

Efek Ekstrak Pegagan (*Centella Asiatica*) pada *Rattus Norvegicus* Wistar yang Dilakukan Ovariectomi Terhadap Proliferasi Epitel pada Dinding Vagina

Effect Of Pegagan (*Centella Asiatica*) Extract in Ovariectomized Wistar-strain *Rattus norvegicus* On Epithelial Proliferation Of Vaginal Wall

Abkar Raden

Fakultas Kedokteran UNS

Bagian Obstetri dan ginekologi FK UNS/ RSUD Dr Moerwardi Surakarta

Telp. 0271-665145

Email : drabkar@yahoo.com

Abstract

Dyspareunia (coital pain) is one of several symptoms commonly found in menopausal women. The pain occurs resulting from reduced collagen and the atrophy of vaginal wall. The symptom can be prevented with estrogen therapy or phytoestrogen. Pegagan is one of phytoestrogens that is able to increase collagen proliferation and synthesis. It is expected that pegagan administration may result in the thickening and elastisizing of vaginal wall. So far, the thickening and elastisizing of vaginal wall remain unclear.

The objective of this study was to explain the thickening and elastisizing of vaginal wall due to increased collagen synthesis and epithelial proliferation-maturation on the vaginal wall of pegagan extract-receiving ovariectomized Wistar-strain *Rattus norvegicus* rats.

This was an experimental study using posttest only control group design. Thirty-five female rats, aged 4 months and bodyweight of 290-300 grams, were ovariectomized. The rats were randomized into 4 groups, each consisting of 7 rats. Preliminary study was performed to identify the atrophy of vaginal wall, and it was found that the atrophy occurred on day 21. Group 1 received no pegagan extract. Groups 2, 3, and 4 received pegagan extract on day 22 post-ovariectomy in the following doses: 30 mg, 60 mg, and 120 mg/Kbw/day, respectively, for 40 days per oral. On day 61 post-ovariectomy, the rats were histological examination for the thickening of vaginal wall.

Results were analyzed using Univariate analysis indicated significant increase ($p < 0.05$) in the proliferation and maturation of vaginal wall epithelium.

In conclusion, the administration of pegagan extract increases the thickening and elastisizing of vaginal wall.

Keywords : *Centella asiatica*, vaginal epithelial proliferation, phytoestrogen,

Pendahuluan

Nyeri sanggama (*dyspareunia*) merupakan salah satu keluhan yang sering di jumpai pada perempuan menopause karena penurunan hormon estrogen. Berkurangnya hormon estrogen karena ovarium tidak berfungsi optimal. Kondisi ini mengakibatkan mengakibatkan dinding vagina menipis, kering dan kurang elastis (*dryness vaginal*) karena terjadi proses atrofi epitel dan penurunan kolagen (Cuozi *et al.*, 1995; Baziad, 2003; Al-Baghdadi dan Ewies, 2009).

Keluhan menopause dapat dikurangi dengan banyak dan teratur memakan sayur dan buah yang mengandung fitoestrogen (estrogen dari herbal) seperti kacang, kedelai, tahu, tempe, bengkuang dan buah anggur. Penelitian pada perempuan Jepang yang menopause dan sering mengkonsumsi buah dan sayur, seperti kacang (peanut), kedelai (soy), tahu (*tofu*), terbukti menurunkan keluhan *hot flushes* (Davis, 2001), tetapi belum terbukti berpengaruh terhadap perbaikan elastisitas vagina (Noerpramana, 2005). Demikian juga pada penelitian meta analisis dengan pemakaian fitoestrogen yang lain seperti Black Cohosh, Red Clover hanya menolong dalam masalah

hot flushes, berkeringat di malam hari, kesehatan jantung dan memperlambat kehilangan masa tulang, tetapi belum ada bukti yang berefek pada perbaikan keluhan *dyspareunia*. (Noerpramana, 2005).

