

Pengaruh Genistein terhadap Peningkatan Apoptosis Sel pada Kultur Sel Endometriosis

Dwina Mastryagung¹, Sutrisno², Dwi Yuni³

¹Program Studi Magister Kebidanan Universitas Brawijaya Malang

²Divisi Fertilitas Endokrinologi Reproduksi Departement Obstetri dan Ginekologi

Fakultas Kedokteran/Rumah Sakit Saiful Anwar, Malang

³Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRAK

Genistein merupakan salah satu terapi untuk endometriosis. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian berbagai dosis genistein terhadap apoptosis sel pada kultur sel endometriosis. Ini merupakan penelitian eksperimental dengan True Experimental Posttest Only with Control Group, dilakukan di laboratorium Anatomi Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sampel menggunakan jaringan endometriosis dari laparoskopi. Terdapat 7 kelompok perlakuan yaitu kontrol, pemberian genistein dosis 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 30 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$ dan 50 $\mu\text{mol/L}$. Masa inkubasi masing-masing dosis 6, 24, dan 48 jam terhadap apoptosis sel. Pengukuran apoptosis sel menggunakan Cellular DNA Fragmentation ELISA Kit. Uji ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan antara pemberian dosis dan masa inkubasi waktu terhadap apoptosis sel dimana $p=0,000(0,000<0,05)$. Nilai rata-rata apoptosis tertinggi berada pada dosis 50 $\mu\text{mol/L}$ ($2,9 \pm 0,51$) dengan inkubasi 48 jam dan nilai apoptosis terendah diperoleh pada kelompok kontrol pada masa inkubasi waktu 6 jam ($0,69 \pm 0,13$). Terdapat hubungan yang signifikan antara pemberian dosis genistein dengan masa inkubasi waktu terhadap apoptosis sel, dimana semakin tinggi dosis semakin lama waktu inkubasi semakin mempengaruhi peningkatan apoptosis sel pada kultur jaringan endometriosis. (MOG 2014;22:31-38)

Kata kunci: Endometriosis, Apoptosis Sel, Genistein

ABSTRACT

Genistein is one therapy for endometriosis. This study was to determine the effect of genistein administration in various doses on cell apoptosis. This experimental study using True Experimental Posttest Only Control Group design was conducted in the Laboratory of Anatomy Physiology Faculty of Medicine, University of Brawijaya.. This study samples used endometriosis tissue taken from laparoscopic procedure, cultured implementation is done in accordance with the procedures that have been made, where there are 7 treatment groups : control, administration of genistein dose of 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 30 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$ and 50 $\mu\text{mol/L}$ with an incubation period of each dose is 6, 24 and 48 hours on cell apoptosis. Measurement of apoptotic cells is done by using the Cellular DNA Fragmentation ELISA Kit. Analysis with ANOVA test revealed significant differences between the dosing and incubation time on cell apoptosis where $p = 0.000 (0.000 < 0.05)$. The average value of the highest apoptosis is at a dose of 50 $\mu\text{mol/L}$ (2.9 ± 0.51) by incubation for 48 hours and lowest values obtained in the control group during the 6 -hour incubation period (0.69 ± 0.13). In conclusion, there are significant relation between genistein dose with incubation time on the cell apoptosis. The higher the dose and the longer incubation time would significantly increased cells apoptotic in tissue culture endometriosis. (MOG 2014;22:31-38)

Keywords : Endometriosis , Cells Apoptosis , Genistein

Correspondence: Dwina Mastryagung, Program Studi Magister Kebidanan Universitas Brawijaya Malang

PENDAHULUAN

Endometriosis merupakan penyakit ginekologi kronis yang mempengaruhi perempuan selama daur siklus kehidupannya, dimana jaringan endometrium ditemukan diluar kavum uteri dengan lokasi yang paling sering terjadi yakni di ovarium (*endometrioma*)^{1,2}. Etiologi terjadinya endometriosis sampai saat ini belum dapat ditegakkan secara pasti, Teori John Sampson (1927) mengungkapkan bahwa endometriosis terjadi disebabkan

kan oleh sel-sel endometrium yang dilepaskan pada saat menstruasi mengalami *retrograde* (bergerak mundur) ke tuba fallopi yang kemudian masuk kedalam rongga pelvic dan mengadakan implantasi di peritoneum³. Endometriosis dianggap sebagai prekursor kanker dan faktor resiko terjadinya kanker ovarium, dimana terdapat pola yang sama antara kondisi endometriosis dan kanker ovarium dalam hal invasi lokal, penyebaran dan responsif terhadap estrogen dalam menginduksi sinyal faktor pertumbuhan, dimana kanker ovarium

mengeskpresikan resistensi terhadap mekanisme apoptosis dan ditandai dengan ketidakstabilan genomik sama seperti endometriosis.^{4,5}

