



## Pengaruh Kurkumin pada Kultur Sel Luteal Tikus yang mengandung Teofilin terhadap Kadar cAMP dan Progesteron

### *Effect of Curcumin on cAMP and Progesterone Concentration of Rat Luteal Cells Culture Containing Theophylline*

Endang Purwaningsih<sup>1</sup>, Sri Kadarsih Soejono<sup>2</sup>, Djaswadi Dasuki<sup>3</sup>,  
Edy Meiyanto<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta

<sup>2</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta

<sup>3</sup>Department of Obstetric and Gynecology, Faculty of Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta

<sup>4</sup>Department of Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University, Yogyakarta

**KATA KUNCI** *transduksi sinyal; teofilin; cawan kultur; ELISA; RIA*  
**KEYWORDS** *signal transduction; theophylline; culture plate; ELISA; RIA*

**ABSTRAK** *Senyawa kurkumin dapat menghambat steroidogenesis kultur sel luteal dengan menghambat sekresi progesteron. Letak kerja kurkumin pada steroidogenesis kultur sel luteal belum diketahui. Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui pengaruh kurkumin terhadap kadar cAMP dan kadar progesteron pada steroidogenesis kultur sel luteal dengan penambahan teofilin. Subyek penelitian adalah korpus luteum tikus Sprague Dawley yang diinduksi dengan PMSG. Kurkumin diberikan sesaat setelah stimulasi LH dan atau PGF2a dengan dan tanpa penambahan teofilin. Kemudian kultur sel diinkubasi selama 24 jam. Konsentrasi cAMP diukur dengan metode ELISA sedangkan konsentrasi progesteron diukur dengan metode RIA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa LH meningkatkan cAMP dan kadar progesteron secara bermakna, sedangkan PGF2a mengurangi kadar cAMP dan kadar progesteron secara tidak bermakna. Teofilin meningkatkan kadar cAMP dan kadar progesteron secara bermakna dan hampir sama dengan stimulasi LH. Kurkumin menghambat kadar cAMP oleh LH maupun teofilin. Disimpulkan bahwa kurkumin menghambat kadar cAMP dan kadar progesteron pada kultur sel luteal dengan cara menekan transduksi sinyal di up stream cAMP.*

**ABSTRACT** *Curcumin compound can inhibit steroidogenesis of luteal cell culture by inhibiting the production of progesterone. The action site of the curcumin on steroidogenesis of luteal cells is still unknown. The objective of this study is to analyze the effect of curcumin on the cAMP and progesterone concentration in steroidogenesis of luteal cell culture containing theophylline. The subject of this investigation was corpus luteum of rat Sprague Dawley strain after being induced by PMSG. Curcumin was given shortly after the stimulation of LH and or PGF2a with or without theophylline. The cells were cultured then put into incubator for 24 hours. The concentration of cAMP was assessed by ELISA whereas the progesterone concentration was measured by RIA method.*

*The result showed that LH stimulation increased cAMP and progesterone concentration significantly. However, PGF2 $\alpha$  caused no significant effects on the cAMP and progesterone concentration. Theophylline increased cAMP and progesterone concentration significantly but showed no significant effect on LH stimulation. Curcumin inhibited cAMP and progesterone concentrations by either LH or theophylline stimulation. In conclusion, it is suggested that curcumin inhibited cAMP and progesterone concentrations signal in upstream cAMP by suppressing the transduction.*

Regulasi steroidogenesis pada sel luteal merupakan mekanisme yang sangat kompleks dan menghasilkan progesteron (P4) sebagai komponen utama. Regulasi ini melibatkan beberapa hormon antara lain LH dan PGF2 $\alpha$ . Sekresi LH secara kontinyu merangsang korpus luteum untuk mensekresi progesteron (Keyes *et al.*, 1983, Stauffer, 2003). LH menstimulasi sekresi progesteron dengan melibatkan aktivitas enzim adenilat siklase yang berada dalam membran sel luteal, pembentukan *Cyclic Adenosine 3',5' Monophosphate* (cAMP) dan aktivasi protein kinase A (PKA) serta enzim-enzim steroidogenik seperti sitokrom P450 *side chain cleavage* (P450scc), 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenase (3 $\beta$ -HSD) (Niswender *et al.*, 2000; Chin *et al.*, 2004). Peran PGF2 $\alpha$  antara lain mengganggu ikatan LH dengan reseptor LH (R-LH) dan mengurangi jumlah R-LH (Khan *et al.*, 1979), menghambat aktivitas enzim adenilat siklase dan akumulasi cAMP (Thomas *et al.*, 1978; Ahren *et al.*, 1980), mereduksi transkripsi enzim sitokrom P450scc dan 3 $\beta$ -HSD (Ravindranath *et al.*, 1992), menurunkan sekresi progesteron melalui jalur protein kinase C (PKC) (Wiltbank *et al.*, 1990).

