

**POTENSI SERBUK RIMPANG KUNYIT (*Curcuma longa* L.) DALAM  
MEMPERBAIKI AGING OVARIUM PADA TIKUS PUTIH STRAIN  
WISTAR (*Rattus norvegicus*) PREMENOPAUSE**

**DISERTASI**

oleh  
**TEGUH SUPRIHATIN**  
**137090100111008**



**PROGRAM DOKTOR BIOLOGI  
JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2019**

**POTENSI SERBUK RIMPANG KUNYIT (*Curcuma longa* L.) DALAM  
MEMPERBAIKI AGING OVARIUM PADA TIKUS PUTIH STRAIN  
WISTAR (*Rattus norvegicus*) PREMENOPAUSE**

**DISERTASI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor  
dalam Bidang Biologi

oleh

**TEGUH SUPRIHATIN**

**137090100111008**



**PROGRAM DOKTOR BIOLOGI  
JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG**

**2019**

HALAMAN PENGESAHAN DISERTASI

POTENSI SERBUK RIMPANG KUNYIT (*Curcuma longa* L.) DALAM  
MEMPERBAIKI AGING OVARIUM PADA TIKUS PUTIH STRAIN  
WISTAR (*Rattus norvegicus*) PREMENOPAUSE

DISERTASI

TEGUH SUPRIHATIN, S.Si., M.Si.  
137090100111008

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 17 Juni 2019 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh  
gelar Doktor dalam Bidang Biologi



Menyetujui  
Promotor

Dr. Sri Rahayu, M.Kes.  
NIP. 19620528 198701 2 001

Ko-Promotor I

Ko-Ppromotor II

Prof. Muhaimin Rifa'i, S.Si., M.Si., Ph.D.Med.Sc.  
NIP. 19680626 199702 1 001

Dr. Sri Widyarti, M.Si.  
NIP. 19670525 199103 2 001

Mengetahui  
Ketua Program Studi Doktor Biologi  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D.  
NIP. 19671213 199103 2 001

## SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI DISERTASI

Judul Disertasi:

**POTENSI SERBUK RIMPANG KUNYIT (*Curcuma longa* L.) DALAM  
MEMPERBAIKI AGING OVARIUM PADA TIKUS PUTIH STRAIN WISTAR  
(*Rattus norvegicus*) PREMENOPAUSE**

Nama : Teguh Suprihatin

NIM : 137090100111008

### KOMISI PROMOTOR :

Promotor : Dr. Sri Rahayu, M.Kes.

Ko-Promotor I : Prof. Muhaimin Rifa'i, S.Si., M.Si., Ph.D.Med.Sc.

Ko-Promotor II : Dr. Sri Widarti, M.Si.

### TIM DOSEN PENGUJI :

Penguji I : Drs. Sofy Permana, M.Sc., D.Sc.

Penguji II : Prof. Widodo, S.Si., M.Si., Ph.D.Med.Sc.

Penguji III : Dr. Ir. Gatot Ciptadi, DESS.

Penguji IV : Dr. Bayyinatul Muchtaromah, drh., M.Si.

Seminar Hasil Penelitian : 5 April 2019

Ujian Kelayakan Disertasi : 24 Mei 2019

Ujian Akhir Disertasi : 17 Juni 2019

## PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

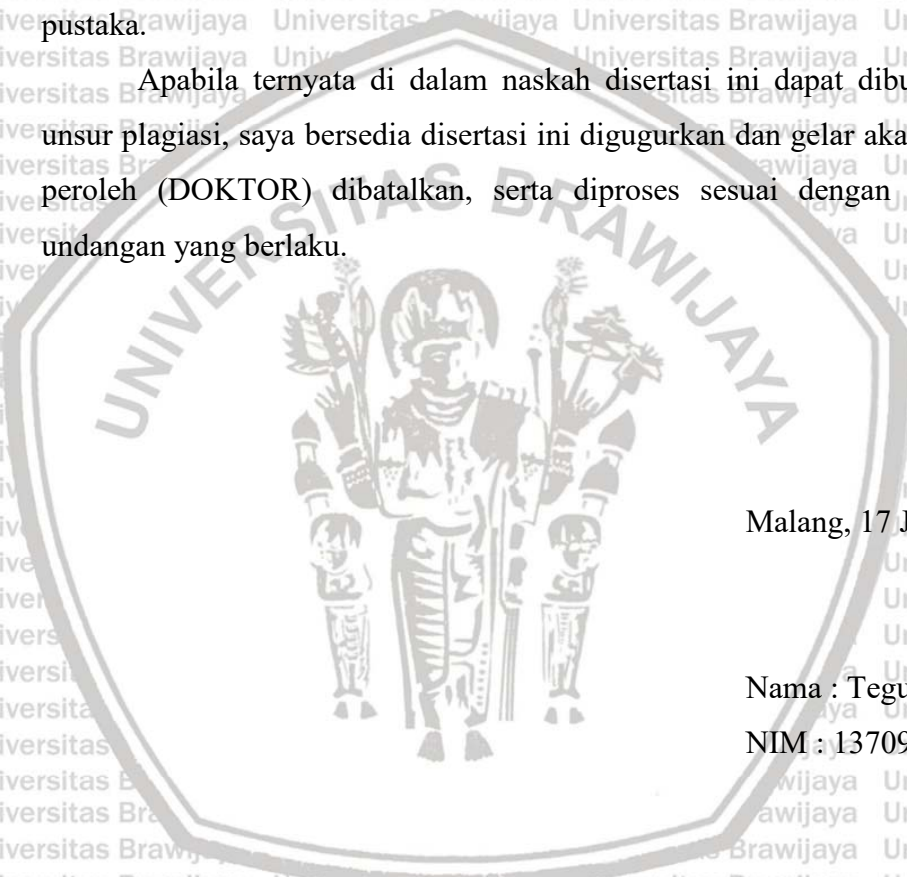
Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah disertasi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah disertasi ini dapat dibuktikan terdapat unsur unsur plagiasi, saya bersedia disertasi ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, 17 Juni 2019.

Nama : Teguh Suprihatin

NIM : 137090100111008



## PEDOMAN PENGGUNAAN DISERTASI

Disertasi ini tidak dipublikasikan, namun dapat digunakan secara terbuka kepada umum untuk keperluan studi ilmiah dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis dan pemilik proyek penelitian. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan atas seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah serta ketentuan yang berlaku untuk meyebutkannya.



## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Surabaya pada tanggal 3 Oktober 1973. Anak ke sepuluh dari sepuluh bersaudara, putra dari Bapak Suprpto dan Ibu Sudarsih. Menyelesaikan pendidikan formal di Sekolah Dasar Negeri Gempol II pada tahun 1986, Sekolah Menengah Pertama Negeri Gempol pada tahun 1989, dan Sekolah Menengah Atas Negeri Pandaan pada tahun 1992. Selanjutnya menempuh pendidikan strata 1 (S1) di Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro pada tahun 1993 dan lulus pada tahun 1998. Pada tahun 1999 mulai diterima sebagai tenaga pengajar (PNS) di Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Diponegoro sampai sekarang. Pada tahun 2000 sampai dengan 2003 melanjutkan pendidikan strata 2 (Magister) melalui program BPPS di Pasca Sarjana Universitas Airlangga Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi. Tahun 2013 mulai menempuh pendidikan di Program Doktor Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya dengan bidang minat Bioteknologi.

Selama menempuh pendidikan Program Doktor, penulis telah mengikuti beberapa kegiatan akademik diantaranya :

1. Research Dissemination, Research Group of SMONAGENES UB, 2013
2. Seminar Nasional : DNA Transgenik dan kloning, Biosains UB, 2013
3. Seminar Nasional : Bahan Obat Alami, Biosains UB, 2013
4. Seminar Nasional dan Workshop : *In Vitro* Maturasi dan *In Vitro* Fertilisasi, Biosains UB, 2013
5. Seminar Internasional : 4<sup>th</sup> BaSIC Science dan 5<sup>th</sup> ICGRC, FMIPA UB, 2014
6. Seminar Internasional : 6<sup>th</sup> ICGRC, FMIPA UB, 2015
7. Seminar Internasional : 2<sup>nd</sup> ICAMBBE, UB, 2015
8. Writing Clinic Workshop : Strategi Publikasi Internasional Bereputasi, Clinical Journal CAPA, 2016
9. Pelatihan dan Lokakarya Penulisan Publikasi pada Jurnal Internasional bagi Mahasiswa Program Doktor Biologi UB, PPIKID UB, 2016
10. Seminar Internasional : 7<sup>th</sup> ICGRC, FMIPA UB, 2016, Presenter
11. Bioinformatics Workshop : Exploring Indonesian Herbal Medicine Through Computational Study (*In Silico*), InBio, 2017

12. Seminar Internasional : 7<sup>th</sup> , Basic Science, FMIPA UB, 2017, Presenter
13. Workshop dan Klinik : Peningkatan Kualitas Hasil Penelitian Program Peningkatan Kapasitas Riset Tahun 2017, Dirjen RisBang Dikti, 2017
14. Workshop : Pengelolaan Luaran Penelitian, LPPM UB, 2017
15. Workshop Bioinformatika : Predict your research result with *in silico* analysis, Program Studi SMONAGENES, 2018
16. Workshop Rekonstruksi Kurikulum : Reorientasi Kurikulum untuk Meningkatkan Kompetensi dan Daya Saing Lulusan Jurusan Biologi UB di Era Revolusi Industri 4.0, 2018
17. Mendapatkan Hibah Penelitian Disertasi Doktor (PDD), 2017
18. Publikasi Ilmiah 1, Jurnal Internasional bereputasi terindeks *Scopus* : *Computational study of curcumin as antioxydant and potential inhibitor to abrogate Keap1-Nrf2 interaction, Medicinal Plant-International Journal of Phytomedicines and Related Industries*, Vol. 9(3), September 2017
19. Publikasi Ilmiah 2, Jurnal bereputasi terindeks *Microsoft Academic Search* : *Malondialdehyde (MDA) ovary and estradiol blood serum levels of premenopause white rat (Rattus norvegicus) after turmeric powder (Curcuma longa L.) treatment, Journal of Tropical Life Science*, 2019

Demikian riwayat hidup dan kegiatan akademik yang telah diikuti selama menempuh pendidikan di Program Doktor Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Malang.

Malang, 17 Juni 2019

Penulis,

Teguh Suprihatin



## RINGKASAN

**Potensi Serbuk Rimpang Kunyit (*Curcuma longa* L.) dalam Memperbaiki Aging Ovarium pada Tikus Putih Strain Wistar (*Rattus norvegicus*) Premenopause****Teguh Suprihatin, Sri Widyarti, Muhaimin Rifa'i, Sri Rahayu**

Aging ovarium adalah proses yang berhubungan dengan penurunan kemampuan reproduksi pada individu betina yang ditandai dengan reduksi jumlah folikel secara drastis. Penyebab terjadinya aging ovarium diduga karena adanya peningkatan produksi oksidan seperti ROS oleh mitokondria sel granulosa ovarium. Peningkatan produksi ROS kemungkinan berasal dari proses fosforilasi oksidatif dan steroidogenesis. Peningkatan produksi ROS yang melebihi kemampuan homeostasis dalam sel granulosa ovarium akan menyebabkan gangguan pada proses tumbuh kembang folikel ovarium.

Tanaman kunyit sudah sejak lama digunakan sebagai tanaman obat. Tanaman kunyit, terutama pada bagian rimpang diduga mengandung senyawa kurkumin dan senyawa-senyawa lain yang mempunyai potensi sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek pemberian serbuk rimpang kunyit, dalam memperbaiki aging ovarium pada tikus putih betina premenopause. Perbaikan aging ovarium diharapkan melalui fungsi kurkumin sebagai antioksidan yang mampu mengaktivasi *Nrf2* dan memulai proses transkripsi enzim antioksidatif seperti enzim *GST*. Pembentukan enzim *GST* akan melindungi sel granulosa dari radikal bebas sehingga diharapkan proses proliferasi sel granulosa dapat berjalan dengan baik. Penelitian dilaksanakan dalam dua tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan dilakukan dengan analisis fitokimia menggunakan LC-MS untuk mengetahui kandungan senyawa pada serbuk rimpang kunyit, analisis *in silico* terhadap senyawa-senyawa yang terkandung dalam serbuk rimpang kunyit untuk mengetahui potensinya sebagai antioksidan dan analisis potensi penghambatan kurkumin terhadap ikatan antara *Nrf2* dan *Keap1* secara *in silico*. Penelitian utama dilakukan secara *in vivo* dengan memberikan perlakuan serbuk rimpang kunyit pada hewan coba sesuai dengan dosis yang telah ditentukan.

Analisis *in silico* dilakukan dengan menggunakan *software Pass Server* untuk memprediksi potensi senyawa-senyawa yang terkandung dalam serbuk rimpang kunyit sebagai antioksidan, melalui skor *probability activity (Pa)*. Selanjutnya untuk senyawa kurkumin dilakukan *docking* menggunakan *PyRx* untuk mengetahui potensinya sebagai inhibitor ikatan antara *Nrf2* dengan protein *Keap1*. Penelitian *in vivo* dilakukan dengan menggunakan 30 ekor tikus putih strain wistar betina dengan bobot rata-rata 200-250 g, usia 12 bulan yang diasumsikan sudah memasuki masa premenopause. Perlakuan dibagi menjadi 6 kelompok dengan masing-masing kelompok diulang sebanyak 5 kali ulangan. Kelompok perlakuan terdiri dari P0 yaitu perlakuan kontrol negatif dimana hewan coba hanya diberi akuades, P1 yaitu perlakuan kontrol positif dimana hewan coba diberi serbuk kurkumin dengan dosis 6,75 mg/kg BB, P2 yaitu hewan coba diberi perlakuan serbuk rimpang kunyit sebanyak 100 mg/kg BB, P3 : 200 mg/kg BB, P4 : 400 mg/kg BB, dan P5 : 800 mg/kg BB. Serbuk rimpang kunyit diberikan secara oral selama 27 hari. Pada hari ke1 dan ke14 dilakukan koleksi darah untuk keperluan mengukur kadar estradiol. Pada hari ke28 semua hewan coba dikorbankan, untuk isolasi organ ovarium.

Sampel ovarium kanan digunakan untuk pengukuran kadar *MDA* menggunakan metode *TBA*. Sampel ovarium kiri difiksasi dengan larutan fiksatif formalin 10 % selama 24 jam, kemudian dilakukan prosedur mikroteknik dan pewarnaan HE untuk mengetahui jumlah folikel dan pewarnaan imunohistokimia untuk mengetahui proliferasi sel granulosa melalui deteksi *PCNA*, mengetahui distribusi *MDA*, *Nrf2* dan enzim *GST*. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap, data yang diperoleh dianalisis menggunakan *ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *BNJ*.

Hasil analisis fitokimia menggunakan *LC-MS* menunjukkan bahwa pada serbuk rimpang kunyit terdeteksi sebanyak 49 jenis senyawa. Senyawa-senyawa yang terdapat pada serbuk rimpang kunyit diantaranya adalah *curcumin* 7,798 %, *curcumene* 5,411 %,  $\alpha$  *turmerone* 4,949 %, *demethoxycurcumin* 4,115 %, *curcumenone* 4,100 %,  $\alpha$  *turmerone* 3,898 %, *procurcumenol* 2,804 %, *cinnamic acid* 2,676 %, *caffeic acid* 2,675 %, *turmeronol B* 2,504 %,  $\beta$  *caryophyllene* 2,350%, *arabinose* 2,313 %, *bis demethoxycurcumin* 2,277 %,  $\beta$  *sitosterol* 2,230 %, dan *glucose* 2,214 %. Senyawa-senyawa pada serbuk rimpang kunyit yang berpotensi sebagai antioksidan berdasarkan nilai *Pa* adalah *ascorbic acid* dengan nilai *Pa* 0,951, *quercetine* 0,878,  $\beta$  *carotene* 0,823, *arabinose* 0,801, *bis demethoxycurcumin* 0,685, *demethoxycurcumin* 0,654, *curcumin* 0,634, *caffeic acid* 0,611, *cinnamic acid* 0,489, *letestuianin A* 0,483, *calebin A* 0,464. Penelitian secara *in silico* menunjukkan bahwa senyawa kurkumin mempunyai potensi sebagai inhibitor ikatan antara *Nrf2* dan *Keap1*. Potensi kurkumin sebagai inhibitor ikatan antara *Nrf2* dan *Keap1* berdasarkan nilai *Pa* yaitu sebesar 0,634, nilai *binding affinity* antara kurkumin dan *Keap1* sebesar -8,4, kemampuan kurkumin berikatan dengan molekul protein *Keap1* pada sisi aktif *SER508A*, *ALA556A*, *TYR525A*, *TYR334A*, dan *ARG415A*.

Hasil penelitian secara *in vivo* menunjukkan bahwa pemberian serbuk rimpang kunyit dosis 200 mg/kg BB adalah dosis optimal, karena nilai parameter yang diamati selalu lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif, walaupun tidak selalu merupakan hasil tertinggi bila dibandingkan dengan perlakuan dosis serbuk rimpang kunyit yang lain. Serbuk rimpang kunyit dosis 200 mg/kg BB menurunkan secara signifikan kadar *MDA* ovarium tikus putih premenopause sebesar 40,24 %, menurunkan secara signifikan distribusi *MDA* sebesar 41,42 %, meningkatkan distribusi *Nrf2* sebesar 2,74 %, meningkatkan secara signifikan distribusi enzim *GST* tertinggi sebesar 48,54 %, dan meningkatkan secara signifikan kadar hormon estradiol sebesar 3,53 kali dibandingkan dengan kontrol negatif. Pemberian serbuk rimpang kunyit dosis 200 mg/kg BB pada tikus putih premenopause juga optimal meningkatkan proliferasi sel granulosa ovarium yaitu sebesar 6,65 % dan meningkatkan secara signifikan jumlah folikel primer tertinggi sebesar 2,62 kali, meningkatkan jumlah folikel sekunder sebesar 22,59 %, meningkatkan secara signifikan jumlah folikel antral tertinggi sebesar 81,08 %, serta meningkatkan jumlah korpus luteum tertinggi sebesar 32,26 % dibandingkan dengan kontrol negatif.

## SUMMARY

**The Potential of Turmeric (*Curcuma longa* L.) to Improving Aging Ovary in Wistar Strain of Premenopause White Rats (*Rattus norvegicus*)****Teguh Suprihatin, Sri Widyarti, Muhaimin Rifa'i, Sri Rahayu**

Ovarian aging is a process that is associated with a decrease in reproductive capacity in female individuals characterized by drastic reduction in follicle counts. The cause of ovarian aging is thought to be due to increased production of oxidants such as ROS by mitochondrial ovarian granulosa cells. Increased production of ROS probably originates from the process of oxidative phosphorylation and steroidogenesis. Increased production of ROS that exceeds the ability of homeostasis in ovarian granulosa cells will cause disruption in the process of ovarian follicle growth.

Turmeric plants (*Curcuma longa* L.) have long been used as medicinal plants. Turmeric plants, especially in the rhizomes are thought to contain curcumin compounds and other compounds that have the potential as antioxidants. This study aims to examine the effect of giving turmeric powder, in improving ovarian aging in premenopausal female white rats. Ovarian aging improvement is expected through the function of curcumin as an antioxidant that is able to activate Nrf2 and start the process of transcription of antioxidant enzymes such as the GST enzyme. The formation of the GST enzyme will protect granulosa cells from free radicals, so it is hoped that the granulosa cell proliferation process can run well. The research was carried out in two stages, namely preliminary research and main research. Preliminary research was conducted with phytochemical analysis using LC-MS to determine the content of compounds in turmeric powder, *in silico* analysis of compounds contained in turmeric powder to determine its potential as an antioxidant and analysis of potential inhibition of curcumin on the bond between Nrf2 and Keap1 *in silico*. The main research was carried out *in vivo* by treating turmeric powder in experimental animals according to the prescribed dosage.

*In silico* analysis is carried out using the Pass Server software to predict the potential of compounds contained in turmeric powder as an antioxidant, through a probability activity (Pa) score. Furthermore, docking procedure were performed on the curcumin compound using PyRx to determine its potential as an inhibitor of the bond between Nrf2 and Keap1 protein. The *in vivo* study was carried out using 30 wistar female white rats with an average weight of 200-250 g, 12 months of age assumed to have entered premenopausal period. The treatments were divided into 6 groups with each group repeated 5 times. The treatment group consisted of P0, which was a negative control treatment where the experimental animals were only given aquades, P1 which was a positive control treatment where the experimental animals were given a dose of 6.75 mg/kg BW curcumin powder, P2, which was treated with 100 mg/kg BW turmeric powder, P3: 200 mg/kg BW, P4: 400 mg/kg BW, and P5: 800 mg/kg BW. Turmeric powder is administered orally for 27 days. On the 1st and 14th day a blood collection was carried out for the purpose of measuring estradiol levels. On the 28th day all experimental animals were sacrificed, to isolate the ovary organs. The right ovarian sample was used to measure MDA levels using the TBA method. The left ovary sample was fixed with a 10% formalin fixative solution for 24 hours, then microtechnic and HE

staining procedures were performed to determine the number of follicles and immunohistochemical staining to determine granulosa cell proliferation through PCNA detection, determine the distribution of MDA, Nrf2 and GST enzymes. The study used a completely randomized design, the data obtained were analyzed using ANOVA and continued with the BNJ test.

The results of phytochemical analysis using LC-MS showed that 49 kinds of compounds were detected in turmeric powder. The compounds found in turmeric powder include curcumin 7,798%, curcumene 5,411%,  $\alpha$  turmerone 4,949%, demethoxycurcumin 4,115%, curcumenone 4,100%,  $\alpha$  turmerone 3,898%, procurcumenol 2,804%, cinnamic acid 2,676%, caffeic acid 2,675%, turmeronol B 2.504%,  $\beta$  caryophyllene 2,350%, arabinose 2,313%, bis demethoxycurcumin 2,277%,  $\beta$  sitosterol 2,230%, and glucose 2,214%. The compounds in turmeric powder which have the potential as antioxidants based on Pa values are ascorbic acid with Pa values 0.951, quercetine 0.878,  $\beta$  carotene 0.823, arabinose 0.801, bis demethoxycurcumin 0.685, demethoxycurcumin 0.654, curcumin 0.634, caffeic acid 0.611, cinnamic acid 0.489, cinnamic acid 0.489, letestuanin A 0.483, calebin A 0.464. *In silico* research shows that curcumin compounds have the potential as inhibitors of the bond between Nrf2 and Keap1. The potential of curcumin as an inhibitor of the bond between Nrf2 and Keap1 is based on the Pa value of 0.634, the binding affinity value between curcumin and Keap1 is -8.4, the ability of curcumin binds to Keap1 protein molecules on the active side SER508A, ALA556A, TYR525A, TYR334A, and ARG415A.

*In vivo* results showed that administration of turmeric powder dosage of 200 mg/kg BW was the optimal dose, because the observed parameter values were always higher than the negative controls, although not always the highest results when compared to the other doses of turmeric powder. Turmeric powder rhizome dose of 200 mg/kg BW significantly decreased the MDA level of premenopausal white rats by 40.24%, significantly reduced MDA distribution by 41.42%, increased Nrf2 distribution by 2.74%, significantly increased the highest GST enzyme distribution by 48.54%, and significantly increased the hormone estradiol level by 3.53 times compared to the negative control. The administration of turmeric powder dose 200 mg/kg BW in premenopausal rats also optimally increased ovarian granulosa cell proliferation by 6.65% and significantly increased the highest number of primary follicles by 2.62 times, increasing the number of secondary follicles by 22.59%, increased significantly the highest number of antral follicles by 81.08%, and increased the highest number of corpus luteum by 32.26% compared to negative controls.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, Tuhan Yang Maha Esa, atas selesainya penyusunan disertasi yang berjudul “Potensi Serbuk Rimpang Kunyit (*Curcuma longa L.*) dalam Memperbaiki Aging Ovarium pada Tikus Putih Strain Wistar (*Rattus norvegicus*) Premenopause”.

Kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian studi dan penulisan disertasi ini, dengan ketulusan hati penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

1. Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi melalui Program BPPDN dan Hibah Penelitian Disertasi Doktor yang telah memberikan beasiswa dan hibah penelitian sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.
2. Direktur Program Pasca Sarjana, Universitas Brawijaya yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti Program Studi Doktor Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya.
3. Dekan Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti Program Studi Doktor Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya.
4. Ketua Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya : Prof. Muhaimin Rifa'i, S.Si., M.Si., Ph.D.Med.Sc., yang selalu memberikan arahan dan semangat.
5. Ketua Program Studi Doktor, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya : Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D., dan Ketua Program Studi Doktor Biologi sebelumnya : Luchman Hakim, S.Si., M.Agr.Sc., Ph.D. serta Prof. Dr. Ir. Estri Laras Arumingtyas, M.Sc.St., atas semua arahan dan bimbingan.
6. Rektor Universitas Diponegoro yang telah memberikan ijin tugas belajar untuk melanjutkan studi.
7. Dekan Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro yang telah memberikan kesempatan untuk melanjutkan studi.
8. Ketua Departemen dan staf dosen Departemen Biologi Universitas Diponegoro yang telah memberikan ijin dan dorongan semangat.
9. Tim Promotor dan Kopromotor : Dr. Sri Rahayu, M.Kes, selaku Promotor, Prof. Muhaimin Rifa'i, S.Si., M.Si., Ph.D.Med.Sc, selaku kopromotor I dan Dr. Sri Widyarti, M.Si., selaku kopromotor II, yang telah banyak meluangkan waktu dan dengan sabar mengarahkan, membimbing, memberi masukan, memberikan semangat, motivasi dalam penelitian dan penyelesaian disertasi.
10. Tim Penguji : Drs. Sofy Permana, M.Sc. D.Sc., Prof. Widodo, S.Si. M.Si. Ph.D. Med.Sc., dan Dr. Ir. Gatot Ciptadi, DESS atas kesediaan untuk menguji, dan telah banyak memberikan saran, perbaikan, masukan, sejak ujian proposal sampai dengan ujian akhir disertasi.
11. Penguji Eksternal : Dr. Bayyinatul Muchtaromah, drh., M.Si, atas kesediaan untuk menguji, dan memberikan saran, perbaikan, serta masukan dalam penulisan disertasi.
12. Dosen pengampu mata kuliah pada Program Doktor Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya yang telah memberikan pengetahuan dan bimbingan selama studi.

13. Staf administrasi Program Doktor Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya yang telah membantu selama studi.
14. Seluruh instansi terkait yang telah memberikan kesempatan pada penulis dalam pelaksanaan penelitian.
15. Tekhnisi pada laboratorium terkait yang telah membantu selama penelitian.
16. Anggota *working group* Bioreproduksi di Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.
17. Mahasiswa Prodi S3 Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, yang selalu saling menjadi penyebar semangat dalam menuntut ilmu dan penyelesaian studi. Khusus untuk teman seangkatan Prodi S3 Biologi tahun 2013, *Let's go folk* : Nur Indah Julisaniah, Eny Yuniati, Anak Agung Sagung Alit Suksmaningsih Kapandyan, Sutoyo, Moch. Alwi, Djuhari, Agung Budiantoro, Kartini, Mulyati., Irvan, Gatra Ervi Jayanti, Sattya Arimurti, dan Kurniasih Sukenti.
18. Keluarga tersayang : Ayahanda (Alm) dan Ibunda (Almh) yang telah memberikan dasar pendidikan, etika, dan nilai-nilai kehidupan. Semua kakak yang selalu memberikan doa, restu, semangat dalam mengikuti studi, serta dukungan materil yang sangat membantu.
19. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian naskah disertasi ini.

Penelitian dan penulisan karya ilmiah adalah suatu proses panjang yang sangat jauh dari kata selesai dan sempurna, masukan dan saran selalu mutlak penulis harapkan demi perbaikan dan kemanfaatan karya ilmiah ini bagi semua pihak.

Malang, 17 Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>Sampul</b> .....	i
<b>Halaman judul</b> .....	ii
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	iii
<b>SUSUNAN TIM PROMOTOR DAN PENGUJI</b> .....	iv
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI</b> .....	v
<b>PEDOMAN PENGGUNAAN DISERTASI</b> .....	vi
<b>RIWAYAT HIDUP</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	ix
<b>SUMMARY</b> .....	xi
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	xiii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xv
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xvii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xviii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xx
<b>DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN</b> .....	xxi
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
2.1 Aging pada Ovarium.....	5
2.1.1 Konsep tentang Aging pada Ovarium.....	5
2.1.2 Mekanisme Aging Ovarium.....	6
2.1.3 Faktor-faktor yang Menyebabkan Aging Ovarium.....	7
2.1.4 Aging Dini pada Ovarium.....	8
2.1.5 Aspek Molekuler dan Seluler pada Aging Ovarium.....	9
2.1.6 <i>Reactive Oxygen Species (ROS)</i> .....	10
2.2 Perkembangan Folikel pada Ovarium.....	10
2.2.1 Tahap gonadotropin <i>independent</i> .....	11
2.2.2 Tahap gonadotropin <i>responsive</i> .....	13
2.2.3 Tahap gonadotropin <i>dependent</i> .....	13
2.3 Peran FSH dan LH dalam Folikulogenesis.....	15
2.4 Peran Estrogen dalam Folikulogenesis.....	17
2.5 Tanaman Kunyit ( <i>Curcuma longa</i> L.).....	18
2.5.1 Kandungan Kimia Rimpang Kunyit.....	20
2.5.2 Kurkumin dalam Serbuk Kunyit.....	20
2.6 Potensi Kurkumin untuk Menghambat Proses Aging.....	22
2.7 Absorpsi Kurkumin pada Saluran Pencernaan.....	23
2.8 <i>Glutathione S-Transferase</i> Sebagai Antioksidan Endogen.....	24
2.9 <i>Nrf2</i> Sebagai Faktor Transkripsi Gen Antioksidan.....	24

2.10 Kerangka Konseptual.....25

**BAB III. METODE PENELITIAN..... 28**

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....28

3.2 Kerangka Operasional Penelitian.....28

3.2.1 Penelitian Pendahuluan.....29

3.2.2 Penelitian Utama.....30

3.3 Rancangan Penelitian.....31

3.4 Hewan Coba.....32

3.5 Serbuk Rimpang Kunyit.....32

3.6 Perlakuan Hewan Coba.....32

3.7 Prosedur Penelitian.....33

3.7.1 Analisis kadar hormon estradiol menggunakan.....33

3.7.2 Preparasi histologi dan pewarnaan HE.....34

3.7.3 Metode Imunohistokimia untuk mengetahui proliferasi.....35

3.7.4 Metode Imunohistokimia untuk mengetahui distribusi.....36

3.7.5 Penentuan Kadar MDA dengan Metode TBA .....36

3.7.6 Penentuan Kadar Kurkumin dalam serbuk rimpang.....37

3.7.7 Analisis Data.....37

**BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....38**

4.1 Analisis *LC-MS*.....38

4.2 Analisis *in silico* kandungan senyawa pada serbuk.....40

4.3 Analisis *in silico* potensi kurkumin sebagai antioksidan.....40

4.4 Pengaruh pemberian serbuk rimpang kunyit terhadap.....44

4.4.1 Kadar MDA ovarium tikus putih premenopause.....45

4.4.2 Distribusi MDA pada sel granulosa folikel ovarium.....47

4.4.3 Distribusi *Nrf2* pada sel granulosa folikel ovarium.....49

4.4.4 Distribusi Enzim *GST* pada sel granulosa folikel.....50

4.4.5 Kadar hormon estradiol pada serum darah tikus putih.....52

4.5 Pengaruh pemberian serbuk rimpang kunyit terhadap.....54

4.5.1 Proliferasi sel ranulosa ovarium tikus putih.....54

4.5.2 Jumlah folikel ovarium tikus putih premenopause.....56

4.6 Pembahasan Umum.....57

**BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....67**

5.1 Kesimpulan.....67

5.2 Saran.....67

**DAFTAR PUSTAKA.....68**

**LAMPIRAN.....78**



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Kandungan senyawa dengan konsentrasi tertinggi hasil analisis <i>LC-MS</i> pada serbuk rimpang kunyit.....	39
Tabel 2. Kandungan senyawa pada serbuk rimpang kunyit yang berpotensi sebagai antioksidan berdasarkan nilai <i>Pa</i> ( <i>Probability Activity</i> ).....	40
Tabel 3. Prediksi aktivitas biologi kurkumin.....	41
Tabel 4. Skor <i>binding affinity</i> dari <i>IQK</i> dan kurkumin terhadap <i>Keap1</i> ....	41
Tabel 5. Kadar <i>MDA</i> ovarium tikus putih premenopause ( $\mu\text{mol/g}$ ) dengan metode <i>TBA</i> .....	46
Tabel 6. Distribusi <i>MDA</i> pada sel granulosa folikel ovarium tikus putih premenopause (%) dengan metode <i>IHK</i> .....	48
Tabel 7. Distribusi <i>Nrf2</i> pada sel granulosa folikel ovarium tikus putih premenopause (%) dengan metode <i>IHK</i> .....	50
Tabel 8. Distribusi enzim <i>GST</i> pada sel granulosa folikel ovarium tikus putih (%) dengan metode <i>IHK</i> .....	51
Tabel 9. Kadar estradiol ( <i>E2</i> ) pada serum darah tikus putih premenopause ( $\mu\text{g/mL}$ ) dengan metode <i>ELISA</i> .....	52
Tabel 10. Distribusi <i>PCNA</i> pada sel granulosa folikel ovarium tikus putih premenopause (%) dengan metode <i>IHK</i> .....	55
Tabel 11. Jumlah folikel primordial, primer, sekunder, antral dan korpus luteum pada ovarium tikus putih premenopause dengan pewarnaan <i>HE</i> .....	57

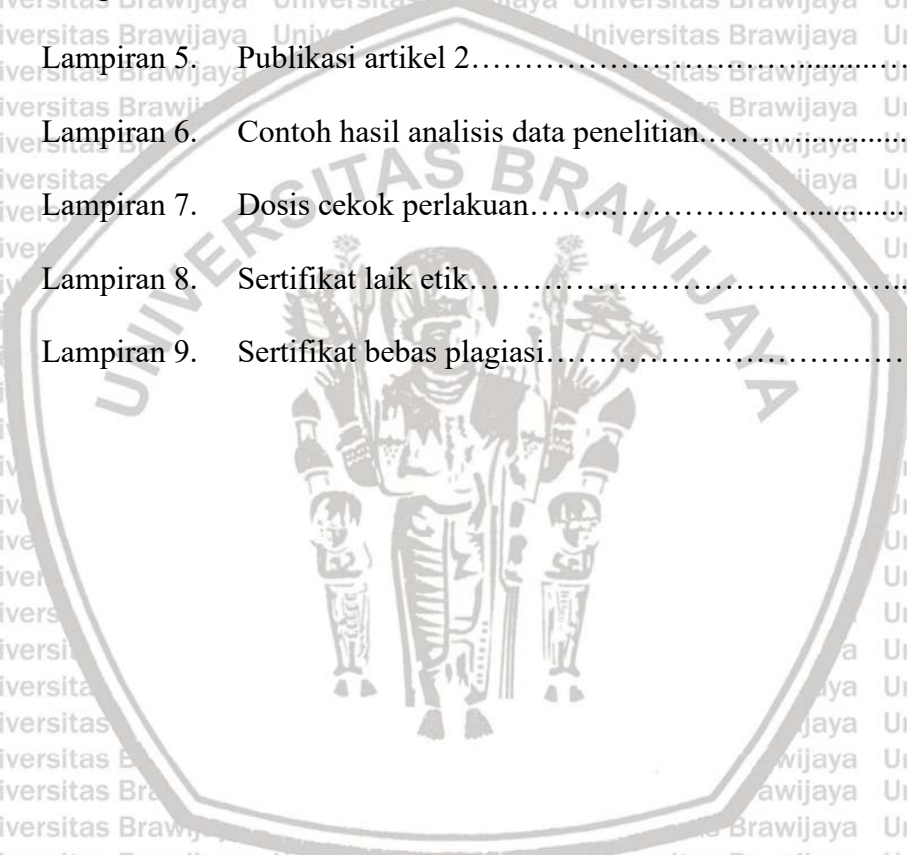
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Skema perubahan cadangan folikel ovarium dengan bertambahnya usia seorang wanita dan efek perubahan cadangan folikel tersebut terhadap beberapa faktor endokrin hipotalamus-pituitari.....	7
Gambar 2. Perkembangan folikel ovarium kelinci.....	14
Gambar 3. Tahapan folikulogenesis.....	15
Gambar 4. Mekanisme <i>two-cell two-gonadotropin</i> , pembentukan hormon steroid (progesteron, androgen dan estrogen) yang berasal dari kolesterol.....	17
Gambar 5. Rimpang, serbuk dan tanaman kunyit ( <i>Curcuma longa</i> L.).....	19
Gambar 6. Struktur kimia kurkumin.....	21
Gambar 7. Peran <i>Nrf2</i> dalam transkripsi <i>GST</i> .....	23
Gambar 8. Kerangka konseptual penelitian.....	27
Gambar 9. Tahapan analisis <i>in silico</i> .....	30
Gambar 10. Tahapan penelitian <i>in vivo</i> .....	31
Gambar 11. Hasil analisis <i>LC-MS</i> serbuk rimpang kunyit.....	38
Gambar 12. Interaksi molekuler antara kurkumin (kuning) pada sisi aktif gugus aromatik dengan <i>Keap1</i> (biru) pada <i>substrate binding domain SER508A, ALA556A, TYR525A, TYR334A dan ARG415A</i> .....	42
Gambar 13. Struktur <i>Co-crystal</i> dari molekul protein <i>Keap1</i> yang menunjukkan 5 titik pada <i>binding cavity Keap1</i> .....	43
Gambar 14. <i>Docking</i> antara molekul protein <i>Keap1</i> dan molekul senyawa 19 ( <i>IQK</i> ) yang kemungkinan berikatan pada asam amino <i>Arg380, Arg415, Arg483, Phe478, Ser508, Ser555, Ala556, dan Tyr525</i> .....	44
Gambar 15. Kemampuan molekul kurkumin sebagai peluruh radikal bebas seperti $H_2O_2$ , $HO^\bullet$ , dan $ROO^\bullet$ kemungkinan melalui dua gugus fenolik dan satu gugus metilen pada kurkumin.....	47

Gambar 16.	Distribusi MDA pada sel granulosa folikel ovarium tikus putih premenopause dengan metode IHK.....	48
Gambar 17.	Distribusi <i>Nrf2</i> pada sel granulosa folikel ovarium tikus putih premenopause dengan metode IHK.....	49
Gambar 18.	Distribusi enzim <i>GST</i> pada sel granulosa folikel ovarium tikus putih premenopause dengan metode IHK.....	51
Gambar 19.	Kandungan fitosteroid ( $\beta$ -sitosterol) pada serbuk rimpang kunyit yang memiliki kemiripan struktural dengan kolesterol, yang merupakan bahan baku pembentukan hormon-hormon steroid seperti estradiol.....	53
Gambar 20.	Distribusi <i>PCNA</i> pada sel granulosa folikel ovarium tikus putih premenopause dengan metode IHK.....	55
Gambar 21.	Folikel ovarium tikus putih premenopause menggunakan metode pewarnaan HE.....	57
Gambar 22.	Fungsi kurkumin sebagai antioksidan dengan mekanisme inhibitor interaksi antara <i>Keap1</i> dan <i>Nrf2</i> .....	60
Gambar 23.	Aktivasi <i>Nrf2</i> dan regulasinya terhadap beberapa gen. Inaktivasi <i>Keap1</i> akan menyebabkan <i>Nrf2</i> mulai aktif dan bermigrasi ke dalam nukleus. Bersama dengan molekul heterodimer yaitu <i>sMaf</i> ( <i>small Maf</i> ), <i>Nrf2</i> meregulasi ekspresi gen <i>ARE</i> ( <i>Antioxidant Response Element</i> ) - <i>dependent</i> dalam beberapa kategori.....	62
Gambar 24.	Interaksi antara <i>Keap1</i> dan <i>Nrf2</i> . (A) Respon terhadap stres oksidatif dan elektrofilik, <i>Nrf2</i> merangsang ekspresi gen enzim sitoprotektif. (B) <i>Phylogenetic alignment</i> dari <i>N-terminal Neh2</i> domain dari <i>Nrf2</i> .....	63
Gambar 25.	Histogram distribusi <i>MDA</i> , <i>Nrf2</i> , enzim <i>GST</i> dan <i>PCNA</i> pada sel granulosa ovarium tikus putih premenopause setelah perlakuan serbuk rimpang kunyit dengan dosis yang berbeda.....	65
Gambar 26.	Histogram jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder, folikel antral, dan korpus luteum pada ovarium tikus putih premenopause setelah perlakuan serbuk rimpang kunyit dengan dosis yang berbeda.....	66

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Hasil analisis LC-MS serbuk rimpang kunyit.....	78
Lampiran 2. Sertifikat seminar internasional.....	79
Lampiran 3. Potensi senyawa yang terkandung pada serbuk rimpang kunyit sebagai antioksidan berdasarkan nilai Pa.....	80
Lampiran 4. Publikasi artikel 1.....	81
Lampiran 5. Publikasi artikel 2.....	89
Lampiran 6. Contoh hasil analisis data penelitian.....	98
Lampiran 7. Dosis cekok perlakuan.....	103
Lampiran 8. Sertifikat laik etik.....	104
Lampiran 9. Sertifikat bebas plagiasi.....	105



**DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN**

AGEs	: Advanced Glication End Products
AH	: Senyawa antioksidan
ARE	: Antioxidant Response Element
CRS	: Carbonil Reactive Species
ERT	: Estrogen Replacement Therapy
E2	: Estradiol
GCS	: Glutamylcystein Synthetase
GST	: Glutathion S Transferase
HO•	: Hidroperoksil
HRT	: Hormon Replacement Therapy
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrogen peroksida
Keap1	: Kelch-like-ECH-assosiate protein 1
LC-MS	: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
MDA	: Malondialdehyde
NF-kB	: Nuclear Factor kappa B
NQO1	: NADPH Quinone Oxireductase 1
Nrf2	: Nuclear related factor 2
OH•	: Radikal bebas hidroksil
O•	: Oxygen superoxide radical
Pa	: Probability activity
PCNA	: Proliferating Cell Nuclear Antigen
Prx	: Peroxiredoxin
RH, ROH	: Senyawa stabil
ROS	: Reactive Oxygen Species
R•, ROO•	: Radikal lipid
SFE	: Supercritical Fluid Extraction
SOD	: Supra Oxide Dismutase
TBA	: Thio Barbituric Acid
TCA	: Tri Chloroacetic Acid

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kapasitas atau kemampuan reproduksi pada wanita akan mengalami penurunan seiring dengan pertambahan usia (Gougeon, 2003). Kapasitas reproduksi wanita secara alami mencapai puncak pada usia 20 tahun, kesuburan akan mengalami penurunan secara drastis pada usia sekitar 30 tahun dan akhirnya memasuki masa menopause pada usia rata-rata 50-51 tahun (te Velde & Pearson (2002). Penurunan kemampuan reproduksi pada wanita seiring dengan pertambahan usia, terlihat pada penelitian yang dilakukan di Amerika Serikat pada 120.000 peserta program embrio transfer. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada wanita usia dibawah 35 tahun keberhasilan program embrio transfer mencapai 45 % kelahiran, 24 % pada wanita usia 35-37 tahun, 19% pada wanita usia 38-40 tahun, 8 % pada wanita usia 41-42 8%, dan 4 % pada wanita usia diatas 42 tahun (Wright dkk., 2006).

