



Menjelajahi Sifat Antiinflamasi dan Antioksidan Jahe Merah pada Pencegahan Terjadinya Polikistik Ovarium Syndrome (PCOS): Studi In Silico dan In Vivo

Siti Mudrikatin^{1*}, Herin²

^{1,2}STIKES Husada Jombang, Indonesia

Alamat: JL Veteran, Mancar Peterongan, Mancarmalang, Mancar, Kec. Jombang, Kabupaten Jombang, Jawa Timur 61481

Korespondensi penulis: mudrisiti@gmail.com

Abstract: Background of the incident of increasing cases of polycystic ovary syndrome (PCOS) with a prevalence of insulin resistance of 50-75%, insulin resistance will cause oxidative stress due to hyperglycemia which will then increase proinflammatory cytokines in TNF- α and other cytokines, thus triggering an increase in inflammation resulting in an increase in infertility cases of 89.6%. The aim is to investigate the prevention of PCOS through red ginger injected with testosterone propionate in vivo, insilico using open babel software on PyRx V.1.0. The in vivo method is an experimental laboratory study, using two five rats of the *Rattus norvegicus* type divided into five groups using PCOS prevention through red ginger, examinations carried out on blood and ovarian organs, preparations were made which were observed with a binocular microscope on TNF- α examination with immunohistochemistry, ELISA examination on insulin levels, blood examination on blood glucose, data analysis was carried out using one way ANOVA. The study began with the preparation of control activator ligands, 6-Shogaol (Pubchem ID 5281794) and 6-Gingerol (Pubchem ID 442793) and target receptors TNF- α (PDB ID: 2AZ5) and KEAP1-NRF2 (PDB ID: 5CGJ), Insilico results that occur in red ginger are able to interact at a similar position in the interaction of TNF- α with control compared to KEAP1. In vivo research results showed that testosterone propionate 100 mg / kg BW significantly increased the inflammatory cytokine TNF- α , along with polycystic markers in folliculogenesis ($p < 0.05$) compared to negative controls and administration of red ginger at 800 mg / kg significantly decreased TNF- α levels. red ginger also prevents the occurrence of pcos. The conclusion shows that the bioactive 6-shogaol 6-gingerol in red ginger can provide preventive benefits in polycystic ovary syndrome (pcos) by modulating the inflammatory pathway.

Keywords: Red ginger, anti-inflammatory and antioxidant, PCOS prevention

Abstrak: Latarbelakang kejadian adanya peningkatan kasus polikistik ovarium syndroma (pcos) dengan prevalensi resistensi insulin 50-75%, resistensi insulin akan menyebabkan stress oksidatif karena keadaan hiperglikemia kemudian akan meningkatkan sitokin proinflamasi pada TNF- α dan sitokin yang lain, sehingga memicu adanya peningkatan peradangan sehingga terjadi peningkatan kasus infertilitas 89,6%. Tujuan untuk menyelidiki pencegahan pcas melalui jahe merah yang disuntik testosterone propionat pada invivo, insilico menggunakan software open babel pada PyRx V.1.0. Metode invivo jenis penelitian eksperimental laboratoris, menggunakan dua lima tikus jenis *Rattus norvegicus* di bagi lima kelompok dengan menggunakan pencegahan pcas melalui jahe merah, pemeriksaan yang dilakukan pada darah dan organ ovarium, dilakukan pembuatan preparat yang diamati dengan mikroskop binokuler pada pemeriksaan TNF- α dengan pemeriksaan imunohistokimia, pemeriksaan elisa pada kadar insulin, pemeriksaan darah pada glukosa darah, di lakukan analisa data dengan menggunakan one way anova. Penelitian diawali dengan penyiapan ligan control activator, 6-Shogaol (Pubchem ID 5281794) dan 6-Gingerol (Pubchem ID 442793) dan reseptor target TNF- α (PDB ID: 2AZ5) dan KEAP1-NRF2 (PDB ID: 5CGJ), Hasil Insilico yang terjadi pada jahe merah mampu berinteraksi pada posisi yang similar pada interaksi TNF- α dengan control dibandingkan KEAP1. In vivo hasil penelitian menunjukkan bahwa testosterone propionat 100 mg/kg BB secara signifikan meningkatkan sitokin inflamasi TNF- α , bersama dengan penanda polikistik pada folikulogenesis ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol negatif dan pemberian jahe merah pada 800 mg/kg secara signifikan menurunkan kadar TNF- α . jahe merah juga mencegah terjadinya pcas. Kesimpulan menunjukkan bahwa bioaktif 6-shogaol 6-gingerol pada jahe merah dapat memberikan manfaat pencegahan pada polikistik ovarium syndroma (pcas) dengan memodulasi jalur inflamasi.