LH menstimulasi sekresi progesteron dengan melibatkan aktivitas adenilat siklase, pembentukan *cyclic AMP* (cAMP) dan aktivasi Protein Kinase A (PKA). Protein Kinase A (PKA) terlibat dalam pengaturan transkripsi gen *Steroidogenic Acute Regulatory (StAR)* dan ekspresi enzim sitokrom P-450

*side chain cleavage* (P-450 scc) melalui peningkatan fosforilasi *cAMP Response Element Binding Protein* (CREB) dan *Extracellular Signal Regulated Kinase* (ERK) (Wettschureek and Offermanns, 2005). Tang & Hurley (1998) menyatakan bahwa cAMP merupakan kunci dalam sinyal transduksi intraseluler pada sintesis hormon, *neurotransmitter* dan *chemokynes*. Tahap kunci dalam pengaturan sinyal transduksi melalui cAMP adalah memodulasi aktivitas adenilat siklase, suatu enzim yang mensintesis cAMP dari hidrolisis ATP. Aktivitas adenilat siklase dan akumulasi cAMP dapat dipengaruhi dan dirangsang oleh LH dan FSH. Peran cAMP sebagai mediator LH belum diketahui dengan jelas, walaupun telah diketahui bahwa cAMP menstimulasi fosforilasi protein seluler (Nugent *et al.*, 1975) Menurut Thomas *et al.* (1978) pemberian teofilin, suatu zat yang dapat menghambat enzim fosfodiesterase yang menghidrolisis cAMP menjadi 5'AMP dapat meningkatkan produksi progesteron oleh kultur sel luteal.

Saat ini senyawa kurkumin (1,7 bis (4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-6-heptadin -3-5-dion) telah dapat diisolasi dari ekstrak rimpang kunyit dan telah dapat disintesis secara laboratorik, bahkan telah dapat dibuat senyawa analognya dengan melakukan mo-

*Correspondence:*

Dr. Endang Purwaningsih, MS,PA., Department of Anatomy (Biology), Fakultas of Medicine, YARSI University, Jakarta, Jalan Letjen. Suprpto, Cempaka Putih, Jakarta Pusat 10510, Tel. 021-4206674-76, Faksimile: 021-4243171

difikasi pada gugus aromatik terminal dan metilen aktif (Sardjiman, 2000). Ekstrak kunyit dapat menyebabkan terjadinya anovulasi (Garg, 1974) dan dapat menurunkan berat testis, menurunkan kadar testosteron, serta menurunkan spermatogenesis (Ammon and Wahl, 1991). Pengaruh kurkumin terhadap sistem reproduksi melalui uji *in vitro* dilaporkan oleh Zulkhah *et al.* (2000) yang menunjukkan adanya pengaruh kurkumin pada kultur sel luteal setelah dirangsang oleh hCG. Soejono *et al.* (2001) melaporkan peran kurkumin pada produksi progesteron dengan maupun tanpa pemberian teofilin, suatu senyawa penghambat fosfodiesterase. Nurcahyo dan Soejono (2007) membuktikan kurkumin mampu menghambat produksi progesteron pada kultur sel granulosa.

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui efek kurkumin pada steroidogenesis kultur sel luteal (KSL) khususnya terhadap kadar cAMP dan kadar progesteron pada penambahan teofilin serta mengetahui letak kerja/sasaran aksi kurkumin pada steroidogenesis sel luteal.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Bahan

Subyek penelitian adalah sel luteal yang diambil dari korpus luteum (umur 4 hari) tikus (*Rattus norvegicus*, L) betina galur *Sprague Dawley* (UPHP UGM) yang diinduksi superovulasi dengan *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* / PMSG (Gestyl, Organon). Sel luteal diperoleh dengan cara mekanik dan enzimatik dari korpus luteum. Untuk pembuatan kultur sel luteal digunakan *Minimum Essential Medium* (MEM), *Fetal Bovine Serum* (FBS), Penisilin-Streptomisin (PenStrep), Gentamycin, Fungizone, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), Kolagenase, Tripkan Blue (Gibco, BRL, Life Technologies, Rockville, MD). Untuk pengukuran kadar cAMP dan

kadar progesteron masing-masing digunakan kit ELISA cAMP (Sigma, Aldrich Inc, St Louise, London), Kit RIA Progesteron (DPC, Los Angeles, USA), teofilin (Sigma Aldrich Inc, St. Louise, MO). Bahan kimia yang diperlukan untuk perlakuan dan uji adalah kurkumin (Lab. Molnas, Fakultas Farmasi UGM), LH, PGF<sub>2α</sub>.

### Cara Kerja

#### Rancangan Penelitian

Penelitian ini untuk mengetahui efek kurkumin terhadap kadar cAMP pada steroidogenesis KSL dengan diberi LH dan atau PGF<sub>2α</sub>. Penelitian terdiri atas enam belas kelompok yang meliputi delapan kelompok tanpa diberi teofilin dan delapan kelompok lainnya ditambahkan teofilin. Kedelapan kelompok yang dimaksud adalah 1. Kultur sel luteal (KSL) + pelarut metanol 1% (sebagai kontrol); 2. KSL + kurkumin; 3. KSL + LH; 4. KSL + LH + kurkumin; 5. KSL + PGF<sub>2α</sub>; 6. KSL+ PGF<sub>2α</sub> + kurkumin; 7. KSL + LH + PGF<sub>2α</sub>; 8. KSL + LH + PGF<sub>2α</sub> + kurkumin.