Penurunan kapasitas reproduksi pada wanita usia diatas 35 tahun diidentifikasi sebagai aging ovarium, yang ditandai antara lain dengan penurunan jumlah folikel ovarium secara drastis, penurunan kadar hormon estrogen, siklus estrus yang tidak teratur (te Velde & Pearson, 2002). Faktor penyebab pasti terjadinya aging ovarium belum dapat secara jelas diketahui (Li dkk., 2012). Berdasarkan teori *free radical theory of aging*, menyatakan bahwa *Reactive Oxygen Species (ROS)*, yang diproduksi oleh mitokondria akan menyebabkan kerusakan pada mitokondria itu sendiri ketika jumlahnya meningkat seiring dengan pertambahan usia dan melebihi kemampuan homeostasis sel (Tatone dkk., 2008). Kerusakan pada mitokondria akan mengganggu kinerja sel secara keseluruhan dan akan memicu terjadinya penyakit-penyakit degeneratif yang berhubungan dengan aging (Rattan, 2006).

*ROS* yang diduga sebagai pemicu terjadinya aging ovarium, selain berasal dari metabolisme energi pada mitokondria sel granulosa, juga dihasilkan dari proses steroidogenesis (Valko dkk., 2007). Produksi *ROS* yang tinggi dan melebihi kemampuan homeostasis sel akan mengakibatkan kerusakan berbagai komponen seluler seperti *DNA*, *RNA*, protein dan lipid (Miguel dkk., 1980). Kerusakan akan berlanjut pada mitokondria

sel granulosa (Tatone dkk., 2008), mengganggu kinerja sel granulosa secara keseluruhan terutama pada proses proliferasi, dimana dukungan terhadap perkembangan oosit akan terganggu (Tatone & Amicarelli, 2012). Kondisi ini akan berujung pada terganggunya proses folikulogenesis dan bisa mengakibatkan terjadinya atresia folikel (Valko dkk., 2007).

Keluhan - keluhan yang datang menyertai masa terjadinya aging ovarium pada wanita yang telah mencapai usia 30 - 40 tahun seringkali dilakukan dengan terapi (Wright dkk., 2006). Terapi pada wanita menjelang masa menopause yang selama ini banyak dilakukan adalah secara hormonal yaitu dengan terapi sulih hormon (*hormon replacement therapy* atau *HRT* dan *estrogen replacement therapy* atau *ERT*) (Wratsangka, 1999). Efektivitas hormon estrogen dalam mengatasi keluhan menjelang menopause sangat tinggi, tetapi pada terapi hormon ini terdapat efek samping pada wanita - wanita yang mempunyai riwayat penyakit kanker payudara, kanker endometrium, sirosis hati, hipertensi, dan hiperlipidemia (Baziad, 2003). Dewasa ini terapi sulih hormon sudah mulai ditinggalkan dan beralih ke bahan obat yang lebih alami dan tidak menimbulkan efek samping (Wright dkk., 2006).

Tanaman kunyit telah sejak lama digunakan sebagai tanaman obat (Aggarwal dkk., 2006). Senyawa kurkumin pada tanaman kunyit diyakini berpotensi sebagai antikanker, antiviral, antiinflamasi dan antioksidan (Atef dkk., 2014). Jayaprakasha dkk. (2006), menyatakan bahwa senyawa aktif kurkuminoid memiliki aktivitas hepatoprotektif, cardioprotektif, antifungal dan, antioksidan. Kandungan kurkumin pada serbuk rimpang kunyit dapat berfungsi sebagai antioksidan (Shen dkk., 2012), karena kurkumin dapat mengaktivasi agen transkripsi yaitu *Nuclear related factor 2 (Nrf2)* yang berperan penting dalam transkripsi kelompok enzim detoksifikasi fase II (*phase II detoxification enzymes*) seperti *glutathione S-transferase (GST)*, *NAD(P)H quinone oxireductase 1 (NQO1)* dan *glutamylcystein synthetase (GCS)* (Zhang, 2006). Enzim - enzim detoksifikasi fase II ini berfungsi melindungi sel dari radikal bebas terutama dari kelompok *ROS* (Reyes dkk., 2013).

Kandungan senyawa kurkumin pada tanaman kunyit juga dapat berfungsi sebagai peluruh radikal bebas (*scavenger*) intra seluler dari molekul oksidatif seperti  $H_2O_2$ ,  $HO^\bullet$ , dan  $ROO^\bullet$ , melalui dua gugus fenolik dan satu gugus metilen  $CH_2$  yang dimiliki oleh

kurkumin (Barzegar & Movahedi, 2011). Kemampuan kurkumin sebagai peluruh radikal bebas intra seluler akan melindungi sel dari toksisitas radikal bebas terutama dari kelompok ROS (Barzegar & Movahedi, 2011)

Tanaman kunyit juga mengandung fitosteroid (*β-sitosterol*) (Li dkk., 2011). Fitosteroid diduga dapat berfungsi sebagai prekursor sintesis hormon steroid seperti estrogen karena secara struktural dan fungsional, fitosteroid memiliki kemiripan dengan kolesterol yang merupakan prekursor alami sintesis hormon steroid (Kusmana dkk., 2007). Efek estrogenik dari fitosteroid (*β-sitosterol*) dan kemampuan kurkumin dalam mengaktifasi *Nrf2*, untuk memicu transkripsi enzim - enzim detoksifikasi fase 2 seperti enzim *GST* yang bersifat sitoprotektif, serta kemampuan kurkumin sebagai peluruh radikal bebas diharapkan dapat membantu memperbaiki aging ovarium pada wanita, yang dalam penelitian ini akan diuji cobakan berupa serbuk rimpang kunyit pada tikus putih strain wistar (*Rattus norvegicus*) premenopause.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian adalah ;

1. Senyawa apa saja yang terkandung pada serbuk rimpang kunyit yang berpotensi sebagai antioksidan ?
2. Apakah senyawa kurkumin yang terkandung pada serbuk rimpang kunyit dapat berpotensi sebagai antioksidan dengan menghambat ikatan antara *Nrf2* dan *Keap1* berdasarkan analisis *in silico* ?
3. Apakah pemberian serbuk rimpang kunyit dapat menurunkan kadar dan distribusi *MDA*, meningkatkan distribusi *Nrf2* dan enzim *GST* pada ovarium tikus putih premenopause ?
4. Apakah pemberian serbuk rimpang kunyit dapat meningkatkan kadar hormon estradiol serum darah, meningkatkan proliferasi sel granulosa dan jumlah folikel ovarium pada tikus putih premenopause ?



### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah ;

1. Mengetahui kandungan senyawa pada serbuk rimpang kunyit yang berpotensi sebagai antioksidan.
2. Menganalisis secara *in silico* potensi senyawa kurkumin yang terkandung pada serbuk rimpang kunyit sebagai antioksidan melalui mekanisme penghambatan ikatan antara *Nrf2* dan *Keap1* .
3. Menganalisis pemberian serbuk rimpang kunyit dalam menurunkan kadar dan distribusi *MDA*, meningkatkan distribusi *Nrf2* dan enzim *GST* pada ovarium tikus putih premenopause.
4. Menganalisis pemberian serbuk rimpang kunyit dalam meningkatkan kadar hormon estradiol serum darah, meningkatkan proliferasi sel granulosa dan jumlah folikel ovarium pada tikus putih premenopause.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian adalah ;

1. Memberikan informasi tentang kandungan senyawa - senyawa yang terdapat pada serbuk rimpang kunyit dan kemungkinan potensinya sebagai antioksidan serta potensi senyawa kurkumin yang terkandung pada serbuk rimpang kunyit sebagai inhibitor ikatan antara *Nrf2* dan *Keap1*.
2. Memberikan informasi tentang potensi serbuk rimpang kunyit dalam memperbaiki aging ovarium pada tikus putih premenopause melalui indikator kadar dan distribusi *MDA*, distribusi *Nrf2* dan enzim *GST*, kadar hormon estradiol serum darah, serta proliferasi sel granulosa dan jumlah folikel ovarium.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Aging pada Ovarium

##### 2.1.1 Konsep tentang Aging pada Ovarium

Aging reproduksi menurut Perry & Santoro (2006) adalah generalisasi dari aging somatik, keduanya sangat berkaitan erat. Sejalan dengan bertambahnya usia maka pengaruh stres oksidatif akan mengganggu kinerja seluler dan meningkatkan kerusakan DNA (Fleming, 1982). Cadangan oosit pada ovarium fetus mencapai puncak pada 16-20 minggu masa gestasi yaitu sekitar 6-7 juta oosit (Broekmans dkk., 2009), cadangan oosit mulai mengalami pengurangan secara drastis pada saat fetus berusia 24 minggu (Gougeon, 2003). Saat lahir, bayi mempunyai 1-2 juta folikel, kemudian akan terjadi proses atresia secara konstan sehingga pada usia sekitar 37,5 tahun, seorang wanita normalnya tinggal mempunyai cadangan folikel sekitar 25.000. Pada usia ini proses atresia akan mengalami percepatan sampai pada usia menopause yaitu sekitar 51 tahun dan cadangan folikel hanya tinggal sekitar 1000 folikel (Gougeon dkk., 1994; Gougeon, 2003).

Konsep tentang aging reproduksi mengarah kepada penurunan secara gradual dari jumlah dan kualitas oosit, yang berada bersama folikel dalam kortek ovarium (te Velde & Pearson, 2002). Konsep aging ovarium berhubungan dengan reduksi jumlah folikel dan meningkatnya kerusakan kualitas folikel yang akan menyebabkan penurunan kesuburan secara gradual sehingga akhirnya menyebabkan sterilitas secara alami (menopause). Penurunan jumlah oosit dan peningkatan kerusakan kualitas oosit pada ovarium disebut dengan *poor ovarian reserve* (PO) dan seringkali disinonimkan dengan aging ovarium (Li dkk., 2012).

Proses aging ovarium pada setiap individu sangat bervariasi, hal tersebut dapat diindikasikan dari besarnya variasi usia pencapaian menopause (te Velde & Pearson, 2002). Sebagian wanita diketahui masih fertil sampai pada 5 dekade dari usianya disebut dengan aging ovarium secara fisiologi, sedangkan sebagian lagi diketahui sudah kehilangan kesuburannya secara alamiah pada sekitar pertengahan usia 30 (*mid-thirties*) (Broekmans dkk., 2009) yang disebut dengan *prematur ovarian failure* (POF) atau aging

ovarium secara patologi yg akhirnya mengarah ke aging dini ovarium (*early aging ovarium*) (Li dkk., 2012). Mekanisme terjadinya aging dini ovarium yang ditandai dengan penurunan secara drastis jumlah folikel dari *follicle pool* dan penurunan kualitas oosit, samapi saat ini masih belum secara jelas diketahui. Beberapa ide sudah mengarah ke faktor endokrin, parakrin, metabolik dan genetik sebagai petunjuk menuju titik terang untuk menjelaskan mekanisme terjadinya proses aging dini ovarium yang rumit (Li dkk., 2012).

### 2.1.2 Mekanisme Aging Ovarium

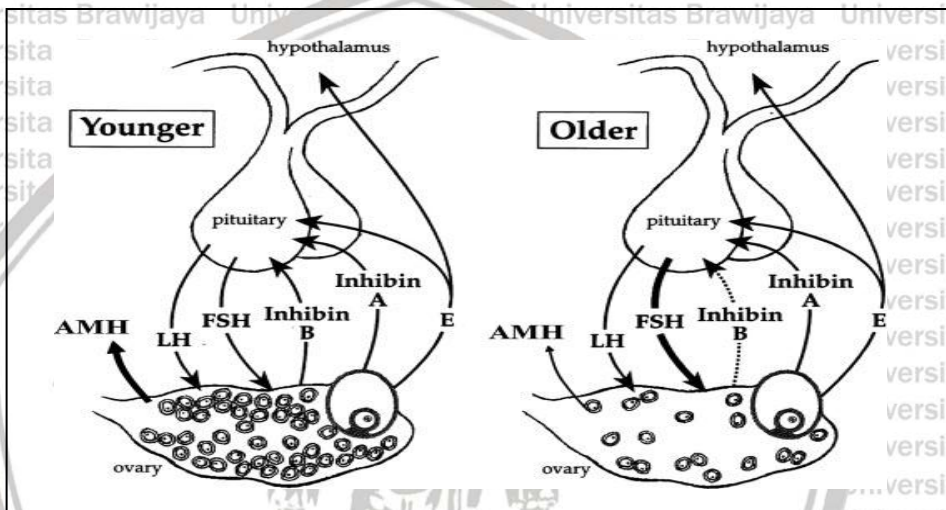
Kumpulan folikel primordial, baru dibentuk pada akhir trimester kedua usia kehamilan. Setelah kumpulan folikel primordial terbentuk, maka akan siap sebagai sumber perkembangan folikel (Hansen dkk., 2008). Kumpulan folikel primordial akan tetap diam beberapa tahun (bahkan sampai 40 tahun) sampai diaktivasi untuk menjadi folikel primer. Setiap bulan, beberapa folikel dari kumpulan ini akan diaktivasi dan berkembang menuju ke tahap folikel primer, preantral dan antral (McGee & Hsueh, 2000). Dalam perjalanan perkembangannya, hanya akan ada satu folikel yaitu folikel dominan yang berkembang sampai tahap preovulatori, sedangkan lainnya akan atresia pada tahap perkembangan folikel yang berbeda-beda (Broekmans dkk., 2009).

Selama masa reproduktif dalam kehidupan wanita, jumlah folikel primordial akan berkurang rata-rata sekitar 1000 folikel setiap bulan. Sekitar 99,9 % folikel akan mengalami atresia pada tahap perkembangan yang berbeda-beda. Seorang wanita akan mengovulasikan sekitar 400-500 folikel selama masa hidupnya (Hansen dkk., 2008).

Pada periode transisi dari peri-menopausal ke menopause jumlah folikel berkurang secara tajam yang disebabkan oleh peningkatan level FSH (Broekmans dkk., 2009). Kondisi tersebut akan menyebabkan siklus menstruasi menjadi lebih pendek, demikian juga dengan tahap folikuler. Siklus menstruasi akan memendek dan berkurang sekitar 2-3 hari (Hansen dkk., 2008).

Peningkatan level FSH disebabkan oleh penurunan inhibin B dan AMH yang merupakan regulator negatif terhadap level FSH (Gambar 1). Sumber utama inhibin B dan AMH adalah folikel preantral dan folikel antral kecil. Kehilangan folikel prematur selama aging ovarium terutama karena rendahnya level inhibin B dan AMH, bersamaan

dengan hasil akumulasi FSH (Gleicher dkk., 2011). Pencarian tentang faktor-faktor yang berubah bersamaan dengan aging berfokus pada AMH (Tatone dkk., 2008). Peningkatan kadar FSH berakselerasi dengan proses seleksi dan rekrutmen folikel dominan, sementara level tinggi FSH akan memaksa sel granulosa sekitar prematur oosit mengalami pematangan (*maturity*) yang terlalu cepat (Broekmans dkk., 2009). Maturasi yang tidak sinkron antara sel granulosa dan oosit akan mengakibatkan lebih banyak folikel yang atresia dan hilang (Gleicher dkk., 2011).



Sumber : Broekmans dkk., (2009)

Gambar 1. Skema perubahan cadangan folikel ovarium dengan bertambahnya usia seorang wanita dan efek perubahan cadangan folikel tersebut terhadap beberapa faktor ovarium dan faktor endokrin hipotalamo-pituitari.

### 2.1.3 Faktor-faktor yang Menyebabkan Aging pada Ovarium

Faktor-faktor yang mempengaruhi jumlah dan kualitas oosit seiring dengan berjalannya usia secara umum masih belum bisa dengan jelas didefinisikan (Li dkk., 2012). Beberapa faktor yang diindikasikan berhubungan dengan aging prematur ovarium dan konsekuensi dari penuaan saat menopause adalah : Faktor genetik ; perubahan *DNA genomik* (Hamatani dkk., 2004; Sathyapalan dkk., 2009) mutasi *DNA mitokondria* (Trifunovic dkk., 2009) dan penurunan aktivitas telomerase (Kinugawa dkk., 2000). Faktor lingkungan mikro ovarium ; *ROS* dan *advanced glycation end products (AGEs)* (Tatone & Amicarelli, 2013), vaskularisasi perifolikuler. Faktor efek patologi. Faktor lain seperti merokok, radiasi, logam berat, bahan kimia yang dapat mengganggu proses

meiosis oosit dan menyebabkan *aneuploidy* (te Velde & Pearson, 2002), pola makan (diet) yang salah juga merangsang aging prematur ovarium (Li dkk., 2012).

Penelitian tentang aging ovarium atau aging reproduktif lebih fokus ke kuantitatif aspek dari aging ovarium yang mengarah ke model matematika untuk memprediksi kehilangan folikel yang berbasis pada kronologi usia tanpa mengarah ke penghitungan marker biologi (Hansen dkk., 2008). Konsep tentang aging ovarium atau penurunan reproduksi telah menjadi jelas yaitu proses penurunan secara gradual dari jumlah dan kualitas oosit (te Velde & Pearson, 2002). Penelitian selanjutnya lebih mengarah untuk mengetahui faktor-faktor yang dapat mempercepat datangnya proses aging ovarium sehingga kemudian disebut dengan aging dini ovarium (*early aging ovarium*), seperti contohnya penelitian tentang lingkungan mikro ovarium yang berhubungan dengan stres oksidatif dan *advanced glycation end products (AGEs)* (Tatone & Amicarelli, 2013).

#### 2.1.4 Aging Dini pada Ovarium (*early ovarian aging*)

Aging ovarium atau penurunan kemampuan reproduksi pada wanita yang ditandai dengan penurunan secara drastis jumlah folikel pada ovarium, seringkali disebabkan oleh faktor genetik, faktor lingkungan mikro ovarium, faktor pathologi, dan faktor lain seperti kebiasaan merokok, radiasi, dan logam berat. Pada kondisi tertentu, aging ovarium bisa datang lebih awal dimana proses penurunan jumlah folikel terjadi lebih cepat, sehingga akan berimbas pada usia yang lebih dini dalam pencapaian masa menopause. Kondisi ini dikenal sebagai aging dini ovarium *early aging ovarium* (Lobo, 2003; Hansen dkk., 2008; Subrat dkk., 2013).

Penelitian - penelitian selanjutnya mengenai aging dini pada ovarium lebih mengarah pada faktor - faktor yang dapat menyebabkan terjadinya aging dini ovarium tersebut. Faktor penyebab utama yang diduga sebagai pemicu terjadinya aging dini pada ovarium adalah perubahan lingkungan mikro dari ovarium yang disebabkan oleh radikal bebas, *advanced glycation end products (AGEs)* (Yin & Chen, 2005). Radikal bebas yang diduga menjadi penyebab utama perubahan lingkungan mikro ovarium adalah dari kelompok *Reactive Oxygen Species (ROS)* (Tatone & Amicarelli, 2013).

### 2.1.5 Aspek Molekuler dan Seluler pada Aging Ovarium

Aspek molekuler penyebab terjadinya aging ovarium adalah adanya perubahan pada lingkungan mikro ovarium (Sharov dkk., 2008). Perubahan pada lingkungan mikro ovarium berhubungan dengan rantai transpor elektron pada mitokondria yang mengalami gangguan saat memproduksi energi homeostasis. Gangguan pada proses produksi energi tersebut kemungkinan disebabkan dan dipengaruhi oleh peningkatan produksi dari racun produk metabolik seperti *reactive oxygen species (ROS)* yang dapat secara serius menyebabkan kerusakan biomolekuler pada mitokondria (Rattan, 2006). Aging ovarium dapat dilihat dari akumulasi kerusakan yang progresif dan irreversibel dari integritas makromolekul mitokondria, yang kemudian akan berlanjut ke kehilangan homeostasis metabolik dan penurunan fungsi utama dari sel - sel granulosa ovarium (Tatone & Amicarelli, 2013).

*Reactive oxygen species (ROS)*, termasuk *superoxide anion radical*, *hidroxyl radicals* dan hidrogen peroksida adalah produk dari metabolisme aerobik. Sumber utama dari *ROS* adalah kebocoran elektron dari dalam membran mitokondria selama fosforilasi oksidatif dan produksi ATP, di ovarium enzim citochrome P450 juga relevan sebagai sumber *ROS* (Rattan, 2006). Selain *ROS*, proses metabolisme endogen seperti glikolisis juga dapat menghasilkan radikal bebas dari kelompok karbonil yaitu *carbonyl reactive species (CRS)*. *CRS* dapat berinteraksi dengan protein dan lipid menghasilkan produk yang sangat reaktif dan berkontribusi terhadap kerusakan organ yang merupakan pertanda timbulnya penyakit degeneratif (Tatone & Amicarelli, 2013).

Teori-teori tentang aging menyatakan ketika terjadi kebocoran elektron intra-mitokondria maka akan meningkatkan produksi *ROS*, yang mana akan mempengaruhi stabilitas *DNA mitokondria (mtDNA)* dan fungsi mitokondria (Yin & Chen, 2005). Saat produksi radikal bebas seperti *ROS* dan *CRS* melebihi kapasitas *scavenger* sebagai antioksidan maka muncul stres oksidatif. Ketidak-seimbangan ini akan menyebabkan gangguan kinerja seluler dan energi yang dilepaskan dari mitokondria dan akhirnya akan mengarah ke kerusakan dan kematian sel (Tatone dkk., 2008).

### 2.1.6 Reactive Oxygen Species (ROS)

Sumber utama ROS seperti disebutkan sebelumnya adalah kebocoran elektron yang berasal dari membran dalam mitokondria selama fosforilasi oksidatif dan produksi ATP. Pada jaringan steroidogenik seperti ovarium, enzim sitokrom P450 juga relevan sebagai sumber penghasil ROS (Finkel & Holbrook, 2000). ROS adalah molekul signaling, modulasi dari level ROS dalam sistem scavenger ROS akan meregulasi perkembangan dan daya tahan folikuler. ROS kemungkinan menginisiasi apoptosis pada folikel antral dan merupakan signal penting pada proses ovulasi (Agarwal dkk., 2012).

Sistem scavenger ROS yang melibatkan aktivitas enzimatic dan level protein dari *superoxide dismutase (SOD)* dapat diobservasi pada sel kumulus. SOD bereaksi dengan *superoxide anion radicals* untuk membentuk oksigen dan  $H_2O_2$ , keadaan seperti ini ditemukan menurun pada kondisi aging dan level rendah dari aktivitas SOD berkorelasi dengan kegagalan hasil *In Vitro Fertilization (IVF)* (Matos dkk., 2009).

## 2.2 Perkembangan Folikel pada Ovarium

Proses pertumbuhan (proliferasi) dan perkembangan (diferensiasi) pada folikel yang di dalamnya terjadi proses oogenesis disebut sebagai proses folikulogenesis (Hafez, 2000). Folikulogenesis berlangsung sejak hewan mencapai pubertas, dimulai dengan diambilnya folikel primordial ke dalam suatu kumpulan yang berisi folikel-folikel yang sedang tumbuh berkembang dan dapat diakhiri baik dengan ovulasi atau menjadi atresia (Gougeon, 2003).

Folikulogenesis juga disebut sebagai suatu proses untuk mencapai kelangsungan kehidupan tingkat lanjut yang ditandai dengan proliferasi sel-sel folikel ovarium (pertumbuhan folikuler) dan sitodiferensiasi (Frandsen, 1986). Pertumbuhan folikuler berdasarkan tahapan perkembangan folikel dan ketergantungan terhadap gonadotropin dapat dibagi menjadi 3 tahapan, (1) pertumbuhan folikuler dari folikel primordial, folikel primer dan folikel sekunder (tahap gonadotropin independent), (2) transisi antara tahap preantral dan awal antral (tahap gonadotropin responsive), dan (3) pertumbuhan kontinyu dari awal antral sampai ke seleksi folikel untuk diovulasikan (tahap gonadotropin dependent) (Orisaka dkk., 2009).

Pertumbuhan folikel pada tahap preantral (tahap gonadotropin independent) dipengaruhi oleh faktor-faktor pertumbuhan yang diproduksi secara lokal melalui mekanisme autokrin/parakrin (oocyte paracrine growth factors BMP-6, BMP-15, GDF-9) (Piotrowska dkk., 2013). Tahap yang kedua dan tahap ketiga diatur oleh *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) serta faktor-faktor pertumbuhan lainnya (Gougeon, 2003). Faktor-faktor pertumbuhan ini akan merangsang proliferasi sel dan mempengaruhi aktivitas gonadotropin (Roche, 1996).

### 2.2.1 Tahap gonadotropin independent

Tahap gonadotropin *independent* meliputi pertumbuhan folikuler dari mulai folikel primordial, folikel primer sampai folikel sekunder (Orisaka dkk., 2009). Folikel primordial merupakan unit dasar terpenting reproduksi dari ovarium oleh karena dari folikel ini akan berkembang menjadi folikel dominan dan nantinya akan memasuki siklus menstruasi (Gougeon, 2003). Hasil penelitian Hutt dkk. (2006), menyatakan bahwa masuknya suatu folikel primordial yang telah tersedia pada kumpulan folikel-folikel yang sedang tumbuh dikatakan sebagai proses pengambilan atau transisi folikel primordial menjadi folikel primer, pada hewan kelinci muda (Gambar 2).

Sebagian dari folikel primordial akan diambil dan tumbuh langsung setelah pembentukannya dalam masa fetus. Proses pengambilan akan terus berlangsung sampai kumpulan folikel primordial tidak dapat aktif lagi (Hafez, 2000). Perubahan bentuk sel dari skuamous menjadi kuboid, dan perubahan kandungan potensial mitotik pada sel granulosa merupakan penanda histologis terjadinya proses pengambilan, kejadian ini diikuti dengan aktivasi gen dan pertumbuhan dari oosit (McGee & Hsueh, 2000).

Aktivasi folikel primordial ditandai dengan (1) transisi sel granulosa disekitar oosit dari bentuk skuamous menjadi kuboid, (2) proliferasi secara perlahan dari sel granulosa (3) pertumbuhan oosit (Hutt dkk., 2006)

Folikel primer ditandai dengan adanya satu atau lebih sel granulosa kuboid yang tersusun dalam satu lapis sel yang mengelilingi oosit. Proses perkembangan utama yang terjadi pada folikel primer termasuk ekspresi reseptor FSH dan pertumbuhan serta diferensiasi oosit (Gougeon, 2003). Hasil penelitian Orisaka dkk., (2009) menyatakan bahwa pada folikel primer (tahap pre antral) mulai dibentuk sel theka yang berasal dari



sel korteks stroma dan bukan dari sel medula stroma. Pertumbuhan folikel primer kelinci muda dari folikel primer akan diikuti dengan terbentuknya lapisan sel theka disekitar folikel (Hutt dkk., 2006). Pembentukan sel theka dari stroma sel pada folikel primer dipengaruhi oleh berbagai faktor yang belum sepenuhnya jelas, tetapi hasil penelitian Young & McNeilly (2010) menyebutkan bahwa pada saat pembentukan sel theka dari sel stroma kemungkinan dikontrol oleh kombinasi dari faktor-faktor seperti AMH, bFGF, BMP, GDF-9, IGF, KGF, LIF, dan SCF (*kit ligand*).

Pada saat perkembangan folikel primer, sel-sel granulosa akan mengekspresikan reseptor FSH (Gougeon, 2003). Aktivin yang diproduksi oleh sel granulosa diduga memiliki peranan dalam merangsang ekspresi reseptor FSH melalui mekanisme autokrin/parakrin dan juga diduga bahwa peningkatan dari kadar FSH plasma akan meningkatkan perkembangan folikel primer (Macklon & Fauser, 1999).

Pada perkembangan folikulogenesis preantral, struktur folikel mulai mengalami perubahan (Lierman dkk., 2007). Perubahan yang utama selama perkembangan folikel sekunder yaitu peningkatan jumlah sel granulosa dan penambahan sel theka (Tajima dkk., 2007). Perkembangan folikel primer menjadi folikel sekunder yang berkembang sempurna merupakan hasil dari proses aktif pengaturan autokrin/parakrin termasuk faktor-faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh oosit (Piotrowska dkk., 2013).

Perkembangan folikel sekunder dimulai dengan bertambahnya sel granulosa lapisan kedua. Tahapan ini disebut sebagai transisi folikel primer menjadi sekunder. Hal ini diikuti dengan perubahan sel granulosa dari epitel selapis kuboid menjadi epitel berlapis kolumnar (Gougeon, 2003). Sel granulosa dan sel theka mensupport perkembangan oosit dengan nutrisi esensial, prekursor metabolik, *growth factor* dan hormon (Hutt & Albertini, 2007), sedangkan oosit akan mensekresi *growth factor* berupa 2 anggota dari kelompok *transforming growth factor (TGF-B)* yaitu *GDF-9* dan *BMP-15* untuk mensupport proliferasi sel granulosa (Piotrowska dkk., 2013).

Perkembangan progresif folikel sekunder berlanjut dengan bertambahnya lapisan sel granulosa yaitu dua lapis atau lebih mengelilingi oosit, perkembangan sel theka di sekitar lamina basalis, serta terbentuknya pembuluh darah di sekitar sel theka (Gougeon, 2003). Sel theka merupakan transformasi dari sel korteks stroma hasil asosiasi kerja dari sel granulosa dengan *LHR* (Orisaka dkk., 2009). Pertumbuhan preantral FSH dan LH

reseptor bekerjasama untuk membentuk sistem *second messenger cAMP* pada sel granulosa dan sel theka (McNatty dkk., 2007). Fase akhir preantral adalah bentuk folikel sekunder sempurna, dimana oosit akan dikeliling oleh zona pelusida, beberapa lapis sel granulosa, lamina basalis, sel theka interna dan eksterna yang sudah didukung oleh pembuluh darah (Gougeon, 2003).

### 2.2.2 Tahap gonadotropin responsive

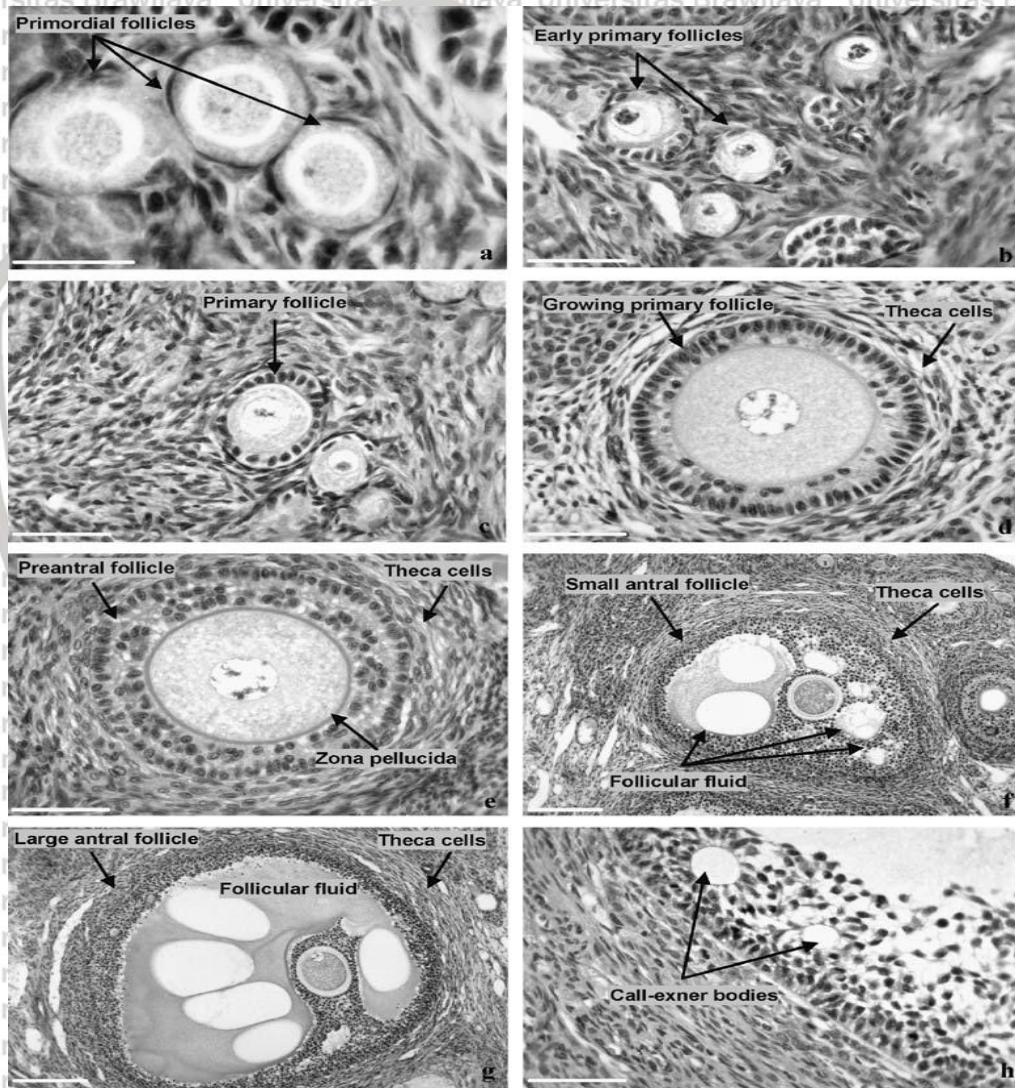
Tahap gonadotropin responsive merupakan pertumbuhan folikel terutama dikontrol oleh intraovarian regulator seperti *growth factor*, *cytokine* dan *gonadal steroid* (Orisaka dkk., 2009). Pertumbuhan folikel pada tahap ini tidak memerlukan gonadotropin, hanya distimulasi oleh kehadiran FSH (McGee & Hsueh, 2000). Tahap transisi dari folikel preantral ke folikel awal antral ini merupakan tahapan kedua dari perkembangan folikel menuju bentuk yang bergantung pada gonadotropin (tahap gonadotropin dependent) dan penentuan folikel akan tumbuh lanjut atau mengalami atresia (Orisaka dkk., 2009). Folikel yang terpilih untuk berkembang lebih lanjut menerima gonadotropin dan sinyal regulator intra ovarian sehingga dapat survival, sedangkan folikel yang atresia merupakan konsekuensi dari ketidakcukupan dari pendukung pertumbuhan (Hutt dkk., 2006). Tahap transisi preantral – awal antral rentan terjadi folikel atresia (McGee & Hsueh, 2000).

Tahap transisi preantral – awal antral ditandai dengan adanya suatu ruang (kavitas) atau antrum yang mengandung cairan yang disebut cairan folikuler (Hafez, 2000), kondisi ini menandakan folikel berada pada tahap awal antral (Gougeon, 2003). Pada tahap ini perkembangan folikel bergantung pada growth faktor lokal dan sekresi FSH maupun LH dari hipofisis, FSH akan memacu oosit untuk menyelesaikan tahap meiosis, serta menekan reseptor LH sehingga sel granulosa terus berproliferasi dan membentuk kumulus oophorus (Hutt & Albertini, 2007). FSH adalah tombol pengatur interaksi sel oosit dan sel kumulus selama perkembangan folikel antral (Hutt & Albertini, 2007).

### 2.2.3 Tahap gonadotropin dependent

Tahap gonadotropin *dependent* merupakan tahap pertumbuhan kontinyu menuju bentuk folikel antral sampai folikel Graaf, termasuk proses pengambilan, pemilihan dan ovulasi folikel (Orisaka dkk., 2009). Tahap gonadotropin *dependent* ini merupakan tahap

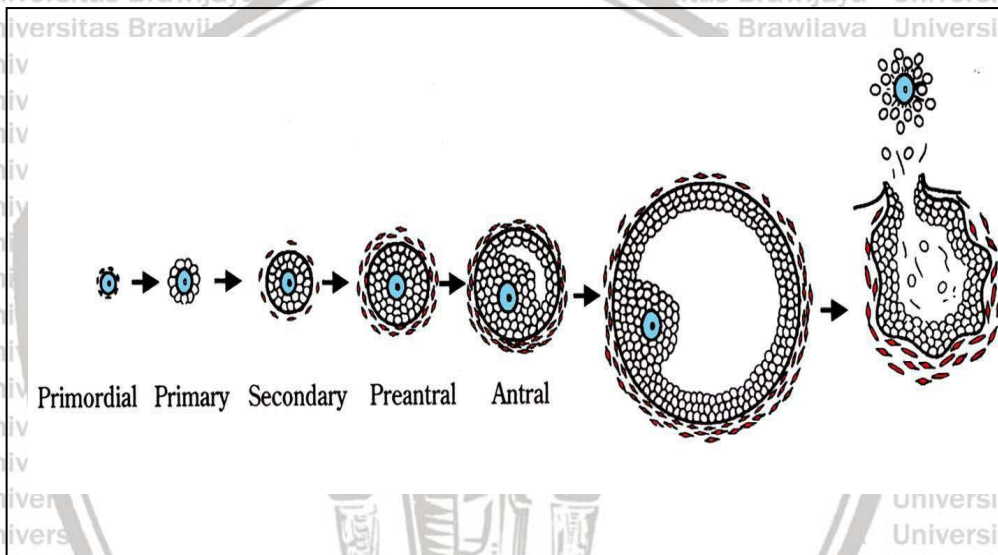
final dari folikulogenesis yang ditunjukkan oleh lonjakan LH dan akan menghasilkan generasi metafase II pada oosit (Gougeon, 2003). Oosit sendiri mensekresikan *growth factor* yang sangat mendukung banyak kegiatan pematangan folikel Graaf, diantaranya adalah GDF - 9 dan BMP - 15. Ekspresi diferensial dari GDF - 9 dan BMP - 15 telah terlibat dalam sensitisasi selektif dari folikel terhadap FSH, yang akhirnya mengarah pada pemilihan folikel dominan yang akan diovulasikan (Hutt & Albertini, 2007).



