

Gambaran Histopatologi Ovarium Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Akibat Pemberian Vitamin E dan Etilin Estradiol

*(THE HISTOPATHOLOGY FEATURES OF OVARY IN WHITE RAT (*Rattus norvegicus*) DUE TO VITAMIN E AND ETHINYL ESTRADIOL)*

Yudha Yaksa Crada Yoga Arum Raharjo¹, Samsuri², I Ketut Berata³

¹Mahasiswa 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: yudharaharjo00@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa pemberian etinil estradiol mempengaruhi histopatologi ovarium tikus putih dan mengetahui efek pemberian suplementasi vitamin E terhadap efek samping etinil estradiol pada ovarium tikus putih. Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus putih betina, dibagi dalam 5 kelompok perlakuan, yaitu kontrol(-) yang hanya diberi pakan dan minum saja, kontrol(+) diberikan etinil estradiol dengan dosis 150 mg/kg, P1 diberikan etinil estradiol 150 mg/kgbb dan vitamin E dengan dosis 100 mg/kgbb, P2 diberikan etinil estradiol 150 mg/kgbb dan vitamin E dengan dosis 150 mg/kgbb, P3 diberikan etinil estradiol 150 mg/kgbb dan vitamin E dengan dosis 200 mg/kgbb. Pemberian perlakuan selama 30 hari, kemudian hewan coba dinekropsi. Jaringan ovarium diambil dan diproses untuk pembuatan preparat histopatologi. Variabel yang diperiksa meliputi adanya proliferasi sel epitel dan nekrosis. Hasil penelitian diperoleh adanya perbedaan yang sangat nyata antara kontrol negatif (-) dan kontrol positif (+). Rerata skor perbaikan dari kerusakan ovarium berbeda nyata antara perlakuan P1, P2, dan P3. Kelompok perlakuan P2 dan P3 yang paling menunjukkan perubahan mendekati rerata skor kelompok kontrol negatif (-). Simpulan dari penelitian ini adalah pemberian etinil estradiol mempengaruhi perubahan histopatologi ovarium tikus putih. Pemberian suplementasi vitamin E mampu mengurangi efek samping etinil estradiol. Sehingga vitamin E dapat digunakan sebagai terapi pada pasien yang sedang menggunakan preparat hormonal seperti etinil estradiol.

Kata kunci: etinil estradiol; histopatologi; kerusakan ovarium; ovarium; vitamin E

ABSTRACT

This study aimed to prove that the affects of administration ethinyl estradiol the white rat ovary and determine the effects of vitamin E supplementation on the adverse effects of ethinyl estradiol on ovary in white rat. This study used 25 female rats were divided into 5 groups, namely the control (-) are simply fed and drank alone, control (+) given ethinyl estradiol at a dose of 150 mg/kg, P1 given ethinyl estradiol 150 mg/kg and vitamin E at a dose of 100 mg/kg, P2 given ethinyl estradiol 150 mg/kg and vitamin E at a dose of 150 mg/kg, P3 given ethinyl estradiol 150 mg/kg and vitamin E at a dose of 200 mg/kg. The provision of treatment for 30 days, then the sample for Necropsy. Ovaries tissue is taken and processed for making preparations for histopathology. Variables examined include epithelial cell proliferation and necrosis. We observe highly significant differences between negative control (-) and positive control (+). The mean score improvement of ovary damage was significantly

different between the treatment P1, P2, and P3. P2 and P3 treatment group showed a mean score of the control group approached the negative (-). The conclusions of this research was the ethinyl estradiol affects the ovary histopathological in rat. Supplementation of vitamin E have been able to reduce the side effects of ethinyl estradiol. So that vitamin E can be used as a therapy in patients who are currently using hormonal preparations such as ethinyl estradiol.

