot uterus (miometrium) pada saat proses persalinan (Dubois, 1998).

Enzim PG endoperoxidase H synthase (PGHS)-2 yang lebih dikenal dengan COX-2 memegang peranan utama dalam produksi prostaglandin di endometrium. Cyclooxygenase-2 bertanggung jawab terhadap perubahan asam arakhidonat menjadi bentuk endoperoksid yang merupakan prekursor utama dari berbagai bentuk prostaglandin termasuk PGF_{2α} dan PGE₂.

PG endoperoxidase H synthase (PGHS)-2 (COX-2) diatur oleh Luteinizing hormone (LH) pada semua jaringan uterus (endometrium, miometrium, cervik dan oviduk). Pada saluran reproduksi tersebut LH mengatur COX-2 dengan jalan mengaktifkan inositol fosfat (IP)

dan adenilat siklase (AC) (Shemesh dan Field, 2004). Mekanisme aksi yang terjadi pada jaringan uterus sama dengan mekanisme aksi yang terjadi di ovarium dan testis, yaitu

mengaktifkan *second messenger* melalui jalur pengikatan protein G. Mekanisme LH merangsang peningkatan ekspresi COX-2 di endometrium disajikan pada gambar 2.



Gambar 2 . Mekanisme LH merangsang peningkatan ekspresi COX-2 di endometrium (Shemesh, 2001)

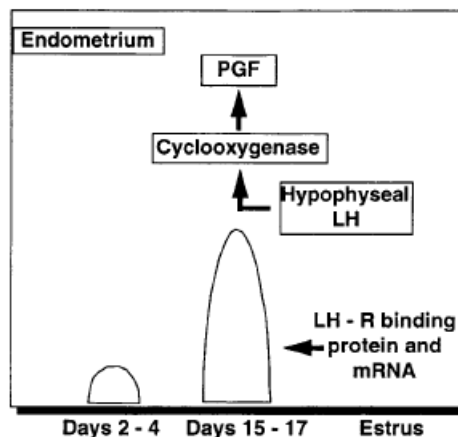
Pengaktifan *adenilat siklase* (AC) dan *phospholipase* (PL) terjadi setelah pengikatan LH yang mengakibatkan stimulasi protein G di membran. Reseptor gonadotropin terutama berinteraksi dengan Gs dan dapat berubah-ubah ikatannya dengan Gq dan Gi. Pengaktifan dari PLC merupakan tahap awal dari jalur *phosphoinositide* yang menghasilkan *second messengers diacylglycerol* (DAG) dan *inositol triphosphat* (IP₃). Ikatan antara IP₃ dengan reseptor di retikulum endoplasma merangsang pelepasan Ca²⁺ bebas dari tempatnya di retikulum endoplasma, sehingga meningkatkan konsentrasi Ca²⁺ intraseluler. Peningkatan jumlah Ca²⁺ yang bebas dapat mengikat protein pengatur seperti calmodulin. Ikatan antara Ca²⁺ dengan

calmodulin dapat mempengaruhi berbagai enzim dan mungkin meningkatkan atau menekan aktivitasnya, sebagai contoh COX-2 dan produksi dari prostaglandin. Peningkatan Ca²⁺ bersama-sama dengan DAG juga diperlukan untuk mengaktifkan protein kinase C (PKC) meningkatkan prostaglandin. Pengaktifan AC akan meningkatkan cyclic adenosin mono fosfat (cAMP) yang akan mengaktifkan protein kinase A (PKA) dan merangsang pelepasan Ca²⁺ yang akan mengikat calmodulin. Protein kinase A dan ikatan antara Ca²⁺ dengan calmodulin secara bebas atau bersama-sama mendukung peningkatan COX-2 (Shemesh, 2001).

Luteinizing Hormon meningkatkan produksi PGF_{2α} di

jaringan ovarium dan merangsang produksi $\text{PGF}_{2\alpha}$ oleh sel-sel endometrium pada hari ke 15-17 (siklus estrus sapi 20 hari) (Shemesh *et al.*, 2000). Hal tersebut menunjukkan bahwa ada faktor intraseluler yang mungkin berperan dalam pengaturan siklus

estrus pada hewan-hewan memamah biak dan implantasi pada wanita. Terdapat hubungan langsung sementara antara peningkatan konsentrasi dari reseptor LH, induksi COX-2 dan produksi $\text{PGF}_{2\alpha}$ dalam sel-sel epitel endometrium (Shemesh, *et al.*, 2000).