Sumber : Hutt dkk., (2006)

Gambar 2. Perkembangan folikel ovarium kelinci. a) Folikel primordial dengan selapis sel granulosa pipih. b) Folikel Primer awal dengan campuran sel granulosa pipih dan kuboid. c) Folikel Primer dengan selapis sel granulosa kuboid. d) Folikel Primer dengan selapis dan 2 lapis sel granulosa dan sel theca disekeliling membran basal folikel. e) oosit pada folikel preantral dikelilingi oleh 2 atau lebih sel granulosa. f) cairan folikuler membentuk kavitas antara sel granulosa dan oosit pada folikel antral kecil, g dan h) folikel antral besar.

Secara garis besar pola pertumbuhan dan perkembangan folikel ovarium dari folikel primordial sampai folikel Graaf (folikulogenesis) dan ovulasi terbagi menjadi 3 tahap, yaitu *gonadotropin independent*, *gonadotropin responsive*, dan *gonadotropin dependent* (Gambar 3) (Orisaka dkk., 2009). Setiap tahapan dalam folikulogenesis sampai terjadinya ovulasi akan selalu diregulasi oleh faktor parakrin (misalnya, KIT ligan, GDF-9 dan BMP-15), autokrin faktor (misalnya, activin dan inhibin) dan hormon endokrin (misalnya, FSH, LH, estradiol dan progesteron), semua faktor tersebut mempunyai peranan yang sangat penting dalam folikulogenesis (Matzuk & Lamb, 2008).



Sumber : Orisaka dkk., (2009)

Gambar 3. Tahapan folikulogenesis.

### 2.3 Peran FSH dan LH dalam Folikulogenesis

Proses inisiasi dari pertumbuhan folikuler, apakah kehadiran FSH diperlukan atau tidak pada proses ini masih menjadi perdebatan (Gougeon, 2003). Mencit *hypogonadal* dengan mengalami penghilangan gen Gn-RH, jumlah folikel yang mengalami pertumbuhan awal menjadi menurun, dan jumlah folikel yang mengalami pertumbuhan awal akan kembali normal setelah diperlakukan dengan FSH (Halpin dkk., 1986). Pada manusia folikel primordial tidak mengekspresikan adanya FSH reseptor mRNA, tetapi FSH reseptor terdeteksi pada transisi folikel primer (Gougeon, 2003).

Perkembangan folikuler setelah folikel mencapai tahap transisi primer ke sekunder adalah bergantung pada gonadotropin, *folikel stimulating hormon (FSH)* dan *luteinizing*

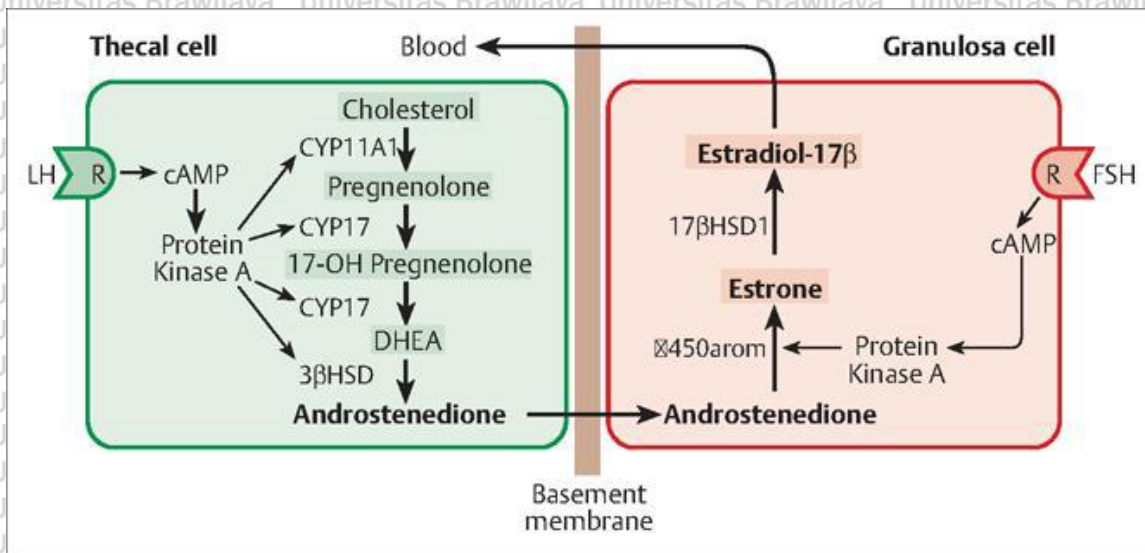
*hormon (LH)* (Lindeberg, 2008). Kedua glikoprotein tersebut diproduksi oleh hipofisis anterior dan pelepasannya distimulasi oleh *gonadotropin releasing hormon (GnRH)* yang diproduksi oleh hipotalamus (Matzuk & Lamb, 2008). Tahapan pertama dari perkembangan folikel tidak bergantung pada FSH tetapi dari tahap sekunder akhir sampai tahap awal antral dan seterusnya bergantung pada gonadotropin (Orisaka dkk., 2009). Penelitian (Kumar dkk., 1997) menyatakan bahwa mencit yang defisiensi FSH akan infertil karena pertumbuhan folikel terhenti pada tahap folikel sekunder.

Penggunaan suatu varietas sistem model yang *gonadotropin suppression*, normalnya akan memunculkan mutasi pada manusia dan *gene knockout* pada mencit, secara meyakinkan menunjukkan adanya aksi dari FSH dan LH secara bersama-sama mengontrol perkembangan folikel antral (Cambell, 2009). FSH menstimulasi pertumbuhan dan perkembangan folikel, mencapai ukuran preovulasi pada domba dan menyebabkan *hypogonadotrophic* dengan perlakuan *long term* GnRH analog (Picton & McNeilly, 1991). Folikulogenesis normal dan maturasi oosit juga bergantung pada peran penting dari LH. Pada kebanyakan spesies, maturasi dan perkembangan akhir dari folikel antral dan oositnya untuk ovulasi adalah sangat bergantung pada peningkatan fluktuasi sekresi LH (Roche, 1996).

Folikel pada tahap preantral mulai bergantung pada stimulasi FSH dari hipofisis, estimasi waktu pertumbuhan folikel untuk tumbuh dari tahap preantral sampai tahap ovulasi adalah sekitar 85 hari (Gougeon, 2003). Selama tahap pertumbuhan folikel-folikel tergantung pada fluktuasi gonadotropin dari siklus menstruasi. LH dan FSH keduanya sangat penting dalam produksi hormon steroid menurut sistem umum yang bisa diterima yaitu *two-cell two-gonadotropin* (Drummond, 2006). Menurut teori tersebut, LH berikatan dengan reseptor LH pada sel theka interna dan mengaktifkan cAMP yang akan merangsang konversi dari kolesterol menjadi androgen.

Androgen kemudian memasuki membran dasar dan masuk ke sel granulosa secara difusi. Pada sel granulosa FSH berikatan dengan reseptor FSH dan mengaktifasi cAMP untuk merangsang p450 aromatase yang akan mengkonversi androgen menjadi estradiol (Erickson, 2004; Drummond, 2006; Gervasio dkk., 2014) (Gambar 4). Selanjutnya estradiol dilepaskan ke cairan folikuler dan sirkulasi untuk berpartisipasi dalam regulasi

selanjutnya yaitu pematangan folikuler dan perkembangan organ reproduksi betina (Erickson, 2004).



Sumber : Gervasio dkk., (2014)

Gambar 4. Mekanisme *two-cell two-gonadotropin*, pembentukan hormon steroid (progesteron, androgen dan estrogen) yang berasal dari kolesterol.

## 2.4 Peran Estrogen dalam Folikulogenesis

Estrogen (estron, estriol dan estradiol) yang dihasilkan oleh kombinasi sel granulosa dan sel theka atas pengaruh gonadotropin, sebagian akan beredar bersama dengan sirkulasi darah dan akan berpengaruh pada perkembangan organ reproduksi betina (Hafez, 2000). Selain itu estrogen bersama dengan FSH akan berpengaruh pada perkembangan folikel dominan terutama pada sel granulosa (Aerts & Bols, 2010). Puncak produksi estrogen akan terjadi ketika folikel pada tahap preovulasi, puncak produksi dari estrogen ini akan mengakibatkan *feedback negative* mekanisme pada poros hipotalamus-pituitari-ovarium (HPO) dengan meregulasi sekresi *GnRH* hipotalamus sehingga produksi gonadotropin menurun (Lindeberg, 2008).

Penambahan hormon estrogen dari luar tubuh pada tikus hipofisektomi dapat menstimulasi terjadinya proliferasi sel granulosa pada folikel preantral dan mengurangi terjadinya atresia folikel (Drummond, 2006). Penambahan FSH pada tikus hipofisektomi dapat mengakibatkan peningkatan pertumbuhan dan perkembangan folikuler pada folikel antral. Kombinasi dari penambahan hormon estrogen dan FSH diindikasikan dapat

menstimulasi terjadinya proliferasi sel granulosa secara *in vitro* (Bley dkk., 1997). Gen yang dirangsang oleh estrogen di dalam sel granulosa belum sepenuhnya diketahui tetapi diduga adalah *cyclin D2*, *inhibin  $\alpha$*  dan *inhibin  $\beta$*  (Richards, 2001).

Estrogen juga bertanggung jawab dalam memfasilitasi diferensiasi sel granulosa termasuk induksi sistem reseptor FSH, LH dan prolaktin. Bersama dengan FSH dan LH, estradiol (E2) menstimulasi akumulasi cAMP (Richards dkk, 1979) dan meningkatkan cAMP *binding site* pada sel granulosa (Richards & Rolfes, 1980). Progesteron pada saluran reproduksi betina memainkan peran penting dalam ovulasi, implantasi, mengatur kebuntingan dan menghambat estrus (Hafez, 2000). Progesterin digunakan untuk meningkatkan aktivitas enzim steroidogenik pada gonadotropin terutama sel granulosa dan meningkatkan produksi progesteron dari sel granulosa (Ruiz de Galarreta dkk., 1985), sebaliknya RU486 (antiprogesterin) menghambat produksi progesteron pada kultur sel granulosa manusia melalui penurunan aktivitas *3 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase* (DiMattina dkk., 1986).

## 2.5 Tanaman Kunyit (*Curcuma longa* L.)

Tanaman kunyit adalah tanaman herba perenial dan mempunyai rizoma (rimpang/umbi) yang masuk ke dalam famili jahe (*Zingiberaceae*) (Gambar 5). Tanaman kunyit merupakan tanaman tropis asli dari Asia dan sekarang sudah menyebar ke daerah-daerah subtropis di seluruh dunia (Li dkk., 2011). Serbuk berwarna kuning gelap yang dihasilkan dari rimpang kunyit dikenal dengan nama *turmeric powder*, di India, China dan Asia sudah sejak lama banyak digunakan untuk bahan makanan dan pengobatan (Singh dkk., 2010). Buku tua agama Hindu *Ayurvedic* atau *Ayurveda Medicine* menyebutkan bahwa serbuk kunyit digunakan untuk meredakan kondisi inflamasi, sedangkan dalam pengobatan tradisional China digunakan untuk stimulan, *aspirant*, *astringent* dan *diuretic* (Li dkk., 2011).

Tanaman kunyit dewasa ini banyak dibudidayakan karena secara tradisional dipercaya dapat mengobati berbagai penyakit. Di India serbuk kunyit digunakan untuk mengobati penyakit empedu, selesma, batuk, diabetes, penyakit hepatic, rematik dan sinusitis (Singh dkk., 2010). Pengobatan tradisional China menggunakan serbuk kunyit (Gambar 5) untuk mengobati penyakit kulit, infeksi parasit, inflamasi, rematik, dan

*biliary disorders* (Li dkk., 2009). Tanaman kunyit mempunyai tinggi sekitar 1 meter, berbatang basah dan dapat tumbuh di berbagai tempat tropis dan subtropis (McCaleb dkk.,

2000). Klasifikasi tanaman kunyit menurut Jones dan Luchsinger, (1987) adalah :

Kingdom : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Sub Divisi : Angiospermae

Kelas : Monocotyledonae

Ordo : Zingiberales

Famili : Zingiberaceae

Genus : *Curcuma*

Spesies : *Curcuma longa* L. Syn *Curcuma domestica* Varr.

India adalah negara produsen terbesar serbuk kunyit dan mensuplai 90 % kebutuhan dunia akan serbuk kunyit. India memproduksi 716.900 metrik ton serbuk kunyit dari 161.300 hektar lahan pada tahun 2004-2005 (Li dkk., 2011). Terdapat sekitar 70 kultivar tanaman kunyit di India seperti *rajapuri*, *duggirala*, *berhampur*, *salem*, *tekurpeta*, serta banyak dikembangkan pula jenis baru seperti *PTS-10* dan *PTS-24* yang mampu menghasilkan rimpang kunyit dengan kandungan kurkumin sebesar 9,3 % (Singh dkk., 2010).



Sumber : Li dkk., (2011)

Gambar 5. Rimpang, serbuk dan tanaman kunyit (*Curcuma longa* L.).



### 2.5.1 Kandungan Kimia Rimpang Kunyit

Komponen kimia pada rimpang kunyit menurut penelitian Li dkk., (2011) adalah komponen fenolik yaitu diarylheptanoids dan diarylpentanoids, kurkumin ( $C_{21}H_{20}O_5$ ) termasuk golongan diarylheptanoids (fenol), rimpang kunyit mengandung kurkumin dan turunannya sebesar 3-15 % (kurkumin 71,5 %, demetoksikurkumin 19,4 % dan bisdemetoksikurkumin 9,1 %). Kandungan kimia berikutnya adalah phenylpropen dan komponen fenolik lain seperti terpen yaitu monoterpen, sesquiterpen, diterpen, triterpen, alkaloid, steroids, dan asam lemak (Aggarwal dkk., 2006).

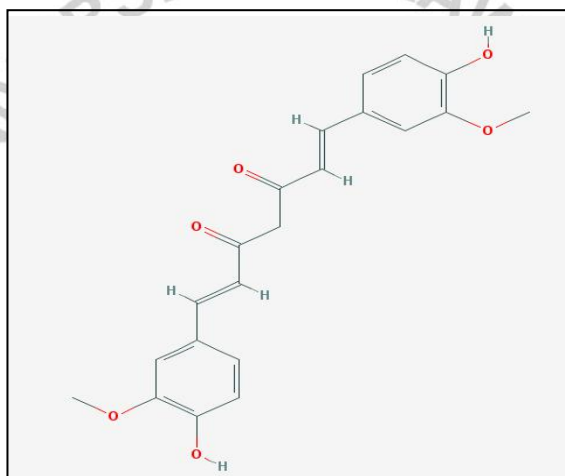
Berdasarkan hasil penelitian Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro) bahwa kandungan kurkumin rimpang kunyit rata-rata 10,92 % (Simanjuntak, 2011). Hasil penelitian Asghari dkk. (2008), menyatakan bahwa pada pemanenan usia tanaman kunyit 10 bulan, akan diperoleh rimpang kunyit dengan berat rata-rata 6,30 g dari setiap satu pokok tanaman kunyit, dan rata-rata kandungan kurkumin sebanyak 170,1 mg atau sebesar 2,7 %. Serbuk kering rimpang kunyit (turmeric) mengandung 3-5 % kurkumin dan dua senyawa derivatnya dalam jumlah yang kecil yaitu demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin, yang ketiganya sering disebut sebagai kurkuminoid (Singh dkk., 2010).

### 2.5.2 Kurkumin dalam Serbuk Kunyit

Kandungan kurkuminoid menjadi dasar penilaian kualitas rimpang kunyit, semakin tinggi kandungan kurkuminoid dalam rimpang atau serbuk kunyit maka semakin tinggi nilai ekonomisnya (Li dkk., 2011). Sedangkan untuk kurkumin murni di pasaran komersial tersedia dalam bentuk campuran dengan kedua turunannya yaitu demetoksi kurkumin dan bisdemetoksi kurkumin, yang berupa senyawa kurkuminoid (Li dkk., 2009). Kandungan kurkumin dalam rimpang kunyit bervariasi sesuai dengan jenis tanaman kunyit (kultivar), usia pemanenan, ukuran atau jenis rimpang (rim pang induk kandungan kurkumin berbeda dengan rimpang anakan), dan kondisi tanah (daerah, iklim, musim) (Asghari dkk., 2009). Kandungan kurkumin pada kunyit (*Curcuma longa*) adalah 3-8 %, paling tinggi dibandingkan dengan kunyit putih (*Curcuma zedoaria*) 0,1 %, dan temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza*) 1,2 % (Chattopadhyay dkk., 2004). Kurkumin dapat diekstraksi dari rimpang kunyit dengan menggunakan berbagai teknik seperti

hidrodestilasi, *low pressure solvent extraction*, *soxhlet*, dan *supercritical fluid extraction (SFE)* (Li dkk., 2011).

Sifat kurkumin tidak larut dalam air tetapi larut dalam etanol, metanol, actone, dimetilsulfoksid (Li dkk., 2011). Sedangkan menurut Wahyuni dkk., (2004) kurkumin larut dalam alkohol dan asam asetat glasial. Kurkumin mempunyai berat molekul 368,37 g/mol, berwarna kuning cerah, dan *melting point* 183°C (Simanjuntak, 2011). Rumus molekul kurkumin adalah  $C_{21}H_{20}O_6$ , sedangkan rumus molekul turunan kurkumin yaitu demetoksikurkumin dan bis demetoksikurkumin adalah  $C_{20}H_{18}O_5$  dan  $C_{19}H_{16}O_4$ , diduga gugusan aktif kurkuminoid terletak pada gugus hidroksi fenol (Gambar 6) (Gantait dkk., 2011).



Sumber : (PubChem, CID : 969516)  
Gambar 6. Struktur kimia kurkumin.

Kurkumin saat ini telah dapat dibuat senyawa analognya dengan melakukan modifikasi pada gugus aromatik terminal dan metilen aktif. Salah satu senyawa analog kurkumin yang telah mendapat hak paten sebagai antioksidan dan antiinflamasi dan diperkenalkan sebagai Molekul Nasional (Molnas) adalah *pentagamavunon-0* atau *PGV-0* ((2,5 bis (4'-hidroksi-3'-metoksi benzilidin) siklopentanon)) (Purwaningsih dkk., 2013).

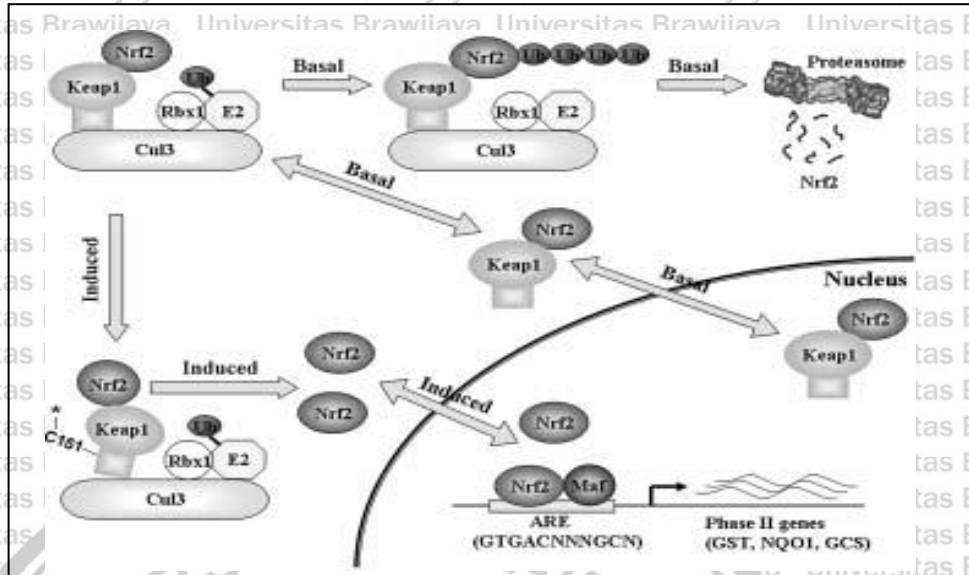
Kurkumin diyakini memodulasi beberapa molekuler target dan menghambat faktor transkripsi (*NF-κB*), enzim (*COX-I*, *COX-2*, *LOX*), sitokin (*TNFα*, *IL-1β*, *IL-6*) dan gen-gen antiapoptotik (*BCL2*, *BCL2L1*) (Shehzad & Lee, 2010).

Ekstrak serbuk rimpang kunyit atau bahan aktif kurkuminoid juga menunjukkan aktivitas hepatoprotektif, cardioprotektif, antifungal, dan antioksidan (Jayaprakasha dkk., 2006). Penelitian *in vivo* dan *in vitro* serta percobaan secara klinis di China dan USA menduga bahwa kurkumin adalah salah satu komponen yang paling dianjurkan untuk dikembangkan dalam terapi penyakit Alzheimer's (Hamaguchi dkk., 2010). Hasil penelitian Kohli dkk., (2005), menyatakan bahwa kurkumin mempunyai aktivitas antioksidan, *scavenger* superoksida dan menghambat peroksidasi lipid. Selain itu kurkumin juga dianggap mempunyai fungsi sebagai pembersih oksigen reaktif spesies dan nitrogen reaktif spesies, atau bertanggungjawab melindungi *DNA* terhadap kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dan melindungi hepatosit dari berbagai racun (Schulz, 2008).

## 2.6 Potensi Kurkumin untuk Menghambat Proses Aging

Kurkumin adalah suatu komponen elektrofilik yang mengaktivasi *signaling pathway* dari *Nuclear related factor 2 (Nrf2)* yang berperan penting dalam aktivasi enzim antioksidan (Sikora dkk., 2010). Penelitian Kitani dkk., (2007) pada *Mus musculus* usia 13 bulan yang diberi pakan dengan suplementasi kurkumin 0,2 % dapat meningkatkan lama hidup (*lifespan*) rata-rata 11,7 %. Hal ini diduga disebabkan selain karena kurkumin dapat mengaktivasi *signaling pathway* dari *Nrf2* untuk meningkatkan regulasi enzim antioksidan yang melindungi sel dari radikal bebas (Sikora dkk., 2010).

Hasil penelitian (Reyes dkk., 2013) menunjukkan bahwa kurkumin dapat mengaktivasi *Nrf2* dalam sitoplasma sel dengan cara menghambat (inhibitor) ikatan antara *Nrf2* dengan protein *Keap1*. Setelah ikatan antara *Nrf2* dengan *Keap1* terlepas, selanjutnya *Nrf2* masuk ke dalam nukleus dan akan mempengaruhi transkripsi enzim-enzim antioksidatif dari kelompok detoksifikasi fase II (*phase II detoxification enzymes*) seperti *glutathione S-transferase (GST)*, *NAD(P)H quinone oxireductase 1 (NQO1)* dan *glutamylcystein synthetase (GCS)* (gambar 7) Zhang (2006). Enzim-enzim anti oksidatif ini selanjutnya akan melindungi sel dari radikal bebas terutama dari kelompok ROS (Reyes dkk., 2013).



Sumber : Zhang, (2006)

Gambar 7. Peran *Nrf2* dalam transkripsi enzim GST (*Glutathione S-Transferase*).

## 2.7 Absorpsi Senyawa Polifenol pada Saluran Pencernaan

Senyawa fenol adalah senyawa yang berasal dari tumbuhan yang mempunyai struktur cincin aromatik dengan satu atau dua gugus hidroksil (McCaleb dkk., 2000). Polifenol adalah senyawa fenol yang mempunyai lebih dari satu struktur cincin aromatik (Li dkk., 2011). Kurkumin, adalah senyawa polifenol karena memiliki dua struktur cincin aromatik dengan satu gugus hidroksil (Aggarwal dkk., 2006). Absorpsi senyawa fenol maupun polifenol tergantung pada struktur kimia dan interaksi senyawa tersebut dengan senyawa lain (D'Archivio dkk., 2010).

Perjalanan senyawa polifenol per oral pada saluran pencernaan tidak terlalu banyak mengalami perubahan sampai senyawa polifenol tersebut berada di lambung, dimana senyawa polifenol akan mengalami perubahan dari bentuk kompleks (oligomeric) menjadi bentuk yang lebih sederhana (monomeric) oleh kerja enzim dan mikroflora lambung (D'Archivio dkk., 2010). Senyawa polifenol yang telah menjadi bentuk monomeric (glikosida) akan menuju usus dan akan mengalami proses hidrolisis oleh enzim hidrolase menjadi bentuk aglycones (Prasad dkk., 2014).

Senyawa polifenol selanjutnya menuju ke hepar dan mengalami rangkaian proses konjugasi berupa metilasi, sulphasi dan glukoronidasi (D'Archivio dkk., 2010), selanjutnya senyawa polifenol ikut dalam peredaran darah dan sampai ke sel target

(Toden & Goel, 2017). Pemberian serbuk kurkumin 500 mg/kg berat badan pada tikus akan menghasilkan 1% kandungan molekul kurkumin pada plasma darah (Yang dkk., 2007), sedangkan pemberian secara per oral serbuk kurkumin pada tikus, sebanyak 1000 mg/kg berat badan tikus, menghasilkan 15ng/mL molekul kurkumin pada plasma darah setelah 50 menit (Prasad dkk., 2014).

## 2.8 *Glutathione S-Transferase (GST)* Sebagai Antioksidan Endogen

*Glutathione S-Transferase* adalah enzim dari kelompok detoksifikasi fase 2 yang menstimulasi konjugasi *GSH* menjadi suatu komponen endogenus dan eksogenus elektrofilik pusat, menghasilkan formasi konjugasi *GSS* yang sesuai (Findlay dkk., 2006). Isoenzim *GST* dibagi menjadi tujuh kelas berdasarkan kesamaan sekuens asam amino, lima kelas adalah sitosolik dan dua kelas adalah ikatan membran, semuanya bersifat polimorfik pada manusia (Townsend & Tew, 2003).

*GST* mempunyai implikasi terhadap resistensi dan mulai dikembangkan sebagai agen kemoterapi (Findlay dkk., 2006), Pengembangan obat berbasis enzim *GST* sangat dimungkinkan karena adanya dua pola kerja *GST* yaitu melalui detoksifikasi secara langsung dan melalui inhibitor *MAPK* (Tew, 1994). Koneksi *GST* terhadap regulasi *MAPK* adalah relatif baru (Findlay dkk., 2006). Penemuan peran keterlibatan *GST* terhadap regulasi jalur *MAPK* berbarengan dengan diketahuinya peran protein redoks kecil, termasuk *peroksiredoksin (Prx)* pada kompleksitas lapisan jalur *MAPK*, yang bertanggung jawab terhadap sinyal survival sel atau kematian sel.

## 2.9 *Nrf2* Sebagai Faktor Transkripsi Gen Antioksidan

Nuclear related factor 2 (*Nrf2*) awalnya diidentifikasi memiliki kemampuan pencegahan penyakit kanker melalui induksi enzim fase 2, dan sebagai antioksidan indigenus untuk menginaktifkan reaktivitas karsinogenik intermediet (Zhang, 2006). Data dari uji micro-array membuktikan bahwa *Nrf2* mengatur gen-gen yang berfungsi pada enzim klasik detoksifikasi fase 2 dan antioksidan (Cho dkk., 2005). *Nrf2* adalah media respon pertahanan, sangat penting bagi sel untuk menangkal dampak buruk dari pengaruh eksogen dan mempertahankan homeostasis redoks seluler, setelah diketahui bahwa oksigen reaktif spesies (*ROS*) mempunyai hubungan dengan patogenesis pada manusia

termasuk kanker, maka diharapkan bahwa *Nrf2* dapat berfungsi dalam pencegahan timbulnya penyakit pada manusia (Zhang, 2006).

Diskusi tentang *Nrf2* berlanjut mengarah pada *Nrf2* sebagai kritikal faktor yang meregulasi respon pertahanan seluler ketika sel berada pada kondisi oksidatif stres, atau distimulasi oleh komponen kemopreventif (Zhang, 2006). Aktivitas *Nrf2* diregulasi secara ketat oleh negatif regulator yang disebut dengan *Keap1* (Itoh dkk., 1999). *Keap1* awalnya dideskripsikan sebagai faktor sitoplasmik yang berikatan dengan actin sitoskeleton dan *Nrf2*, untuk mempertahankan *Nrf2* tetap berada di dalam sitoplasma (Zhang, 2006). Sel yang dalam kondisi terpapar oleh oksidatif stres dan komponen kemopreventif, akan menyebabkan *Nrf2* terlepas dari *Keap1*, kemudian *Keap1* akan translokasi ke nukleus, selanjutnya membentuk suatu heterodimer dengan partner obligatori yaitu Maf, dan akhirnya mengaktifkan *ARE* untuk ekspresi gen (cullinan dkk., 2004).

## 2.10 Kerangka Konseptual

Penurunan kapasitas reproduksi pada wanita seiring dengan pertambahan usia erat kaitannya dengan proses *aging* ovarium (Tatone dkk., 2008). *Aging* adalah konsep gabungan antara usia dan hasil akumulasi malfungsi proses fisiologi dari kerusakan biomolekul. Kerusakan biomolekul ini tidak dapat diperbaiki dan merupakan pengaruh sampingan yang tidak dapat dihindari dari proses normal metabolisme (Yin & Chen, 2005).

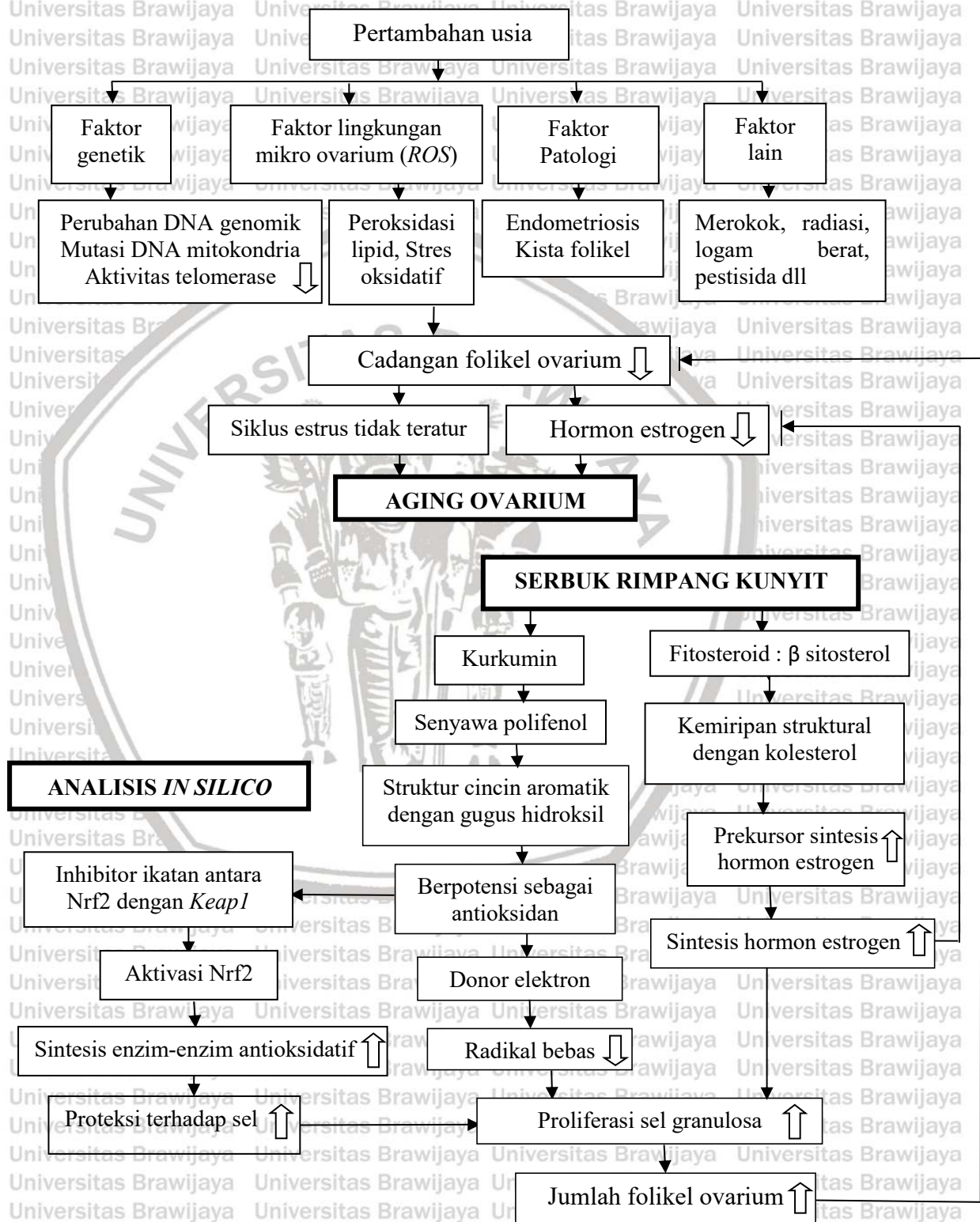
Proses *aging* adalah fenomena biologi kompleks yang dikarakteristikkan melalui penurunan secara progresif dan gradual dari fungsi berbagai organ dan jaringan (Sharov dkk., 2008). *Aging* adalah proses dimana kerusakan sel secara seluler (mitokondria) dan kerusakan *DNA* akibat stres oksidatif yang berawal dari meningkatnya radikal bebas sejalan dengan bertambahnya usia makhluk hidup (*the free radical theory*) (Fleming, 1982). *Aging* ovarium disebabkan oleh faktor genetik, lingkungan mikro ovarium, patologi dan faktor lain seperti kebiasaan merokok, radiasi, logam berat (Subrat dkk., 2013). Penelitian tentang *aging* ovarium dewasa ini mengarah pada kondisi stres oksidatif yang diakibatkan oleh radikal bebas dalam tubuh yang tidak terkontrol, terutama radikal bebas dari kelompok *ROS* (Tatone dkk., 2008).

Rimpang kunyit mengandung fitosteroid ( $\beta$ -sitosterol) yang memiliki kemiripan struktur dengan kolesterol sebagai prekursor sintesis hormon steroid (estrogen) (Kusmana dkk., 2007). Rimpang kunyit juga mengandung kurkumin yang merupakan komponen elektrofilik yang dapat mengaktivasi *signaling pathway* dari *Nrf2* untuk meregulasi transkripsi enzim antioksidatif seperti *GST*, *NQO1* dan *GCS* (Zhang, 2006). Efek estrogenik dari fitosteroid dan kemampuan kurkumin dalam mengaktivasi *Nrf2* yang meregulasi transkripsi dari enzim antioksidatif, diharapkan dapat memperbaiki kondisi stres oksidatif dan menghambat terjadinya proses aging pada ovarium tikus putih. Indikator yang akan digunakan untuk mengetahui adanya penghambatan proses aging ovarium adalah proliferasi sel granulosa, aktivasi *Nrf2*, distribusi enzim *GST*, kadar hormon estrogen, kadar dan distribusi *MDA*, serta jumlah folikel ovarium.

Penelitian pendahuluan, yaitu analisis *LC-MS* untuk mengetahui kadar senyawa kurkumin pada serbuk rimpang kunyit dan penelitian secara *in silico* untuk mengetahui potensi kurkumin sebagai antioksidan dengan menggunakan *tool* yaitu *Pass Server* sehingga diperoleh nilai *score probability activity (Pa)*, nilai *Pa* ini dapat digunakan untuk memprediksi apakah suatu senyawa mempunyai potensi dalam aktivitas biologis tertentu dalam tubuh atau hanya berpotensi secara komputasi (Ekins dkk., 2007). Kemampuan kurkumin dalam mengaktivasi *Nrf2* dapat diprediksi secara *in silico* dengan melakukan *docking* menggunakan *PyRx*, sehingga diketahui energi bebas ikatan antara kurkumin dan *Keap1*, semakin kecil energi bebas ikatan antara dua senyawa maka ikatannya semakin kuat (Dallakyan & Olson, 2015). Hasil *docking* sampai diperoleh nilai energi bebas dapat digunakan sebagai landasan untuk membuktikan bahwa kurkumin mempunyai potensi menghambat (inhibitor) ikatan antara *Nrf2* dan *Keap1*.

Penelitian utama, yaitu penelitian secara *in vivo* dengan memberikan perlakuan serbuk rimpang kunyit pada hewan coba. Serbuk rimpang kunyit mengandung fitosteroid yang bersifat estrogenik yang diduga berfungsi sebagai prekursor sintesis hormon steroid (estrogen) (Kusmana dkk., 2007). Serbuk rimpang kunyit juga mengandung kurkumin yang merupakan komponen elektrofilik yang dapat mengaktivasi *signaling pathway* dari *Nrf2* untuk meregulasi transkripsi enzim-enzim antioksidatif seperti enzim *GST* (Zhang, 2006). Efek estrogenik dari fitosteroid dan kemampuan mengaktivasi *Nrf2* untuk meregulasi transkripsi enzim antioksidatif dari kurkumin diharapkan dapat menghambat

proses aging ovarium pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). Kerangka konseptual penelitian disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Kerangka konseptual penelitian.



### BAB III METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2015 - Januari 2017 di Laboratorium Fisiologi, Struktur dan Perkembangan Hewan, dan Laboratorium Biologi Molekuler, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya. Penelitian juga dilaksanakan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

Pemeliharaan hewan coba dari usia 4 bulan sampai usia 12 bulan dan diberikan perlakuan selama 28 hari dilaksanakan di kandang penelitian Laboratorium Fisiologi, Struktur dan Perkembangan Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya. Isolasi organ, prosedur mikroteknik, pewarnaan HE pada preparat, dan prosedur *ELISA* pada serum darah dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya. Prosedur imunohistokimia pada preparat dan analisis hasilnya dilaksanakan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.

#### 3.2 Kerangka Operasional Penelitian

Penelitian dilakukan melalui dua tahap yaitu penelitian pendahuluan dengan melakukan analisis *LC-MS* untuk mengetahui kandungan dan kadar (%) senyawa-senyawa yang terdapat pada serbuk rimpang kunyit. Analisis *in silico* dilakukan untuk mengetahui potensi kurkumin sebagai antioksidan dan kemampuan kurkumin dalam mengaktivasi *Nrf2* dengan menghambat (inhibitor) ikatan antara *Nrf2* dan *Keap1*.

Penelitian utama dilakukan secara *in vivo* dengan memberikan perlakuan serbuk rimpang kunyit pada hewan coba yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) premenopause dengan dosis yang berbeda, dan memberikan perlakuan berupa serbuk kurkumin murni sebagai kontrol positif, serta memberikan perlakuan akuades untuk hewan coba kelompok kontrol negatif.

Analisis *in silico* juga dilakukan terhadap semua senyawa yang terkandung pada serbuk rimpang kunyit hasil analisis *LC-MS*, untuk mengetahui potensinya sebagai antioksidan. Analisis dengan metode *ELISA* dilakukan untuk mengetahui kadar hormon

estradiol. Prosedur mikrotehnik dengan pewarnaan HE dan prosedur imunohistokimia dilakukan pada preparat organ yang diisolasi dari hewan coba.

### 3.2.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan dengan melakukan analisis *LC-MS* dan analisis *in silico*. Analisis *LC-MS* dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa-senyawa yang terdapat pada serbuk rimpang kunyit, terutama senyawa kurkumin dan turunannya. Sedangkan analisis *in silico* dilakukan untuk mengetahui potensi senyawa kurkumin dalam menghambat ikatan antara *Nrf2* dengan *Keap1*. Tahapan analisis secara *in silico* terdapat pada Gambar 9.

