

## Potensi Ekstrak Etanol (96%) Jahe Merah (*Zingiber Officinale* Var. *Rubrum*) dalam Memperbaiki Fungsi Hormon, Ovarium dan Resistensi Insulin pada Tikus Wistar Model Polycystic Ovarian Syndrome

Siti Mudrikatin<sup>1\*</sup>, Edy Anas Ahmadi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Husada Jawa Timur

<sup>2</sup> Sekolah Tinggi Ekonomi Islam Permata Bojonegoro, Indonesia

[mudri@gmail.com](mailto:mudri@gmail.com) <sup>1\*</sup>, [gaaneks1@gmail.com](mailto:gaaneks1@gmail.com) <sup>2</sup>

Alamat: Jl. Ade Irma Suryani No.42A, Sumbang, Kec. Bojonegoro, Kabupaten Bojonegoro, Jawa Timur 62115

Korespondensi penulis: [mudri@gmail.com](mailto:mudri@gmail.com)

**Abstract:** Previous studies have shown that red ginger has the potential to treat PCOS because it has been proven to be able to reduce serum FSH, LH and estradiol and testosterone, inhibit the cyclooxygenase pathway, change the pituitary axis, inhibit lipooxygenase expression in various animal studies. The purpose of this study is to prove the potential of red ginger extract as a regulator of anti-androgenic, ovulation, estrogenic activity and reduce insulin resistance. The research design used was for experimental research using a post-test-only control group design. And for the analysis of the potential bioactivity of red ginger extract as an immunomodulatory agent computationally (Insilico). Animal care was carried out in the Pharmacology and Biomedicine Laboratory and has received approval from the Ethics Committee. The sample used was a female Wistar rat on the 56th day of the experiment (after modeling). All treatments were given orally for 28 times. Independent variable = Red ginger extract. Dependent variable = Dependent variables are 1. Hormones: Testosterone, LH, FSH 2. ovarian inflammation activation (PPAR $\gamma$  activation and anti-inflammatory cytokines IL-4 and ROS, NF $\kappa$ B, TNF  $\alpha$ . 3. Insulin resistance (insulin, glucose, HOMA IR) and 4 Lipid profile (TG, HDL, LDL, cholesterol). Control variables are: 1) Gender; 2) Age; 3) Strain; 4) Food and beverage intake; 5) Maintenance and care. Quantitative and qualitative research data. using parametric tests, namely One-Way ANOVA after meeting the requirements for normal data distribution and the same data variance. The One-Way ANOVA statistical test is continued with the Tuckey test to determine the differences in each group..

**Keywords;** Red Ginger Ethanol Extract, Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS), Insulin Resistance and Ovarian Function

**Abstrak:** Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa jahe merah mempunyai potensi untuk mengobati PCOS karena telah terbukti mampu menurunkan serum FSH, LH dan estradiol dan testosteron, menghambat jalur siklooksigenase, mengubah kelenjar hipofisis sumbu, menghambat ekspresi lipoksigenase pada berbagai penelitian hewan coba. Tujuan Penelitian ini membuktikan potensi Ekstrak jahe merah sebagai pengatur aktivitas anti-androgenik, ovulasi, estrogenik dan menurunkan resistensi insulin. Rancangan penelitian yang digunakan adalah ntuk penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan *post-test-only control group*. Dan untuk Analisis potensi bioaktivitas ekstrak jahe merah sebagai agen immunomodulator secara komputasi (Insiliko). Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Biomedik dan telah mendapatkan persetujuan dari komite Etik. Sampel yang digunakan adalah Tikus wistar betina Pada hari ke 56 percobaan (setelah pemodelan). Semua perlakuan dilakukan secara oral selama 28 kali. Variabel independen= Ekstrak jahe merah. Variabel dependen = Variabel dependen yaitu 1. Hormon : Testosteron, LH, FSH 2. aktivasi inflamasi ovarium (aktivasi PPAR $\gamma$  dan sitokin anti inflamasi IL-4 dan ROS, NF $\kappa$ B, TNF  $\alpha$ . 3. Resistensi insulin (insulin, glukosa, HOMA IR) dan 4 Profil lipid ( TG, HDL, LDL, kolesterol). Variabel kendali yaitu: 1) Jenis kelamin; 2) Umur; 3) Galur; 4) Asupan makanan dan minuman; 5) Pemeliharaan dan perawatan. Data hasil penelitian kuantitatif dan kualitatif. menggunakan uji parametrik yaitu *One-Way ANOVA* setelah memenuhi persyaratan distribusi data yang normal dan varians data yang sama. Uji statistic *One-Way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Tuckey* untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok.

**Kata kunci;** Ekstrak Etanol Jahe Merah, Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS), Resistensi Insulin dan Fungsi Ovarium

## **1. LATAR BELAKANG**

*Polycystic ovarian syndrome* (PCOS) merupakan kelainan endokrin yang banyak terjadi pada wanita usia subur yang mempunyai gejala dan dampak cukup signifikan pada kesehatan reproduksi dan metabolik (Strowitzki, 2021). Akibat peningkatan kadar hormon androgen, wanita mengalami amenorea, ovulasi tidak teratur sehingga sulit hamil, pertumbuhan rambut tidak normal di tubuh dan wajah, obesitas infertilitas, jerawat serta peningkatan risiko penyakit jantung dan diabetes (Akre *et al.*, 2022). Resistensi insulin, sindrom metabolik, dan inflamasi persisten juga merupakan gejala PCOS (Abdalla *et al.*, 2020). Resistensi insulin memainkan peran penting dalam patofisiologi PCOS dan merupakan penanda risiko kardiometabolik yang utama.

