

Pengaruh Vitamin E dan Etilin Estradiol terhadap Histopatologi Uterus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

(EFFECTS OF VITAMIN E AND ETINYL ESTRADIOL IN HISTOPATHOLOGY OF UTERINE WHITE RATS (*Rattus norvegicus*))

Ardi Sandriya¹, Samsuri², I Ketut Berata³

¹Mahasiswa Pendidikan Profesi Dokter Hewan,

²Laboratorium Farmakologi Veteriner,

³Laboratorium Patologi Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana

Jl.P.B. Sudirman Denpasar Bali, Telp: 0361-223791

e-mail: ardisandriya@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa vitamin E dapat memperbaiki struktur histopatologi uterus akibat efek samping etinil estradiol. Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus putih betina yang dibagi dalam lima kelompok perlakuan, yaitu kontrol (-) tidak diberi etinil estradiol maupun vitamin E; kontrol (+) diberikan etinil estradiol dengan dosis 150 mg/kgBB/hari tanpa pemberian vitamin E, P1 diberikan etinil estradiol dengan dosis 150 mg/kgBB/hari dan vitamin E 100 mg/kgBB/hari, P2 diberikan etinil estradiol dengan dosis 150 mg/kgBB/hari dan vitamin E 150 mg/kgBB/hari, dan P3 diberikan etinil estradiol dengan dosis 150 mg/kgBB/hari dan vitamin E 200 mg/kgBB/hari. Perlakuan selama 30 hari, dan pada hari ke 31 seluruh hewan coba dinekropsi. Organ uterus diambil untuk pembuatan preparat histopatologi dengan teknik pewarnaan hematoksilin eosin (HE). Variabel yang diperiksa adalah nekrosis dan proliferasi sel epitel uterus. Hasil penelitian membuktikan pemberian suplementasi vitamin E dosis 150 mg/kgBB/hari mampu menekan proliferasi dan nekrosis sel epitel endometrium uterus tikus putih (*Rattus norvegicus*) sehingga vitamin E dapat digunakan sebagai antioksidan pada pasien yang sedang menggunakan etinil estradiol.

Kata Kunci: Etilin estradiol; vitamin E; uterus; nekrosis; proliferasi

ABSTRACT

The aim of this experiment was to prove that vitamin E can improve the uterine histopathological structure because of the side effects of ethinyl estradiol. This experiment used 25 female white rats, were divided into five groups of treatment, namely control (-) is not given ethinyl estradiol and vitamin E, control (+) was given ethinyl estradiol at a dose of 150 mg/kgBW/day without vitamin E, P1 is given ethinyl estradiol at a dose of 150 mg/kgBW/day and vitamin E 100 mg/kgBW/day, P2 is given ethinyl estradiol at a dose of 150 mg/kgBW/day and vitamin E 150 mg/kgBW/day, and P3 are given ethinyl estradiol at a dose of 150 mg/kgBW/day and vitamin E 200 mg/kgBW/day. The treatment lasts 30 days and the 31st day, all the animals try to termination and make a necropsy. Uterine organs taken to make preparations for histopathology with hematoxylin eosin staining (HE). Variables examined were necrosis and proliferation of uterine epithelial cells. The results proved that supplementation of vitamin E 150 mg/kgBW/day were able to suppress the proliferation and necrosis of epithelial endometrium cells of white rats (*Rattus norvegicus*). So vitamin E can be used as an antioxidant in patients that using etinil estradiol.

Keywords: Ethinyl estradiol; vitamin E; uterine; necrosis; proliferation

PENDAHULUAN

Etinil estradiol termasuk ke dalam golongan hormon estrogen sintetis. Etinil estradiol merupakan estrogen sintetis yang memiliki potensi yang sama dengan estrogen (Sitasiwi dan Mardiaty, 2016). Estrogen merupakan hormon seks steroid yang berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan seksual sekunder betina seperti kelenjar mammae dan organ reproduksi yang lain. Selain itu, hormon ini memiliki pengaruh terhadap siklus menstruasi, uterus, dan ovulasi. Hayder *et al.* (1999) menyatakan bahwa etinil estradiol merupakan agen farmakologi yang paling sering digunakan sebagai kombinasi obat kontrasepsi oral. Etinil estradiol telah digunakan lebih dari 30 tahun yang dikombinasikan dengan progestin sintetis dalam kontrasepsi oral (Newbold dan Liehr, 2000), karena etinil estradiol memiliki bioavailabilitas yang lebih besar (Delclos *et al.*, 2008). Penggunaan estrogen sintetis dapat menimbulkan efek samping karena sifatnya yang karsinogenik (Kartawiguna, 2001), juga menyebabkan proliferasi sel dan apoptosis jaringan (Chen dan Yager, 2004).