Keywords: ethinyl estradiol; histopatology; ovary; ovaries damage; vitamin E

PENDAHULUAN

Estrogen secara luas digunakan oleh praktisi terutama pada hewan kecil untuk mengobati hipogonadisme dan hormonal inkontinensia urin pada anjing betina. Pada anjing jantan, estrogen digunakan untuk mengobati anal adenoma, kelebihan libido dan hiperplasia prostat (Acke *et al.*, 2003). Penggunaan estrogen yang berlebihan dan berkepanjangan dilaporkan menyebabkan sitotoksitas dan kanker pada berbagai organ, termasuk hati (Loose dan Stancel, 2006; Madhuri, 2008; Pandey *et al.*, 2008). Estrogen telah dilaporkan menyebabkan kerusakan hati dan karsinoma hepatoseluler (Tao, 1991; Mayol *et al.*, 1992). Pada anjing betina, efek samping seperti penekanan sumsum tulang, pyometra dan infertilitas telah dilaporkan setelah pengobatan dengan pemberian berbagai bentuk obat yang mengandung estrogen. Salah satu contoh preparat estrogen adalah etinil estradiol.

Etinil estradiol merupakan obat turunan estradiol yang sering digunakan sebagai kontrasepsi, terapi hormon untuk *androgen dependent disorders*, jerawat dan terapi pengganti hormon pada osteoporosis yang paling sering digunakan secara oral (Stipic *et al.*, 2011). Etinil estradiol mempunyai efek seperti estradiol yang dihasilkan oleh ovarium, yaitu menyebabkan proliferasi sel reproduksi dan memiliki efek yang hampir sama dengan efek estradiol pada kondisi normal fase diestrus pada hewan yang tidak diovariectomi (Sato *et al.*, 1996; Suhargo, 2005). Proliferasi sel epitelium merupakan fenomena akibat respon adanya hormon estrogen (Suzuki *et al.* 1996). Pada kondisi normal, estrogen berfungsi untuk merangsang pertumbuhan sel epitel dan glandula endometrium (Suhargo, 2005). Penggunaan estrogen sintesis dalam waktu yang lama dapat menimbulkan hiperplasia dan karsinoma, salah satunya pada uterus (Arnold, 1992).

Untuk mencegah atau mengurangi efek samping etinil estradiol, terutama efek oksidannya, maka perlu diberikan antioksidan. Salah satu jenis antioksidan yang murah adalah vitamin E. Vitamin merupakan senyawa organik yang diperlukan tubuh dalam jumlah

kecil untuk mempertahankan kesehatan dan seringkali bekerja sebagai kofaktor untuk enzim metabolisme (Dewoto, 2009).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian etinil estradiol dan pengaruh pemberian vitamin E terhadap efek samping etinil estradiol pada ovarium tikus putih (*Rattus norvegicus*).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) berumur 2-3 bulan, dengan berat 100-200 gram yang diperoleh di Kota Denpasar, Provinsi Bali. Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang hewan percobaan, tempat minum, spuit 1 ml, 3 ml, glove, *tissue processor*, sonde, alas kandang, tempat pakan, tabung reaksi, rak tabung, *Bekker glass*, pipet ukur, cawan petri, timbangan digital, *object glass*, mikroskop binokuler, *staining jar*, pewarna Haematoksin-Eosin. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain pakan tikus, air, *Neutral Buffer Formalin* (NBF) 10%, alkohol 70%, 80%, 90%, dan alkohol absolut, toluena, *paraffin*, minyak zaitun, minyak kelapa, etinil estradiol dan vitamin E. Vitamin E yang digunakan dengan merek dagang Nature-E, sedangkan etinil estradiol dengan merek dagang Ovalumon.

Penelitian ini menggunakan vitamin E dengan dosis bertingkat yaitu 100 mg/kg, 150 mg/kg, dan 200 mg/kg, sedangkan untuk dosis etinil estradiol menggunakan dosis 150 mg/kg. Dosis tersebut merupakan dosis estrogen tinggi (Egger dan Kindermann, 1980). Percobaan menggunakan 25 ekor tikus putih yang dibagi menjadi 5 kelompok yang dibagi sebagai berikut :

P0 = Pakan dan minum (kontrol negatif).

P1 = Diberikan etinil estradiol dengan dosis 150 mg/kg berat badan (kontrol positif).

