PENGARUH EKSTRAK KULIT BUAH NAGA MERAH (*HYLOCEREUS POLYRHIZUS*) TERHADAP OVARIUM MENCIT MODEL ENDOMETRIOSIS

Sagita Candra Puspitasari¹, Hendy Hendarto², Widjiati³

¹ Mahasiswa Magister Ilmu Kesehatan Reproduksi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga Surabaya, Email : frice_star89@yahoo.co.id

² Departemen Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, RSUD Dr. Soetomo

³ Departemen Embriologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

ABSTRACT

Endometriosis occurs when one of the normal tissues grows ectopically on the organs of the body other than the uterus. One of the mechanisms of infertility associated with endometriosis is a change in immune system function that affects the ovarian follicle which causes an increase in granulosa cells in the ovarian follicle endometriosis patients. The red dragon fruit is one of the plants capable of inhibiting NF- κ B secretion of cytokine from endometriosis. This study aims to study the effect of red dragon fruit extract on the ovaries of mice of endometriosis model. 12 samples of female mice divided into 2 groups consisting of positive control group and treatment group used as endometriosis for 14 days, then the next 14 days positive group is given solution Na-CMC 0,5%, while treatment group given dose 0,25 mg / gram BB. This research type is true experimental by using randomized post test only control experimental group design. The results of this study indicate that there is a significant difference in the number of granulosa cell apoptosis between groups. Provision of extract dragon fruit peel in mice model of endometriosis can decrease the number of granulosa cell apoptosis with significant result $P < 0,05$.

Keywords : extract of *hylocereus polyrhizus* peel, endometriosis, granulosa cell apoptotic

PENDAHULUAN

Infertilitas merupakan tidak terjadinya kehamilan pada pasangan suami istri yang telah berhubungan seksual selama setahun atau lebih secara teratur dan tanpa proteksi. Dilaporkan bahwa wanita infertil memiliki 6 sampai 8 kali lipat kemungkinan memiliki endometriosis dibandingkan wanita subur (ASRM, 2012).

Salah satu mekanisme infertilitas yang diduga terkait dengan endometriosis yaitu adanya peningkatan stress oksidatif, perubahan fungsi sistem imun, perubahan hormonal di dalam zalir folikel dan zalir peritoneum, dan penurunan reseptivitas endometrium (Gupta *et al.*, 2008). Lingkungan mikro peritoneum wanita dengan endometriosis yang mengandung faktor pro-inflamasi dan ROS memiliki peran penting melalui perubahan komunikasi autokrin-parakrin dalam mekanisme perlengketan

pelvis, folikulogenesis yang abnormal, berkurangnya kualitas oosit/ embrio, berkurangnya fungsi sperma, dan gangguan implantasi (Hendarto, 2012). Perubahan cairan peritoneum yang menunjukkan peningkatan aktivitas makrofag, sekresinya adalah beberapa sitokin yang menyebabkan terjadinya proses apoptosis patologis. Hal ini terutama ditemukan pada endometriosis berat dengan infertilitas, dimana terjadi proses tersebut pada sel granulosa ovarium dengan ditemukan kadar *Interleukin-6* (*IL-6*) dan *IL-8* yang tinggi pada cairan peritoneum. Pertumbuhan lebih lanjut dari sel endometrium akibat menstruasi retrograde kemungkinan juga melibatkan sistem imun penderita endometriosis.

Respon imun pada zalir peritoneum endometriosis berupa peningkatan aktivitas

makrofrag peritoneum, dilanjutkan terjadinya sekresi berlebihan beberapa sitokin oleh makrofag aktif yaitu IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF- α (Bedaiwy, 2002). TNF- α diinisiasi oleh ikatan sitokin terhadap reseptor yang menyebabkan aktivasi faktor transkripsi yaitu NK- $\kappa\beta$ (*nuclear factor kappa beta*) di sel granulosa yang kemudian akan menginduksi gen yang terlibat dalam respon inflamasi dan apoptosis (Kim *et al.*, 2006). Jalur ekstrinsik apoptosis dimulai dari perekrutan *adapter protein*, seperti FADD (*Fas associated death domain*), membentuk *death inducing signaling complex* (DISC) untuk mengaktivasi *caspase-8* dan *caspase-10*, yang nantinya mengaktifkan *caspase-3* sebagai efektor apoptosis (Kalimuthu, 2013).

