

THE ROLE OF LEAF WATER CLOVER (*Marsilia crenata*) SQUEEZE TOWARDS ESTROGEN BLOOD LEVEL AND UTERINE HISTOLOGY IN RATS (*Rattus norvegicus*)

Pratiwi Trisunuwati
Lecturer at Faculty of Animal Husbandry, University of Brawijaya
e-mail: pratiwi_trisunuwati@yahoo.com

ABSTRACT

Water clover (*Marsilea crenata*) is contained with isoflavones, shown to mimic the role of the female hormone estrogen. Isoflavones binding to estrogen receptors that produce beneficial effects. However, research on the optimal dose of water clover use is still not much studied. The purpose of this study was to determine the effects of leaf squeeze water clover towards estrogen and how affect the histology of uterine. This study used 30 female Wistar Rats (*Rattus norvegicus*) divided into six groups. P1 as a negative control group, P2 as a positive control group. P4, P5 and P6 were given squeeze water cloverleaf concentrations given as follow (6.25%, 12.5%, 25%, 50%). The results was analized with one way ANOVA showed significant ($p < 0.05$) between groups, among group P3, P4, P5 and P6 increase the blood estrogen mostly higher than the negative control (P1) and a positive control (P2). Histological features of the uterus in the positive control group showed endometrial lining thicker than the negative control group. Histology of the uterus in the treatment group P4, P5 and P6 are also seen endometrium thickening as in group P3. This research has proved that water clover extract consumption show a promising supporting phytoestrogen hormone therapy in the future both in animal and human. However there was needed a much futher research in order to found a proper dose for as a prospective pytotherapy.

Keyword: Water Clover (*Marsilia crenata*), estrogen, uterine histology

PENDAHULUAN

Daun semanggi air (*Marselia crenata*) memiliki kandungan bioaktif yaitu isoflavon yang termasuk flavonoid glycosida termasuk di dalam nya adalah genistein dan deidzein. Ke duanya mempunyai aktivitas di dalam tubuh mirip dengan estrogen. Karena berasal dari tumbuhan maka biasa disebut dengan phytoestrogen yang merupakan substrat dari tumbuhan yang memiliki aktivitas mirip estrogen (Glover and Assinder, 2006). Menurut Jefferson, *et.al.*(2002)fitoestrogen merupakan dekomposisi alami yang ditemukan pada tumbuhan yang memiliki banyak kesamaan dengan estradiol yang merupakan bentuk alami estrogen yang

potensial.. Penggunaan phytoestrogen memiliki efek samping yang lebih kecil dibandingkan dengan estrogen kimiawi sintesis atau bahan lain seperti hormon pengganti (*hormonal replacement therapy/HRT*) pada wanita (Achdiat, 2003).

Phytoestrogen dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu *isoflavon*, *coumesten*, dan *lignans*. Senyawa isoflavon di dapatkan terdistribusi secara luas pada berbagai bagian tanaman, baik pada bagian akar, batang daun, maupun buah (Hernawati, 2009). Daun semanggi memiliki kandungn isoflavon *formononetin* dan *biochanin A* yang cukup tinggi (Gultekin, 2006). Isoflavon merupakan phytoestrogen yang sering digunakan di masyarakat dan dapat

dikelompokkan menjadi tiga yaitu *daidzein*, *glycetein*, dan *genistein*. *Genistein* merupakan isoflavon yang paling banyak dijumpai yaitu sekitar 60% dari seluruh isoflavon, terutama pada kacang-kacangan. Ternyata *Genistein* mempunyai afinitas terhadap *reseptor estrogen β* (ER β), sejauh ini dikatakan paling efektif pada penelitian pada hewan coba dan aman untuk manusia.

Aktivitas estrogenik isoflavon terkait dengan struktur kimianya yang mirip dengan stilbestrol, yang biasa digunakan sebagai obat estrogenik. Bahkan, isoflavon mempunyai aktivitas yang lebih tinggi dari stilbestrol. Menurut Oilis (1962 dalam Pawiroharsono, 2007), *daidzein* merupakan senyawa isoflavon yang aktivitas estrogenik lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa isoflavon lainnya. Aktivitas estrogenik tersebut terkait dengan struktur isoflavon yang dapat ditransformasikan menjadi equol mempunyai struktur fenolik yang mirip dengan hormon estrogen.

