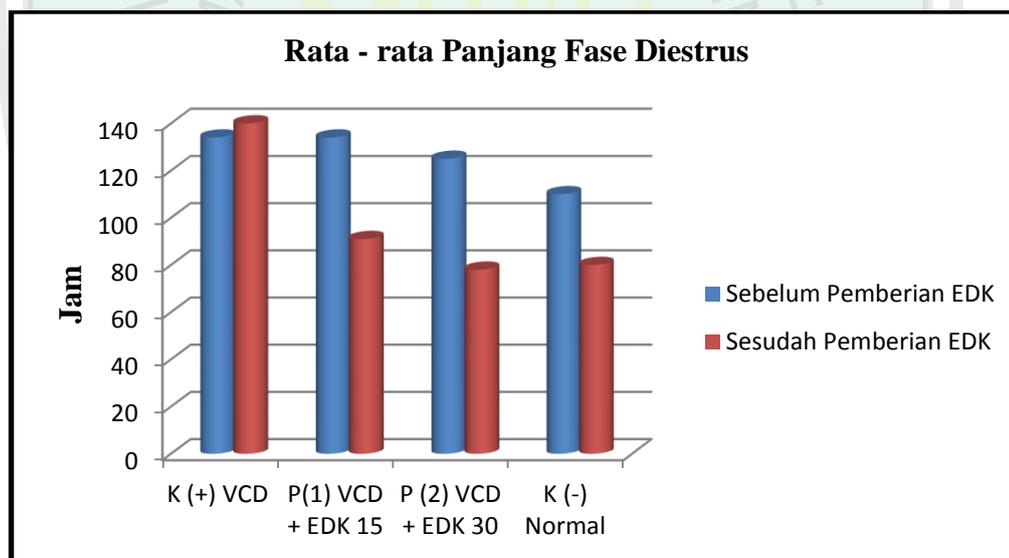


BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Ekstrak Air Daun Katu (*Sauropuss androgynus* (L.) Merr) terhadap Panjang Fase Diestrus Mencit (*Mus musculus* L.) Betina Premenopause

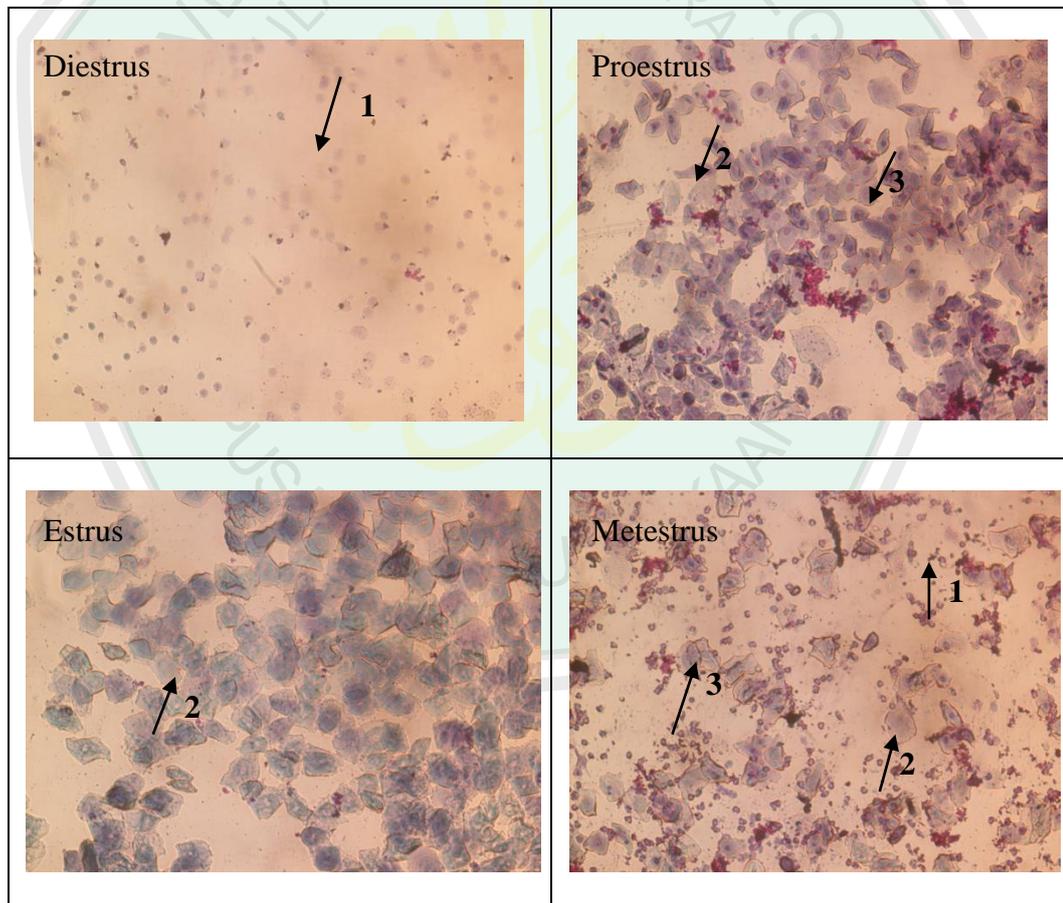
Pengukuran panjang fase diestrus mencit (*Mus musculus* L.) betina premenopause dilakukan dengan pengamatan apusan vagina sesudah pemberian VCD (sebelum perlakuan) dan sesudah pemberian ekstrak air daun katu (sesudah perlakuan). Adapun hasil pengamatan panjang fase diestrus seperti diagram pada gambar 4.1.



Gambar 4.1. Diagram Perbedaan Panjang Fase Diestrus Mencit Betina Premenopause Sebelum dan Sesudah Pemberian Perlakuan Ekstrak Air Daun Katu. Keterangan : K (+) = VCD, tanpa terapi, P (2) = VCD + Ekstrak Air Daun Katu (EDK) 30 mg/kgBB 30 hari, P (1) = VCD + Ekstrak Air Daun Katu (EDK) 15 mg/kgBB 30 hari, K (-) = Normal.

Diagram pada Gambar 4.1 tersebut, menunjukkan bahwa terdapat peningkatan rata-rata panjang fase diestrus dari kelompok kontrol positif (K+), P(1) (perlakuan dosis 15 mg/kgBB), dan P(2) (perlakuan dosis 30 mg/kgBB). Sesudah pemberian ekstrak air daun katu, rata-rata panjang fase diestrus

mengalami penurunan pada kelompok P(1) (perlakuan dosis 15 mg/kgBB), dan P(2) (perlakuan dosis 30 mg/kgBB). Pengamatan apusan vagina pada kelompok P(1) dan P(2) terdapat fase selain fase diestrus yaitu fase proestrus, fase estrus, dan fase metestrus. Gambar apusan vagina setelah diberi pewarna Giemsa, diamati dengan mikroskop komputer binokuler CX Olympus CX31 untuk mengamati jenis-jenis sel yang terdapat di apusan vagina dan menentukan fase dalam siklus estrus. Hasil pengamatan panjang fase diestrus pada apusan mencit betina premenopause dalam 4 fase tersebut seperti pada gambar gambar 4.2.



