

Efek Kurkumin terhadap Sekresi Estrogen dan Ekspresi Reseptor Estrogen β Kultur Sel Granulosa Babi Folikel Sedang

Effects of Curcumin on Estrogen Secretion and Estrogen Receptor β in Pig Granulosa Cells of Medium Follicles

Rul Afiyah Syarif¹, Sri Kadarsih Soejono², Edy Meiyanto³, Mae Sri H Wahyuningsih¹

¹Bagian Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

²Bagian Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

³Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC) Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

ABSTRAK

Kurkumin merupakan senyawa yang diisolasi dari *Curcuma longa* L. Secara empirik *C. longa* L dikonsumsi masyarakat selama folikulogenesis untuk mencegah kehamilan. Pertumbuhan dan perkembangan sel granulosa tergantung pada FSH, LH, PGF2 α , estrogen dan reseptor estrogen β (ER β). Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek kurkumin terhadap sekresi estrogen dan ekspresi ER β pada sel granulosa babi folikel sedang yang dirangsang FSH, LH dan PGF2 α . Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *post test-only control group*. Sel granulosa diisolasi dari folikel ukuran sedang ovarium babi dan disubkultur dalam medium kultur. Penelitian dilakukan pada 16 kelompok yang terbagi dalam 4 kelompok perangsangan (sel granulosa tidak dirangsang apapun, dirangsang FSH atau LH atau PGF2). Empat kelompok perangsangan dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu kelompok tidak diberi perlakuan dan kelompok diberi kurkumin 3 peringkat konsentrasi. Kadar estrogen dan ekspresi ER β sel granulosa dianalisa secara *enzyme immuneassay*. Kadar estrogen dan ekspresi ER β pada kelompok yang diberi kurkumin tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p>0,05$). Kadar estrogen dan ekspresi ER β pada kelompok yang dirangsang FSH atau LH dan diberi kurkumin berkonsentrasi rendah lebih rendah bermakna daripada tanpa diberi kurkumin ($p<0,05$). Kadar estrogen sel granulosa yang dirangsang PGF2 α dan diberi kurkumin lebih tinggi bermakna daripada tanpa kurkumin ($p<0,05$), dan tidak ada perbedaan yang bermakna ekspresi ER β antara kelompok yang dirangsang PGF2 α dan diberi kurkumin dengan kelompok tanpa kurkumin ($p>0,05$). Kurkumin mampu menurunkan estrogen dan ekspresi ER β sel granulosa yang dirangsang FSH atau LH dari folikel babi ukuran sedang. Dengan demikian, kurkumin dapat mengganggu folikulogenesis dan berpotensi sebagai agen antifertilitas.

Kata Kunci: Estrogen, kurkumin, reseptor estrogen β , sel granulosa

ABSTRACT

Curcumin is an active substance isolated from Curcuma longa L. Empirically C. longa L has been consumed during folliculogenesis to prevent pregnancy. The growth and development of granulosa cells depend on presence of FSH, LH, PGF2 α , estrogen and estrogen receptor β (ER β). This study aimed to determine effect of curcumin on estrogen secretion and ER β expression in FSH-, LH-, and PGF2 α -stimulated pig granulosa cells of medium follicles. The study was an experimental laboratory study with post test-only control group design. Granulosa cells were isolated from medium follicles of pig ovaries and sub cultured in culture media. Studies was performed using 16 treatment groups which divided into 4 different stimulation groups (un-stimulated, FSH-stimulated, LH-stimulated, and PGF2 stimulated granulosa cells). Each stimulated group was then assign into 4 treatment groups i.e. untreated group and curcumin treated groups of 3 different concentrations. The estrogen level and ER β expression were analyzed by enzymeimmunoassay. Estrogen level and ER β expression were not significantly different between curcumin treated and control group ($p>0,05$). Estrogen level and ER β expression in FSH- or LH-stimulated granulosa cells treated by lower concentrations of curcumin was significantly lower than in those untreated ($p<0,05$). Estrogen level in PGF2 α -stimulated granulosa cells treated by curcumin were significantly higher than in those untreated ($p<0,05$), and no significant differences were observed in the ER β expression between PGF2 α -stimulated granulosa cells treated by curcumin and those untreated ($p>0,05$). Curcumin was able to decreasing expression of ER β in FSH- or LH-stimulated granulosa cells of pig medium follicles. Therefore, curcumin may disturb folliculogenesis and a potential agent for antifertility.

Keywords: Curcumin, estrogen, estrogen receptor β , granulosa cells

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 29, No. 1, Februari 2016; Korespondensi: Rul Afiyah Syarif. Bagian Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, Gedung Radiopoetro Lantai II Sayap Timur, JL. Farmako, Sekip Utara, 55281, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281 Tel. (0274) 511103 Email: rulafiyah@yahoo.com

PENDAHULUAN

Kurkumin merupakan senyawa fenolik yang diisolasi dari rimpang *Curcuma longa* L (*C. longa* L). Secara empirik *C. longa* L telah digunakan oleh masyarakat untuk mengatur siklus menstruasi dan penjarangan kehamilan (1). Rimpang kering *C. longa* L banyak mengandung senyawa fenolik kurkuminoid yang terdiri atas kurkumin, demetoksikurkumin, bisdemetoksikurkumin, dan siklokurkumin (2). Kurkumin mempunyai efek farmakologi berupa antispasmodik, antimikroba, antikanker, hepatoprotektor, kemopreventif, dan antiinflamasi dan neuroproteksi (2). Dalam sistem reproduksi, kurkumin menghambat steroidogenesis pada kultur sel luteal tikus (3,4) dan sel granulosa folikel besar babi (5), serta menekan folikulogenesis dan steroidogenesis pada wanita subur (6).