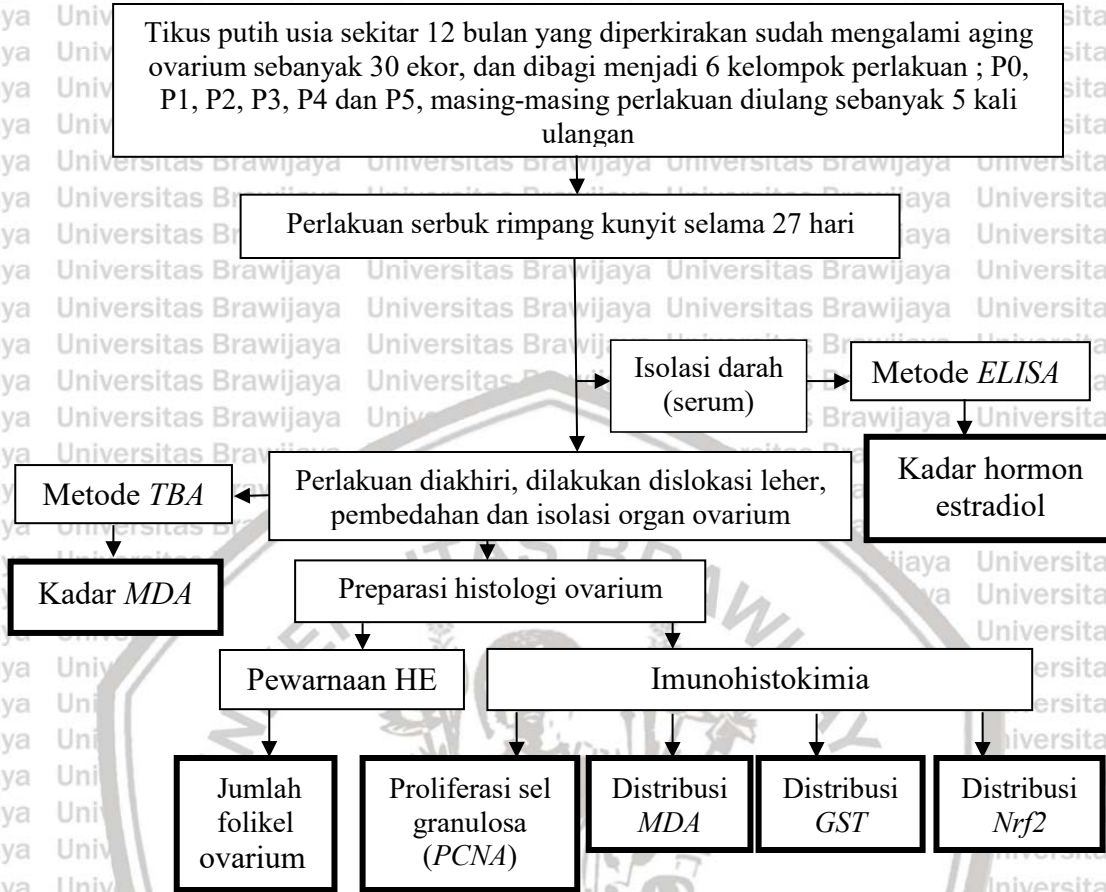
Sampel struktur tiga dimensi dari senyawa kurkumin didapatkan dari server *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) dengan kode **CID 969516**. Prediksi aktivitas biologi yaitu potensi kurkumin sebagai antioksidan dan free radical scavenger, serta nilai *probability activity* (*Pa score*) dianalisis menggunakan *PASS Server* (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>). Prediksi potensi senyawa kurkumin ditunjukkan dengan nilai *probability activity*. Struktur *Keap1* diperoleh dari server protein data bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) dengan *PDB:ID 4IQK* hasil dari metode *X ray*. Alasan digunakan struktur *4IQK* karena struktur tersebut telah berikatan dengan ligan *IQK* yang dapat dijadikan referensi, selanjutnya dilakukan proses *docking* menggunakan program *PyRx (autodock vina)* (Dallakyan & Olson, 2015).

*Docking* dilakukan secara spesifik pada sisi yang sama dengan ligan referensi (*IQK*) dan dipilih binding energi yang memiliki hasil terkecil atau paling negatif karena menunjukkan konformasi kompleks yang paling baik dengan ikatan yang sangat kuat.

Setelah di dapatkan energi hasil *docking*, disimpan kompleks *Keap1*-kurkumin dan kompleks *Keap1*-*IQK* menggunakan *PyMol*. Selanjutnya dilakukan visualisasi hasil *docking* menggunakan *LigandScout* (Wolber & Langer, 2005), untuk menunjukkan interaksi kurkumin dengan asam amino dari *Keap1*. Potensi inhibisi dilihat dari asam amino sisi aktif yang diikat oleh kurkumin.

**ANALISIS *IN SILICO***Sampel struktur 3 dimensi kurkumin dari *PubChem* dengan kode *CID 969516*Prediksi potensi kurkumin sebagai antioksidan menggunakan *PASS Server*nilai *probability activity (Pa)*Prediksi potensi kurkumin sebagai inhibitor ikatan *Nrf2* dengan *Keap1*Nilai *binding affinity* kurkumin dengan *Keap1* dan *IQK* (referensi) dengan *Keap1*Pemodelan molekul *Keap1* dan prediksi sisi ikatan dengan kurkuminVisualisasi menggunakan *PyMol* dan *LigandScout*Gambar 9. Tahapan analisis *in silico***3.2.2 Penelitian Utama**

Penelitian utama dilakukan secara *in vivo* dengan memberikan serangkaian perlakuan pada hewan coba (Gambar 10). Perlakuan diberikan untuk mengetahui pengaruh serbuk rimpang kunyit terhadap parameter penelitian yang akan diamati pada akhir perlakuan. Parameter penelitian yang diamati meliputi kadar *MDA* ovarium dengan menggunakan metode *TBA*, kadar hormon estradiol menggunakan metode *ELISA*. Penghitungan jumlah folikel ovarium dilakukan di bawah mikroskop dari hasil preparasi jaringan organ ovarium menggunakan metode parafin yang dilanjutkan dengan pewarnaan HE. Sedangkan untuk distribusi *MDA*, *PCNA*, *Nrf2*, dan enzim *GST* pada ovarium dihitung di bawah mikroskop dari hasil pewarnaan preparat jaringan menggunakan metode imunohistokimia.



Gambar 10. Tahapan penelitian *in vivo*

### 3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan 6 kelompok perlakuan, setiap kelompok perlakuan masing-masing diulang sebanyak 5 kali ulangan, kelompok perlakuan terdiri dari ;

P0 : kontrol negatif tanpa pemberian serbuk rimpang kunyit (akuades)

P1 : kontrol positif dengan pemberian serbuk kurkumin dosis 6,75 mg/kg BB (Lai dkk., 1999)

P2 : perlakuan serbuk rimpang kunyit dosis 100 mg/kg BB (Somchit dkk., 2005)

P3 : perlakuan serbuk rimpang kunyit dosis 200 mg/kg BB

P4 : perlakuan serbuk rimpang kunyit dosis 400 mg/kg BB

P5 : perlakuan serbuk rimpang kunyit dosis 800 mg/kg BB

### 3.4 Hewan Coba

Hewan coba adalah 30 ekor tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) strain wistar, usia 12 bulan, bobot rata - rata 200-250 g. Hewan coba diperoleh dari LPPT Universitas Gadjah Mada, sebanyak 100 ekor dan berusia 4 bulan. Hewan coba dipelihara selama 8 bulan sampai berusia 12 bulan dimana diperkirakan telah memasuki masa premenopause. Selain berdasarkan usia, masa permenopause hewan coba juga didasarkan hasil apus vagina selama 2 minggu dimana sudah menunjukkan ketidak-teraturan siklus reproduksi.

Seratus ekor hewan coba yang dipelihara dari usia 4 bulan, setelah mencapai usia 12 bulan, maka dipilih 30 ekor untuk dijadikan hewan coba penelitian yang akan diberikan perlakuan. Pemilihan hewan coba berdasarkan bobot tubuh yang seragam yaitu pada kisaran 200-250 g, dan berdasarkan pada hasil apus vagina dimana dipilih hewan coba yang siklus reproduksinya berada pada fase estrus.

### 3.5 Serbuk Rimpang Kunyit

Serbuk Rimpang kunyit diperoleh dari Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro), Jl. Tentara Pelajar no. 3 Bogor. Rimpang kunyit dipanen dari tanaman kunyit yang telah berusia sekitar 8 bulan, dipilih rimpang utama dengan panjang sekitar 5-7 cm dan diameter 1-1,5 cm. Rimpang kunyit dibersihkan dengan dicuci menggunakan air sampai bersih kemudian diiris tipis dan dikering-anginkan sampai kering. Pengeringan dilakukan selama kurang lebih 2 minggu sampai kandungan air hanya tinggal sekitar 10 % (Asghari dkk., 2008). Irisan tipis rimpang kunyit yang sudah kering kemudian diblender sampai terbentuk serbuk rimpang kunyit (*turmeric*).

Selanjutnya dilakukan pengayakan pada serbuk rimpang kunyit dengan menggunakan ayakan yang berukuran 200 mesh.

### 3.6 Perlakuan Hewan Coba

Perlakuan diberikan pada hewan coba selama 27 hari dengan cara melarutkan serbuk rimpang kunyit sesuai dosis perlakuan ke dalam 4 ml aquades, kemudian disondekan per oral ke hewan coba setiap hari sekitar jam 09.00 pagi (kapasitas lambung tikus putih dengan bobot sekitar 200-250 g adalah 5 ml). Pada hari ke 1 dan hari ke 14 dilakukan koleksi darah dari ujung ekor. Pada hari ke 28 perlakuan diakhiri, hewan coba

kemudian didislokasi leher dan dilanjutkan dengan pembedahan untuk isolasi organ ovarium.

Preparasi histologis ovarium menggunakan metode parafin dan dilanjutkan dengan pewarnaan HE. Slide preparat hasil pewarnaan HE kemudian diamati dibawah mikroskop untuk menghitung jumlah folikel. Slide preparat hasil dari metode parafin juga dilanjutkan dengan prosedur imunohistokimia. Slide hasil pewarnaan menggunakan prosedur imunohistokimia kemudian diamati di bawah mikroskop untuk mengetahui distribusi *MDA*, *Nrf2*, *GST*, dan proliferasi sel granulosa melalui distribusi *PCNA*.

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 Analisis Kadar Hormon Estradiol Menggunakan Metode *ELISA*

Koleksi darah dilakukan dengan memotong ujung ekor hewan coba, darah yang menetes dari ujung ekor segera ditampung ke dalam tabung *EDTA*. Darah yang ditampung dalam tabung *EDTA* kemudian didiamkan selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan serum darah. Serum darah yang diperoleh kemudian dilakukan prosedur dengan metode *ELISA* menggunakan estradiol *ELISA* kit (merk bt-laboratory) untuk mengetahui kadar hormon estradiol.

Tahapan prosedur *ELISA* yang dilakukan diawali dengan membiarkan reagen berada dalam suhu kamar (18-25 °C) sebelum digunakan, kemudian *coating* ke dalam *well microplate*, *micropipeting* 50 µL larutan standar, dan sampel ke dalam *well microplate* pada kolom yang berbeda. Kemudian ditambahkan 100 µL *estradiol enzym conjugate* untuk tiap *microplate*, inkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam ditempat gelap dan tutup dengan aluminium foil. Selanjutnya dicuci menggunakan *washing solution* dengan volume 300 µL, diulangi pencucian sebanyak 5 kali, ditambahkan 100 µL larutan *TMB substrate solution* ke setiap *microplate* sesuai dengan urutan. Inkubasi selama 20 menit pada suhu ruang, ditutup dengan aluminium foil. *Stop solution* sebanyak 50 µL ditambahkan ke dalam tiap *microplate* dengan lembut untuk menghentikan reaksi. Kemudian *well microplate* dimasukkan ke dalam *ELISA Spectrophotometere*, selanjutnya dibaca dan diobservasi pada panjang gelombang 450 nm (Crowther, 2001).

### 3.7.2 Preparasi Histologi dan Pewarnaan HE

Preparat histologis organ ovarium pada penelitian ini dibuat menurut metode parafin dengan pewarnaan Hematoxylin - Eosin (Suntoro, 1983). Pembedahan dan pengambilan organ ovarium dari hewan coba dilakukan menggunakan alat bedah steril dan dilakukan dengan sangat hati-hati agar ovarium yang diambil tidak mengalami kerusakan. Ovarium selanjutnya dicuci dengan NaCl fisiologis (NaCl 0,9%). Setelah dicuci, difiksasi dengan formalin 10%. Ovarium yang telah difiksasi kemudian dibuat preparat histologinya sesuai prosedur Suntoro (1983).

Ovarium yang telah difiksasi selanjutnya dicuci dengan akuades dan direndam ke dalam larutan *FAA* (*formaldehyde: acetic acid: alcohol*) selama 24 jam (*overnight*). Selanjutnya dilakukan dehidrasi secara bertingkat dengan alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, dan alkohol absolut masing-masing selama 1 jam. Setelah dehidrasi, dilakukan penjernihan selama 1 jam dengan cara ovarium dimasukkan ke dalam larutan alkohol xylol, kemudian dimasukkan ke dalam xylol murni I, II, III masing-masing selama 20 menit. Ovarium yang tidak jernih menunjukkan proses dehidrasi kurang berjalan baik sehingga harus diulang didehidrasi kembali. Setelah ovarium tampak jernih, dilakukan tahap infiltrasi parafin. Tahap ini dilakukan dengan cara merendam ovarium secara bertingkat ke dalam cairan parafin dengan titik leleh 48-52°C, 52-54°C, dan 54-56°C masing-masing selama 1-2 jam (Suntoro 1983).

Tahapan selanjutnya setelah infiltrasi adalah *embedding*, yaitu menanam/memasukkan organ ovarium ke dalam cetakan berisi parafin cair dan dibiarkan sampai parafin mengeras. Selanjutnya parafin yang sudah mengeras dan membentuk blok parafin yang di dalamnya terdapat organ ovarium ditempelkan pada *holder*, kemudian dipotong menggunakan *microtome* dengan ketebalan 5 µm. Irisan parafin dengan organ ovarium di dalamnya yang diperoleh dari hasil pemotongan, selanjutnya ditempelkan pada gelas objek yang sebelumnya telah diolesi albumin. Albumin yang digunakan dicampur gliserin dengan perbandingan 1:1 dan disimpan dalam kotak sediaan selama satu hari sampai benar-benar mengering. Tahap selanjutnya adalah deparafinisasi yaitu menghilangkan parafin yang terdapat pada jaringan organ ovarium, dengan cara merendam jaringan dalam xylol selama 10 menit. Setelah itu dilakukan proses pewarnaan jaringan organ ovarium dengan terlebih dahulu menghilangkan sisa cairan xylol yang

masih ada pada preparat dengan cara menghisapnya menggunakan kertas saring yang ditempelkan dengan sangat hati-hati. Tahapan selanjutnya adalah berturut-turut slide dimasukkan ke dalam alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, dan 30% masing-masing selama 5 menit lalu ke akuades selama 5 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir kurang lebih (Suntoro 1983).

Setelah itu jaringan dimasukkan ke dalam cairan pewarna pertama yaitu hemotoksilin selama 4 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit. Selanjutnya jaringan dimasukkan ke dalam aquades, dilanjutkan dengan dimasukkan alkohol bertingkat 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%. Jaringan organ ovarium kemudian direndam dalam larutan pewarna kedua yaitu eosin 0,5% (dalam alkohol 70%) selama 1,5 menit. Setelah terwarnai, jaringan dicelupkan ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, dan alkohol absolut selama 10 menit. Tahap selanjutnya preparat dikering-anginkan dan dimasukkan ke dalam xylol selama 15 menit. Sediaan histologi selanjutnya ditetesi kanada balsem lalu ditutup dengan *coverglass*. Tahap terakhir preparat diberi label dan keterangan, kemudian diamati di bawah mikroskop (Suntoro 1983).

### 3.7.3 Metode Imunohistokimia untuk Mengetahui Proliferasi Sel Granulosa Melalui deteksi PCNA

Slide sampel jaringan ovarium hasil preparasi histologi yang telah dideparafinasi dibilas dengan PBS pH 7,4. Slide diinkubasi dgn H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% selama 20 menit pada suhu ruang. Kemudian slide dicuci dengan menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali. Selanjutnya dilakukan *Blocking* slide dengan *skim milk* 1% selama 30 menit pada suhu ruang, kemudian slide dicuci lagi dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali.

Tahapan selanjutnya adalah slide ditetesi dengan antibodi primer yaitu *mouse monoclonal anti-PCNA (PC10, DAKO)* dalam *skim milk* 1% (1:200) selama semalam (*overnight*), kemudian slide dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali. Selanjutnya slide ditetesi antibodi sekunder terlabel biotin (1:400) dalam PBS pH 7,4 dan diinkubasi selama 1 jam, kemudian slide dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali. Tahapan selanjutnya slide ditetesi dengan *SA-HRP* (1:1000) dalam PBS pH 7,4 dan diinkubasi selama 40 menit, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali. Slide ditetesi dengan *DAB* dan diinkubasi selama 20 menit, slide dicuci dengan PBS pH 7,4



sebanyak 3 kali. Selanjutnya dilakukan *counterstain* dengan hematoksilin selama 5 menit pada suhu ruang, kemudian direndam dengan air kran selama 10 menit. Slide dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan oven atau dikering - anginkan selama semalam. Selanjutnya dilakukan *mounting* slide dengan entelan dan ditutup dengan gelas penutup (Boenisch, 2001).

#### 3.7.4 Metode Imunohistokimia untuk Mengetahui Distribusi *MDA*, *Nrf2* dan *GST*

Metode imunohistokimia yang digunakan untuk mengetahui distribusi *MDA*, *Nrf2* dan enzim *GST* adalah metode yang sama dengan yang digunakan untuk mengetahui proliferasi sel melalui distribusi *PCNA*. Perbedaannya hanya pada penggunaan antibodi primer, yaitu antibodi primer *mouse monoclonal anti-MDA antibody* dengan nomor katalog ab6463 (*abcam*) untuk mengetahui ekspresi *MDA*. Antibodi primer *mouse monoclonal anti-Nrf2 antibody* 1808Y dengan nomor katalog ab62352 (*abcam*) untuk mengetahui distribusi *Nrf2*, dan antibodi primer *mouse monoclonal anti-GST antibody* dengan nomor katalog ab170323 (*abcam*) untuk mengetahui distribusi enzim *GST*.

#### 3.7.5 Penentuan Kadar *MDA* dengan Metode *TBA*

Pengukuran kadar *MDA* ovarium menggunakan metode reagen *thiobarbituric acid (TBA)*. Organ ovarium tikus dicuci menggunakan *phosphat buffer saline*, kemudian digerus menggunakan mortar sampai halus. Selanjutnya ditambahkan larutan *buffer* potasium klorida dengan perbandingan 1:10. Homogenat dimasukkan ke dalam tabung polipropilen (*microtube*) dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada temperatur 4°C. Supernatan diambil 50 µL kemudian ditambahkan 500 µL *TBA* dan 250 µL *trichloroacetic acid (TCA)* lalu dihomogenkan. Selanjutnya homogenat dipanaskan menggunakan *waterbath* pada temperatur 100°C selama 5 menit, kemudian homogenat kembali disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm, selama 5 menit, pada temperatur 25°C. Selanjutnya ditentukan nilai absorbansi sampel jaringan ovarium menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 532 nm (Schemedes & Helmer, 1989).

### 3.7.6 Penentuan Kadar Kurkumin dalam Serbuk Rimpang Kunyit dengan Metode LC-MS

Serbuk rimpang kunyit dimaserasi dengan pelarut n-heksana hingga filtratnya jernih. Filtrat kemudian disaring, residu hasil maserasi dikering-anginkan sampai kering. Residu yang telah kering kemudian dimaserasi kembali menggunakan etanol hingga filtratnya jernih. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak berbentuk bubuk (Farnsworth, 1966). Analisis LC-MS dilakukan dengan cara sampel (bubuk) dilarutkan dengan etanol HPLC grade sehingga menjadi 10 mg/mL. Kemudian dilanjutkan dengan menginjeksikan 100 uL larutan dalam sistem instrumentasi Shimadzu 2010A yang menggunakan kolom Phenomenex Luna RP-C (150 x 2 mm) dengan fasa gerak gradien dari 10% aetonitril-air hingga 100% aetonitril-air selama 40 menit. Proses determinasi rumus molekul senyawa yang terdapat pada sampel akan ditampilkan dalam bentuk kromatogram (Setyaningsih dkk., 2016).

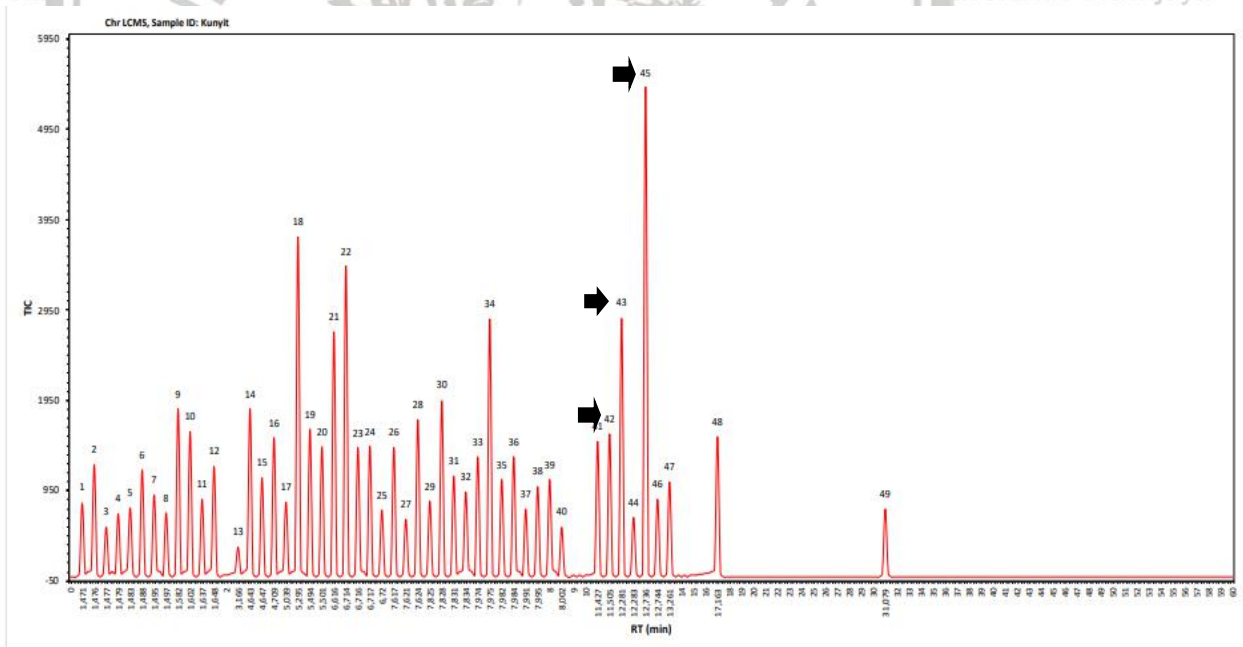
### 3.7.7 Analisis Data

Data dari hasil penelitian *in vivo*, yaitu data tentang kadar MDA, distribusi MDA, distribusi Nrf2, distribusi enzim GST, distribusi PCNA, kadar estradiol, dan jumlah folikel pada ovarium tikus putih premenopause setelah perlakuan dianalisis dengan *Analysis of Variance (ANOVA)* pada taraf 5%. Apabila dari hasil uji ANOVA terdapat pengaruh yang signifikan maka akan dilanjutkan dengan uji beda nyata jujur (BNJ) pada taraf 5%. Analisis semua data yang diperoleh dari hasil penelitian *in vivo* menggunakan *software* komputer yaitu program SPSS for windows versi 22.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Analisis LC-MS Kandungan Senyawa yang Terdapat pada Serbuk Rimpang Kunyit

Hasil analisis LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) atau kromatografi cair-spektrometri massa, pada serbuk rimpang kunyit diperoleh sebanyak 49 senyawa. Konsentrasi senyawa paling tinggi yang terkandung pada serbuk rimpang kunyit adalah kurkumin ( $C_{21}H_{20}O_6$ ) yaitu 7,798%, sedangkan konsentrasi untuk senyawa turunan kurkumin yaitu demetoksikurkumin ( $C_{20}H_{18}O_5$ ) dan bis demetoksikurkumin ( $C_{19}H_{16}O_4$ ) adalah 4,115% dan 2,277%. Senyawa-senyawa yang terdapat pada serbuk rimpang kunyit berdasarkan hasil analisis LC-MS dapat dilihat pada Gambar 11 dan Tabel 1.



Gambar 11. Hasil analisis LC-MS serbuk rimpang kunyit dengan kandungan utama adalah kurkumin dengan nomor puncak (45), demetoksikurkumin (43), dan bis demetoksikurkumin (42) seperti terlihat pada tanda panah (➡).

Hasil analisis LC-MS serbuk rimpang kunyit yang telah dilakukan sudah sesuai dengan hasil penelitian dari beberapa peneliti sebelumnya yang menyatakan bahwa serbuk rimpang kunyit mengandung senyawa fitokimia yang bervariasi termasuk

kurkumin, demethoksikurkumin, bis demethoksikurkumin, zingiberene, curcumenol, turmerone, dan turmeronol (Chattopadhyay dkk., 2004). Kurkuminoid dan minyak esensial adalah bioaktif utama yang ditemukan pada tanaman kunyit, dengan kurkuminoid paling banyak terakumulasi pada bagian rimpang dari tanaman kunyit (Li dkk., 2011). Kurkuminoid adalah sebutan untuk senyawa kurkumin beserta dengan turunannya (Chattopadhyay dkk., 2004). Kurkumin, demethoxykurkumin, bisdemethoxykurkumin, dan ar-turmerone adalah empat komponen aktif utama pada serbuk rimpang kunyit (Lokhande dkk., 2013).

Tabel 1. Kandungan senyawa dengan konsentrasi tertinggi hasil analisis LC-MS pada serbuk rimpang kunyit

Nomor puncak	Nama senyawa	Rumus kimia	Waktu retensi (menit)	Konsentrasi (%)	Nilai m/z
45	Curcumin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	12,736	7,798	340.1311
18	Curcumene	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	5,295	5,411	202.1722
22	α Turmerone	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	6,714	4,949	218.1671
43	Demethoxycurcumin	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	12,281	4,115	338.1154
34	Curcumenone	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	7,975	4,100	234.1620
21	Ar Turmerone	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O	6,616	3,898	216.1514
30	Procurcumenol	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	7,828	2,804	234.1620
9	Cinnamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	1,582	2,676	148.0524
14	Caffeic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	4,643	2,675	180.0423
28	Turmeronol B	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	7,624	2,504	232.1463
19	β Caryophyllene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	5,494	2,350	204.1878
10	Arabinose	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	1,602	2,313	150.0528
42	Bis Demethoxycurcumin	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	11,505	2,277	308.1049
48	β Sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	17,163	2,230	414.3862
16	Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	4,709	2,214	180.0634

Faktor - faktor yang mempengaruhi kandungan senyawa yang terdapat pada rimpang tanaman kunyit beserta persentasenya adalah masa pemanenan rimpang kunyit, jenis kultivar tanaman kunyit (Asghari dkk., 2009), metode pengeringan rimpang kunyit (Lokhande dkk., 2013), dan kondisi rimpang kunyit yang akan dianalisis dalam kondisi segar atau kering (Singh dkk., 2010). Kandungan kurkumin beserta turunannya yang terdapat pada rimpang tanaman kunyit mempunyai fungsi yang sangat beragam termasuk sebagai analgesik, antiseptik, antiinflamasi, antimalaria, dan antioksidan (Chattopadhyay dkk., 2004).

#### 4.2 Analisis *in Silico* Kandungan Senyawa pada Serbuk Rimpang Kunyit yang berpotensi Sebagai Antioksidan

Analisis pada kandungan senyawa serbuk rimpang kunyit yang berpotensi sebagai antioksidan berdasarkan nilai *Probability activity (Pa score)* dengan menggunakan *software PASS server* terdapat pada Tabel 2. Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat 11 senyawa yang mempunyai nilai  $Pa > 0,3$  yaitu *Ascorbic acid*, *Quercetin*,  $\beta$  *Carotene*, *Arabinose*, *Bis Demethoxycurcumin*, *Demethoxycurcumin*, *Curcumin*, *Caffeic acid*, *Cinnamic acid*, *Letestuienin A*, dan *Calebin A*. Nilai  $Pa$  diatas 0,3 dapat dikategorikan bahwa senyawa tersebut mempunyai aktivitas biologi dalam tubuh seperti yang dimaksud, dalam hal ini adalah potensi sebagai antioksidan.

Tabel 2. Kandungan senyawa pada serbuk rimpang kunyit yang berpotensi sebagai antioksidan berdasarkan nilai  $Pa$  (*Probability Activity*)

Nomor puncak	Nama senyawa	Rumus kimia	Nilai $Pa$
13	Ascorbic acid	$C_6H_8O_6$	0,951
41	Quercetine	$C_{15}H_{10}O_7$	0,878
49	$\beta$ Carotene	$C_{40}H_{56}$	0,823
10	Arabinose	$C_5H_{10}O_5$	0,801
42	Bis Demethoxycurcumin	$C_{19}H_{16}O_4$	0,685
43	Demethoxycurcumin	$C_{20}H_{18}O_5$	0,654
45	Curcumin	$C_{21}H_{20}O_6$	0,634
14	Caffeic acid	$C_9H_8O_4$	0,611
9	Cinnamic acid	$C_9H_8O_2$	0,489
44	Letestuienin A	$C_{20}H_{20}O_5$	0,483
47	Calebin A	$C_{21}H_{20}O_7$	0,464

#### 4.3 Analisis *in Silico* Potensi Kurkumin sebagai Antioksidan

Potensi kurkumin sebagai antioksidan dan *free radical scavenger* dianalisis dengan cara melakukan pengujian aktivitas biologi. *Software* yang digunakan adalah *PASS server*, melalui pendekatan *Structure Activity Relationship (SAR)*, yang ditunjukkan dengan nilai  $Pa$  (*Probability activity score*) (Paramashivam dkk., 2015).

Hasil analisis *in silico* menunjukkan bahwa kurkumin mempunyai potensi sebagai antioksidan dan *free radical scavenger*, dimana potensi kurkumin sebagai antioksidan mempunyai nilai  $Pa$  0,634, sedangkan potensi kurkumin sebagai *free radical scavenger*

mempunyai nilai  $Pa$  0,771 (Tabel 3). Nilai  $Pa > 0,7$  menunjukkan bahwa pengujian senyawa tersebut secara komputasi tidak akan jauh berbeda dengan pengujian di laboratorium, sedangkan nilai  $Pa > 0,3$  menunjukkan bahwa senyawa tersebut kemungkinan mempunyai potensi secara komputasi dan perlu dilakukan pengujian di laboratorium (Savcun dkk., 2013).

Tabel 3. Prediksi aktivitas biologi kurkumin

Aktivitas Biologi	Probability Activity ( $Pa$ )
Antioksidan	0,634
<i>Free radical scavenger</i>	0,771

Prediksi potensi kurkumin sebagai aktivator dari *Nrf2* dilakukan dengan membandingkan nilai *binding affinity* antara *Keap1* dan kurkumin dengan *Keap1* dan *IQK* (Tabel 3). *Nrf2* (*NF-E2-Related Factor 2*) adalah faktor transkripsi yang berikatan dengan represor spesifik yaitu *Keap1* (Motobashi & Yamamoto., 2004). *Nrf2* dapat aktif apabila tidak berikatan dengan *Keap1*, obat-obatan komersial telah banyak dikembangkan untuk mengaktifkan *Nrf2* dengan cara menghambat *Keap1*. Aktifnya *Nrf2* yang tidak berikatan dengan *Keap1* adalah representasi dari dimulainya sintesis enzim antioksidatif dalam upaya pencegahan stres oksidatif dan aging pada sel (Bruns dkk., 2015).

*Nrf2* aktif akan menandai dimulainya proses transkripsi enzim-enzim detoksifikasi fase 2 (*phase II detoxification enzymes*) (Jockers, 2016). Enzim detoksifikasi fase 2 bertanggung jawab melindungi sel dari radikal bebas terutama dari kelompok *ROS* (*reactive oxygen species*). Peningkatan produksi *ROS* menyebabkan gangguan pada sirkuit redoks seluler dan ketidakseimbangan regulasi proses redoks seluler yang berimbas pada kerusakan oksidatif pada makromolekul seluler yang merupakan proses awal terjadinya stres oksidatif dan aging (Reyes dkk., 2013).

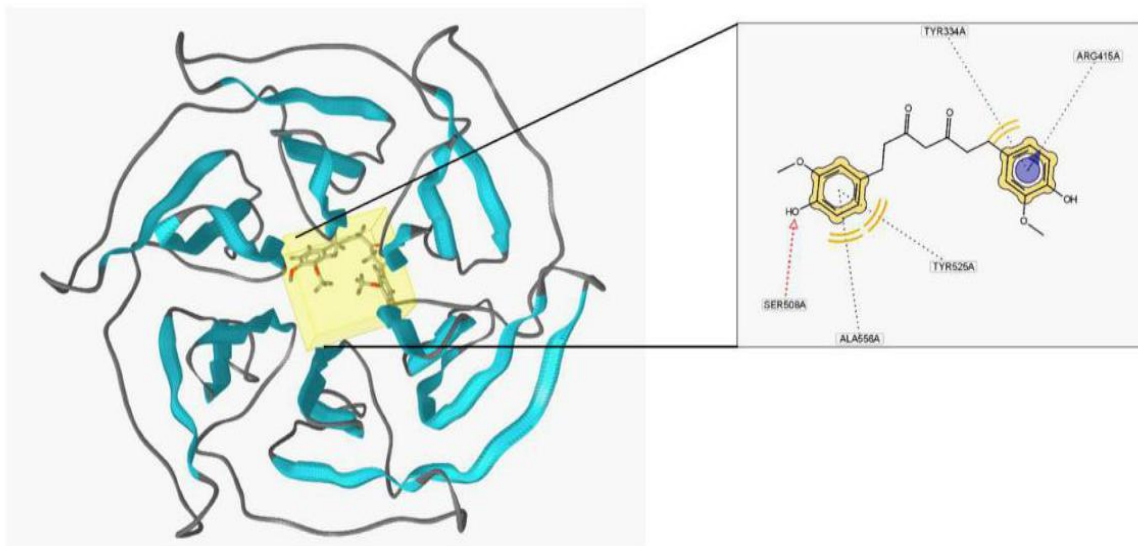
Tabel 4. nilai *binding affinity* dari *IQK* dan kurkumin terhadap *Keap1*

Reseptor protein	Ligan	Binding affinity (kkal/mol)
<i>Keap1</i> (PDBID: 4IQK)	<i>IQK</i>	-10,7
	kurkumin	-8,4

*IQK* atau senyawa 19 adalah *ID* (kode) dari *PDB* untuk senyawa aktif yang bekerja mengikat *Keap1*, agar tidak berinteraksi dengan *Nrf2*. *IQK* diyakini sebagai

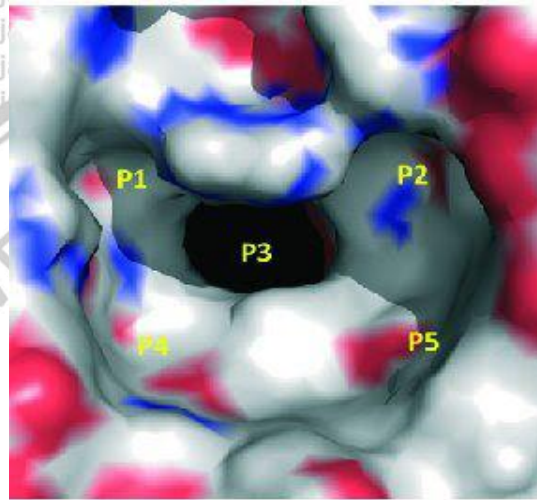
inhibitor ikatan antara *Keap1* dan *Nrf2* (Zhuang dkk., 2017). *IQK* dapat digunakan sebagai kontrol pembanding untuk melihat potensi kurkumin dalam menghambat ikatan *Nrf2* dan *Keap1*. Hasil pada Tabel 4 menunjukkan bahwa *IQK* sebagai inhibitor dari *Keap1* mempunyai nilai *binding affinity* yang lebih tinggi yaitu -10.7 kkal/mol, sedangkan kurkumin mempunyai nilai *binding affinity* sebesar -8.4 kkal/mol. Meskipun demikian, kurkumin dapat dikategorikan mempunyai energi ikatan (*binding affinity*) yang tinggi, artinya kurkumin mempunyai kemampuan untuk lebih mudah berikatan dengan molekul *Keap1* (Ekins, 2007).

Hasil pemodelan dan *docking* antara molekul kurkumin dan protein *Keap1* (Gambar 12), menunjukkan bahwa terbentuk interaksi molekuler antara kurkumin pada sisi aktif gugus aromatik (Prakoso dkk., 2017), sedangkan *Keap1* interaksinya pada *substrate binding domain SER508A, ALA556A, TYR525A, TYR334A, dan ARG415A*. Terbentuknya ikatan antara kurkumin dan *Keap1*, memunculkan asumsi bahwa kurkumin mampu menghalangi ikatan antara *Nrf2* dan *Keap1*, sehingga *Nrf2* lepas dari *Keap1* dan menjadi aktif masuk ke nukleus untuk berperan dalam proses transkripsi enzim detoksifikasi fase II (Jockers, 2016).



Gambar 12. Interaksi molekuler antara kurkumin (kuning) pada sisi aktif gugus aromatik dengan *Keap1* (biru) pada *substrate binding domain SER508A, ALA556A, TYR525A, TYR334A dan ARG415A*.

Penelitian Zhuang dkk. (2017), menyatakan bahwa dari hasil sinar-X struktur *Keap1* menunjukkan adanya 5 titik pada *binding cavity* yaitu P1, P2, P3, P4, dan P5 (Gambar 13). Pada titik - titik ini kemungkinan menjadi sisi ikatan untuk menempelnya ligan maupun inhibitor. P1 dan P2 ikatannya bersifat polar, sedangkan P4 dan P5 bersifat non polar. P3 merupakan bentukan secara simetri dari protein yang menjadi penghalang bagi inhibitor.

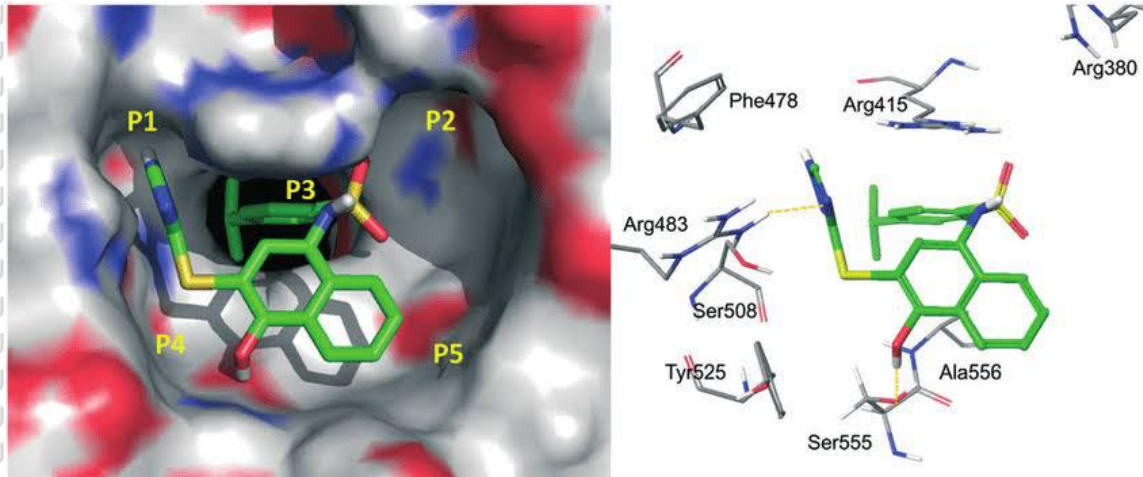


Sumber : Zhuang dkk., (2017)

Gambar 13. Struktur *Co-crystal* dari molekul protein *Keap1* yang menunjukkan 5 titik pada *binding cavity Keap1*.

Hasil *docking* antara molekul protein *Keap1* dengan molekul senyawa 19 (PDB ID: *IQK*) menunjukkan ikatan pada asam amino *Arg380*, *Arg415*, *Arg483*, *Phe478*, *Ser508*, *Ser555*, *Ala556*, dan *Tyr525* (Gambar 14) (Zhuang dkk., 2017). Terdapat 4 ikatan yang sama antara *IQK* dan *Keap1* dengan kurkumin dan *Keap1* setelah proses *docking* yaitu pada asam amino *Arg415*, *Ser508*, *Ala556*, dan *Tyr525*. Adanya kesamaan ikatan asam amino pada molekul protein *Keap1* ini semakin menguatkan asumsi bahwa fungsi kurkumin adalah sama dengan molekul *IQK* yaitu sebagai inhibitor ikatan antara *Keap1* dan *Nrf2*.





Sumber : Zhuang dkk., (2017)

Gambar 14. Docking antara molekul protein *Keap1* dan molekul senyawa 19 (IQK) yang kemungkinan berikatan pada asam amino *Arg380*, *Arg415*, *Arg483*, *Phe478*, *Ser508*, *Ser555*, *Ala556*, dan *Tyr525*.

#### 4.4 Pengaruh Pemberian Serbuk Rimpang Kunyit terhadap Indikator Aging pada Tikus Putih Premenopause

Pertambahan usia pada individu akan mengakibatkan kerusakan sel akibat akumulasi radikal bebas yang dapat mengganggu metabolisme tubuh, radikal bebas merupakan produk samping dari metabolisme normal tubuh yang biasa dikelompokkan ke dalam *ROS (reactive oxygen species)* (Doshi & Agarwal, 2014). Radikal bebas dalam tubuh bersifat sangat reaktif (tidak stabil) dan dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid (Favier, 1995). Peroksidasi lipid dapat menyebabkan kerusakan secara oksidatif pada asam lemak tak jenuh rantai panjang menghasilkan *malondialdehyde (MDA)*. Kadar *MDA* sering digunakan sebagai indeks pengukuran aktivitas radikal bebas (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Akumulasi radikal bebas (*ROS*) juga terjadi pada organ ovarium sejalan dengan pertambahan usia individu (Tatone dkk., 2008). Radikal bebas ini selanjutnya dapat mengganggu proses perkembangan folikuler pada ovarium dan akan memperparah kondisi penurunan secara bertahap dari cadangan folikel ovarium pada individu yang mengalami aging ovarium menjelang masa menopause (Tatone & Amicarelli, 2013).