Gambar 4.2. Gambaran apusan vagina yang memperlihatkan fase-fase dalam siklus estrus. Keterangan: 1. Leukosit, 2. Sel Kornifikasi, 3. Sel epitel berinti (perbesaran 100x).

Berdasarkan uji normalitas dengan Kolmogorov Smirnov serta uji homogenitas Lavene dari data panjang fase diestrus yang didapatkan menunjukkan bahwa data panjang fase diestrus mencit premenopause berdistribusi normal ($p > 0.05$) (Lampiran 4), selanjutnya dilakukan analisis data dengan One Way ANOVA tentang pengaruh ekstrak air daun katu terhadap panjang fase diestrus mencit premenopause. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa bahwa F_{hitung} (sebelum dan sesudah perlakuan) $> F_{tab1\%}$, hal tersebut menunjukkan bahwa ada pengaruh yang sangat nyata dari pemberian ekstrak air daun katu terhadap panjang fase diestrus sebagaimana yang tercantum dalam tabel 4.1.

Tabel 4.1 Ringkasan ANOVA Panjang Fase Diestrus Mencit Betina Premenopause Sebelum dan Sesudah Perlakuan Ekstrak Air Daun Katu

SK	db		JK		KT		Fhit		Ftab 1%	
	a	b	a	B	a	b	a	b	a	b
Perlakuan	3	3	2006.4	12928	668.8	4309.3	5.88**	62.6	5.29**	5.29
Galat	16	16	2124.8	1100.8	132.8	68.8				
Total	19	19	4131.2	14028.8						

Keterangan: (a) Sebelum Perlakuan Ekstrak Air Daun Katu (*Sauropus androgynus* (L.) Merr), (b) Sesudah Perlakuan Ekstrak Air Daun Katu (*Sauropus androgynus* (L.) Merr), (***)Data panjang fase diestrus berbeda sangat nyata.

Berdasarkan tabel 4.1, diketahui bahwa hasil panjang fase diestrus mencit sebelum pemberian ekstrak air daun katu (setelah pemberian VCD) dan sesudah pemberian ekstrak air daun katu berpengaruh sangat nyata. Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan yang ada, maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 1%. Berdasarkan hasil uji BNT 1% dari rata-rata panjang fase diestrus mencit, maka didapatkan notasi BNT seperti pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Ringkasan BNT 1% Panjang Fase Diestrus Mencit Betina Premenopause Sebelum dan Sesudah Perlakuan Ekstrak Air Daun Katu

Perlakuan	Rataan Panjang Fase Diestrus	
	Sebelum Perlakuan	Sesudah Perlakuan
K (+)	134.4 ± 8,76 ^b	140.8 ± 4,38 ^b
P (1)	134.4 ± 13,14 ^b	91.2 ± 12,13 ^a
P (2)	125.6 ± 10,43 ^b	78.4 ± 6,69 ^a
K (-)	110.4 ± 8,76 ^a	80 ± 8 ^a

Keterangan: huruf *superscript* yang berbeda pada kolom yang sama menyatakan adanya perbedaan sangat nyata ($p < 0,01$) antar kelompok perlakuan.

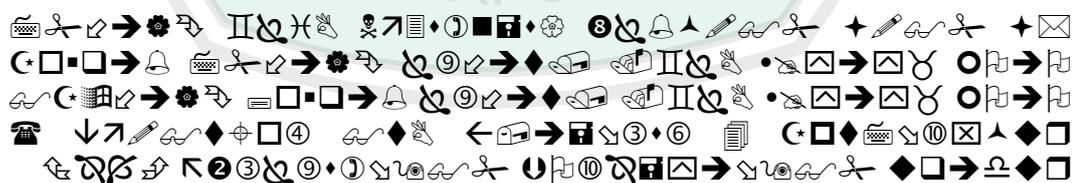
Berdasarkan tabel 4.2, dari rata-rata panjang fase diestrus mencit (*Mus musculus* L.) betina premenopause sebelum pemberian ekstrak air daun katu (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) menunjukkan bahwa pemberian VCD pada kelompok K(+) mempunyai efek yang sama dengan kelompok P(1) dan P(2). Data uji BNT 1% menunjukkan sebelum pemberian VCD, hasil yang diperoleh berpengaruh sangat nyata terhadap panjang fase diestrus mencit betina, sehingga mencit menjadi premenopause dengan fase diestrus ≥ 5 hari (120 jam). Data uji BNT 1% menunjukkan panjang fase diestrus sebelum pemberian ekstrak air daun katu kelompok K(+), P(1), dan P(2) mencit mengalami pemanjangan (> 120 jam) dibandingkan kelompok K(-).

Setelah pemberian ekstrak air daun katu, hasil yang diperoleh berpengaruh sangat nyata terhadap panjang fase diestrus mencit betina premenopause dengan fase diestrus ≤ 5 hari. Hasil uji BNT 1% menunjukkan pemberian ekstrak air daun katu pada kelompok P(1) dan P(2) berpengaruh sangat nyata terhadap panjang fase diestrus mencit betina premenopause, sehingga fase diestrus mencit menurun menjadi normal ($\pm 72-84$ jam).

Setelah pemberian ekstrak air daun katu, diketahui bahwa ekstrak air daun katu berpengaruh sangat nyata dalam taraf signifikansi 1% terhadap kelompok

P(1) (dosis 15 mg/kgBB) dan P(2) (dosis 15 mg/kgBB) secara statistik mempunyai notasi yang sama dengan kelompok K(-), sehingga dapat disimpulkan bahwa panjang fase diestrus kelompok P(1) dan P(2) normal. Apabila dibandingkan antara kelompok perlakuan P(1) yakni pemberian ekstrak air daun katu dosis 15 mg/kgBB dengan kelompok P(2) yakni dosis 30 mg/kgBB, terlihat bahwa hasil penurunan panjang fase diestrus sejalan dengan lebih tingginya dosis ekstrak air daun katu.

Premenopause merupakan awal perubahan fisiologi dalam tubuh wanita. Perubahan tersebut menimbulkan keluhan pada wanita. Manusia mengalami perubahan secara fisik dan fisiologinya secara umum dan bertahap sesuai dengan umur (Shihab, 2002). Pada wanita, pada saat umur memasuki tua ada beberapa tanda. Tanda yang dapat diamati secara fisik salah satunya adalah tumbuhnya uban di kepala, sedangkan perubahan fisiologisnya yaitu mengalami penurunan fungsi tubuh seperti organ reproduksi yang dapat menyebabkan menopause. Perubahan tahap yang dialami oleh manusia dijelaskan dalam al-Quran Surat al-Ruum (QS 30): 54



Artinya : “Allah-lah yang menciptakan kamu dari keadaan lemah, kemudian menjadikan kamu sesudah lemah menjadi kuat, setelah kuat, lemah lagi dan beruban”.