Steroidogenesis dan follikulogenesis ovarium diatur oleh gonadotropin ((*Follicle Stimulating Hormon* (FSH), *Luteinizing Hormon* (LH)), estrogen dan reseptornya. *Follicle Stimulating Hormon* diperlukan untuk maturitas folikel, merangsang sintesis dan sekresi estrogen dan merangsang ekspresi reseptor LH (LHR) di sel granulosa ovarium. Estrogen berperan meningkatkan ekspresi reseptor FSH (FSHR) dan LHR sehingga berdampak pada peningkatan proliferasi sel granulosa. Kerja estrogen dalam folikulogenesis dan steroidogenesis dimediasi melalui reseptor estrogen, khususnya reseptor estrogen beta (ER β) yang merupakan reseptor dominan di ovarium daripada ER α (7,8). *Luteinizing Hormon* merangsang sel teka ovarium untuk mensekresi *aromatizable androgen* (androstenedion dan testosteron) yang selanjutnya diubah menjadi estrogen di sel granulosa oleh sitokrom P450 aromatase (CYP19) yang diinduksi FSH (9). Selain itu LH memicu sekresi prostaglandin yang pesat sesaat sebelum ovulasi (10,11) sehingga terjadilah ovulasi. Ketika ovulasi, dinding folikel mengalami ruptur karena rangsangan PGF 2α . Jadi dapat dikatakan ovulasi tidak akan terjadi tanpa kenaikan kadar prostaglandin (10).

Prekursor utama steroidogenesis di ovarium manusia adalah kolesterol *low-density lipoprotein* (LDL) dan *high-density lipoprotein* (HDL) (12). Di dalam sel teka dan sel granulosa ovarium, kolesterol dibawa ke membran luar mitokondria dan selanjutnya dipindahkan ke membran mitokondria bagian dalam oleh protein *steroidogenic acute regulatory* (StAR) (13). Di membran bagian dalam mitokondria, kolesterol diubah menjadi pregnenolon oleh enzim *cytochrome side-chain cleavage* (P450 scc). Pregnenolon berdifusi keluar mitokondria dan masuk ke retikulum endoplasma. Di retikulum endoplasma sel granulosa, pregnenolon dimetabolisme menjadi progesteron oleh enzim 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) sedangkan di sel teka akan diubah menjadi androgen (androstenedion dan testosteron) oleh enzim 17 α -hydroxylase. Androgen berdifusi ke sel granulosa dan akan diubah menjadi estrogen oleh enzim P450 aromatase (14). Dengan demikian, banyak enzim yang terlibat dalam sekresi estrogen.

Mekanisme molekuler steroidogenesis dan ekspresi protein dipengaruhi oleh gonadotropin dan PGF 2α . Pengikatan hormon gonadotropin ke reseptornya akan menginduksi pelepasan subunit G α dan selanjutnya aktivasi protein kinase A (PKA) dan fosfolipase C (PLC) (15) sedangkan pengikatan PGF 2α ke reseptornya akan mengaktifkan fosfolipase C (PLC) (16). Aktivasi jalur

cAMP/PKA berpengaruh terhadap ekspresi ER β (17) dan sekresi steroid (15). Penelitian sebelumnya mendapatkan bahwa kurkumin menghambat aktivitas 3 β HSD (18) dan sitokrom P450 scc (19) di sel luteal tikus, serta beraksi sebelum adenilat siklase dalam transduksi intasel jalur cAMP/PKA (4). Dapat disimpulkan bahwa kurkumin mampu menghambat steroidogenesis dan ekspresi protein, namun apakah kurkumin mempengaruhi sekresi estrogen dan ekspresi reseptor estrogen sel granulosa, perlu kajian lebih lanjut.

Kondisi folikel ukuran sedang ovarium yang mengandung sel granulosa yang belum mengalami luteinisasi dan masih berkembang menuju folikel besar, dan tipe ER β yang lebih dominan daripada ER α menarik untuk dijadikan model seluler dalam penelitian ini. Selain itu, secara fisiologis LH, FSH dan PGF 2 ada dalam tubuh yang keberadaannya sangat penting dalam mengatur berlangsungnya steroidogenesis dan folikulogenesis. Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji efek kurkumin terhadap sekresi estrogen dan ekspresi protein ER β pada sel granulosa babi folikel sedang yang dirangsang FSH, LH dan PGF 2α .

METODE

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *posttest-only control group design* dan menggunakan binatang coba babi sebagai model seluler. Penelitian dilakukan pada 16 kelompok yang terbagi dalam 4 kelompok perangsangan (sel granulosa tidak dirangsang apapun, dirangsang FSH atau LH atau PGF 2). Empat kelompok perangsangan dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu kelompok tidak diberi perlakuan dan kelompok diberi kurkumin 3 peringkat konsentrasi, atau secara terinci kelompok tersebut adalah 1.) kontrol, 2.) FSH, 3.) LH, 4.) PGF 2 , 5.) kurkumin 25 μ M (K25), 6.) kurkumin 50 μ M (K50), 7.) kurkumin 100 μ M (K100), 8.) FSH+K25, 9.) FSH+K50, 10.) FSH+K100, 11.) LH+K25, 12.) LH+K50, 13.) LH+ K100, 14.) PGF 2 + K25, 15.) PGF 2 + K50, dan 16.) PGF 2 + K100.

Penambahan FSH, LH, dan PGF 2α dalam sel granulosa bertujuan untuk membuat lingkungan yang mirip dengan kondisi sebenarnya, yaitu bahwa di dalam tubuh terdapat hormon/zat tersebut. Karena ovarium yang diperoleh dari pejagal hewan tidak selalu mengandung folikel ukuran sedang yang cukup untuk perlakuan 3 plikat sekaligus maka tiap kelompok diwakili satu sampel, dan perlakuan dalam penelitian ini diulang 3 kali. Sel granulosa yang tidak dirangsang dan tidak diberi perlakuan disebut sebagai kelompok kontrol. Konsentrasi kurkumin yang diberikan adalah 25, 50, dan 100 μ M (20). Konsentrasi FSH dan LH 50ng/mL dan PGF 2 0,56M (5).