Gambar 3. Kapasitas ikatan LH pada fase siklus estrus di endometrium (Shemesh *et al.*, 2000)

Peningkatan kapasitas ikatan LH mungkin berhubungan dengan dengan peningkatan produksi prostaglandin. Luteinizing hormon menyebabkan COX-2 endometrium meningkat secara invitro pada hari ke 2-4 dan 15-17 siklus estrus (Siklus estrus sapi 20 hari) (gambar 2). Meskipun LH meningkatkan COX-2 pada semua jaringan yang diuji pada penelitian yang dilakukan oleh Shemesh, *et al.*, (2000), tetapi terdapat perbedaan prostanoid yang dihasilkan. Prostanoid yang paling banyak dihasilkan pada cervix karena adanya stimulai LH dan oxytocin adalah PGE_2 , sedangkan di endometrium adalah $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Aktivitas COX-2 meningkat tajam pada pertengahan siklus menstruasi karena adanya lonjakan LH. Pelepasan prostaglandin sebagai

produk enzim ini oleh ekspresi COX-2 pada manusia selama fase luteal ditemukan pada epitelium luminal dan sel-sel perivascular (Marion dan Danielson, 1999).

B. Kurkumin

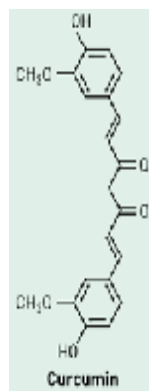
Kurkumin dikenal sebagai bahan alami yang memiliki aktifitas biologis yang terdapat pada rimpang kunyit (*Curcuma longa*) dan temulawak (*Curcuma xanthoriza Roxb*). Di Asia kurkumin banyak digunakan sebagai obat tradisional, di India digunakan untuk pengobatan berbagai macam penyakit seperti gangguan ductus biliaris, anoreksia, influenza, gangguan hepar, reumatik dan sinusitis. Di Cina dan Thailand kurkumin digunakan untuk pengobatan Acne vulgaris, abdominal

pain dan ikterus (Goot, 1995). Selain itu kurkumin juga banyak digunakan sebagai bahan tambahan makanan sebagai bumbu atau obat-obatan, sebagai jamu untuk mencegah dan pengobatan berbagai penyakit setelah melahirkan, saat datang menstruasi dan untuk mengatur kesuburan (antifertilitas) (1985 dan Soewito, 1988 cit Nurcahyo H & Soejono, 2001).

Kurkumin mempunyai sifat sebagai antioksidan (Pulla Reddy dan Lokesh, 1994; Unnikhrisnan dan Rao, 1995), antiinflamasi (Ghatak dan Basu, 1972; Srimal dan Dhawan, 1973; Mukhopadhahyay *et al*, 1982; Huang *et al*, 1992) dan anti neoplastik (Nakamura *et al.*, 1998; Dinkovakostova dan Talalay, 1999; Anto *et al*, 2002). Akhir-akhir ini dilaporkan bahwa Kurkumin juga mempunyai efek merangsang proses apoptosis yaitu proses kematian sel dalam rangka mempertahankan integritas tubuh secara keseluruhan dan meningkatkan aktifitas

apoptosis pada kultur sel granulosa berbagai ukuran folikel ovarium (Meiyanto, 1999; Nurcahyo, 2003).

Struktur kimia kurkumin (*diferuloylmethane*) yang merupakan konstituen terbesar dan terpenting dari risoma tanaman, ditemukan oleh Roughley dan Whiting (1973). Kurkumin akan mencair pada suhu 176-177°C dan membentuk garam merah kecoklatan dengan alkalis. Kurkumin larut dalam etanol, alkalis, keton, asam asetat dan kloroform, tetapi tidak larut dalam air. Rantai utama kurkumin berupa alifatik, tidak tersaturasi dan gugus aril dapat digantikan (Araujo dan Leon, 2001) Kurkumin memiliki gugus fungsional yang berperan sebagai sisi aktif sebagai berikut : 1. gugus sentral β diketon yang mengandung gugus metilen aktif, 2. ikatan rangkap pada rantai alifatik, 3. gugus hidroksil dalam kedudukan meta pada cincin terminal aromatik. Gambar 5