Penurunan jumlah folikel ovarium akan diikuti dengan penurunan produksi dari hormon

estrogen yang diproduksi oleh sel - sel granulosa dan sel - sel teka folikel ovarium (Agarwal dkk., 2012).

#### 4.4.1 Kadar *MDA* pada Ovarium Tikus Putih Premenopause setelah Pemberian Serbuk Rimpang Kunyit

Kadar *MDA* ovarium tikus putih premenopause yang diperoleh dengan menggunakan metode *TBA*, setelah dilakukan uji *ANOVA* dan uji *BNJ*, menunjukkan bahwa kelompok perlakuan kontrol positif dan kelompok perlakuan dosis, berbeda secara signifikan dengan kelompok perlakuan kontrol negatif (Tabel 5). Kelompok hewan coba yang diberi perlakuan serbuk kurkumin (kontrol positif) dan kelompok hewan coba yang diberi perlakuan dosis serbuk rimpang kunyit menunjukkan penurunan kadar *MDA* secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (akuades). Kelompok perlakuan serbuk rimpang kunyit yang menunjukkan penurunan kadar *MDA* tertinggi adalah kelompok dosis serbuk rimpang kunyit 100 mg/kg BB yaitu  $40,20 \pm 9,16 \mu\text{mol/g}$ , atau mengalami penurunan sebesar 47,69 % dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (akuades).

Penurunan kadar *MDA* setelah perlakuan serbuk rimpang kunyit diduga karena adanya kandungan senyawa - senyawa pada serbuk rimpang kunyit yang berfungsi sebagai antioksidan alami, seperti asam askorbat, quercetin,  $\beta$  karotene, arabinose, bis demethoksikurkumin, demethoksikurkumin, kurkumin, asam caffeic, asam cinnamic, letestuanin A, dan kalebin A. Senyawa antioksidan alami banyak diisolasi dari tumbuhan karena bersifat fenolik dan polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol asam - asam organik fungsional. Senyawa antioksidan alami dari serbuk kunyit juga bisa berupa pigmen seperti karotenoid dan kurkuminoid (Li dkk., 2011). Kandungan senyawa aktif pada serbuk kunyit kelompok senyawa fenolik terutama kurkumin telah banyak diketahui aktivitasnya sebagai antioksidan (Singh dkk., 2010). Penelitian Darwadi dkk. (2013) menyatakan bahwa pemberian terapi kurkumin mampu menurunkan kadar *MDA* pada kelenjar parotis tikus putih, dan pada penelitian Kohli dkk. (2005), menyatakan bahwa kurkumin mempunyai aktivitas antioksidan, *scavenger* superoksida dan peluruh radikal bebas. Kurkumin juga dianggap mempunyai fungsi sebagai pembersih oksigen reaktif spesies dan nitrogen reaktif spesies, atau

bertanggungjawab melindungi *DNA* terhadap kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dan melindungi hepatosit dari berbagai racun (Schulz, 2008).

Tabel 5. Kadar *MDA* ovarium tikus putih premenopause ( $\mu\text{mol/g}$ ) dengan metode *TBA*.

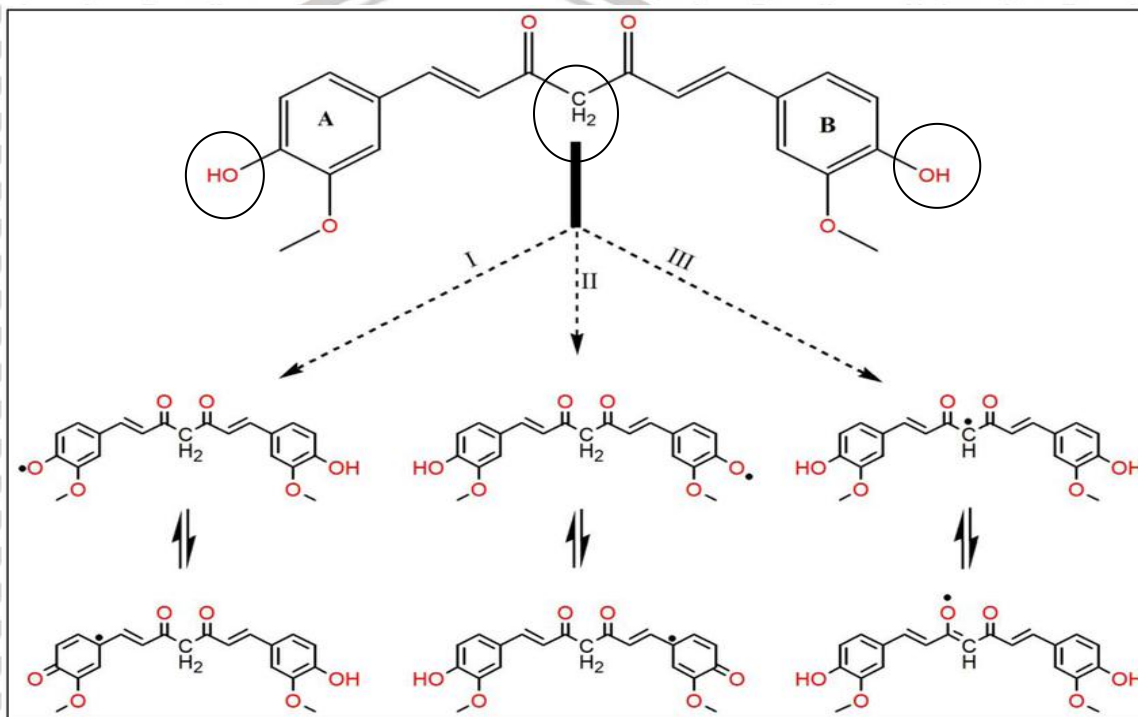
Parameter	Akuades	Kurkumin dosis 6,75 mg/kg BB	Dosis 100 mg/kg BB	Dosis 200 mg/kg BB	Dosis 400 mg/kg BB	Dosis 800 mg/kg BB
Kadar <i>MDA</i>	76,86 $\pm$ 10,06 <sup>b</sup>	24,86 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>	40,20 $\pm$ 9,16 <sup>a</sup>	42,86 $\pm$ 4,61 <sup>a</sup>	42,20 $\pm$ 8,71 <sup>a</sup>	44,20 $\pm$ 6,95 <sup>a</sup>

Keterangan : angka-angka dengan superskrip huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ( $\alpha < 0,05$ ).

Kemampuan kurkumin sebagai peluruh radikal bebas (Gambar 15) diduga karena struktur kurkumin yang mempunyai dua gugus fenolik (OH) dan satu gugus metilen ( $\text{CH}_2$ ) pada bagian  $\beta$  diketon yang bertanggung jawab terhadap stabilisasi resonansi radikal melalui reaksi konjugasi (Barzegar & Movahedi, 2011). Peroksidasi lipid yang dikenal sebagai reaksi berantai dan menghasilkan radikal bebas, dapat dihambat oleh kurkumin yang berperan penting dalam menangkap radikal bebas yang terlibat dalam peroksidasi lipid menjadi senyawa yang lebih stabil (Venugopal & Adluri, 2007). Mekanisme antioksidan pada kurkumin berasal dari dua gugus fenolik dan satu gugus metilen, dengan cara transfer elektron atau donasi atom H untuk bereaksi dengan radikal bebas. Kurkumin dianggap mempunyai potensi sebagai antioksidan yang sangat kuat karena kurkumin dapat mendonorkan atom H dari gugus fenoliknya dan juga dapat mendonorkan atom H dari sisi  $\beta$  diketon dari gugus metilen ( $\text{CH}_2$ ) (Barzegar & Movahedi, 2011).

*MDA* (*Malondialdehid*) dengan rumus kimia  $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$  adalah produk samping dari metabolisme lipid dalam tubuh, *MDA* merupakan produk dari peroksidasi lipid yaitu perusakan oksidatif pada asam lemak tak jenuh berantai panjang (Favier, 1995). Peroksidasi lipid dapat disebabkan oleh radikal bebas yang sangat reaktif, salah satunya adalah dari kelompok *reactive oxygen species* (*ROS*). *MDA* dapat digunakan sebagai indeks pengukuran aktivitas radikal bebas karena radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dan menghasilkan *MDA*, tingginya kadar *MDA* dalam tubuh kemungkinan disebabkan oleh meningkatnya aktivitas radikal bebas (Halliwell dan Gutteridge, 2015).

Kurkumin, selain dapat berfungsi sebagai antioksidan langsung yaitu dengan cara donor elektron juga mempunyai fungsi sebagai antioksidan tidak langsung karena dapat mengaktivasi *Nrf2* yang berperan dalam proses transkripsi enzim kelompok detoksifikasi fase II (*GST*, *NQO1*, dan *GCS*) (Jockers, 2016) yang melindungi sel dari radikal bebas (Reyes dkk., 2013). Perlindungan sel dari radikal bebas oleh enzim kelompok detoksifikasi fase II, diduga akan menghambat terjadinya kerusakan sel dan peningkatan produksi radikal bebas, termasuk menghambat peningkatan produksi *MDA* (Reyes dkk., 2013).

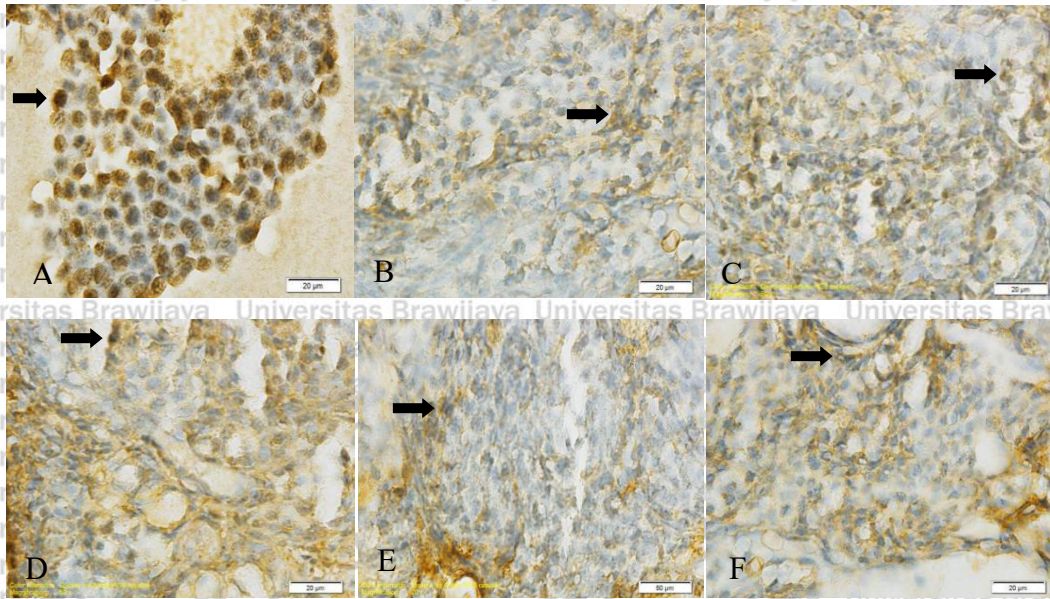


Sumber : Barzegar & Movahedi, (2011)

Gambar 15. Kemampuan molekul kurkumin sebagai peluruh radikal bebas seperti  $H_2O_2$ ,  $HO^\bullet$ , dan  $ROO^\bullet$  kemungkinan melalui dua gugus fenolik dan satu gugus metilen yang terdapat pada kurkumin (lingkaran).

#### 4.4.2 Distribusi *MDA* pada Sel Granulosa Ovarium Tikus Putih Premenopause setelah Pemberian Serbuk Rimpang Kunyit

Hasil pewarnaan menggunakan metode IHK pada preparat ovarium tikus putih premenopause setelah perlakuan serbuk kurkumin dan berbagai dosis serbuk rimpang kunyit selama 27 hari terhadap distribusi *MDA* disajikan pada Gambar 16. Sel granulosa yang berwarna coklat menunjukkan bahwa positif terdeteksi adanya *MDA*.



Gambar 16 : Distribusi *MDA* pada sel granulosa folikel ovarium tikus putih premenopause dengan metode IHK setelah perlakuan. Sel granulosa berwarna coklat yang ditunjukkan dengan tanda panah (➡) menunjukkan positif *MDA*. A. kontrol negatif (akuades), B. kontrol positif (serbuk kurkumin), C. serbuk rimpang kunyit dosis 100 mg/kg BB, D. dosis 200 mg/kg BB, E. dosis 400 mg/kg BB, F. dosis 800 mg/kg BB. Perbesaran 1000x menggunakan mikroskop bright field merk Olympus seri BX53.

Hasil uji *ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *BNJ* terhadap data distribusi *MDA* pada sel granulosa ovarium tikus putih premenopause menggunakan metode IHK setelah perlakuan menunjukkan hasil seperti pada Tabel 6.

Tabel 6. Distribusi *MDA* pada sel granulosa folikel ovarium tikus putih premenopause (%) dengan metode IHK.

Parameter	Akuades	Kurkumin dosis 6,75 mg/kg BB	Dosis 100 mg/kg BB	Dosis 200 mg/kg BB	Dosis 400 mg/kg BB	Dosis 800 mg/kg BB
IHK <i>MDA</i>	66,56±10,45 <sup>b</sup>	39,22±1,26 <sup>a</sup>	48,33±3,51 <sup>a</sup>	38,99±2,51 <sup>a</sup>	37,44±2,54 <sup>a</sup>	40,89±4,68 <sup>a</sup>

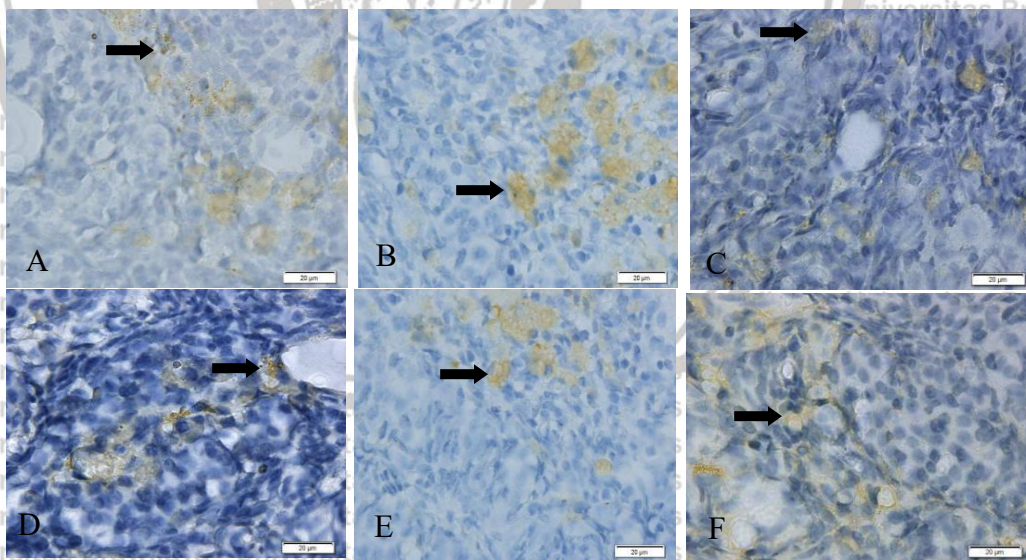
Keterangan : angka-angka dengan superskrip huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ( $\alpha < 0,05$ ).

Kelompok hewan coba yang diberi perlakuan serbuk kurkumin (kontrol positif) dan kelompok hewan coba yang diberi perlakuan dosis serbuk rimpang kunyit semuanya menunjukkan penurunan distribusi *MDA* secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (akuades). Penurunan distribusi *MDA* tertinggi pada kelompok

dosis serbuk rimpang kunyit terdapat pada kelompok dosis 400 mg/kg BB yaitu sebesar 43,75 %. Kondisi ini identik dengan hasil analisis kadar *MDA* menggunakan metode *TBA* yang sudah dibahas sebelumnya, dimana terjadi penurunan kadar *MDA* secara signifikan antara perlakuan kelompok serbuk kurkumin dan semua kelompok dosis serbuk rimpang kunyit dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (akuades). Penurunan distribusi *MDA* setelah perlakuan serbuk kurkumin dan serbuk rimpang kunyit diduga karena adanya kandungan senyawa bioaktif kurkumin dan senyawa - senyawa lain yang berfungsi sebagai antioksidan.

#### 4.4.3 Distribusi *Nrf2* pada Sel Granulosa Ovarium Tikus Putih Premenopause setelah Pemberian Serbuk Rimpang Kunyit

Hasil pewarnaan menggunakan metode IHK pada preparat ovarium tikus putih premenopause setelah perlakuan serbuk kurkumin dan berbagai dosis serbuk rimpang kunyit selama 27 hari terhadap distribusi *Nrf2* disajikan pada Gambar 17. Sel granulosa yang berwarna coklat menunjukkan bahwa positif terdeteksi adanya *Nrf2*.



Gambar 17 : Distribusi *Nrf2* pada sel granulosa folikel ovarium tikus putih premenopause dengan metode IHK setelah perlakuan. Sel granulosa berwarna coklat yang ditunjukkan dengan tanda panah (➡) menunjukkan positif *Nrf2*. A. kontrol negatif (akuades), B. kontrol positif (serbuk kurkumin), C. serbuk rimpang kunyit dosis 100 mg/kg BB, D. dosis 200 mg/kg BB, E. dosis 400 mg/kg BB, F. dosis 800 mg/kg BB. Perbesaran 1000x menggunakan mikroskop bright field merk Olympus seri BX53.

Hasil uji ANOVA dan uji BNJ terhadap data distribusi *Nrf2* pada sel granulosa ovarium tikus putih premenopause setelah perlakuan serbuk rimpang kunyit dengan menggunakan metode IHK menunjukkan hasil seperti pada Tabel 7. Hasil analisis menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan antara kelompok perlakuan serbuk kurkumin dengan kelompok kontrol negatif (akuades) dengan, sedangkan kelompok perlakuan serbuk rimpang kunyit berbeda tidak signifikan dengan kelompok kontrol negatif.

Tabel 7. Distribusi *Nrf2* pada sel granulosa folikel ovarium tikus putih premenopause (%) dengan metode IHK.

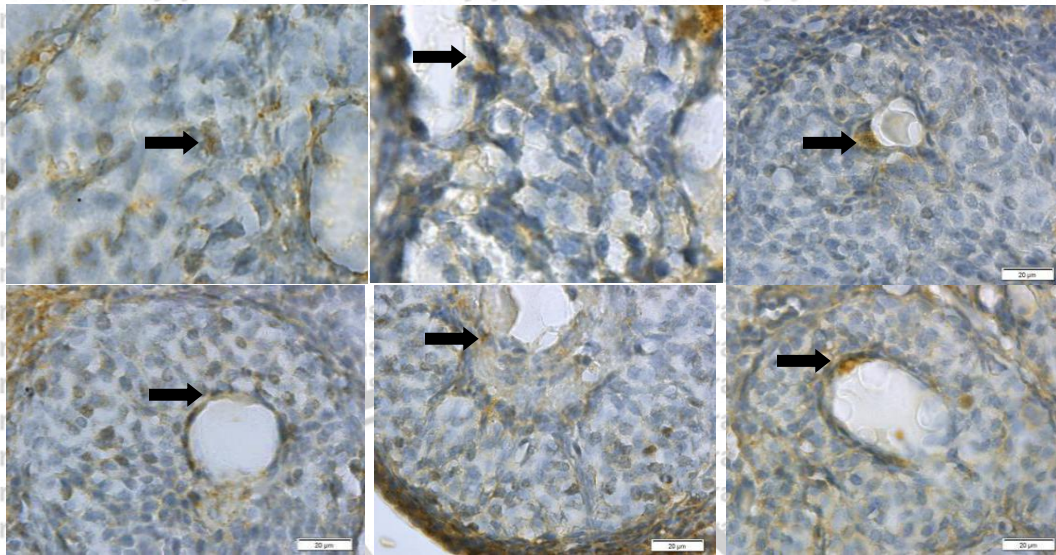
Parameter	Akuades	Kurkumin dosis 6,75 mg/kg BB	Dosis 100 mg/kg BB	Dosis 200 mg/kg BB	Dosis 400 mg/kg BB	Dosis 800 mg/kg BB
IHK <i>Nrf2</i>	26,22±2,37 <sup>a</sup>	34,55±2,19 <sup>b</sup>	26,89±0,92 <sup>ab</sup>	26,94±2,55 <sup>ab</sup>	29,27±4,97 <sup>ab</sup>	31,55±2,86 <sup>ab</sup>

Keterangan : angka-angka dengan superskrip huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ( $\alpha < 0,05$ ).

Distribusi *Nrf2* pada kelompok perlakuan serbuk rimpang kunyit menunjukkan berbeda tidak signifikan dengan kelompok perlakuan kontrol negatif (akuades), akan tetapi kecenderungannya menunjukkan peningkatan seiring dengan peningkatan dosis serbuk rimpang kunyit yang diberikan. Kelompok hewan coba yang diberi perlakuan serbuk kurkumin (kontrol positif) menunjukkan peningkatan distribusi *Nrf2* secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (akuades), sedangkan kelompok perlakuan serbuk rimpang kunyit berbeda tidak signifikan dengan kelompok kontrol negatif, tetapi kecenderungannya menunjukkan peningkatan distribusi *Nrf2* seiring dengan peningkatan dosis serbuk kunyit yang diberikan.

#### 4.4.4 Distribusi Enzim GST pada Sel Granulosa Ovarium Tikus Putih Premenopause setelah Pemberian Serbuk Rimpang Kunyit

Hasil pewarnaan menggunakan metode IHK pada preparat ovarium tikus putih premenopause setelah perlakuan serbuk kurkumin dan berbagai dosis serbuk rimpang kunyit selama 27 hari terhadap distribusi enzim GST disajikan pada Gambar 18. Sel granulosa yang berwarna coklat menunjukkan bahwa positif terdeteksi adanya enzim GST.



Gambar 18 : Distribusi enzim *GST* pada sel granulosa folikel ovarium tikus putih premenopause dengan metode IHK setelah perlakuan Sel granulosa berwarna coklat yang ditunjukkan dengan tanda panah (➡) menunjukkan positif *GST*. A. kontrol negatif (akuades), B. kontrol positif (serbuk kurkumin), C. serbuk rimpang kunyit dosis 100 mg/kg BB, D. dosis 200 mg/kg BB, E. dosis 400 mg/kg BB, F. dosis 800 mg/kg BB. Perbesaran 1000x menggunakan mikroskop bright field merk Olympus seri BX53.

Hasil uji *ANOVA* dan uji *BNJ* terhadap data distribusi enzim *GST* pada sel granulosa ovarium tikus putih premenopause setelah perlakuan serbuk rimpang kunyit dengan menggunakan metode IHK menunjukkan hasil seperti pada Tabel 8. Hasil analisis menunjukkan bahwa kelompok perlakuan serbuk kurkumin dan kelompok perlakuan serbuk rimpang kunyit berbeda secara signifikan dengan kelompok perlakuan kontrol negatif yang hanya diberikan perlakuan berupa akuades, kecuali kelompok perlakuan dosis 100 mg/kg BB yang menunjukkan perbedaan tidak signifikan terhadap kelompok perlakuan kontrol negatif.

Tabel 8. Distribusi enzim *GST* pada sel granulosa folikel ovarium tikus putih (%) dengan metode IHK.

Parameter	Akuades	Kurkumin dosis 6,75 mg/kg BB	Dosis 100 mg/kg BB	Dosis 200 mg/kg BB	Dosis 400 mg/kg BB	Dosis 800 mg/kg BB
IHK <i>GST</i>	47,05±3,42 <sup>a</sup>	72,94±2,86 <sup>b</sup>	61,16±4,85 <sup>ab</sup>	69,89±7,16 <sup>b</sup>	69,16±9,11 <sup>b</sup>	69,83±8,66 <sup>b</sup>

Keterangan : angka-angka dengan superskrip huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ( $\alpha < 0,05$ ).



Kelompok hewan coba yang diberi perlakuan serbuk kurkumin (kontrol positif) dan kelompok hewan coba yang diberi perlakuan serbuk rimpang kunyit, menunjukkan peningkatan distribusi enzim *GST* (*Glutathione S-Transferase*) secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (akuades). Peningkatan distribusi Enzim *GST* setelah perlakuan serbuk kurkumin dan serbuk rimpang kunyit diduga karena adanya kandungan kurkumin yang merupakan senyawa elektrofilik yang dapat berfungsi sebagai faktor transkripsi dengan mengaktivasi *signaling pathway* dari *Nrf2* di dalam sitoplasma sel dengan cara menghambat ikatan antara *Nrf2* dengan protein *Keap1* (Reyes dkk., 2013).

#### 4.4.5 Kadar Hormon Estradiol pada Serum Darah Tikus Putih Premenopause setelah Pemberian Serbuk Rimpang Kunyit

Hasil uji *ANOVA* dan uji BNP pada kadar estradiol hewan coba setelah perlakuan dengan menggunakan metode *ELISA* menunjukkan, bahwa kelompok perlakuan serbuk kurkumin (kontrol positif) dan kelompok perlakuan dosis serbuk rimpang kunyit dapat meningkatkan kadar estradiol serum darah hewan coba secara signifikan, kecuali kelompok perlakuan serbuk rimpang kunyit dosis 100 mg/kg BB (P2) yang tidak menunjukkan peningkatan dibanding dengan kontrol (Tabel 9). Peningkatan kadar estradiol tertinggi pada kelompok perlakuan serbuk rimpang kunyit terdapat pada kelompok dosis 400 mg/kg BB yaitu sebesar  $3,49 \pm 0,35$   $\mu\text{g/mL}$  atau 2,7 kali dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (akuades).

Tabel 9. Kadar estradiol (E2) pada serum darah tikus putih premenopause ( $\mu\text{g/mL}$ ) dengan metode *ELISA*.

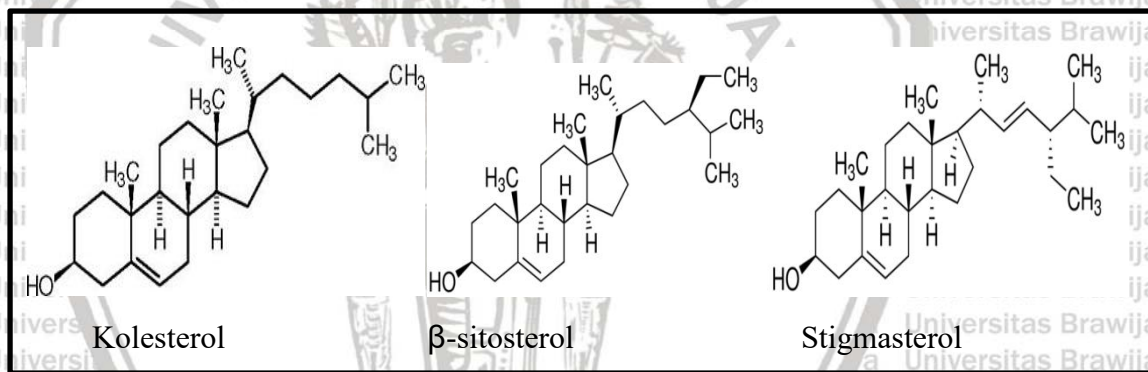
Kadar E2 hari ke	Akuades	Kurkumin dosis 6,75 mg/kg BB	Dosis 100 mg/kg BB	Dosis 200 mg/kg BB	Dosis 400 mg/kg BB	Dosis 800 mg/kg BB
1	$0,94 \pm 0,19^a$	$0,94 \pm 0,19^a$	$0,89 \pm 0,20^a$	$0,83 \pm 0,13^a$	$1,01 \pm 0,20^a$	$0,89 \pm 0,04^a$
14	$0,94 \pm 0,21^a$	$2,86 \pm 0,18^b$	$0,73 \pm 0,17^a$	$3,32 \pm 0,26^b$	$3,49 \pm 0,35^b$	$3,41 \pm 0,36^b$

Keterangan : angka-angka dengan superskrip huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ( $\alpha < 0,05$ ).

Peningkatan kadar estradiol pada serum darah tikus putih premenopause setelah perlakuan serbuk rimpang kunyit diduga karena adanya kandungan senyawa fitosteroid pada serbuk rimpang kunyit yaitu  $\beta$ -sitosterol. Fitosteroid kemungkinan berpengaruh

secara tidak langsung dan langsung terhadap peningkatan kadar estrogen pada tikus (Zhao & Mu, 2011). Pengaruh tidak langsung fitosteroid terhadap peningkatan kadar estrogen adalah karena adanya kemiripan struktural dan fungsional fitosteroid dengan kolesterol (Gambar 19), yang mempunyai fungsi estrogenik yaitu sebagai prekursor alami sintesis hormon steroid seperti estrogen (Kusmana dkk., 2011).

Rimpang kunyit mempunyai kandungan fitosteroid (Ravindran dkk., 2007), fitosteroid merupakan senyawa bioaktif dari tanaman yang secara struktural dan fungsional memiliki kemiripan dengan hormon estrogen, serta dilaporkan memiliki berbagai aktivitas estrogenik (Aggarwal dkk., 2006). Fitosteroid ditemukan pada banyak tanaman obat herba, termasuk *red clover*, *black cohosh*, *alfalfa*, *hops*, *licorice*, dan kunyit (Mazur dkk., 1998). Fitosteroid dapat berpengaruh dalam menstabilkan keseimbangan hormon dalam tubuh hewan (Saljoughian, 2007).



Sumber : Li dkk., (2011)

Gambar 19. Kandungan fitosteroid ( $\beta$ -sitosterol) pada serbuk rimpang kunyit yang memiliki kemiripan struktural dengan kolesterol, yang merupakan bahan baku pembentukan hormon-hormon steroid seperti estradiol.

Pengaruh langsung fitosteroid terhadap peningkatan kadar estrogen darah adalah aksi langsung fitosteroid pada sel granulosa ovarium (Zhao & Mu, 2011). Estrogen adalah hormon steroid yang memiliki fungsi estrogenik dengan banyak jalur, salah satunya adalah mempengaruhi sekresi hormon FSH dan LH melalui mekanisme feedback (Amstrong, 2011). Penambahan fitosteroid dari luar tubuh dapat diterjemahkan sebagai peningkatan kadar estrogen eksogen yang akan memblok produksi GNRH dari hipotalamus yang berimbas dengan berkurangnya produksi FSH dan LH dari hipofisis, sehingga perkembangan folikel ovarium berkembang minimum dan bertahan tidak

ovulasi, kondisi ini akan mempertahankan sel-sel granulosa folikel untuk terus memproduksi hormon estrogen (Thakur dkk., 2009).

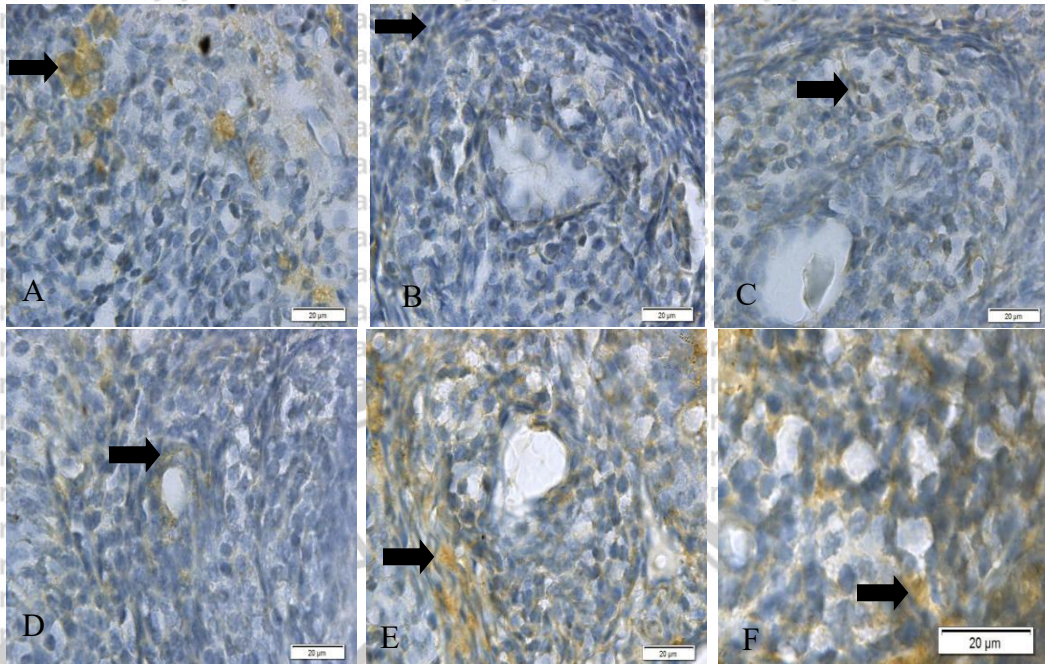
#### **4.5 Pengaruh Pemberian Serbuk Rimpang Kunyit terhadap Indikator Proliferasi Sel Granulosa dan Jumlah Folikel Ovarium Tikus Putih Premenopause**

Proliferasi sel adalah proses pertumbuhan dan pembelahan sel. Pada jaringan normal proses proliferasi selalu mengarah ke penambahan jaringan (Gougeon, 2003). Pertambahan sel yang akan membentuk jaringan tidak hanya bergantung pada proliferasi sel saja, akan tetapi juga oleh kematian sel terprogram (apoptosis). Keseimbangan antara produksi sel baru (proliferasi) dengan kematian sel terprogram akan mempertahankan jumlah sel yang tepat untuk mengisi jaringan (Gougeon dkk., 1994). Proliferasi merupakan suatu siklus pembelahan sel, dimana terjadi pembelahan DNA induk menjadi dua sel anak. Siklus pembelahan sel diatur oleh *Cyclin Dependent Kinase (CDK)* (Erickson, 2004). Siklus pembelahan sel dibagi menjadi fase G1 (parasintesis), S (sintesis), G2 (premitosis), M (mitosis) dan G0 (istirahat) (Fortune, 2003). Selanjutnya perpindahan antar fase diatur oleh *checkpoint* yang menentukan apakah kondisi memungkinkan untuk masuk ke fase berikutnya (Lindeberg, 2008).

Penanda atau marker yang sering digunakan untuk melihat proliferasi sel adalah *PCNA (proliferating cell nuclear antigen)*. *PCNA* digunakan sebagai penanda proliferasi sel karena ekspresi *PCNA* meningkat pada sel yang sedang aktif melakukan pembelahan. Ekspresi *PCNA* di dalam inti sel dapat dideteksi dengan menggunakan metode imunohistokimia (Sullivan dkk., 1993).

##### **4.5.1 Proliferasi Sel Granulosa pada Ovarium Tikus Putih Premenopause setelah Pemberian Serbuk Rimpang Kunyit**

Hasil pewarnaan menggunakan metode IHC pada preparat ovarium tikus putih premenopause setelah perlakuan serbuk kurkumin dan berbagai dosis serbuk rimpang kunyit selama 27 hari terhadap kadar *PCNA* disajikan pada Gambar 20. Sel granulosa yang berwarna coklat menunjukkan bahwa positif terdeteksi adanya *PCNA*.



Gambar 20 : Distribusi *PCNA* pada sel granulosa folikel ovarium tikus putih premenopause dengan metode IHK setelah perlakuan. Sel granulosa berwarna coklat yang ditunjukkan dengan tanda panah (➡) menunjukkan positif *PCNA*. A. kontrol negatif (akuades), B. kontrol positif (serbuk kurkumin), C. serbuk rimpang kunyit dosis 100 mg/kg BB, D. dosis 200 mg/kg BB/hari, E. dosis 400 mg/kg BB, F. dosis 800 mg/kg BB. Perbesaran 1000x menggunakan mikroskop bright field merk Olympus seri BX53.

Hasil uji *ANOVA* dan uji *BNJ* terhadap data distribusi *PCNA* pada sel granulosa ovarium tikus putih premenopause setelah perlakuan serbuk rimpang kunyit dengan menggunakan metode IHK menunjukkan hasil seperti pada Tabel 10. Hasil analisis menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan antara kelompok perlakuan serbuk kurkumin (kontrol positif) dengan kelompok perlakuan kontrol negatif (akuades), sedangkan kelompok perlakuan serbuk rimpang kunyit berbeda tidak signifikan dengan kelompok kontrol negatif.

Tabel 10. Distribusi *PCNA* pada sel granulosa folikel ovarium tikus putih premenopause (%) dengan metode IHK.

Parameter	Akuades	Kurkumin dosis 6,75 mg/kg BB	Dosis 100 mg/kg BB	Dosis 200 mg/kg BB	Dosis 400 mg/kg BB	Dosis 800 mg/kg BB
IHK <i>PCNA</i>	46,77±5,49 <sup>a</sup>	68,5±7,86 <sup>b</sup>	50,11±2,99 <sup>ab</sup>	49,88±10,46 <sup>ab</sup>	63,88±5,77 <sup>ab</sup>	62,33±6,83 <sup>ab</sup>

Keterangan : angka-angka dengan superskrip huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ( $\alpha < 0,05$ ).

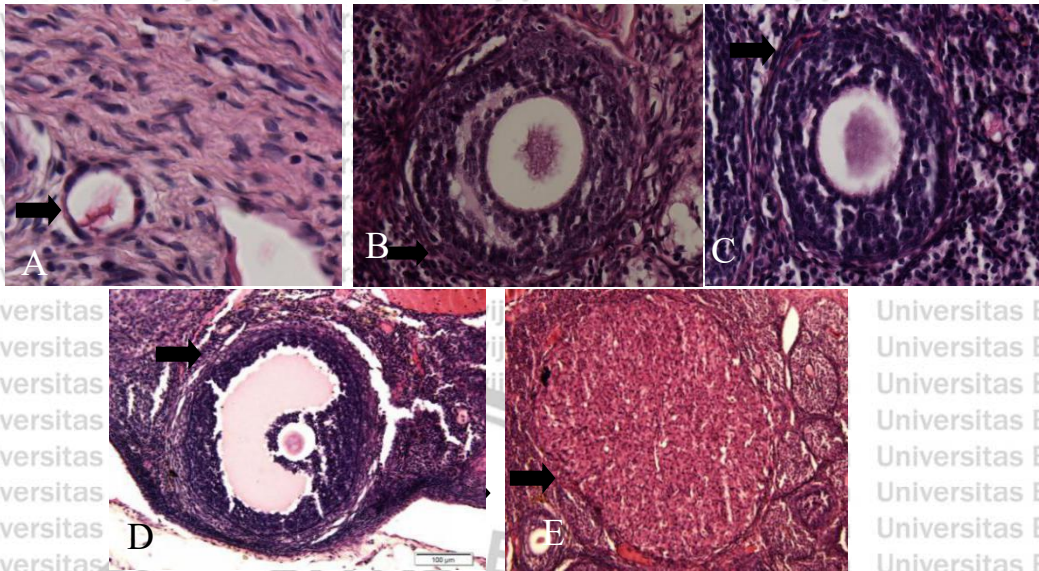
Kelompok hewan coba yang diberi perlakuan serbuk kurkumin (kontrol positif) menunjukkan peningkatan distribusi *PCNA* secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (akuades), sedangkan kelompok perlakuan serbuk rimpang kunyit berbeda tidak signifikan dengan kelompok kontrol negatif, tetapi kecenderungannya menunjukkan peningkatan distribusi *PCNA* seiring dengan peningkatan dosis serbuk kunyit yang diberikan.

#### 4.5.2 Jumlah Folikel pada Ovarium Tikus Putih Premenopause setelah Pemberian Serbuk Rimpang Kunyit

Hasil pembuatan preparat organ ovarium tikus putih premenopause menggunakan metode parafin dan dilanjutkan dengan pewarnaan Hematoksili-Eosin (HE) tampak pada gambar 21. Preparat digunakan untuk menghitung jumlah folikel dan korpus luteum pada ovarium hewan coba setelah perlakuan serbuk rimpang kunyit. Pengamatan preparat dan penghitungan jumlah folikel dilakukan dibawah mikroskop.