*World Health Organization* (WHO) memperkirakan bahwa jumlah pasien PCOS sebanyak 116 juta (3,4%) di seluruh dunia pada tahun 2012. Secara global, perkiraan prevalensi PCOS sangat bervariasi, mulai dari 2,2% hingga 26% (Kahal *et al.*, 2017); WHO, 2023). Di Indonesia data resmi mengenai PCOS belum tersedia akan tetapi dari 105 kasus yang telah ditemukan di RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta, sebanyak 100 wanita mengalami oligo/amenorea (94,2%), 34 wanita mengalami hirsutisme (32,4%) dan 50,5% wanita mengalami resistensi insulin (Pangastuti and Sumapradja, 2011).

Manajemen pengobatan signifikan mempengaruhi kualitas hidup pasien PCOS. Terapi komplementer berupa herbal digunakan untuk mencegah, mengendalikan, dan mengurangi komplikasinya (Aquino and Nori, 2014). Jahe merupakan phenolik natural yang aman penggunaanya dalam mencegah, mengendalikan, dan mengurangi komplikasi PCOS. Jahe kaya akan berbagai kandungan kimia, termasuk senyawa fenolik, terpen, polisakarida, lipid, asam organik dan serat mentah (Mao *et al.*, 2019). Jahe merah merupakan salah satu rempah yang memiliki potensi manfaat bagi wanita yaitu meningkatkan insulin sensitivitas, antiinflamasi dan stres oksidatif, mengatur siklus menstruasi dan melancarkan pencernaan ketidaknyamanan yaitu kembung, gas dan gangguan pencernaan (Mudrikatin, 2020; Dastgheib *et al.*, 2022; Sakshi *et al.*, 2024). Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa jahe mempunyai potensi untuk mengobati PCOS karena telah terbukti mampu menurunkan serum FSH, LH dan estradiol dan testosteron, menghambat jalur siklooksigenase, mengubah kelenjar hipofisis sumbu, menghambat ekspresi lipoksigenase, NF- $\kappa$ B dan sintase oksida nitrat pada berbagai penelitian hewan coba (Hajam *et al.*, 2024). Bagaimana patomekanisme polifenol ekstrak Jahe merah mengatur aktivitas anti-androgenik, ovulasi, estrogenik, kesuburan dan menurunkan kejadian penyakit metabolik lainnya seperti infertilitas, resistensi insulin, hiperglikemia,

hiperlipidemia dalam pengobatan PCOS belum banyak yang melaporkan. Melihat latar belakang diatas maka peneliti ingin membuktikan lebih lanjut bagaimana mekanismenya, sehingga ekstrak jahe merah dapat digunakan sebagai bahan pangan fungsional pendamping pada pasien dengan penyakit PCOS.

## 2. KAJIAN TEORI

### **Tinjauan Teori Tentang Jahe Merah**

Rimpang Jahe mengandung minyak atsiri dan oleoresin serta senyawa- senyawa lain. Kandungan minyak atsiri dapat menghasilkan aroma harum pada jahe (Handrianto, 2016). Jahe merah mempunyai kandungan minyak atsiri sebesar 3,9%, kandungan minyak atsiri jahe merah lebih tinggi daripada jahe lainnya (Setiadi *et al.* 2014). Rasa pedas pada jahe disebabkan adanya oleoresin (Handrianto, 2016). Jahe mengandung oleoresin 7-10%, minyak atsiri 1-3%, sari pati sekitar 52%, sejumlah kecil protein, vitamin, mineral (Awanis dan Mutmainnah, 2016). Oleoresin merupakan campuran minyak atsiri dengan senyawa terpenoid didalamnya. Terpenoid memiliki aktivitas antimikroba pada membran sitoplasma dengan merusak membran luar dan membran dalam serta dapat juga berinteraksi dengan protein membran dan target intraseluler (Awanis dan Mutmainnah, 2016). Oleoresin juga mengandung komponen gingerol, shogaol, zingerone, resin. Senyawa turunan fenol seperti gingerol dan shogaol dapat digunakan sebagai senyawa antibakteri, protein dan fenol adalah ikatan yang lemah dan segera mengalami peruraian dan pada kadar tinggi fenol menyebabkan koagulasi protein sehingga membran sel mengalami lisis (Awanis dan Mutmainnah, 2016). Jahe merah selain memiliki kandungan minyak atsiri dan oleoresin, juga memiliki kandungan senyawa-senyawa lain seperti gingerol, 1,8- cineole, 10- dehydrogingerdione, 6-gingerdione, arginine, a-linolenic acid, aspartic,  $\beta$ sitosterol, caprylic acid, capsaicin, chlorogenic acid, farnesal, farnesene, farnesol, dan unsur pati seperti tepung kanji, serta serat-serat resin dalam jumlah sedikit (Lentera, 2002).