Apoptosis merupakan kematian sel terprogram tanpa menyebabkan terjadinya inflamasi⁷. Pada kasus eutopic endometrium perempuan yang mengalami endometriosis memiliki apoptosis sel lebih rendah dibandingkan dengan perempuan yang normal, hal ini disebabkan karena ketidakmampuan sel endometrium untuk mengirimkan sinyal 'kematian' yang ditandai dengan adanya peningkatan BCL-2 dan penurunan ekspresi BAX.⁶ Pengaruh estrogen terhadap proliferasi jaringan endometriosis menjadi salah satu landasan dalam pemberian pengobatan dengan tujuan menekan pembentukan bahan steroid oleh ovarium, adapun terapi yang dipergunakan hingga saat ini meliputi terapi hormonal dan tindakan pembedahan atau gabungan keduanya, namun memiliki efek samping dan angka kekambuhan yang cukup tinggi.^{1,7,8} Menurut Amberkar, *et al* (2010) mengemukakan bahwa genistein sebagai salah satu strategi terapi terbaru, dimana genistein merupakan unsur utama dari phytoestrogen golongan isoflavon^{1,10}

Genistein disebutkan memiliki struktur ikatan kimia yang menyerupai 17- β estradiol sehingga mampu mengikat reseptor estrogen (ER) dengan afinitas 20-30 kali lebih tinggi pada Er- β dibandingkan ER- α .⁹ Genistein merupakan unsur utama dari phytoestrogen golongan isoflavon.¹⁰ Genistein secara umum pada dosis yang tinggi dapat bekerja sebagai *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs) memiliki efek anti estrogenic yang dapat menghambat terjadinya proliferasi sel dan meningkatkan apoptosis sel seperti pada kultur sel kanker lambung menunjukkan peningkatan indeks apoptosis sel pada pemberian genistein 20 μ mol/L dalam kurun waktu 24 sampai dengan 72 jam.¹¹ serta didukung penelitian melakukan inkubasi pemberian genistein dimulai dari 6 jam pada sel kanker ovarium.¹² Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui Bagaimanakah pengaruh pemberian genistein terhadap apoptosis sel pada kultur sel endometriosis?

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian *True Experimental* dengan *design Posttest Only with Control Group*. Jaringan endometriosis yang akan dipergunakan diambil dari hasil tindakan laparoskopi dengan hasil PA positif. Penelitian dilakukan di Laboratorium Anatomi Fisiologi Universitas Brawijaya. Subyek penelitian dalam percobaan ini adalah kultur sel enometriosis yang akan dibagi menjadi 7 kelompok, masing-masing akan

diberikan genistein dosis 5 μ mol, 10 μ mol, 20 μ mol, 30 μ mol, 40 μ mol, 50 μ mol dengan masa inkubasi waktu pada masing-masing dosis adalah 6 jam, 24 jam dan 48 jam.

Alat Penelitian

Alat yang digunakan meliputi cawan metri dengan merk Duran, lemari es dengan dengan freezer (-20°C) merk Panasonic, pH meter, LAF (*Laminar Air Flow*) vertical dengan merk Esco, Falsh culture dengan merk Corning, mikroskop inverted dengan merk Olympus CKX 41, mikroskop binokuler dengan merk Olympus CX 21, camera digital dengan merk Olympus, incubator dengan merk Binder dan tabung CO₂, Mikro Sentrifuse Tube 1,5 ml dengan merk eppendorf, syringe microofilter 0.2 μ m dengan merk corning, pipet mikro 1000 μ L dan 500 μ L merk Gilson, tip falcon 15 ml merk BD, spuit dengan merk Terumo, sentrifuse merk Hittich, water bath dengan merk Memmert, laboratory bottle 250 ml dengan merk Duran, timbangan analitik dengan merk Sartorius, lampu spritus dan autoclave merk Tomy, serta *Cellular DNA Fragmentation ELISA Kit* dengan merek Roche

Bahan Penelitian

Jaringan endometriosis yang diambil dari dinding kista coklat/kista ovarium dengan laparoskopi sebanyak 0,5-1gr. Tiga macam larutan yang disaring dengan menggunakan saringan 0,22 mikron untuk sterilisasi yaitu Larutan I merupakan larutan transport dengan pencucian yang berisi HBSS (*Ham's Balanced Salt Solution*) dan gentamicin 50 μ g/ml untuk mencegah kontaminasi. Larutan II merupakan larutan disosiasi yaitu larutan yang digunakan untuk memisahkan sel satu dengan sel yang lain, berisi 0,14% kolagenase IV (500 μ g/ml) (Sigma), 0,1% Dnase (2,5 μ g/ml) (Sigma) dalam HBSS. Larutan III merupakan larutan untuk melisiskan eritrosit karena sel darah merah merupakan tempat yang baik untuk kuman berkembang sehingga harus dihilangkan, berisi 8,29 gram NH₄CL, 1,0 gram NaHCO₂, 0,0371 gram *Ethylene Diamine tetra acid* (EDTA) (Sigma) dalam 1 liter *aquadest steril* (Otsuka). Medium kultur (Merk sigma) yang terdiri dari Hank's F-12 merupakan medium transport dan DMSO 1:1 dengan 10% FCS (*Fetal Calfs Serum*) (Gibco), penicillin 50-100 μ g/ml (Penstrep), *L-Glutamine* 2 mM (Sigma), streptomycin 50-100 μ g/ml (Sigma), Fungizone 250 μ g/ml (Sigma)