Kata kunci: Jahe merah, antiinflamasi dan antioksidan, pencegahan PCOS

1. PENDAHULUAN

Polikistik ovarium syndrome (pcos) ditandai resistensi insulin yang sering terjadi pada wanita dengan obesitas, penegakan diagnosis ini menggunakan kriteria Rotterdam yaitu oligo atau anovulasi, hiperandrogen dan gambaran polikistik di ovarium prevalensi kejadian pcos pada kejadian wanita reproduksi adalah 5-21%. Pada wanita pcos, prevalensi resistensi insulin 50-75% dengan penurunan sensitivitas insulin 35-40% dibanding wanita normal, pcos akan mengalami infertilitas 61%-89,6% [1]. Resistensi insulin akan menyebabkan stress oksidatif oleh karena keadaan hiperglikemia dan peningkatan kadar asam lemak bebas yang kemudian akan meningkatkan TNF- α [2]. Beberapa peneliti menetapkan model tikus pcos dapat berhasil diinduksi dengan pemberian testosteron propionat secara subkutan atau intraperitoneal selama 21 hari, perlu diseleksi dari tikus pcos dengan hiperinsulinemia. [3]. Penanganan hyperinsulinemia pada pasien pcos akan menyebabkan perbaikan folikulogenesis sehingga menyebabkan ovulasi dan angka kehamilan yang tinggi, terdapat penelitian yang melaporkan bahwa pasien pcos, ditemukan konsentrasi sitokin proinflamasi yaitu TNF- α meningkat juga sitokin yang lain [4,5]. Shogaol gingerol pada jahe merah memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan dan antioksidan, antioksidan dan antibakteri, diperlukan uji klinis lebih lanjut untuk mengetahui dosis yang tepat, efektifitas serta efek samping pemberian jahe merah sebagai pencegahan [6]. Kandungan bioaktif gingerol dan shogaol pada jahe merah mampu memberikan aktivasi farmakologi, seperti anti inflamasi dan anti oksidan dan anti oksidan dan antioksidan, shogaol dan gingerol pada jahe merah merupakan senyawa fenolik yang mampu menekan aktivitas anti inflamasi dan anti oksidan dan anti oksidan dengan cara menekan sitokin proinflamasi yaitu TNF- α [7]. dan senyawa gingerol menghambat sitokin dalam meningkatkan sel radang melalui penekanan ekspresi mediator proinflamasi secara langsung dimana mediator ini bertanggungjawab dalam peradangan persisten. Gingerol juga menghambat peningkatan nuklir faktor kappa β yaitu salah satu komponen inflamasi nuklir faktor kappa β merupakan faktor transkripsi yang mengontrol sejumlah gen penting dalam proses imunitas dan inflamasi diantaranya adalah TNF- α [8]. Berdasarkan Penelitian terdahulu bahwa shogaol gingerol terbukti efek anti inflamasi dan anti oksidan dan anti oksidan yang dibuktikan dengan penurunan kadar TNF- α . [9]. Jahe merah yang memiliki antiinflamasi dan antioksidan dan antioksidan yang lebih baik [10]. Namun, penelitian yang mengkaji efek sifat antiinflamasi dan antioksidan dan antioksidan pada jahe merah dapat mencegah terjadinya polikistik ovarium sindrom (pcos).

2. METODE

Desain dan pengaturan studi

Penelitian *in silico* dilakukan untuk menyelidiki sifat antiinflamasi dan antioksidan dan antioksidan dari jahe merah. Penelitian diawali dengan penyiapan ligan control activator, 6-Shogaol (Pubchem ID 5281794) dan 6-Gingerol (Pubchem ID 442793) dan reseptor target TNF- α (PDB ID: 2AZ5) dan KEAP1-NRF2 (PDB ID: 5CGJ), diikuti dengan analisis molecular docking untuk memprediksi afinitas pengikatan ketiga protein target tersebut [11]. Untuk lebih memastikan temuan ini, penelitian eksperimental menggunakan tikus betina *Rattus norvegicus* dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya Indonesia. Penelitian menggunakan hewan coba tikus jenis *rattus norvegicus* yang dibagi menjadi lima kelompok, selama 7 hari (hari ke 1-7) dilakukan aklimatisasi, kemudian selama 12 hari (hari ke 8-20) dilakukan observasi estrus, kemudian selama 3 hari (hari ke 21-23) kelompok perlakuan diberi jahe merah sesuai dengan dosis, selama 21 hari (hari ke 24-45) dilakukan pada (a) kelompok kontrol diberi makan minum standart secara oral; (b) kelompok kontrol positif, tikus normal diberi makan minum standart secara oral; dan disuntik testosterone propionate 100 mg/kg/bb setiap hari sekali; (c) kelompok perlakuan satu, tikus normal diberi makan minum standart secara oral, diberi jahe merah 200 mg/kg/bb per hari dua kali kemudian 1 jam disuntik testosterone propionate 100 mg/kg/bb/hari; (d) kelompok perlakuan dua, tikus normal diberi makan minum standart secara oral, diberi jahe merah 400 mg/kg/bb per hari dua kali kemudian 1 jam disuntik intraperitoneal testosterone propionate 100 mg/kg/bb setiap hari; (e) kelompok perlakuan tiga, tikus normal diberi makan minum standart secara oral; diberi jahe merah 800 mg/kg/bb per hari dua kali kemudian 1 jam disuntik intraperitoneal testosterone propionate 100 mg/kg/bb setiap hari. Hari ke 46 semua tikus determinasi dengan anestesi kemudian dilakukan pengambilan darah dan organ ovarium, dilakukan pembuatan preparat yang diamati dengan mikroskop binokuler pada pemeriksaan TNF- α , faktor nuklir kappa β pemeriksaan elisa pada kadar insulin, pemeriksaan darah pada glukosa darah. Langkah selanjutnya dilakukan analisa data dengan menggunakan one way anova.