Isolasi Sel Granulosa Babi

Penelitian dengan sampel sel granulosa babi telah mendapatkan ijin dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran UGM No KE/FK/205/EC. Isolasi sel granulosa babi menggunakan metode Nurcahyo (5). Ovarium babi yang diperoleh dari pejagal hewan di Yogyakarta dimasukkan dalam botol berisi PBS yang mengandung 1x10 5 U/L Penicilline dan 100mg/L Streptomycine (Penstrep 1%) dalam termos es. Ovarium segera dibawa ke laboratorium untuk dibersihkan dan diisolasi sel granulosa. Sel granulosa diambil dari folikel berukuran sedang (diameter folikel 3-5mm) dengan mengaspisasi cairan folikel

menggunakan spuit 1mL dan jarum 26 G. Kriteria ukuran folikel mengikuti Asahara *et al*, (20). Cairan folikel dimasukkan ke *conical tube* dan disentrifus 2000rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet dicuci PBS. Pencucian dilakukan 2-3 kali. Pelet sel diresuspensi dengan DMEM, dikultur dalam *cell culture flask* yang berisi media penumbuh (DMEM, FBS 10%, Penstrep 1%, dan Fungizone 0,5%), dan dimasukkan inkubator CO₂ 5%, suhu 37°C. Setelah 48-72 jam inkubasi atau sel konfluen, dilakukan subkultur. Untuk pemeriksaan estrogen, sel granulosa dikultur di *microplate* 24-sumuran (1,5 x 10⁵ sel per sumuran) dan untuk pengukuran ekspresi ER β , sel granulosa dikultur dalam *microplate* 6-sumuran (jumlah 5 x 10⁵ sel per sumuran) dan diberi perlakuan selama 24 jam. Penghitungan jumlah sel dilakukan setelah sel diwarnai dengan Trypan Blue. Setelah 24 jam, medium kultur di *microplate* 24-sumuran dikumpulkan untuk pemeriksaan kadar estrogen dan sel granulosa di *microplate* 6-sumuran dikerok untuk pemeriksaan ekspresi ER β .

Bahan Uji

Kurkumin berkadar 86,607% (berdasar uji kadar oleh LPPT UGM (No 858/LPPT-UGM/U/II/2007) menggunakan HPLC) diperoleh dari Fakultas Farmasi UGM, FSH *from porcine pituitary* (F2293), LH (L5259), dan PGF₂ tris (P0424) dari Sigma-Aldrich.

Pemeriksaan Kadar Estrogen secara Enzyme Immunoassay

Kadar estrogen diukur dengan Elisa kit dari DRG (EIA 2693). Pemeriksaan menggunakan *microplate* 96-sumur yang telah dilapisi dengan *rabbit anti-Estradiol antibody (polyclonal)*. Pada setiap sumur dimasukkan larutan standar yang telah diketahui kadar estrogennya dan medium kultur sampel penelitian. *Enzyme conjugate* (Estradiol-HRP Conjugate) ditambahkan ke tiap sumur diinkubasi di suhu kamar selama 120 menit. Larutan dalam sumur dibuang dan sumur dicuci 3 kali dengan larutan pencuci. Larutan substrat (*tetramethylbenzidine/TMB*) dimasukkan ke tiap sumur dan *microplate* diinkubasi selama 15 menit dalam suhu kamar. Reaksi dihentikan dengan menambahkan *stop solution* (0,5 M H₂SO₄) ke tiap sumur. Reaksi akan menghasilkan perubahan warna dari biru menjadi kuning. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm dengan Elisa *reader*. Uji ini diulang 3 kali untuk setiap kelompok perlakuan. Kadar estrogen sampel diketahui dengan membandingkan absorbansi sampel pada kurva standar yang dibuat dengan *software four parameter logistic (4-PL) curve-fit* (21).

Pemeriksaan Protein ER β secara Enzyme Immunoassay

Pemeriksaan ER β dilakukan menggunakan Elisa kit *Pig estrogen receptor beta* dari Cusabio (CSB-EL007831PI) dengan teknik *sandwich*. Media kultur sel granulosa dibuang dan sel dicuci dengan PBS dingin (pH 7,2-7,4). Untuk memudahkan pengerokan, ditambahkan sedikit PBS kemudian dikerok. Larutan sel dimasukkan ke tabung Eppendorf dan disimpan semalam di suhu -20°C. Setelah 2 kali *freeze-thaw cycles* untuk memecah membran sel, larutan sel disentrifus 5000 g, 4°C, selama 5 menit dan supernatan dikumpulkan.

Supernatan sampel dan larutan standar dimasukkan ke *microplate* 96-sumur. *Plate* ditutup dengan kertas adesif dan diinkubasi 2 jam, 37°C. Cairan sumur dibuang namun tidak dicuci, kemudian *Biotin-antibody* (1x) 100 μ L

dimasukkan ke tiap sumur. *Microplate* ditutup kertas adesif baru dan inkubasi 1 jam, 37°C. Cairan dalam sumur diaspirasi dan dicuci 3 kali dengan dapar pencuci. *HRP-avidin* (1x) dimasukkan ke tiap sumur, *plate* ditutup dengan kertas adesif baru dan inkubasi 1 jam, 37°C. *Microplate* dicuci 5 kali dengan dapar pencuci. *Substrat TMB* dimasukkan ke tiap sumur, inkubasi 15 menit pada suhu 37°C. *Stop solution* ditambahkan ke tiap sumur dan digoyang pelan-pelan agar tercampur sempurna. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 450 nm menggunakan Elisa *reader*. Uji ini diulang 3 kali untuk setiap kelompok perlakuan. Kadar ER β sampel dihitung dari kurva standar yang dibuat dengan *software four parameter logistic (4-PL) curve-fit* (21).