Estrogen membutuhkan reseptor estrogen (ERs) yang dapat aktif di bawah kendali gen pada kromosom yang disebut ER. Beberapa target organ seperti pertumbuhan ambing, tulang, dan empedu responsif terhadap ER tersebut. Isoflavon, khususnya *genistein*, dapat terikat dengan ER. Walaupun ikatannya lemah, tetapi dengan β -ER mempunyai ikatan sama dengan estrogen (Kristiono, 2009).

Isoflavon atau fitoestrogen dapat berikatan dengan reseptor estrogen sebagai bagian dari aktivitas hormonal, menyebabkan serangkaian reaksi yang menguntungkan tubuh. Senyawa isoflavon terbukti juga mempunyai efek hormonal, khususnya efek estrogenik. Efek estrogenik ini terkait dengan struktur isoflavon yang dapat ditransformasikan menjadi equol yang mempunyai struktur fenolik mirip dengan hormon estrogen. Strukturnya yang mirip dengan hormon esterogen menyebabkan

terjadinya peningkatan ikatan isoflavon dengan reseptor esterogen (Pradana, 2009). Isoflavon mengalami biotransformasi oleh mikroflora pada saluran cerna kemudian diabsorpsi dan mengalami perubahan pada sistem enterohepatik serta mencapai sirkulasi dalam kaitannya dengan estrogen endogen. Phytoestrogen dan turunannya memiliki kekuatan hormonal dan non hormonal ditinjau dari segi efek biologis yang kaya dengan phytoestrogen. Phytoestrogen bekerja melalui inhibisi *enzim 17-hidroksisteroid oksidoreduktase* tipe 1 yang mampu melakukan konversi estron menjadi estradiol yang poten, pengikatan reseptor estrogen yang diikat secara antagonis, dan menyediakan efek inhibisi (Biben, 2012).

Hormon estrogen adalah hormon kelamin yang diproduksi oleh ovarium untuk merangsang pertumbuhan organ seksual, seperti kelenjar mammae dan mengatur siklus birahi. Hormon estrogen merupakan hormon steroid kelamin karena memiliki struktur kimia dengan inti steroid dan secara fisiologis sebagian besar diproduksi oleh kelenjar endokrin sistem reproduksi. Hormon ini dihasilkan oleh folikel de Graaf (Koswara, 2006). Flavonoid dari golongan isoflavon merupakan suatu senyawa yang bersifat estrogenik karena mampu merangsang pembentukan estrogen di dalam tubuh.

MATERI DAN METODE

Peneilitian ini merupakan penelitian murni (*true experimental*) dengan RAL dan uji statistic Anova, dilanjutkan dengan MDRS apabila terdapat pengaruh signifikan dari perlakuan terhadap variable pengamatan. Hewan model yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor tikus betina indukan (*Rattus norvegicus*) berumur 2 bulan dengan berat 100–150 gram, perasan daun semanggi dengan konsentrasi 20%, 40%, 60% dan

80% sebagai bahan perlakuan dengan volume 2 cc per ekor per hari tiap perlakuan, untuk kontrol negatif digunakan larutan normal saline yang diberikan 2cc per ekor, untuk kontrol positif digunakan derivat hormone sintetis, perlakuan dilakukan setiap pagi setelah swab epitel vagina dengan sonde lambung. Pakan dan minum di berikan *ad libitum* setiap hari. (Tabel.1)

Tabel 1. Perlakuan penelitian

Kelompok	Keterangan
Kontrol (-)	Perlakuan larutan <i>normal saline</i>
Kontrol (+)	Perlakuan larutan <i>derivate</i> estrogen sintetis
Perlakuan I	Perlakuan perasan daun semanggi air (20%)
Perlakuan II	Perlakuan perasandaun semanggi air (40%)
Perlakuan III	Perlakuan perasan daun semanggi air (60%)
Perlakuan IV	Perlakuan perasan daun semanggi air (80%)

Variabel yang di amati adalah kadar estrogen darah pada pertengahan dan akhir perlakuan dengan Elisa Kit, sedangkan pengamatan histopatologis dengan pewarnaan HE pada daerah perifer ovarium untuk pengamatan perkembangan folikel pada proses folikulogenesis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji statistik *One Way ANOVA* menunjukkan adanya perlakuan remasan daun semanggi air berpengaruh signifikan ($P < 0,05$) terhadap jumlah kadar estrogen darah hewan model. Demikian pula perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada kadar estrogen darah antar kelompok perlakuan baik pada hari ke-7 ataupun hari ke-24 setelah pemberian perasan daun semanggi air (*Marsilea crenata*), peningkatan paling tinggi terdapat pada kelompok konsentrasi 80%. (Tabel.2)