Prosedur Kultur

Spesimen akan diproses secara aseptik dan diantarkan dengan menggunakan cold box yang berisi es, sedangkan jaringan hasil tindakan laparoskopi diletakan

dalam botol berisi larutan I, kemudian jaringan akan dibersihkan terlebih dahulu dengan menggunakan medium serum free yang diletakan pada cawan petri steril 9 cm untuk membersihkan jaringan dari sisa darah pasca tindakan laparoskopi. Setelah jaringan bersih selanjutnya jaringan akan dicincang atau dipotong-potong menjadi bagian yang kecil-kecil sehingga didapatkan potongan jaringan yang berukuran $\pm 0,5-2,0 \text{ mm}^3$ dengan menggunakan scalpel steril. Memasukan 0,5-1,0 gram potongan jaringan kedalam tabung sentrifugasi steril berukuran 15 ml, yang berisi 10 ml larutan II (enzim disosiasi).

Disosiasi Spesimen tersebut menjadi suspensi sel dengan cara meletakkan tabung sentrifuse yang telah berisi potongan jaringan pada *shaker bath* dengan arah gerakan secara vertical, inkubasi pada *shaker bath* dilakukan selama 2-6 jam, suhu 37°C hal ini bertujuan untuk menyebarkan potongan jaringan keseluruhan bagian tabung sampai terlihat suspensi sel yang telah terdisosiasi.

Sentrifugasikan preparat sel tersebut pada 400 x g dalam waktu 5-8 menit, kemudian larutan disosiasi dibuang dengan menggunakan pipet steril kemudian suspensi sel akan dicuci dalam 10 ml medium kultur. Tambahkan 10 ml larutan steril III, untuk melisiskan eritrosit, kemudian dilakukan inkubasi dan sentrifugasi selama 10 menit. Membuang supernatan kemudian ditambahkan 10ml medium kultur komplit. Menginkubasikan Spesimen secara vertical dalam tabung kerucut selama 5 menit supaya fragmen-fragmen yang tidak terdisosiasi dapat dikeluarkan dari larutan.

Memindahkan supernatan yang mengandung suspensi sel dan medium kultur ke dalam TC *Flask* (tabung kultur) dengan menggunakan pipet steril/pipetting aid. Kemudian inkubasi sel di dalam incubator 95% *humidified* CO_2 5% suhu 37°C . Lakukan pengamatan dan pencucian sel pada hari pertama pasca inkubasi sel. Pengamatan sel dilakukan dengan menggunakan mikroskop *inverted* untuk melihat apakah sel sudah tumbuh atau belum dan apakah terjadi kontaminasi oleh jamur maupun bakteri. Tahap selanjutnya adalah mengganti medium dengan medium yang segar pada hari I, III, V dan ke-VII atau ketika sel-sel telah tumbuh dan medium berwarna kuning (warna kuning menandakan bahwa sel dalam keadaan hidup karena sel melakukan metabolisme dengan baik). Penggantian medium dilakukan samapai sel tumbuh confluent di dalam TC *Flask*

Hasil resuspensi ini dibagi kedalam 6 buah Tc Plate yang berisi 24 well kemudian memasukkan sel kedalam setiap sumur (*well*) percobaan, setelah sel confluent 70-80% pada masing-masing well maka tahap selanjutnya.

Menghitung jumlah sel dengan kamar hitung menggunakan mikroskop Olympus CX 22. Pada tahap selanjutnya Tc Plate yang akan diberikan perlakuan ditambahkan *BrdU Labelling Reagent* untuk melakukan labeling sel dan diinkubasi sampai 2-18 jam, setelah masa inkubasi berakhir maka tahap selanjutnya masing-masing Tc Plate akan diberikan perlakuan berupa dosis genistein. Tc Plat 1 pada well 1-5 merupakan kontrol yang tidak diberikan perlakuan apapun hanya diberikan medium kultur saja, well 6-10 dimasukkan genistein dosis $5 \mu\text{mol/L}$, well 11-15 diberikan genistein dosis $10 \mu\text{mol/L}$ begitu pula selanjutnya pada genistein dosis $20 \mu\text{mol/L}$, $30 \mu\text{mol/L}$, $40 \mu\text{mol/L}$ dan $50 \mu\text{mol/L}$. TC Plate 1 dan 2 merupakan Tc Plate dengan inkubasi 6 jam, Tc plate 3 dan 4 adalah inkubasi genistein 24 jam, sedangkan Tc Plate 5 dan 6 adalah inkubasi genistein 48 jam, setelah masa inkubasi berakhir pindahkan supernatant sel kedalam tabung/tube ependoff 1,5 ml kemudian simpan supernatant kultur dalam almari es suhu 20°C , untuk nantinya dapat digunakan dalam pemeriksaan VEGF-A, IL- 1β , TNF- α , dan IL-6. Sel yang masih melekat pada masing-masing well selanjutnya ditambahkan atau dimasukkan lysis buffer sebanyak 200 μl inkubasikan selama 30 menit samapi 1 jam supaya sel dapat terlepas pada masing-masing well, selanjutnya mengambil suspensi sel tersebut dengan menggunakan micropipette yellow tip untuk dipindahkan pada tube 1,5 ml, kemudian simpan sampel pada almari es suhu 20°C untuk selanjutnya akan dilakukan prosedur pemeriksaan ELISA sesuai dengan prosedur pemeriksaan apoptosis sel dengan menggunakan *ELISA Kit Cellular DNA Fragmentation*