Gambar 4. Struktur kimia Kurkumin

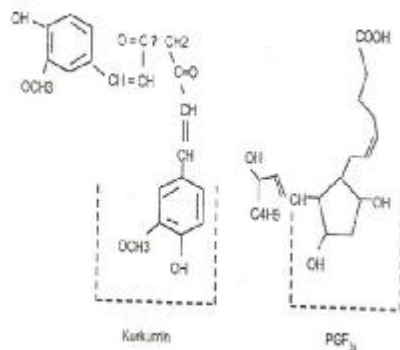
Dengan adanya gugus fungsional yang berbeda-beda itu menyebabkan kurkumin mempunyai banyak aktifitas biologis. Gugus hidroksil kurkumin bertanggung jawab terhadap aktifitas biologis

kurkumin sebagai antiinflamasi, antikanker dan anti mutagenic (Majeed *et al.*, 1995). Adanya gugus fenol dan hidroksil dikaitkan dengan aktifitas biologis kurkumin sebagai antiinflamasi untuk menghambat

pembentukan prostaglandin dan leukotrien (Kiuchi *et al.*, 1992; Iwakami *et al.*, 1986). Kurkumin juga memiliki aktifitas biologi sebagai penangkap radikal bebas (Venkatesan dan Rao, 2000), penghambat aktifitas enzim COX-2 dan *Lipoxygenase* (LOX) (Huang *et al.*, 1991), penghambat aktifitas protein kinase (Simon dkk, 1998), penghambat sintesa molekul-molekul protein regulator pada inti sel (Lin *et al.*, 2000) dan mencegah tumorigenesis, mutagenesis, memblok pembentukan DNA karsinogen dan menghambat angiogenesis (Dinkova Kostova dan Talalay, 1999).

Sebagai bahan antiinflamasi kurkumin mempunyai aktifitas yang sama dengan obat-obat non steroid seperti indometacin dan fenilbutazon karena ketiganya mempunyai gugus

yang mirip yaitu terdapat gugus keton (ikatan rangkap), gugus hidroksil dan cincin aromatic. Selain itu juga mempunyai kemiripan antara struktur dan reseptor kurkumin dengan struktur dan reseptor prostaglandin sehingga kurkumin mempunyai efek sebagai penghambat enzim COX (Mukhopadhyay *et al.*, 1982) Persamaan antara kurkumin dan prostaglandin disajikan pada gambar 6. Menurut Hasmeda dan Polya (1996) kurkumin bersifat sebagai inhibitor PLC/PKC dan c AMP/PKA. Sebagai antifertilitas, ekstrak kurkumin dengan *ether petrolium* dan *aqueos* pada doses 200 mg/kg BB yang diberikan secara oral pada tikus betina akan menyebabkan timbulnya anovulasi dan menghambat proses implantasi (Garg, 1978).



Gambar 5. Persamaan Struktur Kimia Kurkumin dan Prostaglandi (Mukhopadhyay *et al.*, 1982)

C. Fisiologi reproduksi *Rattus norvegicus* strain *Sprague Dawley*

Pemakaian tikus laboratorium untuk percobaan di lingkungan UGM memiliki beberapa keuntungan

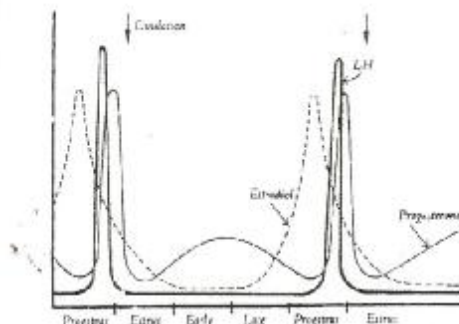
antara lain relative lebih mudah diperoleh dan murah dibandingkan dengan menggunakan hewan lain. Tikus laboratorium lebih cepat dewasa, masa pubertas muncul saat berusia 50-60 hari; sumber lain

menyebutkan bahwa pubertas muncul pada umur 28 hari (Inglis, 1980), tidak memperlihatkan perkawinan musiman, sehingga kemampuan reproduksi tinggi. Jarak antara anus dan papilla genitalia digunakan sebagai patokan menentukan jenis kelamin. Jarak ini relatif lebih lebar pada tikus jantan dibandingkan dengan tikus betina. Berat tikus betina dewasa berkisar 150-250 gram (Smith dan Mangkoewidjojo, 1987). Keuntungan lain dari penggunaan tikus sebagai hewan coba karena tikus tidak mudah muntah karena struktur anatomi yang tidak biasa di tempat oesophagus bermuara ke dalam lambung dan tidak mempunyai empedu (Febrianita, 2008). Dengan kondisi yang demikian sangat menguntungkan karena pemberian zat perlakuan per oral dapat terkontrol.