Analisis *in silico* efek antiinflamasi pada jahe merah

Dalam penelitian saat ini, senyawa 6-shogaol diunduh dari basis data pubchem Id 5281794 dan 6-gingerol diunduh dari basis data pubchem Id 442793 dan digunakan untuk memprediksi afinitas pengikatannya untuk struktur protein target TNF- α , IRS, faktor nuklir

kappa β dan KEAP1 menggunakan metode docking molekuler in silico [12].

Persiapan ligan untuk analisis docking

Struktur ligan control activator, 6-shogaol dan 6-gingerol digambarkan menggunakan Pencarian profil smile (simplified molecular-input line-entry system) dan struktur 3d dari control, 6-shogaol dan 6-gingerol didapatkan dari database pubchem. Dianalisa menggunakan way2drug pass prediction (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/predict.php>) sebagai pencegahan dan treatment pcos. Way2drug pass prediction menggunakan analisa sar untuk membandingkan senyawa input dan senyawa yang sudah diketahui memiliki potensi tertentu. Semakin mirip struktur senyawanya, maka semakin tinggi nilai prediksi yang akan didapatkan. Senyawa yang memiliki stuktur yang mirip, dapat diprediksi memiliki potensi yang serupa. Nilai PA (Probability to be Active) merupakan nilai prediksi output way2drug pass yang menggambarkan potensi suatu senyawa yang diuji. Apabila nilai PA lebih dari 0.7 menandakan bahwa senyawa tersebut diprediksi memiliki potensi yang tinggi sebagai (contoh) anti inflamasi dan anti oksidan dan anti oksidan, karena memiliki kemiripan yang tinggi dengan senyawa pada database. Kami menyarankan untuk menggunakan score 0.5 sebagai cut off score. Nilai PA memberikan arti keakuratan dari fungsi prediksi yang diperoleh, semakin tinggi nilai PA suatu fungsi, maka tingkat akurasinya semakin bagus [13].

Persiapan protein reseptor untuk analisis docking

Analisa target dari jahe merah di dapatkan dari cooperative toxicogenomic database (<https://ctdbase.org>) [14]. Protein yang berkaitan dengan pcos didapatkan dari database open target (<https://www.opentargets.org/>) dan disgenet (www.disgenet.com) [15]. Target yang berkaitan dengan disease pcos, dan target jahe merah kemudian dipetakan menggunakan diagram venn (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>) untuk mengetahui intersection target. Anotasi target DB dilakukan dengan menggunakan webserver David (<https://david.ncifcrf.gov/>) dengan terminology gene ontology dan pathway KEGG (p value < 0,05)x [16]. Preparasi protein dilakukan dengan software pymol 2.5.2, sedangkan pada ligan dilakukan minimalisasi energi universal force field menggunakan software open babel pada pyrx V.1.0. Docking dilakukan menggunakan autodock vina yang terintegrasi di pyrx V.1.0.[11]. Docking dilakukan dengan metode targeted docking (specific docking). Ukuran gridbox disesuaikan dengan posisi residu-residu asam amino yang berikatan pada control **dari hasil penelitian sebelumnya**, yaitu sebagai berikut: TNF- α control inhibitor: 307 (PDB 2AZ5), KEAP1-NRF2 (Control activator: RA839 (PDB 5CGJ). Hasil docking diperoleh berupa binding affinity atau energi afinitas hasil interaksi senyawa dengan protein. Selanjutnya

interaksi antara senyawa dan protein hasil docking divisualisasikan menggunakan software biovia discovery studio 2024.

Teknik visualisasi docking molekul

Berdasarkan penelusuran dengan database CTD, gingerol dapat menurunkan serum insulin dan leptin [17]. Dan shogaol dapat meningkatkan nuclear faktor 2 yang merupakan gene regulator untuk antioksidan, sehingga dapat menghambat kerusakan karena akibat radikal bebas [18].

Hasil docking diperoleh berupa binding affinity atau energi afinitas hasil interaksi senyawa dengan protein. Selanjutnya interaksi antara senyawa dan protein hasil docking divisualisasikan menggunakan software bio via discovery studio 2024. Nantinya hasil docking akan divalidasi berdasarkan: validasi hasil docking dapat ditinjau dari berbagai sisi: (1) nilai RMSD (Root mean standart deviation) dengan membandingkan hasil redock dan hasil kristalografi (experimental). Hasil docking yang dapat digunakan harus kurang dari < 2 angstrom. $\text{RMSD} < 2$ angstrom menandakan bahwa terdapat kemiripan conformation antara struktur docking dan hasil experimental control. (2) posisi docking antara ligand pembanding dan control harus berada pada cavity (lokasi) yang sama. (3) harus terdapat residu protein yang sama antara control dan ligand pembanding untuk menandakan bahwa ligand pembanding memiliki peranan yang mirip dengan control hasil experimental [11,12].