Untuk mengurangi efek samping dari radikal bebas hasil metabolisme etinil estradiol, maka diperlukan antioksidan, salah satu antioksidan yang banyak digunakan adalah vitamin E. Antioksidan merupakan senyawa dengan berat molekul kecil yang dapat bereaksi dengan oksidan sehingga reaksi oksidasi yang merusak biomolekul dapat dihambat (Septiana *et al.*, 2002). Vitamin E mempunyai kemampuan memutuskan berbagai rantai reaksi radikal bebas sebagai akibat kemampuannya memindahkan hidrogen fenolat pada radikal bebas dari asam lemak tidak jenuh ganda yang telah mengalami peroksidasi (Alawiyah dan Hartono, 2006). Beberapa macam penyakit yang disebabkan oleh oksidan seperti kardiovaskuler, kanker, dan katarak dapat dicegah dengan pemberian antioksidan (Septiana *et al.*, 2002). Banyak faktor yang dapat memicu meningkatnya kadar radikal bebas dalam tubuh misalnya polusi, debu, serta metabolisme yang memiliki produk sampingan yaitu radikal bebas.

Salah satu organ yang dapat terpengaruh efek pemberian etinil estradiol dan vitamin E adalah uterus. Uterus berfungsi sebagai penerima dan tempat perkembangan ovum yang telah dibuahi. Tipe uterus tikus adalah duplex yaitu berupa tabung ganda. Dinding uterus terdiri dari tiga lapisan utama, yaitu lapisan paling dalam yang disebut endometrium, myometrium merupakan lapisan tengah, dan perimetrium yang merupakan lapisan terluar (Sitasiwi, 2009). Lapisan endometrium merupakan lapisan yang responsif terhadap perubahan hormon reproduksi sehingga perubahan lapisan ini bervariasi sepanjang siklus estrus dan dapat

dijadikan indikator fluktuasi hormon yang sedang terjadi pada hewan tersebut (Sitasiwi, 2008).

Etinil estradiol sudah banyak beredar di masyarakat salah satunya terdapat dalam pil KB. Konsumsi etinil estradiol secara berkepanjangan dapat memicu efek negatif karena dapat mempengaruhi banyak organ, salah satunya adalah uterus. Uterus akan mengalami perubahan secara histopatologi karena obat memiliki efek karsinogenik, memicu proliferasi, dan apoptosis jaringan. Sitasiwi (2008) menyatakan estrogen memiliki pengaruh dalam jaringan reproduksi, terutama memacu proliferasi sel epitel. Untuk itu penelitian ini dilakukan agar dapat mengetahui pengaruh pemberian vitamin E yang berfungsi sebagai antioksidan dan diperkirakan dapat melindungi uterus dari efek samping etinil estradiol.

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah hewan coba berupa tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) berumur 3-4 bulan, dengan berat 150-200 gram. Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung berdasarkan rumus Federer sehingga jumlah seluruh tikus yang digunakan adalah 25 ekor. Spesimen yang digunakan adalah organ uterus dari hewan coba yang telah diberikan perlakuan.

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan diantaranya etinil estradiol dengan merek dagang Ovalumon®, vitamin E dengan merek dagang Nature-E® dan bahan yang digunakan sebagai pengencer adalah minyak Fillipo Berrio. Alat-alat yang digunakan diantaranya kandang hewan, alas kandang, tempat minum, spuit 3 ml, spuit 1ml, alat sonde, glove, timbangan digital, mikroskop binokuler, gelas objek, kaca penutup, alat bedah, *tissue cassette*, *staining jar*, *embedding set*, dan *microtome*.

Dosis Vitamin E dan Etinil Estradiol

Penelitian ini menggunakan vitamin E dengan dosis bertingkat yaitu 100 mg/kgBB/hari, 150 mg/kgBB/hari, dan 200 mg/kgBB/hari (Insani *et al.*, 2015). Sedangkan untuk dosis etinil estradiol menggunakan dosis 150 mg/kgBB/hari.

K (-) = Diberikan pakan dan minum (kontrol negatif).

K (+) = Diberikan etinil estradiol dengan dosis 150 mg/kgBB (kontrol positif).

P1 = Diberikan etinil estradiol 150 mg/kgBB dan vitamin E dosis 100 mg/kgBB.