Siklus reproduksi tikus betina dikenal dengan istilah estrus (gambar 7). Pada kondisi ini tikus betina aktif secara seksual dan dapat kawin serta siap menerima pembuahan. Estrus biasanya akan berlangsung selama 4-5 hari. Periode

tersebut terjadi selama 9-10 jam, lebih sering pada waktu malam hari dibandingkan siang hari (Febrianita, 2008). Menurut Inglis (1980) masa luteal kurang lebih 10-13 hari. Siklus estrus dibagi menjadi empat periode yang definisinya tergantung pada pemeriksaan apusan vagina yang berkorelasi dengan perubahan ovarium dan uterus .

- a. Stadium I (Proestrus) :
 Pada apusan vagina tampak predominasi sel-sel epitel yang berinti, pada uterus terjadi peningkatan cairan
- b. Stadium II (Estrus) :
 Pada apusan vagina tampak sel-sel kornifikasi yang tidak berinti, pada uterus terjadi distensi cairan maksimal, mulai terjadi regresi.
- c. Stadium III (Metestrus):
 tampak proporsi yang seimbang antara sel-sel leukosit, kornifikasi dan epitel , pada uterus terjadi degenerasi epitel.
- d. Stadium IV (Diestrus) :
 tampak predominansi sel-sel leukosit, uterus mulai beregenerasi (Marcondes, 2002).



Gambar 6. Siklus Estrus pada *Rattus (nn)*

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Tiga puluh ekor tikus putih *Rattus*

norvegicus strain *Sprague Dawley* betina umur 28 hari hasil biakan LPPT-UGM. Kurkumin hasil sintesis

Molnas Fakultas Farmasi UGM, PMSG 10 IU dari Sigma , St. Louis, MO, USA. Luteinizing hormon 10 IU dari Sigma-Aldrich, Inc. L 5259 dan CMC 1 mL .

Persiapan hewan coba

Rattus norvegicus strain *Sprague Dawley* betina umur 28 hari diundi untuk mendapatkan nomor urut dan dikelompokkan dalam 6 kelompok, dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 hewan coba. Jumlah tersebut ditentukan dengan Rumus Federer, yaitu : $(t - 1)(r - 1) \geq 15$. Dalam hal ini t adalah jumlah perlakuan, r adalah jumlah ulangan (Federer, 1955).

Pengambilan subyek penelitian

Hewan coba yang sudah dikelompokkan disuntik dengan suntikan tunggal 10 IU PMSG untuk menyeragamkan fase estrus. Suntikan dilakukan ketika umur hewan coba 28 hari, dan ovulasi akan terjadi pada saat umur hewan coba 30 hari. Hewan coba yang sudah estrus, ditentukan dengan menggunakan vaginal smear.. Kelompok K 2 s/d K 6 diberi perlakuan mulai hari pertama estrus sampai hari ke empat. Luteinizing hormon diberikan dalam dosis tunggal 10 IU, pada hari pertama estrus (umur hewan coba 30 hari). Pengambilan sampel uterus tikus dilakukan pada hari ke lima fase estrus, ketika umur hewan coba 34 hari

Pemberian zat-zat perlakuan

Untuk membuat suspensi zat perlakuan (kurkumin), digunakan CMC. Perlakuan dengan dilakukan secara oral dengan frekuensi pemberian dua kali sehari selama empat hari dengan dosis CMC dan kurkumin seperti yang dilakukan

oleh Adiyanti (2005), sedangkan pemberian LH dilakukan secara injeksi intramuskular dengan dosis 10 IU. Dosis LH sesuai dengan yang dilakukan Gomez *et al.* (2004).

1. K 1 : tanpa perlakuan (aquades)
2. K 2 : mendapat LH 10 IU
3. K 3 : mendapat larutan CMC 1 ml
4. K 4 : mendapat LH 10 IU + larutan CMC 1 ml
5. K 5 : mendapat Kurkumin 100 mg/kg BB + larutan CMC 1 ml
6. K 6 : mendapat LH 10 IU + Kurkumin 100 mg/kg BB + larutan CMC 1 ml

Kelompok K3 merupakan perbandingan untuk kelompok K5 dan kelompok K4 merupakan perbandingan untuk kelompok K6.