Penurunan fungsi reproduksi yang dialami oleh wanita karena umur dapat menyebabkan menopause. Sebelum memasuki fase menopause, wanita akan

memasuki fase premenopause (premenopause) yang ditandai dengan siklus haid yang memanjang dan atrofi vagina (Baziad, 2003). Fase premenopause pada mencit ditandai dengan fase diestrus yang memanjang > 120 jam (Craig *et al*, 2010). Pemberian VCD pada mencit, akan memicu kegagalan ovarium dengan cara merusak folikel primordial dan folikel primer. Keadaan ini disebut periode periovarium, hal ini sama dengan fase perimenopause pada wanita

Pengamatan terhadap panjang fase diestrus kelompok yang diinjeksi VCD (*4-Vinylcyclohexene Dioxide*) menunjukkan hasil yang sama ($p < 0,01$) yaitu rata-rata fase diestrusnya memanjang. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok K(+), P(1), dan P(2) yang diinjeksi VCD mengalami kegagalan ovarium dan kerusakan folikel primordial serta folikel primer (Stanic, 2008; Budi, 2006).

Perubahan kadar hormon estrogen dalam tubuh akan mempengaruhi sel epitel vagina yang mengalami deskuamasi (terkelupas) ke lumen vagina. Penurunan kadar hormon estrogen pada mencit betina premenopause setelah diinjeksi VCD, pada gambaran apusan vagina hanya terdapat leukosit. Menurut Junquera dan Carnero (1982), defisiensi hormon menyebabkan sel epitel menjadi tipis, tanpa disertai sel-sel kornifikasi. Menurut Turner dan Bagnara (1988), mukosa vagina yang tipis pada fase diestrus menyebabkan leukosit dapat bermigrasi ke lumen vagina. Leukosit yang terdapat pada apusan vagina adalah sel-sel parabasal dari epitel vagina yang terkelupas ke lumen vagina (Junquera dan Carnero, 1982).

Secara alami, proses atresia (regresi atau regenerasi) di ovarium terjadi pada fase luteal akhir (metestrus akhir atau awal diestrus). Atresia adalah proses

kematian sel tunggal secara terencana (apoptosis). Saat kadar LH menurun, maka produksi estrogen lokal juga menurun. Hal ini menyebabkan aromatisasi androgen menjadi estradiol menurun. Sehingga kandungan androgen di folikel meningkat. Folikel dengan androgen yang meningkat merupakan penyebab alami atresi di ovarium (Kuslestari, 2008).

VCD (*4-Vinylcyclohexene Dioxide*) meningkatkan proses atresia alami di ovarium dengan cara apoptosis pada folikel primordial dan folikel primer (An Official Journal of the Society of Toxicology, 2010). Pada tingkat molekuler ada 3 fase dalam apoptosis, yaitu fase inisiasi, fase eksekusi, dan fase terminasi (Hadi, 2011).

Mekanisme kerja apoptosis dari VCD adalah melalui jalur intrinsik (*death receptor pathway*). VCD meningkatkan Bax (*B-cell lymphoma -2 associated x protein*). Bax adalah protein sinyal apoptosis sel yang dapat memotong kromosom dan membunuh sel dari dalam (Robinson, 2005). Bax melakukan penetrasi ke membran mitokondria. Hal ini akan memicu keluarnya sitokrom c dari mitokondria dan mengakibatkan meningkatnya caspase-3. Adanya faktor penstimulasi apoptosis dari jalur intrinsik (*death receptor pathway*) menunjukkan fase inisiasi. Kemudian masuk ke fase eksekusi yang ditandai dengan penggelembungan membran sel, fragmentasi inti, kondensasi kromatin, dan degradasi DNA. Fase terminasi merupakan fase akhir dari proses apoptosis, dimana pada fase ini sel apoptotik difagositosis oleh sel-sel fagosit (Hadi, 2011). Proses apoptosis pada folikel primordial dan folikel primer menyebabkan hancurnya folikel preantral (folikel primordial, folikel primer, dan folikel

sekunder. Folikel primordial dan folikel primer yang terapoptosis, menyebabkan kadar hormon estrogen dan LH dalam tubuh menurun. Hal ini mengakibatkan terganggunya siklus folikelgenesis di ovarium, sehingga fase diestrus pada mencit betina premenopause memanjang.

Hasil data panjang fase diestrus setelah pemberian perlakuan ekstrak air daun katuk mengalami perubahan. Kelompok P(1) dan P(2) pada saat diamati apusan vagina selain fase diestrus yang memendek ($p < 0.01$). Panjang fase diestrus kelompok P(2) lebih pendek (mendekati normal) dibandingkan panjang fase diestrus kelompok P(1). Hal ini menunjukkan bahwa dosis kelompok P(2) yaitu 30 mg/kgBB lebih optimal menormalkan panjang fase diestrus karena mempunyai kandungan senyawa aktif yang lebih tinggi dibandingkan dosis P1. Selain itu, pada pengamatan panjang fase-fase selama siklus estrus pada kelompok P(1) dan P(2) terdapat fase proestrus, estrus, metestrus yang menunjukkan bahwa terjadi proses siklus estrus pada mencit betina premenopause kelompok P(1) dan P(2).

Peningkatan kadar hormon estrogen pada mencit betina premenopause setelah pemberian ekstrak air daun katuk, pada gambaran apusan vagina terdapat berbagai jenis sel. Pada fase proestrus terdapat sel epitel berinti dan sedikit epitel kornifikasi. Fase estrus terdapat sel epitel kornifikasi dan fase metestrus terdapat sel epitel kornifikasi, sel epitel berinti, dan leukosit. Menurut Junquera dan Carnero (1982), sel epitel berinti berasal dari sel sel intermediet, sel epitel kornifikasi berasal dari sel superfisial, dan leukosit berasal dari sel parabasal. Sel parabasal, sel intermediet, dan sel superfisial merupakan sel yang berada di epitel vagina dan proliferasinya dipengaruhi oleh kadar hormon estrogen dalam tubuh.

Daun katuk sedikitnya mengandung 7 senyawa aktif yang dapat merangsang pembentukan hormon-hormon steroid (diantaranya progesteron, estradiol, testosteron, glukokortikoid) dan senyawa eikosanoid (seperti prostaglandin, prostasiklin, tromboksan, lipoksin, leukotrin) (Apriadi, 2007). Ekstrak air daun katuk yang digunakan, setelah diuji di laboratorium kimia UMM Malang telah teridentifikasi mengandung senyawa deidzein dan genistein. Genistein adalah salah satu turunan senyawa isoflavon. Menurut Lacy and O'Kennedy (2004), struktur senyawa genistein dan estradiol (E_2) hampir mirip dan mempunyai efek estrogenik. Struktur isoflavon yang menyerupai $17-\beta$ -estradiol, maka isoflavon mampu berikatan dengan reseptor estrogen (ER). ER adalah anggota reseptor intraseluler dari superfamili steroid di membran nukleus. Interaksi isoflavon dengan ER akan mengaktifasi elemen respon estrogen (respon estrogenik) yang berada di sisi dalam membran nukleus. Di dalam struktur genom, hal ini akan mempengaruhi proses transkripsi (Pilsakova *et al*, 2010).