Analisis Data

Rerata perbedaan antar kelompok dianalisa menggunakan one-way ANOVA. Untuk mengetahui antara kelompok mana saja yang berbeda dilanjutkan dengan *post hoc test* yaitu *Least Significant Differences (LSD) test*. Tampilan data dinyatakan sebagai rerata ekspresi \pm SEM.

HASIL

Kadar Estrogen

Data kadar estrogen sel granulosa babi dapat dilihat di Tabel 1. Sekresi estrogen oleh sel granulosa yang dirangsang FSH dan LH lebih tinggi, dan sekresi estrogen oleh sel granulosa yang dirangsang PGF₂ α lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Sekresi estrogen ditingkatkan secara bermakna oleh LH (p<0,05). Sekresi estrogen oleh sel granulosa yang diberi kurkumin 25 μ M lebih rendah sedangkan konsentrasi 50 dan 100 μ M lebih tinggi daripada kelompok kontrol (p>0,05). Semakin tinggi konsentrasi kurkumin menunjukkan peningkatan sekresi estrogen oleh sel granulosa. Terdapat perbedaan sekresi estrogen yang bermakna antara sel granulosa yang diberi kurkumin 25 μ M dengan 100 μ M (p<0,05).

Pemberian kurkumin 25 dan 50 μ M menurunkan sekresi estrogen oleh sel granulosa yang dirangsang FSH secara bermakna (p<0,05) dibandingkan hanya dirangsang FSH sedangkan kurkumin 100 μ M menurunkan sekresi estrogen sel granulosa secara tidak bermakna (p>0,05). Terdapat perbedaan sekresi estrogen yang bermakna antara sel granulosa yang dirangsang FSH dan diberi kurkumin 100 μ M dengan sel yang diberi kurkumin 25 maupun 50 μ M (p<0,05).

Tabel 1. Kadar estrogen kultur sel granulosa babi

Konsentrasi Kurkumin (μ M)	Rata-rata sekresi estrogen (pg/mL/1,5x10 ⁵ sel/24 jam)			
	Kelompok			
	Tanpa Rangsangan	FSH	LH	PGF ₂ α
0	22,38 \pm 0,60	25,94 \pm 0,80	28,39 \pm 1,39 *	18,47 \pm 1,88
25	19,09 \pm 0,80	18,47 \pm 1,88 *	20,28 \pm 2,08 *	21,19 \pm 0,52
50	22,68 \pm 0,30	19,67 \pm 2,35 *	22,68 \pm 1,58 *	25,37 \pm 0,80 *
100	24,47 \pm 0,30	25,70 \pm 3,65	26,88 \pm 1,83	27,78 \pm 0,80 *

Keterangan: Kelompok sel granulosa tanpa rangsangan dan pemberian kurkumin disebut kelompok kontrol. * = p<0,05 berlaku untuk: kelompok LH dibandingkan dengan kelompok kontrol, kelompok FSH+K25 dan FSH+K50 dibandingkan kelompok FSH, kelompok LH+K25 dan LH+K50 dibandingkan kelompok LH, kelompok PGF₂ α +K50 dan PGF₂ α +K100 dibandingkan kelompok PGF₂ α

Pemberian kurkumin 25 dan 50 μ M pada sel granulosa yang dirangsang LH menurunkan sekresi estrogen secara bermakna ($p<0,05$) dibandingkan hanya dirangsang LH, sedangkan kurkumin 100 μ M menurunkan sekresi estrogen sel granulosa yang dirangsang LH secara tidak bermakna ($p>0,05$). Terdapat perbedaan sekresi estrogen yang bermakna antara sel granulosa yang diberi kurkumin 25 μ M dengan 100 μ M ($p<0,05$).

Pemberian kurkumin 25, 50, dan 100 μ M meningkatkan sekresi estrogen sel granulosa yang dirangsang PGF2 α dibandingkan hanya dirangsang PGF2 α . Terdapat perbedaan yang bermakna antara sekresi estrogen sel granulosa yang dirangsang PGF2 α dan diberi kurkumin 50 maupun 100 μ M dengan sel yang hanya dirangsang PGF2 α ($p<0,05$).

Ekspresi ER β

Data ekspresi ER β sel granulosa babi dapat dilihat di Tabel 2. Ekspresi ER β sel granulosa babi yang dirangsang FSH dan LH lebih tinggi secara bermakna ($p<0,05$) dibandingkan kelompok kontrol sedangkan ekspresi ER β sel granulosa babi yang dirangsang PGF2 α tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p>0,05$). Pemberian kurkumin 25, 50, dan 100 μ M menyebabkan kenaikan ekspresi ER β sel granulosa yang tidak berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p>0,05$).

Pemberian kurkumin 25 dan 50 μ M pada sel granulosa yang dirangsang FSH menurunkan ekspresi ER β secara bermakna ($p<0,05$) sedangkan kurkumin 100 μ M menyebabkan penurunan ekspresi ER β sel granulosa secara tidak bermakna ($p>0,05$) dibandingkan sel granulosa yang hanya dirangsang FSH. Pemberian kurkumin 25, 50, dan 100 μ M pada sel granulosa yang dirangsang LH menyebabkan penurunan ekspresi ER β secara bermakna ($p<0,05$) dibandingkan hanya dirangsang LH dan konsentrasi kurkumin yang berbeda tidak memberikan perbedaan ekspresi ER β secara bermakna ($p>0,05$).