Pengamatan dan Pengukuran Data

Semua hewan coba dikorbankan pada hari ke lima fase estrus atau umur tikus 34 hari. Hewan coba diberi eter terlebih dahulu, setelah tidak bergerak segera dilakukan laparostomi untuk diambil uterusnya. Uterus diambil dengan cara dipotong pada daerah pangkal pertemuan kedua uterus, kemudian dibersihkan dari jaringan penggantung uterus dan lemak yang menempel, dan dicuci dengan garam fisiologis. Setelah itu dimasukkan dalam buffer formalin 10% , selanjutnya digunakan untuk pembuatan sediaan mikroskopis (IHC)

Untuk mengetahui ekspresi COX-2 dilakukan pengamatan preparat dengan menggunakan mikroskop fase kontras yang dihubungkan dengan layar monitor. Sel-sel endometrium yang mengekspresikan COX-2 menunjukkan warna coklat . Warna coklat timbul karena adanya

reaksi antara kromogen DAB (Diaminobenzidene) dengan antibodi label (antibodi sekunder). Setiap hewan coba dihitung sel-sel yang mengekspresikan COX-2 kemudian dibandingkan dengan jumlah seluruh sel.

Analisis Data

Perbedaan kepadatan ekspresi COX-2 antar kelompok perlakuan, dianalisis statistik dengan Analisa

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekspresi COX-2 pada epitelium luminal uterus dan epitel glandular uterus

Penghitungan dan pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop fase kontras dan penghitungan ekspresi COX-2 dilakukan secara manual. Sel-sel yang terekspresi COX-2 berwarna coklat dan yang tidak

Varian (ANOVA) satu arah untuk menguji hipotesis. Untuk mengetahui signifikansi antar kelompok perlakuan menggunakan DMRT (Duncan's Multiple Range Test) dengan nilai $p < 0.05$ dan untuk mengetahui zat yang paling berpengaruh pada variabel terikat dianalisis dengan menggunakan univariate analisis of variance (multiple comparison analysis)

terekspresi COX-2 berwarna biru. Dari hasil pengamatan, COX-2 terekspresi pada sel-sel epitel lumen uterus dan sel-sel epitel glandular pada endometrium. Rerata (Mean \pm SD) ekspresi COX-2 di sel epitel luminal endometrium uterus disajikan pada table 1 dan ekspresi COX-2 di epitel glandular uterus disajikan pada tabel 2.

Tabel 1. Rerata (Mean \pm SD) ekspresi COX-2 di epitel luminal endometrium uterus *Rattus norvegicus* strain Sprague dawley akibat pemberian kurkumin 100 mg/kg BB setelah mendapat stimulasi LH 10 IU pada *Multivariate analysis One way anova*

NO	PERLAKUAN	MEAN \pm SD			
1	Aquades LH +	41,66	\pm	0,27952	b
2	Aquades	90,65	\pm	1,50824	d
3	CMC	40,80	\pm	3,07890	b
4	LH + CMC	89,66	\pm	1,50902	d
5	Kurkumin + CMC LH +	8,79	\pm	12,2302	a
6	Kurkumin + CMC	81,72	\pm	7,39760	c

Huruf yang berbeda di atas angka menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$)

Berdasarkan hasil analisis statistik menggunakan Anova satu jalan yang dilanjutkan dengan DMRT, diketahui peningkatan secara bermakna ($P < 0,05$) pada kelompok hewan coba yang diberi perlakuan kurkumin + CMC setelah di stimulasi LH (K6) jika dibandingkan dengan kelompok hewan coba yang diberi kurkumin + CMC (K5). Hal ini menunjukkan bahwa LH dapat merangsang peningkatan ekspresi COX-2 sesuai yang dikemukakan oleh Shemesh *et al.*, (2000) bahwa LH dapat meningkatkan ekspresi COX-2 di endometrium sampai dua kali lipat. Berdasarkan hasil multiple

comparation diketahui bahwa LH memberikan hasil yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap peningkatan ekspresi COX-2 di sel-sel epitel luminal endometrium uterus maupun sel-sel epitel glandular. Luteinizing hormone dapat meningkatkan ekspresi COX-2 melalui jalur Adenilat siklase maupun fosfolipase. Menurut Mizrachi dan Shemesh (1999) LH akan menginduksi secara cepat peningkatan cAMP endometrium dan produksi inositol fosfat (IP1, IP2 dan IP3). Peningkatan *second messenger* tersebut berhubungan dengan peningkatan konsentrasi COX-2 di endometrium dan metabolitnya yaitu PGF.