Prosedur Pemeriksaan Apoptosis dengan ELISA Kit Cellular DNA Fragmentation

Cellular DNA Fragmentation ELISA Kit digunakan untuk mengukur apoptosis sel melalui fragmentasi DNA yang berlabel BrdU dalam sitoplasma sel pada proses apoptosis sel, dalam sitoplasma sel apoptosis memberikan alternative non radiaktif pada ikatan (3H)-timidin yang berbasis assay fragmentasi DNA. Secara spesifikasi anti-DNA antibody akan mengikat single atau double stand DNA kemudian anti BrdU peroxidase (Anti-BrdU-POD Fragments) secara spesifik akan mengikat pada DNA yang telah berlabel BrdU setelah DNA sebagian didenaturasi, kemudian antibody secara spesifik akan mengenali 5-bromo-2'-deoxy-uridine, sedangkan *antibody conjugate* akan menunjukkan tidak adanya reaksi silang dengan komponen endogen seluler seperti thimidin atau uridin

Prosedur Pengukuran Apoptosis Sel

Lapisi microplate elisa dengan anti-DNA-antibody dengan cara mengencerkan 1ml anti-DNA-antibody

dengan 9 ml water steril menggunakan tabung sentrifuse 15 ml kemudian masukan larutan tersebut sebanyak 100 μ l pada masing-masing microplate elisa, tutup microplate dengan adhesive foil inkubasikan selama 1 jam pada suhu 15-25°C. Setelah waktu inkubasi berakhir buang cairan dengan menggunakan tisu dengan cara menutup seluruh bagian microplate dengan tisu kemudian balikan posisi microplate sehingga seluruh cairan dapat teresap pada tisu, pastikan tidak ada gelembung udara ataupun cairan yang tersisa. Lapsi microplate dengan blocking solution dengan cara membuat larutan inkubasi buffer sebanyak 30 ml dicampur dengan 30 ml water steril kemudian masukkan 200 μ l larutan tersebut pada microplate, tutup dengan adhesive cover foil dan inkubasikan selama 30 menit pada suhu 15-25°C, setelah masa inkubasi berakhir buang larutan dengan menggunakan tissue dengan cara yg sama seperti diatas dan lakukan tindakan diatas sebanyak 2 kali.

Tahap selanjutnya adalah pencucian dengan menggunakan *washing buffer* sebanyak 3 kali, kemudian masukkan suspense sel yang berada pada tube 1,5 kedalam masing-masing well sesuai dengan urutan dosis dan masa inkubasi waktu dengan cara masukkan 100 μ l sampel kedalam masing-masing microplate elisa kemudian tutup dengan menggunakan adhesive cover foil selama 90 menit pada suhu 15-25°C, membuang larutan dengan cara aspirasi atau *inverting* kemudian cuci masing-masing microplate dengan menggunakan larutan *washing solution* sebanyak 3 kali, selanjutnya lakukan denaturasi DNA, kemudian tambahkan 100 μ l larutan anti-BrdU-POD kemudian tutup dengan menggunakan adhesive cover Foil selama 90 menit pada suhu 15-25°C.

Kemudian cuci kembali sebanyak 3 kali dan selanjutnya lakukan tahap pengukuran photometric dengan cara memasukan 100 μ l substrate solution, inkubasikan dalam tempat yang gelap sampai larutan berubah warna pada microplate kemudian tambahkan larutan stop solution

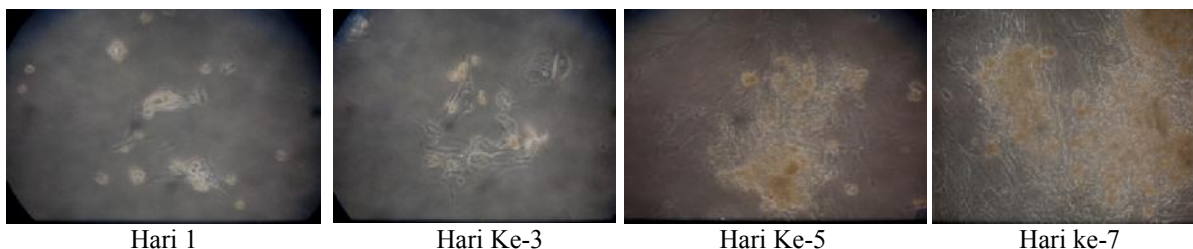
sebanyak 25 μ l pada masing-masing microplate, inkubasikan selama 1 menit pada shaker selanjutnya lakukan pengukuran dengan menggunakan *ELISA Reader* dengan panjang gelombang 450nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah sel confluent 80-85% dilakukan pemeriksaan flowcytometri untuk memeriksa marker endometriosis melalui ekspresi RE- α dan RE- β . Hasil flowcytometri menunjukkan sel endometriosis mengekspresikan reseptor estrogen α dan reseptor β , RE- β lebih dominan 5,42%, bila dibandingkan RE- α 1,81%. Sel yang telah di subkultur dan telah konfluent diberikan paparan genistein dan di inkubasi selama 6 jam, 24 jam serta 48 jam. Ekspresi RE- α dan RE- β diketahui dengan pemeriksaan flowcytometri.