### **Patogenesis PCOS**

Patogenesis PCOS merupakan sindrom multifaset dan masih merupakan kelainan yang belum banyak diketahui. Berbagai mekanisme, ini melibatkan interaksi antara hormon, gen, dan pemicu stres lingkungan tertentu (Hajam *et al.*, 2024). Hormon Gonadotropin seperti hormon LH dan FSH, Estrogen, Progesteron, dan Testosteron berperan penting dalam patogenesis PCOS (Hajam *et al.*, 2024). Stresor lingkungan Paparan androgen pada masa prenatal dan obesitas dianggap sebagai faktor penyebab utama. Paparan androgen ibu pada

janin dalam jumlah berlebih dinilai berkontribusi memicu terjadinya PCOS pada janin. Penyebab lain dari berbagai penyakit termasuk kondisi PCOS adalah stres oksidatif. Faktor genetik Berdasarkan adanya familial clustering terdapat fakta adanya komponen genetik (E *et al.*, 2006). Penelitian yang didasarkan pada anak kembar menunjukkan peningkatan dua kali lipat sindrom ovarium polikistik pada kembar identik secara genetik dibandingkan dengan kembar tidak identik (Vink *et al.*, 2006). Terlepas dari gen yang terkait dengan sintesis dan metabolisme testosteron dan insulin, cara pewarisan sindrom ovarium polikistik masih belum jelas (Jones *et al.*, 2010).

### **Hubungan PCOS dan gangguan metabolisme.**

Data statistik menunjukkan bahwa 1,5% orang menderita PCOS juga didiagnosis positif diabetes tipe 2 dibandingkan dengan 0,4%. wanita non-PCOS, yang berarti bahwa wanita PCOS sebanyak lima kali lipat lebih rentan terhadap diabetes tipe 2 9,7% menderita diabetes tipe 2. Insiden diabetes tipe 2 erat kaitannya dengan BMI (Abbott *et al.*, 2020; Glintborg *et al.*, 2015). Kelebihan berat badan, obesitas dan PCOS memiliki efek sinergis pada perkembangan diabetes tipe 2 (Ollila *et al.*, 2017 ; Rubin *et al.*, 2017) melaporkan bahwa pengobatan kontrasepsi oral diberikan kepada wanita PCOS memiliki risiko lebih besar terkena diabetes tipe 2. Lebih lanjut, penelitian yang sama melaporkan bahwa kontrasepsi oral yang diberikan kepada wanita PCOS meningkatkan tingkat insulin dan juga meningkatkan kemungkinan pengembangan tipe 2 diabetes (Glintborg *et al.*, 2015).

Berbagai penelitian telah dilaporkan bahwa wanita PCOS memiliki risiko penyakit kardiovaskular yang lebih tinggi (Zhao *et al.*, 2016 ; Glintborg *et al.*, 2018). Insulin menghasilkan efek vasodilatasi karena pelepasan oksida nitrat endotel. Insiden IR telah dilaporkan sebanyak 59,76% pada wanita PCOS. Resistensi insulin meningkatkan sintesis agen yang juga menyebabkan peningkatan vasokonstriktif dan stres pembuluh darah pada wanita PCOS. Hiper-insulinemia memberikan efek hipertrofik langsung pada endotel vaskular serta sel otot polos pembuluh darah, resistensi insulin merangsang produksi ET-1, menyebabkan disfungsi endotel (Osibogun, Ogunmoroti and Michos, 2020). Studi meta-analisis di antara 100.000 wanita berusia antara 20-40 tahun, melaporkan bahwa ada hubungan yang cukup besar antara PCOS dan MI (Zhao *et al.*, 2016). Dislipidemia dengan tanda kolesterol LDL tinggi dan trigliserida tinggi, sedangkan HDL menurun terjadi pada PCOS (Mallick, Khatun and Islam, 2018). Obesitas adalah salah satu penyebab utama dislipidemia terlepas dari PCOS, insulin resistensi juga berhubungan dengan dislipidemia, karena PCOS diinduksi dislipidemia menyebabkan resistensi insulin. Baik obesitas maupun dislipidemia

adalah penyebab utama aterosklerosis serta CVD (Mallick, Khatun and Islam, 2018). Hiperandrogenisme dianggap sebagai salah satu penyebab utama dislipidemia. Hiperandrogenisme mungkin menyebabkan kelainan pada profil lipoprotein dengan bertindak langsung pada hati (Harmanci *et al.*, 2013; Echiburú *et al.*, 2012).

### **Obat sintetik efek penyembuhannya pada PCOS**

Metformin lebih dari 50 tahun metformin telah digunakan untuk pengobatan diabetes tipe 2, juga antikanker (Gandini *et al.*, 2014), agen antipenuaan (Bannister *et al.*, 2014), agen kardiovaskular (Hong *et al.*, 2013), neuroprotektif (Cheng *et al.*, 2014) dan dianggap sebagai obat pilihan untuk PCOS (Patel and Shah, 2017).

Metformin adalah salah satu obat allopathic yang berpotensi efektif digunakan untuk pengobatan diabetes, efek terapeutik juga direkomendasikan untuk pengobatan dari PCOS. Potensi kemanjuran metformin yaitu menurunkan pembentukan glukosa hati, menurunkan biogenesis lipid, meningkatkan laju oksidasi asam lemak dan memperlambat glukoneogenesis dan pada akhirnya mengurangi kadar insulin dan glukosa dalam sirkulasi darah. Umumnya, metformin bekerja seperti insulin sensitizer, karena meningkatkan sensitivitas sel terhadap insulin dan juga mempunyai efek langsung pada ovarium (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2010).