Fitoestrogen yang paling estrogenik adalah genistein dan deidzein (Darmadi dkk, 2011). Genistein memiliki afinitas lebih besar daripada deidzein terhadap ER- β . Namun efek genistein lebih efektif pada ER- α daripada ER- β . Hal ini terjadi karena ikatan reseptor α bersifat agonis penuh, dan reseptor β agonis parsial (Sutrisno, 2010). Kadar estrogen yang tinggi akan merangsang maturasi folikel de Graaf dari folikel primordial dan folikel primer di ovarium. Hal ini dapat mempercepat foliklogenesis dan fase diestrus menuju fase estrus.

Mekanisme kerja ekstrak air daun katuk yang mengandung isoflavon sebagai salah satu jenis fitoestrogen untuk mengurangi gejala premenopause

panjang diestrus mencit betina premenopause adalah melalui mekanisme genomik secara langsung. Mekanisme secara langsung yaitu fitoestrogen langsung berikatan dengan reseptor estrogen (ER) dan mempengaruhi transkripsi gen, sehingga dapat menimbulkan efek seperti estrogen (efek estrogenik) (Sutrisno, 2010). Implikasi klinis isoflavon, tergantung pada beberapa faktor termasuk jumlah reseptor yang dapat *binding* dengan isoflavon, letak reseptor, dan konsentrasi estrogen yang mampu bersaing dengan isoflavon (Winarsi, 2005).

Klein (1998) dalam Sitasiwi (2009) menyatakan bahwa reseptor estrogen dalam jaringan tubuh terdiri dari 2 macam, yaitu reseptor alfa (RE α) dan reseptor beta (RE β) dengan tempat distribusi yang berbeda. Reseptor α lebih banyak terdistribusi pada jaringan penyusun organ reproduksi. Vagina merupakan salah satu organ reproduksi, sehingga reseptor estrogen yang terdapat di vagina adalah reseptor alfa (RE α).

Interaksi antara isoflavon dengan reseptor estrogen dalam saluran genitalia, menggantikan kerja estrogen pada saluran tersebut (Winarsi, 2005), sehingga keluhan dan gejala premenopause menurun. Kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam daun katuk membuat daun katuk menjadi salah satu jenis tanaman obat yang sering dimanfaatkan masyarakat Indonesia untuk melancarkan ASI bagi wanita yang menyusui. Daun katuk yang dimanfaatkan juga bermacam-macam jenisnya, tetapi senyawa yang dikandung sama.

Tumbuhan yang bermacam-macam yang tumbuh di bumi, dijelaskan dalam al-Quran Surat at-Thaha QS (20): 53



Artinya: “Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam”.

Mencit betina premenopause kelompok P(1) dan P(2) pada pengamatan juga mengalami fase estrus. Hal ini menunjukkan bahwa mencit kelompok P(1) yang diberi ekstrak air daun katu dosis 15 mg/kgBB dan kelompok P(2) yang diberi ekstrak air daun katu 30 mg/kgBB mengalami folikelgenesis. Ekstrak air daun katu yang mengandung isoflavon diduga memicu folikelgenesis di ovarium. Mekanisme kerja dari isoflavon sebagai bahan fitoestrogen yang mampu memberikan efek estrogenik pada mencit betina premenopause adalah isoflavon yang mirip dengan senyawa 17- β estradiol akan berikatan dengan reseptor estrogen (ER α) yang terdapat di membran nukleus, sehingga mengaktifasi elemen respon estrogen disisi dalam membran nukleus.

Agar mampu berikatan dengan reseptornya, fitoestrogen harus menembus sel masuk ke dalam sitoplasma, kemudian akan berikatan dengan reseptor estrogen di sitoplasma membentuk ikatan hormon-reseptor pada *Estrogen Responsive Element* (ERE) yang kemudian bergerak menuju inti sel untuk berikatan dengan DNA, setelah berikatan dengan DNA maka akan terjadi proses transkripsi sel untuk membentuk protein – protein khusus yang diperlukan dalam

pembelahan sel. Ketika proses transkripsi sintesis protein, kompleks fitoestrogen-reseptor estrogen tidak hanya berikatan dengan ERE namun juga berikatan dengan *co-regulator*. *Co-regulator* terdiri dari *co-activator* yang berfungsi untuk menginduksi terjadinya proses transkripsi gen dari ikatan kompleks fitoestrogen-reseptor estrogen, sehingga dapat diproduksi suatu *messenger*-RNA (mRNA) yang mengakibatkan terjadinya sintesis protein sesuai dengan karakteristik hormon, sedangkan *co-repressor* akan bekerja sebaliknya yakni menghambat proses transkripsi gen (Gruber, 2002). Hal ini akan mempengaruhi transkripsi dan translasi serta proses maturasi folikelgenesis dari folikel preantral menjadi folikel antral, sehingga memicu ovulasi dari folikel de Graaf dan terbentuknya korpus luteum yang menghasilkan estrogen.

Pengamatan terhadap panjang fase diestrus, pada kelompok P(1) dan P(2) terdapat fase lainnya yaitu fase proestrus, estrus, dan metestrus. Perubahan pada siklus estrus juga diiringi dengan perubahan hormonal dan perubahan ovarium. Mencit merupakan hewan coba yang dalam periode satu tahun terjadi siklus reproduksi yang berulang-ulang (poliestrus).

Proestrus adalah fase sebelum estrus yaitu periode dimana folikel ovarium tumbuh menjadi folikel de graaf dibawah pengaruh FSH. Fase ini berlangsung 12 jam. Setiap folikel mengalami pertumbuhan yang cepat selama 2-3 hari sebelum estrus. Sistem reproduksi memulai persiapan-persiapan untuk pelepasan ovum dari ovarium. Akibatnya sekresi estrogen dalam darah semakin meningkat sehingga akan menimbulkan perubahan-perubahan fisiologis dan saraf, disertai kelakuan birahi pada hewan-hewan

betina peliharaan. Perubahan fisiologis tersebut meliputi pertumbuhan folikel, meningkatnya pertumbuhan endometrium, uteri dan serviks serta peningkatan vaskularisasi dan keratinisasi epitel vagina pada beberapa spesies. Preparat apus vagina pada fase proestrus ditandai adanya sel epitel berinti dan sel darah putih berkurang, digantikandengan sel epitel bertanduk, dan terdapat lendir yang banyak (Akbar, 2010).

Fase estrus adalah fase birahi hewan coba dimana folikel siap untuk diovulasikan. Apusan vagina pada mencit yang mengalami fase estrus menunjukkan dominasi sel epitel bertanduk (kornifikasi). Sel epitel kornifikasi adalah sel epitel superfisial yang mengalami deskuamasi (mengelupas) ke lumen vagina. Sel superfisial adalah sel terbesar yang dapat dilihat pada saat apusan vagina, berbentuk poligonal dan tidak terdapat inti. Lapisan superfisial adalah lapisan yang tebal dan dipengaruhi oleh kadar estradiol dalam tubuh (Nalley, dkk, 2011; Karlina, 2003).