Tabel 2. Rerata (Mean \pm SD) ekspresi COX-2 di epitel glandular uterus *Rattus norvegicus* strain Sprague dawley akibat pemberian kurkumin 100 mg/kg BB setelah mendapat stimulasi LH 10 IU pada *Multivariate analysis One way anova*.

PERLAKUAN	MEAN \pm SD			
Aquades	15,72	\pm	1,98069	b
LH + Aquades	83,99	\pm	0,38747	d
CMC	15,61	\pm	1,52968	b
LH + CMC	84,54	\pm	0,64045	d
Kurkumin + CMC	5,56	\pm	7,61965	a
LH + Kurkumin + CMC	67,18	\pm	9,76217	c

Huruf yang berbeda di atas angka menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$)

Penurunan ekspresi COX-2 secara bermakna ($p < 0,05$) terjadi pada kelompok hewan coba yang diberi kurkumin + CMC (K5) jika dibandingkan dengan kelompok pembanding yang diberi CMC (K3). Hal ini menunjukkan bahwa kurkumin menghambat ekspresi COX-2. Dari hasil analisis statistik multiple comparison menunjukkan bahwa kurkumin memberikan hasil yang signifikan ($p < 0,05$) untuk ekspresi COX-2 pada sel-sel epitel luminal endometrium uterus maupun sel-sel epitel glandular endometrium uterus. Ekspresi COX-2 pada kelompok hewan coba yang diberi perlakuan kurkumin setelah di stimulasi LH (K6) juga menurun secara bermakna ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan kelompok pembanding yang diberi CMC setelah mendapat stimulasi LH (K4). Hal ini menunjukkan bahwa peranan LH dalam meningkatkan COX-2 dihambat oleh kurkumin. Hasil analisis tersebut sesuai dengan hasil analisis statistik multiple

comparison yang menunjukkan bahwa Kurkumin + LH memberikan hasil yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap ekspresi COX-2 baik di epitel luminal endometrium uterus maupun epitel glandular (gambar 1 dan 2). Hal ini sesuai dengan hipotesis yang peneliti buat, bahwa pemberian kurkumin setelah mendapat stimulasi LH menurunkan ekspresi COX-2. Penghambatan kurkumin tersebut dimungkinkan melalui penghambatan LH pada upstream jalur adenilat siklase dan fosfolipase.

Luteinizing hormon akan berikatan dengan reseptornya pada membran sel. Ikatan tersebut akan mengaktifkan protein G yang akan mengaktifkan adenilat siklase ataupun fosfolipase. Pada jalur adenilat siklase, aktifnya adenilat siklase menyebabkan perubahan dari ATP menjadi cAMP. Selanjutnya cAMP menyebabkan pelepasan ion Ca^{2+} dari gudangnya di retikulum endoplasma dan mengaktifkan protein kinase A (PKA). Ion-ion Ca^{2+}

yang terlepas akan mengaktifkan calmodulin. Aktifitas PKA dan calmodulin yang akan meningkatkan ekspresi COX-2. Melalui jalur fosfolipase, aktifnya fosfolipase akan menyebabkan perubahan dari PIP2 menjadi IP3 dan DAG yang selanjutnya menyebabkan pelepasan Ca²⁺ yang akan mengaktifkan calmodulin dan protein kinase C (PKC) . PKC dan calmodulin inilah yang akan meningkatkan COX-2. Adanya penghambatan kurkumin pada jalur adenilat siklase dan fosfolipase akan menurunkan ekspresi COX-2. Karena kurkumin menghambat LH maka kurkumin dikenal sebagai antigonadotropin.

SIMPULAN

Pemberian kurkumin pada *Rattus norvegicus* strain *Sprague Dawley* setelah mendapat stimulasi LH menurunkan ekspresi COX-2 di endometrium secara signifikan (P<0,05) melalui salah satu jalur dari jalur rangsangan LH.