### **Mekanisme fitoterapi untuk PCOS**

Obat-obatan herbal adalah intervensi kompleks yang mempunyai potensi interaksi sinergis dan antagonistik antar senyawa (Williamson, 2001). Efek dalam tubuh juga dapat menunjukkan interaksi komplikasi bersamaan dengan sistem tubuh yang berbeda, keduanya secara biokimia dan dengan mengubah fungsi organ. Studi praklinis dan klinis enam obat herbal mempunyai efek menguntungkan bagi wanita dengan oligo/amenore, hiperandrogenisme dan PCOS. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme kerjanya komponen bioaktif yang berbeda. Saat ini perawatan medis dibatasi oleh pendekatan terapeutiknya yang sempit dan oleh efek samping dari beberapa obat. Oleh karena itu, berdasarkan yang tersedia literatur menjadi jelas bahwa komponen bioaktif mungkin bermanfaat memerangi gangguan reproduksi terburuk (Arentz, Abbott and Smith, 2014). Flavonoid saat ini dikenal sebagai obat pilihan karena potensi penyembuhannya terhadap hiperlipidemia, hiperglikemia, stres oksidatif, dan Hiperandrogenisme sebagai konsekuensinya PCOS (Teng *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2022 ; Jahan *et al.*, 2016). Flavonoid adalah molekul kompleks potensial yang memiliki beberapa bermanfaat seperti ini dapat bertindak sebagai antimikroba, antivirus, antiulcerogenik, sitotoksik, antineoplastik, antiinflamasi, antioksidan,

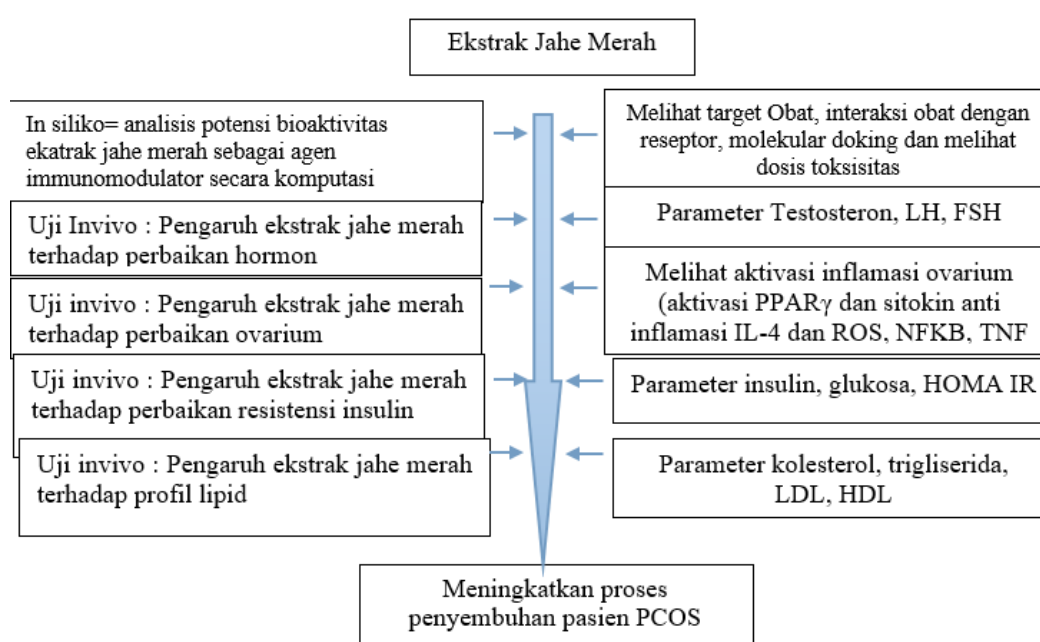
antihipertensi, hepatoprotektif, hipolipidemik dan aktivitas anti-platelet (Sun *et al.*, 2020 ; Teng and Chen, 2017). Selain itu juga mempengaruhi kesehatan metabolisme wanita misalnya menyebabkan tipe 2 diabetes, resistensi insulin, obesitas, penyakit kardiovaskular, dll.