Tabel 2. Ekspresi ER β kultur sel granulosa babi

Konsentrasi Kurkumin (μ M)	Rata-rata ekspresi ER β (pg/mL/5x10 ⁵ sel/24 jam)			
	Kelompok			
	Tanpa Rangsangan	FSH	LH	PGF2 α
0	2,40 \pm 0,15	4,23 \pm 1,03 *	5,96 \pm 1,87 *	2,39 \pm 0,16
25	2,48 \pm 0,17	2,66 \pm 0,37 *	2,37 \pm 0,13 *	2,51 \pm 0,23
50	2,46 \pm 0,08	2,57 \pm 0,33 *	2,45 \pm 0,16 *	2,74 \pm 0,11
100	2,92 \pm 0,30	3,21 \pm 0,10	2,50 \pm 0,14 *	4,66 \pm 0,30 **

Keterangan: Kelompok sel granulosa tanpa rangsangan dan pemberian kurkumin disebut kelompok kontrol.

*= $p<0,05$ berlaku untuk:

kelompok FSH dan LH dibandingkan dengan kelompok kontrol, kelompok FSH+K25 dan FSH+K50 dibandingkan kelompok FSH, kelompok LH+K25 dan LH+K50 dibandingkan kelompok LH, kelompok PGF2 α +K50 dan PGF2 α +K100 dibandingkan kelompok PGF2 α

**= $p<0,1$ berlaku untuk:

kelompok PGF2 α +K100 dibandingkan dengan kelompok PGF2 α

Pemberian kurkumin 25, 50, dan 100 μ M pada sel granulosa yang dirangsang PGF2 α menyebabkan kenaikan ekspresi ER β dibandingkan hanya dirangsang PGF2 α . Semakin tinggi konsentrasi kurkumin, ekspresi ER β semakin besar. Terdapat perbedaan bermakna ($p<0,1$)

ekspresi ER β sel granulosa yang dirangsang PGF2 α dan diberi kurkumin 100 μ M dibandingkan dengan sel granulosa yang hanya dirangsang PGF2 α , dan tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi ER β sel granulosa yang dirangsang PGF2 α dan diberi kurkumin 25 maupun 50 μ M dibandingkan dengan sel granulosa yang hanya dirangsang PGF2 α ($p>0,05$).

DISKUSI

Konsentrasi kurkumin yang digunakan dalam penelitian ini tidak bersifat sitotoksik. Hal ini didasarkan hasil penelitian pendahuluan (22) yang mendapatkan bahwa sel granulosa babi yang diberi kurkumin konsentrasi 25, 50, dan 100 μ M selama 24 jam menunjukkan viabilitas sel yang baik (viabilitas $>75\%$). Penggunaan konsentrasi tersebut dalam penelitian ini menyingkirkan kemungkinan efek toksik kurkumin yang dapat berdampak pada proses metabolisme dalam sel antara lain sintesis estrogen dan protein oleh sel granulosa.

Dibandingkan dengan kelompok kontrol, FSH dan LH meningkatkan sekresi estrogen dan ekspresi ER β oleh sel granulosa dari folikel sedang. Sekresi estrogen dan ekspresi ER β sel granulosa yang diberi LH lebih tinggi bermakna daripada diberi FSH. Peningkatan sekresi estrogen ini dapat disebabkan oleh ukuran folikel ovarium yang digunakan sebagai sumber sel granulosa, produksi cAMP (23), lama kultur (24), jumlah reseptor LH (25), dan adanya aromatase (26). Semakin besar ukuran folikel ovarium maka jumlah LHR semakin besar (27), responsifitasnya terhadap FSH menurun dan semakin responsif terhadap LH dalam mensekresikan estrogen, produksi cAMP-nya lebih dipengaruhi LH daripada FSH (23). Kenaikan produksi cAMP akan meningkatkan steroidogenesis melalui jalur cAMP/PKA (15) dan ekspresi gen protein, antara lain ER β , melalui jalur cAMP/PKA/CREB (28). Kultur sel granulosa umur 2 hari menunjukkan produksi estrogen menurun dan produksi progesteron dalam jumlah yang lebih besar dimulai. Hal ini berkaitan dengan terjadinya perubahan morfologi sel dan sel menjadi kurang responsif terhadap FSH (24). Sementara pemberian perlakuan dalam penelitian ini dilakukan pada hari ke-5 sejak isolasi sel granulosa dari ovarium dilakukan, sehingga produksi estrogen di hari ke-5 tentunya semakin menurun. Selama kultur 24 jam, ekspresi P450arom mRNA (aromatase) sel granulosa folikel besar menurun drastis dan tidak responsif terhadap FSH (29). Ekspresi aromatase banyak terdeteksi di sel granulosa folikel kecil (26) sedangkan sel granulosa yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari folikel ukuran sedang sehingga kemungkinan aromatase lebih rendah.

Ekspresi ER β pada sel granulosa yang dirangsang LH lebih tinggi daripada FSH. LH meningkatkan ekspresi ER β sel granulosa secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil ini sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Pavlik *et al*, yang melakukan pada sel granulosa manusia (8). Selain oleh gonadotropin, ekspresi ER β juga dipengaruhi ukuran folikel ovarium karena pemberian FSH pada sel granulosa tikus yang telah mengalami luteinisasi atau dari folikel besar menurunkan mRNA ER β (30) dan *surge* LH menurunkan mRNA ER β folikel preovulasi hamster (31). Sementara penelitian ini menggunakan sel granulosa folikel sedang sehingga pemberian gonadotropin meningkatkan ekspresi ER β . Menurut Chiang *et al*, penurunan mRNA ER β oleh LH atau hCG terjadi melalui jalur sinyal PKA (17).

Pemberian PGF2 α pada sel granulosa babi dalam penelitian ini menurunkan sekresi estrogen dan tidak mempengaruhi ekspresi ER β . Diduga penurunan sekresi estrogen kemungkinan karena aktivasi PLC, PKC dan kenaikan kalsium intrasel. Aktivasi PKC dan kalsium intrasel akan menghambat adenilat siklase dan selanjutnya terjadilah penurunan sekresi estrogen dan ekspresi protein (13). Penurunan sekresi estrogen juga disebabkan PGF2 α menurunkan transkripsi enzim P450 scc , menghambat enzim 3 β HSD (32), dan menghambat ekspresi gen StAR (33) yang menunjukkan bahwa kerja PGF2 α berlawanan dengan gonadotropin (LH dan FSH).