P2 = Diberikan etinil estradiol 150 mg/kgBB dan vitamin E dosis 150 mg/kgBB.

P3 = Diberikan etinil estradiol 150 mg/kgBB dan vitamin E dosis 200 mg/kgBB.

Perlakuan Sampel

Penyuntikan etinil estradiol secara subkutan dengan dosis yang berbeda-beda sesuai dengan kelompok perlakuan, sedangkan vitamin E diberikan secara oral. Setelah 30 hari perlakuan, semua tikus diterminasi dan dinekropsi selanjutnya diambil uterusnya untuk dibuat preparat histopatologi.

Pembuatan Preparat Histologi

Spesimen berupa uterus dipotong dengan panjang 1 cm, dan difiksasi dalam *Netral Buffer Formalin* (NBF) 10%. Sampel organ selanjutnya diperkecil lagi dengan irisan tipis untuk disimpan dalam *tissue cassette* dan dimasukkan ke dalam *tissue processor*. Selama dalam *tissue processor* terjadi proses dehidrasi dan *clearing* dengan satu sesi larutan yang terdiri dari: alkohol 70 %, alkohol 80 %, alkohol 90 %, alkohol 96 %, alkohol absolut, *toluene*, dan *parafin*, secara bertahap dalam waktu satu hari. Sampel organ diblocking dengan *embedding set* yang dituangi parafin cair kemudian didinginkan.

Blok yang sudah dingin dipotong menggunakan *microtome* dengan ketebalan \pm 4-5 mikron. Proses yang terakhir adalah pewarnaan dengan metode *Harris Hematoxylin-Eosin* dan *mounting* media. Preparat histopatologi diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x dan dicatat perubahan mikroskopik yang ditemukan pada 5 lapang pandang mikroskopik (Kiernan, 1990).

Variabel yang Diamati

Variabel yang diamati adalah lesi nekrosis sel epitel endometrium dan proliferasi sel epitel endometrium, dimana masing-masing diperiksa pada 5 lapang pandang mikroskopik. Preparat histopatologi uterus diperiksa tingkat patologisnya berdasarkan kategori skoring. Nekrosis sel epitel endometrium diberi skor 0 (tidak terjadi nekrosis), skor 1 (nekrosis fokal (ringan)), skor 2 (nekrosis multifokal (sedang)) dan skor 3 (nekrosis difusa (berat)).

Proliferasi sel epitel endometrium diberi skor 0 (tidak ada proliferasi), skor 1 (proliferasi sel rendah (< 25%)), skor 2 (proliferasi sel sedang (25%-50%)) dan skor 3 (proliferasi sel tinggi (>50%)).

Analisis Data

Data hasil penelitian ditabulasi dan selanjutnya dianalisis dengan uji non parametrik Kruskal-Wallis. Jika ada perbedaan nyata ($P < 0,05$) dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney (Steel dan Torrie, 1980).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan histopatologi pada kontrol (-) tidak menunjukkan adanya perubahan pada seluruh sampel, dimana keadaan epitel mukosa uterus (tersusun dari epitel kolumnar simplek) tidak mengalami proliferasi epitel endometrium maupun nekrosis sel epitel. Sedangkan pada kelompok kontrol (+) yang diberikan etinil estradiol dengan dosis 150 mg/kg BB setiap hari, menunjukkan terjadinya proliferasi epitel endometrium dan nekrosis sel epitel. Pada kelompok K(+) didapatkan hasil empat sampel mengalami proliferasi sel epitel endometrium diatas 25% (sedang) dan satu sampel mengalami proliferasi sel epitel endometrium kurang dari 25% (ringan), dua sampel mengalami nekrosis sel epitel sedang dan 3 sampel mengalami nekrosis sel epitel ringan.

Pengamatan pada kelompok P1 yang diberikan etinil estradiol dosis 150 mg/kg BB setiap hari dan vitamin E dosis 100 mg/kg BB setiap hari, didapatkan hasil empat sampel mengalami proliferasi sel epitel endometrium kurang dari 25% (ringan) dan satu sampel mengalami proliferasi sel epitel endometrium lebih dari 25% (sedang). Pengamatan nekrosis menunjukkan semua sampel P1 mengalami nekrosis sel epitel ringan.

Pada kelompok P2 yang diberikan etinil estradiol dosis 150 mg/kg BB setiap hari dan vitamin E dosis 150 mg/kg BB setiap hari, didapatkan seluruh sampel mengalami proliferasi sel epitel endometrium kurang dari 25% (ringan). Pada pengamatan nekrosisnya diperoleh hasil tiga sampel tidak mengalami nekrosis sel epitel dan dua sampel mengalami nekrosis sel epitel ringan.