### **3. METODOLOGI PENELITIAN**

Desain Penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan *post-test-only control group*. Dan untuk Analisis potensi bioaktivitas ekstrak jahe merah sebagai agen immunomodulator secara komputasi (Insiliko). Pemeliharaan hewan coba dan penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Biomedik FK UB Malang Dan telah mendapatkan persetujuan dari komite Etik. Sampel yang digunakan adalah Tikus wistar betina yang digunakan sebagai model hewan coba PCOS dengan diinduksi pristane, Mencit berusia 10-12 minggu, dengan berat rata-rata 180-220 gram, tikus wistar betina berwarna bulu putih, kondisi aktif dan tingkah laku normal, tidak nampak kecacatan secara anatomi. Sebelum percobaan, hewan-hewan diadaptasikan ke lingkungan laboratorium selama 14 hari. Selama penelitian, semua tikus diberi makanan standar dan air dan disimpan dalam kandang polipropilen (43 cm 30 cm 15 cm) di sesuai kondisi standar hewan (siklus diurnal 12 jam terang dan 12 jam gelap mulai jam 07.00, suhu ruangan terkendali  $22 \pm 3$  C, relatif kelembaban 45-55%). Induksi PCOS desain penelitian PCOS diinduksi pada semua hewan percobaan ( $n \frac{1}{4} = 36$ ) kecuali kelompok kontrol ( $n \frac{1}{4} = 12$ ) dengan suntikan intramuskular tunggal injeksi *estradiol valerate* (EV) dengan dosis 4 mg/ kg/hari (dilarutkan dalam 0,4 mL minyak wijen) selama 28 hari (Pournaderi *et al.*, 2017) (Farhadi-Azar *et al.*, 2023). Setelah 28 hari, untuk memastikan induksi PCOS, dilakukan apusan vagina dikumpulkan dari setiap tikus antara pukul 08:00 dan 9:00 selama 14 hari berturut-turut untuk mengetahui siklus estrusnya. Pengamatan siklus estrus yang tidak teratur pada apusan vagina (Tikus dengan empat tahap estrus terganggu) dengan mikroskop cahaya diakui sebagai kriteria utama untuk memastikan keberhasilan induksi model PCOS. Selain itu, untuk kelengkapannya validasi model, 6 ekor tikus pada setiap kelompok diacak dipilih, dikorbankan dengan injeksi intraperitoneal (ip). natrium pentobarbital (Sigma Aldrich Co. USA) (60 mg/kg) dan ovarium dievaluasi untuk konfirmasi histopatologi PCOS. Adanya banyak kista di ovarium jaringan menunjukkan ciri-ciri utama PCOS. Setelah pemodelan, hewan yang tersisa di kelompok kontrol ( $n \frac{1}{4} 6$ ) dan PCOS ( $n \frac{1}{4} 30$  dalam 5 kelompok yang terdiri dari 6 hewan/terdistribusi kelompok) digunakan untuk evaluasi utama di masa depan. Juga, pada hari itu 77 (7 hari sebelum pengambilan sampel), siklus reproduksi masing-masing tikus dievaluasi kembali.

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk membuktikan potensi Ekstrak jahe merah sebagai pengatur aktivitas anti-androgenik, ovulasi, estrogenik dan menurunkan resistensi insulin. Adapun secara khusus tujuan penelitian adalah: (1). Membuktikan potensi ekstrak jahe merah terhadap penurunan testosteron LH (2). Membuktikan potensi ekstrak jahe merah terhadap jumlah folikel ovarium (3). Membuktikan potensi ekstrak jahe merah menghambat inflamasi ovarium (aktivasi  $\text{PPAR}\gamma$  dan sitokin anti inflamasi IL-4). (4). Membuktikan potensi ekstrak jahe merah menghambat resistensi insulin (HOMA IR, insulin dan glukosa) (6). Membuktikan potensi ekstrak jahe merah menghambat dislipidemia

### Roadmap Penelitian



Gambar 1

## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pembagaian kelompok perlakuan

Pada hari ke 56 percobaan (setelah pemodelan), hewan coba dibagi secara acak menjadi lima kelompok sama besar yang masing-masing terdiri dari enam tikus: (1) Kelompok kontrol, tikus sehat (tikus yang diinduksi non-PCOS) yang menerima makanan normal. (2) Kelompok PCOS: tikus yang diinduksi PCOS yang menerima 1 ml/hari normal saline. (3) PCOS + Metformin (MET) (kelompok positif): Tikus PCOS yang menerima MET (Merck Co., Jerman) sebanyak 250 mg/kg/hari (Mvondo *et al.*, 2020). (4) PCOS + EJM 400: Tikus PCOS menerima ekstrak jahe merah dengan dosis 500mg/kg/hari. (5) PCOS + EJM 800: Tikus PCOS menerima



ekstrak Jahe merah dengan dosis 1000mg/kg/hari. (6) PCOS + EJM 1200: Tikus PCOS menerima ekstrak Jahe merah sesuai dosisnya 1500 mg/kg/hari.

Semua perlakuan dilakukan secara oral gavage selama 28 kali yaitu satu kali sehari.

### **Variabel Penelitian**

Variabel independen= Ekstrak jahe merah. Variabel dependen = Variabel dependen yaitu 1. Hormon : Testosteron, LH, FSH 2. aktivasi inflamasi ovarium (aktivasi PPAR $\gamma$  dan sitokin anti inflamasi IL-4 dan ROS, NFKB, TNF  $\alpha$ ). 3. Resistensi insulin (insulin, glukosa, HOMA IR) dan 4 Profil lipid ( TG, HDL, LDL, kolesterol). Variabel kendali :Variabel kendali yaitu: 1) Jenis kelamin; 2) Umur; 3) Galur; 4) Asupan makanan dan minuman; 5) Pemeliharaan dan perawatan. Hormon : Testosteron, LH, FSH diambil dari serum hewan coba dengan metoda *Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay* (ELISA), masing-masing berdasarkan metode dari Cusabio, eBioscience, dan BioLegend. Aktivasi inflamasi ovarium (aktivasi PPAR $\gamma$  dengan imunohistokimia dan sitokin anti inflamasi IL-4 dan ROS dengan pemeriksaan elisa, NFKB diperiksa dengan imunohistokimia, dan TNF  $\alpha$  diperiksa dengan elisa. Resistensi insulin yaitu sensitivitas dari insulin yang diperiksa dengan elisa, pemeriksaan glukosa darah, dan indeks HOMA IR diukur dengan formula:  $HOMA-IR = [glucose] \text{ (mmol/l)} \times [insulin] \text{ (}\mu\text{U/ml)}/22.5$  (Matthews *et al.*, 1985).