Tabel 2. Kadar hormone estrogen darah

perlakuan	(pg/ml) hari ke 7 X±SD	(pg/ml) hari ke 24 X±SD
P(+)	216.3±267.6 ^{ab}	360.6±208.5 ^{ab}
P(-)	136.4±122.9 ^{ab}	238.8±142.8 ^a
P(1)	492.2±122.2 ^b	393.0±120.4 ^{ab}
P(2)	133.7±115.3 ^a	110.3±69.7 ^a
P(3)	256.0±137.0 ^a	319.3±125.3 ^{ab}
P(4)	381.0±150.2 ^{ab}	578.0±86.6 ^b

Peningkatan kadar estrogen tersebut diperkirakan merupakan pengaruh fitoestrogen dari perasan daun semanggi air (*Marsilea crenata*) yang diberikan secara teratur dan dalam jangka waktu yang lebih panjang namun masih dalam batas aman. Hal ini sesuai dengan pernyataan yang di sampaikan oleh Biben (2012), bahwa penggunaan sediaan fitoestrogen pada umumnya baik dan bermanfaat namun pada penggunaan yang tidak sewajarnya atau berlebihan dapat mengganggu atau menimbulkan disfungsi sistem reproduksi terlebih pada penggunaan dalam jangka waktu yang lama. Peningkatan kadar estrogen terjadi karena adanya ikatan antara fitoestrogen dengan reseptor β sehingga terjadi *feedback positive* yang menstimulasi hipotalamus untuk menghasilkan GnRH (yang berperan memstimulasi hipofisa anterior untuk meningkatkan kadar FSH yang mengakibatkan terjadinya peningkatan folikulogenesis).

Isolflavon atau phytoestrogen dapat berikatan dengan reseptor estrogen sebagai bagian dari aktifitas hormonal, menyebabkan serangkaian reaksi yang menguntungkan tubuh. Pada saat kadar estrogen dalam tubuh menurun, akan terdapat banyak kelebihan reseptor estrogen yang tidak terikat, walaupun afinitasnya rendah, isolflavon dapat berikatan dengan reseptor tersebut. Jika tubuh mendapatkan suplai isolflavon atau fitoestrogen, maka akan terjadi pengaruh peningkatan isolflavon

dengan reseptor estrogen yang menghasilkan efek menguntungkan (Koswara, 2006). Isoflavon, senyawa multi manfaat dalam semanggi air yang aktifitasnya mirip dengan estrogen berfungsi untuk membantu pematangan ovidak dan fitoestrogen akan menjadi estrogen aktif dan membantu estrogen melakukan fungsinya sebagai hormon yang membantu pematangan ovidak.

Daun semanggi air mengandung isoflavon yang memiliki efek estrogenik. Aktivitas isoflavon sangat tergantung pada reseptor estrogen dalam tubuh. Isoflavon khususnya genistein dapat berikatan dengan reseptor α dan β estrogen. Afinitas isoflavon sama dengan estrogen bila berikatan dengan reseptor β estrogen. Bila kadar estrogen dalam tubuh berkurang, isoflavon dapat mengambil alih efek estrogen (Baziad, 2003 a).

Gambaran Histologi Ovarium

Ovarium dikelilingi oleh selapis sel epitel kuboid. Sel epitel kolumnar Ovarium tersusun atas folikel dengan berbagai tingkatan perkembangan, jaringan interstisial, serta jaringan stroma yang berisi pembuluh darah, saraf, dan limfe (Davis, 2000). Perkembangan folikel ovarium dipengaruhi oleh hormon estrogen. Estrogen terutama dihasilkan oleh sel-sel granulosa yang mengubah androgen yang dihasilkan oleh sel-sel teka interna menjadi estrogen. Pertumbuhan dan pemasakan folikel ovarium dan sekresi estrogen dikendalikan oleh hormon gonadotropin hipofisis yaitu FSH dan LH. Awal dari semua siklus reproduksi adalah dihasilkannya Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) oleh Hypotalamus. Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) memacu Follice Stimulating Hormone (FSH) pada fase folikuler untuk proses folikulogenesis pada folikel ovarium. Tahapan folikulogenesis adalah dari folikel primer,

sekunder, tertier, dan de"graaf. Komposisi folikel de"graaf adalah sel telur dan antrum folikuler yang berisi hormon estrogen. Sekresi estrogen oleh ovarium memicu pelepasan LH untuk ovulasi pada masa estrus. LH merangsang pembentukan *corpus luteum*. Sedangkan estrogen mempengaruhi sekresi hormon gonadotropin hipofisis melalui efek umpan balik pada hipotalamus.