#### Pembuatan kultur sel luteal (KSL)

Korpus luteum diambil dari ovarium menggunakan forcep gunting dan pinset steril dalam keadaan dingin di dalam ruang LAF. Korpus luteum yang diperoleh, dibersihkan. didispersi secara enzimatik dalam medium yang mengandung kolagenase/dispase 1 mg/ml dan 5% Penstrep. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C selama 3x30 menit. Kemudian setiap 30 menit inkubasi didispersi secara mekanik dengan divorteks dan digojog selama 3 menit. Selanjutnya diinkubasi lagi dan vorteks serta digojog sampai sebanyak 3 kali, dan diulangi sampai tiga kali. Suspensi sel disaring dengan kasa steril untuk selanjutnya dengan MEM pencuci yang mengandung *Fetal Bovine Serum*/FBS (Gibco) 10% disentrifugasi menggunakan supersentrifus (Sorvall super T21)

dengan kecepatan 720 g (2.000 rpm ) pada suhu 4°C selama 10 menit. Pencucian tersebut diulang sebanyak tiga kali. Pada pencucian terakhir supernatan dibuang dan ke dalamnya ditambahkan MEM penumbuh yang mengandung FBS 10%, Penstrep 5%, Gentamycin 5% dan Fungizone 0,7% (Freshney, 1990).

Sebelum sel ditanam terlebih dahulu dihitung jumlah selnya. Perhitungan sel yang hidup dilakukan dengan hemositometer setelah dibubuhkan Tripan blue. Pengenceran dilakukan dengan media penumbuh sampai diperoleh konsentrasi sel luteal antara  $10^5$ - $10^6$  sel/ml. Kemudian sel luteal ditanam dalam cawan kultur 24 sumuran dengan volume 0,5 ml atau pada cawan kultur 96 sumuran dengan volume masing-masing 0,1 mL untuk selanjutnya diinkubasi dengan inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C selama 72 jam. Media kultur diganti dengan yang baru setiap 24 jam dan dilakukan pengecekan dengan pengamatan kultur sel menggunakan mikroskop *inverted*. Sel hidup akan menempel pada dasar cawan kultur, yang mati akan mengambang dalam media dan terbuang pada saat penggantian media. Kemudian dilakukan pemberian perlakuan dengan kurkumin dengan dosis tunggal yaitu 100 µM/L sesuai dengan desain penelitian. Sebelum dilakukan pemberian perlakuan jumlah sel juga dihitung pada salah satu sumuran yang digunakan sebagai sampel.

#### **Pengukuran kadar cAMP dan kadar progesteron (P4)**

Pengukuran kadar cAMP dari sampel sel dalam kultur sel luteal mengikuti protokol kit ELISA cAMP (Sigma, Aldrich, St. Louise). Kadar progesteron hasil sekresi kultur luteal dalam medium, diukur menggunakan metode *RadioImmuno Assay* (RIA). Pada prinsipnya cara kerja RIA berdasarkan kompetisi antara progesteron bebas dengan progesteron berlabel radioisotop.

Data kadar cAMP dan kadar progesteron diolah secara statistik dengan uji Anova satu arah. Untuk mengetahui adanya perbedaan diantara masing-masing kelompok dilakukan uji perbandingan berganda *Least Significant Difference* (LSD).

### **HASIL**

#### **1.Kadar cAMP**

Kadar cAMP dengan atau tanpa penambahan teofilin pada kelompok kontrol, kelompok yang diberi kurkumin tersaji pada Tabel 1. Hasil uji statistik menunjukkan nilai  $F = 4,813$  pada  $p < 0,05$ , sehingga menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok-kelompok perlakuan. Kadar cAMP pada kelompok pelarut (kontrol) dengan teofilin lebih tinggi secara bermakna ( $p < 0,05$ ) dibandingkan kelompok pelarut saja tanpa teofilin. Stimulasi LH pada KSL meningkatkan kadar cAMP secara tidak bermakna ( $p > 0,05$ ) dengan adanya teofilin, dibandingkan LH saja. Pada KSL yang mendapat PGF2 $\alpha$  + teofilin kadar cAMP meningkat secara tidak bermakna ( $p > 0,05$ ) dibandingkan PGF2 $\alpha$  saja (tanpa teofilin). Demikian pula pada KSL yang distimulasi LH + PGF2 $\alpha$  + teofilin, kadar cAMP meningkat secara tidak bermakna ( $p > 0,05$ ) dibandingkan LH+PGF2 $\alpha$  saja. Peningkatan kadar cAMP pada KSL yang mendapat LH + PGF2 $\alpha$  + teofilin tidak menunjukkan perbedaan bermakna dibandingkan KSL yang mendapat PGF2 $\alpha$  + teofilin.

Kurkumin pada kelompok pelarut menyebabkan kadar cAMP lebih rendah secara bermakna ( $p < 0,05$ ) dibandingkan kelompok pelarut saja. Kurkumin mengurangi kadar cAMP secara bermakna ( $p < 0,05$ ) pada KSL yang distimulasi LH dengan atau tanpa penambahan teofilin. Pada KSL yang distimulasi LH + PGF2 $\alpha$  dengan atau tanpa penambahan teofilin, kurkumin juga mengurangi kadar cAMP secara ber-

makna ( $p < 0,05$ ) dibanding tanpa diberi kurkumin. Kadar cAMP pada KSL yang distimulasi  $PGF2\alpha$  dengan atau tanpa penambahan teofilin, tidak menunjukkan hambatan yang bermakna ( $p > 0,05$ ) dibandingkan tanpa kurkumin.