Analisis hasil dan interpretasi doking molekuler

Salah satu syarat yang perlu dipenuhi agar hasil docking dapat diterima yaitu memiliki nilai $\text{RMSD} < 2$ Angstrom. Docking yang dilakukan pada penelitian kali ini memiliki nilai RMSD 0.595 Angstrom ($\text{TNF-}\alpha$) dan 0.405 angstrom (KEAP1). Sehingga docking yang dilakukan sudah memenuhi syarat.

Karena tidak ditemukan struktur NRF2 (yang berfungsi sebagai regulator respon antioxidant untuk mengatasi radikal bebas) maka digunakan struktur KEAP1 yang berikatan dengan NRF2 dan activator RA839 (PDB ID 5CGJ). Aktivasi faktor transkripsi NF-E2 terkait faktor 2 (Nrf2) mempertahankan homeostasis seluler dalam menanggapi stres oksidatif melalui regulasi beberapa gen sitoprotektif. Tanpa stresor, aktivitas Nrf2 dihambat oleh interaksinya dengan Keap1 (protein terkait ECH 1 yang mirip kelch). RA839 merupakan small activator KEAP1 sehingga NRF2 terbebas dari KEAP1 (Winkel et al., 2015). Pada Gambar 1 terlihat bahwa ligand uji dapat berinteraksi pada posisi yang mendekati interaksi RA839 sebagai

control activator dengan KEAP1 (Gambar 1) meski tidak sama 100%, perbedaan lokasi inilah yang membuat nilai jahe tidak sebgus interaksi control dan KEAP1. Berdasarkan nilai binding affinity maka score binding affinity gingerol adalah (-6.5 kcal/mol) merupakan ligand uji tertinggi dibandingkan shogaol (-6.2 kcal/mol) (Tabel 1). Semakin negative nilai binding affinity maka semakin kuat interaksi antara ligand dan protein. Meskipun nilai ligand jahe merah cukup baik, namun nilainya tidak sebaik RA839 yaitu sebesar -10.8 kcal/mol.

Berdasarkan penelusuran interaksi asam amino, menunjukkan bahwa gingerol tidak memiliki asam amino yang similar dengan control untuk berinteraksi dengan KEAP1 sehingga dapat mengaktifkan NRF2. Shogaol dapat berinteraksi dengan KEAP1 seperti interaksi control dengan KEAP1 melalui asam amino ALA556 milik KEAP1 dengan jenis interaksi hydrophobic (tabel 2). Interaksi hydrophobic secara umum diperlukan untuk stabilitas interaksi dan mencegah obat mengalami degradasi. Sehingga shogaol memiliki potensi yang lebih baik dibandingkan gingerol dalam berinteraksi dengan KEAP1 [11,12].

Studi in vivo untuk menilai efek antiinflamasi dan antioksidan dan antioksidan dari shogaol-gingerol pada jahe merah untuk mencegah polikistik ovarium syndrome (pcos)

Hewan percobaan

Dalam penelitian ini, digunakan tikus betina rattus norvegikus berumur 8 minggu dengan berat 100-150 gram. Tikus ini diperoleh dari pusat veteriner farm (pusvetma) Surabaya Indonesia. Semua tikus diaklimatisasi selama satu minggu sebelum penelitian. Tikus ditempatkan di kandang plastik dalam ruangan dengan suhu dua puluh enam lebih kurang dua derajat celcius, makan minum standart yang sudah disediakan sampai durasi percobaan.

Induksi polikistik ovarium syndrome

Dalam penelitian ini, tikus menerima suntikan intraperitoneal testosterone propionate seratus milligram perkilogram perberat badan selama dua puluh satu hari di suntik secara intraperitoneal setiap hari, sampel darah di ambil melalui vena lateral dua puluh empat jam setelah suntikan testosterone propionate dan kadar glukosa darah diukur menggunakan accu-chek (glucometer). Tikus dengan kadar glukosa kurang lebih 200 mg/dl digunakan dalam penelitian ini.