Ekstrak kulit buah naga merah yang mengandung betalain diketahui mampu menghambat aktivasi IKK NF- $\kappa\beta$ tidak teraktivasi pada kultur sel karsinoma mammae MCF-7 (Sarasmita dan Laksmiani, 2015).

Pada penelitian ini akan diujikan dua sampel mencit model endometrosis dengan kadar dosis ekstrak kulit naga merah 0,25 mg/gram BB mencit selama 14 hari, dosis ekstrak kulit buah naga merah yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada penelitian Nugrahaini dan Aziza tentang uji efektifitas antiinflamasi ekstrak kulit buah naga merah pada mencit jantan galur Webster Strain (Nugrahaini and Azizah, 2015).

Untuk itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kulit buah naga merah terhadap ovarium pada Hewan Coba Mencit Model Endometriosis.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian yang digunakan adalah jenis penelitian *true experimental* dengan menggunakan *randomized post test only control group design*. Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) untuk model endometriosis, memiliki ukuran berat badan 20-25 gram, mempunyai bulu yang bersih dan tidak mudah rontok, tidak cacat, tidak ada luka. Sedangkan kriteria eksklusi adalah mencit yang mati pada saat pemberian perlakuan, perilaku mencit berubah saat penelitian (lemas dan tidak lincah).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ovarium dari mencit model endometriosis, ekstrak kulit buah naga merah yang buahnya diperoleh dari kebun Agro Wisata Buah Naga Rembangan Kabupaten Jember, siklosporin A (*Sandimmun*), *water fluid injection*, biopsi endometrium dari bahan uterus operasi tumor jinak, *ethynil estradiol*, dan bahan pembuatan sediaan histopatologis. Penelitian ini dilakukan di kandang hewan coba dan laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penelitian ini dilakukan selama 2 bulan, mulai bulan Juni sampai Juli 2017.

Pembuatan mencit model endometriosis meliputi beberapa tahapan, yaitu mencit betina yang sudah dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu diberi makan 2 kali sehari dengan pellet ayam, dan diberi minum secara *ad libitum*, kelompok kontrol positif (K1) dan kelompok perlakuan (K2) diberikan injeksi siklosporin A (*Sandimmun*) pada hari pertama. Dosis siklosporin A 10 mg/kgBB dikonversi pada dosis mencit 1,82 mg/mencit. Satu ampul siklosporin A setara 50 mg/ml diencerkan dengan *Water Fluid Injection* sebanyak 4 ml, sehingga siklosporin A diinjeksikan sebanyak 0,2 ml/mencit secara intramuskuler (IM) untuk membuat mencit imunodefisiensi, sementara itu biopsi endometrium diambil dari bahan uterus operasi tumor jinak pada uterus, yang di simpan PBS. Dilakukan washing 2x dengan alat sentrifugal sebesar 2500 rpm. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan PBS bersama dengan penicillin 200 IU/ml dan streptomisin 200 ug/ml. Diambil dengan syringe 3 ml jaringan basah endometrium ini. Setiap mencit akan mendapatkan 0,1 ml. Kemudian disuntikkan secara blind pada kavum peritoneum mencit secara perlahan dalam waktu 60 detik. Penyuntikan dengan disposable 1 ml, tetapi menggunakan jarum yang berukuran 16 agar jaringan endometrium dapat masuk. Setelah penyuntikan mencit akan di evaluasi apakah masuk kriteria putus uji atau tidak, selanjutnya dilakukan penyuntikan *ethynil estradiol* secara intramuskular pada hari ke-1 dan ke-5. Sediaan *ethynil estradiol* dengan dosis 30 ug/kgbb setelah dikonversi ke mencit menjadi 5,4 ug permencit. Berarti setiap mencit akan mendapatkan 0,1 ml.

Oleh karena 30 ml mengandung 20000 iu yang setara dengan 2 mg estradiol. Cara penyuntikan pada paha mencit dengan syringe 1 ml dan jarum 1 ml, kemudian mencit ditunggu sampai hari ke-14 dengan perawatan pemberian makan dan minum seperti biasa. Setelah hari ke-15, beberapa mencit akan dikorbankan untuk mengetahui terjadi endometriosis, dan kemudian dipapar dengan ekstrak kulit buah naga merah, mencit dipapar ekstrak kulit buah naga merah dosis 0,25 mg/gram BB selama 14 hari, dan pada hari ke-29, baik mencit yang termasuk kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan diterminasi untuk diambil bagian ovarium.