## 2. Kadar progesteron (P4)

Produksi P4 oleh KSL dengan dan tanpa penambahan teofilin, menunjukkan hasil uji statistik dengan nilai  $F = 4,190$  pada  $p < 0,05$ , sehingga menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok-kelompok perlakuan. Tabel 2 menunjukkan bahwa penambahan teofilin meningkatkan produksi P4 terutama pada kelompok pelarut. Produksi P4 pada pemberian teofilin saja lebih tinggi dibandingkan kelompok pelarut saja (tanpa teofilin) dan hampir sama

tingginya dengan KSL yang distimulasi LH saja maupun LH+ teofilin.

Prostaglandin  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) menurunkan kadar P4 terutama pada KSL yang sebelumnya terstimulasi LH tanpa penambahan teofilin. Pada kelompok pelarut, penurunan kadar P4 oleh  $PGF2\alpha$  terjadi secara tidak bermakna ( $p > 0,05$ ) dengan dan tanpa penambahan teofilin.

Pemberian kurkumin pada KSL mengurangi produksi P4 secara bermakna ( $p < 0,05$ ), baik pada KSL yang distimulasi LH baik LH saja maupun LH +  $PGF2\alpha$  dengan dan tanpa penambahan teofilin. Pada kelompok pelarut dengan teofilin maupun tanpa teofilin kurkumin juga menghambat produksi P4 secara bermakna ( $p < 0,05$ ).

Tabel 1. Kadar cAMP dari setiap kelompok setelah pemberian kurkumin dengan dan tanpa teoflin

Kelompok	Kadar cAMP (pmol/ $3 \times 10^5$ sel/mL/24 jam) (mean $\pm$ standar deviasi)	
	Tanpa teofilin	Dengan teofilin
Pelarut (kontrol)	0,09 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,03
Pelarut + kurkumin	0,03 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00
LH	0,21 $\pm$ 0,00	0,23 $\pm$ 0,03
LH + kurkumin	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00
$PGF2\alpha$	0,06 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01
$PGF2\alpha$ + kurkumin	0,07 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01
LH + $PGF2\alpha$	0,13 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,02
LH + $PGF2\alpha$ + kurkumin	0,09 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00

Tabel 2. Kadar progesteron (P4) dari setiap kelompok setelah pemberian kurkumin dengan dan tanpa teofilin

Kelompok	Kadar P4 ng/3x10 <sup>5</sup> sel/mL/24 jam) (mean ± standar deviasi)	
	Tanpa teofilin	Dengan teofilin
Pelarut (kontrol)	0,68 ± 0,22	1,07 ± 0,22
Pelarut + kurkumin	0,24 ± 0,27	0,65 ± 0,05
LH	1,11 ± 0,28	1,21 ± 0,26
LH + kurkumin	0,53 ± 0,28	0,50 ± 0,10
PGF2 $\alpha$	0,65 ± 0,18	0,88 ± 0,17
PGF2 $\alpha$ + kurkumin	0,39 ± 0,06	0,47 ± 0,07
LH + PGF2 $\alpha$	0,91 ± 0,21	1,06 ± 0,09
LH + PGF2 $\alpha$ + kurkumin	0,51 ± 0,17	0,48 ± 0,06

## PEMBAHASAN

Kadar P4 dalam media kultur merupakan hasil steroidogenesis sel luteal. Kultur sel luteal dapat memproduksi P4 tanpa mendapat stimulasi LH. Hal ini yang menjadi salah satu keunggulan menggunakan kultur sel primer yaitu mempunyai kemampuan memproduksi progesteron. Menurut Thomas *et al.* (1978) kultur sel primer masih memiliki reseptor hormon yang terbawa (*intact*) dari jaringannya. Produksi progesteron dalam kondisi tanpa adanya stimulasi hormon LH ini dikenal sebagai produksi P4 basal.

Penelitian menggunakan kelompok yang diberi pelarut kurkumin yaitu metanol 1% sebagai kontrol, karena penggunaan metanol dalam jumlah yang terbatas tidak mengganggu produksi P4. Dilaporkan oleh Soejono *et al.* (2001) pemberian metanol sebagai pelarut kurkumin dan analog kurkumin tidak mengganggu pertumbuhan kultur sel luteal tikus. Pick *et al.* (2004) juga menyatakan penggunaan metanol sebagai pelarut obat pada kultur sel monosit THP1 dinyatakan aman hingga kadar 4%.