Di Sumatera, khususnya di daerah Aceh terdapat kebiasaan mengkonsumsi daun pegagan (*pegaga*) sebagai makanan khas disana, selain itu juga banyak dikonsumsi setelah melahirkan dalam upaya mempercepat penyembuhan luka persalinan. Menurut penelitian, pegagan atau *Centella asiatica*, banyak ditemukan di Indonesia, yang mempunyai khasiat meningkatkan sintesis kolagen dan proliferasi-maturasi epitel (Winarto dan Surbakti, 2005; Lee, 2006). Hal ini juga sudah dibuktikan oleh Coldren, *et al.*, (2003) dan Lee (2006) pada hewan coba yang dibuat luka menjadi lekas sembuh dengan pemberian pegagan. Efek pegagan yang bisa meningkatkan sintesis kolagen dan proliferasi epitel, maka pemberian pegagan pada perempuan menopause dimungkinkan dapat mengurangi atrofi vagina tersebut, sehingga dengan peningkatan sintesis kolagen dan proliferasi epitel diharapkan dinding

vagina menjadi lebih tebal dan elastis. Sampai saat ini mekanisme penebalan dan elastisitas dinding vagina pada perempuan menopause dengan pemberian ekstrak pegagan belum jelas.

Berdasarkan hal tersebut maka peneliti berupaya untuk menggunakan pegagan sebagai dasar untuk memicu epitelisasi vagina pada perempuan yang mengalami penipisan epitel vagina pada kondisi menopause. Perempuan menopause pasti mengalami proses degenerasi, khususnya terjadi penipisan epitel dan penurunan elastisitas pada dinding vagina oleh karena penurunan hormon estrogen sehingga hal ini dapat mempengaruhi faktor psikis dan fisik dari perempuan yang bersangkutan, sehingga hal tersebut perlu mendapatkan suatu perhatian. Salah satu upaya yang dilakukan adalah dengan memperbaiki kualitas sel penyusun dinding vagina. Untuk perbaikan kualitas tersebut saat ini dilakukan dengan cara pemberian hormon estrogen, namun penggunaan hormon estrogen memberikan efek negatif yaitu meningkatkan kejadian kanker payudara dan kanker rahim pada pemakaian jangka panjang, juga harganya yang mahal sehingga sulit dijangkau oleh masyarakat yang sosial ekonomi rendah. Sebagai penggantinya adalah diupayakan estrogen dari herbal yaitu fitoestrogen. Karena fitoestrogen tidak mempengaruhi peningkatan kejadian kanker payudara dan rahim. Pemberian fitoestrogen pegagan diharapkan dapat mempengaruhi proliferasi dan maturasi sel epitel (*squamous epithelial*), akhirnya dinding vagina diharapkan menjadi lebih tebal dan elastis.

Oleh karena itu bila pada perempuan menopause diberikan pegagan diharapkan dapat menekan radikal bebas dan proliferasi epitel di seluruh tubuh termasuk di vagina, sehingga vagina menjadi lebih baik kualitasnya karena terjadi penebalan yang diharapkan akan terjadi peningkatan elastisitasnya. Untuk membuktikan pengaruh pegagan terhadap penebalan dinding vagina pada perempuan menopause maka perlu dilakukan suatu penelitian. Oleh karena bahan penelitian ini sampelnya dinding vagina tidak diambil dari jaringan manusia oleh karena terhalang faktor etik, maka peneliti menggunakan model hewan coba tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar. Oleh karena itu dibuktikan secara eksperimental terjadinya peningkatan penebalan lapisan epitel dinding vagina tikus Wistar pasca ovariektomi yang diberi larutan ekstrak pegagan.

Materi dan Metode Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental, dipilih jenis ini karena sampel diambil

secara random, perlakuan dan kontrol lebih terkendali dan terukur. Penelitian eksperimen untuk mengukur penebalan dinding vagina yang diasumsikan dapat meningkatkan elastisitas karena pemberian ekstrak etanol pegagan berbagai dosis pada tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar.

Sampel penelitian ini adalah tikus betina (*Rattus norvegicus*) strain Wistar umur 4 bulan dengan berat 290-300 gram, sehat dan yang telah diovariektomi sebagai hewan model menopause.

Atrofi pada hewan coba tersebut terjadi pada hari ke 21 setelah ovariektomi, dengan pengamatan dinding vagina tinggal lapisan epitel sel parabasal. Penelitian baru dilakukan setelah tikus mengalami atrofi pada hari ke 21.

