



Efek kurkumin *sintesis* dan Pentagamavunon-0 terhadap Produksi Progesteron Kultur Sel Luteal dengan Pemberian Forskolin

The Effect of Synthetic Curcumin and Pentagamavunon-0 on the Progesterone Production of Luteal Cell Cultures Added with Forskolin

Endang Purwaningsih¹, Edy Meiyanto², Djaswadi Dasuki³, Sri Kadarsih Soejono⁴

¹Department of Anatomy (Biology), Faculty of Medicine YARSI UNIVERSITY, Jakarta

² Department of Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, GADJAH MADA UNIVERSITY, Yogyakarta

³Department of Obstetric and Gynecology, Faculty of Medicine GADJAH MADA UNIVERSITY, Yogyakarta

⁴Department of Physiology, Faculty of Medicine GADJAH MADA UNIVERSITY, Yogyakarta

KEYWORDS *Curcuma longa*; progesterone; luteal cell culture; protein kinase A

ABSTRACT *Curcumin is one of the common traditional medicines that is often used for fertility regulation. Curcumin analogue, pentagamavunon-0/PGV-0, exerted similar effect with curcumin. Synthetic curcumin and PGV-0 possesses molecular structures similar to prostaglandin. It has been reported that luteal cells are able to produce progesterone in vitro by addition of several hormones such as LH and prostaglandin F2a (PGF2a). Stimulation of luteal cell cultures with LH and/or PGF2a in the presence of synthetic curcumin and PGV-0 will interfere with the progesterone production. Nevertheless, the precise site of action of curcumin remains unknown. The present study aims to determine the effect of synthetic curcumin and PGV-0 on the progesterone production by luteal cell cultures in the presence or absence of several known stimulators or inhibitors such as LH, PGF2a and forskolin, respectively. The results indicated that synthetic curcumin reduced the progesterone concentration significantly ($p < 0,05$) in the luteal cell culture treated with solvent, LH and/or PGF2a, in the presence or absence of forskolin. In the groups treated with PGV-0, and induced with LH and/or PGF2a, the concentration of progesterone did not change significantly ($p > 0,05$). Addition of forskolin on the control group resulted in higher progesterone concentration as that of LH. The findings indicated that synthetic curcumin inhibits progesterone production by the luteal cell cultures through the cAMP/PKA/MAP-Kinase signaling cascade, but PGV-0 might have the site of action in the PLC/PKC/MAP-Kinase signaling cascade.*

Kurkumin yang merupakan komponen aktif dari rizoma *Curcuma longa*, L, menunjukkan berbagai aktivitas farmakologis di antaranya sebagai anti-inflamasi, anti-karsinogenik, anti-ovulasi. Pentagamavunon-0 (PGV-0) merupakan senyawa hasil modifikasi terhadap kurkumin yang merupakan analog kurkumin, diketahui mempunyai efek seperti kurkumin, antara lain pada penghambatan enzim siklooksigenase (COX) spesifik COX-2 (Huang dkk, 1995; Meiyanto, 1999). Kurkumin juga dapat bersifat sebagai inhibitor untuk Protein Kinase A (PKA) dan Protein Kinase C (PKC) (Hasmeda & Polya, 1995).

Penelitian efek kurkumin terhadap sistem reproduksi telah banyak dilakukan terutama secara *in vivo*. Beberapa khasiat yang telah dibuktikan adalah sebagai antiovlasi (Garg, 1974) dan meng-

hambat implantasi (Ammon & Wahl, 1991). Penelitian tersebut belum menjelaskan mekanisme kerja kurkumin pada korpus luteum sebagai organ yang berumur pendek dan sangat penting dalam mengatur siklus menstruasi dan pengatur fertilisasi.

Menurut Mukopadhyay dkk (1982) kurkumin memiliki struktur molekul mirip dengan prostaglandin, maka diduga efek kurkumin sebagai anti-inflamasi terjadi karena adanya kompetisi dengan reseptor prostaglandin di sel target. Pada korpus luteum prostaglandin menyebabkan terjadi-

Correspondence:

Dra. Endang Purwaningsih, MS, Department of Biology, Faculty of Medicine YARSI University, Jakarta, Jalan Let.Jen. Suprpto, Cempaka Putih, Jakarta Pusat 10510, Telephone 021-4206674, 4206675, 4206676 Facsimile 021-4243171.

nya luteolisis, suatu kemunduran pada fungsi korpus luteum. Dengan regresinya korpus luteum merupakan sinyal terminasi siklus menstruasi yang ditandai dengan penurunan produksi progesteron secara drastis (Niswender dkk, 2000).

