

## Penurunan Kadar TNF- dan IL-6 pada Kultur Sel Endometriosis Melalui Pemberian Genistein

Ita Herawati<sup>1</sup>, Sutrisno<sup>2</sup>, Nurdiana<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

<sup>2</sup>Divisi Fertilitas Endokrinologi Reproduksi Departemen Obstetri dan Ginekologi Rumah Sakit

Dr. Syaiful Anwar Malang/Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

<sup>3</sup>Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

### ABSTRAK

*Genistein adalah salah satu terapi untuk endometriosis. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh genistein terhadap penurunan kadar TNF- dan IL-6 pada kultur jaringan endometriosis. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dengan menggunakan kultur jaringan endometriosis yang dipapar genistein berbagai dosis dan waktu. Jaringan endometriosis diambil melalui laparoskopi. Penelitian ini menggunakan desain eksperimental, Posttest only with control group, yang dibagi menjadi 7 kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok dosis 5 µM/L, kelompok dosis 10 µM/L, kelompok dosis 20 µM/L, kelompok dosis 30 µM/L, kelompok dosis 40 µM/L dan kelompok dosis 50 µM/L dengan masa inkubasi 6 jam, 24 jam dan 48 jam. Pengukuran kadar TNF- dan IL-6 menggunakan ELISA. Hasil uji Anova menunjukkan genistein secara signifikan menurunkan kadar TNF- dan IL-6 ( $p < 0,000$ ), rerata terendah kadar TNF- dan IL-6 pada dosis 50 µM/L dengan waktu inkubasi 6 jam. Simpulan, pemberian genistein menurunkan kadar TNF- dan IL-6 pada kultur sel endometriosis. (MOG 2014;22:58-65)*

**Kata kunci:** endometriosis, genistein, TNF- , IL-6

### ABSTRACT

*Genistein in one therapy for endometriosis. The aim of this study was to determine the effect of genistein on TNF- and IL – 6 levels in tissue culture endometriosis. This research had been conducted in the Laboratory of Physiology Faculty of Medicine, University of Brawijaya using tissue culture endometriosis were exposed to genistein with various doses and time. The endometriosis tissue taken via laparoscopy . This study used an experimental design posttest only with control group, which were divided into 7 groups: control group , group a dose of 5 µM/L, 10 µM/L, 20 µM/L, 30 µM/L, 40 µM/L and 50 µM/L and incubate in 6 hour, 24 hour and 48 hour. Measurement of levels of TNF- and IL-6 using ELISA . Analyzing with Anova showed genistein significantly decreased the levels of TNF- and IL-6 (  $p < 0.000$  ) , The lower mean levels of TNF- and IL-6 at are at dose of 50 µm / L with a 6 hour incubation period. In conclusion, genistein decrease TNF- and IL-6 levels in endometriosis cell culture. (MOG 2014;22:58-65)*

**Keywords:** endometriosis, genistein, TNF- , IL-6

**Correspondence:** Ita Herawati, Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

### PENDAHULUAN

Endometriosis merupakan suatu kelainan ginekologik yang sering diderita perempuan usia reproduksi. Angka kejadiannya diperkirakan mencapai 4% dari seluruh populasi perempuan usia subur, dan kejadian tersebut ditemukan pada 20-40% perempuan yang memiliki masalah infertilitas.<sup>1</sup> Endometriosis merupakan suatu proses inflamasi dimana terdapat peningkatan jumlah makrofag yang mensekresi sitokin seperti interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- ) dan penanda tumor dalam cairan peritoneum penderita.<sup>2</sup> Penanda biologis utama pada endometriosis diantaranya adalah TNF- dan IL-6. Wanita dengan endometriosis mengalami peningkatan kadar IL-6 dan TNF- pada cairan peritoneal dan serum. IL-6 dan

TNF- juga berperan dalam perkembangan jaringan endometriosis.<sup>3,4,5</sup>

Genistein adalah *Phytoestrogen* yang berasal dari kedelai. Secara alami mengandung bahan kimia yang dapat berinteraksi dengan reseptor estrogen untuk menghasilkan efek estrogenik atau anti-estrogenik.<sup>6</sup> Studi *Invitro* menunjukkan bahwa *genistein* dalam kisaran 5 sampai 50 µM/L dapat menghambat pertumbuhan sel tumor leukemia, limfoma, kanker prostat, kanker payudara, dan kanker paru-paru.<sup>7</sup> Penelitian terhadap sel *line* yang diinduksi inflamasi dengan pemberian *genistein* dengan dosis 5 µM/L dan 10µM/L selama 12 jam, 24 jam, dan 48 jam terbukti menurunkan kadar IL-6 dan TNF- .<sup>8</sup> *Genistein* menghambat induksi TNF- , IL-6 dan IL-8 (10). Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh *genistein*

terhadap penurunan Kadar TNF- dan IL-6 pada kultur sel endometriosis. Diharapkan Dapat digunakan sebagai dasar untuk terapi endometriosis menggunakan *genistein* melalui efek terhadap TNF- dan IL-6