Adanya gugus OH pada phytoestrogen, estradiol dan dietilstilbesrol merupakan salah satu persyaratan untuk aktivitas estrogenik. Reseptor estrogen mampu mengadakan ikatan dengan beberapa komponen yang mempunyai persamaan struktur dengan estrogen seperti genistein. Isoflavon memiliki struktur difenolik yang mempunyai potensi estrogen sintetis dietilstilbesrol dan heksestrol (Biben, 2012).

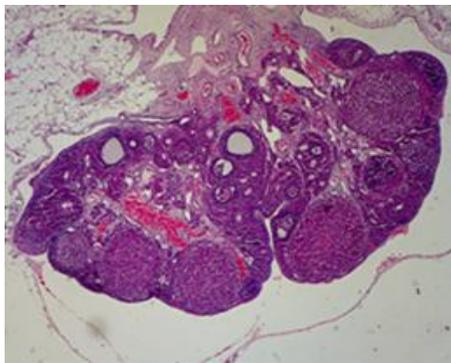
Perkembangan folikel ovarium dipengaruhi oleh hormon estrogen. Estrogen terutama dihasilkan oleh sel-sel granulosa yang mengubah androgen yang dihasilkan oleh sel-sel tekainterna menjadi estrogen. Pertumbuhan dan pemasakan folikel ovarium dan sekresi estrogen dikendalikan oleh hormon gonadotropin hipofisis yaitu FSH dan LH. Sekresi estrogen oleh ovarium memicu pelepasan LH untuk ovulasi pada masa estrus. LH merangsang pembentukan korpus luteum. Sedangkan estrogen mempengaruhi sekresi hormon gonadotropin hipofisis melalui efek umpan balik pada hipotalamus.

Hasil pengamatan histologi ovarium tikus (*Rattus norvegicus*) menggunakan pewarnaan Hemaktosilin-Eosin (HE) dapat dilihat pada Gambar.1. Peningkatan folikulogenesis yang dipicu oleh aktivitas fitoestrogen ditunjukkan dengan adanya dominasi folikel *de graff* pada gambaran histologi ovarium (bagian korteks). Hal ini sejalan dengan Utama (2002) yang menyatakan bahwa estrogen berfungsi untuk membantu pematangan folikel dan

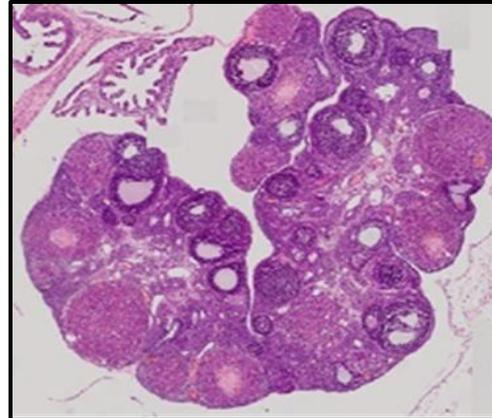
fitoestrogen akan menjadi estrogen aktif serta membantu estrogen melakukan fungsinya sebagai hormon yang membantu pematangan folikel.

Berdasarkan hasil gambaran histologi ovarium tikus (*Rattus norvegicus*), pada kelompok kontrol positif (K+) terlihat adanya folikel-folikel yang hampir memenuhi seluruh bagian korteks ovarium. Terlihat 5 folikel *de graaf* yang teramati pada gambaran histologi ovarium tikus kontrol positif (K+) . Hal ini sesuai dengan fungsi estrogen sintesis yang berperan dalam menghambat ovulasi dan perjalanan ovum ke tubafalopi sehingga folikel terutama folikel *de graff* menumpuk di ovarium. Gambaran histologi ovarium tikus kontrol negatif (K-) hanya terdapat sedikit folikel yang menyebar di bagian tepi korteks ovarium. Pada kelompok kontrol negatif (K-), hanya terdapat 1 folikel *degraaf* yang teramati pada gambaran histologi ovarium.