Telah dilaporkan oleh Zulkhah dkk (2000), bahwa kultur sel luteal mampu memproduksi progesteron. Pada pemberian LH dan atau PGF2 α yang kemudian ditambah kurkumin sintesis dan PGV-0 pada kultur sel luteal memberikan produksi progesteron yang berbeda pada tiap perlakuannya (Soejono dkk, 2000). Pada pemberian teofilin, kurkumin dan PGV-0 memberikan produksi progesteron yang berbeda, diduga karena kurkumin dan PGV-0 memiliki tempat kerja yang berbeda pada kultur sel luteal (Soejono dkk, 2001).

Disisi lain diketahui pada steroidogenesis sel luteal melibatkan aktivitas berbagai hormon antara lain LH dan PGF2 α . LH menstimulasi sekresi progesteron dengan melibatkan aktivitas adenilat siklase, pembentukan *cyclic* AMP (cAMP) dan aktivasi Protein Kinase A (PKA) yang terlibat dalam pengaturan transkripsi gen *Steroidogenic Acute Regulatory* (StAR) dan ekspresi enzim-enzim steroidogenik (Niswender, 2002; Wetttschureek & Offermanns, 2005). PGF2 α merupakan antigonadotropik yang dapat menurunkan jumlah reseptor LH (Thomas dkk, 1978; Khan dkk, 1979). Pada kultur sel luteal manusia PGF2 α dapat menghambat fosforilasi ERK (*Extracellular Signal Regulated Protein Kinase*) melalui jalur PLC/PKC sehingga menurunkan produksi progesteron (Tai dkk, 2001). Pada sel steroidogenik, pemberian forskolin sebagai aktivator enzim adenilat siklase dapat meningkatkan fosforilasi ERK melalui peningkatan kadar cAMP sehingga meningkatkan kadar hormon steroid (Gyles dkk, 2001). Sehubungan dengan hal di atas tujuan penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh kurkumin dan pentagamavunon-0 (PGV-0) pada kultur sel luteal tikus dengan mengukur produksi progesteron yang sebelumnya dirangsang LH dan atau PGF2 α sebelum dan setelah pemberian forskolin. Penelitian ini terkait dengan penelitian lain tentang pengaruh kurkumin dan PGV-0 terhadap fosforilasi ERK pada kultur sel luteal setelah pemberian forskolin.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Bahan yang dipergunakan dalam penelitian adalah kurkumin sintesis dan pentagamavunon-0 dari Fakultas Farmasi UGM. Sel luteal dari korpus luteum tikus galur *Sprague Dawley* umur 28 hari

diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada, yang diinduksi ovulasi masing-masing dengan 10 IU/ekor *Pregnant Mare's Gonadotropin* (PMSG) (Gestyl, Organon). Untuk pembuatan kultur sel luteal diperlukan Medium MEM (*Minimal Essential Medium*), *Fetal Bovine Serum* (FBS), *Fungizone*, Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep), yang diperoleh dari Gibco BRL, Kolagenase, LH, Prostaglandin F2 α (PGF2 α), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), forskolin diperoleh dari Sigma Chemical C0, St.Louis, MO, Kit RIA progesteron dari DPC, Los Angeles, USA.

Cara kerja

Rancangan penelitian

Subyek penelitian adalah kultur sel luteal sebanyak 24 kelompok dengan 4 ulangan. Pengelompokan untuk kelompok kontrol dan perlakuan dilakukan secara random setelah kultur sel luteal mencapai sekitar 3×10^5 sel/ml. Kelompok 1-12 tanpa pemberian forskolin dan kelompok 13-24 dengan pemberian forskolin. Masing-masing kelompok tersebut adalah: kontrol/pelarut methanol 1% (1), kurkumin (2), PGV-0 (3), LH (4), PGF2 α (5), LH +PGF2 α (6), LH + kurkumin (7), LH+PGV-0 (8), PGF2 α +kurkumin (9), PGF2 α +PGV-0 (10), LH+PGF2 α +kurkumin (11), LH+PGF2 α +PGV-0 (12), kelompok 13-24 seperti kelompok 1-12 yang masing-masing ditambahkan forskolin