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental, *Posttest only with control group* yang dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan Oktober sampai November 2013. Berdasarkan rumus Notobroto ditetapkan 4 replikasi dalam penelitian ini, yang dibagi 7 kelompok yaitu kelompok kontrol (tanpa diberikan *genistein*) dan kelompok yang diberikan *genistein* berbagai dosis yang berbeda yaitu 5 µM/L, 10 µM/L, 20 µM/L, 30 µM/L, 40 µM/L, 50 µM/L, dengan masa inkubasi 6 jam, 24 jam, dan 48 jam.

Alat yang digunakan meliputi seperangkat alat bedah steril, cawan metri, *freezer* (-20°C), pH meter, LAF (*Laminar Air Flow*) *vertical*, *Tissue Culture (TC) Plate*, mikroskop *inverted* (Olympus CKX 41), mikroskop binokuler (Olympus CX 21), *camera digital*, *incubator* dan tabung CO<sub>2</sub>, *Micro Sentrifuge Tube* 1,5 ml, *syringe microofilter* 0.2 µm, pipet mikro 1000µL dan 500µL, tip *falcon* 15 ml, spuit, *centrifuge*, *water bath*, *laboratory bottle* 250ml, timbangan analitik, lampu spritus, *cover glass*, *object glass* dan *autoclave*, *Elisa Kit* untuk TNF- dan IL-6 produksi KOMA BIOTECH dan *ELISA Reader*.

Bahan penelitian ini menggunakan jaringan endometriosis sebanyak 0,5-1 gram yang diambil melalui operasi laparoskop. Tiga macam larutan meliputi : Larutan I merupakan larutan transfort dengan pencucian yang berisi HBSS (*Hank,s Balanced Salt Solution*) dengan gentamicin 50 µg/ml. Larutan II berisi 0,14% kolagenase IV (500 µg/ml), 0,1% Dnase (2,5µg/ml) dalam HBSS. Larutan III berisi 8,29 gram NH<sub>4</sub>CL, 1,0 gram NaHCO<sub>2</sub>, 0,0371 gram Ethylene Diamine Tetra Acid (EDTA) dalam 1 liter *aquadest steril*. Medium kultur yang terdiri dari Hank's F-12 dan DMEM (*Delbecco Minimum Essensial Medium*) 1:1 dengan 10% FCS (*Fetal Calfs Serum*), *penicillin* 50-100 µg/ml, *L-Glutamine* 2 mm, *streptomycin* 50-100 µg/ml merk Sigma, *Fungizone* 250 µg/ml.

### Prosedur Kultur

*Specimen* akan diproses secara aseptik dan diantarkan dengan es dalam larutan I dimana jaringan akan ditempatkan dalam cawan petri steril diameter 9 cm, kemudian jaringan dicincang sehingga didapatkan potongan-potongan yang berukuran 0,5-2,0 mm<sup>2</sup> dan

tebal 1 mm<sup>2</sup> dengan menggunakan *scalpel* steril. Potongan jaringan dimasukkan sebanyak 0,5-1,0 gram ke dalam tabung sentrifugasi steril berukuran 15 ml, yang berisi 10 ml larutan II (enzim disosiasi).