P2 = Diberikan etinil estradiol 150 mg/kg dan vitamin E dosis 100 mg/kg berat badan.

P3 = Diberikan etinil estradiol 150 mg/kg dan vitamin E dosis 150 mg/kg berat badan.

P4 = Diberikan etinil estradiol 150 mg/kg dan vitamin E dosis 200 mg/kg berat badan.

Sebanyak 25 ekor tikus putih diberikan perlakuan dengan injeksi etinil estradiol dan pemberian vitamin E peroral satu kali sehari selama 30 hari. Kemudian pada hari 31 dilakukan euthanasia dan nekropsi sesuai prosedur, dilakukan pengambilan organ ovarium dan dimasukkan ke pot kecil yang berisi *neutral buffer formalin 10%*. Sampel kemudian dilakukan pembuatan preparat dengan pewarnaan *Harris Hematoksin Eosin (HE)*.

Preparat histopatologis diamati dan diskoring berdasarkan kategori berikut:

- Skor 0 : Tidak ada nekrosis skor 0 = tidak ada Proliferasi sel epitel
 Skor 1 : Ada nekrosis fokal (Ringan) skor 1 = Proliferasi sel epitel rendah (25%)
 Skor 2 : Ada nekrosis multifokal (Sedang) skor 2 = Proliferasi sel epitel sedang(25- 50%)
 Skor 3 : Ada nekrosis difusa (Berat) skor 3 = Proliferasi sel epitel tinggi (>50%)

Data hasil pengamatan histopatologis dikumpulkan, diskoring dan dianalisis. Analisis komparasi dan efek perlakuan dilakukan dengan uji Kruskal Wallis. Jika terdapat perbedaan nyata, analisis dilanjutkan dengan uji Mann Whitney untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan dibawah mikroskop terhadap ovarium tikus putih (*Rattus norvegicus*) menunjukkan adanya variasi perubahan histopatologi. Sedangkan hasil rerata pemeriksaan kuantitatif gambaran histopatologis ovarium tikus putih disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Rerata nilai kerusakan ovarium tikus putih