Tahapan penelitian

Oleh karena penelitian ini tidak mungkin dilakukan pada manusia, maka peneliti menggunakan model hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar. Untuk membuat hewan coba menopause, maka dilakukan perlakuan dengan cara ovariektomi. Untuk melihat efek rendahnya estrogen pada hewan coba dilakukan pemeriksaan dinding vagina setiap minggu sampai ada perubahan ke arah atrofi, berarti efek hipoestrogen sudah terjadi, berdasarkan penelitian pendahuluan diperoleh hasil kejadian atrofi pada hari ke 21 setelah ovariektomi.

Pembuatan Hewan Model Menopause

Dilakukan ovariektomi dilakukan menurut metode Ingle DJ dan Grith JQ yang dimodifikasi yaitu tikus dianestesi dengan menggunakan ketamin dosis 40 mg/kgBB, im. Bulu abdomen tikus dicukur, sterilisasi menggunakan savlon -betadine, kemudian ditutup doek steril. Dilakukan insisi transabdominal kira-kira diatas uterus sepanjang 1,5 - 2 cm lapis demi lapis sampai menembus dinding peritoneum. Dicari uterus, kemudian diikuti kornu uteri-oviduk-ovarium kiri. Ovarium tampak seperti sekelompok anggur yang translusen. Oviduk dan ovarium dibebaskan dari jaringan lemak dan jaringan ikat sekitarnya, selanjutnya oviduk bagian distal dan ovarium diligasi dan kemudian diangkat. Prosedur yang sama dilakukan pada bagian yang kanan. Eksplorasi tidak didapatkan perdarahan.

Luka insisi di jahit lapis demi lapis, operasi selesai. Terapi post operasi diberikan injeksi gentamisin dengan dosis 60-80 mg/kgBB/hari selama 3 hari (Ananingati, 2007).

Perlakuan Ekstrak Etanol Pegagan

Daun pegagan, disortir, dicuci dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada ruangan yang sudah diatur kelembabannya. Daun kering tersebut diayak dengan mesin pengayak untuk memperoleh serbuk simplisia kering. Kemudian serbuk simplisia itu diekstraksi, secara maserasi yang dimodifikasi dengan pengadukan, sebanyak 3 kali dengan pelarut n-heksan. Filtrat ditampung dan residu diangin-anginkan untuk menghilangkan sisa pelarut n-heksan. Selanjutnya residu tersebut diekstraksi lagi, secara maserasi yang dimodifikasi dengan pengadukan, sebanyak 3 kali dengan menggunakan pelarut etanol 60%. Filtrat dari pelarut etanol 96% tersebut ditampung dan dipekatkan dengan menggunakan rotavator. Ekstrak kental yang didapat, diasamkan dengan HCL 1% sampai pH 3-4 lalu. Kemudian ekstrak tersebut ditambahkan kloroform dengan perbandingan 1: 3. Kedalam corong pisah untuk

dilakukan partisi kloroform – air. Fasa kloroform – air dipisahkan pH 8-9 kemudian dilakukan partisi kloroform – air lagi sebanyak 3 kali, seluruh fasa air yang telah dipisahkan ditampung, kemudian di *freeze drying* untuk mendapatkan serbuk kering.

Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian terhadap 35 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar, betina, berumur 4 bulan dengan berat badan sekitar 290-300 gram, yang terbagi secara random dalam 5 kelompok. Satu kelompok untuk penelitian pendahuluan dan 4 kelompok untuk perlakuan pasca ovariectomi.