Pembuatan media *Minimal Essential Medium*/MEM

Serbuk MEM dalam sachet dilarutkan dalam satu liter aquabides steril menggunakan pengaduk *magnetic stirrer*. Setelah larut tambahkan 2,2 gram sodium bikarbonat sehingga warnanya menjadi merah. pH medium kemudian diukur dengan menggunakan pH meter elektrik. Untuk memperoleh pH 7,4 dengan cara menambahkan NaOH (0,1M) bila pH kurang dari 7,4 atau ditambahkan HCl (0,1M) bila lebih dari 7,4. larutan medium MEM disaring dengan pompa peristaltik dalam ruang steril. Dari dalam tabung Erlenmeyer medium dilewatkan pipa plastik masuk ke dalam pompa yang pada ujungnya dipasang miliopore steril dengan lubang 0,22 mikrometer. Hasil saringan ditampung dalam botol medium steril untuk selanjutnya disimpan dalam lemari es pada suhu 2-8°C. Untuk membuat medium dispersi, ke dalam medium MEM ditambahkan antibiotika PenStrep 5%, Fungizone 1% dan kolagenase 1mg/ml. Untuk membuat medium pencuci, ke dalam medium MEM ditambahkan serum FBS 10%, sedangkan untuk membuat medium

penumbuh kedalam medium MEM ditambahkan PenStrep 5%, Fungizone 0,7% dan FBS 10%.

Pembuatan kultur sel luteal

Untuk mendapatkan korpus luteum dilakukan dengan menginduksi ovulasi dengan *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) (Khan dkk, 1979). Duabelas ekor tikus betina galur *Sprague Dawley* (UPHP, UGM) umur 28 hari masing-masing disuntik secara intramuskular dengan 10 IU PMSG (Gestyl, Organon) untuk menginduksi superovulasi yang dilakukan pada pukul 09.00 WIB. Ovulasi akan terjadi pada saat tikus umur 30 hari. Pada umur 31 hari terbentuk korpus luteum umur 1 hari. Selanjutnya dilakukan pembedahan untuk diambil ovariumnya pada korpus luteum umur 4 hari atau umur tikus 34 hari. Sebelum dilakukan pembedahan, tikus telah dibius dengan kloroform atau eter dan didekapitasi.

Ovarium diambil dan dimasukkan dalam larutan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) 10% Pen-strep. Korpus luteum diambil dari ovarium menggunakan forcep tumpul di bawah mikroskop stereo dan dibersihkan. Didispersi secara enzimatik dalam medium yang mengandung kolagenase dispase 1 mg/ml dan 5% Penstrep. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C selama 1,5 jam. Kemudian didispersi secara mekanik dengan divorteks dan digojog selama 1 menit dan diulangi sampai tiga kali. Suspensi sel disaring dengan kasa steril untuk selanjutnya disentrifus dengan MEM pencuci yang mengandung *Fetal Bovine Serum* / FBS (Gibco, BRL) 10%. Pencucian dilakukan dengan cara sentrifus pada kecepatan 720 g (2.000 rpm) selama 10 menit dan diulangi sebanyak tiga kali. Pada pencucian terakhir supernatan dibuang dan ke dalamnya ditambahkan MEM penumbuh yang mengandung FBS 10%, Penstrep 5% dan Fungizone 0,1%.

Perhitungan sel yang hidup dilakukan dengan hemositometer setelah dibubuhkan Tripkan blue. Pengenceran dengan media penumbuh sampai diperoleh konsentrasi sel luteal antara 10⁵-10⁶ sel/ml. Kemudian sel luteal ditanam dalam cawan kultur 96 sumuran dengan volume masing-masing 0,1 ml untuk selanjutnya diinkubasi dengan inkubator CO₂ 5%, 37°C selama 72 jam. Media kultur diganti dengan yang baru setiap 24 jam. Sel hidup akan menempel pada dasar cawan kultur, yang mati akan larut dalam media dan terbuang pada saat penggantian media. Kemudian dilakukan pemberian perlakuan dengan kurkumin dan PGV-0 dengan dosis tunggal yaitu 100 µM sesuai dengan desain penelitian. Sedangkan pada perangsangan dengan LH, PGF₂α dan forskolin

masing-masing digunakan dosis 50 ng/ml, 0,56 µM dan 1 µM.

Pengukuran kadar progesteron (P)

Kadar progesteron hasil sekresi kultur luteal yang terlarut dalam medium dengan berbagai perakuan, diukur menggunakan metode *Radio Immuno Assay* (RIA). Pada prinsipnya cara kerja RIA berdasarkan kompetisi antara progesteron bebas dengan progesteron berlabel radioisotop. Antibodi anti-P yang telah dilapiskan pada tabung berikatan secara P sampel dan P berlabel radioisotop I¹²⁵ (DPC, Los Angeles, USA). Konsentrasi P berlabel radioisotop konstan sedangkan konsentrasi P bebas bervariasi sehingga jumlah P berlabel yang berikatan dengan antibodi anti-P pada dinding tabung berbanding terbalik dengan konsentrasi P bebas apabila dibaca dengan *gamma counter*.