Meskipun secara statistik tidak bermakna, pemberian kurkumin konsentrasi rendah menurunkan sekresi estrogen sel granulosa dibandingkan dengan kelompok kontrol, dan semakin besar konsentrasi kurkumin sekresi estrogen semakin tinggi. Namun, kurkumin tidak mempengaruhi ekspresi ER β sel granulosa. Lain halnya bila kurkumin diberikan pada sel granulosa yang dirangsang FSH atau LH. Ditunjukkan dalam penelitian ini bahwa kurkumin konsentrasi rendah (25 dan 50 μ M) menurunkan sekresi estrogen dan ekspresi ER β sel granulosa yang dirangsang FSH maupun LH dibandingkan dengan sel yang hanya dirangsang FSH maupun LH. Hal ini menunjukkan bahwa efek penurunan sekresi estrogen dan ekspresi ER β sel granulosa tergantung dengan adanya gonadotropin.

Efek penghambatan oleh kurkumin kemungkinan disebabkan adanya gugus hidroksil fenolik dan karbonil kurkumin yang membentuk ikatan hidrogen dengan molekul target (34) yang dapat berupa enzim maupun faktor transkripsi sehingga mengganggu sistem biologi organisme, antara lain steroidogenesis dan ekspresi protein. Ditemukannya kadar estrogen yang tinggi dalam medium kultur pada pemberian kurkumin konsentrasi yang lebih tinggi kemungkinan disebabkan karena kurkumin konsentrasi yang lebih tinggi mengganggu permeabilitas membran sel granulosa seperti hasil penelitian Jaruga *et al* yang mendapatkan bahwa kurkumin meningkatkan permeabilitas membran sel timus (35). Permeabilitas membran sel yang meningkat menyebabkan estrogen intrasel keluar menuju ekstrasel. Untuk mengetahui apakah kurkumin mengganggu permeabilitas membran sel granulosa perlu diteliti lebih lanjut.

Kurkumin menurunkan sekresi estrogen dan ekspresi ER β sel granulosa yang dirangsang FSH maupun LH dibandingkan dengan sel yang hanya dirangsang FSH maupun LH. Dengan demikian, kombinasi kurkumin dengan gonadotropin bersifat antagonis. Mekanisme penghambatan sekresi estrogen sel granulosa yang dirangsang FSH atau LH dalam jalur steroidogenesis dapat

melalui cAMP/PKA atau MAP kinase. Demikian pula penurunan ekspresi ER β sel granulosa yang dirangsang FSH maupun LH dan diberi kurkumin, diduga kurkumin beraksi melalui jalur ERK/MAPK, *upstream* dari translasi ER β , karena penelitian sebelumnya (19) mendapatkan bahwa kurkumin maupun kombinasi kurkumin dan LH mampu menurunkan fosforilasi ERK1/2 sel luteal sedangkan pemberian LH saja meningkatkan fosforilasi ERK1/2 sel luteal. Penghambatan ERK/MAPK akan menurunkan aktivitas CREB dan selanjutnya penurunan ekspresi gen (28). FSH juga bersifat mengaktifkan ERK1/2 dan p38 MAPK (36-38) sehingga pemberian kurkumin pada penelitian ini juga menurunkan ER β pada sel granulosa yang dirangsang FSH. Pemberian kurkumin meningkatkan sekresi estrogen dan ekspresi ER β sel granulosa yang dirangsang PGF2 α dibandingkan sel yang hanya dirangsang PGF2 α . Hal ini berkaitan dengan sifat sitolitik dan disintegrasi sel dari PGF2 α (39) sehingga penambahan kurkumin pada sel granulosa yang dirangsang PGF2 α diduga semakin meningkatkan disintegrasi sel yang berakibat sekresi estrogen dan ekspresi ER β semakin tinggi.

Kemampuan kurkumin untuk menurunkan ekspresi ER β dan estrogen pada sel granulosa yang dirangsang FSH atau LH menunjukkan kurkumin potensial sebagai antifertilitas. Penurunan ER β dan estrogen mengakibatkan estrogen tidak dapat menjalankan fungsinya seperti yang seharusnya dalam proses steroidogenesis dan folikulogenesis, antara lain proses diferensiasi sel, membantu kerja FSH dan sintesis estrogen, ekspresi LHR, FSHR (40). Penurunan ER β atau tidak adanya ER β pada ovarium menciit menyebabkan menciit menjadi infertil atau subfertil, gagal superovulasi dan atresi lebih awal (41,42). Dapat disimpulkan bahwa kurkumin menghambat sekresi estrogen dan ekspresi ER β pada sel granulosa babi yang dirangsang FSH atau LH. Kurkumin tidak berpengaruh terhadap sekresi estrogen dan ekspresi ER β sel granulosa babi yang dirangsang PGF2 α . Dengan demikian, karena efek penghambatannya pada estrogen dan ER β pada jalur FSH dan LH, kurkumin berpotensi dikembangkan sebagai antifertilitas dengan menghambat steroidogenesis dan folikulogenesis. Penelitian lebih lanjut antara lain efeknya terhadap reseptor yang berperan dalam steroidogenesis, folikulogenesis pada hewan coba maupun uji klinis diperlukan untuk mendukung pengembangan kurkumin sebagai agen antifertilitas