Fase estrus berlangsung selama 12 jam. Perubahan yang terjadi di ovarium adalah folikel de Graaf membesar dan menjadi matang serta ovum mengalami perubahan-perubahan kearah pematangan. Ovulasi yang terjadi pada fase ini dan terjadi menjelang akhir siklus estrus. Folikel yang matang akan terus memproduksi estrogen, akibatnya estrogen dalam darah menjadi tinggi. Kadar estrogen yang tinggi dalam darah, merangsang GnRH untuk memproduksi LH. Hal ini membuat folikel ovarium menjadi matang dan siap untuk ovulasi. Sedangkan fase diestrus terjadi selama 72 jam. Perubahan yang terjadi di ovarium

adalah korpus luteum menjadi matang dan mampu memproduksi estrogen dan progesteron sendiri (Akbar, 2010).

Perubahan hormonal menciut pada fase estrus diawali dengan sekresi GnRH. GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) merupakan hormon yang disintesis di hipotalamus dan disekresikan ke hipofisis anterior melalui vena porta hipotalamo-hipofisis. Hipofisis anterior tidak mempunyai serabut saraf. Pelepasan hormon-hormonnya dirangsang oleh faktor-faktor hormonal melalui pembuluh darah. GnRH ini akan mempengaruhi sekresi FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dan LH (*Luteinizing Hormone*) dari hipofisis anterior. FSH dan LH akan merangsang ovarium untuk mensekresikan hormon estrogen dan progesteron yang akan mempengaruhi siklus estrus. Pada fase proestrus folikel-folikel ovarium masih dalam ukuran kecil. Adanya FSH yang disintesis di hipofisis anterior menyebabkan sel-sel granulosa yang terdapat di dalam folikel akan cepat menjadi banyak. Kemudian akan terbentuk ruangan dalam folikel. Folikel ini disebut folikel de Graaf. Pada sel-sel granulosa di dalam folikel de Graaf akan dihasilkan estrogen (Akbar, 2010).

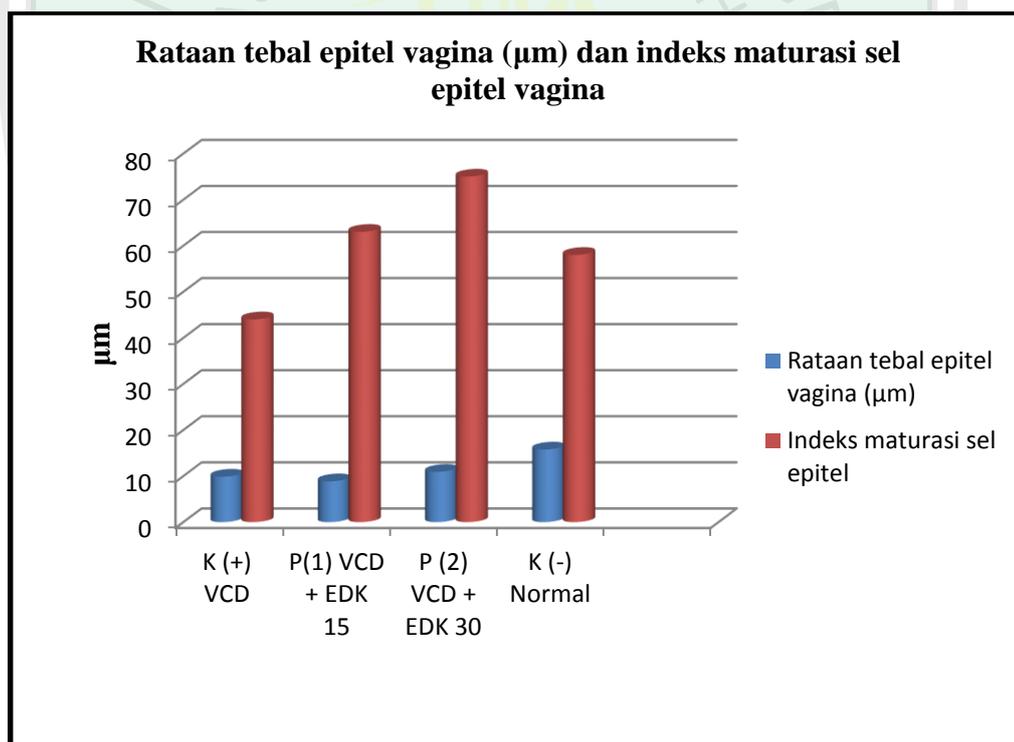
Estrogen berperan untuk merangsang proliferasi epitel vagina dan folikel ovarium menjadi matang dan siap untuk ovulasi. Folikel yang matang akan terus memproduksi estrogen, akibatnya estrogen dalam darah menjadi tinggi. Kadar estrogen yang tinggi dalam darah menandakan menciut sedang dalam fase estrus dan estrogen ini akan merangsang GnRH untuk memproduksi LH. Pada tahap berikutnya akibat terus dihasilkannya LH, maka akan terjadilanjakan LH untuk terjadinya ovulasi. Setelah oosit II ke luar, maka

folikel berubah menjadi korpus luteum yang mampu menghasilkan progesteron. Progesteron menyebabkan perubahan-perubahan endometrium berupa perubahan lapisan endometrium. Lapisan endometrium ini dipersiapkan untuk terjadinya implantasi. Fase pembentukan lapisan ini terjadi pada fase metestrus. Pada fase berikutnya yaitu diestrus, korpus luteum mampu memproduksi estrogen dan progesteron sendiri. Jika tidak terjadi implantasi maka tidak terbentuk plasenta, sehingga kadar estrogen dan progesteron akan menurun. Menurunnya kadar progesteron menyebabkan terjadinya pengelupasan lapisan endometrium (Akbar, 2010).

Metestrus adalah periode segera sesudah estrus di mana korpus luteum bertumbuh cepat dari sel granulosa folikel yang telah pecah dibawah pengaruh LH dan adenohipofisis. Metestrus sebagian besar berada di bawah pengaruh progesteron yang dihasilkan oleh korpus luteum. Progesteron menghambat sekresi FSH oleh adenohipofisis sehingga menghambat pembentukan folikel de Graaf yang lain dan mencegah terjadinya estrus. Selama metestrus uterus mengadakan persiapan-persiapan seperlunya untuk menerima dan memberi makan pada embrio. Menjelang pertengahan sampai akhir metestrus, uterus menjadi agak lunak karena pengenduran otot uterus. Fase ini berlangsung selama 21 jam. Pada preparat apus vagina ciri yang tampak yaitu epitel berinti dan leukosit terlihat lagi dan jumlah epitel menanduk makin lama makin sedikit (Akbar, 2010).

4.2 Pengaruh Ekstrak Air Daun Katu (*Sauropuss androgynus* (L.) Merr) terhadap Proliferasi Epitel Vagina Mencit (*Mus musculus* L.) Betina Premenopause

Pemberian ekstrak air daun katu selain menurunkan panjang fase diestrus juga mempengaruhi proliferasi epitel vagina mencit betina premenopause. Kandungan hormon estrogen yang menurun menyebabkan proliferasi sel-sel epitel vagina terganggu (Yatim, 1994; Nursyah, 2012). Proliferasi epitel vagina mencit betina premenopause dapat dilihat dari ketebalan dan indeks maturasi sel epitel vagina. Ketebalan epitel vagina mencit betina premenopause setelah pemberian ekstrak air daun katu dapat dilihat pada gambar 4.4.