Adanya stimulasi LH pada KSL dapat meningkatkan produksi P4. Hal ini dapat

disimpulkan dari penelitian sebelumnya bahwa LH meningkatkan aktivitas adenilat siklase dan akumulasi cAMP (Thomas *et al.*, 1978). Selanjutnya peningkatan cAMP akan meningkatkan fosforilasi *Extracellular Signal Regulated Kinase/ERK* (Siraishi and Ascoli, 2006), mRNA sitokrom P450<sub>sc</sub> (Ravindranath *et al.*, 1992). Peningkatan parameter-parameter tersebut menimbulkan terjadinya peningkatan produksi P4 oleh KSL. Penelitian juga menunjukkan bahwa LH dapat meningkatkan akumulasi cAMP secara bermakna.

Penambahan PGF2 $\alpha$  mengurangi kadar cAMP secara tidak bermakna dibandingkan kadar cAMP kelompok pelarut. Ini menunjukkan PGF2 $\alpha$  kurang memiliki efek terhadap cAMP. Pada KSL yang mendapat stimulasi LH, PGF2 $\alpha$  terlihat efek antigonadotropik yang nyata. Sesuai dengan pendapat Thomas *et al.* (1978) dan Ahren *et al.* (1980), PGF2 $\alpha$  menghambat akumulasi cAMP pada sel luteal yang distimulasi LH. Hambatan ini dapat terjadi melalui hambatan aktivitas adenilat siklase yang terimbas LH atau karena peningkatan degradasi cAMP.

Penambahan teofilin meningkatkan kadar cAMP secara bermakna dibandingkan kadar cAMP kelompok kontrol dan hampir

sama dengan kadar cAMP pada KSL yang mendapat stimulasi LH saja maupun LH + teofilin dan diikuti dengan peningkatan kadar P4. Kadar cAMP pada kelompok yang distimulasi LH saja tidak berbeda bermakna dengan kadar cAMP pada kelompok yang mendapat stimulasi LH + teofilin. Hal ini disebabkan peningkatan akumulasi cAMP oleh LH sudah terpakai untuk menstimulasi produksi P4, sehingga tidak ada lagi cAMP yang didegradasi menjadi 5'AMP. Pemberian teofilin tidak mencegah hambatan akumulasi cAMP oleh PGF2 $\alpha$ , karena teofilin tidak meningkatkan akumulasi cAMP yang terhambat PGF2 $\alpha$ . Demikian pula PGF2 $\alpha$  tidak menghambat kemampuan teofilin dalam meningkatkan kadar cAMP.

Pemberian kurkumin mengurangi kadar cAMP secara bermakna dibandingkan kadar cAMP kelompok pelarut maupun kelompok yang mendapat stimulasi LH, baik LH saja maupun LH+PGF2 $\alpha$ . Terbukti kurkumin memiliki aktivitas antigonadotropik LH seperti PGF2 $\alpha$ , dengan menghambat kadar cAMP yang distimulasi LH. Kurkumin tidak mencegah efek antigonadotropik dari PGF2 $\alpha$  terhadap kadar cAMP. Pada penambahan teofilin dan kurkumin, kadar cAMP lebih rendah secara bermakna dibandingkan kelompok yang mendapat teofilin saja. Hasil-hasil tersebut mengindikasikan bahwa kurkumin menghambat akumulasi cAMP oleh teofilin maupun LH, yang diikuti oleh hambatan pada produksi P4. Hal ini mengindikasikan bahwa kurkumin menghambat sinyal transduksi steroidogenesis KSL antara LH dengan cAMP, atau menghambat sinyal transduksi steroidogenesis KSL di *up stream* cAMP. Apakah kurkumin dapat menghambat hidrolisis ATP menjadi cAMP belum diketahui dan apakah kurkumin mengganggu substitusi GTP dari GDP belum bisa dijelaskan. Menurut Leung and Steel (1992) dan Wettschureek and Offermanns (2005) substitusi GTP dari GDP diinisiasi oleh

dimerisasi G $\alpha$  dan G $\beta\gamma$ . Selanjutnya G $\alpha$  akan berikatan dengan GTP untuk mengaktifkan adenilat siklase, suatu enzim yang menghidrolisis ATP menjadi cAMP.

Stimulasi LH meningkatkan produksi P4 oleh KSL. Menurut Thomas *et al.* (1978) pemberian LH dosis 1  $\mu$ g/ml pada KSL menyebabkan peningkatan produksi P4 hingga lima kali lipat kadar P4 basal. LH merupakan salah satu faktor luteotropik, selain *human chorionic gonadotropin* (HCG), prostaglandin E2 (PGE2), *Growth Hormone* (GH), *Insuline Like Growth Factor 1* (IGF-1), prolaktin (PRL) dan estriol (Niswender *et al.*, 2000; Arosh *et al.*, 2004). Sebagai gonadotrop (luteotrop) LH dapat meningkatkan aktivitas adenilat siklase, meningkatkan akumulasi cAMP dan aktivasi PKA (Thomas *et al.*, 1978). LH juga dapat meningkatkan ekspresi gen reseptor P4 (P4-R) pada sel luteal (Rekawiecki and Kotwica, 2007) dan meningkatkan ekspresi protein Cx43 (*connexin*) dan GJIC (*Gap Junctional Intracellular Communication*), suatu protein yang berperan dalam komunikasi antar sel luteal yang dapat meningkatkan produksi P4. GJIC dapat ditingkatkan oleh *second messenger* cAMP, PKC dan Ca<sup>++</sup> (Borowczyk *et al.*, 2007).