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan dana penelitian bersumber dari Dana Masyarakat. Ucapan terima kasih juga untuk teknisi Dwi Kurniawati dan Rumbiwati yang telah membantu dalam persiapan sampel penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Soejono SK, Supardjan AM, Nurcahyo H, dan Syamsulhadi R. *Peran Kurkumin Sintesis dan Analognya (Pentagamavunon-0) pada Produksi Progesteron oleh Kultur Sel Luteal Tikus (Sprague Dawley)*. Mediagama. 2001; 3(3): 42-49.
2. Pari L, Tewas D, and Eckel J. *Role of Curcumin in Health and Disease*. Archives of Physiology and Biochemistry. 2008; 114(2): 127-149.
3. Hadi RS and Soejono SK. *Effect of Different Concentrations of Curcumin and Pentagamavunon-0 on Progesteron Productions by Cultured Rat Luteal Cells. Recent Development in Curcumin Pharmacochimistry*. Proceeding of the International Symposium on Recent progress in Curcumin Research. Yogyakarta, 11-12 September 2007; p. 205-213.
4. Purwaningsih E, Meiyanto E, Dasuki D, dan Soejono SK. *Efek Kurkumin Sintesis dan Pentagamavunon-0 terhadap Produksi Progesteron Kultur Sel Luteal*

- dengan Pemberian Forskolin. *Jurnal Kedokteran Yarsi*. 2007; 15(3): 171–177.
5. Nurcahyo H. *Steroidogenesis, Proliferasi, dan Apoptosis pada Kultur Sel Granulosa Berbagai Ukuran Folikel Ovarium Babi setelah pemberian Kurkumin atau Pentagamavunon-0 dengan Rangsangan FSH, LH, dan/atau PGF2 α* . [Disertasi]. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 2003.
 6. Rajuddin. *Kurkumin pada Proses Steroidogenesis dan Folikulogenesis pada Wanita Subur: Kajian Terhadap Kadar LH, Estradiol, Progesteron, dan Ekspresi Cox-2, VEGF, Ketebalan Endometrium dan Ukuran Folikel Ovarium*. [Disertasi]. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta; 2015.
 7. Pelletier G and El-Alfy M. *Immunocytochemical Localization of Estrogen Receptors Alpha and Beta in The Human Reproductive Organs*. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000; 85(12): 4835–4840.
 8. Pavlik R, Wypior G, Hecht S, Papadopoulos P, Kupka M, Thaler C, et al. *Induction of G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) and Nuclear Steroid Hormone Receptors by Gonadotropins in Human Granulosa Cells*. *Histochemistry and Cell Biology*. 2011; 136(3): 289–299.
 9. Lindeberg M, Carlstrom K, Ritvos O, and Hovatta OJ. *Gonadotropin Stimulation of Non-Luteinized Granulosa Cells Increases Steroid Production and The Expression of Enzymes Involved in Estrogen and Progesterone Synthesis*. *Human Reproduction*. 2007; 22(2): 401–406.
 10. Duffy DM and Stouffer RL. *The Ovulatory Gonadotropins Surge Stimulates Cyclooxygenase Expression and Prostaglandin Production by the Monkey Follicle*. *Molecular Human Reproduction*. 2001; 7(8): 731–739.
 11. Tsai SJ and Wiltbank MC. *Differential Effects of Prostaglandin F2 α on In Vitro Luteinized Bovine Granulosa Cells*. *Reproduction*. 2001; 122(2): 245–253.
 12. DeAngelis AM, Roy-O'Reilly M, and Rodriguez A. *Genetic Alterations Affecting Cholesterol Metabolism and Human Fertility*. *Biology of Reproduction*. 2014; 91(5): 117.
 13. Jamnongjit M and Hammes SR. *Ovarian Steroids: The Good, the Bad, and the Signals that Raise Them*. *Cell Cycle*. 2006; 5(11): 1178–1183.
 14. Terranova PF. *The Female Reproductive System*. In: Rhoades RA and Tanner GA (Eds). *Medical Physiology* 2nd edition. Baltimore, New York: Lippincott William & Wilkins; 2003: p. 667-683.
 15. Wood JR and Strauss JF. *Multiple Signal Transduction Pathways Regulate Ovarian Steroidogenesis*. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. 2002; 3(1): 33–46.
 16. Goravanahally MP, Sen A, Inskeep EK, and Flores JA. *PKC Epsilon and an Increase in Intracellular Calcium Concentration are Necessary for PGF2 Alpha to Inhibit LH-Stimulated Progesterone Secretion in Cultured Bovine Steroidogenic Luteal Cells*. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2007; 5: 37.
 17. Chiang CH, Cheng KW, Igarashi S, Nathwani PS, and Leung PC. *Hormonal Regulation of Estrogen Receptor Alpha and Beta Gene Expression in Human Granulosa-Luteal Cells In Vitro*. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000; 85(10): 3828–3839.
 18. Syarif RA and Soejono SK. *Mekanisme Kerja Kurkumin sebagai Antifertilitas: Kajian Aktivitas 3 β Hydroxysteroid Dehydrogenase oleh Kultur Sel Luteal Tikus secara Sitokimia*. Abstrak dan Program PITNAS I Pefardi "Implementasi Ilmu Farmasi Kedokteran dalam Praktek Kedokteran dan Aplikasi Klinik Hasil Pengembangan Obat Herbal". Bandung; 2011; p.41
 19. Purwaningsih E. *Sasaran Aksi Kurkumin dan Pentagamavunon-0 pada Steroidogenesis: Kajian Kadar cAMP, Fosforilasi Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK) dan Ekspresi Sitokrom P450scc pada Kultur Sel Luteal* [Disertasi]. Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 2009.
 20. Asahara S, Sato A, Aljonaid AA, and Maruo T. *Thyroid Hormone Synergizes with Follicle Stimulating Hormone to Inhibit Apoptosis in Porcine Granulosa Cells Selectively from Small Follicles*. *The Kobe Journal of Medical Sciences*. 2003; 49(5-6): 107–116.
 21. MyAssays. *Four Parameter Logistic Curve*. (Online) 2014. Available from: <http://www.myassays.com/four-parameter-logistic-curve.assay>. [diakses tanggal 15 Februari 2015].
 22. Syarif RA, Sunaryo RB, Haposan JH, Wahyuningsih MSH, dan Soejono SK. *Pengaruh Kurkumin dan Ekstrak Etanol Kunyit (Curcuma longa L) terhadap Viabilitas Kultur Sel Granulosa Ovarium Babi*. *Prosiding Peluang dan Tantangan Obat Tradisional dalam pelayanan Kesehatan Formal*. Yogyakarta, 15 Maret 2014; p 270-277.
 23. Hylka VW and diZerega GS. *Granulosa Cells from Pig Follicles of Different Sizes Demonstrate Maturational Differences in Their Steroidogenic Responses to FSH, Calcium Ionophore A23187, and Phorbol Diester*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1990; 89(1): 181–191.
 24. Murphy BD. *Models of Luteinization*. *Biology of Reproduction*. 2000; 63(1): 2–11.
 25. Abdennebi L, Monget P, Pisselet C, Remy JJ, Salesse R, and Monniaux D. *Comparative Expression of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone Receptors in Ovarian Follicles from High and Low Prolific Sheep Breeds*. *Biology of Reproduction*. 1999; 60(4): 845–854.
 26. Silva JM and Price CA. *Effect of Follicle-Stimulating Hormone on Steroid Secretion and Messenger Ribonucleic Acids Encoding Cytochromes P450 Aromatase and Cholesterol Side-Chain Cleavage in Bovine Granulosa Cells In Vitro*. *Biology of Reproduction*. 2000; 62(1): 186–191.
 27. Shanmugam M, Pandita S, and Palta P. *Effects of FSH and LH on Steroid Production by Buffalo (Bubalus Bubalis) Granulosa Cells Cultured In Vitro under Serum-Free Conditions*. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010; 45(5): 922–926.
 28. Zhao E and Mu Q. *Phytoestrogen Biological Actions on*