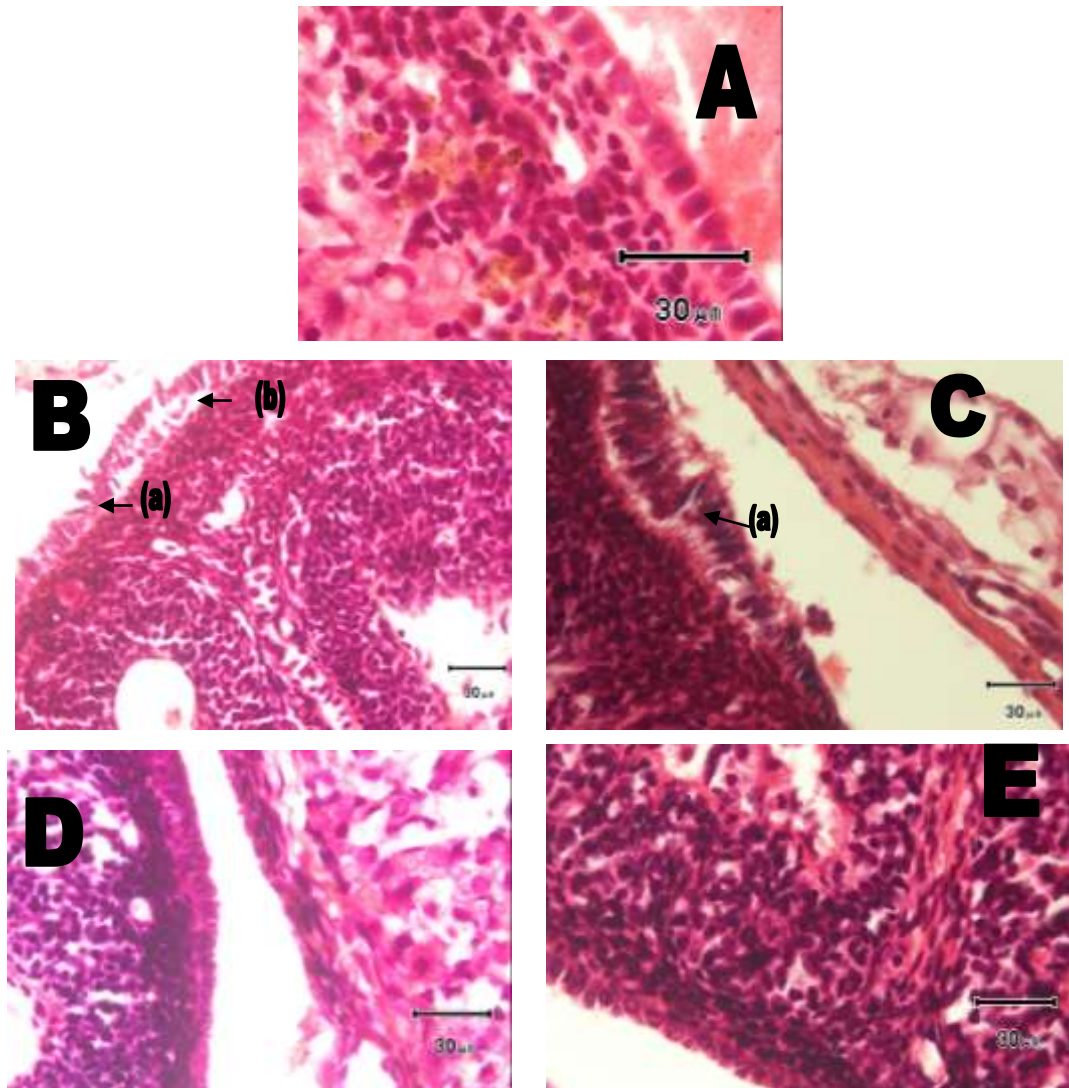
Perlakuan		skor proliferasi	skor nekrosis
Negatif	Mean	0,00	,00
	N	5	5
	Std. Deviation	0,000	0,000
Positif	Mean	1,40	1,00
	N	5	5
	Std. Deviation	0,548	0,000
p1	Mean	0,60	0,00
	N	5	5
	Std. Deviation	0,548	0,000
p2	Mean	0,40	0,00
	N	5	5
	Std. Deviation	0,548	0,000
p3	Mean	0,20	0,00
	N	5	5
	Std. Deviation	0,447	0,000
Total	Mean	0,52	0,20
	N	25	25
	Std. Deviation	0,653	0,408

Dari hasil uji Kruskal-Wallis menunjukkan bahwa perolehan nilai setiap perlakuan untuk proliferasi sel epitel adalah 0,011. Nilai ini menunjukkan ada perbedaan nyata ($P < 0,05$)

antara perlakuan kontrol negatif dengan kelompok perlakuan lain. Nilai setiap perlakuan untuk nekrosis adalah 0,000, ini berarti terdapat perbedaan nyata ($P < 0,05$) antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan. Kategori proliferasi sel epitel dan nekrosis yang terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar dosis vitamin E yang diberikan.

Hasil dari uji Mann-Whitney untuk kategori proliferasi sel epitel adalah antara kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif terdapat perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$), antara kontrol negatif dengan P1, P2, dan P3 tidak terdapat perbedaan nyata ($P > 0,05$). Kemudian antara kontrol positif dengan P1 tidak terdapat perbedaan nyata ($P > 0,05$), sedangkan kontrol positif dengan P2 dan P3 terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). Sedangkan P1 dengan P2 dan P3 tidak terdapat perbedaan nyata ($P > 0,05$) dan P2 dengan P3 juga tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0,05$).

Hasil dari uji Mann-Whitney untuk kategori nekrosis adalah antara kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif terdapat perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$), antara kontrol negatif dengan P1, P2 dan P3 tidak terdapat perbedaan nyata ($P > 0,05$). Kontrol positif dengan P1 dengan P2 dan P3 terdapat perbedaan sangat nyata ($P < 0,01$). Sedangkan antara P1 dan P2 dengan P3 juga tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0,05$). Pada perlakuan P2 dan P3 juga tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0,05$).