Dilaporkan oleh Christenson and Devoto (2003), bahwa hormon luteotropik memiliki mekanisme kerja secara langsung menstimulasi produksi P4 pada sel luteal melalui interaksi dengan reseptornya, maupun stimulasi secara tidak langsung melalui sintesis faktor pertumbuhan, sitokin dan faktor lain yang mempengaruhi fungsi sel luteal. Mekanisme peningkatan produksi P4 oleh LH diawali dengan pengaktifan reseptor *low density lipoprotein* (R-LDL) sebagai bahan utama steroidogenesis sel luteal. Kolesterol untuk proses steroidogenesis berasal dari kolesterol berbentuk lipoprotein (LDL dan HDL) dalam sirkulasi darah, kolesterol sintesis dari jalur *de novo* dari dua unit atom *carbon acetylcoenzyme A*

dan kolesterol hasil hidrolisis kolesterol ester oleh kolesterol esterase (Wilson and Foster, 1992).

Prostaglandin F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) pada KSL menyebabkan produksi P4 berkurang secara tidak bermakna dibanding kelompok pelarut (P4 basal). Hal ini menunjukkan bahwa PGF<sub>2</sub>α tidak menghambat produksi P4 basal. Berbeda dengan penelitian Thomas *et al.* (1978), PGF<sub>2</sub>α menghambat produksi P4 oleh KSL, baik PGF<sub>2</sub>α saja maupun yang sebelumnya terangsang LH. Produksi P4 yang tidak terhambat oleh PGF<sub>2</sub>α menunjukkan bahwa efek antigonadotropik PGF<sub>2</sub>α tidak konsisten (Thomas *et al.*, 1978). Diduga karena KSL umur 4 hari yang digunakan dalam penelitian ini merupakan fase *mid luteal*, kurang peka terhadap PGF<sub>2</sub>α. Kepekaan terhadap PGF<sub>2</sub>α meningkat sejalan dengan umur korpus luteum. Dilaporkan oleh Khan *et al.* (1979) dan Skarzynki and Okuda (1999) korpus luteum umur 3 hari kurang peka (resisten) terhadap PGF<sub>2</sub>α dibandingkan korpus luteum umur 7 hari. Pemberian PGF<sub>2</sub>α dapat menurunkan produksi P4 pada umur korpus luteum 7 hari melalui hambatan ekspresi protein StAR (Fiedler *et al.*, 1999). Resistensi PGF<sub>2</sub>α dikaitkan dengan peran enzim PGDH (*15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase*), suatu enzim dalam sitosol yang bekerja berlawanan dengan COX-2 dengan mencegah terjadinya akumulasi PGF<sub>2</sub>α. (Silva *et al.*, 2000).

Mekanisme aktivitas PGF<sub>2</sub>α pada produksi P4 oleh KSL dapat terjadi melalui jalur sinyal transduksi Ca<sup>2+</sup> dan PKC (*Diacylglycerol/DAG* atau *inositol triphosphate/IP3*) (Okuda *et al.*, 1998; Wiltbank *et al.*, 1990). Menurut Stocco *et al.* (2000) PGF<sub>2</sub>α dapat mengaktifasi ekspresi enzim *20α-hydroxysteroid dehydrogenase* (20α-HSD), suatu enzim yang mengkatabolisme progesteron dengan melibatkan gen faktor transkripsi Nur77.

Pemberian kurkumin dosis 100 μM menyebabkan produksi P4 lebih rendah bermakna dibandingkan produksi P4 kelompok pelarut. Kurkumin juga menunjukkan aktivitas sebagai antigonadotropik LH dengan menghambat peningkatan produksi P4 oleh LH. Kurkumin menyebabkan produksi P4 yang rendah dengan pemberian PGF<sub>2</sub>α yang mendapat stimulasi LH. Hal ini menunjukkan bahwa kurkumin menghambat produksi P4 basal dan bersifat sebagai antigonadotropik dengan menghambat stimulasi LH dalam meningkatkan produksi P4. Pada penambahan teofilin, kurkumin juga menghambat produksi P4. Hasil penelitian ini mendukung hasil penelitian sebelumnya oleh Soejono *et al.* (2001) bahwa kurkumin menurunkan produksi P4 pada pemberian teofilin.

Penelitian Purwaningsih *et al.* (2007) melaporkan bahwa penambahan forskolin (suatu aktivator adenilat siklase) pada KSL menyebabkan peningkatan produksi P4 oleh KSL meskipun ada kurkumin (kurkumin vs kurkumin + forskolin). Hal ini menunjukkan aktivitas adenilat siklase tetap meningkat meskipun ada kurkumin. Dengan adanya stimulasi LH, kurkumin menghambat produksi P4 meskipun ada forskolin (LH + kurkumin vs LH + kurkumin + forskolin). Hal ini menunjukkan bahwa dengan adanya stimulasi LH (tanpa adanya PGF<sub>2</sub>α), peningkatan aktivitas adenilat siklase oleh forskolin dalam menstimulasi produksi P4 dihambat oleh kurkumin. Dengan demikian kurkumin menghambat sinyal transduksi steroidogenesis KSL antara LH dengan adenilat siklase, atau kurkumin menghambat sinyal transduksi di *up stream* adenilat siklase. Apakah dengan menghambat pengikatan LH dengan reseptornya, mengurangi jumlah reseptor LH atau mengganggu kompleks G-Protein (Gα, Gβ, Gγ) belum bisa dijelaskan. Terbentuknya kompleks GTP-Gα akan mengaktifasi enzim adenilat siklase. Menurut