Prosedur pengukuran kadar P dengan metode RIA

Kedalam tabung minivial yang telah dilapis (*coating*) dengan antibodi poliklonal terhadap progesteron (Ab-P) ditambahkan 100 µL P standard yang telah diketahui konsentrasinya dan 100 µL P berlabel radioisotop (I¹²⁵) secara bersama-sama, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam untuk menentukan kadar kurve standard. Kedalam tabung minivial yang lain dan telah dilapis (*coating*) dengan antibodi poliklonal terhadap progesteron (Ab-P) ditambahkan 100 µL medium kultur (sampel yang mengandung P bebas) dan 100 µL P berlabel radioisotop (I¹²⁵) secara bersama-sama, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Seluruh isi tabung dibuang kemudian dicuci bersih sampai beberapa kali dengan air kran untuk membuang P yang tidak terikat dengan Ab-P. Jumlah Ab-P berlabel radioisotop dicacah dengan menggunakan pencacah *gamma counter*. *Percent bound/maximum bound* (%B/Bo) dihitung dengan cara membagi absorbansi masing-masing sampel dengan nilai Bo, kemudian dengan menggunakan kurve standard, hasilnya dikonversi menjadi satuan ng/mL untuk kadar progesteron.

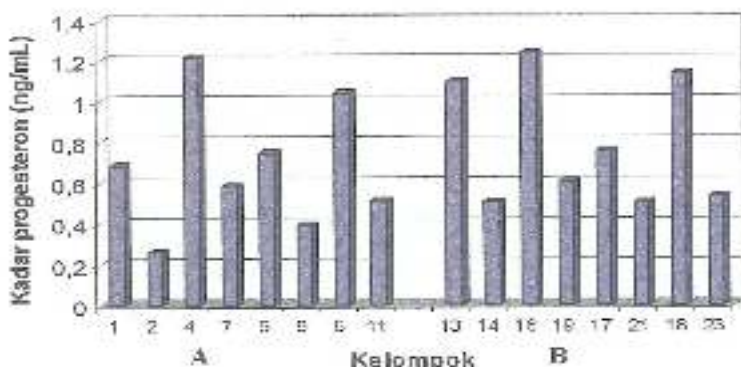
HASIL

Kultur sel luteal korpus luteum umur 4 hari yang telah tumbuh konfluent, kemudian dikelompokkan menjadi kelompok yang hanya mendapat kurkumin atau PGV-0 yang sebelumnya mendapat perlakuan dengan hormon dan forskolin sesuai dengan rancangan penelitian. Kadar progesteron dalam media kultur dari setiap kelompok dihitung

dan dipakai sebagai parameter fungsi kultur sel luteal.

Hasil pengukuran kadar progesteron dalam pelarut/kontrol dan yang mendapat perlakuan LH,

PGF2 α , LH+ PGF2 α dan forskolin, sebelum dan sesudah mendapat tambahan kurkumin sintesis dan PGV-0 tersaji dalam Gambar 1 dan 2.



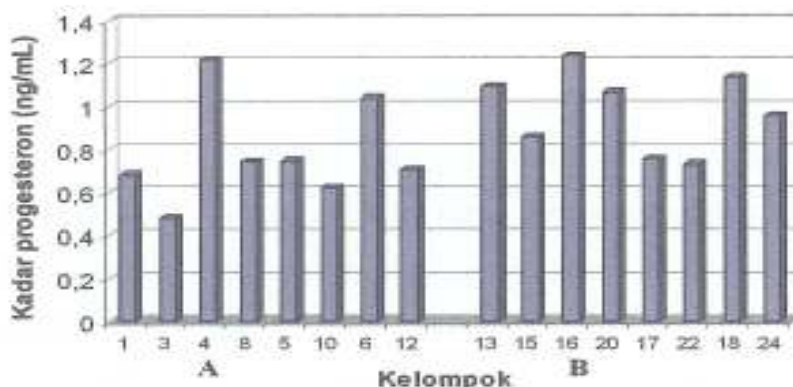
Gambar 1. Histogram kadar progesteron (ng/3x10⁵sel/mL/24 jam) setelah pemberian kurkumin pada kelompok kontrol dan perlakuan.