Gambar 4.4 Diagram Tebal Epitel Vagina Mencit (*Mus musculus*L.) Premenopause Setelah Pemberian Perlakuan Ekstrak Air Daun Katu. Keterangan : K (+) = VCD, tanpa terapi, P (2) = VCD + Ekstrak Air Daun Katu (EDK) 30 mg/kgBB selama 30 hari, P (1) = VCD + Ekstrak Air Daun Katu (EDK) 15 mg/kgBB selama 30 hari, K (-) = Normal.

Berdasarkan uji normalitas dengan Kolmogorov Smirnov serta uji homogenitas Lavene menunjukkan bahwa data tebal epitel vagina mencit

premenopause berdistribusi normal ($p > 0,05$) (Lampiran 6), kemudian dilakukan analisis data dengan One Way ANOVA tentang pengaruh ekstrak air daun katu terhadap tebal epitel vagina mencit premenopause. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa F hitung $>$ F tabel 1%. Hal tersebut menunjukkan bahwa ada pengaruh yang sangat nyata dari pemberian ekstrak air daun katu terhadap tebal epitel vagina seperti yang tercantum dalam tabel 4.3.

Tabel 4.3 Ringkasan ANOVA Ketebalan Epitel Vagina (data transformasi) Mencit Premenopause Setelah Pemberian Ekstrak Air Daun Katu

SK	db	JK	KT	Fhit	Ftab 1%
Perlakuan	3	140.30	46.76	26.07**	5,29
Galat	16	28.703	1.79		
Total	19	169.01			

Keterangan : ** Data ketebalan epitel vagina berbeda sangat nyata

Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan yang ada, maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 1%. Berdasarkan hasil uji BNT 1% dari rata-rata ketebalan epitel vagina mencit (*Mus musculus* L.) premenopause, maka diperoleh notasi BNT seperti pada tabel 5.1.

Tabel 4.4 Ringkasan BNT 1% tentang ketebalan epitel vagina (μm) dan indeks maturasi sel epitel vagina setelah pemberian ekstrak air daun katu

Perlakuan	Rataan tebal epitel vagina (μm)	Indeks maturasi epitel vagina	Keterangan
K (+)	9.85 ± 1.84^b	$44,5 \pm 2,98^a$	Efek estrogen rendah
P (1)	8.85 ± 1.32^a	$63,5 \pm 2,55^b$	Efek estrogen sedang
P (2)	10.90 ± 1.52^c	$75 \pm 2,21^c$	Efek estrogen tinggi
K (-)	15.75 ± 0.80^d	$58,5 \pm 2,99^b$	Efek estrogen sedang

Keterangan: huruf *superscript* yang berbeda pada kolom yang sama menyatakan adanya perbedaan nyata ($p < 0,01$) antar kelompok perlakuan.

Berdasarkan pada tabel 4.4 diketahui bahwa pemberian ekstrak air daun katu pada kelompok P(2) (30 mg/kgBB) berbeda dengan kelompok P(1) (15 mg/kgBB). Rataan tebal epitel vagina kelompok P (2) mempunyai nilai yang lebih tinggi dari kelompok P(1) (15 mg/kgBB) dan K(+) yakni mencit premenopause

tanpa pemberian ekstrak air daun katuk. Perbandingan antara kelompok P(2) dengan kelompok kontrol negatif (normal) secara statistik mempunyai notasi yang sama, artinya adalah keduanya tidak berbeda sangat nyata dalam taraf signifikansi 1%. Apabila dibandingkan antara kelompok perlakuan P(1) yakni pemberian ekstrak air daun katuk dosis 15 mg/kgBB dengan kelompok P(2) yakni dosis 30 mg/kgBB, terlihat bahwa hasil peningkatan ketebalan epitel vagina sejalan dengan lebih tingginya dosis ekstrak air daun katuk.

Data yang diperoleh dari pengamatan terhadap proliferasi epitel vagina mencit betina premenopause, diketahui bahwa pemberian ekstrak air daun katuk sebagai bahan fitoestrogen dapat mempengaruhi indeks maturasi sel epitel vagina. Proliferasi epitel vagina mencit betina premenopause dapat dilihat dari indeks maturasi sel epitel vagina. Berdasarkan uji normalitas dengan Kolmogorov Smirnov serta uji homogenitas Lavene menunjukkan bahwa data indeks maturasi sel epitel vagina mencit premenopause berdistribusi normal ($p > 0,05$) (Lampiran 6). Selanjutnya dilakukan analisis data dengan One Way ANOVA tentang pengaruh ekstrak air daun katuk terhadap indeks maturasi sel epitel vagina mencit premenopause. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa F hitung $>$ F tabel 1%. Hal tersebut menunjukkan bahwa ada pengaruh yang sangat nyata dari pemberian ekstrak air daun katuk terhadap berat uterus sebagaimana yang tercantum dalam tabel 4.5.

Tabel 4.5 Ringkasan ANOVA Data Indeks Maturasi Epitel Vagina Mencit Premenopause Setelah Pemberian Ekstrak Air Daun Katu

SK	db	JK	KT	Fhit	Ftab 1%
Perlakuan	3	2395,9375	798,645	108,83**	5,29
Galat	16	117,4140625	7,338		
Total	19	2513,351563			

Keterangan : **Data indeks maturasi epitel vaginaberbeda sangat nyata

Berdasarkan uji BNT 1% pada tabel 4.4, dapat diketahui bahwa indeks maturasi sel epitel vagina kelompok mencit betina premenopause tanpa perlakuan yaitu kelompok K(+) dengan mempunyai IM paling rendah yaitu 44,5. Hal ini menunjukkan efek estrogen terhadap epitel vagina mencit rendah karena hormon estrogen yang menurun setelah pemberian VCD. Kelompok P(1) mempunyai IM 63,5, sedangkan kelompok K(-) dengan notasi (b) mempunyai IM 58,5. Kelompok P(1) dengan dosis ekstrak air daun katu 15 mg/kgBB mengalami sedikit peningkatan indeks maturasi. Indeks maturasi kelompok P(1) menunjukkan efek estrogen terhadap epitel vagina mencit sedang sama dengan kelompok K(-). Dosis 15 mg/kgBB memperbaiki sedikit proliferasi epitel vagina mencit betina premenopause. Indeks maturasi tertinggi pada kelompok P(2) dengan IM 75. Hal ini menunjukkan efek estrogen terhadap epitel vagina mencit tinggi, karena terjadi peningkatan hormon estrogen setelah pemberian ekstrak air daun katu. Hal ini menunjukkan bahwa estrogen pada mencit kelompok P(2) dengan dosis dosis ekstrak air daun katu 30 mg/kgBB berefek tinggi terhadap proliferasi dan maturasi epitel vagina. Dosis yang optimal untuk meningkatkan efek estrogen terhadap proliferasi (indeks maturasi) epitel vagina adalah dosis 30 mg/kgBB.