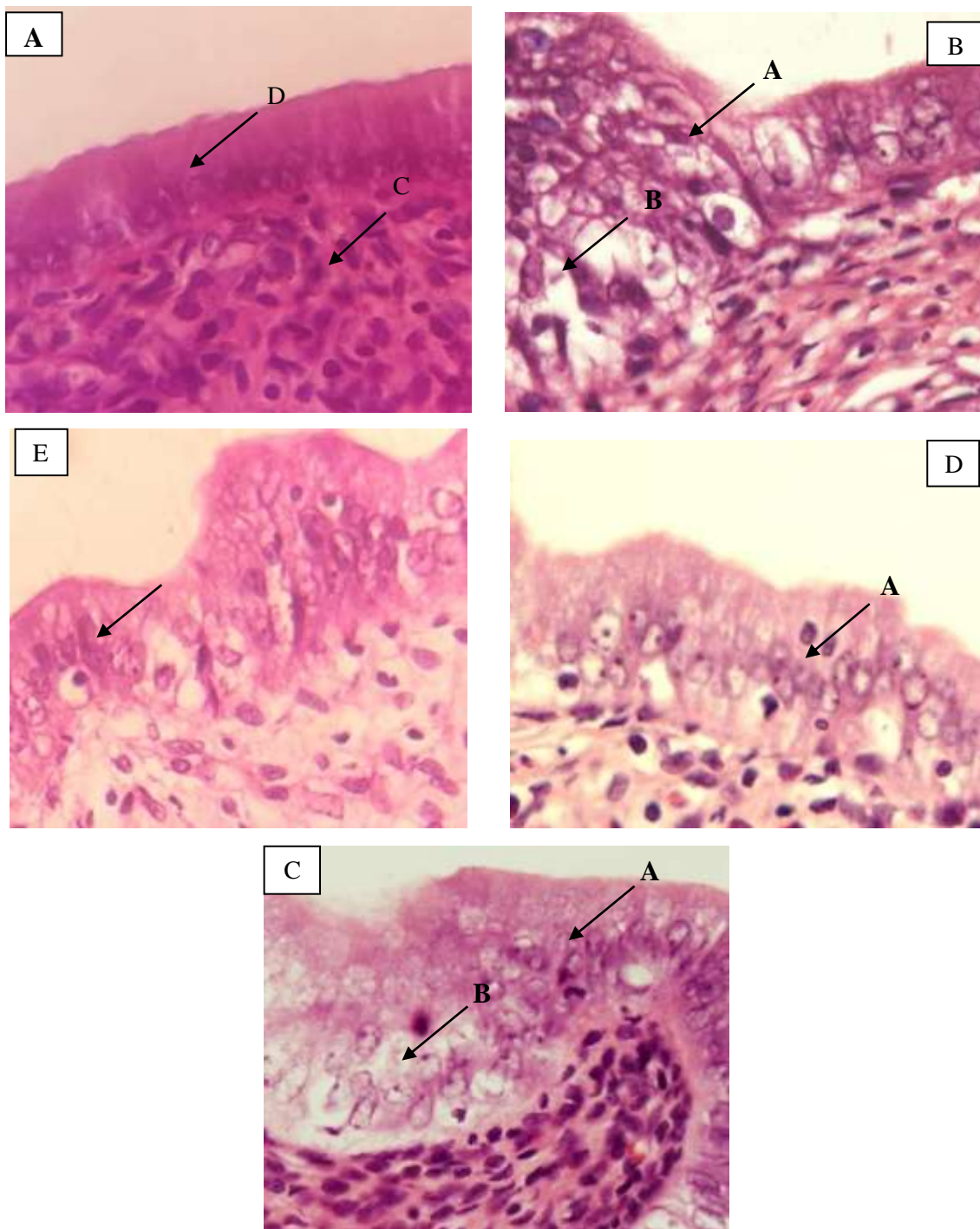
Pada kelompok P3 dengan pemberian etinil estradiol dosis 150 mg/kg BB setiap hari dan vitamin E dosis 200 mg/kg BB setiap hari diperoleh hasil dua sampel tidak mengalami proliferasi sel epitel endometrium dan tiga sampel mengalami proliferasi sel endometrium

kurang dari 25% (ringan). Pengamatan nekrosis sel epitel endometrium pada kelompok P3, tidak berubah.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian etinil estradiol dosis 150 mg/kgBB/hari berpengaruh pada perubahan struktur histopatologi uterus tikus putih (*Rattus norvegicus*), dilihat dari adanya proliferasi dan nekrosis sel epitel endometrium. Pengaruh etinil estradiol dapat pada kelompok K (+), menyebabkan sebagian besar sampel mengalami proliferasi sel epitel endometrium pada tingkat yang sedang dan nekrosis sel epitel ringan/fokal.