DAFTAR PUSTAKA

- Adiyanti SS., 2005, Change of Endometrial Receptivity *Rattus norvegicus* oestrus fase after Curcumine Treatment in Preceding The International Symposium on Recent Progress in Curcumin Research 11-12 September 2006, Faculty of Pharmaceuty, Gadjah Mada University, Yogyakarta. Indonesia.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Leo B, Putte AD, Lipsky PE, 1998, Cyclooxygenase in Biology and Disease, *The FASEB Journal* 12: 1063-1073.
- Federer W.T. 1955. Experimental Design Theory and Application. The Macmillan Company. New York. p.26.
- Gomez, R. Lima, I. Simon, C. and Pellicer, A. 2004. Administration of Low-dose LH Induce Ovulation and Prevents Vascular Hyperpermeability and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Super Ovulated Rats. *Reproduction* 127:483-489.
- Hasmeda, M and Polya, GM. 1996. Inhibition of cyclic AMP-dependent Protein Kinase by Curcumin. *Phytochemistry*. 42(3):599-605.
- Huang, M.T. Lyst, T. Feraro, T., Abidi, T.F., Laskin, J.D. and Coney, A.H. 1991. Inhibitory Effect of Curcumin on in Vitro Lipoxygenase and Cyclooxygenase Activities in Mouse Epidermis, *Cancer-Res.* 51:813-9
- Kelley RW, King AE & Crichley HO, 2001, Cytokine control in human endometrium, *Reproduction* 121:3-19.
- Marions, L. and Danielsson, K.G. 1999. Expression of Cyclooxygenase in Human Endometrium During The Implantation Molecular. *Human Reproduction.* (5): 961-5.
- Meiyanto, E.1999, *Kurkumin Sebagai Obat Kanker: Menelusuri Mekanisme Aksinya*. Majalah Farmasi Indonesia, 10 (5): 224-36.
- Milne, S.A. and Jabour, H.N. 2003. Prostaglandin (PG)F_{2α} Receptor Expression and Signaling in Human Endometrium: Role of PGF_{2α} in Epithelial Cell Proliferation. *JECM.* 88(4): 1825-32.

- Mizrachi D, Shemesh M, 1999a, Expression of Functional Stimulating Luteinizing Hormone (LH) Receptor and its Messenger Ribonucleic acid in Bovine Cervix: LH Augmentation of Intracellular cAMP, Phosphate Inositol and Cyclooxygenase, *Mol Cell Endo* 157: 191-200.
- Moller, B. 2004. Human Endometrial Angiogenesis. An Immunohistochemical Study of the Endometrial Expression of Angiogenic Growth Factors and Their Corresponding Receptors. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertation from the Faculty of Medicine.
- Mukopadhyay, A., Basu, N., Ghatak, N. and Gujral, P.K. 1982. Anti-inflammatory and Irritant Activities of Curcumin Analogues in Rats. *Agents and Action*. 12:508-515.
- Nurcahyo, H. 2004 dan Soejono, S.K. Pengaruh Kurkumin terhadap Aktivitas Apoptosis pada Kultur Sel Granulosa Berbagai Ukuran Folikel Ovarium. *Mediagama* 3:1-11
- Parent, J. Villeneuve, C. and Fostier, M.A. 2003. Evaluation of Contribution of Cyclooxygenase 1 and Cyclooxygenase 2 to The Production of PGE2 and PGF2 α in Epithelial Cells Form Bovine Endometrium. *Reproduction* 126: 539-547.
- Rees, M.C.P. and Bicknell R., 1998. Angiogenesis in the endometrium. *Angiogenesis* 2:29-35
- Rodrigues MC ,Segaloff DL, 1990, The Orientation of The Lutropin/Choriogonadotrophin Receptor in Rat Luteal Cells as Revealed by site-specific antibodies. *Endocrinology* 127: 674-681
- Sales, H.P.T. and Jabbour, H.N. 2003. Cyclooxygenase Enzymes and Prostaglandins in Pathology of The Endometrium. *Reproduction*. (126):559-67.
- Shemesh M., 2001, Action of Gonadotrophins on the uterus, *Journal of Reproduction and Fertility*. (121): 835-842.
- Shemes M, Mizrachi D, Gurevich M, Stram Y, Shore LS, Fields MJ, 2000, Direct Involvement of Luteinizing Hormone in Uterine Function, *Reprod Dom Anim* 25 : 163-166.