Spesimen tersebut dipisahkan menjadi suspensi sel dengan cara menginkubasi dan mencampur potongan jaringan selama 2-6 jam pada suhu 37°C. Inkubasi spesimen dilakukan secara horizontal dalam tabung sentrifugasi untuk menyebarkan potongan jaringan ke seluruh bagian tabung, kemudian tabung dibalik-balikkan sebanyak 5-10 kali setiap interval 30-45 menit sampai terlihat suspensi sel yang telah terdisosiasi (terpisah) berwarna keruh, homogen, terdapat bagian jaringan yang sudah seperti bubuk sehingga tampak medium dan sel terpisah. Preparat sel tersebut disentrifugasikan pada 400 g dalam waktu 5-8 menit. Larutan disosiasi dibuang dengan menggunakan pipet steril. Resuspensi (larutkan kembali) sel-sel dalam 10 ml medium kultur (DMEM), dilakukan *setrifuge* dan supernatan dibuang. Sebanyak 10 ml larutan steril III ditambahkan untuk melisis eritrosit, kemudian diinkubasi dan disentrifugasi selama 10 menit. Supernatan dibaung kemudian di-tambahkan 10 ml medium kultur komplet (DMEM, FCS, *Penicillin*, *L-Glutamine*, *Streptomycin*, *Fungi-zone*). Spesimen diinkubasi secara vertikal dalam tabung kerucut selama 5 menit supaya fragmen-fragmen yang tidak terdisosiasi dapat dikeluarkan dari larutan.

Supernatan yang mengandung suspensi sel dan medium kultur dipindahkan ke dalam *TC Plate* dengan menggunakan pipet steril. Sel diinkubasi di dalam incubator 95% *humidified* 37°C, 5% CO<sub>2</sub> agar sel tersebut dapat hidup. Didiamkan selama 2 hari, lalu dilakukan observasi dengan menggunakan mikroskop *inverted* untuk melihat apakah sel sudah tumbuh atau belum. Medium diganti hingga sel-sel tumbuh dan medium berwarna kuning, dengan menggunakan medium yang segar setiap 3 hari sampai sel-sel menjadi *confluent* di dalam *TC Plate*, yang ditandai dengan sel telah melekat pada *attachment site* dan saling bersentuhan atau berhubungan antar sel. Jarak antara sel yang teratur dan semakin rapat, permukaan sel rata ditandai dengan penampakan inti, membran plasma, sitoplasma serta matriks ekstraseluler, dengan ukuran sel yang lebih besar.

Saat sel *confluent* 70%, sel dipanen (*harvest*). Dilakukan *treatment* dengan membagi menjadi 7 kelompok yaitu kelompok 1 sebagai kontrol (tanpa perlakuan), kelompok 2 ditambahkan *genistein* 5 µM/L, kelompok 3 *genistein* 10 µM/L, kelompok 4 *genistein* 20 µM/L, kelompok 5 *genistein* 30 µM/L, kelompok 6 *genistein* 40 µM/L, kelompok 7 *genistein* 50 µM/L. Masing-masing kelompok dilakukan peng-

ulangan 3 kali dan inkubasi selama 6 jam, 24 jam dan 48 jam. Medium dipindahkan ke dalam *Micro Sentrifuse Tube*, disimpan dalam lemari pendingin pada suhu -20-40°C untuk beberapa hari hingga akan dilakukan pemeriksaan kadar TNF- dan IL-6 dengan tehnik ELISA. Pengukuran kadar TNF- menggunakan ELISA kit spesifik (*Specific sandwich enzyme-linked immunosorbent Assays*) buatan KOMA BIOTECH Inc, Catalog K0331131 (USA), sedangkan pengukuran kadar IL-6 menggunakan ELISA kit spesifik (*Specific sandwich enzyme-linked immunosorbent Assays*) buatan KOMA BIOTECH Inc, katalog K0331194 (USA). Sebanyak 200 ul *wash solution* ditambahkan pada setiap *well*. Cairan dibuang dan dicuci 3x dengan 300 ul *wash solution/well*. Sebanyak 100 ul standar dan sampel ditambahkan ke masing-masing *well*, diinkubasi pada suhu kamar selama minimal 2 jam. Cairan dibuang, dicuci 4x dengan 300 ul *wash solution/well*. Sebanyak 100 ul antibody (0,25 ug/ml)/*well* ditambahkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam, diaspirasi dan dicuci 4x dengan 300 ul *wash solution/well*. Ditambahkan 100 ul *Color Development Enzyme (1:20 dilute)/well*, diinkubasi 30 menit pada suhu ruang (37°C) selama 30 menit, diaspirasi dan dicuci 4x dengan 300 ul *wash solution/well*. Ditambahkan 100 ul *color development solution* tiap *well*, diinkubasi pada suhu ruang selama 4-14 menit (TNF- ) dan 10-20 menit (IL-6). Ditambahkan 100 ul *stop solution* per *well*. Selanjutnya dibaca pada 450 nm dengan ELISA *reader*. Data yang didapat berupa data diskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel. Analisa data dilakukan dengan menguji