Desain eksperimental

Dua puluh lima ekor tikus dibagi menjadi lima kelompok. Alur penelitian pada

tikus *rattus norvegicus* dilakukan aklimatisasi hari ke 1-7 (selama 7 hari), kemudian dilakukan observasi siklus estrus hari ke 8-20 (selama 12 hari), kemudian hari ke-21-23 (selama 3 hari) pada (a) kelompok kontrol diberi makan minum standart secara oral; (b) kelompok kontrol positif, tikus normal diberi makan minum standart secara oral; (c) kelompok perlakuan satu, tikus normal diberi makan minum standart secara oral, diberi jahe merah 200 mg/kg/bb peronde sehari dua kali; (d) kelompok perlakuan dua, tikus normal diberi makan minum standart secara oral, diberi jahe merah 400 mg/kg/bb peronde sehari dua kali ; (e) kelompok perlakuan tiga, tikus normal diberi makan minum standart secara oral; diberi jahe merah 800 mg/kg/bb peronde sehari dua kali. Hari ke 24-45 (selama 21 hari) dilakukan pada (a) kelompok kontrol diberi makan minum standart secara oral; (b) kelompok kontrol positif, tikus normal diberi makan minum standart secara oral; dan disuntik intraperitoneal testosterone propionate 100 mg/kg/bb setiap hari; (c) kelompok perlakuan satu, tikus normal diberi makan minum standart secara oral, diberi jahe merah 200 mg/kg/bb peronde sehari dua kali satu jam kemudian disuntik intraperitoneal testosterone propionate 100 mg/kg/bb setiap hari; (d) kelompok perlakuan dua, tikus normal diberi makan minum standart secara oral, diberi jahe merah 400 mg/kg/bb peronde sehari dua kali kemudian satu jam disuntik intraperitoneal testosterone propionate 100 mg/kg/bb setiap hari (e) kelompok perlakuan tiga, tikus normal diberi makan minum standart secara oral; diberi jahe merah 800 mg/kg/bb peronde sehari dua kali kemudian satu jam disuntik intraperitoneal testosterone propionate 100 mg/kg/bb sehari satu kali. Hari ke empat puluh enam semua tikus diterminasi dengan anestesi kemudian dilakukan pengambilan darah dan organ ke dua ovarium, dilakukan pembuatan preparat yang diamati dengan mikroskop binokuler pada pemeriksaan TNF-a, IRS-1, MDA dan pemeriksaan elisa pada kadar insulin, pemeriksaan darah pada glukosa darah. Langkah selanjutnya di lakukan analisa data dengan menggunakan one way anova.

Pembuatan preparat histologi ovarium

dilakukan dengan langkah sebagai berikut: (1) tahap fiksasi, pada tahap ini, ovarium difiksasi pada larutan formalin 10% selama 24 jam di ulang sebanyak 2 kali pada larutan yang berbeda. (2) tahap dehidrasi, pada tahap ini, ovarium yang telah difiksasi kemudian didehidrasi pada larutan etanol 70% selama 1 jam, kemudian dipindahkan dalam larutan ethanol 80%, dilanjutkan kedalam larutan ethanol 100% sebanyak 2 kali dan dalam ethanol absolut selama 1 jam diulang sebanyak 2 kali pada ethanol absolut yang berbeda. (3) tahap clearing (penjernihan), pada tahap ini, ovarium yang telah didehidrasi kemudian diclearing untuk menarik kadar ethanol dengan menggunakan larutan xylene selama 1,5 jam dan dilanjutkan ke

larutan xylene 3 selama 1,5 jam. (4) tahap embedding, pada tahap ini, ovarium dimasukkan kedalam kaset dan diinfiltrasi dengan menuangkan paraffin yang dicairkan pada suhu 60°C, kemudian parafin dibiarkan mengeras dan dimasukkan ke dalam freezer selama $\pm$ satu jam. (5) tahap sectioning (pemotongan) pada tahap ini, ovarium yang sudah mengeras dilepaskan dari kaset dan dipasang pada mikrotom kemudian dipotong setebal 5 micron dengan pisau mikrotom. Hasil potongan dimasukkan ke dalam water bath bersuhu 40°C untuk merentangkan hasil potongan, hasil potongan kemudian diambil dengan object glass dengan posisi tegak lurus dan dikeringkan. (6) tahap staining (pewarnaan), hasil potongan diwarnai dengan hematoxilin eosin (pewarnaan HE) melalui tahapan sebagai berikut: (a) preparat direndam dalam larutan xylene I selama 10 menit. Preparat diambil dari xylene I dan direndam dalam larutan xylene II selama 5 menit. (b) preparat diambil dari xylene II dan direndam dalam etanol absolut selama 5 menit. (c) preparat diambil dari etanol absolut dan direndam dalam etanol 96% selama 30 detik. (d) preparat diambil dari etanol 96% dan direndam dalam etanol 50% selama 30 detik. (e) preparat diambil dari etanol 50% dan direndam dalam running tap water selama 5 menit. (f) preparat diambil dari running tap water dan direndam dalam meyer hematoshirin selama 1-5 menit. (g) preparat diambil dari larutan meyer dan direndam dalam running tap water selama 2-3 menit. (h) preparat diambil dari running tap water dan direndam dalam pewarna eosin selama 1-5 menit. (i) preparat diambil larutan eosin kemudian dimasukkan dalam ethanol 75% selama 5 detik, kemudian dimasukkan ke dalam etanol absolut selama 5 detik diulang 3 kali pada etanol absolut yang berbeda. (j) preparat diambil dan direndam dalam xylene III selama 5 menit, kemudian dipindahkan dalam xylene IV selama 5 menit dan terakhir dipindahkan ke dalam xylene V selama 10 menit. (k) preparat diangkat dan dikeringkan. (l) preparat ditutup menggunakan deckglass.