Pada kelompok Negatif, (Gb.!) folikel-folikel terlihat kurang berkembang apabila dibandingkan dengan perlakuan remasan daun semanggi air yang terlihat lebih menyebar pada daerah korteks ovarium dengan persebaran folikel yang lebih luas.



Gambar 1. Kontrol negatif



Gambar 2. Perlakuan 4 (80%)

Pada hasil gambaran histologi ovarium tikus di temukan corpus luteum yang tersebar dibagian ovarium hal tersebut dikarenakan oleh peningkatan kadar estrogen, yang merangsang ovulasi. Dengan bertambahnya ukuran folikel, terjadi akumulasi cairan diantara sel granulosa dan menyebabkan terbentuknya *antrum*, sehingga folikel primer berubah bentuk menjadi *folikel d'graaf*, disini oosit menempati posisi excenteric dan dikelilingi oleh 2 – 3 lapisan sel granulosa dan disebut sebagai *cumulus oophorus*. Dengan semakin matangnya folikel, kadar estrogen menjadi semakin meningkat Dengan semakin meningkatnya kadar estrogen, maka terjadilah umpan balik negatif untuk mencegah hiperstimulasi ovarium dan maturasi folikel lainnya. Kondisi ini menjelaskan mengapa pada salah satu perlakuan terjadi kadar estrogen menjadi menurun.

Menurut Goldman and Klatz (2007), hormon sangat dibutuhkan untuk memperbaiki dan mengatur fungsi tubuh. Bila produksi hormon menurun, maka kemampuan tubuh untuk memperbaiki dan mengatur fungsi juga menurun. Isoflavon merupakan flavonoid yang memiliki efek estrogenik. Aktivitas isoflavon sangat tergantung pada reseptor estrogen dalam tubuh. Isoflavon khususnya genistein dapat berikatan dengan reseptor α dan β estrogen.

Afinitas isoflavon sama dengan estrogen bila berikatan dengan reseptor β estrogen. Bila kadar estrogen dalam tubuh berkurang, isoflavon dapat mengambil alih efek estrogen (Baziad, 2003 a). (Salisbury, 2001) menyatakan bahwa pemanjangan lama fase estrus mengindikasikan adanya peningkatan pertumbuhan dan pematangan folikel ovarium karena secara normal aktivitas estrus tidak akan terjadi sebelum folikel yang bertumbuh dan matang terlihat di dalam ovarium.

Selama berlangsungnya siklus ovarium terjadi perubahan-perubahan terutama pada folikel ovarium, yaitu perubahan pada folikel primordia menjadi folikel sekunder kemudian menjadi folikel sekunder dan tersier dan terakhir menjadi folikel *De Graff*. Setelah terjadi ovulasi sisa folikel *De Graff* akan berkembang menjadi *Corpus Luteum*. Proses ini disebut dengan folikulogenesis (Williams, 2002). Siklus ovarium dapat dibedakan menjadi dua tingkatan yaitu fase folikuler atau pembentukan folikel sampai masak dan fase luteal yaitu fase setelah ovulasi, kemudian terbentuk *corpus luteum* sampai siklus berikutnya dimulai. Siklus ovarium dan folikulogenesis adalah proses yang berlangsung terus-menerus sampai persediaan folikel primer habis. Tidak semua folikel primer akan mengalami pendewasaan menjadi folikel secara lengkap, hanya sebagian kecil saja yang akan sampai pada stadium yang siap untuk diovulasikan. Sebagian besar dari folikel-folikel tersebut akan mengalami atresia sebelum benar-benar menjadi folikel yang matang (Ganong, 2008). Peranan dari estrogen alami yang berasal dari tubuh dan phytoestrogen adalah mempercepat pemasakan pertumbuhan folikel-folikel ovarium dari folikel primer sampai menjadi folikel *de graff*.

Perkembangan selanjutnya dari folikel primer adalah membentuk folikel sekunder.