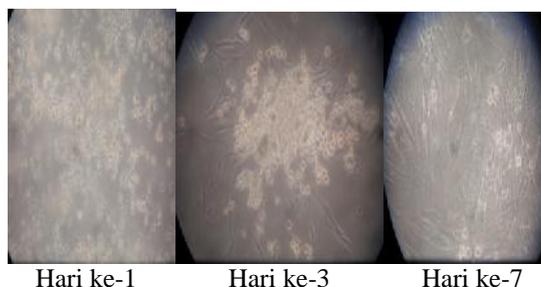
homogenitas, normalitas. Untuk mengetahui perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dilakukan uji Anova serta untuk mengetahui pengaruh dari pemberian genistein dilakukan regresi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil Uji Penurunan Kadar TNF- dan IL-6 Berdasarkan Dosis Genistein

Pada rerata jumlah kadar TNF- dan IL-6 pada kultur sel endometriosis yang dipapar genistein berbagai dosis didapati adanya penurunan kadar TNF- pada kelompok kontrol, dan kelompok perlakuan dengan berbagai dosis. Pada Tabel 1 berdasarkan hasil uji Anova menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ( $P=0,000<$  ) terhadap penurunan rerata kadar TNF- antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan berbagai dosis. Tampak rerata tertinggi pada kelompok kontrol sebesar  $69,60 \pm 17,82^a$  pg/ml lalu berangsur menurun dengan semakin tingginya dosis. Rerata terendah didapatkan pada dosis  $50 \mu\text{M/L}$  sebesar  $16,39 \pm 2,57^e$  pg/ml.

Tabel 2 menunjukkan kadar IL-6 juga mengalami penurunan yang sama dengan kadar TNF- , Tampak rerata tertinggi pada kelompok kontrol sebesar  $67,44 \pm 15,32^a$  pg/ml lalu berangsur menurun dengan semakin tingginya dosis. Rerata terendah didapatkan pada dosis  $50 \mu\text{M/L}$  sebesar  $11,95 \pm 4,79^f$  pg/ml.



Gambar 1. Pertumbuhan Kultur Sel Endometriosis

Tabel 1. Kadar TNF- (pg/mL) pada kultur sel endometriosis berdasarkan dosis genistein

Kelompok Dosis	Waktu Inkubasi (Rerata±SD)			Rerata Total	P Value
	6 Jam	24 Jam	48 Jam		
Kontrol	87.74±5.62 <sup>a</sup>	65.58±8.78 <sup>a</sup>	55.48±18.16 <sup>a</sup>	69.60±17.82 <sup>a</sup>	0,000<math>\alpha</math>
5 $\mu\text{M/L}$	56.79±8.47 <sup>b</sup>	45.89±2.17 <sup>b</sup>	32.49±2.77 <sup>b</sup>	45.06±11.43 <sup>b</sup>	
10 $\mu\text{M/L}$	38.23±2.01 <sup>c</sup>	33.76±7.05 <sup>c</sup>	27.36±3.87 <sup>bc</sup>	33.12±6.36 <sup>c</sup>	
20 $\mu\text{M/L}$	28.29±5.55 <sup>d</sup>	26.89±1.82 <sup>cd</sup>	24.96±3.62 <sup>bc</sup>	26.71±3.86 <sup>d</sup>	
30 $\mu\text{M/L}$	25.32±3.08 <sup>d</sup>	23.21±4.26 <sup>de</sup>	24.71±2.01 <sup>bc</sup>	24.41±3.08 <sup>d</sup>	
40 $\mu\text{M/L}$	27.92±8.31 <sup>de</sup>	18.16±3.01 <sup>e</sup>	18.82±1.13 <sup>c</sup>	21.63±6.58 <sup>d</sup>	
50 $\mu\text{M/L}$	17.32±3.65 <sup>e</sup>	16.35±1.97 <sup>e</sup>	15.49±2.18 <sup>c</sup>	16.39±2.57 <sup>e</sup>	

Tabel 2. Kadar IL-6 (pg/mL) pada kultur sel endometriosis berdasarkan dosis genistein