Ket: Kelompok, kontrol (pelarut); 2, kurkumin; 4, LH; 5, PGF2 α ; 6, LH+ PGF2 α 7, LH+kurkumin; 9, PGF2 α + kurkumin; 11, LH+ PGF2 α + kurkumin; 13, pelarut + forskolin; 14, kurkumin + forskolin; 16, LH+forskolin; 17, PGF2 α + forskolin; 18, LH+ PGF2 α + forskolin; 19, LH + kurkumin+forskolin; 21, PGF2 α + kurkumin + forskolin; 23, LH + PGF2 α + kurkumin+forskolin A, sebelum diberi forskolin; B, sesudah diberi forskolin

Pemberian kurkumin sintesis pada kelompok pelarut menurunkan produksi progesteron secara bermakna ($p < 0,05$) dibanding pelarut saja, baik sebelum maupun setelah penambahan forskolin. Pada perangsangan LH, baik sebelum maupun setelah pemberian forskolin, produksi progesteron menurun secara bermakna ($p < 0,05$) akibat pemberian kurkumin sintesis. Demikian juga pada perangsangan LH dan PGF2 α , baik sebelum maupun setelah penambahan forskolin, produksi progesteron menurun secara bermakna dengan pemberian kurkumin sintesis. Pemberian kurkumin sintesis pada kultur sel luteal yang sebelumnya ditambahkan PGF2 α se-

belum maupun setelah pemberian forskolin menurunkan produksi progesteron secara tidak bermakna ($p > 0,05$).

Lain halnya dengan kelompok yang ditambah dengan PGV-0 sebelum maupun setelah penambahan forskolin (Gambar 2) dari pelarut dan pada kelompok yang sebelumnya dirangsang LH dan PGF2 α tidak menurunkan produksi progesteron ($p > 0,05$). Demikian pula pada kelompok yang sebelumnya ditambah PGF2 α dan forskolin Penurunan produksi progesteron secara bermakna ($p < 0,05$) hanya terjadi pada kultur sel yang sebelumnya dirangsang LH tanpa pemberian forskolin.



Gambar 2. Histogram kadar progesteron (ng/3x10⁵sel/mL/24jam) setelah pemberian PGV-0 pada kelompok kontrol dan perlakuan.

Ket: Kelompok, kontrol (pelarut); 3, PGV-0; 4, LH; 5, PGF2 α ; 6, LH+ PGF2 α 8, LH + PGV-0; 10, PGF2 α + PGV-0 ; 12, LH+ PGF2 α + PGV-0; 13, pelarut + forskolin; 15, PGV-0 + forskolin; 16, LH+forskolin; 17, PGF2 α + forskolin; 18, LH+ PGF2 α + forskolin; 20, LH + PGV-0+forskolin; 22, PGF2 α + PGV-0 + forskolin; 24, LH + PGF2 α + PGV-0 + forskolin; A, sebelum diberi forskolin; B, sesudah diberi forskolin.

Dari hasil diatas terlihat bahwa penambahan forskolin, suatu zat aktivator enzim adenilat siklase, meningkatkan produksi progesteron pada semua kelompok, yaitu pelarut, LH dan atau PGF2 α . Kadar progesteron pada pemberian forskolin saja lebih tinggi dibanding dengan jika mendapat pelarut saja ($p < 0,05$), dan sama tingginya ($p > 0,05$) dengan pemberian LH saja maupun dengan pemberian LH dan forskolin. Pada penelitian pemberian PGF2 α tidak menurunkan produksi progesteron secara bermakna dibanding kelompok kontrol ($p > 0,05$), baik sebelum maupun setelah pemberian forskolin.

PEMBAHASAN

Kultur sel luteal dibuat dari korpus luteum tikus *Sprague Dawley* (SD) umur 4 hari. Umur korpus luteum 4 hari ini merupakan umur-umur korpus luteum dari *mid luteal*. Kultur sel luteal umur 4 hari masih membawa hormon-hormon yang ada sewaktu intak (di dalam ovarium tubuh tikus). Hormon-hormon tersebut antara lain adalah LH dan PGF2 α . Sehubungan dengan umur korpus luteum adalah *mid luteal*, maka diperkirakan membawa LH dan PGF2 α yang hampir sama banyaknya. Kultur sel luteal primer masih mempunyai sifat mirip dengan sel asalnya sehingga masih banyak membawa LH dan PGF2 α yang terikat pada reseptornya (Soejono dkk, 2000). Seperti pada asalnya, dalam kultur sel luteal dengan penambahan LH juga memberikan produksi progesteron yang lebih tinggi bermakna dibanding kontrol. Menurut Niswender (2002) stimulasi LH akan meningkatkan produksi progesteron melalui peningkatan aktivitas adenilat siklase, peningkatan akumulasi cAMP, peningkatan aktivasi PKA. Dikatakan oleh Thomas dkk (1978) bahwa dengan adanya PGF2 α sedikit akan menurunkan efek stimulasi LH atau bila LH diberikan bersama-sama dengan PGF2 α akan menghambat kerja LH. Lebih lanjut dilaporkan bahwa PGF2 α pada sel luteal menurunkan produksi progesteron (Niswender, 2002; Stocco dkk, 2007). Pada penelitian PGF2 α dosis 0,56 μ M tidak menurunkan produksi progesteron secara bermakna. Hal ini karena umur korpus luteum 4 hari yang digunakan pada penelitian ini merupakan umur korpus luteum *mid luteal* diduga kurang peka terhadap PGF2 α . Khan dkk (1979) melaporkan bahwa PGF2 α merupakan antigonadotropik yang sangat tergantung pada umur korpus luteum, korpus luteum umur 3 hari kurang peka terhadap PGF2 α dibanding umur korpus luteum 7 hari.