Gambar 1. Gambaran histopatologi ovarium tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan HE dan perbesaran 400X (A) kelompok kontrol negatif, (B) kontrol positif dengan adanya proliferasi (a) dan nekrosis (b), (C) P1 dengan adanya proliferasi ringan (a), (D) P2 tampak sel epitel mendekati normal, dan (E) P3 sel epitel sudah seperti kontrol negatif (HE, 400x).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian etinil estradiol mempengaruhi perubahan histopatologi ovarium tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilihat dari adanya proliferasi sel epitel ovarium dan nekrosis. Pemberian suplemen vitamin E terhadap efek samping etinil estradiol (150 mg/kg) pada ovarium tikus putih pada kategori proliferasi sel epitel maupun nekrosis sudah mampu memperbaiki kerusakan sel akibat pemberian etinil estradiol. Dilihat dari perubahan yang terjadi pada perlakuan kontrol positif yaitu pemberian etinil estradiol 150 mg/kgBB setiap hari secara subkutan pada tikus putih yang menunjukkan

kerusakan yang tinggi pada ovarium tikus putih ditandai dengan proliferasi sel epitel yang sedang dan nekrosis ringan. Perubahan gambaran kerusakan ovarium tikus putih ini disebabkan karena adanya pemberian estradiol yang diterima oleh reseptor estrogen pada ovarium, sehingga menimbulkan adanya proliferasi sel epitel. Etinil estradiol mempunyai efek seperti estradiol yang dihasilkan oleh ovarium, yaitu menyebabkan proliferasi sel reproduksi dan memiliki efek yang hampir sama dengan efek estradiol pada kondisi normal fase diestrus pada hewan yang tidak diovariectomi (Sato *et al.*, 1996; Suhargo, 2005). Suzuki *et al.* (1996) juga mengatakan bahwa salah satu pengaruh pemberian estrogen adalah adanya peningkatan proliferasi sel epitel. Estrogen berikatan dengan reseptor estrogen (ER) membentuk kompleks reseptor aktif dan mempengaruhi transkripsi gen yang mengatur proliferasi sel. Mekanisme klasik aksi langsung estrogen pada nukleus DNA melibatkan ikatan hormon pada nukleus reseptor-estrogen, yang nantinya terikat sebagai *dimer-dimer* pada elemen respon-estrogen di daerah pengatur pada gen-gen yang merespon estrogen dan berhubungan dengan faktor transkripsi basal, ko-aktivator, dan ko-represor untuk mengubah ekspresi gen.

Selain adanya proliferasi sel pada kontrol positif juga ditemukan adanya nekrosis ringan. Nekrosis bisa terjadi disebabkan oleh beberapa hal diantaranya adalah suplai darah kurang, toksin, tidak ada inervasi syaraf, suhu, sinar radioaktif, dan trauma mekanik (Berata *et al.*, 2011). Hal ini terjadi karena adanya kadar estrogen yang tinggi. Kadar suatu obat dalam tubuh yang tinggi serta antioksidan tubuh tidak mampu mengatasi, maka akan menyebabkan stress oksidatif, apoptosis, atau nekrosis (Turan, 2010).

Pada perubahan yang terlihat pada histopatologi ovarium tikus putih yang diberikan suplementasi vitamin E mengalami perbaikan yang sangat signifikan, meskipun masih terlihat adanya proliferasi sel epitel pada perlakuan P1, dan pada P2 dan P3 sel epitel sudah mendekati normal dan sama dengan kontrol negatif. Selain penurunan proliferasi sel pada perlakuan P1, P2, dan P3 yang mendekati normal, hasil gambar histopatologi ovarium tikus putih yang diberikan suplementasi vitamin E tidak ada terlihat nekrosis seperti yang terlihat pada gambar histologi kontrol (+) yang hanya diberikan etinil estradiol 150 mg/kgBB setiap hari secara subkutan. Perbaikan gambaran histopatologi tersebut disebabkan karena peran vitamin E sebagai antioksidan dan dapat melindungi kerusakan membran sel akibat radikal bebas. Vitamin E melindungi asam lemak tak jenuh pada membran fosfolipid. Vitamin E juga

melindungi membran sel darah merah yang kaya dengan asam lemak tak jenuh ganda dari kerusakan akibat oksidasi. Selain itu vitamin juga melindungi lipoprotein dalam sirkulasi LDL dari proses oksidasi (Dewoto, 2009).