Hasil uji *ANOVA* dan uji BNP terhadap data jumlah folikel pada ovarium tikus putih premenopause setelah pemberian perlakuan serbuk rimpang kunyit dengan metode pewarnaan Hematoxilin-Eosin, seperti ditunjukkan pada Tabel 11. Hasil analisis menunjukkan terdapat perbedaan secara signifikan pada jumlah folikel primer dan jumlah folikel antral, sedangkan pada jumlah folikel primordial, jumlah folikel sekunder dan jumlah korpus luteum terdapat perbedaan yang tidak signifikan antara kelompok perlakuan kontrol negatif (akuades) dengan kelompok perlakuan serbuk kurkumin dan perlakuan serbuk rimpang kunyit.

Kelompok perlakuan serbuk rimpang kunyit dengan dosis 200 mg/kg BB menunjukkan jumlah folikel primer dan jumlah folikel antral tertinggi yaitu  $9,7 \pm 1,52$  atau sebesar 1,6 kali dan  $6,7 \pm 0,57$  atau sebesar 81,08 %. Peningkatan jumlah folikel primer dan jumlah folikel antral secara signifikan pada kelompok perlakuan serbuk kurkumin dan kelompok perlakuan serbuk rimpang kunyit dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (akuades) kemungkinan disebabkan adanya kandungan senyawa bioaktif kurkumin pada serbuk kurkumin dan serbuk rimpang kunyit yang dapat berfungsi sebagai antioksidan (Shen dkk., 2012) dan melindungi sel-sel granulosa ovarium dari radikal bebas terutama dari kelompok ROS (Reyes dkk., 2013).



Gambar 21. Folikel ovarium tikus putih premenopause menggunakan metode pewarnaan HE. Folikel ditunjukkan dengan tanda panah (■). A. Folikel primordial; perbesaran 200x, B. Folikel primer; 400x, C. Folikel sekunder; 400x, D. Folikel antral; 400x, E. Korpus luteum; 100x. Menggunakan mikroskop bright field merk Olympus seri BX53.

Tabel 11. Jumlah folikel primordial, primer, sekunder, antral dan korpus luteum pada ovarium tikus putih premenopause dengan pewarnaan HE.

Parameter	Akuades	Kurkumin dosis 6,75 mg/kg BB	Dosis 100 mg/kg BB	Dosis 200 mg/kg BB	Dosis 400 mg/kg BB	Dosis 800 mg/kg BB
Folikel primordial	36,0±4,58 <sup>a</sup>	39,7±1,53 <sup>a</sup>	32,3±5,77 <sup>a</sup>	36,7±1,53 <sup>a</sup>	31,7±5,50 <sup>a</sup>	32,3±7,02 <sup>a</sup>
Folikel primer	3,7±0,57 <sup>a</sup>	6,0±1,00 <sup>ab</sup>	5,7±1,15 <sup>ab</sup>	9,7±1,52 <sup>b</sup>	8,7±2,51 <sup>b</sup>	6,7±1,52 <sup>ab</sup>
Folikel sekunder	2,7±0,57 <sup>a</sup>	4,7±1,15 <sup>a</sup>	2,0±1,00 <sup>a</sup>	3,3±1,52 <sup>a</sup>	3,7±0,57 <sup>a</sup>	4,0±1,00 <sup>a</sup>
Folikel antral	3,7±0,57 <sup>ab</sup>	6,3±1,15 <sup>c</sup>	3,3±1,52 <sup>a</sup>	6,7±0,57 <sup>c</sup>	6,0±1,00 <sup>bc</sup>	4,3±0,57 <sup>abc</sup>
Korpus luteum	5,3±0,57 <sup>a</sup>	7,7±0,57 <sup>a</sup>	5,7±1,15 <sup>a</sup>	7,0±1,00 <sup>a</sup>	6,7±1,52 <sup>a</sup>	6,0±1,00 <sup>a</sup>

Keterangan : angka-angka dengan superskrip huruf yang berbeda pada lajur yang sama menunjukkan berbeda nyata ( $\alpha < 0,05$ ).

#### 4.6 Pembahasan Umum

Masa peralihan dari fase reproduktif ke fase nonreproduktif suatu individu diawali dengan suatu tahapan yang disebut dengan premenopause (te Velde & Pearson, 2002).

Tahap premenopause ditandai dengan mulai menurunnya fungsi reproduksi, menurunnya kadar hormon progesteron, estrogen, dan siklus reproduksi yang tidak teratur (Broekmans dkk., 2009). Penurunan fungsi reproduksi pada tahap premenopause dapat ditandai dengan penurunan jumlah dan kualitas folikel pada ovarium (Li dkk., 2012). Faktor

penyebab utama penurunan jumlah dan kualitas folikel diduga adalah adanya perubahan faktor lingkungan mikro ovarium seperti, peningkatan kadar radikal bebas dan *advanced glycation end products (AGEs)* (Tatone & Amicarelli, 2013).

Peningkatan kadar radikal bebas terutama berasal dari kelompok *ROS*, seperti Radikal superoksida anion, Radikal hidroksil, dan Hidrogen peroksida (Tatone dkk., 2008). *Radical Oxygen Species (ROS)* adalah produk metabolisme aerobik, dimana terjadi kebocoran elektron dari dalam membran mitokondria selama proses fosforilasi oksidatif dan produksi energi (Rattan, 2006). *Carbonil Reactive Spesies (CRS)* juga merupakan kelompok radikal bebas yang berasal dari metabolisme endogen sel yaitu proses glikolisis (Tatone & Amicarelli). Peningkatan produksi radikal bebas karena kebocoran elektron intra-mitokondria diduga erat hubungannya dengan faktor aging (penuaan) sel (Rattan, 2006). Peningkatan produksi radikal bebas seperti *ROS* dan *CRS* ketika sudah melebihi kemampuan fungsi antioksidan dari *scavenger*, akan mengakibatkan terjadinya gangguan pada metabolisme sel, kerusakan sel, dan dapat berujung pada terjadinya kematian sel (Yin & Chen, 2005). Ketidak-seimbangan antara produksi radikal bebas dan antioksidan, akan menyebabkan gangguan kinerja seluler dan energi yang dilepaskan dari mitokondria, yang akhirnya akan mengarah ke kerusakan dan kematian sel (Tatone dkk., 2008).

Penelitian ini bertujuan untuk memperbaiki kondisi tidak seimbang antara produksi radikal bebas dan antioksidan, yang diduga terjadi pada individu yang memasuki masa premenopause. Serbuk rimpang kunyit yang mengandung senyawa kurkumin dan senyawa-senyawa lain yang berpotensi sebagai antioksidan eksogen diharapkan dapat membantu menyeimbangkan kondisi tersebut.

Prediksi aktivitas kurkumin sebagai antioksidan pada penelitian ini dapat diketahui berdasarkan hasil analisis *in silico* yang meliputi nilai Probability activity ( $P_a$ ), nilai *Binding affinity* dan formulasi *docking* antara senyawa kurkumin dengan *Keap1*. Nilai  $P_a$  dan *Binding affinity* senyawa kurkumin sebagai antioksidan cukup tinggi, sehingga secara *in silico* kurkumin dinyatakan mempunyai potensi sebagai antioksidan dan bisa dilanjutkan pembuktiannya dengan melakukan penelitian secara laboratoris (Savcun dkk., 2013). Sedangkan dari hasil pemodelan dan *docking* interaksi antara senyawa kurkumin dengan molekul protein *Keap1*, kemungkinan kurkumin dapat

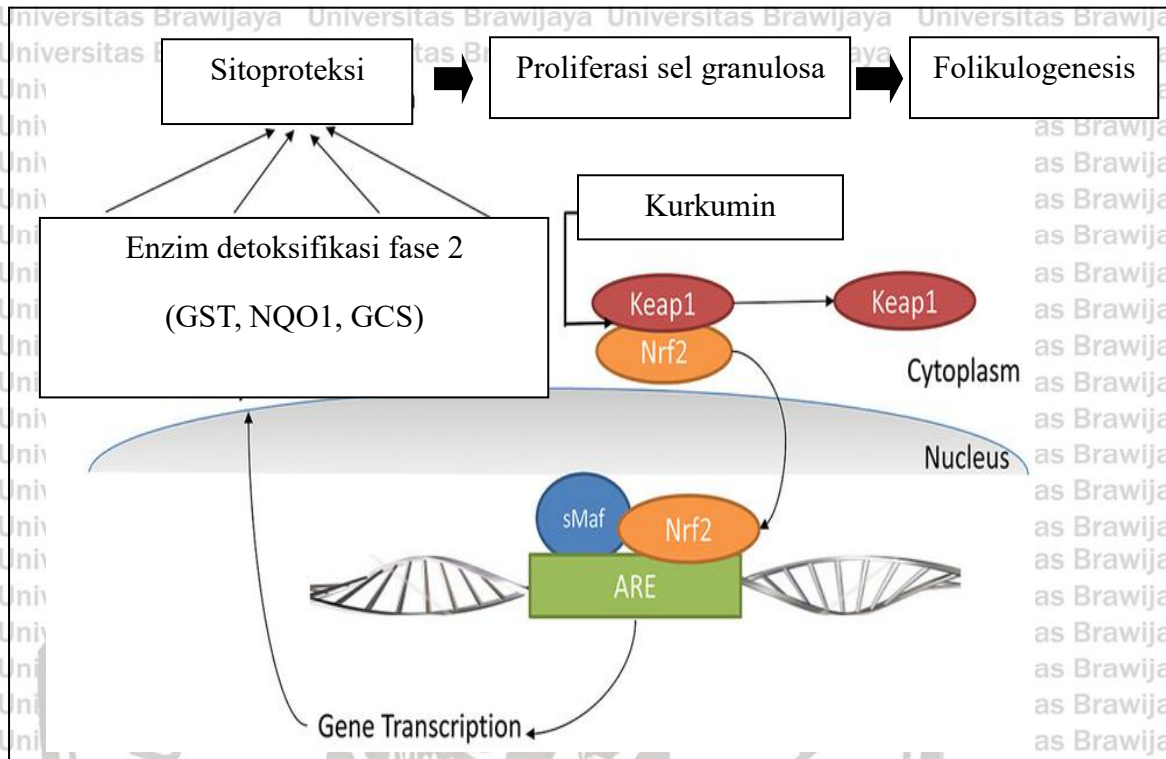
berikatan pada *substrate binding domain* asam amino dari *Keap1*, yaitu *Serin*, *Alanin*, *Tyrosin* dan *Arginin* (*SER508A*, *ALA556A*, *TYR525A*, *TYR334A* dan, *ARG415A*).

Kemampuan kurkumin berikatan dengan molekul *Keap1* ini diasumsikan bahwa kurkumin berpotensi sebagai inhibitor ikatan antara *Keap1* dengan *Nrf2*. Hasil penelitian secara *in silico* dilanjutkan dengan penelitian laboratoris (*in vivo*).

Hasil penelitian yang menggunakan hewan coba tikus putih premenopause, menunjukkan adanya perbaikan kondisi hewan coba kelompok dosis serbuk rimpang kunyit dibanding kelompok kontrol negatif, dimana terjadi penurunan kadar *MDA* secara signifikan. Kadar *MDA* ovarium tikus putih premenopause mengalami penurunan tertinggi pada perlakuan serbuk rimpang kunyit dosis 100 mg/kg BB, dengan penurunan sebesar 47,69 %. Sedangkan distribusi *MDA* sel granulosa ovarium mengalami penurunan tertinggi pada perlakuan serbuk rimpang kunyit dosis 400 mg/kg BB, dengan penurunan sebesar 43,75 % (Gambar 25).

Penurunan kadar dan distribusi *MDA* secara signifikan pada kelompok dosis serbuk rimpang kunyit dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif diduga karena kemampuan kurkumin sebagai peluruh radikal bebas. Struktur kurkumin yang mempunyai dua gugus fenolik (OH) dan satu gugus metilen (CH<sub>2</sub>) pada bagian β diketon yang bertanggung jawab terhadap stabilisasi resonansi radikal melalui reaksi konjugasi (Barzegar & Movahedi, 2011). Peroksidasi lipid yang dikenal sebagai reaksi berantai dan menghasilkan radikal bebas, dapat dihambat oleh kurkumin yang berperan penting dalam menangkap radikal bebas yang terlibat dalam peroksidasi lipid menjadi senyawa yang lebih stabil (Venugopal & Adluri, 2007). Mekanisme antioksidan pada kurkumin diduga dengan melalui cara transfer elektron atau donasi atom H untuk bereaksi dengan radikal bebas. Kurkumin dianggap mempunyai potensi sebagai antioksidan yang sangat kuat karena kurkumin dapat mendonorkan atom H dari gugus hidroksi cincin fenoliknya dan juga dapat mendonorkan atom H dari sisi β diketon dari gugus metilen (CH<sub>2</sub>) (Barzegar & Movahedi, 2011).





Gambar 22. Fungsi kurkumin sebagai antioksidan dengan mekanisme inhibitor interaksi antara *Keap1* dan *Nrf2*.

Peningkatan kadar estradiol pada serum darah tikus putih premenopause setelah perlakuan serbuk rimpang kunyit diduga karena adanya kandungan senyawa fitosteroid pada serbuk rimpang kunyit yaitu  $\beta$ -sitosterol. Fitosteroid kemungkinan berpengaruh secara langsung dan tidak langsung, terhadap peningkatan kadar estradiol pada tikus (Zhao & Mu, 2011). Pengaruh tidak langsung fitosteroid terhadap peningkatan kadar estradiol adalah karena adanya kemiripan struktural dan fungsional fitosteroid dengan kolesterol, yang mempunyai fungsi estrogenik yaitu sebagai prekursor alami sintesis hormon steroid seperti estradiol (Kusmana dkk., 2011). Fitosteroid merupakan senyawa bioaktif dari tanaman yang secara struktural dan fungsional memiliki kemiripan dengan hormon estrogen yang dinyatakan memiliki berbagai aktivitas estrogenik (Aggarwal dkk., 2006). Fitosteroid dapat berpengaruh dalam menstabilkan keseimbangan hormon dalam tubuh hewan (Saljoughian, 2007). Pengaruh langsung fitosteroid terhadap peningkatan kadar estrogen darah adalah aksi langsung fitosteroid pada sel granulosa ovarium (Zhao & Mu, 2011). Estrogen adalah hormon steroid yang memiliki fungsi estrogenik dengan

banyak jalur, salah satunya adalah mempengaruhi sekresi hormon FSH dan LH melalui mekanisme *feedback* (Amstrong, 2011).

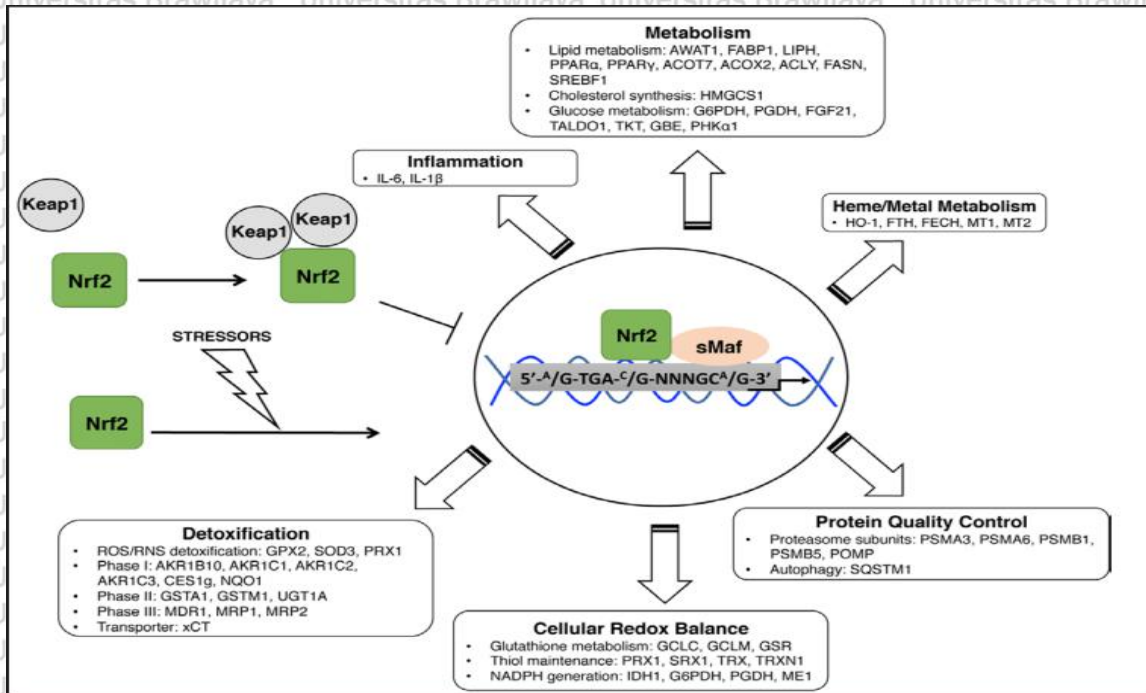
Kelompok perlakuan serbuk rimpang kunyit dosis 200 mg/kg BB menunjukkan jumlah folikel primer, jumlah folikel antral, dan jumlah korpus luteum tertinggi, yaitu sebesar  $9,7 \pm 1,52$ ,  $6,7 \pm 0,57$ , dan  $7,0 \pm 1,00$ , dibandingkan dengan kelompok perlakuan serbuk rimpang kunyit dosis yang lain. Kelompok perlakuan serbuk rimpang kunyit dosis 200 mg/kg BB juga mengalami peningkatan jumlah folikel primer dan jumlah folikel antral secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, sedangkan pada jumlah folikel sekunder mengalami kecenderungan peningkatan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif tetapi tidak signifikan (Gambar 26).

Peningkatan jumlah folikel primer, sekunder, antral dan korpus luteum pada perlakuan serbuk rimpang kunyit dosis 200 mg/kg BB kemungkinan disebabkan adanya kandungan senyawa kurkumin dan senyawa-senyawa lain pada serbuk rimpang kunyit yang berfungsi sebagai antioksidan dan dapat melindungi sel-sel granulosa ovarium dari radikal bebas terutama dari kelompok ROS. Adanya sitoproteksi pada sel granulosa ovarium akibat kerja dari antioksidan akan menjamin keberlangsungan proses proliferasi sel berjalan dengan baik, sehingga diharapkan proses folikulogenesis juga berjalan dengan baik (Gambar 22) dan terlihat dari hasil penelitian yang ditunjukkan dengan peningkatan jumlah folikel primer dan folikel antral secara signifikan (Gambar 26).

Distribusi *Nrf2* pada kelompok perlakuan serbuk rimpang kunyit menunjukkan berbeda tidak signifikan dengan kelompok perlakuan kontrol negatif, akan tetapi kecenderungannya menunjukkan peningkatan seiring dengan peningkatan dosis serbuk rimpang kunyit yang diberikan. Peningkatan distribusi *Nrf2* pada sel granulosa tikus putih premenopause tertinggi adalah perlakuan serbuk rimpang kunyit dosis 800 mg/kg BB, dengan peningkatan sebesar 20,32 % dibandingkan dengan kontrol negatif (Gambar 25).

Peningkatan distribusi *Nrf2* setelah perlakuan serbuk kurkumin dan serbuk rimpang kunyit diduga karena adanya kandungan kurkumin yang berfungsi sebagai antioksidan. Senyawa kurkumin berfungsi sebagai antioksidan karena dapat mengaktifasi *Nrf2* dan meregulasi proses transkripsi enzim - enzim detoksifikasi fase II seperti enzim *GST*, *NQO1*, dan *GCS* (Zhang, 2006), enzim - enzim ini akan melindungi sel granulosa ovarium dari tingginya kadar ROS pada individu premenopause (Prasad dkk., 2016). *Nrf2*

merupakan agen transkripsi yang mempunyai spektrum luas (Gambar 23). Aktivasi *Nrf2* dapat berperan dalam regulasi transkripsi beberapa kategori gen sesuai dengan pemicunya (*stressors*) (Paladino dkk., 2018).

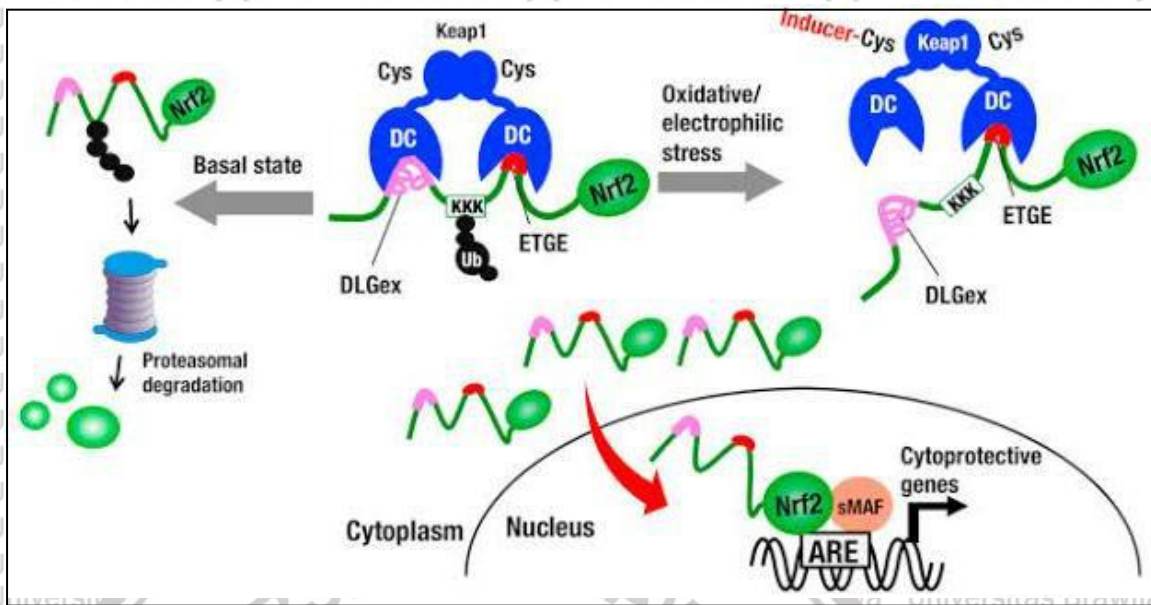


Sumber : Paladino dkk., (2018)

Gambar 23. Aktivasi *Nrf2* dan regulasinya terhadap beberapa gen. Inaktivasi *Keap1* akan menyebabkan *Nrf2* mulai aktif dan bermigrasi ke dalam nukleus. Bersama dengan molekul heterodimer yaitu *sMaf* (*small Maf*), *Nrf2* meregulasi ekspresi gen *ARE* (*Antioxidant Response Element*) - *dependent* dalam beberapa kategori.

Kurkumin terbukti dapat meningkatkan distribusi *Nrf2* pada sel granulosa ovarium tikus putih premenopause, selanjutnya peningkatan *Nrf2* akan berimbas pada peningkatan distribusi enzim *GST*. Hal ini terbukti dengan hasil penelitian yang menunjukkan adanya peningkatan distribusi *GST* secara signifikan setelah perlakuan serbuk rimpang kunyit dosis 200, 400, dan 800 mg/kg BB, dengan peningkatan distribusi *GST* tertinggi pada perlakuan serbuk rimpang kunyit dosis 200 mg/kg BB, yaitu sebesar 48,54 % dibandingkan dengan kontrol negatif (Gambar 25). *Nrf2* selanjutnya akan bertranslokasi menuju nukleus untuk memicu sintesis gen-gen antioksidan (Zhang, 2006).

*Nrf2* di dalam nukleus akan berikatan dengan *sMaf* dan mengaktivasi *ARE* (*Antioxidant Response Element*) untuk mentranskripsi gen-gen sitoprotektif (Gambar 24) (Suzuki & Yamamoto, 2015).



Sumber : Suzuki & Yamamoto, (2015)

Gambar 24. Interaksi antara *Keap1* dan *Nrf2*. Respon terhadap stres oksidatif dan elektrofilik, *Nrf2* merangsang ekspresi gen enzim sitoprotektif.

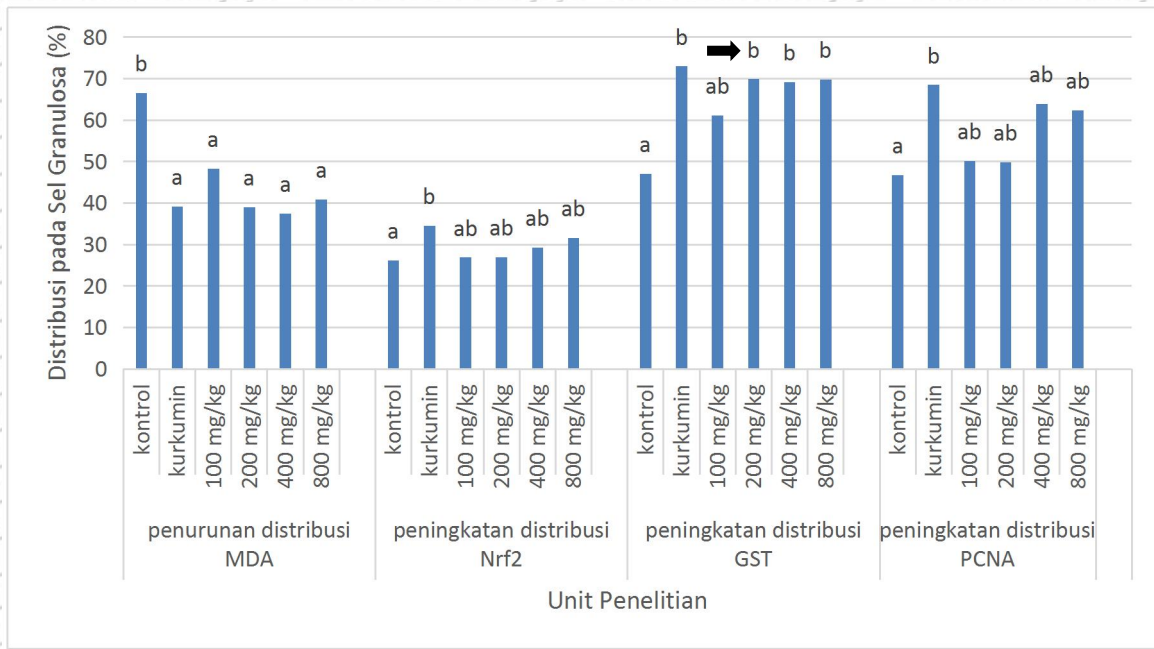
*Nrf2* yang terdeteksi oleh pewarnaan preparat dengan menggunakan metode imunohistokimia (IHK) adalah *Nrf2* yang dalam kondisi bebas tidak berikatan, yaitu *Nrf2* yang berada di sitoplasma yang sudah terlepas dari molekul *Keap1* dan *Nrf2* yang berada di dalam nukleus yang belum berikatan dengan *sMaf* (Boenisch., 2001). Setelah *Nrf2* terlepas dari molekul *Keap1* dan bertranslokasi dari sitoplasma ke dalam nukleus, maka *Nrf2* akan berikatan dengan *sMaf* dan menstimuli *ARE dependent gene* untuk mentranskripsi enzim *GST* (Zhang, 2006). Meningkatnya distribusi enzim *GST* pada sel granulosa ovarium, akan diiringi dengan dengan berkurangnya *Nrf2* yang dalam kondisi bebas. Hal ini terbukti pada penelitian ini dimana distribusi *Nrf2* yang tetap rendah, walaupun cenderung meningkat pada perlakuan dosis serbuk rimpang kunyit dibandingkan dengan kontrol negatif (Gambar 25).

Radikal bebas, seperti hidroksil oksida (OH<sup>-</sup>) dapat menyebabkan peroksidasi lipid menghasilkan senyawa yang dideteksi sebagai *MDA*. Pada penelitian ini, pemberian serbuk rimpang kunyit terbukti dapat menurunkan secara signifikan kadar dan distribusi *MDA* pada sel granulosa ovarium tikus putih premenopause dibandingkan dengan kontrol negatif. Penurunan kadar dan distribusi *MDA* pada kelompok perlakuan serbuk rimpang kunyit, sejalan dengan kenaikan distribusi *Nrf2*, enzim *GST*, dan *PCNA*. Enzim *GST*

merupakan enzim yang berperan penting terhadap perlindungan sel (sitoproteksi) oleh kerusakan dari bahan toksik (Burg dkk., 2006)

Adanya sitoproteksi oleh enzim *GST*, akan menyebabkan sel granulosa ovarium tikus putih premenopause berkembang dengan optimal. Pada penelitian ini terbukti, perlakuan serbuk rimpang kunyit cenderung meningkatkan proliferasi sel granulosa (*PCNA*) dibandingkan dengan kontrol negatif, dengan peningkatan tertinggi pada dosis 400 mg/kg BB yaitu sebesar 36,58 %. Menurut Homma dkk. (2009), kerja enzim *GST* adalah memproteksi sel dengan menghambat kerja *P21* sebagai inhibitor siklus sel. Kondisi *P21* yang tidak aktif, akan memicu siklus sel untuk dapat kembali berjalan karena *E2F* sebagai faktor transkripsi untuk *Cyclin E* menjadi aktif kembali. *Cyclin E* diperlukan oleh sel untuk masuk ke fase S. Pada penelitian ini peningkatan fase S ditunjukkan dengan peningkatan distribusi *PCNA* yang artinya terjadi peningkatan proliferasi sel granulosa ovarium.

*PCNA* (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) adalah suatu antigen yang diekspresikan di dalam nukleus sel dan merupakan regulator proliferasi sel yang penting, *PCNA* merupakan marker terjadinya proliferasi sel (Junquera & Carneiro, 2005). Kecenderungan peningkatan proliferasi sel pada kelompok perlakuan dosis serbuk rimpang kunyit karena adanya peran kurkumin sesuai dengan penelitian Velasquez dkk. (2014), yang menyatakan bahwa pemberian 0,5  $\mu$ M kurkumin pada stem sel olfaktorik (*Olfactory Ensheathing Cells*) dapat menstimulasi terjadinya proliferasi sel. Pemberian kurkumin pada mencit dewasa secara signifikan dapat meningkatkan jumlah sel-sel baru pada hipokampus, hal ini mengindikasikan bahwa kurkumin turut berperan dalam proses neurogenesis pada hipokampus mencit dewasa (Kim dkk., 2007). Kurkumin juga dapat merangsang proliferasi dan migrasi sel-sel 3T3-L1 pre adiposa, melalui aktivasi signaling pathway PI3K dan MEK dengan menghambat secara langsung p38 dan p-SAPK/JNK, diduga kurkumin berperan dalam proliferasi sel pre adiposa dan migrasinya menjadi fibroblas (Kim dkk., 2011).

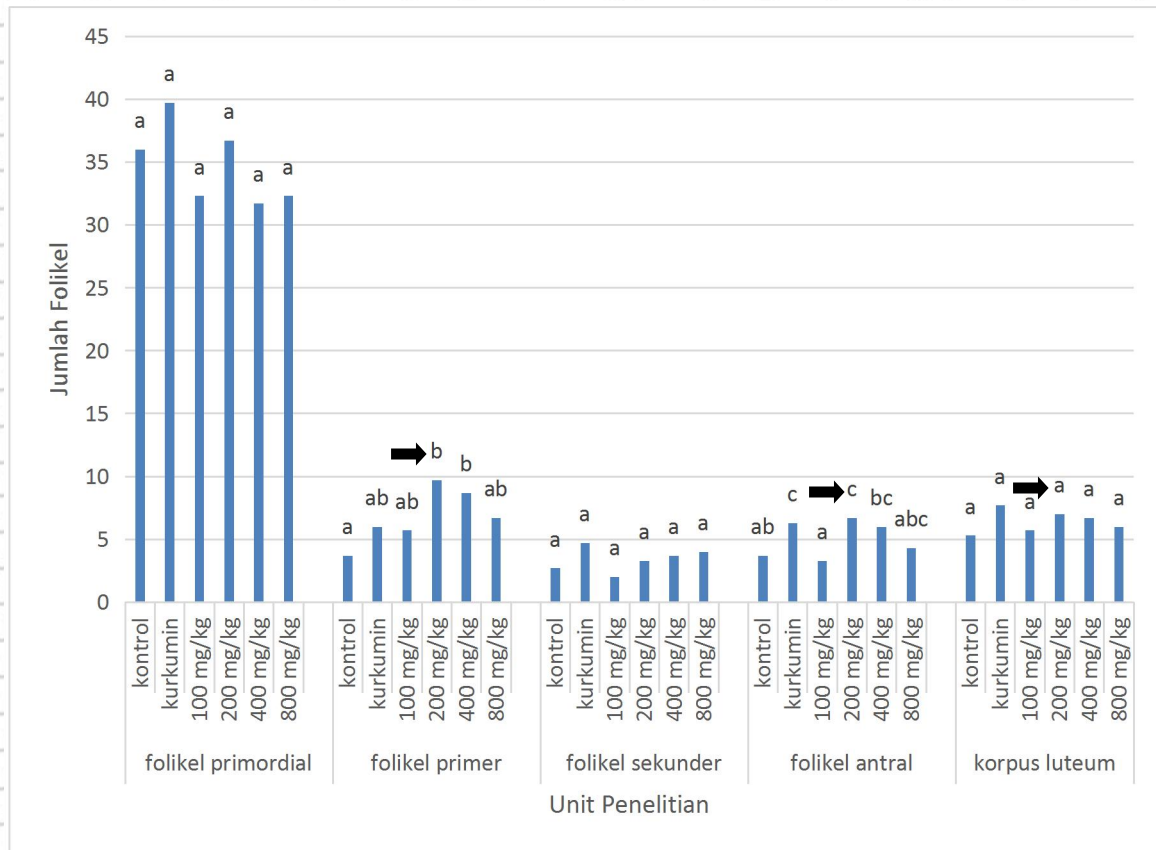


Gambar 25. Histogram distribusi *MDA*, *Nrf2*, enzim *GST* dan *PCNA* pada sel granulosa ovarium tikus putih premenopause setelah perlakuan serbuk rimpang kunyit dengan dosis yang berbeda. Notasi huruf kecil yang berbeda menunjukkan berbeda signifikan pada  $\alpha < 0,05\%$ . Tanda panah (➔) menunjukkan perlakuan dosis serbuk rimpang kunyit dengan kecenderungan paling optimal.

Pemberian serbuk rimpang kunyit dosis 200 mg/kg BB adalah dosis optimal, karena nilai parameter yang diamati selalu lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif, walaupun tidak selalu merupakan hasil tertinggi bila dibandingkan dengan perlakuan dosis serbuk rimpang kunyit yang lain. Serbuk rimpang kunyit dosis 200 mg/kg BB menurunkan secara signifikan kadar *MDA* ovarium tikus putih premenopause sebesar 40,24 %, menurunkan secara signifikan distribusi *MDA* sebesar 41,42 %, meningkatkan distribusi *Nrf2* sebesar 2,74 %, dan meningkatkan secara signifikan distribusi enzim *GST* tertinggi sebesar 48,54 %. Dosis 200 mg/kg BB juga meningkatkan secara signifikan kadar hormon estradiol sebesar 3,53 kali dibandingkan dengan kontrol negatif.

Pemberian serbuk rimpang kunyit dosis 200 mg/kg BB pada tikus putih premenopause juga optimal meningkatkan proliferasi sel granulosa ovarium yaitu sebesar 6,65 %. Dosis 200 mg/kg BB juga meningkatkan secara signifikan jumlah folikel primer tertinggi sebesar 2,62 kali, meningkatkan jumlah folikel sekunder sebesar 22,59 %, meningkatkan secara signifikan jumlah folikel antral tertinggi sebesar 81,08 %, serta

meningkatkan jumlah korpus luteum tertinggi sebesar 32,26 % dibandingkan dengan kontrol negatif (Gambar 26).



Gambar 26. Histogram jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder, folikel antral, dan korpus luteum pada ovarium tikus putih premenopause setelah perlakuan serbuk rimpang kunyit dengan dosis yang berbeda. Notasi huruf kecil yang berbeda menunjukkan berbeda signifikan pada  $\alpha < 0,05\%$ . Tanda panah (➔) menunjukkan perlakuan dosis serbuk rimpang kunyit dengan kecenderungan paling optimal.

## BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

1. Senyawa - senyawa pada serbuk rimpang kunyit yang berpotensi sebagai antioksidan berdasarkan analisis *in silico* adalah *ascorbic acid*, *quercetin*,  $\beta$  *carotene*, *arabinose*, *bis demethoxycurcumin*, *demethoxycurcumin*, *curcumin*, *caffeic acid*, *cinnamic acid*, *letestuanin A*, dan *calebin A*.
2. Senyawa kurkumin berpotensi sebagai inhibitor ikatan antara *Nrf2* dan *Keap1* berdasarkan analisis *in silico*.
3. Serbuk rimpang kunyit dosis 200 mg/kg BB adalah dosis optimal, yaitu dapat menurunkan kadar *MDA* secara signifikan sebesar 40,24 %, menurunkan distribusi *MDA* secara signifikan sebesar 41,42 %, meningkatkan distribusi *Nrf2* sebesar 2,74 %, meningkatkan distribusi enzim *GST* tertinggi secara signifikan sebesar 48,54 %, dan meningkatkan kadar hormon estradiol secara signifikan sebesar 3,53 kali dibandingkan dengan kontrol negatif.
4. Serbuk rimpang kunyit dosis 200 mg/kg BB juga optimal meningkatkan proliferasi sel granulosa ovarium yaitu sebesar 6,65 % dan meningkatkan secara signifikan jumlah folikel primer tertinggi sebesar 2,62 kali, meningkatkan jumlah folikel sekunder sebesar 22,59 %, meningkatkan secara signifikan jumlah folikel antral tertinggi sebesar 81,08 %, serta meningkatkan jumlah korpus luteum tertinggi sebesar 32,26 % dibandingkan dengan kontrol negatif.

### 5.2 Saran

1. Serbuk rimpang kunyit dosis 200 mg/kg BB direkomendasikan sebagai bahan terapi oral untuk memperbaiki kondisi aging ovarium pada wanita yang memasuki masa premenopause.
2. Senyawa - senyawa yang terkandung dalam serbuk rimpang kunyit selain kurkumin, yang berpotensi sebagai antioksidan perlu dipelajari dan dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui atau memprediksi mekanisme kerja senyawa - senyawa tersebut dalam tubuh sebagai antioksidan.