Kurkumin atau pentagamavunon-0 (PGV-0) sebagai senyawa analog kurkumin selain memiliki

sifat sitotoksitas terhadap sel kanker, juga diketahui memiliki kemampuan penghambatan spesifik terhadap siklooksigenase seperti (COX-2) pada sel kanker (Huang dkk, 1995; Meiyanto, 1999) dan lipoksigenase yang berperan sebagai katalisator perubahan asam arakhidonat menjadi prostaglandin (Ammon dkk, 1993). Lebih lanjut dilaporkan oleh Meiyanto (2004) bahwa PGV-0 menurunkan level ekspresi COX-2 yang merupakan *up stream* regulator *cell cycle* dan apoptosis. Dikatakan oleh Ammon dkk (1993), bahwa kurkumin mempunyai reseptor dan struktur sebagai indometasin, padahal indometasin bersifat sebagai inhibitor sintesis prostaglandin, bersifat mencegah terjadinya luteolisis. Dari penelitian ini, kurkumin menurunkan produksi progesteron dari kultur sel luteal, berarti menunjukkan adanya suatu kemunduran kultur sel luteal. Hal ini mengacu pada sifat kurkumin sebagai penghambat sintesis prostaglandin, tentunya mengakibatkan perpanjangan umur korpus luteum. Akan tetapi pada kultur sel luteal (bukan sel kanker) kurkumin menyebabkan kemunduran sel luteal.

Menurut Hasmeda & Polya (1995) kurkumin bersifat sebagai inhibitor protein kinase A (PKA) melalui rangsangan cAMP (PKA *dependent* cAMP). Untuk produksi progesteron pada sel luteal, diperlukan rangsangan LH yang memerlukan cAMP sebagai pengaktif mitokondria dalam fungsinya mensintesis progesteron (Soejono dkk, 2001; Chin dkk, 2004). Dalam penelitian ini digunakan forskolin, suatu zat aktivator adenilat siklase yang dapat meningkatkan akumulasi cAMP (Gyles dkk, 2001). Didapat dari penelitian ini bahwa pemberian forskolin menyebabkan produksi progesteron oleh kultur sel luteal lebih tinggi secara bermakna dibanding sebelum diberi forskolin pada kelompok kontrol. Menurut Dewi dkk (2002) pemberian forskolin pada sel luteal meningkatkan produksi progesteron, karena forskolin dapat mengaktifasi fosforilasi *Extracellular Signal Regulated Protein Kinase* (ERK1/2) melalui peningkatan level cAMP. Sedangkan ERK diperlukan untuk mengaktifasi protein *Steroidogenic Acute Regulatory* (StAR) yang berperan dalam pengangkutan kolesterol dan meningkatkan ekspresi enzim-enzim steroidogenik.

Kelompok-kelompok yang mendapat perlakuan kurkumin sintesis menunjukkan penurunan produksi progesteron yang berbeda bermakna, pada kelompok pelarut/kontrol maupun yang sebelumnya mendapat rangsangan LH saja serta yang mendapat rangsangan LH + PGF2 α baik sebelum maupun setelah mendapat forskolin. Hal ini kemungkinan terkait dengan sifat kurkumin sebagai

penghambat PKA dan PKC (Hasmeda & Polya, 1995). Dengan adanya rangsangan LH aktivasi PKA akan menyebabkan peningkatan fosforilasi ERK dan faktor transkripsi seperti CREB (*Cyclic AMP Response Element Binding Protein*), selanjutnya akan meningkatkan fosforilasi protein StAR dan ekspresi enzim-enzim steroidogenik seperti sitokrom P450_{scc} yang merombak kolesterol menjadi pregnenolon dan enzim 3 β - *Hydroxysteroid Dehydrogenase* (3 β -HSD) yang mengkonversi pregnenolon menjadi progesteron. Dalam hal ini ada dugaan bahwa penurunan produksi progesteron oleh kultur sel luteal akibat pemberian kurkumin tersebut disebabkan oleh penurunan fosforilasi ERK, penurunan fosforilasi StAR dan atau penurunan ekspresi enzim-enzim steroidogenik. Namun hal ini perlu penelitian lebih lanjut.