Pada penelitian ini didapatkan hasil suplementasi vitamin E per oral terhadap tikus putih yang sudah diberi etinil estradiol 150 mg/kgBB setiap hari secara subkutan, mengalami perbaikan yang sangat signifikan, khususnya pada dosis vitamin 150 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB. Sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian vitamin E sudah mampu memperbaiki gambaran histopatologi ovarium tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi etinil estradiol secara subkutan.

SIMPULAN

Suplementasi vitamin E dapat memperbaiki efek samping pemberian etinil estradiol.

SARAN

Para dokter dan dokter hewan untuk memberikan vitamin E kepada pasien yang sedang menjalani terapi hormonal dengan etinil estradiol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih saya ucapkan kepada Kepala Laboratorium Patologi dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana atas penggunaan fasilitas pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Acke E, Mooney CT, Jones BR. 2003. Oestrogen Toxicity in A Dog. Ireland: *Irish Vet. Journal* 56(9): 465-468.
- Arnold E. 1992. *Muir's Textbook of Pathology*. 13th Edition. Great Britain.
- Berata IK, Winaya IBO, Adi AAAM, Adnyana IBW. 2011. *Patologi Veteriner Umum*. Denpasar: Swasta Nulus.
- Dewoto HR. 2009. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 5. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Egger H, Kindermann G. 1980. *Effects of High Estrogen Doses on The Endometrium*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp 51-53.
- Loose DS, Stancel GM. 2006. *Estrogens and Progestins*. In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Edisi 11. New York: McGraw-Hill Co. pp. 1541-1571.
- Madhuri S. 2008. Studies on Oestrogen Induced Uterine and Ovarian Carcinogenesis and Effect of ProImmu in Rats. (PhD Thesis). Jabalpur: RDVV.

- Mayol X, Neal GE, Davies R, Romero A, Domingo J. 1992. Ethinyl Estradiol Induced Cell Proliferation in Rat Liver. Involvement of Specific Populations of Hepatocytes. United States: *Carcinogenesis* 13(12): 2381-2388.
- Pandey, Govind, Madhuri S. 2008. Median Lethal Dose, Acute and Chronic Toxicities of Ethinyl Oestradiol Estrogen. *Natl. J. Life Sci.* 5(2): 291-294.
- Sato M, Rippy MK, Bryant HU. 1996. Raloxifene, Tamoxifene, Nafoxidine, or Estrogen Effects on Reproductive and Nonreproductive Tissues in Ovariectomized Rats. *The FASEB Journal* 10: 905-912.
- Stipic I, Sambunjak D, Novak RK, Pehlic M, Strinic T. 2011. Proposal for Deletion of Ethinylestradiol as A Therapy For Menopausal Symptoms and Osteoporosis Prophylaxis in Women From who Model List of Essential Medicines. 18th Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines, University of Split, Soltanska 2. 2-3.
- Suhargo L. 2005. Efek Estrogenik Ekstrak Daun Handeuleum {*Graptophyllum pictum* (L.) griff)} pada Histologi Uterus Mencit Betina Ovariectomi. *Berk. Penel. Hayati* 10: 107-110.
- Suzuki A, Enari M, Abe Y, Ohta Y, Iguchi T. 1996. Effect of Ovariectomy on Histological Change and Protein Expression in Female Mouse Reproductive Tracts. *In Vivo* 10(1).
- Tao LC. 1991. Oral Contraceptive-associated Liver Cell Adenoma and Hepatocellular Carcinoma. Australia: *Journal of Cancer* 68: 341-347.
- Turan B. 2010. Role Of Antioxidants In Redox Regulation Of Diabetic Cardiovascular Complications. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11: 819-836