## DAFTAR PUSTAKA

- Aerts, J.M.J. & P.E.J. Bols. 2010. Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects. *Reproduction domestic animal*. 45:180-187.
- Agarwal, A., A. Aponte-Mellado, B.J. Premkumar, A. Shaman, & S. Gupta. 2012. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 10:1-49.
- Aggarwal, B.B., C. Sundaran, N. Malani, & H. Ichikawa. 2006. Curcumin: The Indian Solid Gold. *SVNY*. 332:16-34.
- Amicarelli F., S. Colafarina, F. Cattani, A. Cimini, C. Di Ilio C., & M.P. Ceru. 2003. Scavenging system efficiency is crucial for cell resistance to ROS-mediated methylglyoxal injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 35:856-871.
- Amstrong, D. G. 1984. Ovarian Aromatase Activity in The Domestic Fowl (*Gallus domesticus*). *Journal of Endocrinology*. 100:81-86
- Asghari, G., A. Mostajeran, & M. Shebli. 2008. Curcuminoid and Essential Oil component of turmeric at different stages of growth cultivated in Iran. *Research Pharmaceutical Science*. 4(1):55-61.
- Atef, M., M. Attia, F.A. A. Ibrahim, N.A. Abd EL-Latif , & S.W. Aziz . 2015. Antioxidant effects of curcumin against cadmium chloride-induced oxidative stress in the blood of rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 6(3):33-40.
- Barzegar, A. M., & A. A. Movahedi. 2011. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. *Plos ONE* 6(10) e26012. DOI:10.1371/journal.pone.0026012
- Baziad, A. 2003. **Menopause dan Andropouse**. Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawihardjo. Jakarta. Hal. 25-41.
- Benchabane, Y., Di Giorgio C., Boyer G., et al. 2009. Photo-inducible cytotoxic and clastogenic activities of 3,6-di-substituted acridines obtained by acylation of proflavin. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 44: 2459-2467.
- Bley, M.A., P.E. Saragueta, J. L. Baranao. 1997. Concerted stimulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis by sex steroids and follicle-stimulating hormone. *The Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology*. 62:11-19.
- Boenisch, T. 2001. **Immunohistochemical Handbook; Antibodies**. 3rd edition. DAKO Corporation. California.
- Broekmans, F.J., M.R. Soules, & B.C. Fauser. 2009. Ovarian Aging: Mechanisms and Clinical Consequences. *Endocrine Reviews*. 30(5):465-493.
- Bruns, D.R., J.C. Drake, & L.M. Biela. 2015. *Nrf2* signaling and the slowed aging phenotype: evidence from long-lived models. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-15
- Burg, D., J. Riepsaame, C. Pont, G. Mulder, & B. van de Water. 2006. Peptide-bond modified Glutathione conjugate analogs modulate *GST* Function in GSH-conjugation, Drug sensitivity and JNK signaling. *Biochemistry and Pharmacology*. 71:268-277.
- Campbell, B.K. 2009. The Endocrine and local of ovarian follicle development in the ewe. *Animal Reproduction*. 6(1):159-171

- Chattopadhyay, I., K. Biswas, U. Bandyopadhyay, & R. K. Banerjee. 2004. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Current Science*. 87:44-50.
- Cho, H.Y., S.P. Reddy, A. Debiase, M. Yamamoto, & S.R. Kleeberger. 2005. Gene Expression profiling of *Nrf2*-mediated protection against oxidative injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 38:325-343
- Crowther, J. R., 2001. **The ELISA Guidebook**. Humana Press. Totowa. New Jersey.
- Cullinan, S.B., J.D. Gordon, J. Jin, J.W. Harper, J.A. Diehl. 2004. The *Keap1*-BTB protein is an adaptor that bridges *Nrf2* to Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-*Keap1* ligase. *Molecular and Cellular Biology*. 24:8477-8486.
- Dallakyan, S., & A.J. Olson. 2015. Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. *Methods Molecular Biology*. 263:243-50
- Dalton, T.P., H.G. Shertzer, & A. Puga. 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology Toxicology*. 39:67-101.
- D'Archivio, M., C. Filesi, R. Vari, B. Sczacchio, & R. Masella. 2010. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Science*. 11:1321-1342.
- Darwadi, R. P., Aulanni'am, & C. Mahdi. 2013. Pengaruh Terapi Kurkumin terhadap Kadar *Malondialdehid (MDA)* Hasil Isolasi Parotis dan Profil Protein Tikus Putih yang Terpapar Lipopolisakarida (LPS). *Kimia Student Jurnal*. 1(1);133-139. Universitas Brawijaya Malang.
- Das, S., R. Chattopadhyay, S. Ghosh, S.K. Goswami, B.N. Chakravarty, & K. Chaudhury. 2006. Reactive oxygen species level in follicular fluid-embryo quality marker in IVF. *Human Reproduction*. 21:2403-2407.
- de Bruin, J.P., H. Bovenhuis, P.A. van Noord, P.L. Pearson, J.A. van Arendonk, E.R. te Velde, W.W. Kuurman, & M. Dorland. 2001. The role of genetic factors in age at natural menopause. *Human Reproduction*. 16:2014-2018.
- DiMattina M, B. Albertson, D.E. Seyler, D.L. Loriaux, & R.J. Falk. 1986. Effect of the antiprogestin RU486 on progesterone production by cultured human granulosa cells: inhibition of the ovarian 3 $\beta$ hydroxysteroid dehydrogenase. *Contraception*. 34:199-208.
- Doshi, S.B., & A. Agarwal. 2014. The role of oxidative stress in menopause. *Journal of Mid-life Health*. 4(3):140-147.
- Drummond, A.E. 2006. The role of steroids in follicular growth, Review. *Reproduction Biology and Endocrinology*. 4(16):1-11.
- Duvoix, A., R. Blasius, S. Delhalle, M. Schnekenburger, F. Morceau, E. Henry, M. Dicato, & M. Diederich. 2005. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Letters*. 223:181-190.
- Ekins, S., J. Mestres & B. Testa. 2007. *In silico* pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond, Brit. *Journal of Pharmacology*. 152(1):21-37.
- Erickson, G.F. 2004. **Gynecology and obstetrics**, vol 5 chapter 12 : **Follicle growth and development**. Lipincott Williams and Wilkins. California.
- Farnsworth, N.R. 1966. Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 55(3):225-276.
- Favier, A. E. 1995. **Analysis of Free Radicals in Biological Systems**. Birkhauser Voulagh Basel P. 102. Switzerland.

- Findlay, V.J., D.M., Townsend, & K.D., Tew. 2006. **Cancer Drug Discovery and Development: Cancer Drug Resistance. Chapter 12: Glutathione and Glutathione S-Transferase in Drug Resistance.** Edited by B.A., Teicher. Humana Press Inc. Totowa. New Jersey.
- Finkel, T., & N.J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408:239–247.
- Fleming, J. 1982. Mitochondrial Mutations and Aging : A new version of the Free radical theory of aging. *Gerontology*. 28:44-53.
- Fortune, J.E. & S.E. Vincent. 1983. Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells *in vitro*. *Biology Reproduction*. 28:1078-1089.
- Fortune, J.E. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 78:135-163.
- Frandsen, R.D. 1992. **Anatomy and physiology of farm animals.** 4th edition. Terjemahan B. Srigandono & K. Praseno. Gadjah mada University Press. 680-697.
- Gantait, A., T. Barman, & P.K. Mukherjee. 2011. Validated method for Estimation of curcumin in turmeric powder. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. 10(2):247-250.
- Gervásio, C.G., M.P. Bernuci, M.F. Silva-de-Sá, & A.C. Japur de Sá Rosa-e-Silva. 2014. The Role of Androgen Hormones in Early Follicular Development, Review article. *ISRN obstetry and gynecology*. Hindawi Publishing Corporation. Vol. 2014:1-11.
- Gleicher, N., A. Weghofer, & D.H. Barad. 2011. Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging. *Reproduction Biology and Endocrinology*. 9(23):1-11.
- Goldin, A., J.A. Beckman, A.M. Schmidt, & M.A. Creager. 2006. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 114:597-605.
- Goff, A.K., P.C.K. Leung, & D.T. Armstrong. 1979. Stimulatory action of follicle-stimulating hormone and androgen on the responsiveness of rat granulosa cells to gonadotrophin *in vitro*. *Endocrinology*. 104:1124-1129.
- Gougeon, A. 2003. **The Ovary, chapter 2 ; Dynamics for human growth: morphologic, dynamic, and functional aspects.** Elsevier. 25-43.
- Gougeon, A, R. Ecochard, & J.C. Thalabard. 1994. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: Increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biology Reproduction*. 50:653–663.
- Hafez, E.S.E. 2000. **Reproduction in farm animals.** 7th edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. 68-81.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 2015. **Free Radical in Biology Medicine 5th Edition (preview).** Oxford University Press. Oxford. United Kingdom.
- Halpin, D.M., H.M. Charlton, & M.J. Faddy. 1986. Effects of gonadotrophin deficiency on follicular development in hypogonadal (hpg) mice. *Journal of Reproduction and Fertility*. 78:119-125.
- Hamaguchi, T., K. Ono, & M. Yamada. 2010. Review: curcumin and Alzheimer's disease. CNS. *Neuroscience Therapeutic*. 16:285-297.
- Hamatani, T., G. Falco, M.G. Carter, H. Akutsu, C.A. Stagg, A.A. Sharov, D.B. Dudekula, V. VanBuren, & M.S.H. Ko. 2004. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Human Molecular Genetic*. 13:2263-2278.
- Hamet, P., & J. Tremblay. 2003. Genes of aging. *Metabolism*. 52:5-9.

- Hansen, K.R., N.S. Knowlton, A.C. Thyer, J.S. Charleston, M.R. Soules, & N.A. Klein. 2008. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Human Reproduction*. 23:699-708.
- Hatcher, H., R. Planalp, J. Cho, F.M. Tortia, & S.V. Torti. 2008. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Science*. 65:1631-1652.
- Homma, S., Y. Ishii, Y. Morishima, T. Yamadori, & Y. Matsuno. 2009. Nrf2 Enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 15(10):3423-3434.
- Hutt, K.J., E.A. McLaughlin, & M.K. Holland. 2006. Primordial follicle activation and follicular development in the juvenile rabbit ovary. *Cell Tissue Research*. 326:809-822.
- Hutt, K.J. & D.F. Albertini. 2007. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reproductive BioMedicine Online*. 14(6):758-764.
- Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J.D. Engel, & M. Yamamoto. 1999. *Keap1* represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by *Nrf2* through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes and Development*. 13:76-86.
- Jayaprakasha, G. K., L.J.M. Rao, & K.K. Sakariah. 2006. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chemical*. 98:720-724.
- Jockers, D. 2016. *Nrf2*: The anti-oxidant amplifier. <http://drjockers.com/nrf2-the-anti-oxidant-amplifier/>. Accessed on May 31<sup>st</sup>.
- Jones, S., B., & A.E. Luchsinger. 1987. **Plant Systematics. Biology Sciences series.** McGraw-Hill Book Company Second Edition. New York. 491.
- Junquera, L.C. & J. Carneiro. 2005. **Basic Histology-Text and Atlas.** 11<sup>th</sup>ed. USA : The McGraw - Hill Companies, Inc.
- Jurenka J. S. 2009. Anti-Inflammatory properties of Curcumin, a Major Constituent of *Curcuma longa*: A Review of Preclinical and Clinical Research. *Alternative Medicine review*. 14(2):141-153.
- Kezele, P. & M.K., Skinner. 2003. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by oestrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology*. 144:3329-3337.
- Kim, J.H., S.H. Park, S.W. Nam, H.J. Kwon, & B.W. Kim. 2011. Curcumin stimulates proliferation, stemness acting signals and migration of 3T3-L1 preadipocytes. *International Journal of Molecular Medicine*. 28:429-435.
- Kim, S.J., T.G. Son, H.R. Park, M. Park, & M.S. Kim. 2008. Curcumin stimulates proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus. *The Journal of Biochemistry*. 283(21):14497-14505.
- Kinugawa, C., T. Murakami, & K. Okamura. 2000. Telomerase activity in normal ovaries and premature ovarian failure. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 190:231-238.
- Kitani, K., T. Osawa, & T. Yokozawa. 2007. The effects of tetrahydrocurcumin and green tea polyphenol on the survival of male C57BL/6 mice. *Biogerontology*. 8:567-573.

- Kohli, K., J. Ali, M.J. Antasari, & Z. Raheman. 2005. Curcumin a Natural antiinflammatory agent. Educational Forum. *Indian Journal of Pharmacology*. 37(3):141-143.
- Kumar, T.R., Y. Wang, N. Lu, & M.M. Matzuk. 1997. Follicle Stimulating Hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics*. 15(2):201-204.
- Kunwar, A. & K.I. Priyadarsini. 2011. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical and Allied Sciences*, 1(2):53-60.
- Kusmana, D., R. Lestari, Setiorini, A.N. Dewi, P.R. Ratri, & R.R.R. Soraya. 2007. Efek Estrogenik Ekstrak Etanol 70% Kunyit (*Curcuma domestica* VAL.) terhadap Mencit (*Mus musculus* L.) Betina yang Diovariectomi. *Makara Sains*. 11(2): 90-97
- Lee, K.S., B.S. Lee, S. Semnani, A. Avanesia, & C.Y. Um. 2010. Curcumin extends life span, improves health span, and modulates the expression of age-associated aging genes in *Drosophila melanogaster*. *Rejuvenation Research*. 13:561-570.
- Li, Q., X.D. Geng, W. Zheng, J. Tang, B. Xu, & Q.H. Shi. 2012. Current understanding of ovarian aging. *Scie. Chi*. 55 (8):659-669.
- Li, S., W. Yuan, G. Deng, P. Wang, P. Yang, & B.B. Aggarwal. 2011. Chemical composition and product quality control of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Pharmaceutical Crops*. 2:28-54.
- Li, W., J.T. Feng, Y.S. Xiao, Y.Q. Wang, X.Y. Xue, & X.M. Liang. 2009. Three novel terpenoids from the rhizomes of *Curcuma longa*. *Journal of Asian Nature Product Research*. 11(6):569-575.
- Lierman, S., P. De Sutter, J. Liu, J. Gerris, M. Dhont, & J. Van der Elst. 2007. Co-culture of pre-antral ovarian follicles does not increase the yield of in-vitro-matured oocytes in the mouse. *Reproductive BioMedicine Online*. 14(4):436-443.
- Lindeberg, M. 2008. **Molecular and morphological studies of folliculogenesis, oocyte maturation and embryogenesis in humans**. thesis for doctoral degree (Ph.D.). Karolinska Institutet. Stockholm. Sweden.
- Lobo, R.A. 2003. Early ovarian ageing: a hypothesis, what is early ovarian ageing?. *Human Reproduction*. 18(9):1762-1764.
- Lokhande, S.M., R.V. Kale, A.K. Sahoo, & R.C. Ranveer. 2013. Effect of curing and drying methods on recovery, curcumin and essential oil content of different cultivars of turmeric (*Curcuma longa* L.). *International Food Research Journal*. 20(2):745-749.
- Macklon, N.S. & B.C.J.M. Fauser. 1999. Aspects of ovarian follicle development throughout life. *Hormone Research*. 52:161-170.
- Matos L., D. Stevenson, F. Gomes, J.L. Silva-Carvalho, & H. Almeida. 2009. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. *Molecular Human Reproduction*. 15:411-419.
- Matzuk, M.M. & D.J. Lamb. 2008. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine*. 14(11):1197-1213.
- Mazur W. & H. Adlercreutz. 1998. Naturally occurring estrogen in food. *Pure and Applied Chemistry*. 70:1759-1776.
- McCaleb, R., E. Leigh, & K. Morien. 2000. **Turmeric, *Curcuma longa*, Zingiberaceae**. In: **The Encyclopedia of Popular Herbs**. CA: Prima Publishing. 374-381.

- McGee, E.A. & A.J. Hsueh. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Society*. 21(2):200-214.
- McNatty, K.P., K. Reader, P. Smith, D.A. Heath, & J.L. Juengel. 2007. Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase: a 2006 perspective. *Social Reproductive Fertility*. 64:55-68.
- Medvedev, Z.A. 1990. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biology Review*. 65:375-398.
- Meiyanto, E., 1999. Kurkumin sebagai antikanker : menelusuri mekanisme aksi. *Majalah Farmasi Indonesia*. 10(4):224-236.
- Meizarini, A., Siswandono, W. Riawan, R.P. Rahayu. 2018. *In Silico* and *In Vivo* anti-inflammatory studies of curcuminoids, turmeric extract with zinc oxide, and eugenol. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 17(2):269-275.
- Menon, V.P., & A.R. Sudheer. 2007. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol*. 595: 105-125. Miquel, J., A. Bernd, J.M. Sempere, & R.A. Diaz-Alperi. 2002. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects future clinical use: a review. *Gerontology Geriatric*. 34:37-46.
- Miquel, J, A.C. Economos, J. Fleming, & J.E. Johnson, Jr. 1980. Mitochondrial role in cell aging. *Experimental Gerontology*. 15:575-591.
- Motohashi, H. & M. Yamamoto. 2004. *Nrf2-Keap1* defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Molecular Medicine*. 10: 549-57.
- Nurrochmad, A. 2004. Review: Pandangan baru kurkumin dan aktivitasnya sebagai antikanker. *Biofarmaka*. 2(2):75-80.
- Orisaka, M., K. Tajima, B.K. Tsang, & F. Kotzuki, 2009, Oocyte-granulosa-theca cell interaction during preantral follicular development, *Journal of Ovarian Research*, 2(9):1-7.
- Paladino, S. A. Conte, R. Caggiano, G.M. Pierantoni, & R. Faraonio. 2018. Nrf2 pathway in age-related neurological disorder: insights into microRNAs. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 47:1951-1976
- Paramashivam S.K., K. Elayaperumal, B.B. Natarajan *et al.* 2015. *In silico* pharmacokinetic and molecular docking studies of small molecules derived from *Indigofera aspalathoides* Vahl targeting receptor tyrosine kinases. *Bioinformation*. 11(2): 73-84.
- Park, S.K., & T.A. Prolla. 2005. Gene expression profiling studies of aging in cardiac and skeletal muscles. *Cardiovascular Research*. 66:205-212.
- Perry, G.N., & N.F. Santoro. 2006. Aging in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis ; Knobil and Neill's. *Physiology of Reproduction*. Elsevier. 1(3):2729-2745.
- Picton, H, & A. McNeilly. 1991. Effect of basal and pulsatile LH release on FSH-stimulated follicle growth in ewes chronically treated with gonadotrophin releasing hormone agonist. *Journal Endocrinology*, 128:449-456.
- Piotrowska, H., B. Kempisty, P. Sosinska, S. Ciesiolka, D. Bukowska, P. Antosik, M. Rybska, K.P. Brussow, M. Nowicki, & M. Zabel. 2013. The role of TGF superfamily gene expression in the regulation of folliculogenesis and oogenesis in mammals: a review. *Veterinarni Medicina*. 58(10):505-515.
- Prakoso, N.I., L. Hakim, & N. Hidayati. 2017. Molecular modeling of an analog compounds Pentagamavumon (PGV-1) through computational chemistry method. *Indonesian Journal of Chemical Research*. 2(1-2):28-40.

- Prasad, S., K.T., Amit, & B.B., Aggarwal. 2014. Recent development in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer Research Treatment*. 46(1):2-18.
- Prasad, S., M. Tiwari, A.N. Pandey, T.G. Shrivastav, & S.K. Chaube. 2016. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. *Journal of Biomedical Science*. 23(11):36-43.
- Purwaningsih, E., S. K. Soejono, D. Dasuki, & E. Meiyanto. 2013. Sasaran Aksi Pentagamavunon-0 pada Steroidogenesis Sel Luteal Melalui Pengukuran Fosforilasi Extracellular Signal Regulated Kinase. *Journal Indonesia Medicine Associates*. 63(2):52-57.
- Rattan, S.I.S. 2006. Theories of biological aging: Genes, proteins, and free radicals. *Journal Free Radicals Research*. 40(12):1230-1238.
- Ravindran, P.N., K.N. Babu, & K. Sivaraman. 2007. **Turmeric. The Genus Curcuma**. CRC press. London.
- Reyes, S.G., S.G. Beltrán., O.N. Campos, & J.P. Chaverri. 2013. Curcumin Pretreatment Induces *Nrf2* and an Antioxidant Response and Prevents Hemin-Induced Toxicity in Primary Cultures of Cerebellar Granule Neurons of Rats. Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/801418>.
- Richards, J.S. 2001. Perspective: the ovarian follicle - a perspective in 2001. *Endocrinology*. 142:2184-2193.
- Richards, J.S., J.A. Jonassen, A.I. Rolfes, K. Kersey, & L.E. Reichert Jr. 1979. Adenosine 3', 5'-monophosphate, LH receptor and progesterone during granulosa cell differentiation: effects of oestradiol and FSH. *Endocrinology*. 104:765-773.
- Richards, J.S. & A.I. Rolfes. 1980. Hormonal regulation of cyclic AMP binding to specific receptor proteins in rat ovarian follicles. *Journal Biological Chemistry*. 225:5481-5489.
- Roche, J.F. 1996. Control and regulation of folliculogenesis – a symposium in perspective. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1:19-27.
- Ruiz de Galarreta, C.M., L.F. Fanjul, & A.J. Hsueh. 1985. Progesterin regulation of progesterone biosynthetic enzymes in cultured rat granulosa cells. *Ster*. 46:987-1002.
- Saljoughian, M. 2007. Focus on Phytoestrogen. *Oncology*. 32(12):27-32.
- Salminen A, J. Huuskonen, J. Ojala, A. Kauppinen, K. Kaarniranta, & T. Suuronen. 2008. Activation of innate immunity system during aging: NF- $\kappa$ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Research Reviews*. 7:83-105.
- Sandur, S.K., M.K. Pandey, B. Sung, K.S. Ahn, A. Murakami, G. Sethi, P. Limtrakul, V. Badmaev, & B.B. Aggarwal. 2007. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and antiproliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogene*. 28:1765-1773.
- Sathyapalan, T., L.W. Cho, E.S. Kilpatrick, C.W. Le Roux, A.M. Coady, & S.L. Atkin. 2009. BMP15 and premature ovarian failure: causal mutations, variants, polymorphisms?. *Clinical Endocrinology*. 72:422-426.
- Savcun, G.Y., E. Ozkan, E. Dulundu, U. Topaloglu *et al*. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory effect of curcumin against hepatorenal oxidative injury in an

- experimental sepsis model in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg Turkish Journal*. 19(6):507-515.
- Schemedes, A. V and G. Helmer. 1989. a new thiobarbituric acid (TBA) method for determining free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxydes selectively as a measure of lipid peroxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. DOI: 10.1007/BF02653674
- Schmitt, A., J. Nöller, & J. Schmitt. 2007. The binding of advanced glycation end products to cell surfaces can be measured using bead-reconstituted cellular membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1768:1389-1399.
- Schulz, O. 2008. **The Biological Activity of Curcumin**. Wellness foods Europe. 10-13.
- Setyaningsih D., Y.B. Murti, S. Martono, W.L.J. Hinrichs, T. Hertiani, & A. Fudholi. 2016. A novel reversed phase high performance liquid chromatography method to accurately determine low curcumin in rat plasma. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical*. 8(5):377-386.
- Sharov, A.A., G. Falco, Y. Piao, S. Poosala, K.G. Becker, A.B. Zonderman, D.L. Longo, D. Schlessinger, & M.S.H. Ko. 2008. Effects of aging and calorie restriction on the global gene expression profiles of mouse testis and ovary. *BMC Biology*. 6(24):1-16.
- Shehzad, A., & Y.S. Lee. 2010. Curcumin : Multiple molecular targets mediate multiple pharmacological actions : A review. *Drugs of the Future*. 35:113-120.
- Shen, L. R., F. Xiao, P. Yuang, Y. Chen, & Q. K. Gao. 2012. Curcumin-supplemented diets increase superoxide dismutase activity and mean lifespan in Drosophila. *Age*. DOI : 10.1007/s11357-012-9438-2. Published online in Wiley Online Library, wileyonlinelibrary.com.
- Shen, L. R., L. D. Parnell, J. M. Ordovas, & C. Q. Lai. 2012. Curcumin and aging, review article. DOI: 10.1002/biof.1086. Published online in Wiley Online Library, wileyonlinelibrary.com.
- Sikora, E., G. Scapagnini, & M. Barbagallo. 2010 Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases. *Immunity Ageing*. 7:1-4.
- Simanjuntak, P. 2011. Studi kimia dan farmakologi tanaman kunyit (*Curcuma longa* L.) sebagai tumbuhan obat serbaguna. *Jurnal Kimia. Mulawarman*. 9(1):1-5.
- Singh, G., I.P.S. Kapoor, P. Singh, C.S. de Heluani, M.P. de Lampasona, & C.A.N. Catalan. 2010. Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). *Food and Chemical Toxicology*. 48:1026-1031.
- Somchit, M.N., A. Zuraini, A. Bustaman, M.R. Sulaiman, R. Nurantulina. 2005. Protective Activity of Turmeric (*Curcuma longa*) in Paracetamol Induced-Hepatotoxicity in Rat. *International Journal of Pharmacology*. 1(3):252-256
- Subrat, P., S.A. Santa, & J. Vandana. 2013. The Concepts and Consequences of Early Ovarian Ageing: A Caveat to Women's Health. *Journal of Reproduction and Infertility*. 14(1):3-7.
- Suckow, B. K., & M. A. Suckow. 2006. Lifespan extension by the antioxidant curcumin in *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Biomedicine*. Sci. 2:401-404.
- Sullivan, R.P., G. Mortimer, I.O. Muirheartaigh. 1993. Cell proliferation in breast tumor; analysis of histological parameters Ki67 and PCNA expression. *Journal of Medical Science*. 162(9):343-347.



- Suntoro, H. 1983. **Metode Pewarnaan (Histologi dan Histokimia)**. Penerbit Bharata Karya Aksara. Jakarta.
- Suzuki, T. & M. Yamamoto. 2015. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radical Biology and Medicine*. 88(part B):93-100.
- Tajima, K., M. Orisaka, T. Mori, & F. Kotsuji. 2007. Ovarian theca cells in follicular function. *Reproductive BioMedicine Online*. 15(5):591-609.
- Tarin, J.J. 1995. Aetiology of age-associated aneuploidy: a mechanism based on the free radical theory of ageing. *Human Reproduction*. 10:1563–1565.
- Tatone, C., F. Amicarelli, M.C. Carbone, P. Monteleone, D. Caserta, R. Marci, P.G. Artini, P. Piomboni, & R. Focarelli. 2008. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Human Reproduction*. 14:131-142.
- Tatone, C., & F. Amicarelli. 2013. The aging ovary—the poor granulosa cell. *Fertility and Sterility*. 99(1):12-17.
- te Velde, E.R., & P.L. Pearson. 2002. The variability of female reproductive ageing. *Human Reproduction*. 8:141-154.
- Tew, K.D. 1994. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Research*. 54:4313-4320.
- Thakur, S., B. Bawara, A. Dubey, D. Nandini, N.S. Chauhan, and D.K. saraf. 2009. Effect of *Carum carvi* and *Curcuma longa* on Hormonal and Reproductive Parameter of female Rats. *International Journal of Phytomedicine*. 1(2009)31-38
- Thornalley, P.J. 2008. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems—role in ageing and disease. *Drug Metabolism and Drug Interaction*. 23:125-150.
- Toden, S & A. Goel. 2017. The holy grail of curcumin and its efficacy in various diseases: is bioavailability truly a big concern?. *Journal of Restorative Medicine*. 6:27-36.
- Townsend, D.M., & K.D., Tew. 2003. The role of glutathione S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 22:7369-7375.
- Trifunovic, A., A. Wredenberg, & M. Falkenberg. 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*. 429: 417-423.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, & J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cellular Biology*. 39(1):44-84.
- Velasquez J.T., M.E. Watts, M. Todorovic, & L. Nazareth. 2014. Low-dose curcumin stimulates proliferation, migration and phagocytic activity of olfactory ensheathing cells. *Plos One* 9(10):1-17.
- Venugopal, P.M., and R.S. Adluri. 2007. Antioxydant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 595:105-125.
- Wahyuni, A. Hardjono, & P.H. Yamrewav. 2004. Ekstraksi Kurkumin dari Kunyit. *Prosiding Seminar Nasional Rekayasa Kimia dan Proses*. ISSN:1411-4216.
- Wei, Y.H., & H.C. Lee. 2002. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Experimental Biology and Medicine*. 227:671-682.
- Wilkens, R., M.S. Veena, M.B. Wang, & E.S. Srivatsan. 2011. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*. 10:12-19.

- Wolber, G., & T. Langer. 2005. *LigandScout*: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 45(1):160-169. DOI: 10.1021/ci049885e.
- Wratsangka, R. 1999. Pemberian terapi sulih hormon sebagai upaya meningkatkan kesehatan wanita menopause. *Jurnal Kedokteran Trisakti*. 18(3):155-162.
- Wright, V.C., J. Chang, G. Jeng, & M. Macaluso. 2006. Assisted reproductive technology surveillance—United States, 2003. *MMWR Surveill Summ*. 55:1–22.
- Yang, K.Y., L.C. Lin, T.Y. Tseng, S.C. Wang, & T.H. Tsay. 2007. Oral Bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 853(1-2):183-189.
- Yin, D., & K. Chen. 2005. The essential mechanisms of aging: Irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions. *Experimental Gerontology*. 40:455–465.
- Young, J.M., & A.S. McNeilly. 2010. Theca : the forgotten cell of the ovarian follicle. *Society for Reproduction and Fertility Online*. 140:489-504.
- Zhang, D.D. 2006. Mechanistic studies of the *nrf2-keap1* signaling pathway. *Drug Metabolism Reviews*. 38(4):769-789.
- Zhao, E. and Q. Mu. 2011. Phytoestrogen Biological Action on Mammalian Reproductive System and Cancer Growth. *Scientia Pharmaceutica*. 79(1):1-20.
- Zhuang, C., Z. Wu, C. Xing, & Z. Miao. 2017. Small molecules inhibiting Keap1-Nrf2 protein-protein interactions: a novel approach to activate Nrf2 function. *Medicinal Chemistry Communication*. 8:286-294.

Lampira 1. Hasil analisis LC-MS serbuk rimpang kunyit

Nomor puncak	Nama senyawa	Rumus kimia	Waktu retensi (menit)	Konsentrasi (%)	Nilai m/z
1	p Cymene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1,471	1,176	134.1096
2	α Terpinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1,476	1,790	136.1252
3	α Pinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1,477	0,791	136.1252
4	β Pinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1,479	0,999	136.1252
5	Sabinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1,483	1,099	136.1252
6	Limonene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1,488	1,705	136.1252
7	α Phellandrene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1,495	1,306	136.1252
8	Camphene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1,497	1,019	136.1252
9	Cinnamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	1,582	2,676	148.0524
10	Arabinose	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	1,602	2,313	150.0528
11	Linalool	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1,637	1,235	154.1358
12	α Terpineol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1,648	1,755	154.1358
13	Ascorbic acid	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	3,166	0,472	176.0321
14	Caffeic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	4,643	2,675	180.0423
15	Fructose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	4,647	1,578	180.0634
16	Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	4,709	2,214	180.0634
17	Heptan 3 one	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	5,039	1,190	194.1307
18	Curcumene	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	5,295	5,411	202.1722
19	β Caryophyllene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	5,494	2,350	204.1878
20	sesquiphellandrene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	5,501	2,072	204.1878
21	Ar Turmerone	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O	6,616	3,898	216.1514
22	α Turmerone	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	6,714	4,949	218.1671
23	Bisacumol	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	6,716	2,050	218.1671
24	Curlone	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	6,717	2,078	218.1671
25	α Atlantone	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	6,720	1,064	218.1671
26	Curzerenone	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	7,617	2,058	230.1307
27	Propanal	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	7,621	0,919	232.1463
28	Turmeronol B	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	7,624	2,504	232.1463
29	Dehydrocurdione	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	7,825	1,204	234.1620
30	Procurcumenol	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	7,828	2,804	234.1620
31	Isoprocurcumenol	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	7,831	1,600	234.1620
32	Germacone 4,5 epoxide	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	7,834	1,350	234.1620
33	Curcumenol	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	7,974	1,911	234.1620
34	Curcumenone	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	7,975	4,100	234.1620
35	Curdione	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	7,982	1,548	236.1776
36	Curcumol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	7,984	1,912	236.1776
37	2methyl 3cyclohexene 1,2diol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	7,991	1,078	238.1933
38	Procurcumadiol	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	7,995	1,434	250.1569
39	Zedoarondiol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	8,000	1,549	252.1725
40	Bisacurone	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	8,002	0,790	252.1725
41	Quercetine	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	11,427	2,155	302.0427
42	Bis Demethoxycurcumin	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	11,505	2,277	308.1049
43	Demethoxycurcumin	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	12,281	4,115	338.1154
44	Letestuiianin A	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	12,283	0,948	340.1311
45	Curcumin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	12,736	7,798	340.1311
46	Letestuiianin B	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	12,744	1,234	370.1416
47	Calebin A	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	13,261	1,508	384.1209
48	β Sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	17,163	2,230	414.3862
49	β Carotene	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	31,079	1,079	536.4382

Lampiran 2. Sertifikat Seminar Internasional



**CERTIFICATE**

This is certify that

**TEGUH SUPRIHATIN, S.Si., M.Si.**

Has participated at

**7<sup>th</sup> International Conference on Global Resource Conservation**

**(ICGRC ) 2016**

**"From Traditional Herbal Medicine into Synthetic Biology for Better Human Lives"**

As **ORAL PRESENTER**

November 2 – 4, 2016 at Atria Hotel Malang, East Java, Indonesia

**Rector of Universitas Brawijaya**

**Chairman of ICGRC 2016**

**Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS.**

**Prof. Mufaimin Rifa'i, PhD., Med. Sc.**

**Lampiran 3.** Potensi senyawa yang terkandung pada serbuk rimpang kunyit sebagai antioksidan berdasarkan nilai *Pa*

Nomor puncak	Nama senyawa	Rumus kimia	Nilai <i>Pa</i>
1	ρ Cymene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0,144
2	α Terpinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0,135
3	α Pinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-
4	β Pinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-
5	Sabinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-
6	Limonene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0,157
7	α Phellandrene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-
8	Camphene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-
9	Cinnamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	0,489
10	Arabinose	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	0,801
11	Linalool	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0,380
12	α Terpineol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	-
13	Ascorbic acid	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	0,951
14	Caffeic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	0,611
15	Fructose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-
16	Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-
17	Heptan 3 one	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	-
18	Curcumene	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	0,303
19	β Caryophyllene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,174
20	sesquiphellandrene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,213
21	Ar Turmerone	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O	0,274
22	α Turmerone	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	-
23	Bisacumol	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	0,248
24	Curlone	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	0,197
25	α Atlantone	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	-
26	Curzerenone	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	0,274
27	Propanal	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	-
28	Turmeronol B	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	0,383
29	Dehydrocurdione	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	-
30	Procurcumenol	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	0,147
31	Isoprocucumenol	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	-
32	Germacrone 4,5 epoxide	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	-
33	Curcumenol	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	-
34	Curcumenone	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	0,145
35	Curdione	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	-
36	Curcumol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	-
37	2methyl 3cyclohexene 1,2diol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	-
38	Procurcumadiol	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	-
39	Zedoarondiol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	0,133
40	Bisacurone	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	0,220
41	Quercetine	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	0,878
42	Bis Demethoxycurcumin	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	0,685
43	Demethoxycurcumin	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	0,654
44	Letestuienin A	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	0,483
45	Curcumin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	0,643
46	Letestuienin B	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	-
47	Calebin A	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	0,464
48	β Sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	0,177
49	β Carotene	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	0,823



Lampiran 4. Publikasi artikel 1

## Medicinal Plants

Vol. 9 (3), September 2017, 150-153

IndianJournals.com

doi : 10.5958/0975-6892.2017.00023.5

### Research Article

## Computational study of curcumin as antioxidant and potential inhibitor to abrogate *Keap1-Nrf2* interaction

Teguh Suprihatin<sup>1,2</sup>, Sri Widyarti<sup>3</sup>, Muhaimin Rifa'i<sup>3</sup> and Sri Rahayu<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Doctoral Student of Biology Department, Brawijaya University, Malang, Indonesia

<sup>2</sup>Department of Biology, Diponegoro University, Semarang, Indonesia

<sup>3</sup>Department of Biology, Brawijaya University, Malang, Indonesia

Received: June 10, 2017; Accepted: September 11, 2017

### ABSTRACT

*Nrf2* is a kind of transcription factor which is related to antioxidative enzyme synthesis and protecting cell from aging process. *Keap1* protein receptor, which acts as a suppressor specifically interacts with *Nrf2*. Abrogating the interaction between *Keap1* and *Nrf2* will activate *Nrf2* in the cytosol. One of the compound which is suggested as an inhibitor of *Keap1-Nrf2* interaction is curcumin. Therefore, this research aims to identify potency of curcumin as antioxidant and an inhibitor in the interaction of *Keap1-Nrf2* in order to activate *Nrf2*. The biological activity prediction of curcumin was analyzed by PASS online server. Then, *docking* process of curcumin to *Keap1* was carried out by *PyRx AutoDock Vina* to analyze the *binding affinity* and compared to *Keap1-IQK* as a control. Results showed that curcumin has a high ability as an antioxidant and free radical scavenger with Pa score 0.634, and 0.771, respectively. Furthermore, *docking* process pointed out that *IQK* had -10.7 Kcal/mol in *binding affinity* and it was higher than the *binding affinity* of curcumin about -8.4 Kcal/mol. However, it is suggested that curcumin has the high potential as antioxidant and inhibitor to release *Keap1-Nrf2* complex.

**Keywords:** Aging, antioxidant, curcumin, *Keap1*, *Nrf2*

### Introduction

Curcumin is an herbal compound which derived from *Curcuma longa* rhizome. It is not only antioxidant but also acts as an electrophilic compound which can trigger the *Nrf2/ARE* signaling pathway to activate the antioxidative enzyme (Sikora *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2013). Mice which treated diet with 0,2% tetrahydro curcumin at the age of 13 months had significantly longer average lifespan about 11,7% (Kitani *et al.*, 2007). In another research, curcumin also increasing the lifespan of *Drosophila* sp. (Shen *et al.*,

2013). Those appropriate to recently data which documenting the effect of curcumin in protecting against to diseases that related to aging and lifespan (Sikora *et al.*, 2010).

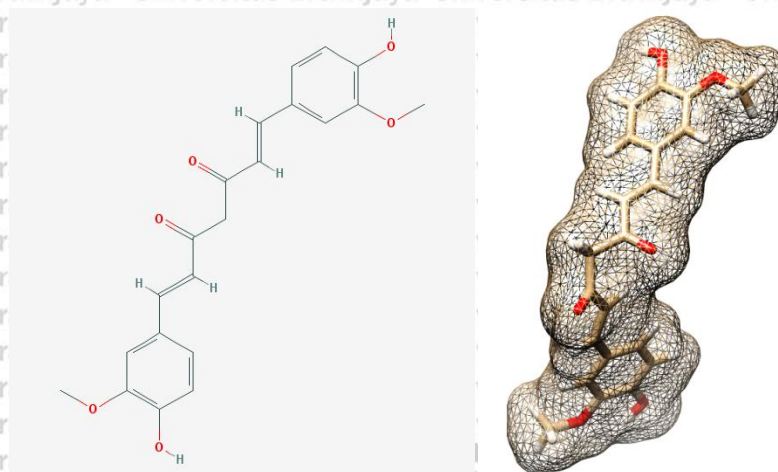
Curcumin induces antioxidant defense by modulating Nrf2. When, curcumin interact to *Keap1*, *Nrf2* release and translocated into the nucleus where it binds to an antioxidant responsive element in *DNA* to initiate gene expression of an antioxidant enzyme. That enzyme will reduces free radicals and protect the cell from *ROS* (Gonzalez-Reyes *et al.*, 2013).

Nowadays, the application of computational or *in silico* approach had widely applied for pharmacological studies. Such of methods had developed to discover novel molecules which potentially activating protein target (Ekins *et al.*, 2007). *Docking* process is one kind of analysis in order to found molecules with desired function (Dallakyan & Olson, 2015). Then, the potential of small molecules can be analyzed based on the biological activity prediction by PASS server. It indicated by  $P_a$  (probability activity) and  $P_i$  (probability inactivity) score which vary from 0 to 1. Then, only  $P_a > P_i$  which will be considered (Paramashivam *et al.*, 2015). Therefore, this study aims to investigate the potential of curcumin as an antioxidant to activate *Nrf2* by inhibiting *Keap1-Nrf2* interaction using *in silico* approach.

## Material and Methods

### Ligand Preparation

The 3D structure of Curcumin (CID: 969516) was retrieved from PubChem ([www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)) in SDF format (Figure 1). Furthermore, it was converted by Open Babel to PDB format for docking preparation.



**Figure 1.** Two and Three-dimensional structure of curcumin

### Biological activity analysis

Biological activity includes potential of antioxidant and free radical scavenger of curcumin were predicted by PASS server (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>). It indicated by Pa (Probability activity) score.

### Accession of target protein

The 3D structure of protein receptor *Keap1* (PDBID: 4IQK) which bind to *IQK* ligand was collected from Protein Data Bank (PDB) ([www.rcsb.org/pdb/home/home.do](http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)). It opened by *PyMol* to separate from the ligand and another water molecule. This optimization was essential for docking preparation (Figure 2).

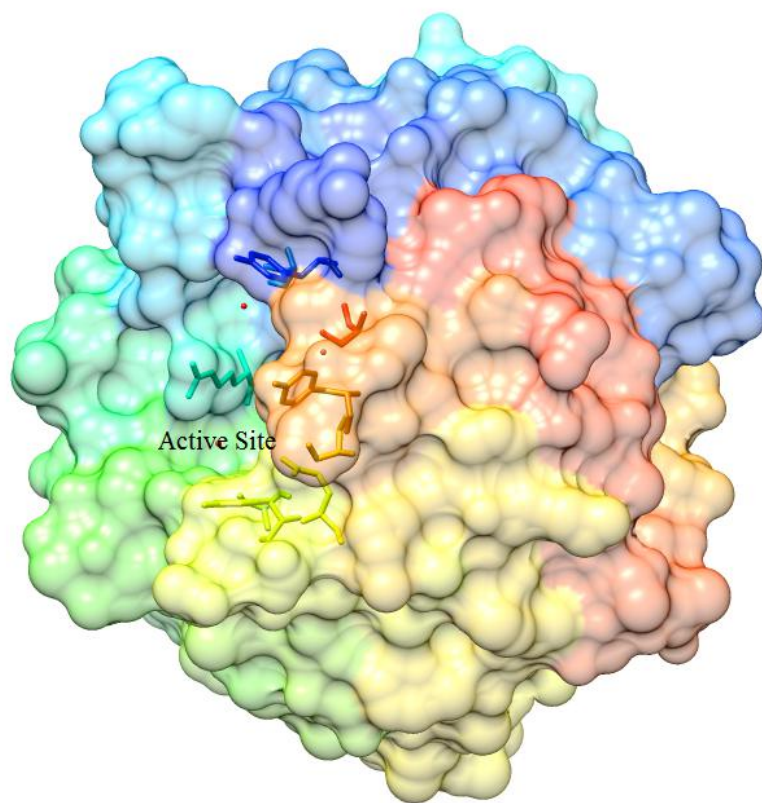
### Molecular docking analysis

Curcumin was docked to *Keap1* receptor in a specific site similar to *IQK* as ligand reference. Docking process was carried out by *Pyrx AutoDock Vina*. It was aimed to calculate *binding affinity* score of the curcumin-Keap1 complex.