Kelompok Dosis	Waktu Inkubasi (Rerata±SD)				P Value
	6 Jam	24 jam	48 jam	Total Rerata	
Kontrol	71.75±7.74 <sup>a</sup>	60.03±6.48 <sup>a</sup>	70.54±25.46 <sup>a</sup>	67.44±15.32 <sup>a</sup>	0,000<
5 µM/L	58.51±8.59 <sup>b</sup>	47.43±4.28 <sup>b</sup>	43.32±5.20 <sup>b</sup>	49.75±8.80 <sup>b</sup>	
10 µM/L	47.71±1.60 <sup>c</sup>	38.98±3.22 <sup>c</sup>	30.45±4.58 <sup>bc</sup>	39.05±7.96 <sup>c</sup>	
20 µM/L	36.65±7.24 <sup>d</sup>	31.85±1.74 <sup>d</sup>	30.27±4.42 <sup>bc</sup>	32.92±5.34 <sup>cd</sup>	
30 µM/L	33.55±2.88 <sup>d</sup>	26.95±2.86 <sup>de</sup>	30.43±10.32 <sup>bc</sup>	30.31±6.44 <sup>d</sup>	
40 µM/L	17.02±5.01 <sup>e</sup>	22.82±2.14 <sup>e</sup>	17.48±10.45 <sup>cd</sup>	19.11±6.74 <sup>e</sup>	
50 µM/L	9.99±5.97 <sup>e</sup>	16.13±3.47 <sup>f</sup>	9.73±1.22 <sup>d</sup>	11.95±4.79 <sup>f</sup>	

Keterangan: Pada rerata±sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (p-value<0.05) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna (p-value>0.05).

Tabel 3. Kadar TNF-α(pg/mL) pada kultur sel endometriosis berdasarkan waktu inkubasi genistein

Waktu Inkubasi	Dosis Genistein (Rerata±SD)							Total Rerata	P Value
	Kontrol	5 µM/L	10 µM/L	20 µM/L	30 µM/L	40 µM/L	50 µM/L		
6 Jam	87.74±5.62 <sup>a</sup>	56.79±8.47 <sup>b</sup>	38.23±2.01 <sup>c</sup>	28.29±5.55 <sup>d</sup>	25.32±3.08 <sup>d</sup>	27.92±8.31 <sup>de</sup>	17.32±3.65 <sup>e</sup>	40.23±23.57 <sup>a</sup>	0,000<∞
24 Jam	65.58±8.78 <sup>a</sup>	45.89±2.17 <sup>b</sup>	33.76±7.05 <sup>c</sup>	26.89±1.82 <sup>cd</sup>	23.21±4.26 <sup>de</sup>	18.16±3.01 <sup>e</sup>	16.35±1.97 <sup>e</sup>	32.83±17.14 <sup>b</sup>	
48 Jam	55.48±18.16 <sup>a</sup>	32.49±2.77 <sup>b</sup>	27.36±3.87 <sup>bc</sup>	24.96±3.62 <sup>bc</sup>	24.71±2.01 <sup>bc</sup>	18.82±1.13 <sup>c</sup>	15.49±2.18 <sup>c</sup>	28.47±13.97 <sup>c</sup>	

Keterangan: Pada rerata±sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (p-value<0.05) dan jika memuat huruf yang samaberarti tidak ada perbedaan yang bermakna (p-value>0.05).

Tabel 4. Kadar IL-6 (pg/mL) pada kultur sel endometriosis berdasarkan waktu inkubasi

Waktu Inkubasi	Dosis Genistein (Rerata±SD)							Total Rerata	P Value
	Kontrol	5 µM/L	10 µM/L	20 µM/L	30 µM/L	40 µM/L	50 µM/L		
6 Jam	71.75±7.74 <sup>a</sup>	58.51±8.59 <sup>b</sup>	47.71±1.60 <sup>c</sup>	36.65±7.24 <sup>d</sup>	33.55±2.88 <sup>d</sup>	17.02±5.01 <sup>e</sup>	9.99±5.97 <sup>e</sup>	39.31±21.37 <sup>a</sup>	0,014<∞
24 Jam	60.03±6.48 <sup>a</sup>	47.43±4.28 <sup>b</sup>	38.98±3.22 <sup>c</sup>	31.85±1.74 <sup>d</sup>	26.95±2.86 <sup>de</sup>	22.82±2.14 <sup>e</sup>	16.13±3.47 <sup>f</sup>	34.88±14.66 <sup>b</sup>	
48 Jam	70.54±25.46 <sup>a</sup>	43.32±5.20 <sup>b</sup>	30.45±4.58 <sup>bc</sup>	30.27±4.42 <sup>bc</sup>	30.43±10.32 <sup>bc</sup>	17.48±10.45 <sup>cd</sup>	9.73±1.22 <sup>d</sup>	33.17±21.15 <sup>b</sup>	

Keterangan: Pada rerata±sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (p-value<0.05) dan jika memuat huruf yang samaberarti tidak ada perbedaan yang bermakna (p-value>0.05).