Pengamatan preparat ovarium

Sediaan mikroanatomi ovarium tikus polikistik ovarium syndrome (pcos) diamati di bawah mikroskop binokuler Nikon E 100 dengan pembesaran 400 kali (10x40) dan difoto dan ovarium tikus perlakuan di beri jahe merah sesuai dengan dosis masing-masing yang diberikan personele sehari dua kali dan injeksi testosterone Propionat 100 mg/kg BB setiap hari diamati di bawah mikroskop binokuler Nikon E 100 dengan pembesaran 400 kali (10x40) dan difoto Untuk mengetahui pengaruh ekstrak jahe merah dilakukan melalui penghitungan jumlah folikel primer, folikel sekunder, jumlah folikel tersier dan jumlah folikel de graff, jumlah korpus luteium dan ketebalan sel teka melalui luas 5 lapang pandang dalam setiap preparat.

Analisa data

Jumlah folikel primordial, jumlah folikel primer, jumlah folikel sekunder, jumlah folikel tertier, jumlah folikel de graff, Jumlah korpus luteum, tebal sel teka dan berat ovarium yang telah dihitung dianalisa menggunakan uji analisa varians atau anova dengan uji perbandingan berganda duncan untuk mengidentifikasi perbedaan antar kelompok dengan $p < 0,05$. Analisis statistik dilakukan menggunakan Jamovi versi 2.4. dan Prisma 9.0

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Evaluasi *in silico* efek antiinflamasi dan antioksidan dan antioksidan pada jahe merah

Dalam shogaol gingerol digunakan untuk memprediksi afinitas pengikatan untuk tiga protein target TNF- α , untuk menyiapkan control, 6-shogaol dan 6-gingerol untuk docking ligan, optimasi geometri struktur tiga dimensinya dilakukan untuk meminimalkan energy dan mencapai konformasi yang paling stabil. Keluaran utama dari docking adalah proses pengikatan, yang menunjukkan orientasi dan posisi shogaol gingerol dalam situs pengikatan protein. Dalam visualisasi tiga dimensi, shogaol gingerol muncul sebagai model tongkat blod green residu asam amino yang sama antara kontrol, blod red residu asam amino yang sama dengan kontrol namun berbeda jenis interaksinya. Redocking dilakukan untuk memvalidasi keakuratan file PDB yang diunduh, menggunakan docking shogaol gingerol untuk memastikan hasil yang valid dan akurat. Kriteria utama untuk validasi redocking adalah nilai deviasi akar kuadrat rata-rata atau Root Mean Standart Devition (RMSD), untuk setiap protein RMSD antara ligan asli dan ligan yang di-redock dinilai, dengan akurasi yang dapat diterima ditunjukkan oleh nilai RMSD $< 2,0$ Å untuk TNF- α . Interaksi terlihat bahwa ligand control, 6-shogaol, 6-gingerol dapat berinteraksi pada posisi yang mendekati interaksi 307 dengan NFkB, KEAP1 sebagai kontrol inhibitor. Berdasarkan nilai binding affinity maka score binding affinity gingerol adalah (-6.5 kcal/mol) merupakan ligand uji tertinggi dibandingkan shogaol (-6.1 kcal/mol). Semakin negative nilai binding affinity maka semakin kuat interaksi antara ligand dan protein. Meskipun nilai ligand jahe cukup baik, namun nilainya tidak sebaik 307 yaitu sebesar -8.9 kcal/mol. Interaksi TNF- α , NFkB, KEAP1 menunjukkan mampu berinteraksi pada posisi yang sama seperti interaksi control, shogaol dan gingerol. Gingerol dan shogaol memiliki interaksi asam amino yang sama dengan control 307, gingerol berinteraksi dengan TNF melalui TYR119 dengan jenis interaksi hidrofobik dan TYR151 dengan jenis interaksi hydrogen, sementara shogaol berinteraksi dengan asam amino yang sama namun berbeda jenis interaksinya. Sehingga control, shogaol dan gingerol

berinteraksi pada asam amino yang sama yaitu TYR119, dan TYR151. Interaksi hydrogen berkontribusi terhadap kekuatan ikatan antara ligand dan protein, sementara interaksi hidrofobik bertanggung jawab terhadap kestabilan interaksi sehingga tidak mudah mengalami degradasi.

Pengaruh jahe merah terhadap ekspresi TNF- α , NFKB dan KEAP1 pada tikus yang diinduksi testosterone propionat

Aktifitas sitokin TNF- α pada folikogenesis di ovarium meningkat secara signifikan setelah stimulasi dengan testosterone propionate, namun pencegahan dengan jahe merah pada dosis 800 mg/kg BB secara signifikan mengurangi aktifitas sitokin TNF- α . Temuan ini menggaris bawahi peran penting pada jahe merah mencegah terjadi polikistik ovarium syndrome (pcos). Data ini juga menunjukkan ekspresi TNF- α , NFkB, KEAP1 meningkat secara signifikan pada hewan penderita polikistik ovarium syndrome (pcos) di bandingkan dengan hewan sehat. Pemberian jahe merah pada dosis 800 mg/kg BB secara signifikan menekan produksi produksi TNF- α , NFkB, KEAP1 dibandingkan dengan kelompok penderita polikistik ovarium syndrome (pcos). Temuan ini menunjukkan bahwa jahe merah dapat berfungsi sebagai agen antiinflamasi dan antioksidan dengan menghambat produksi sitokin proinflamasi

Efek shogaol gingerol pada inflamasi folikulogenesis yang diinduksi testosterone propionate

Data ini menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam ekspresi folikogenesis pada kelompok kontrol positif di bandingkan dengan kelompok kontrol sehat ($p < 0,05$). Pemberian jahe merah pada dosis 400 dan 800 mg/kg BB secara nyata menurunkan persentase inflamasi. Data ini menunjukkan bahwa jahe merah dapat mencegah inflamasi yang di induksi testosterone pada folikulogenesis.