### **Prosedur Pemeriksaan**

#### **a. Pembuatan Ekstrak Etanol jahe merah**

Jahe merah dibersihkan lalu didinginkan sampai kering, dengan kadar air 5%. Herbal yang telah kering dipotong-potong dan digiling sampai terbentuk serbuk. Sebanyak 300 g serbuk dalam labu ukur 2000 ml dimaserasi dalam etanol 96% sampai seluruh serbuk terendam (1500 ml). Maserasi dilakukan selama 6 jam sambil digoyang menggunakan *shaker* dengan kecepatan 40 rpm. Rendaman serbuk direfluks selama 3 jam dan disaring menggunakan kertas saringm ampas penyaringan direfluks kembali dengan etanol 96%, diulang sebanyak 2 kali. Etanol yang terdapat pada filtrat dihilangkan dengan cara diuapkan menggunakan evaporator vakum (*vacuum evaporator*) pada suhu 40°C, sehingga diperoleh ekstrak kental (*crude extract*) etanol 96%.

#### **b. Pemeliharaan hewan percobaan**

Sebelum perlakuan, 48 ekor tikus terlebih dahulu diaklimatisasi dalam kondisi laboratorium selama dua minggu dengan diberi makan yang cukup. Setelah itu dibagi dalam lima kelompok perlakuan seperti diatas. Tikus dibuat model PCOS dengan suntikan



intramuskular tunggal injeksi *estradiol valerate* (EV) dengan dosis 4 mg/ kg/hari (dilarutkan dalam 0,4 mL minyak wijen) selama 28 hari (Pournaderi *et al.*, 2017) (Farhadi-Azar *et al.*, 2023) Hewan uji ditempatkan dengan kandang terpisah (satu kandang / ekor). Pemberian ekstrak jahe merah secara oral/sonde diberikan setiap hari selama 30 hari. Pada hari terakhir, puasa semalam, tikus kemudian ditimbang berat badannya, tikus di euthanasia dengan chloroform dosis tinggi, segera darah diambil dari jantung, darah dipisahkan jadi dua tabung untuk plasma dan untuk serum, kemudian jaringan liver dan ovarium, arteri disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai digunakan.

- c. Pengukuran TNF, IL4, Testosteron, LH, FSH dengan Metode Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) Koma Biotech Inc

Supernatan diambil dan disimpan sampai akan digunakan. Pengukuran *mouse ELISA Kit*. Prosedur pengukuran dengan mouse ELISA kit yaitu : 1). Label dulu sebelum pemeriksaan, 2). Sisakan 1 well untuk dikosongkan untuk *substrate blank*. 3). Pipet 200  $\mu\text{L}$  untuk standar 1-6 untuk duplikat well, 4). Pipet 200  $\mu\text{L}$  spesimen ke dalam sumur buat duplikat, 5). Tutup mikropate dengan *plate sealer* dan inkubasi 30 menit pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ ., 6). *Plate* dicuci 4 kali dengan sedikitnya 300  $\mu\text{L}$  *1X Wash Buffer* tiap sumur dan *buffer* residual dibuang dengan mengetuk-ketuk kuat *plate* yang telah dibalik di atas kertas penyerap. Semua proses pencucian berikutnya harus dilakukan dengan cara yang sama; 7). Ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  Detector Antibody untuk setiap sumur sampel. 8). *Plate* ditutup dengan *plate sealer* yang disertakan di dalam kit dan diinkubasikan pada temperatur  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit. 9). *Plate* dicuci 4 kali dengan sedikitnya 300  $\mu\text{L}$  *1X Wash Buffer* tiap sumur dan *buffer* residual dibuang dengan mengetuk-ketuk kuat *plate* yang telah dibalik di atas kertas penyerap. Semua proses pencucian berikutnya harus dilakukan dengan cara yang sama, 10). Ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  *Substrate* pada masing masing sumur standart, 11). diinkubasikan selama 30 menit dalam pada temperature ruangan. Sumur dengan konsentrasi *antibodi* yang tinggi harus berubah warna menjadi biru, 12) Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100  $\mu\text{L}$  *Stop Solution* untuk masing-masing sumur. Warna biru akan berubah menjadi warna kuning. 13). Setelah 15 menit Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 450 nm.

- d. Prosedur pemeriksaan ROS, PPAR $\gamma$  dan NFK $\beta$  dalam jaringan nefron dengan Imunohistokimia.

Tahap pertama adalah deparafinasi. Preparat dicelup dalam xylol sebanyak 2 kali, alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%, 30%) dan aquades secara berurutan. Preparat dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Tahap berikutnya adalah permeabilitas sel. Preparat diinkubasi sel pada 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  dalam PBS selama 10 menit suhu ruang. Preparat dicuci

selama 3 kali dengan PBS. Bloking Sel. Preparat diinkubasi sel pada 1 % BSA (*Bovine Serum Albumin*) selama 1 jam pada suhu ruang. Preparat dicuci 3 kali dengan PBS. Preparat diinkubasi sel pada anti mouse ROS, PPAR $\gamma$  dan NFK $\beta$  dan antibodi primer 1:1000 dalam *Fetal Bovine Serum* (PBS). Setelah itu dicuci dengan PBS 3 x 5 menit. Inkubasi Sel dengan Antibodi sekunder. Preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder selama 10 menit pada suhu ruang. Preparat dicuci sel pada PBS selama 3x5 menit. Preparat ditetesi dengan *Diaminobenzidine* (DAB) selama 5-10 menit. Preparat dicuci sel dengan aquades 3x5 menit. Preparat ditetesi *counterstain* dengan *Meyer's hematoxilen* selama 10 menit. Preparat dibiarkan pada suhu kamar hingga kering. Mounting. Setiap slide diberi label. Satu tetes medium (Entelin) dijatuhkan ke atas preparat. Cover glass ditutupkan ke atas preparat yang telah diberi mounting medium