Tabel 5. Kadar TNF-α(pg/mL) pada kultur sel endometriosis berdasarkan dosis genistein dan waktu inkubasi

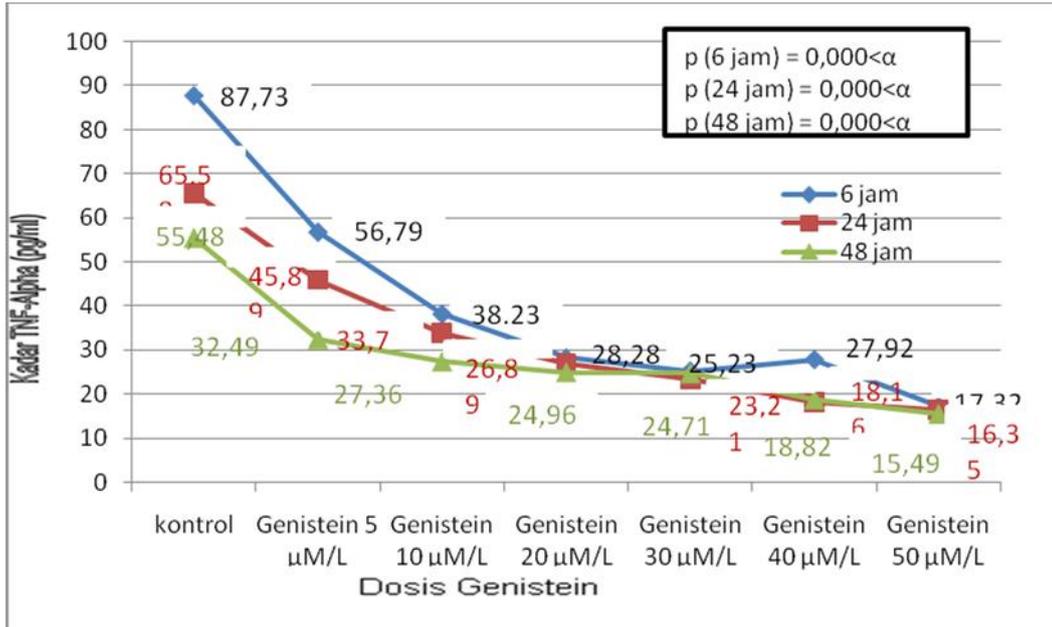
Kelompok Perlakuan	6 Jam		24 Jam		48 Jam	
	Rerata±SD	P Value	Rerata±SD	P Value	Rerata±SD	P Value
Kontrol	87.74±5.62 <sup>a</sup>	0,000<∞	65.58±8.78 <sup>a</sup>	0,000<∞	70.54±25.46 <sup>a</sup>	0,000<∞
5 µM/L	56.79±8.47 <sup>b</sup>		45.89±2.17 <sup>b</sup>		43.32±5.20 <sup>b</sup>	
10 µM/L	38.23±2.01 <sup>c</sup>		33.76±7.05 <sup>c</sup>		30.45±4.58 <sup>bc</sup>	
20 µM/L	28.29±5.55 <sup>d</sup>		26.89±1.82 <sup>cd</sup>		30.27±4.42 <sup>bc</sup>	
30 µM/L	25.32±3.08 <sup>d</sup>		23.21±4.26 <sup>de</sup>		30.43±10.32 <sup>bc</sup>	
40 µM/L	27.92±8.31 <sup>de</sup>		18.16±3.01 <sup>e</sup>		17.48±10.45 <sup>cd</sup>	
50 µM/L	17.32±3.65 <sup>e</sup>		16.35±1.97 <sup>e</sup>		9.73±1.22 <sup>d</sup>	

Keterangan: Pada rerata±sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (p-value<0.05) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna (p-value>0.05).