Proses ekstraksi kulit buah naga merah dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% dan jumlah apoptosis sel granulosamenggunakan metode imunohistokimia.

Untuk melihat normalitas data, digunakan uji *Shapiro-Wilk*. Apabila data yang didapatkan berdistribusi normal, akan dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* dan Uji Tukey (HSD). Apabila data yang didapatkan tidak berdistribusi normal, akan dilanjutkan dengan uji *Kruskall Wallis*, uji *Mann Whitney*. Penelitian ini menggunakan tingkat kemaknaan sebesar 0,05. Menggunakan spss 16.

HASIL

Tabel 5.1 mengindikasikan bahwa terdapat perbedaan distribusi jumlah apoptosis sel granulosadari kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dosis 0,25 mg/gram BB. Perbedaan tersebut ditunjukkan oleh adanya penurunan dari jumlah apoptosis sel granulosaseiring pemberian dosis terapi pemberian ekstrak kulit buah naga merah.

Perbandingan Pengaruh Ekstrak Kulit Buah Naga Merah Terhadap Jumlah Apoptosis Sel Granulosa

Tabel 5.1 Rerata dan simpangan baku jumlah apoptosis sel granulose mencit model endometriosis antara kelompok kontrol dan kelompok yang mendapat terapi ekstrak kulit buah naga merah

RerataJumlahApoptosis Sel Granulosa

Apoptosis	K1	K2
	5,88±2,28	3,28±0,50

Gambar 5.2 Perbedaan ekspresi apoptosis antar kelompok perlakuan. Ekspresi apoptosis tampak sel imunoreaktif yang diekspresikan bewarna cokelat. (Mikroskop Nikon Eclipse e-100, Perbesaran 400x, Optilab Viewer 2.2, Software Pengolah Gambar Image raster 3.0) (Novak, 2007)

PEMBAHASAN

Apoptosis merupakan proses kematian sel yang terjadi pada sel tunggal secara terencana ditandai dengan gambaran morfologi dan biokimia khas sebagai akibat dari inisiasi oleh stimulasi fisiologi maupun patologi tanpa menimbulkan reaksi radang dan merupakan proses fisiologi untuk perkembangan, pemeliharaan homeostatis dan mempertahankan hospes organisme multiseluler (Zeiss, 2003 ; Daniel, 2004). Pada sistem reproduksi, proses apoptosis berdampak pada fungsi dan perkembangan normal ovarium (Hadi, 2011).

Sel granulosa merupakan sel somatik yang terkait erat dengan folikulogenesis. Fungsi sel tersebut adalah memproduksi

steroid dan sejumlah faktor pertumbuhan untuk berinteraksi dengan oosit selama perkembangan di ovarium. Apoptosis pada sel granulosa dapat terjadi pada tahapan folikulogenesis (Inoue *et al.*, 2011). $TNF-\alpha$ diinisiasi oleh ikatan sitokin terhadap reseptor yang menyebabkan aktivasi faktor transkripsi yaitu $NF-\kappa\beta$ (*nuclear factor kappa beta*) di sel granulosa yang kemudian akan menginduksi gen yang terlibat dalam respon inflamasi dan apoptosis (Kim *et al.*, 2006).

Hasil perhitungan rerata jumlah apoptosis sel granulosa menunjukkan bahwa apoptosis sel granulosa terkuat didapatkan pada kelompok kontrol positif. Apoptosis sel granulosa pada kelompok perlakuan lebih rendah daripada kelompok kontrol positif.

Hal ini sesuai dengan penelitian Oepomo (2003) yang menyatakan bahwa apoptosis sel granulosa pada kelompok endometriosis lebih kuat daripada kelompok kontrol negatif dan kelompok yang mendapat terapi (Oepomo, 2003).