Data hasil penelitian akan disajikan dalam  $mean \pm SD$ . Data penelitian merupakan data kuantitatif dan kualitatif. Kemudian semua data dianalisis dengan menggunakan statistik parametrik dengan menggunakan software SPSS versi 23, menggunakan uji parametrik yaitu *One-Way ANOVA* setelah memenuhi persyaratan distribusi data yang normal dan varians data yang sama. Uji statistic *One-Way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Tuckey* untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok. Apabila uji *One-Way ANOVA* tidak memenuhi persyaratan maka dilakukan transformasi data dan jika tetap tidak memenuhi persyaratan dilakukan uji *Kruskal-Wallis*, jika signifikan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

## 5. KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol (96%) jahe merah (*Zingiber officinale* var. *rubrum*) memiliki potensi dalam memperbaiki fungsi hormon, ovarium, dan resistensi insulin pada tikus Wistar model Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS). Ekstrak jahe merah terbukti efektif menurunkan kadar hormon androgenik seperti testosteron, LH, dan FSH, serta meningkatkan keseimbangan hormon estrogenik. Selain itu, ekstrak ini juga menunjukkan aktivitas antiinflamasi dengan menekan ekspresi ROS, NF- $\kappa$ B, dan TNF- $\alpha$  serta meningkatkan kadar IL-4, yang berkontribusi pada penurunan inflamasi ovarium.

Penelitian ini juga mengungkapkan bahwa ekstrak jahe merah dapat mengurangi resistensi insulin melalui penurunan kadar glukosa, insulin, dan HOMA-IR, serta memperbaiki profil lipid dengan menurunkan trigliserida dan LDL sekaligus meningkatkan kadar HDL. Uji bioaktivitas secara *in silico* menunjukkan bahwa senyawa aktif dalam ekstrak jahe merah berperan sebagai imunomodulator dan pengatur aktivitas hormon.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini mendukung penggunaan ekstrak jahe merah sebagai agen terapeutik potensial untuk mengatasi PCOS melalui efeknya pada regulasi hormon, pengendalian inflamasi, dan perbaikan resistensi insulin. Studi lebih lanjut pada manusia diperlukan untuk memastikan efektivitas dan keamanan penggunaan ekstrak ini sebagai pengobatan alternatif bagi penderita PCOS.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbott, D.H. *et al.* (2020) 'Implications for Pathophysiology and Therapy', 14(2), pp. 131–143. Available at: <https://doi.org/10.1080/17446651.2019.1576522>. Hyperandrogenic.
- Abdalla, M.A. *et al.* (2020) 'A review of therapeutic options for managing the metabolic aspects of polycystic ovary syndrome', *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 11, pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1177/2042018820938305>.
- Akre, S. *et al.* (2022) 'Recent Advances in the Management of Polycystic Ovary Syndrome: A Review Article', *Cureus*, 14(8), pp. 10–15. Available at: <https://doi.org/10.7759/cureus.27689>.
- Aquino, C.I. and Nori, S.L. (2014) 'Complementary therapy in polycystic ovary syndrome.', *Translational medicine @ UniSa*, 9(11), pp. 56–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24809037> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4012377>.
- Bannister, C.A. *et al.* (2014) 'Can people with type 2 diabetes live longer than those without? A comparison of mortality in people initiated with metformin or sulphonylurea monotherapy and matched, non-diabetic controls', *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 16(11), pp. 1165–1173. Available at: <https://doi.org/10.1111/dom.12354>.
- Chen, L. *et al.* (2022) 'Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids: a review', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(28), pp. 7730–7742. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1917508>.
- Dastgheib, M. *et al.* (2022) 'A comparison of the effects of cinnamon, ginger, and metformin consumption on metabolic health, anthropometric indices, and sexual hormone levels in women with polycystic ovary syndrome: A randomized double-blinded placebo-controlled clinical trial', *Frontiers in Nutrition*, 9(November), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1071515>.
- Diamanti-Kandarakis, E. *et al.* (2010) 'Metformin: An old medication of new fashion: Evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome', *European Journal of Endocrinology*, 162(2), pp. 193–212. Available at: <https://doi.org/10.1530/EJE-09-0733>.
- Diamanti-Kandarakis, E. and Dunaif, A. (2012) 'Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: An update on mechanisms and implications', *Endocrine Reviews*, 33(6), pp. 981–1030. Available at: <https://doi.org/10.1210/er.2011-1034>.
- E, D.-K. *et al.* (2006) 'Polycystic ovary syndrome: the influence of environmental and genetic