Leung and Steel (1992) dan Wettschureek and Offermanns (2005) aktivitas adenilat siklase diawali dengan terbentuknya kompleks GTP-G $\alpha$  yang lepas dari kompleks G $\beta$ G $\gamma$ . New and Wong (2007) menyatakan bahwa G $\alpha$  yang mengaktivasi sinyal transduksi melalui adenilat siklase/cAMP/PKA disebut G $\alpha_s$ .

Dengan demikian dapat disimpulkan kurkumin menghambat kadar cAMP dan kadar progesteron pada steroidogenesis kultur sel luteal (KSL) yang mendapat stimulasi LH dengan penambahan teofilin maupun tanpa penambahan teofilin. Kurkumin menghambat sinyal transduksi steroidogenesis sel luteal dengan sasaran aksi di *up stream* cAMP.

Penelitian lebih lanjut untuk mengungkap antara lain efek kurkumin terhadap reseptor LH, kompleks G-protein misalnya ekspresi protein G $\alpha$ , aktivitas enzim adenilat siklase perlu dilakukan untuk pengembangan kurkumin sebagai bahan alternatif pengaturan kesuburan yang mengarah pada penggunaan sebagai bahan antifertilitas.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan banyak terima kasih terutama kepada Yayasan YARSI dan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi lewat skema BPPS atas dukungan biaya untuk terselenggaranya penelitian ini.

### KEPUSTAKAAN

- Ahren K, Rosberg S, and Khan I 1990. On the Mechanism of Trophic hormone Action in the Ovary. In: Dumont, JE and Nunez, J (Eds) Hormones and Regulations 4. Elsevier North-Holland Biomedical Press.
- Ammon HPT, and Wahl MA 1991. Pharmacology of *Curcuma longa* Planta. Medica. 57: 1-7
- Arosh JD, Banu SK, Chapdelaine P, Madore E, Sirois J, and Fortier MA 2004. Prostaglandin Biosynthesis, Transport and Signaling in Corpus Luteum: A Basis for Autoregulation of Luteal Function. Endocrinol. 145 (5): 2551-2560
- Borowczyk E, Johnson M, Bilski JJ, Bilaska MA, Redmer, DA, Reynolds LP, and Grazul-Bilaska AT 2007. Role of gap junctions in regulation of progesterone secretion by ovine luteal cells *in vitro*. Reproduction. 133: 641-651
- Chin EC, Harris TE, and Abayasekara DRE 2004. Changes in cAMP dependent Protein Kinase (PKA) and Progesteron secretion in Luteinizing human granulose. Cells. J. Endocrinol. 183: 39-40
- Christenson K, and Devoto L 003. Cholesterol transport and steroidogenesis by Corpus Luteum. Reprod. Biol. Endocrinol. 1 (90): 1-9
- Fiedler EP, Plouffe Jr, Hales DB, Hales KH, and Khan I 1999. Prosta-Glandin F2 $\alpha$  Induces a Rapid Decline in Progesterone Production and Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression in Isolated Rat Corpus Luteum Without Altering Messenger Ribonucleic Acid Expression. Biol.Reprod. 61: 643-650.
- Freshney RI 1990. Culture of Animal Cells. A manual of Basic Technique, Second Ed, Alan R Lies Inc, New York
- Garg SK 1974. Effect of Curcuma longa (Rhizome) on Fertility in Experimental Animals. Planta. Medica. 26; 225-227.
- Keyes PL, Gadsby JE, Yuh KCM, and Bill CH 1983. The Corpus luteum, In Reproductive Physiology IV, International Review of Physiology. 27, RO Greep Eds, University Park Press Baltimore: 57-97.
- Khan MI, Rosberg S, Lahav M, Lamprecht SA, Selstam G, Herlitz H, and Ahren K 1979. Study of the mechanism of action of the inhibitory effect of PGF2 $\alpha$  on cyclic AMP accumulation in rat korpora lutea of various ages, Biol. Reprod. 21: 1175
- Leung PCK, and Steele GI 1992. Intracellular Signaling in the Gonade, Endocrinol. Rev. 13 (3): 476-498.
- New DC, and Wong YH 2007. Molecular Mechanisms mediating the G-Protein Coupled Receptor regulation of cell cycle progression. J. Mol. Signaling. 2-2 as doi:10.11871760-2128-2-2.
- Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, and McIntush EW 2000. Mechanism Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. Physiol. Rev. 80 (1): 1-29.
- Nugent C, Lopata A, and Gould MK 1975. The Effect of Exogenous Gonadotropins on Ovarium Adenylate Cyclase Activity. Endocrinol. 97 (3): 581-587.
- Nurcahyo H, and Soejono SK 2007. The effect of Curcumin and Pentagamavunon-0 on The Steroidogenesis, Proliferation Activity and Apoptosis in Cultured Porcine Granulosa Cells at Varying Stages of Follicular Growth. In Ed: Pudjono Ganjar, IG, Sismindari, Riyanto S, Meiyanto E, Susidarti RA, Ikawati, and Nugroho AK. Ritmaleni. Recent Development in Curcumin Pharmacology. Proceeding of the International