Hasil Uji Apoptosis Sel Berdasarkan Dosis Genistein

Berdasarkan Tabel 1 terdapat perbedaan yang signifikan antara pemberian dosis genistein terhadap peningkatan apoptosis sel dimana p value = 0,000 (0,000<0,05). Berdasarkan nilai rata-rata apoptosis sel pada kelompok genistein dosis 50 μ M/L ($2,25 \pm 0,63$) merupakan nilai rata-rata tertinggi dibandingkan dengan kelompok yang lainnya dan nilai rata-rata apoptosis terendah ditunjukkan pada kelompok kontrol ($0,85 \pm 0,20$). Berdasarkan Hasil *uji Tukey* menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna pada nilai rata-rata apoptosis antara kelompok kontrol dengan semua kelompok perlakuan ($p = 0.000$), namun pada genistein dosis 5 μ mol/L, 10 μ mol/L, 20 μ mol/L, dan 30 μ mol/L, berada dalam kolom yang sama atau kelompok yang sama dengan kontrol yaitu dengan $p=0,431$, ini berarti tidak ada perbedaan yang signifikan, sedangkan perbedaan yang signifikan ditunjukkan pada pemberian genistein dosis 40 μ mol/L dan 50 μ mol/L.



Gambar 1. Pertumbuhan Kultur Sel Endometriosis. kultur hari ke-1 sudah mulai tumbuh embrionik sel, hari ke-3 terlihat sel sudah mulai tumbuh dan berdiferensiasi, Kultur hari ke-6, Sel mulai memenuhi flask 50% Kultur hari ke 7, Sel mulai memenuhi flask 85 – 90% *confluent*.

Tabel 1. Pengaruh pemberian berbagai dosis genistein terhadap apoptosis sel

Pemberian Genistein	Waktu Inkubasi (Mean $\pm$ SD)			Σ	p-value
	6 Jam	24 Jam	48 Jam		
Kontrol	0,69 $\pm$ 0,13	0,91 $\pm$ 0,23	0,95 $\pm$ 0,16	0,85 $\pm$ 0,20 ^a	0,000
5 μ mol/L	0,77 $\pm$ 0,16	0,90 $\pm$ 0,35	0,92 $\pm$ 0,15	0,86 $\pm$ 0,23 ^a	
10 μ mol/L	0,70 $\pm$ 0,10	0,86 $\pm$ 0,13	1,16 $\pm$ 0,20	0,91 $\pm$ 0,24 ^a	
20 μ mol/L	0,82 $\pm$ 0,19	0,95 $\pm$ 0,42	1,15 $\pm$ 0,34	0,97 $\pm$ 0,33 ^a	
30 μ mol/L	0,89 $\pm$ 0,37	1,21 $\pm$ 0,25	1,20 $\pm$ 0,19	1,10 $\pm$ 0,30 ^a	
40 μ mol/L	1,15 $\pm$ 0,50	1,71 $\pm$ 0,47	2,40 $\pm$ 0,47	1,75 $\pm$ 0,69 ^b	
50 μ mol/L	1,65 $\pm$ 0,25	2,19 $\pm$ 0,30	2,90 $\pm$ 0,51	2,25 $\pm$ 0,63 ^c	

Keterangan : Apoptosis sel pada pemberian genistein berdasarkan factor waktu terjadi peningkatan yang signifikan

Tabel 2. Tabel Uji ANOVA Rata-rata Apoptosis Sel Berdasarkan Faktor Inkubasi Waktu

Waktu Inkubasi	Dosis Genistein							Σ	p-value
	Kontrol	5 μ mol/L	10 μ mol/L	20 μ mol/L	30 μ mol/L	40 μ mol/L	50 μ mol/L		
6 Jam	0,69 $\pm$ 0,13	0,77 $\pm$ 0,16	0,7 $\pm$ 0,1	0,82 $\pm$ 0,19	0,89 $\pm$ 0,37	1,15 $\pm$ 0,5	1,65 $\pm$ 0,25	0,95 $\pm$ 0,41 ^a	0,000
24 Jam	0,91 $\pm$ 0,23	0,9 $\pm$ 0,35	0,86 $\pm$ 0,13	0,95 $\pm$ 0,42	1,21 $\pm$ 0,25	1,71 $\pm$ 0,47	2,19 $\pm$ 0,3	1,25 $\pm$ 0,56 ^b	
48 Jam	0,95 $\pm$ 0,16	0,92 $\pm$ 0,15	1,16 $\pm$ 0,2	1,15 $\pm$ 0,34	1,2 $\pm$ 0,19	2,4 $\pm$ 0,47	2,9 $\pm$ 0,51	1,53 $\pm$ 0,8 ^c	