Pada perlakuan dengan PGV-0 produksi progesteron pada hampir semua kelompok baik kelompok kontrol maupun yang sebelumnya mendapat hormon LH dan atau PGF2 α tidak berbeda bermakna, baik sebelum maupun setelah pemberian forskolin. Penurunan produksi progesteron akibat pemberian PGV-0 secara bermakna hanya terjadi pada kultur sel luteal yang sebelumnya mendapat rangsangan LH saja sebelum diberikan forskolin; sedangkan rangsangan LH pada kelompok yang diberi forskolin, pemberian PGV-0 tidak menurunkan produksi progesteron. Berarti PGV-0 dapat menghambat kerja LH, walaupun belum dapat ditentukan letak kerjanya. Diduga pada steroidogenesis sel luteal PGV-0 tidak menghambat jalur cAMP/PKA sehingga kurang menghambat fosforilasi ERK, fosforilasi StAR dan ekspresi enzim-enzim steroidogenik. Seperti diketahui bahwa pada steroidogenesis sel luteal jalur cAMP/PKA merupakan jalur utama karena aktivasi PKA melibatkan terjadinya fosforilasi ERK dan faktor transkripsi CREB yang keduanya akan meningkatkan fosforilasi StAR. Transportasi kolesterol dari sitosol ke membran luar mitokondria dan dari membran luar mitokondria ke membran dalam mitokondria oleh StAR merupakan tahap yang akut dalam steroidogenesis (Bogan & Niswender, 2007). Ada kemungkinan PGV-0 bekerja pada jalur PLC/PKC, karena dengan rangsangan LH, steroidogenesis sel luteal selain melalui jalur utama cAMP/PKA, bisa terjadi melalui jalur PLC/PKC yang akan mengaktifasi MAP Kinase ERK melalui Ras/Raf. Namun demikian apakah PGV-0 dapat menghambat PLC/PKC tersebut masih perlu penelitian lebih lanjut. Berarti PGV-0 menghambat kerja LH, walaupun belum dapat ditentukan letak kerjanya.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil-hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Kurkumin sintesis menurunkan produksi progesteron oleh kultur sel luteal melalui jalur utama cAMP/PKA/MAP-Kinase sedangkan PGV-0 diduga bekerja pada jalur PLC/PKC/Ras/Raf/MAP-Kinase pada steroidogenesis sel luteal.
2. Pada dosis yang sama kurkumin sintesis dan PGV-0 memiliki efek hambatan yang berbeda pada produksi progesteron oleh kultur sel luteal karena keduanya memiliki letak kerja yang berbeda pada steroidogenesis sel luteal.

SARAN

1. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengkaji efek kurkumin sintesis dan PGV-0 pada produksi progesteron oleh kultur sel luteal terhadap akumulasi cAMP atau pada *up stream* cAMP seperti adenilat siklase (mengingat forskolin sebagai aktivator adenilat siklase) atau pada reseptor LH.
2. Mengkaji efek kurkumin sintesis dan PGV-0 pada produksi progesteron oleh kultur sel luteal di daerah *down stream* cAMP seperti protein kinase A (PKA), MAP-Kinase ERK, StAR dan enzim-enzim steroidogenik.