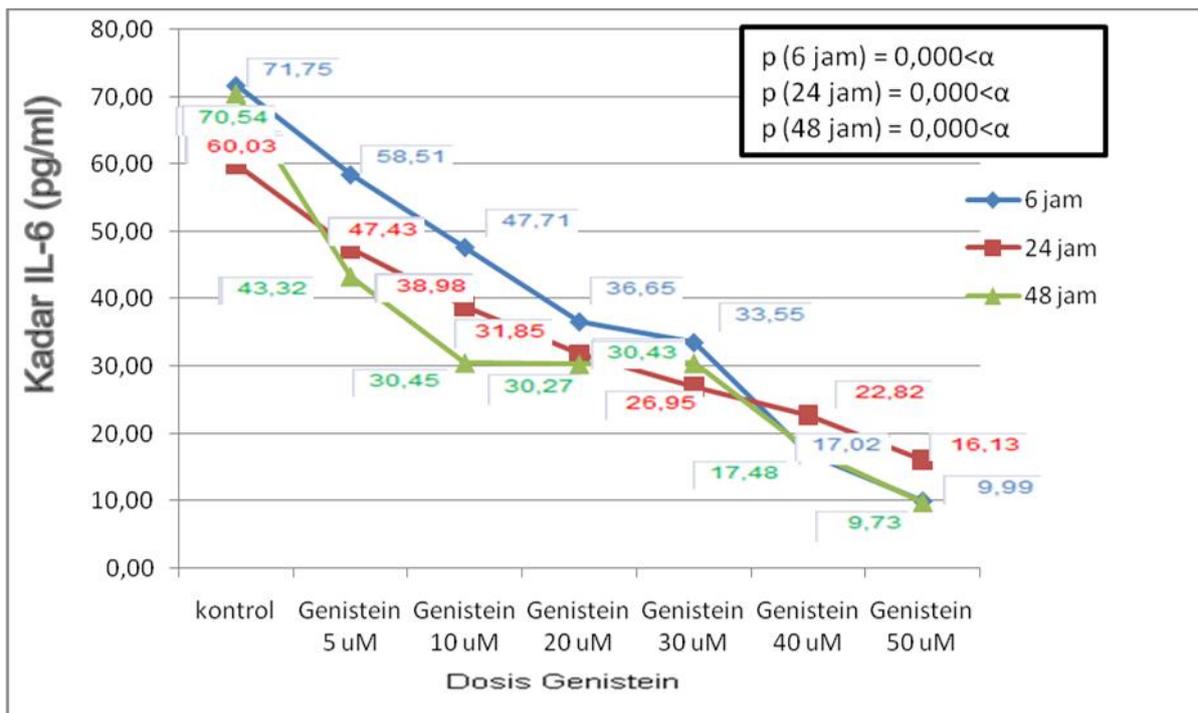
Tabel 6. Kadar IL-6 (pg/mL) pada kultur sel endometriosis berdasarkan dosis genistein dan waktu inkubasi

Kelompok Perlakuan	6 Jam		24 Jam		48 Jam	
	Rerata±SD	P Value	Rerata±SD	P Value	Rerata±SD	P Value
Kontrol	71.75±7.74 <sup>a</sup>	0,000<∞	60.03±6.48 <sup>a</sup>	0,000<∞	70.54±25.46 <sup>a</sup>	0,000<∞
5 µM/L	58.51±8.59 <sup>b</sup>		47.43±4.28 <sup>b</sup>		43.32±5.20 <sup>b</sup>	
10 µM/L	47.71±1.60 <sup>c</sup>		38.98±3.22 <sup>c</sup>		30.45±4.58 <sup>bc</sup>	
20 µM/L	36.65±7.24 <sup>d</sup>		31.85±1.74 <sup>d</sup>		30.27±4.42 <sup>bc</sup>	
30 µM/L	33.55±2.88 <sup>d</sup>		26.95±2.86 <sup>de</sup>		30.43±10.32 <sup>bc</sup>	
40 µM/L	17.02±5.01 <sup>e</sup>		22.82±2.14 <sup>e</sup>		17.48±10.45 <sup>cd</sup>	
50 µM/L	9.99±5.97 <sup>e</sup>		16.13±3.47 <sup>f</sup>		9.73±1.22 <sup>d</sup>	

Keterangan: Pada rerata±sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (p-value<0.05) dan jika memuat huruf yang samaberarti tidak ada perbedaan yang bermakna (p-value>0.05).



Gambar 2. Tren Penurunan Rerata Kadar TNF-



Gambar 3. Tren Penurunan Rerata Kadar IL-6

### Hasil Uji Penurunan Kadar TNF- dan IL-6 Berdasarkan Waktu Inkubasi Genistein

Pada rerata jumlah kadar TNF- dan IL-6 pada kultur sel endometriosis yang dipapar genistein berbagai dosis didapati adanya penurunan kadar TNF- pada waktu 6 jam, 24 jam dan 48 jam. Pada Tabel 2 berdasarkan hasil uji perbandingan berganda dengan uji Anova menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ( $P=0,000<$ ) terhadap penurunan rerata kadar TNF- antara kelompok waktu inkubasi. Tampak rerata kadar TNF- dan IL-6 kelompok waktu inkubasi 6 jam lebih besardan menurun seiring dengan penambahan waktu inkubasi.