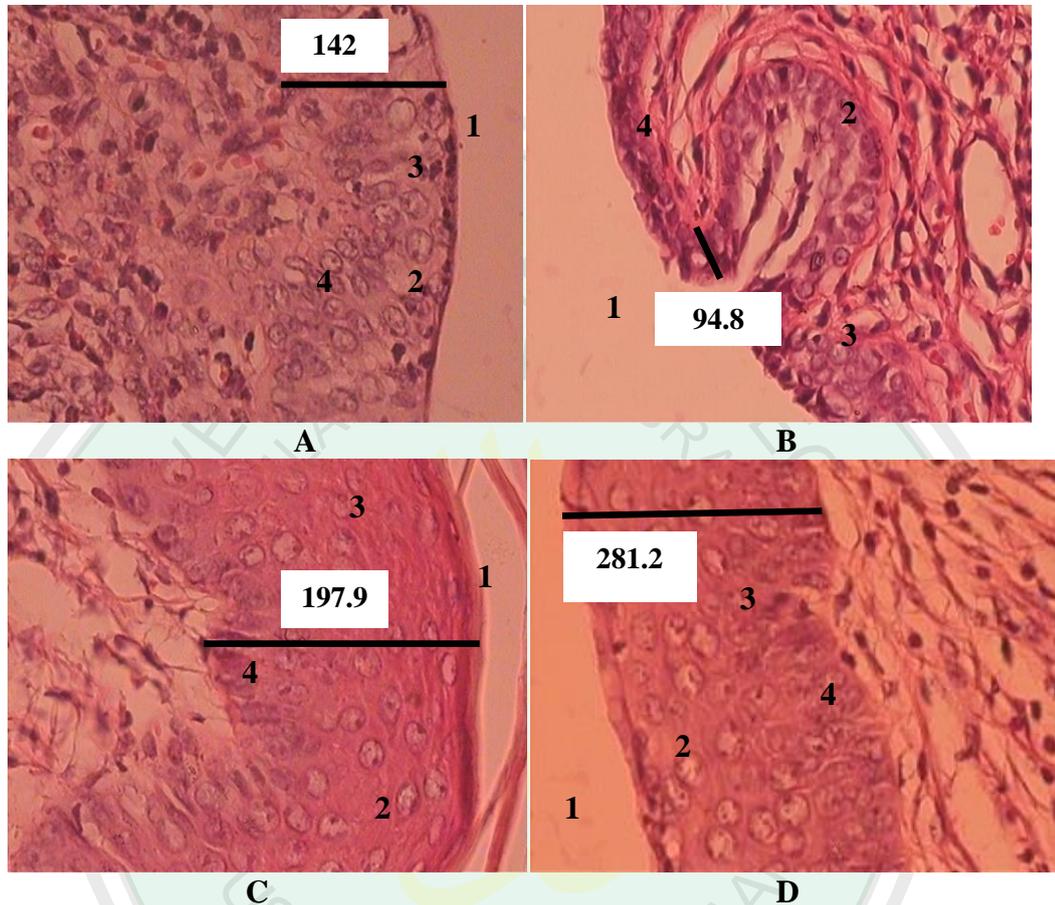
Tabel 4.6 Distribusi sel epitel vagina pada mencit betina premenopause

Kelompok	Rerata Sel Parabasal (%)	Rerata Sel Intermediet (%)	Rerata Sel Superfisial (%)
K (-), Normal	38,15	24,57	37,28
K (+), VCD	41,84	25,51	32,65
P (1), VCD+EDK 15 mg/kgBB	26,78	33,03	40,17
P (2), VCD+EDK 30 mg/kgBB	30,88	27,94	41,17

Berdasarkan tabel 4.6, diketahui bahwa persentase sel parabasal paling banyak terdapat pada kelompok K (+) (VCD) yaitu 41,84%. Hal ini menunjukkan pada kelompok K(+) yang diinjeksi VCD tidak terjadi proses diferensiasi sel epitel vagina. Sedangkan persentase sel superfisial pada kelompok P(1) dengan dosis ekstrak air daun katu 15 mg/kgBB adalah 40,17, sedangkan persentase sel superfisial pada kelompok P2 dengan dosis ekstrak air daun katu 30 mg/kgBB adalah 41,17%. Hal ini menunjukkan bahwa proses diferensiasi sel epitel vagina pada kelompok P(1) dan P(2) berjalan baik. Ketebalan lapisan epitel vagina dan maturasi sel epitel sesuai dengan kandungan hormon estrogen dan usia. Sel superfisial yang banyak menunjukkan banyaknya kandungan hormon estrogen, sedangkan sel parabasal yang banyak menunjukkan sedikitnya hormon estrogen dalam tubuh. Defisiensi estrogen akan mengakibatkan penurunan proliferasi epitel serta maturasi epitel menjadi sel intermediet dan sel superfisial. Hal ini terjadi karena semua lapisan hilang kecuali lapisan sel basal (Amran, 2010).

Hasil tebal epitel vagina dan indeks maturasi didukung oleh hasil histopatologi dari epitel vagina. Berikut adalah hasil pengamatan gambaran histologi epitel vagina mencit betina premenopause dengan pewarnaan HE

diambil dari mikroskop komputer binokuler CX Olympus CX31, dapat diketahui bagian-bagian dari jaringan epitel vagina.



Gambar 4.5: Histologi epitel vagina mencit betina premenopause. Keterangan: A. Kelompok K(-) = Normal, B. Kelompok K(+) = (VCD), C= Kelompok P (1) = VCD + Ekstrak Air Daun Katu (EDK) 15 mg/kgBB selama 30 hari, D. Kelompok P (2) = VCD + Ekstrak Air Daun Katu (EDK) 30 mg/kgBB selama 30 hari. Bagian-bagian pada preparat yaitu 1. Lumen, 2. Sel Superfisial, 3. Sel Intermediet, 4. Sel Parabasal) dengan perbesaran 400x.

Berdasarkan gambar histologi vagina diatas (gambar 4.5), dapat diketahui ada perbedaan proliferasi dari epitel vagina pada tiap-tiap kelompok. Kelompok (K+) yang hanya diinjeksi dengan VCD mempunyai ketebalan dan indeks maturasi paling rendah dibandingkan kelompok P(1) dan P(2). Kadar hormon estrogen yang rendah akibat injeksi VCD menyebabkan terganggunya proses maturasi dan proliferasi epitel vagina. Pengamatan histologi menunjukkan bahwa

lapisan epitel vagina kelompok K(+) banyak ditemukan sel parabasal, dan sedikit sel intermediet maupun sel superfisial. Hal ini terjadi karena semua lapisan hilang kecuali lapisan sel basal (Amran, 2010) dan lapisan epitel mengalami penipisan.

Pengamatan terhadap proliferasi epitel vagina penting dilakukan untuk mengetahui perubahan epitel vagina pada saat premenopause. Kandungan hormon estrogen yang menurun saat premenopause, menyebabkan reseptor estrogen tidak aktif yang berada di dalam inti sel target berikatan dengan heat shock protein hsp90. Ikatan antara estrogen dengan reseptor estrogen di inti sel menjadi reaktif dan mempengaruhi ERE (*Estrogen Responsive Element*). Ikatan antara estrogen, reseptor estrogen, dan ERE memicu transkripsi mRNA dan translasi protein target, sehingga memicu respon estrogenik sel (Kusmana, dkk, 2007).