Keterangan : Inkubasi waktu genistein memberikan pengaruh yang signifikan terhadap peningkatan apoptosis sel

Tabel 3. Apoptosis sel berdasarkan factor intraksi antara dosis dengan waktu inkubasi

Pemberian Genistein	Waktu Inkubasi (Mean $\pm$ SD)					
	6 Jam		24 Jam		48 Jam	
	Mean $\pm$ SD	p-value	Mean $\pm$ SD	p-value	Mean $\pm$ SD	p-value
Kontrol	0,69 $\pm$ 0,13 ^a	0,000	0,91 $\pm$ 0,23 ^{abc}	0,000	0,95 $\pm$ 0,16 ^{abc}	0,000
5 μ mol/L	0,77 $\pm$ 0,16 ^a		0,9 $\pm$ 0,35 ^{abc}		0,92 $\pm$ 0,15 ^{abc}	
10 μ mol/L	0,7 $\pm$ 0,1 ^a		0,86 $\pm$ 0,13 ^{ab}		1,16 $\pm$ 0,2 ^{abc}	
20 μ mol/L	0,82 $\pm$ 0,19 ^a		0,95 $\pm$ 0,42 ^{abc}		1,15 $\pm$ 0,34 ^{abc}	
30 μ mol/L	0,89 $\pm$ 0,37 ^{ab}		1,21 $\pm$ 0,25 ^{abc}		1,2 $\pm$ 0,19 ^{abc}	
40 μ mol/L	1,15 $\pm$ 0,5 ^{abc}		1,71 $\pm$ 0,47 ^{cd}		2,4 $\pm$ 0,47 ^{de}	
50 μ mol/L	1,65 $\pm$ 0,25 ^{bcd}		2,19 $\pm$ 0,3 ^{de}		2,9 $\pm$ 0,51 ^e	

Keterangan: Nilai rata-rata tertinggi apoptosis sel berada pada dosis 50 μ mol/L pada inkubasi waktu 48 jam

Hasil Uji Apoptosis sel Berdasarkan Inkubasi Waktu Genistein

Inkubasi waktu memiliki p-value sebesar 0,000 (<0,005) sehingga terdapat pengaruh yang signifikan waktu inkubasi terhadap peningkatan apoptosis sel. Waktu inkubasi 48 jam ($1,53 \pm 0,8$) menghasilkan nilai rata-rata apoptosis yang paling tinggi dan nilai rata-rata apoptosis yang paling rendah pada waktu inkubasi 6 jam ($0,95 \pm 0,41$) (Tabel 2). Hasil uji *Tukey* 5% menunjukkan bahwa masing-masing inkubasi waktu berada pada kolom/kelompok yang berbeda ini berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara waktu perlakuan pemberian genistein.

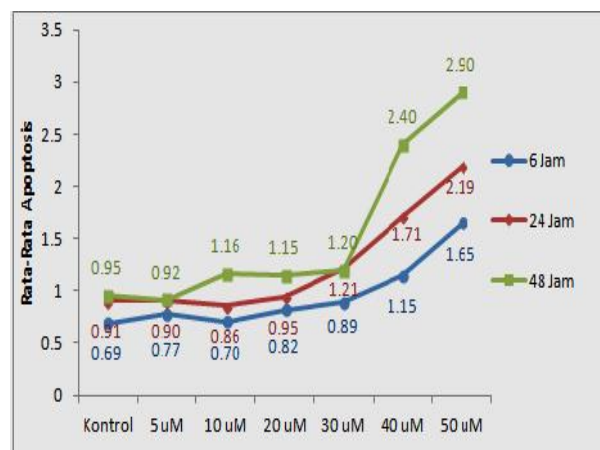
Hasil Analisis ANOVA Berdasarkan Interaksi Waktu dan Dosis Genistein

Berdasarkan Uji ANOVA menunjukan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan antara inkubasi waktu dan pemberian dosis genistein terhadap apoptosis sel dengan $p=0,000$ ($0,000 < 0,05$), dimana nilai apoptosis tertinggi berada pada waktu 48 jam dosis 50 μM ($2,9 \pm 0,51$) dibandingkan dengan dosis dan masa inkubasi waktu yang lainnya dan nilai rata-rata apoptosis terendah berada pada kontrol 6 jam ($0,69 \pm 0,13$), dengan demikian genistein cukup mampu meningkatkan apoptosis sel pada dosis yang tinggi. Tren peningkatan nilai rata-rata apoptosis sel pada waktu inkubasi 6 jam, 24 jam, maupun 48 jam seiring dengan peningkatan dosis genistein. Waktu inkubasi 6 jam, peningkatan dosis genistein yang diberikan, memberikan pengaruh yang signifikan terhadap peningkatan apoptosis. Pemberian genistein dosis 50 $\mu\text{mol/L}$ berdampak pada peningkatan rata-rata apoptosis hingga mencapai titik maksimum (rata-rata apoptosis tertinggi). Rata-rata apoptosis tiap dosis genistein pada inkubasi 6 jam terlihat paling rendah jika dibandingkan dengan inkubasi 24 dan 48 jam. Hal ini menunjukkan bahwa berbagai dosis genistein pada inkubasi 6 jam belum mampu menghasilkan apoptosis yang maksimum.