Hasil uji *Kruskal Wallis* pada indeks apoptosis sel granulosa menunjukkan $p=0,001$ ($p<0,05$) dan dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak kulit buah naga merah dengan dosis 0,25 mg/gram BB menyebabkan perbedaan yang bermakna terhadap indeks apoptosis sel granulosa pada kelompok kontrol positif. Hasil uji *Man Whitney* menunjukkan perbedaan nilai kelompok antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Dalam penelitian kultur sel granulosa yang dilakukan oleh Carlberg *et al.*, (2000), dilakukan perbandingan beberapa sitokin antara kultur sel granulosa wanita dengan endometriosis dan yang tanpa endometriosis. Didapatkan hasil bahwa terjadi peningkatan produksi dari 4 sitokin yaitu $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ dan $TNF-\alpha$. Namun hanya $TNF-\alpha$ yang meningkat secara signifikan. Penelitian ini menunjukkan bahwa sel granulosa dapat menjadi sumber produksi dari $TNF-\alpha$ (Carlberg, 2000). $TNF-\alpha$ memediasi berbagai respons biologis termasuk peradangan, infeksi dan apoptosis sel. Efek dari $TNF-\alpha$ diinisiasi oleh ikatan sitokin terhadap reseptor, yang menyebabkan aktivasi dari faktor utama transkripsi diantaranya *nuclear factor kappa β* ($NF-\kappa B$). Aktivasi tersebut kemudian menginduksi gen yang terlibat

dalam respon inflamasi dan apoptosis (Kim *et al.*, 2006).

Selain itu, Sitokin $IL-6$ yang disekresikan makrofag ke dalam rongga peritoneum, akan berikatan dengan reseptor $IL6R$ pada sel granulosa ovarium dan menyebabkan aktifnya cascade caspase melalui aktivasi death receptor (Scheller *et al.*, 2011). Lewat jalur ekstrinsik atau jalur sitoplasma. Aktivasi death receptor menyebabkan terekutnya adapter protein *FADD* (*Fas Associated Death Domain*) yang kemudian membentuk *DISC* (*Death Inducing Signal Complex*) sehingga menyebabkan aktivasi dari caspase 8 dan caspase 10. Caspase 8 dan 10 akan mengaktifkan caspase 3 sebagai eksekutor apoptosis sel granulosa.

Sel-sel yang diaktifkan oleh sitokin mungkin memproduksi dan mensekresikan sitokin yang sama sebagai sinyal parakrin atau untuk meningkatkan dan menstabilkan sinyal dalam sel yang mensekresi melalui regulasi autokrin. Mekanisme autokrin atau parakrin produksi $TNF-\alpha$ melibatkan beberapa protein, diantaranya $NF-\kappa B$, penghambat $I\kappa B\alpha$ dan A20, penghantar sinyal kinase IKK dan sitokin $TNF-\alpha$ serta reseptornya $TNFR1$ (Pekalski *et al.*, 2013).

Hasil penelitian ini juga didukung oleh penelitian Ardianta 2015 tentang khasiat kurkumin sebagai antiinflamasi dan penghambatan pada $NF-\kappa B$ sehingga bisa menurunkan apoptosis sel granulosa. Efek antiinflamasi kurkumin dimediasi melalui penekanan terhadap faktor transkripsi $NF-\kappa B$. Kurkumin menghambat aktivasi $NF\kappa B$ dengan mencegah fosforilasi dan degradasi $I\kappa B\alpha$. Kurkumin tidak secara langsung mengganggu aktifitas IKK. Kurkumin memblokir degradasi $I\kappa B$ yang diinduksi baik oleh $IL-6$ atau $TNF-\alpha$, melalui messenger yang digunakan baik oleh jalur $IL-6$ atau $TNF-\alpha$. Efek dari kurkumin tersebut mungkin disebabkan oleh gangguan transmisi sinyal protein adapter seperti *RIP*, *TRAF-2*, atau *TRAF-6*, yang memicu aktivasi dari IKK. Kemungkinan lainnya adalah bahwa kurkumin menghambat aktivitas dari messenger yang diinduksi baik oleh $IL-6$ atau $TNF-\alpha$ yang mampu mengaktifkan IKK (Ardianta *dkk.*, 2015). Jobin *et al.*, (1999), menyimpulkan bahwa kurkumin menghambat aktivasi $NF-\kappa B$ yang dimediasi sitokin

(*cytokinemediated NF- κ B*) dengan memblokir sinyal yang memicu aktivasi IKK (Jobin *et al.*, 1999).