Diskusi

Efek perlindungan jahe merah dalam mengurangi inflamasi pada folikulogenesis, Temuan ini mendukung eksplorasi lebih lanjut terhadap jahe merah sebagai bagian dari strategi komprehensif yang bertujuan untuk mencegah terjadinya pcos.

Jahe merah mencegah pcos yang di induksi testosterone propionate dengan memberikan efek antiinflamasi. Hal ini ditunjukkan dengan penurunan ekspresi TNF- α , KEAP1 dalam sel ovarium. Pcos yang diinduksi testosterone propionate berfungsi dalam penelitian pcos, memberikan wawasan tentang polikistik pada hewan dan memungkinkan penyelidikan tentang patofisiologi pcos dan intervensi terapeutik yang potensial [19]. Hasil

sistematik review dan meta analisis yang dilakukan pada penelitian tentang jahe merah yang menggunakan metode randomized controlled trials (RCT), menunjukkan bahwa konsumsi jahe merah secara peroral mampu menurunkan marker inflamasi pada serum darah seperti TNF- α , KEAP1 [20].

Sitokin yang terkait dengan peradangan termasuk TNF- α , KEAP1 bisa ditekan dengan shogaol dapat berinteraksi 113 protein target dan ditemukan 88 target yang berasosiasi dengan pcos, terdapat 5 protein yang dapat ditargetkan dengan Jahe merah dan berasosiasi dengan pcos. Lima protein yang dapat ditargetkan oleh Jahe merah dan berasosiasi dengan pcos adalah BCL2 (Apoptosis regulator bcl2; kaitannya dengan apoptosis), PPARG (Peroxisome proliferasi aktivasi reseptor gamma; kaitannya dengan inflamasi), LEP (Leptin; kaitannya dengan body weight). YAP1 (yes-associated protein satu kaitannya dengan apoptosis. Target penelitian seperti TNF- α , KEAP1, insulin, juga dapat berkaitan dengan Jahe merah. Berdasarkan penelusuran dengan database CTD, gingerol dan shogaol dapat menurunkan ekspresi TNF- α selain itu juga mempengaruhi regulasi NFkB atau faktor transkripsi untuk gene inflamasi, sehingga dapat berkorelasi dengan TNF- α [21,22).

Temuan dari studi in vivo ini menunjukkan bahwa pemberian Jahe merah secara oral secara signifikan mengurangi faktor pro-inflamasi, TNF- α , KEAP1, sehingga melindungi folikulogenesis dari kerusakan pada kondisi resistensi insulin. Peradangan kronis seringkali meningkatkan aktivasi NF-kB, yang mendorong produksi sitokin inflamasi seperti TNF- α , NFkB, KEAP1, yang merupakan kontributor utama komplikasi resistensi insulin, termasuk kerusakan pada folikulogenesis [23]. Efek perlindungan Jahe merah kemungkinan besar disebabkan oleh sifat antiinflamasi dan antioksidan dan antioksidan dan antioksidan [24]. Sebuah studi sebelumnya telah menunjukkan bahwa Jahe merah menghambat produksi sitokin inflamasi, termasuk TNF- α , KEAP1, juga memiliki kemampuan antioksidan yang mengurangi stress oksidatif [25].

Studi ini menunjukkan bahwa Jahe merah memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan dan antioksidan pada folikulogenesis dalam kondisi pcos. Jahe merah juga memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan dan antioksidan pada 6-gingerol 6-shogaol pengatur utama. Jahe merah membantu menjaga sel, yang penting kelangsungan hidup folikulogenesis dalam kondisi yang rentan terhadap pcos, 5 protein yang ditargetkan oleh Jahe merah dan berasosiasi dengan pcos adalah BCL2, PPARG, LEP, YAP1 (21,22). Namun, diperlukan studi lebih lanjut menilai ekspresi TNF- α , NFkB dan KEAP1 dengan histopatologi terjadinya pcos.

KESIMPULAN

Jahe merah mencegah terjadinya PCOS (Polikistik Ovarium Sindrom) yang diinduksi testosterone propionate melalui control aktivator 6shogaol, 6gingerol yang ditandai dengan penurunan ekspresi TNF- α , dan KEAP1, bersama itu jahe merah menunjukkan antiinflamasi dengan mengurangi produk TNF- α dan KEAP1 pada folikel di sel ovarium.

Persetujuan Etis

Protokol penelitian ini ditinjau dan disetujui oleh komite etik penelitian hewan, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia (Nomor persetujuan: 212/EC/KEPK/FKUA/2024).