Hasil Analisis Regresi

Waktu inkubasi 6 jam didapatkan koefisien regresi sebesar 0,017 dengan p-value sebesar 0,000 ($0,000 < 0,05$) yang berarti terdapat pengaruh yang signifikan antara pemberian dosis genistein terhadap Apoptosis dengan Koefisien determinasi (R-square) sebesar 0,5124

ini berarti pemberian genistein mampu mempengaruhi Apoptosis sel sebesar 51,24%. Pada waktu inkubasi 24 jam didapatkan koefisien regresi sebesar 0,025 dengan p-value sebesar 0,000 ($0,000 < 0,05$) yang berarti terdapat pengaruh yang signifikan antara pemberian dosis genistein terhadap Apoptosis, dengan koefisien determinasi (R-square) sebesar 0,6305 yang berarti bahwa pemberian genistein mampu mempengaruhi Apoptosis sebesar 63,05%. Pada waktu inkubasi 48 jam didapatkan koefisien regresi sebesar 0,038 dengan p-value sebesar 0,000 ($0,000 < 0,05$) yang berarti terdapat pengaruh yang signifikan dengan koefisien determinasi (R-square) sebesar 0,71 yang berarti genistein memberikan pengaruh sebesar 71% terhadap apoptosis sel (Tabel 4).



Gambar 2. Tren peningkatan apoptosis sel

Endometriosis merupakan kondisi kronis yang ditandai dengan pertumbuhan jaringan endometrium diluar kavum uteri¹³. Kultur sel endometriosis pada penelitian ini menggunakan sel epitel dan sel stroma, dan tidak dilakukan pemisahan terhadap keduanya. Hal ini sesuai dengan penelitian yang pernah dilakukan oleh As'adi, dkk. 2008 oleh karena sel stroma berfungsi memproduksi faktor pertumbuhan parakrin untuk dapat menginduksi pertumbuhan sel epitel. Sel epitel memiliki peran yang cukup penting dalam mekanisme imunologi seperti menghubungkan efek sitokin terhadap proliferasi dan pengeluaran prostaglandin.¹⁴

Tabel 4. Hasil Analisis Regresi pada Masing-Masing Waktu Inkubasi

Variabel Terikat	Persamaan Regresi	p-value	Korelasi dan p-value	R-Square
Apoptosis 6 Jam	$Y = 0,588 + 0,017 X$	0,000	$r=0,716$ $p=0,000$	51,24%
Apoptosis 24 Jam	$Y = 0,684 + 0,025 X$	0,000	$r=0,794$ $p=0,000$	63,05%
Apoptosis 48 Jam	$Y = 0,681 + 0,038 X$	0,000	$r=0,843$ $p=0,000$	71,00%

Keterangan : Y adalah Apoptosis dan X adalah Dosis Genistein

Estrogen yang tinggi pada endometriosis menyebabkan terjadinya gangguan pada apoptosis sel. Ketidakmampuan sel endometrium untuk mengirimkan sinyal "kematian" atau kemampuan sel untuk menghindari kematian sel dikaitkan dengan peningkatan ekspresi anti-apoptosis faktor (misalnya, BCL-2) dan penurunan faktor ekspresi pro-apoptosis (misalnya, BAX) pada endometriosis sehingga akibat dari gangguan sensitivitas jaringan endometrium untuk apoptosis spontan memberikan kontribusi pada implantasi normal dan pertumbuhan endometrium di lokasi ektopik^{6,15,16}

Genistein yang merupakan golongan dari phytoestrogen memiliki aktifitas seperti 17β -estradiol dimana dapat berikatan dengan reseptor estrogen dan berkompetisi dengan estrogen endogen, pada lingkungan estrogen yang rendah genistein mampu bertindak sebagai agonis reseptor estrogen, namun akan bertindak sebaliknya pada kadar estrogen endogen tinggi sebagai agonis parsial^{17,21}

Pada penelitian Kultur sel DU145 (*androgen-independent human prostate cancer cell line, University of Science and Technology of China, UST*) mendapatkan bahwa pemberian genistein dosis 30 μ M dapat meningkatkan apoptosis sebesar 10,56 dibandingkan dengan dosis 15 μ M, pada dosis 60 μ M menjadi 19,61 % dan 30% pada dosis 120 μ M¹⁸

Pada penelitian kultur line sel kanker ovarium (HO-8910) dengan menggunakan metode MTT mendapatkan hasil bahwa genistein pada dosis 50 μ M dan 100 μ M, sudah mampu menghambat proliferasi sel dengan pengaruh waktu dan dosis, dimana pada waktu 72 jam sudah terjadi penghambatan proliferasi 30% pada dosis 50 μ M dan 68% pada dosis 100 μ M, sedangkan pengukuran apoptosis sel dilakukan dengan menggunakan flowcitometri didapatkan hasil bahwa 34% mengalami apoptosis pada pemberian genistein dosis 100 μ M.²⁰ Hasil penelitian menunjukkan bahwa genistein mampu meningkatkan apoptosis sel pada dosis 50 μ M/L dan waktu inkubasi 48 jam.