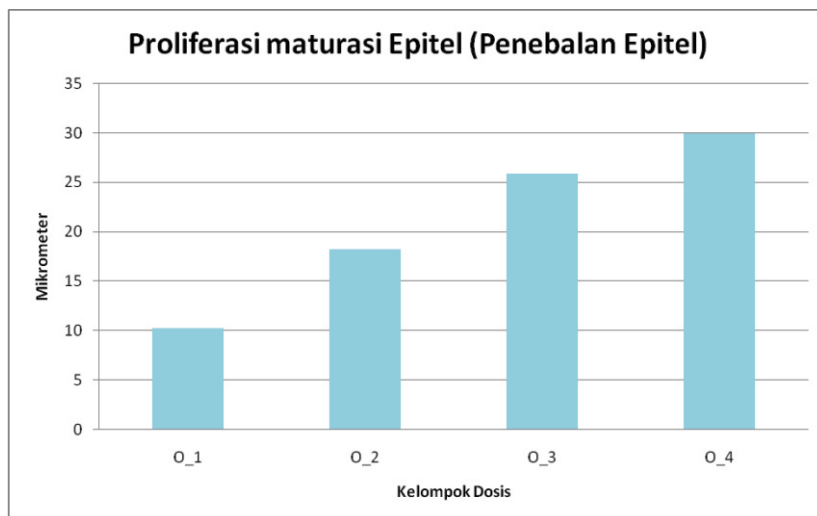
Dilakukan uji univariat (anova) untuk melihat perbedaan antara pemberian dosis pada Proliferasi-maturasi epitel. Dari (Lampiran 3) (Tabel 5.2. Gambar 5.2) menunjukkan adanya perbedaan signifikan akibat peningkatan dosis pemberian ekstrak pegagan. ($p < 0,05$).

Tabel 1. Rerata dan Standar Deviasi proliferasi-maturasi data penelitian

VARIABEL	Kel.O_1		Kel.O_1		Kel.O_1		Kel.O_1		P
	Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD	
Proliferasi m. epitel (μ)	10.286	.5872	18.229	1.1856	25.943	5.6824	30.029	5.5790	.000

Pada Tabel 1 menunjukkan proliferasi dan maturasi epitel cenderung naik (dalam mikrometer) akibat pemberian ekstrak pegagan sesuai peningkatan

dosis, dibandingkan tanpa diberi ekstrak pegagan menunjukkan suatu perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

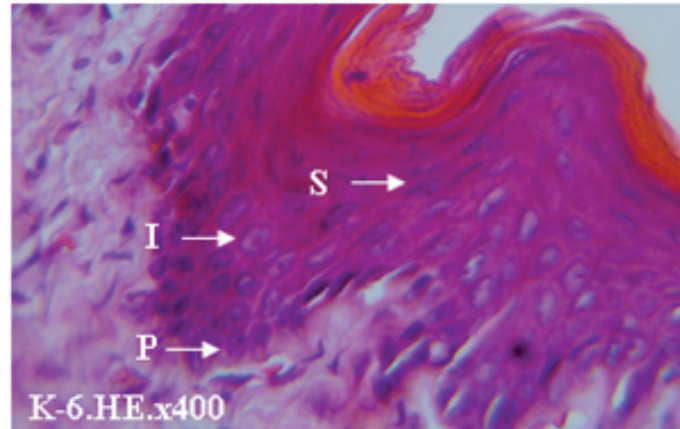


Gambar 1. Rerata dan Standar Deviasi proliferasi-maturasi data penelitian

Pada Gambar 1. menunjukkan kenaikan proliferasi-maturasi (penebalan) epitel dinding vagina pada semua kelompok perlakuan, setelah peningkatan dosis pemberian ekstrak pegagan dibandingkan dengan kelompok kontrol (0_1), tanpa ekstrak pegagan.

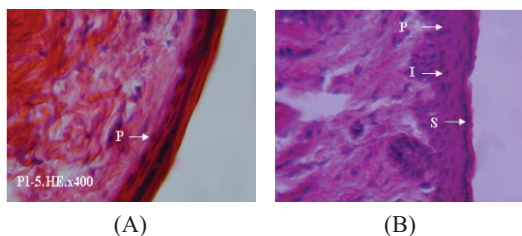
Pada Gambar 5.4 (A) Menunjukkan susunan epitel dinding vagina, gambar ini diambil pada hewan

coba normal yang belum diovariectomi susunan epitelnya masih lengkap, terdiri dari sel parabasal, intermediate dan superfisial dan pada gambar (B) tanda panah menunjukkan sabut kolagen yang masih banyak memberikan reaksi positif, pada hewan coba normal yang belum diovariectomi.