Proses kerja etinil estradiol dalam tubuh tidak lepas dari adanya reseptor estrogen di dalam organ target. Sitasiwi (2009) menyatakan bahwa reseptor estrogen dalam jaringan tubuh terdiri dari dua macam, reseptor alfa (RE- α) dan reseptor beta (RE- β) dengan tempat distribusi yang berbeda. RE- α terekspresi paling banyak pada saluran reproduksi, terutama uterus, vagina dan ovarium, glandula mammae, hipotalamus, sel endotel, dan sel otot polos vaskuler sedangkan RE- β pada colon, tulang, otak, dan pembuluh darah. Ketika estrogen berikatan dengan reseptornya maka gen dari reseptor akan mengkode protein yang berfungsi sebagai pengaktivasi faktor transkripsi beberapa domain penting sebagai tempat berikatan dengan hormon. Protein yang dihasilkan terlokalisasi pada nukleus. Proses proliferasi yang terjadi pada sel dimulai dengan estrogen yang menembus membran sel kemudian berikatan dengan reseptor. Ikatan ini menyebabkan perubahan konformasi reseptor, kemudian masuk ke dalam nukleus untuk menginisiasi terjadinya transkripsi dan translasi yang menghasilkan protein pengkode proliferasi sel.

Selain proliferasi epitel, tampak juga perubahan berupa nekrosis sel epitel. Pemberian etinil estradiol dalam jangka panjang akan meningkatkan radikal bebas di dalam tubuh. Menurut Halliwell dan Gutteridge (1999) radikal bebas endogen merupakan radikal bebas yang terbentuk sebagai respon normal dari peristiwa biokimia dalam tubuh secara terus menerus yang meliputi reaksi reduksi-oksidasi mitokondria dan metabolisme obat-obatan. Fitria *et al.* (2013) melaporkan bahwa obat-obatan merupakan sumber oksidan dari dalam tubuh. Radikal bebas yang berlebihan dapat membahayakan tubuh karena dapat merusak makromolekul dalam sel seperti asam lemak, protein, asam nukleat yang selanjutnya dapat menyebabkan kerusakan sel. Apabila produksi oksidan melebihi antioksidan yang ada, menyebabkan sel mengalami stress oksidatif atau nekrosis (Widayati, 2012).



Gambar 1. Gambaran Struktur Sel Epitel Endometrium pada Setiap Perlakuan (HE, 400X). Keterangan: EP= epitel, EN= endometrium, A= proliferasi, dan B= nekrosis. Gambar kode A merupakan kontrol negatif. Gambar kode B merupakan kontrol positif yang diberi EE dosis 150 mg/kgBB/hari. Gambar kode C diberikan EE dosis 150 mg/kgBB/hari dan vitamin E dosis 100 mg/kgBB/hari. Gambar kode D diberikan EE dosis 150 mg/kgBB/hari dan vitamin E dosis 150 mg/kgBB/hari. Gambar kode E diberikan EE dosis 150 mg/kgBB/hari dan vitamin E dosis 200 mg/kgBB/hari.