SIMPULAN

Pemberian Genistein dapat meningkatkan apoptosis sel dilihat dari dosis maupun waktu. Semakin tinggi dosis dan semakin lama waktu inkubasi semakin meningkatkan apoptosis sel pada kultur sel endometriosis

DAFTAR PUSTAKA

1. Amberkar MV, Kumari M, Mor V, Semwal A, Adiga S. PPAR- γ : a dagger in endometriosis. Australian Medical Journal AMJ. 2010;3(12):814-20
2. Farrell E and Garad R. Endometriosis. ANJ Clinical Update. 2012;20(5)
3. Leyland N, Casper R, Laberge P, Sing. Endometriosis Diagnosis and Management. Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada (JOGC). 2010;32(7)
4. Baldi A, Campioni A, Signorile PG. Endometriosis: Pathogenesis, Diagnosis, Therapy and Association with Cancer. Oncology Reports. 2008;19:843-6
5. Vlahos NF, Kalampokas T, Fotiou S. Endometriosis And Ovarian Cancer: Abstracts A Review. 2010;26(3):213-9
6. Harada T, Taniguchi F, Izawa M, Ohama Y, Takenaka Y, Tagashira Y, Ikeda A, Watanabe A, Iwake T, Terakawa N. Apoptosis and Endometriosis. Frontiers in Bioscience. Human Reproduksi Update. 2007;12(1):3140-51
7. Yayas A. 2012. Endometriosis. <http://id.scribd.com/doc/80607561/Jurnal-Dr-Adi-Yayas-Yuli-Fix>. Diakses pada 29 Oktober 2012.
8. Lusa. 2009. Bagaimana Penanganan Endometriosis. Yogyakarta. <http://www.lusa.web.id/Ginekologi>. Diakses pada 29 Oktober 2012)
9. Riecanaky, Jagla F, Pilsakova L. The Physiological Action of Isoflavon Phytoestrogens. Physiol. Res. 2010;59:651-64
10. Lee JY, Kim HS, Song YS. Genistein as a Potential Anticancer Agent Against Ovarian Cancer. JTCM China. 2011;2(2):96-104

11. Hai BZ, Juan JC, Wen XW, Jian TC, Qin Du. Apoptosis of Human Primary Gastric Carcinoma Cells Induced by Genistein. *World journal of Gastroenterology*. 2004;10(12):1822-5
12. Haitao L, Jiang H, King SM, Chen YC. Inhibition of Cell Growth and VEGF Expression in Ovarian cancer Cells by Flavonoids. *Nutrition and Cancer*. 2008;60(6):800-9
13. Farquhar C. 2008. Endometriosis. *BMJ*. 2007 : 334 : 249-53. <http://bmj.com/cgi/content/full/334/7587/249>. Diakses pada 21 Januari 2013.
14. Freshney M and Freshney I. *Culture of Specialized Cells, Culture of Epithelial Cell*. 2nd Eds. AS: Wiley-Lis; 2002
15. Olive D, Lindhein S, Pritts E. New medical treatments for endometriosis. 2004;18(2):319-28
16. Cahyanti R. Bcl-2 dan Indeks Apoptosis pada Hiperplasia Endometrium Non-Atipik Simpleks dan Komplek. *Laboratorium Obstetri dan Ginekologi FK Universitas Diponogoro, Semarang*. 2008
17. Preedy VR. *Isoflavones Chemistry, analysis, function and effects*. Royal Society of Chemistry publishing. 2012
18. Yuan-jing F, Shan-Nan H, Lian Xia. Genistein synergizes with RNA interference inhibiting surviving for inducing DU-145 of prostate cancer cells to apoptosis. Published by Elsevier Ireland Ltd. 2009;284:189-197
19. Yuan-jing F, Shan-Nan H, Lian Xia. Genistein synergizes with RNA interference inhibiting surviving for inducing DU-145 of prostate cancer cells to apoptosis. Published by Elsevier Ireland Ltd. 2009;284:189-197
20. Soares SR, Varea AM, Mora JJ, Pellicer A. Pharmacologic Therapies in Endometriosis : a systematic review. *American Society for Reproductive Medicine*. 2012;98(3)
21. Speroff L and Fritz MA. *Handbook for Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility Hormones Biosynthesis, Metabolism, and Mechanism of Action*. 8th Eds. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins; 2011. p. 1221-40