- factors.’, *Hormones (Athens)*, 5(1), pp. 17–34.
- Echiburú, B. *et al.* (2012) ‘CAG repeat polymorphism of androgen receptor gene and X-chromosome inactivation in daughters of women with polycystic ovary syndrome (PCOS): Relationship with endocrine and metabolic parameters’, *Gynecological Endocrinology*, 28(7), pp. 516–520. Available at: <https://doi.org/10.3109/09513590.2011.650744>.
- Gandini, S. *et al.* (2014) ‘Metformin and cancer risk and mortality: A systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders’, *Cancer Prevention Research*, 7(9), pp. 867–885. Available at: <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0424>.
- Glintborg, D. *et al.* (2018) ‘Cardiovascular disease in a nationwide population of Danish women with polycystic ovary syndrome’, *Cardiovascular Diabetology*, 17(1), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0680-5>.
- Hajam, Y.A. *et al.* (2024) ‘A review on critical appraisal and pathogenesis of polycystic ovarian syndrome’, *Endocrine and Metabolic Science*, 14(January), p. 100162. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.endmts.2024.100162>.
- Harmanci, A. *et al.* (2013) ‘Oral contraceptive plus antiandrogen therapy and cardiometabolic risk in polycystic ovary syndrome’, *Clinical Endocrinology*, 78(1), pp. 120–125. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2012.04466.x>.
- Jones, G.L. *et al.* (2010) ‘Do South Asian women with PCOS have poorer health-related quality of life than Caucasian women with PCOS? A comparative cross-sectional study’, *Health and Quality of Life Outcomes*, 8(1), p. 149. Available at: <https://doi.org/10.1186/1477-7525-8-149>.
- Jones, L. and Regan, F. (2019) *Endocrine disrupting chemicals*. Third Edit, *Encyclopedia of Analytical Science*. Third Edit. Elsevier. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14512-3>.
- Kahal, H. *et al.* (2017) ‘The Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome: a Systematic Review and Meta-analysis’, *Endocrine Abstracts*, 8(56), pp. 96351–96358. Available at: <https://doi.org/10.1530/endoabs.50.p339>.
- Mallick, S., Khatun, S. and Islam, S. (2018) ‘Dyslipidemia in Women with Polycystic Ovary Syndrome : Comparison between Obese Cases and Obese Controls in a Government Hospital in West Bengal’, 6(4), pp. 34–38. Available at: <https://doi.org/10.17354/ijss/2018/201>.
- Mao, Q.Q. *et al.* (2019) ‘Bioactive compounds and bioactivities of ginger (zingiber officinale roscoe)’, *Foods*, 8(6), pp. 1–21. Available at: <https://doi.org/10.3390/foods8060185>.
- Mudrikatin, S. (2020) ‘The influence of red ginger extract in menopause climacterium period of total cholesterols in covid-19 pandemic period in east java’, *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(6), pp. 831–835. Available at: <https://doi.org/10.31838/srp.2020.6.120>.
- Ollila, M.M.E. *et al.* (2017) ‘Overweight and obese but not normal weight women with PCOS are at increased risk of Type 2 diabetes mellitus - A prospective, population-based

- cohort study', *Human Reproduction*, 32(2), pp. 423–431. Available at: <https://doi.org/10.1093/humrep/dew329>.
- Osibogun, O., Ogunmoroti, O. and Michos, E.D. (2020) 'Polycystic ovary syndrome and cardiometabolic risk: Opportunities for cardiovascular disease prevention', *Trends in Cardiovascular Medicine*, 30(7), pp. 399–404. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2019.08.010>.
- Pangastuti, N.P. and Sumapradja, K. (2011) 'Profile of Polycystic Ovarian Syndrome Patients in Dr. Cipto Mangunkusumo General Hospital Jakarta', *Indonesian Journal of Obstetrics and Gynecology*, pp. 8–13. Available at: <http://inajog.com/index.php/journal/article/view/215>.
- Patel, R. and Shah, G. (2017) 'Effect of metformin on clinical, metabolic and endocrine outcomes in women with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials', *Current Medical Research and Opinion*, 33(9), pp. 1545–1557. Available at: <https://doi.org/10.1080/03007995.2017.1279597>.
- Rubin, K.H. *et al.* (2017) 'Development and risk factors of type 2 diabetes in a nationwide population of women with polycystic ovary syndrome', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 102(10), pp. 3848–3857. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01354>.
- Strowitzki, T. (2021) 'Advanced diagnosis of polycystic ovary syndrome—new prediction models with standard parameters', *Fertility and Sterility*, 115(1), pp. 92–93. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.09.031>.
- Sun, C. *et al.* (2020) 'Dietary polyphenols as antidiabetic agents: Advances and opportunities', *Food Frontiers*, 1(1), pp. 18–44. Available at: <https://doi.org/10.1002/fft2.15>.
- Teng, H. and Chen, L. (2017) ' $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitors from seed oil: A review of liposoluble substance to treat diabetes', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), pp. 3438–3448. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1129309>.
- Vink, J.M. *et al.* (2006) 'Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(6), pp. 2100–2104. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1494>.
- Williamson, E.M. (2001) '1-s2.0-S0944711304700586-main', 8(5), pp. 401–409. Available at: <http://www.urbanfischer.de/journals/phytomed%0APhytomedicine>.
- Zhao, L. *et al.* (2016) 'Polycystic ovary syndrome (PCOS) and the risk of coronary heart disease (CHD): A meta-analysis', *Oncotarget*, 7(23), pp. 33715–33721. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9553>.