DAFTAR PUSTAKA

- Chakraborty, A., Mukherjee, S., Sikdar, S., Paul, A., & Ghosh, S. (2012). [6]-Gingerol isolated from ginger attenuates sodium arsenite induced oxidative stress and plays a corrective role in improving insulin signaling in mice. *Toxicology Letters*, 210(1), 34–43.
- Das, N., Islam, M. E., Jahan, N., Islam, M. S., Khan, A., Islam, M. R., & Parvin, M. S. (2014). Antioxidant activities of ethanol extracts and fractions of *Crescentia cujete* leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 1–12.
- David. (2021). DAVID: A web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W216–W221.
- Diapeti, A. M., Merlita, H., & Doti, W. (2019). Pengaruh kombinasi dekokta *Zingiber officinale* var. *rubrum* dan *Imperata cylindrica* terhadap kadar TNF- α serum tikus osteoarthritis. Tesis. Fakultas Kedokteran Universitas Malang.
- Filimonov, D. A., Lagunin, A. A., Gloriovova, T. A., Rudik, A. V., Druzhilovskii, D. S., Pogodin, P. V., & Poroikov, V. V. (2014). Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50, 444–457.
- Indrawati, I., Miranti, M., & Mayfi, I. R. (2017). Antibacterial activity of ethanolic extracts of rhizome from three ginger varieties against acne isolated bacteria. *Nusantara Bioscience*, 9(1), 92–96.
- Jia, Y., Li, X., Meng, X., Lei, J., Xia, Y., & Yu, L. (2023). Anticancer perspective of 6-shogaol: Anticancer properties, mechanism of action, synergism and delivery system. *Chinese Medicine*, 18(1), 138.

- Lizneva, D., Suturina, L., Walker, W., Brakta, S., Gavrilova-Jordan, L., & Azziz, R. (2016). Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 106(1), 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.05.003>
- Mak, K. K., Zhang, S., Sakirolla, R., Balijepalli, M. K., Dinkova-Kostova, A. T., Epemolu, O., ... & Pichika, M. R. (2023). Synthesis of new shogaol analogues as NRF2 activators and evaluation of their anti-inflammatory activity, modes of action and metabolic stability. *Antioxidants*, 12(2), 475.
- Morvaridzadeh, M., Sadeghi, E., Agah, S., Fazelian, S., Rahimlou, M., Kern, F. G., ... & Heshmati, J. (2021). Effect of ginger (*Zingiber officinale*) supplementation on oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Food Biochemistry*, 45(2), e13612.
- Okamoto, M., Irii, H., Tahara, Y., Ishii, H., Hirao, A., Udagawa, H., ... & Shimizu, I. (2011). Synthesis of a new [6]-gingerol analogue and its protective effect with respect to the development of metabolic syndrome in mice fed a high-fat diet. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(18), 6295–6304.
- Piñero, J., Ramírez-Anguita, J. M., Saüch-Pitarch, J., Ronzano, F., Centeno, E., Sanz, F., & Furlong, L. I. (2020). The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D845–D855.
- Rachman, D. F., Merlita, H., & Wahyuningsih, D. (2019). Efek kombinasi dekokta rimpang jahe merah dan rimpang *Imperata cylindrica* terhadap kadar superoxide dismutase (SOD) dan malondialdehyde serum tikus osteoarthritis. Disertasi. Fakultas Kedokteran UIN Malang.
- Riduan, R. J. (2015). Pengaruh pemberian ekstrak jahe merah terhadap gambaran histopatologi pankreas yang diinduksi aloksan. Disertasi. Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
- Russo, G., Liguori, I., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., ... & Abete, P. (2012). Oxidative stress and diseases. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (pp. 757–772). <https://doi.org/10.5772/2535>
- Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., ... & Chang, W. (2022). DAVID: A web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W216–W221.
- Supu, R. D., et al. (2018). Red ginger (*Zingiber officinale* var. *rubrum*): Its chemical constituents, pharmacological activities and safety. *Fitifarmaka: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 8(1), 2087–9164.
- Taylor, H., Pal, L., & Sel, S. (2019). *Speroff's Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility* (9th ed.). Wolters Kluwer.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461.
- Velaga, V. S. A. R., Suryadevara, N., Chee, L. L., & Ismail, N. E. (2017). Phytochemical analysis and immune-modulatory effect of *Moringa oleifera* flowers. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 24. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i6.16>

- Wang, M.-X., Yin, Q., & Xu, X. (2020). A rat model of polycystic ovary syndrome with insulin resistance induced by letrozole combined with high-fat diet. *Medical Science Monitor*, 26. <https://doi.org/10.12659/MSM.922136>
- Winkel, A. F., Engel, C. K., Margerie, D., Kannt, A., Szillat, H., Glombik, H., ... & Schmoll, D. (2015). Characterization of RA839, a noncovalent small molecule binder to Keap1 and selective activator of Nrf2 signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 290(47), 28446–28455.
- Yücel, Ç., Karatoprak, G. Ş., Açıkara, Ö. B., Akkol, E. K., Barak, T. H., Sobarzo-Sánchez, E., & Shirooie, S. (2022). Immunomodulatory and anti-inflammatory therapeutic potential of gingerols and their nanoformulations. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 902551.
- Zuo, T., Zhu, M., & Xu, W. (2016). Roles of oxidative stress in polycystic ovary syndrome and cancers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/8589318>