Gambar 2. Gambaran lapisan epitel dinding vagina pada tikus normal

Keterangan: Menunjukkan susunan epitel bertahap pada vagina hewan coba normal P: sel parabasal, I: intermediate, S: superfisial (HE,x400)



Gambar 3. Gambaran lapisan epitel vagina hewan coba yang mengalami atrofi dan yang telah mendapatkan ekstrak pegagan

Keterangan: (A) menunjukkan lapisan epitel yang menipis (atrofi), yang diambil dari jaringan vagina Wistar 21 hari setelah ovariektomi (HE,x400), sedangkan (B) menunjukan gambaran epitel dari Wistar yang diovariectomi kemudian diberikan ekstrak pegagan dosis 120 mg/kgBB, selama 40 hari, P: sel parabasal, I: epitel intermedia, S: epitel superfisial (HE,x400)

Pada Gambar 3 (A) Tampak epitel vagina sudah menunjukkan atrofi, menipis setelah ovariektomi 21 hari dibandingkan dengan jaringan vagina pada penelitian pendahuluan(gambar 3. A). Gambar 3. (B) Setelah diberi ekstrak pegagan 40 hari

tampak ada perubahan penebalan dinding vagina, muncul lapisan intermediate dan superfisial.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental untuk menjelaskan efek ekstrak pegagan terhadap penebalan dan elastisitas dinding vagina. Pada penelitian ini digunakan hewan coba tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar betina yang berumur 4 bulan dengan berat badan antara 290-300 gram sebanyak 35 ekor yang diovariectomi. Peneliti menggunakan tikus Wistar karena tikus Wistar merupakan tikus laboratorium, yang mudah diternakkan, mudah diperoleh dalam jumlah besar dan pemeliharaan gampang. Sedang binatang lain seperti kelinci memerlukan kandang yang besar, biaya yang banyak. Berdasarkan penghitungan besar sampel, diperoleh $n = 7$ per kelompok. Pada penelitian ini dibutuhkan 4 kelompok hewan coba yang dialokasikan pada setiap kelompok secara random (*allocation random sampling*). Penelitian pendahuluan dilakukan untuk menentukan atrofi dinding vagina yang teramati. Waktu tersebut ditemukan pada hari ke 21. Pembagian 4 kelompok untuk melihat efek ovariektomi dan efek pemberian dosis ekstrak pegagan terhadap penebalan dinding vagina.

Sampai saat ini dosis pemberian fitoestrogen yang efektif belum ada kesepakatan di antara ahli atau

peneliti. Pada umumnya dimulai dari dosis rendah 20 mg sampai 100 mg/kbb/hari. Dosis yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan peneliti sebelumnya pada fitoestrogen (*Pueraria Lobata*) pada tikus hewan coba yaitu dosis 30mg dan 60 mg/kbb/hari (Ananingati, 2007) dan peneliti menambah dengan dosis 120 mg/kbb/hari dengan maksud mencari efek fitoestrogen bila dosis dinaikkan. Kelompok (0_1), adalah tikus ovariectomi yang tidak diberi ekstrak pegagan. Kelompok (0_2), (0_3), (0_4) adalah tikus ovariectomi yang diberi ekstrak pegagan dengan masing-masing dosis 30mg, 60mg, 120mg/kgbb/hari. Sampai hari ke-61 pasca ovariectomi kelompok tikus yang tidak diberi ekstrak pegagan dan yang diberi ekstrak pegagan dikorbankan. Alasan penelitian sampai 40 hari setelah ovariectomi sebagai ekstra polasi, bahwa penelitian efek fitoestrogen pada manusia untuk pengobatan sindrom menopause baru berefek sekitar pemakaian 8 bulan (8 kali haid), jadi pada tikus kira-kira 8 kali siklus reproduksi sama dengan 40 hari. Sampel dinding vagina diambil dan dilakukan pemeriksaan histologis untuk melihat penebalan epitel vagina.