Pemberian vitamin E mampu memperbaiki perubahan struktur histopatologi uterus yaitu proliferasi sel epitel endometrium dan nekrosis sel epitel endometrium akibat pemberian etinil estradiol dosis 150 mg/kg BB. Regenerasi struktur histopatologi tersebut, terjadi karena vitamin E berfungsi sebagai antioksidan, yang berfungsi untuk mencegah, menurunkan reaksi oksidasi, memutus, menghambat, menghentikan dan menstabilisasi radikal bebas (Margaill *et al.*, 2005) sehingga vitamin E dapat melindungi sel tubuh dari pengaruh pemberian etinil estradiol. Dalam jangka waktu yang lama hasil suplementasi vitamin E per oral terhadap tikus putih yang diberi etinil estradiol dosis 150 mg/kg BB setiap hari secara subkutan mengalami perbaikan yang sangat signifikan, khususnya pada pemberian vitamin E dosis 200 mg/kgBB setiap hari, perbaikan terlihat sangat baik dan mendekati normal.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian etinil estradiol dosis 150 mg/kgBB/hari secara subkutan terbukti mempengaruhi struktur histopatologi epitel endometrium uterus tikus putih (*Rattus norvegicus*) berupa proliferasi sel epitel endometrium dan nekrosis sel epitel endometrium. Pemberian suplementasi vitamin E dosis 150 mg/kgBB/hari sudah mampu menekan proliferasi sel epitel endometrium dan nekrosis sel epitel endometrium uterus tikus putih (*Rattus norvegicus*) akibat pemberian etinil estradiol 150 mg/kgBB/hari secara subkutan.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang mekanisme reaksi antara etinil estradiol dengan vitamin E pada sistem sirkulasi dan metabolisme.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kepala Laboratorium Farmakologi dan Kepala Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alawiyah D, Hartono M. 2006. Pengaruh Penambahan Vitamin E dalam Bahan Pengencer Sitrat Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Boer. *J.Indon. Trop. Anim. Agric* 31(1): 8-14.
- Chen JQ, Yager JD. 2004. Estrogen's Effects on Mitochondrial Gene Expression: Mechanisms and Potential Contributions to Estrogen Carcinogenesis. *New York Academy of Sciences* 1028: 258-272.
- Delclos KB, Weisl CC, Bucci TJ, Olson G, Mellick P, Sadovova N, Latendresse JR, Thorn B, Newbold RR. 2008. Overlapping but Distinct Effects of Genistein and Ethinyl Estradiol (EE2) in Female Sprague-Dawley Rats in Multigenerational Reproductive and Chronic Toxicity Studies. *Reprod Toxicol* 27(2): 117-132.
- Fitria, Triandhini RINKR, Mangimbulude JC, Karwur FF. 2013. Merokok dan Oksidasi DNA. *Sains Medika* 5(2): 113-120.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford: Oxford Univ Press.
- Hayder SM, Chiappetta C, Stancel GM. 1999. Synthetic Estrogen 17 α -Ethinyl Estradiol Induces Pattern of Uterine Gene Expression Similar to Endogenous Estrogen 17 β -Estradiol. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 290(2): 740-747.
- Insani A, Samsuri, Berata IK. 2015. Gambaran Histopatologi Hati Tikus Putih yang Diberikan Deksametason dan Vitamin E. *Indonesia Medicus Veterinus* 4(3): 228-237.
- Kartawiguna E. 2001. Faktor-Faktor yang Berperan pada Karsinogenesis. *Jurnal Kedokteran Trisakti* 20(1): 16-26.
- Kiernan JA. 1990. *Histology and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 2nd ed. New York: Pergamon Press.
- Margaill I, Plotkine M, Lerouet D. 2005. Antioxidant Strategies in the Treatment of Stroke. *Free Rad Biol Med* 39(4): 429-443.
- Newbold RR, Liehr JG. 2000. Induction of Uterine Adenocarcinoma in CD-1 Mice by Catechol Estrogens. *Cancer Research* 60: 235-237.
- Septiana AT, Muchtadi D, Zakaria FR. 2002. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Diklorometana dan Air Jahe (*Zingiber officinale Roscoe*) pada Asam Linoleat. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 13(2): 105-110.
- Sitasiwi AJ. 2008. Hubungan Kadar Hormon Estradiol 17- β dan Tebal Endometrium Uterus Mencit (*Mus musculus* L.) selama Satu Siklus Estrus. *Buletin Anatomi dan Fisiologi* 16(2): 38-45.
- Sitasiwi AJ. 2009. Efek Paparan Tepung Kedelai dan Tepung Tempe sebagai Sumber Fitoestrogen terhadap Jumlah Kelenjar Endometrium Uterus Mencit (*Mus musculus* L.). *Buletin Anatomi dan Fisiologi* 17(1): 1-10.
- Sitasiwi AJ, Mardiaty SM. 2016. Efek Antifertilitas Ekstrak Air dari Biji *Carica papaya* terhadap Keteraturan Siklus Estrus Mencit (*Mus musculus* L.). *Buletin Anatomi dan Fisiologi* 1(1): 68-74.
- Steel RGD, Torrie JH. 1980. *Principles and Procedures of Statistics—A Biometrical Approach*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill.
- Widayati E. 2012. Oksidasi Biologi, Radikal Bebas, dan Antioxidant. *Majalah Ilmiah Sultan Agung* 50(128): 1-7.