Pada fase ini untuk pertama kalinya folikel mengalami perbanyakan sel dan terdapat lapisan kedua di sekitar oosit. Folikel sekunder mengalami penambahan ukuran dan jumlah yang cukup besar. Disinilah selanjutnya membantu perkembangan sel-sel folikel tersebut bersatu membentuk lapisan granulosa oosit primer mulai tumbuh. Pada perkembangan akhir, folikel sekunder terlihat dikelilingi oleh ruangan yang tidak beraturan dan merupakan hasil diferensiasi sel-sel epitel dari stroma ovarium. Sel-sel epitel tersebut kemudian secara bersama-sama membentuk teka folikuli. Pada perkembangan akhir folikel sekunder terjadi pemisahan teka folikuli menjadi teka interna dan eksterna (William, 2002). Folikel tersier disebut juga folikel kaviti atau folikel antral, terlihat dengan adanya kaviti (antrum) dan diferensiasi teka folikuli menjadi teka interna dan teka eksterna. Perubahan folikel tersier disebabkan pembelahan yang sangat cepat dari sel-sel folikel (William, 2002).

Folikel matang (*De Graff*) tampak sebagai vesikel transparan yang menonjolkan permukaan ovarium. Sebagai akibat penimbunan cairan, rongga folikel Pada stadium ini lapisan granulosa tampak menipis karena penambahan cairan folikel (*liquor folikuli*) tidak seimbang dengan pembelahan sel-sel granulosa. Sel granulosa yang menyusun lapisan pertama sekitar ovarium akan memanjang dan membentuk korona radiata yang menyertai ovum pada saat ovulasi. Ketika folikel benar-benar matang dan menghasilkan estrogen alami dan di tambah dengan estrogen eksogen, maka akan mempercepat proses stimulasi ovulasi oleh LH. Sehingga pada gambaran histologis terlihat perkembangan folikel menjadi lebih cepat dan segera terjadi ovulasi. Sehingga dapat diperkirakan bahwa perasan semangi air dapat meningkatkan pemasakan folikel dan mempercepat ovulasi.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian yang telah dilakukan terbukti bahwa Perasan daun Semanggi air dapat berperan meningkatkan kadar estrogen darah pada hewan model..Dari pengamatan histopatologis juga dibuktikan bahwa mampu merangsang percepatan perkembangan folikulogenesis dan ovulasi. .

SARAN

Saran yang di sampaikan adalah pemanfaatan daun semanggi air sebagai pakan suplementasi pada ternak, namuin demikian perlu dilakukan penelitian lapang terlebih dulu dalam hal perbaikan tampilan reprodukis yang ditengarai dengan kadar estrogen rendah misalnya pada kasus subestus, an estrus atau percepatan estrus pertama post partum yang diakhiri dengan ovulasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriastini, J.J. 2003. *Marsilea crenata* C.Presl. Di dalam: de Winter WP, Amoroso VB, editor. *Cryptograms: Ferns and fern allies*. LIPI. Bogor.
- Hafez, E.S.E, M.R. Jainudeen, dan Y. Rosnina. 2000. *Hormones Growth Factors and Reproduction*. Di dalam : *Reproduction in Farm Animals*. Ed ke-3. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia.
- Johnson, D.M. 2011. *Systematics of the New World Species of Marsilea (Marsileaceae)*. American Society of Plant Taxonomists : 1–
- Koswara. 2006. *Isoflavon Senyawa Multi Manfaat dalam Kedelai*. Fakultas Teknologi Pertanian IPB. Bogor.
- Mardiari, S.M. dan A.J. Sitasiwi. 2008. Korelasi jumlah folikel ovarium dengan konsentrasi hormon estrogen mencit (*mus musculus*) setelah konsumsi harian tepung kedelai selama 40 hari. *Buletin Anatomi dan Fisiologi* 16(2):54–59.
- Tsourounis C. 2004. Clinnical effect of fitoestrogens. *Clinical Obstretict and Gynecology*: 44(4):836–42.
- Williams. 2002 “*Hormonaal Control of Folliculogenesis*”. Baltimore : William and Wilkins.
- Yossi Wibisono, dkk .2011. Optimalisasi genistein untuk penolakan tepung kedelaiedamame menggunakan bakteri sebagai penghasil β -glucosidase,berk. *penel. hayati edisi khusus: 7a* (149–155)
- Yu, Y, W. Li, Z. Han, M. Luo and J. Tan. 2003. The effect of follicle-stimulating hormone on follicular development, granulosa cell apoptosis and steroidogenesis and its mediation by insulin like growth factor i in the goat ovary. *Theriogenology* 60:1691–1704.