Pada pengamatan mikroskopis sayatan dinding vagina dengan pengecatan Hematoksin eosin (Gambar 5.5) membuktikan terjadi peningkatan penebalan dinding vagina pada hewan coba setelah diberi ekstrak pegagan, terutama pada dosis 120mg/kbb/hari dibandingkan dengan dinding vagina pada hewan coba yang tidak diberi ekstrak pegagan. Pada pemeriksaan imunohistokimia menunjukkan terjadi peningkatan RE- β , Kolagen tipe-1(KT-1) dan TGF- β serta penurunan Hsp70, yang kemudian meningkat lagi setelah hewan coba diberi ekstrak pegagan dibandingkan dengan hewan coba yang tidak diberi ekstrak pegagan, ini membuktikan terjadi respons yang baik pada pemberian ekstrak pegagan pada peningkatan penebalan dan peningkatan kolagen dinding vagina sehingga diharapkan vagina menjadi lebih elastis pada kondisi menopause. Dengan adanya penebalan dan peningkatan kolagen tipe 1, di dinding vagina maka respon ini sangat berguna untuk pengobatan nyeri sanggama yang superfisial (karena efek estrogen berkerkurang), sedang untuk nyeri sanggama yang dalam (*deep dyspareunia*) belum bisa digunakan karena penyebab *deep dyspareunia* bukan karena hipoestrogen tetapi karena adanya endometriosis (estrogen masih tinggi) yang tumbuh di ligamentum sakrouterina sehingga ligamentum menjadi kaku dan mengeluarkan *prostaglandin* yang menurunkan nilai ambang rasa sakit sehingga nyeri waktu penetrasi penis(sanggama).Bila diberikan pada

perempuan yang reseptor estrogennya masih tinggi (menopause prekok) maka efektifitas dari pegagan diharapkan responnya menjadi lebih baik.

Kesimpulan

Pegagan terbukti sebagai fitoestrogen yang dapat meningkatkan penebalan dan peningkatan kolagen dinding vagina tikus yang diovariectomi.

Daftar Pustaka

- Al-Baghdadi O and Ewies AAA. 2009. Topical estrogen therapy in the management of post menopausal vaginal atrophy : An up-to date overview. *Climacteric*. 12. 91-105
- Alexande Asea, Rehli M and Kabingu E . 2002. Novel Signal Transduction Pathway Utilized by extracellular Hsp - 70 , *J.Biol.Chem.*277(17):15028-15035.
- Ananingati, 2007. Pengaruh isoflavon genestein daidzein ekstrak *Pueraria Lobata* terhadap ekspresi reseptor beta pada endotel aorta tikus hipoestrogen . Tesis.FK.Unibraw.Malang.
- Baziad Ali,2003. Menopause dan Andropause.ed.1, Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo,hal 100-123.
- Coldren, Christopher D., Hashim, P., Ali, M. Johari, OH, Se-Kyung.,Sinkey anthony J. and Rha Cho Kyun. 2003. Gene expression in the Human Fibroblast induced by Centella asiatica Triterpenoids. *Planta Med New York* 725-732.
- Cuozi RJ, Helzsouer KJ, and Fetting JH. 1995. Prevalence of menopausal symptom among women with a history of breast cancer and attitudes to wardestrogen replacement therapy. *Johns hopkin:medical inst*
- Davis SR, 2001. Phytoestrogen therapy for menopausal symptoms?.*BMJ*. 323: 354-355.
- Lee Jongsung , 2006. Asiaticoside Induce Human Collagen I Synthesis through TGF β Receptor I Kinase (T β RI Kinase)-Independent Smad Signaling. *Planta Med*. 72:324-328
- Noerpramana, NP,2005, Fitoserm: Terapi terkini dalam mengatasi Masalah Kesehatan Menopause, Simposium PERMI, Jakarta, hlm.16-36
- Shakir, Ali, and Derek A.M. 2004, Review Article Signal Transduction via NF-KB pathway:a argeted treatment modality for infection, inflammation and repair, 22:67-69)

Winarto W.P dan Surbakti M., 2005. Khasiat dan Manfaat Pegagan Tanaman Penambah Daya Ingat. Agro Media Pustaka. Jakarta. Hal 2-3