KEPUSTAKAAN

- Ammon HPT, Wahl MA 1991. Pharmacology of *Curcuma longa*, *Planta Medica* 57 :1-7.
- Ammon HPT, Safayhi M, Mack T, Sabieraj J 1983. Mechanism of Antiinflammatory Action of Curcumine and Boswellic Acids. *J Ethnopharmacol* 38 (2-3):113 -9.
- Bogan RI, Niswender GD 2007. Constitutive Steroidogenic in Ovine Large Luteal Cells May Be Mediated by Tonocally Active Protein Kinase A. *Biol Reprod* 77: 000 - 000.
- Chin EC, Harris TE, Abayasekara DRE 2004. Changes in cAMP dependent Protein Kinase (PKA) and Progesteron secretion in Luteinizing human granulose cells. *J Endocrinol* 183: 39-50.
- Dewi DA, Abayasekara DRE, Wheeler-Jones PD 2002. Requirement for ERK1/2 Activation in the regulation of Progesteron production in Human Granulosa-Lutein Cells Is Stimulus specific, *Endocrinol.*, 143 (3): 877-888.
- Garg SK 1974. Effect of *Curcuma longa* (Rhizome) on Fertility in Experimental Animals. *Planta Medica*. 26 : 225 - 227.
- Gyles SL, Burns CJ, Whitehouse BJ, Sugden D, Marsh PJ 2001. ERKs Regulate Cyclic AMP induced Steroid Synthesis through Transcription of the Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Gene. *J Bio Chem*. 276 (14): 34888-34895.
- Hasmeda M, Polya GM 1995. Inhibition of Cyclic AMP- dependent Protein Kinase by Curcumin, In: Pramono S., Jenie UA, Sudibyo RS, Gunawan D Ed. Recent Developments in Pharmacology, *Proceeding of the International Symposium*

- of *Curcumin Pharmacochemistry (ISCP)*, Aditya Media, Yogyakarta: 117-125.
- Huang MT, Ma W, Lou JR, Lu YP, Chang R, Newmark H, Conney AH 1995. Inhibitory Effects of curcumin on Tumorigenesis in Mice. In : Pramono S, Jenie UA, Sudibyo RS, Gunawan D Ed., *Recent Developments in Curcumin Pharmacochemistry, Proceeding Of The International Symposium on Curcumin Pharmacochemistry (ISCP)*, Aditya Media. Yogyakarta: 47 - 61.
- Khan ML, Rosberg S, Lahav M, Lamprecht SA, Selstam G, Herlitz H, Ahren K 1979. Study of the mechanism of action of the inhibitory effect of PGF₂ α on cyclic AMP accumulation in rat corpora lutea of various ages. *Biol Reprod.* 21: 1175.
- Meiyanto E 1999. Kurkumin sebagai obat kanker. Menelusuri Mekanisme Aksinya, *Majalah Farmasi Indonesia* 10 (94): 224-236.
- Meiyanto E 2004. Efek Anti-Proliferatif dan Anti-Metastatik Tulang Pentagamavunon-0 terhadap kanker payudara. *Laporan Akhir Riset Unggulan Terpadu X Bidang Kesehatan.* Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Mukhopadhyay A, Basu N, Ghatak N, Gujral PK 1982. Anti-Inflammatory and irritant Activities of Curcumin analogues in rat. *Agent and Action.*, 12 (4) : 508 - 515.
- Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntosh EW 2000. Mechanism Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. *Physiol Rev* 80 (1) : 1 - 29.
- Niswender GD 2002. Molecular Control of Luteal secretion of Progesterone. Review. *Reproduction.* 123: 333-339.
- Soejono SK, Sutriano, Wiyanto J, Marlina U, Puspitasari S 2000. Sitotoksitas Kurkumin Molekul Nasional pada Kultur Sel Luteal tikus (*Sprague Dawley*), *Mediagama* 2 (13) : 59 - 67.
- Soejono SK, Amin SM, Nurcahyo H, Hadi RS 2001. Peran kurkumin Sintesis dan analognya (Pentagamavunon-O) pada produksi progesteron oleh kultur sel luteal Tikus (*Sprague Dawley*). *Mediagama.* III (3): 42 -49.
- Stocco C, Telleria C, Gibori G 2007. The Molecular Control of Corpus Luteum: Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 28 (1): 117-149.
- Tai CJ, Kang SK, Choi KC, Tzeng CR, Leung PCK 2001. Role of Mitogen Activated Protein Kinase in Prostaglandin F₂ α Action in Human granulosa-Luteal Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 375-380.
- Thomas JP, Dorflinger LJ, Behrman HR 1978. Mechanism of the Rapid Antigonadotropic Action of Prostaglandins in Cultured Luteal Cells, *Proc Natl Acad Sci* 75 (3): 1344 - 8.
- Wettschurek N, Offermanns S 2005. Mammalian G Protein and Their Cell Type Specific Functions. *Physiol Rev* 85 : 1159- 1204.
- Zulkah N, Soejono SK, Suwono 2000. Pengaruh kurkumin sintetik terhadap Produksi progesteron oleh kultur sel luteal tikus dengan perangsangan hCG dan PGF₂ α . *Sains Kedokteran, Berkala Penelitian Pascasarjana Ilmu -ilmu Kesehatan,* Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.