- Symposium on Recent Progress in Curcumin Research. Faculty of Pharmacy Gadjah Mada University, Yogyakarta.
- Okuda K, Uenoyama Y, Lee KW, Sakumoto R, and Skarzynski DJ 1998. Progesterone Stimulation by Prostaglandin F2 $\alpha$  Involves the Protein Kinase Pathway in Cultured Luteal Cells. *J. Reprod. Dev.* 44: 79-84.
- Pick N, Cameron SC, Arad D, and Av-Gay Y 2004. Screening of Compounds Toxicity against Human Monocyte cell line THP-1 by Flow Chemistry. *Biol. Proce. Online.* 6(1): 220-225.
- Purwaningsih E, Meiyanto E, Dasuki Dj, Soejono SK 2007. Efek kurkumin sintesis dan Pentagamavunon-0 terhadap Produksi Progesteron Kultur Sel Luteal dengan Pemberian Forskolin. *J. Kedok. Yarsi.* 15(3):171-177.
- Ravindranath N, Little - Ihrig L, Benyo DF, and Zelesnik AJ 1992. Role Of Luteinizing Hormone in the Expression of Cholesterol Side-Chain Cleavage Cytochrome P450 and 3 $\beta$  - Hydroxysteroid Dehydrogenase,  $\Delta^{5-4}$  Isomerase Messenger Ribonucleic Acids in the Primate Corpus Luteum. *Endocrinology.* 131 (5): 2065-2070.
- Rekawiecki R, and Kotwica J 2007. Molecular regulation of progesterone synthesis in the bovine corpus luteum. *J. Vet. Med.* 52 (9): 405-412.
- Sardjiman 2000. Synthesis of Some New Series of Curcumin Analogues, Antioxidative, antiinflamatory, antibacterial Activities, and Qualitative-Structure Relationship. Dissertation. Gadjah Mada University, Yogyakarta, 2000.
- Shiraishi K, and Ascoli M. 2006. Activation of the Lutropin/Choriogonadotropin Receptor in MA-10 Cells Stimulates Tyrosine Kinase Cascades that Activated Ras and the Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK1/2). *Endocrinology.* 147 (7): 3419-3427.
- Silva FJ, Juengel JL, Rollyson MLK, and Niswender GD 2000. Prostaglandin Metabolism in the ovine Corpus luteum: Catabolisme of PGF2 $\alpha$  Coincides with resistance of Corpus luteum to PGF2 $\alpha$ . *Biol. Reprod.* 83: 1229-1236.
- Skarzynski DJ, and Okuda K 1999. Sensitivity of Bovine Corpora Lutea to Prostaglandin F2 $\alpha$  Is Dependent on Progesterone, Oxytocin and Prostaglandin. *Biol. Reprod.* 60: 1292-1298.
- Soejono SK, Amin SM, Nurcahyo H, and 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.
- Stauffer RI 2003. Progesterone as mediator of Gonadotropin Action in the Corpus Luteum Beyond Steroidogenesis. *Human. Reprod. Update.* 9(2): 94-117.
- Stocco CO, Zhong L, Sugimoto Y, Ichikawa A, Lau LF, and Gibori G 2000. Prostaglandin F2 $\alpha$ -induced Expression of 20 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Involves the Transcription Factor Nur77. *J. Biol. Chem.* 275 (47): 1114-1119.
- Tang WJ, and Hurley JH 1998. Catalytic Mechanism and Regulation of Mammalian Adenylyl Cyclase. *Minireview. Molec. Pharmacol.* 54: 231-240.
- Thomas JP, Dorflinger LJ, and Behrman HR 1978. Mechanism of The Rapid Antigonadotropic Action of Prostaglandins in Cultured Luteal Cells, *Proc Natl Acad Sci.*, 75 (3): 1344-1348.
- Wettschureek N, and Offermanns S 2005. Mammalian G Protein and Their Cell Type Specific Functions. *Physiol Rev* 85: 1159-1204.
- Wiltbank MC, Diskin MG, Flores JA, and Niswender GD 1990. Regulation of The Corpus Luteum by Protein Kinase C. II. Inhibition of Lipoprotein-Stimulated Steroidogenesis by Prostaglandin F2 $\alpha$ . *Biol. Reprod.* 42: 239-245.
- Wilson JD, and Foster DW Eds 1992. *Williams Textbook of Endocrinology.* 8<sup>th</sup> ed WB Saunders Co. Philadelphia.
- Zulkah N, Soejono SK, and Suwono 2000. Pengaruh kurkumin sintetik Terhadap Produksi progesteron oleh kultur sel luteal tikus dengan perangsangan hCG dan PGF2 $\alpha$ . *Sains Kedokteran, Berkala Penelitian Pascasarjana Ilmu-Ilmu Kesehatan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.*