SIMPULAN

Jumlah apoptosis sel granulosa ovarium pada mencit model endometriosis yang diberi ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dengan dosis 0,25 mg/gram BB lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol positif.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardianta, W.MY., Hendarto, Hendy., Widjiati. 2015. *Kurkumin Menurunkan Ekspresi Tumor Necrosis Factor (TNF- α) Kompleks Oosit-Kumulus Sapi pada Kultur dengan Zalir Peritoneum Penderita Infertil terkait Endometriosis*. Majalah Obstetri & Ginekologi. 23 (23) : 133-139.
- ASRM, Practice. Committee. 2012. *Endometriosis and infertility: a committee opinion*. 98:591-8 Fertility Sterility.
- Bedaiwy, K., Dunsmoor-Su, R. and Coutifaris, C. 2002. *Effect of endometriosis on in vitro fertilization*, Fertility and Sterility 77: 1148-55.
- Carlberg, M. 2000. *Elevated expression of TNF- α in cultured granulosa cells from women with endometriosis*. Hum Reprod 15(6) : 1250-1255.
- Daniel, N.N. and Krosmeier, S.J. 2004. *Cell Death : Critical Control Points*. Cen. 116 : 205-219.
- Gupta, S., Goldberg, J.M., Aziz, N., Goldberg, E., Krajcir, N. and Agarwal, A. 2008. *Pathogenic mechanism in endometriosis-associated infertility*. Fertility Sterility 90: 247-57.
- Hadi, R.S. 2011. *Mekanisme Apoptosis pada Regresi Sel Luteal*. Majalah Kesehatan PharmaMedika. 3:1.
- Hendarto, H. 2012. *Pathomechanism of infertility in endometriosis*, in Endometriosis the basic concept and Current Research Trends. Intech : 343-353.
- Inoue, Noriyuki, *et.al.* 2011. *Role of cell-death ligand-receptor system of ganulosa cells in selective follicular atresia in porcine ovary*. J Reprod Dev. 57(2) : 169-75.
- Jobin, C., Bradham, C.A., Russo, M.P., Juma, B., Narula, A.S., Brenner, D.A. and Sartor, R.B. 1999. *Curcumin blocks cytokine-mediated NF- κ B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-B kinase activity*. The Journal of Immunology. 163 : 3474-84.
- Kim, Y.S., Ahn, Y., Hong, M.H., Joo, S.Y., Kim, K.H., Sohn, I.S., Park, H.W. 2006. *Curcumin attenuates Nuclear Factor-k*. The Korean Society of circulation. 36: 482-489.
- Kalimuthu, S. and Se-Kwon, K. 2013. *Cell survival and apoptosis signaling the United States therapeutic target for cancer : Marine bioactive compounds*. International Journal of Molecular Sciences 14: 2334-2354.
- Novak, M., Madej, J.A., Dziegeil, P. 2007. *Intensity of Cox 2 expression in Cell of Soft Tissue Fibrosarcomas in Dog As Related to Grade of Tumor malignation*. Bull Vet inst Pulawy 51, 275-279. 200
- Nugrahaini and Azizah. 2015. *Uji Efektifitas Ekstrak Etanol Hylocereus polyrhizus Dengan Metode Geliat Pada Mencit Jantan Galur Swiss Webster*. The Muhammadiyah University. Surakarta
- Oepomo T.D. 2003. *Peran IL-6 serta IL-8 dalam zalir peritoneum penderita infertilitas disertai endometriosis dalam proses apoptosis sel granulosa ovari yang patologis*. Disertasi Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Pekalski, J., Zuk, P.J., Kochanczk, M., Junkin, M., Kellog, R., Tay, S. and

- Lipniacki, T. 2013. *Spontaneous NF- κ B activation by autocrine TNF- α signaling : A computational study*, PLOS ONE 8(11) : e78887.
- Sarasmita dan Laksmiani. 2015. *Test the Sitotoksisitas Ethanol Extract Hylocereus polyrhizus Peel on breast cancer cells in vitro and in silico*. The Udayana University.Bali
- Scheller, Jurgen., Chalaris, Athena., Arras, Dirk S., and John, Stefan R. 2011. *The pro and anti-inflammatory Properties of the Cytokine Interleukin-6*, Biochimica et Biophysica Acta. 1813 : 878-888.
- Zeiss, J.c. 2003. *The Apoptosis-Necrosis Continuun : Insights from Genetically Altered Mice*. Vet Pathol, 40: 481-495.