Daun katuk yang mengandung senyawa isoflavon (Suprayogi, 2000) bersifat estrogenik terhadap epitel vagina mencit betina premenopause, sehingga dapat mempengaruhi proliferasi epitel vagina. Isoflavon merupakan salah satu jenis fitoestrogen (Sulistiyawati dan Proverawati, 2010). Sifat estrogenik dari isoflavon disebabkan oleh cincin A-C mirip cincin A-B pada estrogen dan mirip kelompok hidroksil dalam posisi 5. Letak cincin ini memainkan peran penting dalam meningkatkan aktifitas estrogen. Pada menopause isoflavon bersifat estrogenik dengan cara mengambil alih estrogen endogen untuk berikatan dengan reseptor estrogen (Darmadi dkk, 2011).

Mekanisme kerja fitoestrogen melalui reseptor estrogen (ER) secara langsung, sehingga mempengaruhi transkripsi gen (Sutrisno, 2010). Reseptor estrogen pada jaringan penyusun organ reproduksi seperti vagina adalah reseptor

α (Klein (1998) *dalam* Sitasiwi (2009). Reseptor estrogen α bersifat agonis penuh (Sutrisno, 2010) dimana isoflavon bekerja melalui reseptor estrogen (agonis) (Baziad, 2003).

Pengamatan yang dilakukan terhadap panjang fase diestrus mencit betina premenopause, diketahui terdapat fase proestrus, estrus, dan metestrus. Pada fase proestrus ini kadar estrogen mulai meningkat dan saluran mukosa vagina mulai mendapatkan peningkatan aliran darah (vaskulasasi) yang lebih intensif sehingga sel-sel epitel saluran reproduksi mulai berproliferasi. Proliferasi yang terjadi pada sel-sel epitel endometrium uterus, epitel vagina, dan epitel duktus kelenjar ambing terjadi secara tidak langsung dibantu oleh faktor parakrin yang dihasilkan sel stroma akibat induksi estrogen (Cooke *et al*, 1995). Fase estrus memiliki kadar estrogen tinggi dan suplai darah ke vagina bertambah sehingga epitel vagina mengalami kornifikasi dengan cepat. Pada fase metestrus, kadar estrogen menurun dan vaskularisasi berkurang sehinggaterjadi pelepasan sel epitel vagina dan penyusunan leukosit (Toelihere, 1985).

Penyebab penipisan epitel vagina ada 2 yaitu secara langsung dan tidak langsung. Adapun penyebab secara langsung adalah melalui ikatan antara estrogen dengan reseptor estrogen. Estrogen tidak cukup merubah konformasi reseptor estrogen, sehingga menyebabkan tidak adanya interaksi antara estrogen dengan reseptor estrogen pada sisi akseptor DNA. Ekspresi gen menurun dimana gen tidak dikatalisis oleh enzim RNA polymerase yang akhirnya menyebabkan penurunan mRNA. Pada sisi lain tRNA juga menurun, sintesis materi sel menjadi

menurun dan menyebabkan aktivitas penipisan pada sel epitel. (Puspitadewi dan Sunarno, 2007).

Penyebab penipisan epitel vagina secara tidak langsung adalah estrogen berikatan dengan reseptor estrogen α stroma. Pada kondisi hipoestrogen, faktor parakrin berupa *epidermal growth factor* (EGF) tidak aktif. EGF adalah protein tirosin kinase yang terdapat pada epitel. EGF dan tirosin kinase tidak dapat mengaktifkan protein kinase dalam sitoplasma sel. Protein kinase berupa *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) yang menjadi sinyal utama pengaktifan transkripsi dan translasi tidak aktif, sehingga tidak terjadi sintesis protein yang diperlukan untuk mitosis sel-sel epitel. Mitosis sel epitel yang tidak terjadi, menyebabkan tidak terjadi proliferasi sel epitel dan dapat dilihat pada epitel vagina yang menipis (Kusmana dkk, 2007). Akibat penipisan epitel vagina adalah menyebabkan aliran darah ke vagina berkurang dan elastisitas vagina berkurang (Proverawati, 2010), vagina terasa panas, gatal, kering, (lubrikasi berkurang) yang mengakibatkan hubungan seks menjadi sakit (Prawirohardjo, 2003). Vagina yang mengalami atrofi (menyusut) akan menimbulkan rasa panas, gatal, serta kering pada vagina (Baziad, 2003).

Kelompok P(1) dan P(2) yang diberi perlakuan ekstrak air daun katun dengan dosis yang berbeda juga mempunyai ketebalan dan proliferasi yang berbeda. Ekstrak air daun katun yang diinjeksikan pada mencit betina yang mengalami premenopause berpengaruh nyata terhadap ketebalan dan indeks maturasi epitel vagina ($p < 0,01$). Mitosis sel epitel memicu proliferasi sel epitel dan dapat dilihat pada ketebalan epitel yang meningkat (Buchanan *et al.*, 1998;

Cooke *et al.*, 1998; Kusmana dkk., 2007). Kelompok P(2) (281,2 μm) lebih tebal daripada kelompok P(1) (197,9 μm). Dosis yang efektif untuk memicu proliferasi epitel vagina adalah dosis 30 mg/kgBB.

Proliferasi sel epitel vagina dipicu oleh faktor parakrin. 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 (Kusmana, dkk, 2007).

Protein kinase yang teraktivasi diduga berupa *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) yang merupakan sinyal utama pengaktivasi transkripsi maupun translasi, sehingga terjadi sintesis protein. 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 (maturitas). 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. 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 (Kusmana, dkk, 2007)

Struktur isoflavon yang mirip dengan estradiol 17- β (E_2) menyebabkan proliferasi epitel vagina secara langsung berikatan antara dengan reseptor estrogen α (ER- α) pada epitel (Buchanan *et al.*, 1998). Mekanisme estrogen secara langsung berikatan dengan reseptor estrogen α (ER- α) dalam mempengaruhi aktivitas proliferasi sel, dengan cara estrogen berikatan dengan reseptor estrogen pada sel target (sel yang ada di vagina) dan merubah konformasi reseptor estrogen. Perubahan konformasi menyebabkan ikatan antara estrogen dengan reseptor estrogen menjadi aktif. Ikatan ini terletak di site binding pada sisi akseptor rantai DNA. Interaksi antara estrogen dengan reseptor estrogen pada sisi akseptor DNA menyebabkan ekspresi gen meningkat. Ekspresi gen dikatalisis oleh enzim RNA polymerase yang menyebabkan peningkatan mRNA. Pada sisi lain tRNA juga meningkat dan sintesis materi sel juga meningkat. Menyebabkan terjadi aktivitas proliferasi sel epitel vagina dan ketebalan epitel vagina (Buchanan *et al.*, 1998; Puspitadewi dan Sunarno, 2007).