### Molecular interaction analysis

The molecular interaction was analyzed by *LigandScout* to visualize and identify interaction residues in the binding domain of curcumin and Keap1 receptor. Potential inhibition of curcumin was indicated by molecular interaction of Keap1 which interacts to curcumin.





**Figure 2.** Prepared model of Keap1 as protein target

## Result and Discussion

### Biological activity prediction of curcumin

The biological activity of the herbal compound was analyzed by PASS online server with Structure Activity Relationship (SAR). It determined by score of Pa (probability activity) and Pi (probability inactivity) with values vary from 0 to 1 (Paramashivam *et al.*, 2015). Curcumin was analyzed in order to find out the possible biological activity of antioxidant and free radical scavenger. The analysis shows that curcumin obviously determines as free radical scavenger which indicated by Pa score 0.771. Moreover, curcumin also highly potentially as an antioxidant agent with Pa score 0.634 (Table 1). The result is supported by Savcun *et al.*, (2013); Menon & Sudheer (2007) which that as antioxidant and free radical scavenger, curcumin inhibits oxidative DNA damage, denaturation of cellular protein and lipid peroxidation.

Those Pa and Pi score considered to be measurement tools to predict active or inactive compound respectively. The minimum standard of reliable value is 0.3. Biological

activity with  $P_a > 0.7$  indicates that the result of *in silico* assay will relatively similar to laboratory assay, while  $P_a > 0.3$  indicates that those compound potentially *in silico* approach (Benchabane et al, 2009).

**Table 1.** Biological activity prediction of curcumin

Biological Activity	Probability Activity ( $P_a$ )
Antioxidant	0.634
Free radical scavenger	0.771

While biological activity had known, then the potential of curcumin as an inhibitor of Keap1 was analyzed by molecular docking processes using *Pyrx Autodock Vina*. Molecular docking was conducted on the active site of Keap1 receptors which bind to *IQK* ligand. *IQK* is a reference inhibitor which used as a control for comparison to curcumin. It utilizes to investigate the potential of curcumin to inhibit the interaction of Keap1 and *Nrf2*.

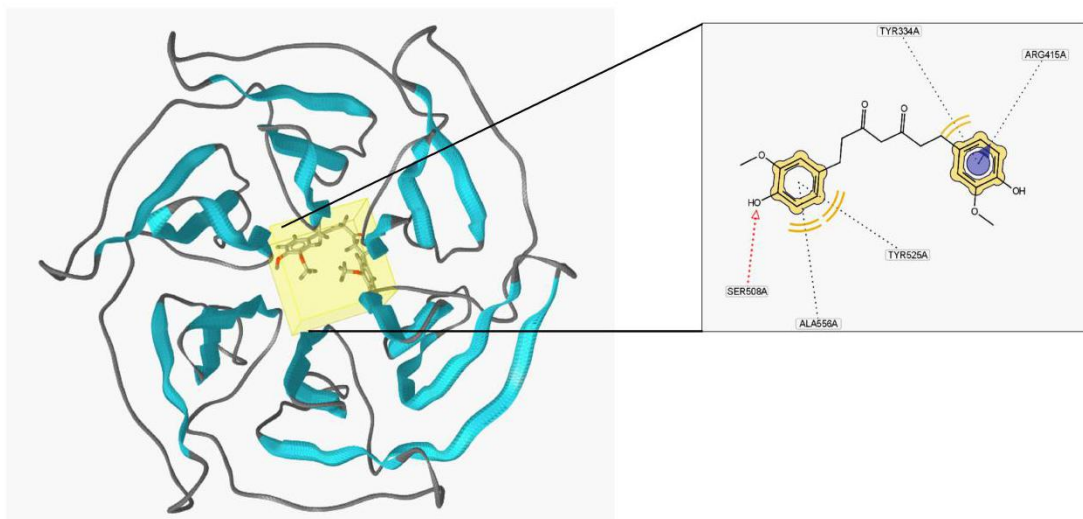
*Nrf2* (NF-E2-Related Factor 2) is a transcription factor which interacts to its specific repressor, Keap1 (Motohashi and Yamamoto, 2004). *Nrf2* in responding to cytotoxic stress is well defined. It signaling defends to against the oxidative stress including aging-related diseases. But, Keap1 targets *Nrf2* for ubiquitination and degradation by 26S proteasome. Those resulting low-level expression of *Nrf2* (Bruns *et al.*, 2015).

**Table 2.** Binding affinity score of *IQK* and curcumin to Keap1 receptor

Protein receptor	Ligand	Binding affinity (Kcal/mol)
Keap1	<i>IQK</i>	-10.7
(PDBID: 4IQK)	Curcumin	-8.4

Based on Table 2, the results pointed out that *IQK* efficiently inhibits Keap1 receptor with minimum binding affinity score about -10.7 Kcal/mol that compared to curcumin which only has -8.4 kcal/mol. However, it suggested that curcumin potentially acts as an inhibitor of Keap1 because it also has a binding affinity score which relatively low. In addition, the result of docking process also showed molecular interaction while curcumin binds to substrate binding domain of Keap1 in the SER508A, ALA556A, TYR525A, TYR334A and ARG415A (Figure 3). Furthermore, it suggested that curcumin potentially

as an inhibitor since it has strongly binding to Keap1 on the similar binding domain of *IQK*.

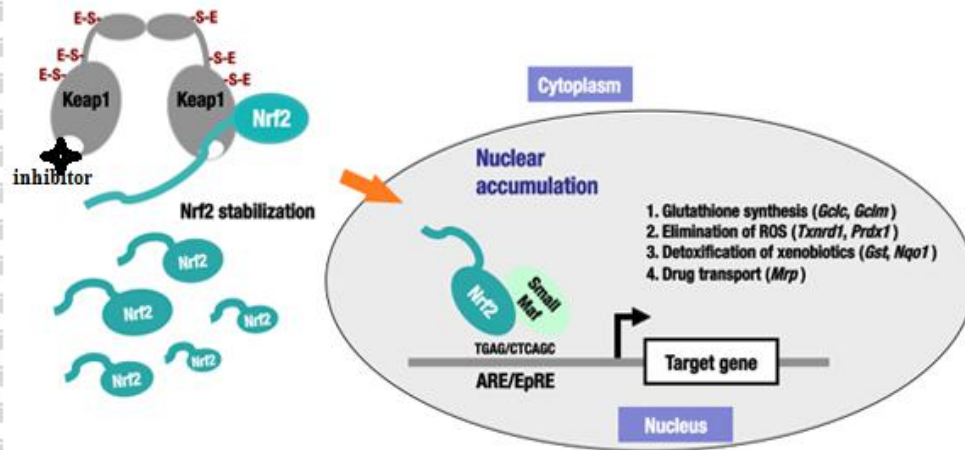


**Figure 3.** Molecular interaction of curcumin with Keap1 protein receptor (blue) on substrate binding domain (SER508A, ALA556A, TYR525A, TYR334A and ARG415A)

For inhibiting aging process, curcumin activates Nrf2 which is already in the cytoplasm and remain bound to Keap1 receptor. Curcumin interact to Keap1, Nrf2 release and translocated into nucleus where it binds to an antioxidant responsive element in *DNA* to initiate gene expression. Nrf2-regulated gene classified into phase II xenobiotic-metabolizing, an antioxidant enzyme, *DNA* repair enzymes and anti-inflammatory enzyme (Jockers, 2016) (Figure 4). That enzyme will reduce free radicals and protect the cell from *ROS* for increasing the ability of the cell to repair (Gonzalez-Reyes *et al.*, 2013).

### Conclusion

Curcumin is an herbal compound which known as antioxidant and severe potential. Based on the result, curcumin has highly biological activity as an antioxidant and free radical scavenger in high Pa score in each. Moreover, curcumin also strongly binding to the active site of Keap1 and interact to the binding domain of Keap1 in SER508A, ALA556A, TYR525A, TYR334A and ARG415A. It suggested that curcumin is highly potentially as an inhibitor of Keap1 to activate for Nrf2 activation.



**Figure 4.** Mechanism of Keap1 inhibition for activating Nrf2 (Jockers, 2016)

### Acknowledgement

This paper is part of the dissertation of the first author sponsored by BPPDN scholarship, provided by the Directorate General of Higher Education, Ministry of Research, Technology and Higher Education of Republic Indonesia.

### References

- Benchabane Y., C. Di Giorgio, G. Boyer, *et al.* 2009, Photo-inducible cytotoxic and clastogenic activities of 3,6-di-substituted acridines obtained by acylation of proflavine, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44: 2459-2467.
- Bruns D.R., J.C. Drake, L.M. Biela, *et al.* 2015. Nrf2 signaling and the slowed aging phenotype: evidence from long-lived models. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-15.
- Dallakyan, S., & A.J. Olson. 2015. Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. *Methods Mol Biol.* 263:243-50
- Ekins, S., J. Mestres & B. Testa. 2007. *In silico* pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond, *Brit. J of Pharmacol.* 152(1):21-37.
- Jockers D. 2016. Nrf2: The anti-oxidant amplifier. <http://drjockers.com/nrf2-the-anti-oxidant-amplifier/>. Accessed on May 31<sup>st</sup>.
- Kitani, K., T. Osawa, & T. Yokozawa. 2007. The effects of tetrahydrocurcumin and green tea polyphenol on the survival of male C57BL/6 mice. *Biogerontol.* 8:567-573.
- Menon V.P., & A.R. Sudheer. 2007. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 595: 105-125.
- Paramashivam SK., K. Elayaperumal, B.B. Natarajan *et al.* 2015. *In silico* pharmacokinetic and molecular docking studies of small molecules derived from

*Indigofera aspalathoides* Vahl targeting receptor tyrosine kinases. *Bioinformation*. 11(2): 73-84.

Gonzalez-Reyes, S, S. Guzman-Beltrán., O.N Medina-Campos, & J. Peddraza-Chaverri. 2013. Curcumin Pretreatment Induces Nrf2 and an Antioxidant Response and Prevents Hemin-Induced Toxicity in Primary Cultures of Cerebellar Granule Neurons of Rats. *Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/801418>.

Savcun GY, E. Ozkan, E. Dulundu, U. Topaloglu *et al.* 2013. Antioxidant and anti-inflammatory effect of curcumin against hepatorenal oxidative injury in an experimental sepsis model in rats. *Ulus Travma Acil Cerr Derg.* 19(6): 507-515.

Shen, L. R., F. Xiao, P. Yuang, Y. Chen *et al.* 2012. Curcumin-supplemented diets increase superoxide dismutase activity and mean lifespan in *Drosophila*. *Age*. DOI : 10.1007/s11357-012-9438-2.

Sikora, E., G. Scapagnini, & M. Barbagallo. 2010. Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases. *Immun. Age.* 7:1-4.

Zhang, D.D. 2006. Mechanistic studies of the nrf2-keap1 signaling pathway. *Inform. Health.* 38:769-789.

## Lampiran 5. Publikasi artikel 2

**Malondialdehyde (MDA) Ovary and Estradiol Blood Serum Levels of Premenopause White Rat (*Rattus norvegicus*) after Turmeric Powder (*Curcuma longa* L.) Treatment**TEGUH SUPRIHATIN<sup>1,2</sup>, SRI WIDYARTI<sup>3</sup>, MUHAIMIN RIFA'I<sup>3</sup>, AND SRI RAHAYU<sup>3\*</sup><sup>1</sup> Student of Biology Department Doctoral Program, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University, Malang.<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Diponegoro University, Semarang.<sup>3</sup> Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University, Malang.**Abstract**

Premenopause is a physiological condition in a female individual that has entered the aging period, a condition usually characterized by elevated MDA levels and decreased estrogen levels. The objective of this study was to determine the level of ovarian MDA and estradiol serum levels of premenopausal white rat blood after oral turmeric powder treatment. The animals used were 30 female Wistar strains white rat, age 12 months with an average body weight 200-250 g. The animals were divided into 6 groups, namely the negative control group (P0) with 4 ml/day distilled water treatment; positive control group (P1), this group was treated with pure curcumin powder 6.75 mg/kg BW; treatment group 1 (P2), group was treated with turmeric powder 100 mg/kg BW; treatment group 2 (P3); treatment group 3 (P4); and treatment group 4 (P5), these group were treated with turmeric powder at 200 mg/kg BW; 400 mg/kg BB; and 800 mg/kg BW dose respectively. Oral Treatment was administered daily for 27 days. Blood collection was performed on days 0, 14, and 28. The ovarian collection was conducted on day 28. MDA ovarian level was measured using *TBA* method and blood serum estradiol level was measured using ELISA method. The results exhibited that the positive control group (P1) and the treatment group (P2-P5) showed significantly lower ovarian MDA levels compared with the negative control group (P0). The turmeric powder dose 200 mg/kg BW (P3) can increase estradiol levels by day 14 ( $3.32 \pm 0.26$  pg/mL) and at day 28 ( $4.01 \pm 0.26$  pg/mL).

**Keywords:** menopause, turmeric powder, curcumin, malondialdehyde, estradiol

\*Corresponding author; SRI RAHAYU

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia; email: srahayu@ub.ac.id

**Introduction**

The age of an individual affects reproductive ability (Gougeon, 2003). Climacteric is a transitional period from reproductive individuals to non-reproductive, which is

divided into 4 stages. These stages are premenopausal, perimenopause, menopause, and postmenopausal (te Velde & Pearson, 2002). The premenopausal stage is characterized by a gradual decline in ovarian function, estrus cycle changes, slow follicular development and reduced estrogen hormone production (Wright *et al.*, 2006). Women premenopausal stage occurs at around 40 years old (Gougeon *et al.*, 1994), whereas a decrease in ovarian function in mice is reported to occur at 8-12 months depending on the strain (Cruz *et al.*, 2016).

Turmeric powder contains curcumin that can function as an antioxidant (Shen *et al.*, 2012). Curcumin is an electrophilic component capable to activate Nuclear related factor 2 (Nrf2) which plays an important role in the transcription of second phases detoxification enzymes, such as glutathione S-transferase (*GST*), NAD (P) H quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*) and glutamylcysteine synthetase (*GCS*) (Zhang, 2006). Phase II detoxification enzyme groups protect cells from free radicals, especially from the *ROS* group (Reyes *et al.*, 2013). Reactive oxygen species (*ROS*) are part of free radicals derived from cellular energy metabolism and steroidogenesis processes (Valko *et al.*, 2007).

Free radicals in the body are highly reactive (unstable) and can cause lipid peroxidation (Favier, 1995). Lipid peroxidation may cause oxidative damage to long-chain unsaturated fatty acids resulting in malondialdehyde (MDA). MDA levels are often used as an index of measurement of free radical activity (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Turmeric powder contains curcumin and its derivatives possess biological activity as antioxidants or free radical degrader. Curcumin has an aromatic ring structure with one phenolic hydroxy group on each of its aromatic rings (Schulz, 2008). This phenolic hydroxy group function as a hydrogen atom donor in an unstable free radical so that it becomes more stable (Valko *et al.*, 2007).

Turmeric powder also contains phytosterols ( $\beta$ -sitosterol and stigmasterol) (Li *et al.*, 2011), phytosterol function as a precursor of the natural estrogen hormone (estrogenic function) because structurally and functionally, phytosterols have a structure similar to cholesterol which is a natural precursor synthesis of steroid hormones such as estrogen (Kusmana *et al.*, 2007).

Turmeric powder contains curcumin which is an antioxidant and has a phenolic hydroxy group (polyphenols). It is suspected to be an electron donor to unstable free radicals (Valko *et al.*, 2007). The content of curcumin in turmeric powder is expected to reduce the levels of MDA which is a product of the lipid peroxidation process, where the process of lipid peroxidation is caused by the presence of free radicals which is a product of the body's normal metabolism. Turmeric powder also contains phytosterol that are thought to function as precursors of steroid hormones synthesis such as estradiol (Kusmana *et al.*, 2007). Hence its administration is orally expected to increase hormone estradiol level.

## Materials and Methods

### Research Design

The research design was a complete randomized design with 6 treatments. Each treatment was repeated 5 times. The treatment consisted of several groups, which are described as follows:

- a. The negative control group (P0), a group of animals with 4 ml distilled water
- b. The positive control group (P1), a group of animals administered pure curcumin at a dose of 6.75 mg/kg bw (Jurenka, 2009)
- c. The treatment group 1 (P2), a group of animals treated with 100 mg/kg bw turmeric powder (Somchit *et al.*, 2005)
- d. The Treatment group 2 (P3), a group of animals which was administered with 200 mg/kg bw turmeric powder
- e. The Treatment group 3 (P4), a group of animals which was administered with 400 mg/kg bw turmeric powder
- f. The Treatment group 4 (P5), a group of animals treated with 800 mg/kg bw turmeric powder

### Animals

The study were conducted on 30 white female rats (*Rattus norvegicus*) wistar strain, age 12 months, with an average weight of 200-250 g. The animals were obtained from LPPT Gajah Mada University.



## Research Method

The treatment of turmeric powder is given orally on daily basis for 27 days. Blood collection was performed on days 0, 14 and 28, followed by a procedure for measurement of blood serum estradiol levels using the ELISA method. On the 28th day, the animals were subject to cervical dislocation (breaking of the neck) prior to surgery. Surgery and ovarian organ collection were performed for the procedure of measuring MDA ovarian level using TBA method.

### Determination of MDA Level by TBA Method

Measurement of MDA levels of the ovaries used thiobarbituric acid (TBA) reagents. Rats ovary organ was washed using saline phosphate buffer, then crushed using mortar. A potassium chloride buffer solution with ratio 1:10 were added afterward. The homogenate is inserted into a polypropylene tube (microtube) and centrifuged at 10,000rpm for 10 minutes at 4°C. The supernatant was taken at 50µL and 500µL TBA, and 250µL trichloroacetic acid (TCA) were then homogenized. The homogenate was heated using waterbath at 100°C for 5 min, then centrifuged at 12,000rpm for 5 min, at 25°C. Absorbance value was determined using UV spectrophotometer at 532nm wavelength (Schemedes & Helmer, 1989).

### Determination of Estradiol Hormone Level by ELISA Method

Blood collection is done by cutting the tail end of the animals, the blood dripping from the tail end is immediately accommodated into the EDTA tube. After set aside for 2 hours, it was then centrifuged at 3000rpm for 10minutes to obtain serum. The serum was analyzed by ELISA method using estrogen ELISA kit (Elabscience brand) to determine estradiol hormone levels.

The reagent was left at room temperature (18-25°C) before use, coating was conducted into well microplate, micropipeting 50µL standard solution, and samples were put into well microplate on different columns, 100µL estradiol enzym conjugate for each microplate, incubation at 37°C for 2 hours in dark place and covered with aluminum foil, then washed with 300µL washing solution, repeated for 5 times. 100µl TBM substrate solution was added to each microplate according to the sequence. It was incubated for 20 minutes at room temperature, covered with aluminum foil. 50µL stop solution were added into each microplate gently to stop the reaction. Well microplate is inserted into Elisa

Spectrophotometere. It was then analyzed and observed at 450nm wavelength (Crowther, 2001).

**Results and Discussion**

A group of animals treated with pure curcumin powder (positive control) and a group of animals treated with turmeric powder showed significantly decreased MDA levels compared with the negative control group (aquadest). The positive control group (P1) showed the lowest decrease in MDA levels of  $24.86 \pm 5.77 \mu\text{mol/g}$  (Table 1). Decreased levels of MDA after turmeric powder treatment is suspected because of the content of curcumin that serves as an antioxidant. The provision of curcumin therapy can reduce levels of MDA in the parotid gland of white rats (Darwadi *et al.* 2013). Curcumin has antioxidant activity, a superoxide scavenger, and free radical degrader (Kohli *et al.* 2005). Curcumin is also thought to have a function as a species reactive oxygen cleaner and reactive nitrogen species or is responsible for protecting *DNA* against damage caused by free radicals and protecting hepatocytes from various toxins (Schulz, 2008).

**Table 1.** MDA level ( $\mu\text{mol/g}$ ) of premenopausal ovarian white rats after turmeric powder treatment

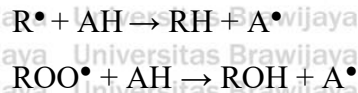
Parameter	aquades	pure Curcumin	dose 100mg/kg BW	dose 200mg/kg BW	dose 400mg/kg BW	dose 800mg/kg BW
MDA	$76,86 \pm 10,06^b$	$24,86 \pm 5,77^a$	$40,2 \pm 9,16^a$	$42,86 \pm 4,61^a$	$42,2 \pm 8,71^a$	$44,2 \pm 6,95^a$

Note: numbers with different letter superscript exhibits significantly different nature ( $\alpha < 0,05$ ).

The function of curcumin as an antioxidant and free radical degrader is thought due to curcumin structure having phenolic groups, which can donate  $H^+$  electrons to reactive free radicals. Hence causing them to be more stable (Barzegar & Movahedi, 2011).

Free radicals are a product of the body's normal metabolism. One of the free radical is the Reactive Oxygen Species (*ROS*) group (Favier, 1995). *ROS* can cause lipid peroxidation, a chain reaction that will produce MDA, inhibition of the free radical activity of *ROS* group by curcumin will inhibit also lipid peroxidation process and cause decreasing MDA production (Venugopal & Adluri, 2007).

The antioxidant mechanism of curcumin possessing phenolic group is a hydrogen atom donor. The antioxidant compound (AH) can provide the hydrogen atom rapidly to the lipid radical (R•, ROO•) and convert it to a more stable form (RH and ROH), while the antioxidant radical derivative (A•) has a more stable state compared to lipid radical (Halliwell & Gutteridge, 2015).



Pure curcumin powder and turmeric powder treatment may increase serum estradiol levels of test animals on the measurement at day 14's estradiol levels, except turmeric rhizome 100 mg / kg BW (P2) dose which exhibits no improvement compared to control group. Based on estradiol level measurement on day 28, only 200 mg / kg (P3) dose treatment showed an increase in estradiol levels compared with negative controls (Table 2).

**Table 2.** Estradiol level (pg/mL) of premenopausal white rat blood serum after turmeric powder treatment

Blood Collection BW day	aquadest	pure curcumin	dose 100mg/kg BW	dose 200mg/kg BW	dose 400mg/kg BW	dose 800mg/kg
0	0,94±0,19 <sup>a</sup>	0,94±0,19 <sup>a</sup>	0,89±0,20 <sup>a</sup>	0,83±0,13 <sup>a</sup>	1,01±0,20 <sup>a</sup>	0,89±0,04 <sup>a</sup>
14	0,94±0,21 <sup>a</sup>	2,86±0,18 <sup>b</sup>	0,73±0,17 <sup>a</sup>	3,32±0,26 <sup>b</sup>	3,49±0,35 <sup>bc</sup>	3,41±0,36 <sup>bc</sup>

Note: numbers with different letter superscript exhibits significantly different nature ( $\alpha < 0,05$ ).

Increased estradiol levels of white rats blood serum after turmeric powder treatment is suspected due to the phytoestrogen compounds content in the form of phytosterols on turmeric powder  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol (Li *et al.*, 2011). Thakur *et al.*, (2009) explains that the content of phytoestrogens in turmeric powder ethanol extract can increase rats blood serum estrogen levels. Phytoestrogens likely to directly or indirectly affect elevated rats estrogen level (Zhao & Mu, 2011), the indirect effect of phytoestrogens on estrogen levels increase is a structural and functional similarity of phytoestrogens with cholesterol, possessing estrogenic function as a natural precursor of the synthesis of steroid hormones such as estrogen (Kusmana *et al.*, 2011).

Estrogen is a steroid hormone that has an estrogenic function with many pathways, one of which is affecting the secretion of hormones FSH and LH through a feedback mechanism (Armstrong, 2011). The main natural estrogens in humans are estradiol, estrone, and estriol. Estradiol and estrone are produced by ovarian granulosa and ovarian cells, while estriol degrades estradiol, estrone, and the production of the placenta (Turner & Bagnara, 1988).

The estrogenic potential of phytoestrogens on turmeric powder was suggested can increases estrogen levels in the blood (Maligalig *et al.*, 1994). The content of turmeric powder is similar to cholesterol structure. It serves as a precursor to the synthesis of steroid hormones such as estrogen (Kusmana *et al.*, 2011).

Phytoestrogens may possess direct effect on increased blood estrogen levels by a direct action of phytoestrogens in ovarian granulosa cells (Zhao & Mu, 2011). Direct action of phytoestrogens in estrogen levels increase, for example by the addition of phytoestrogens from outside the body (exogenous estrogens) will work by blocking the production of Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) from the hypothalamus which will impact on the reduced production of FSH and LH hormones from the pituitary, the ovarian follicle develops a minimum and does not ovulate, this condition will retain follicular granulosa cells to continue producing estrogen (Thakur *et al.*, 2009).

### **Conclusion**

The treatment of turmeric powder administered orally can significantly decrease mature ovarian MDA levels. Treatment of turmeric powder at a dose of 200 mg/kg BW may increase the blood estradiol levels of white rats on days 14 and 28.

### **Acknowledgment**

This paper is part of the dissertation of the first author sponsored by BPPDN scholarship, provided by the Directorate General of Higher Education, Ministry of Research, Technology and Higher Education of Republic Indonesia.

## References

- Amstrong, D. G. 1984. Ovarian Aromatase Activity in The Domestic Fowl (*Gallus domesticus*). *J Endocrinol.* 100;81-86
- Barzegar, A. M., and A. A. Movahedi. 2011. Intracellular ROS protection. Efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. *Plos ONE* 6(10) e26012. DOI:10.1371/journal.pone.0026012
- Crowther, J. R., 2001. **The ELISA Guidebook**. Humana Press. Totowa. New Jersey.
- Cruz, G., D. Fernandois, and A. H. Paredes. 2016. Ovarian function and reproductive senescence in the rats: role of ovarian sympathetic innervation. *Reproduction Advance Publication*, first post on 31 October 2016.
- Darwadi, R. P., Aulanni'am, and C. Mahdi. 2013. Pengaruh Terapi Kurkumin terhadap Kadar *Malondialdehid* (MDA) Hasil Isolasi Parotis dan Profil Protein Tikus Putih yang Terpapar Lipopolisakarida (LPS). *Kimia Student Journal.* 1(1);133-139. Universitas Brawijaya Malang.
- Favier, A. E. 1995. **Analysis of Free Radicals in Biological Systems**. Birkhauser Voulagh Basel P. 102. Switzerland
- Gougeon, A. 2003. **The Ovary**, chapter 2 ; Dynamics for human growth: morphologic, dynamic, and functional aspects. Elsevier. Hal. 25-43.
- Gougeon, A, R. Ecohard, and J.C. Thalabard. 1994. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: Increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biol. Reprod.* 50:653–663.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 2015. **Free Radical in Biology Medicine 5<sup>th</sup> Edition (preview)**. Oxford University Press. Oxford. United Kingdom.
- Jurenka J. S. 2009. Anti-Inflammatory properties of Curcumin, a Major Constituent of *Curcuma longa*: A Review of Preclinical and Clinical Research. *Alternative Medicine review.* 14(2);141-153
- Kohli, K., J. Ali, M.J. Antasari, and Z. Raheman. 2005. A Natural antiinflammatory agent. *Edu. For.* 37(3):141-143.
- Kusmana, D., R. Lestari, Setiorini, A.N. Dewi, P.R. Ratri, and R.R.R. Soraya. 2007. Efek Estrogenik Ekstrak Etanol 70% Kunyit (*Curcuma domestica* VAL.) terhadap Mencit (*Mus musculus* L.) Betina yang Diovariektomi. *Mak. Sai.* 11(2): 90-97
- Li, S., W. Yuan, G. Deng, P. Wang, P. Yang, and B.B. Aggarwal, 2011, Chemical composition and product quality control of turmeric (*Curcuma longa* L.), *Pharmaceuti. Crops*, 2:28-54
- Maligalig, M. D., A. L. D. Lannu, & B. M. Lontoc. 1994. Estrogenic activity of the aqueous extract of *Curcuma longa* Linn. *Philippine Journal of Science.* 123 (2);105-109
- Reyes, S.G., S.G. Beltrán., O.N. Campos, & J.P. Chaverri. 2013. Curcumin Pretreatment Induces Nrf2 and an Antioxidant Response and Prevents Hemin-Induced Toxicity in Primary Cultures of Cerebellar Granule Neurons of Rats. Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/801418>.
- Schemedes, A. V and G. Helmer. 1989. a new thiobarbituric acid (TBA) method for determining free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxydes selectively as a measure of lipid peroxidation. *J of the American oil chemists' society.* DOI: 10.1007/BF02653674

- Schulz, O. 2008. **The Biological Activity of Curcumin**. Wellness foods Europe. 10-13.
- Shehzad, A., & Y.S. Lee. 2010. Curcumin : Multiple molecular targets mediate multiple pharmacological actions : A review. *Drugs. Fut.* 35:113-120.
- Shen, L. R., F. Xiao, P. Yuang, Y. Chen, & Q. K. Gao. 2012. Curcumin-supplemented diets increase superoxide dismutase activity and mean lifespan in Drosophila. *Age*. DOI : 10.1007/s11357-012-9438-2. *Published online in Wiley Online Library*. wileyonlinelibrary.com.
- Somchit, M.N., A. Zuraini, A. Bustaman, M.R. Sulaiman, R. Nurantulina. 2005. Protective Activity of Turmeric (*Curcuma longa*) in Paracetamol Induced-Hepatotoxicity in Rat. *International Journal of Pharmacology*. 1(3);252-256
- te Velde, E.R., & P.L. Pearson. 2002 The variability of female reproductive ageing. *Hum. Reprod.* 8:141-154.
- Thakur, S., B. Bawara, A. Dubey, D. Nandini, N.S. Chauhan, and D.K. saraf. 2009. Effect of *Carum carvi* and *Curcuma longa* on Hormonal and Reproductive Parameter of female Rats. *International Journal of Phytomedicine*. 1(2009)31-38
- Turner C. D., and J. T. Bagnara. 1988. **Endokrinologi Umum**. Edisi keenam. Airlangga University Press.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, & J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The Internati. J. Biochemis. Cell. Biol.* 39(1):44-84.
- Venugopal, P.M., and R.S. Adluri. 2007. Antioxydant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 595;105-125
- Zhang, D.D. 2006. Mechanistic studies of the nrf2-keap1 signaling pathway. *Inform. Health.* 38:769-789.
- Zhao, E. and Q. Mu. 2011. Phytoestrogen Biological Action on Mammalian Reproductive System and Cancer Growth. *Sci Pharm.* 79(1);1-20

Lampiran 6. Contoh analisis data hasil penelitian

NPART TESTS  
 /K-S(NORMAL)=MDAspektro  
 /MISSING ANALYSIS.

**NPar Tests**

Notes		
Output Created		22-OCT-2018 00:04:30
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	18
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each test are based on all cases with valid data for the variable(s) used in that test.
Syntax		NPART TESTS /K-S(NORMAL)=MDAspektro /MISSING ANALYSIS.
Resources	Processor Time	00:00:00.00
	Elapsed Time	00:00:00.00
	Number of Cases Allowed <sup>a</sup>	196608

a. Based on availability of workspace memory.

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		MDAspektro
N		18
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	45.2000
	Std. Deviation	17.31711
	Absolute	.209
Most Extreme Differences	Positive	.209
	Negative	-.108
Kolmogorov-Smirnov Z		.887
Asymp. Sig. (2-tailed)		.411

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.

ONEWAY MDAspekro BY perlakuan  
 /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY  
 /MISSING ANALYSIS  
 /POSTHOC=TUKEY ALPHA(0.05).

### Oneway

#### Notes

Output Created		22-OCT-2018 00:05:20
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	18
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax		ONEWAY MDAspekro BY perlakuan /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=TUKEY ALPHA(0.05).
Resources	Processor Time	00:00:00.02
	Elapsed Time	00:00:00.03



MDA	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
P0	3	76.8667	10.06645	5.81187	51.8602	101.8731	66.20
P1	3	24.8667	5.77350	3.33333	10.5245	39.2088	18.20
P2	3	40.2000	9.16515	5.29150	17.4325	62.9675	30.20
P3	3	42.8667	4.61880	2.66667	31.3929	54.3404	40.20
P4	3	42.2000	8.71780	5.03322	20.5438	63.8562	36.20
P5	3	44.2000	6.92820	4.00000	26.9894	61.4106	36.20
Total	18	45.2000	17.31711	4.08168	36.5884	53.8116	18.20

**Descriptives**

MDAspektro

	Maximum
P0	86.20
P1	28.20
P2	48.20
P3	48.20
P4	52.20
P5	48.20
Total	86.20

**Test of Homogeneity of Variances**

MDAspektro

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.574	5	12	.719

**ANOVA**

MDAspektro

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4370.000	5	874.000	14.407	.000
Within Groups	728.000	12	60.667		
Total	5098.000	17			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: MDAspektro

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
P0	P1	52.0000*	6.35959	.000	30.6386	73.3614
	P2	36.6667*	6.35959	.001	15.3053	58.0280
	P3	34.0000*	6.35959	.002	12.6386	55.3614
	P4	34.6667*	6.35959	.002	13.3053	56.0280
	P5	32.6667*	6.35959	.003	11.3053	54.0280
P1	P0	-52.0000*	6.35959	.000	-73.3614	-30.6386
	P2	-15.33333	6.35959	.226	-36.6947	6.0280
	P3	-18.00000	6.35959	.119	-39.3614	3.3614
	P4	-17.33333	6.35959	.140	-38.6947	4.0280
	P5	-19.33333	6.35959	.085	-40.6947	2.0280
P2	P0	-36.6667*	6.35959	.001	-58.0280	-15.3053
	P1	15.33333	6.35959	.226	-6.0280	36.6947
	P3	-2.66667	6.35959	.998	-24.0280	18.6947
	P4	-2.00000	6.35959	.999	-23.3614	19.3614
	P5	-4.00000	6.35959	.986	-25.3614	17.3614
P3	P0	-34.0000*	6.35959	.002	-55.3614	-12.6386
	P1	18.00000	6.35959	.119	-3.3614	39.3614
	P2	2.66667	6.35959	.998	-18.6947	24.0280
	P4	.66667	6.35959	1.000	-20.6947	22.0280
	P5	-1.33333	6.35959	1.000	-22.6947	20.0280
P4	P0	-34.6667*	6.35959	.002	-56.0280	-13.3053
	P1	17.33333	6.35959	.140	-4.0280	38.6947
	P2	2.00000	6.35959	.999	-19.3614	23.3614
	P3	-.66667	6.35959	1.000	-22.0280	20.6947
	P5	-2.00000	6.35959	.999	-23.3614	19.3614
P5	P0	-32.6667*	6.35959	.003	-54.0280	-11.3053
	P1	19.33333	6.35959	.085	-2.0280	40.6947
	P2	4.00000	6.35959	.986	-17.3614	25.3614
	P3	1.33333	6.35959	1.000	-20.0280	22.6947
	P4	2.00000	6.35959	.999	-19.3614	23.3614

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## Homogeneous Subsets

### MDAspektro

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
P1	3	24.8667	
P2	3	40.2000	
P4	3	42.2000	
P3	3	42.8667	
P5	3	44.2000	
P0	3		76.8667
Sig.		.085	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



## Lampiran 7. Dosis Cekok Perlakuan

### Dosis cekok

Dosis 1 (P2);

$$100\text{mg/kgBB} = 100 \times 0,018 = 1,8 \text{ (konversi)}$$

$$\text{Dosis cekok} = 1,8 \times 1000/200 = 9\text{mg}$$

Dosis 2 (P3);

$$200\text{mg/kgBB} = 200 \times 0,018 = 3,6$$

$$\text{Dosis cekok} = 3,6 \times 1000/200 = 18\text{mg}$$

Dosis 3 (P4);

$$400\text{mg/kgBB} = 400 \times 0,018 = 7,2$$

$$\text{Dosis cekok} = 7,2 \times 1000/200 = 36\text{mg}$$

Dosis 4 (P5);

$$800\text{mg/kgBB} = 800 \times 0,018 = 14,4$$

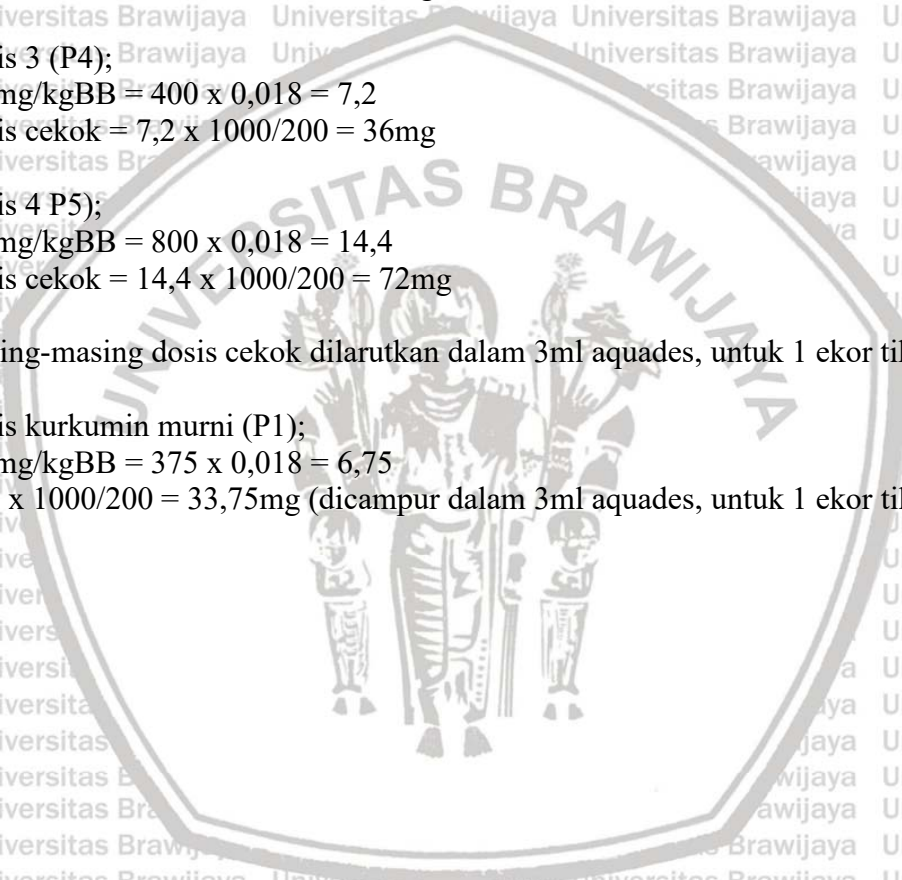
$$\text{Dosis cekok} = 14,4 \times 1000/200 = 72\text{mg}$$

Masing-masing dosis cekok dilarutkan dalam 3ml aquades, untuk 1 ekor tikus setiap hari.

Dosis kurkumin murni (P1);

$$375\text{mg/kgBB} = 375 \times 0,018 = 6,75$$

$$6,75 \times 1000/200 = 33,75\text{mg (dicampur dalam 3ml aquades, untuk 1 ekor tikus setiap hari)}$$



Lampiran 8. Sertifikat laik etik



**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS UDAYANA**

**KOMISI ETIK PENGGUNAAN HEWAN DALAM PENELITIAN & PENDIDIKAN**

Kampus JI, PH, Sudirman Denpasar

Telp/Fax: (0361) 223793

**KELAIKAN ETIK  
(ETHICAL CLEARANCE)**

**NO: 204KE-PH-LI-1/II/2016**

Komisi Etik Penggunaan Hewan dalam Penelitian dan Pendidikan, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, setelah mempelajari dengan seksama proposal penelitian yang diusulkan,

**Judul**

**POTENSI KURKUMIN PADA SERBUK RIMPANG KUNYIT (*Curcuma longa* L.) UNTUK MENGAKTIVASI Nrf2 DALAM MENGHAMBAT AGING OVARIUM PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*).**

**Peneliti**

**TEGUH SUPRIHATIN**

**Instansi Peneliti**

**Program Doktor, Biologi, Fakultas Matematika dan IPA, Universitas Udayana**

**Tempat Penelitian**

**Laboratorium Fisiologi Hewan, Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Udayana.**

**Dinyatakan Laik Etik**

(mengacu pada Bab 7.8 tentang penggunaan hewan dalam penelitian dan pendidikan dari organisasi kesehatan hewan dunia)

Denpasar, 2 Maret 2016

**Mengetahui**

**Dekan Fakultas Kedokteran Hewan,  
Universitas Udayana**

**Komisi Etik Penggunaan Hewan  
untuk Penelitian dan Pendidikan  
Ketua,**

**Dr.drh. Nyoman Adi Suratma, MP  
NIP. 19600305 198703 1 001**

**Prof.Dr.drh. Ketut Herata, M.Si  
NIP.19610914 198702 1 001**

Lampiran 9. Sertifikat bebas plagiasi