- Mammalian Reproductive System and Cancer Growth*. Scientia Pharmaceutica. 2011; 79(1): 1–20.
29. Berndtson AK, Weaver CJ, and Fortune JE. *Differential Effects of Oxytocin on Steroid Production by Bovine Granulosa Cells*. Molecular and Cellular Endocrinology. 1996; 116(2): 191–198.
 30. Sharma SC, Clemens JW, Pisarska MD, and Richards JS. *Expression and Function of Estrogen Receptor Subtypes in Granulosa Cells: Regulation by Estradiol and Forskolin*. Endocrinology. 1999; 140(9): 4320–4334.
 31. Yang P. *Expression of ER-alpha and ER-beta in the Hamster Ovary: Differential Regulation by Gonadotropins and Ovarian Steroid Hormones*. Endocrinology. 2002; 143(6): 2385–2398.
 32. Li XM, Juorio AV, and Murphy BD. *Prostaglandins Alter the Abundance of Messenger Ribonucleic Acid for Steroidogenic Enzymes in Cultured Porcine Granulosa Cells*. Biology of Reproduction. 1993; 48(6): 1360–1366.
 33. Shea-Eaton W, Sandhoff TW, Lopez D, Hales DB, and McLean MP. *Transcriptional Repression of the Rat Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Protein Gene by the AP-1 Family Member C-Fos*. Molecular and Cellular Endocrinology. 2002; 188(1-2): 161–170.
 34. Gupta SC, Prasad S, Kim JH, et al. *Multitargeting by Curcumin as Revealed by Molecular Interaction Studies*. Natural Product Reports. 2011; 28(12): 1937–1955.
 35. Jaruga E, Salvioli S, Dobrucki J, et al. *Apoptosis-like, Reversible Changes in Plasma Membrane Asymmetry and Permeability, and Transient Modifications in Mitochondrial Membrane Potential Induced by Curcumin in Rat Thymocytes*. FEBS Letters. 1998; 433(3): 287–293.
 36. Gonzalez-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S, Firestone GL, and Richards JS. *Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Stimulates Phosphorylation and Activation of Protein Kinase B (PKB/Akt) and Serum and Glucocorticoid-Induced Kinase (Sgk): Evidence for A Kinase-Independent Signaling by FSH in Granulosa Cells*. Molecular Endocrinology. 2000; 14(8): 1283–1300.
 37. Tajima K, Dantes A, Yao Z, et al. *Down-Regulation of Steroidogenic Response to Gonadotropins in Human and Rat Preovulatory Granulosa Cells Involves Mitogen-Activated Protein Kinase Activation and Modulation of DAX-1 and Steroidogenic Factor-1*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2003; 88(5): 2288–2299.
 38. Yu F-Q, Han C-S, Yang W, Jin X, Hu ZY, and Liu YX. *Activation of the P38 MAPK Pathway by Follicle-Stimulating Hormone Regulates Steroidogenesis in Granulosa Cells Differentially*. The Journal of Endocrinology. 2005; 186(1): 85–96.
 39. Lupulescu AP. *Cytologic and Metabolic Effects of Prostaglandins on Rat Skin*. The Journal of Investigative Dermatology. 1977; 68(3): 138–145.
 40. Minegishi T, Nakamura K, Yamashita S, Ikeda S, and Kogure K. *Regulation of Human Luteinizing Hormone Receptor in the Ovary*. Reproductive Medicine and Biology. 2008; 7(1): 11–16.
 41. Couse JF, Yates MM, Deroo BJ, and Korach KS. *Estrogen Receptor-Beta is Critical to Granulosa Cell Differentiation and the Ovulatory Response to Gonadotropins*. Endocrinology. 2005; 146(8): 3247–3262.
 42. Jansen HT, West C, Lehman MN, and Padmanabhan V. *Ovarian Estrogen Receptor-Beta (ERbeta) Regulation: I. Changes In ERbeta Messenger RNA Expression Prior to Ovulation in the Ewe*. Biology of Reproduction. 2001; 65(3): 866–872.