### Hasil Uji Penurunan Kadar TNF- dan IL-6 terhadap Dosis Genistein dan Waktu Inkubasi 6 Jam, 24 Jam, 48 Jam

Berdasarkan hasil uji Anovapada data kadar TNF- pada kultur sel endometriosis dengan pemaparan genistein berbagai dosis dan waktu inkubasi 6 jam, 24 jam dan 48 jam, diperoleh ada perbedaan yang bermakna rerata kadar TNF- dan IL-6 pada ketujuh kelompok sampel pengamatan, hal ini ditunjukkan dengan nilai  $p\text{-value} = 0,000<$ .

Tampak pada gambar 2 dan 3 terlihat tren penurunan rerata kadar TNF- dan IL-6 berbagai dosis genistein dengan waktu inkubasi. Terjadi penurunan rerata kadar TNF- dan IL-6 pada kelompok perlakuan pemberian genistein seiring dengan dosis dan waktu inkubasi yang meningkat. Hasil uji Anova menunjukkan penurunan yang sangat bermakna secara statistik ( $p\text{-value} = 0,000<$ ). Terlihat rerata terendah kadar TNF- pada pemberian dosis genistein 50  $\mu\text{M/L}$  pada waktu inkubasi 48 jam. Kadar IL-6 terendah pada pemberian dosis genistein 50  $\mu\text{M/L}$  pada waktu inkubasi 6 jam.

### Hubungan Berbagai Dosis Genistein dengan Inkubasi Waktu terhadap Kadar TNF- dan IL-6

Pada hasil uji analisis regresi diperoleh ada pengaruh yang sangat bermakna antara dosis genestein (5  $\mu\text{M/L}$ , 10  $\mu\text{M/L}$ , 20  $\mu\text{M/L}$ , 30  $\mu\text{M/L}$ , 40  $\mu\text{M/L}$ , dan 50  $\mu\text{M/L}$ ) terhadap kadar TNF- waktu inkubasi 48 jam pada kultur sel endometriosis. Hal ini ditunjukkan dengan model persamaan regresi linier yaitu  $\hat{y} = -0,336x + 32,663$   $r^2=0,788$  dengan  $p\text{-value}=0,000<$  Adapun prosentase pengaruh dosis genestein terhadap kadar TNF- adalah koefisien determinasi  $\times 100\% = 0,788 \times 100\% = 78,8\%$  Hal ini berarti bahwa dalam penelitian ini kadar TNF- waktu inkubasi 48 jam pada kultur jaringan endometriosis dipengaruhi oleh dosis genistein sebesar 78,8% dan kadar TNF-

dipengaruhi oleh variabel lain selain dosis genistein yang tidak diteliti dalam penelitian ini sebesar 21,2%.

Tabel 7. Hasil analisis regresi pengaruh dosis terhadap kadar TNF-

Waktu inkubasi	Persamaan regresi	Prosentase pengaruh	p-value
6 jam	$\hat{y} = -1,080x + 64,152$	65,2%	0,000
24 jam	$\hat{y} = -0,833x + 51,287$	73,3%	0,000
48 jam	$\hat{y} = -0,336x + 32,663$	78,8%	0,000

Keterangan : Hasil analisis regresi pengaruh berbagai dosis genistein dan inkubasi waktu terhadap kadar TNF-

Tabel 7 menjelaskan terdapat hubungan yang linier dan pengaruh yang bermakna antara dosis genistein terhadap kadar TNF- berbagai dosis genistein dan waktu inkubasi dari hasil analisis regresi. Sedangkan pada Tabel 8 menunjukkan hasil uji analisis regresi diperoleh ada pengaruh yang sangat bermakna antara dosis genestein (5  $\mu\text{M/L}$ , 10  $\mu\text{M/L}$ , 20  $\mu\text{M/L}$ , 30  $\mu\text{M/L}$ , 40  $\mu\text{M/L}$ , dan 50  $\mu\text{M/L}$ ) terhadap kadar IL-6 waktu inkubasi 48 jam pada kultur jaringan endometriosis. Hal ini ditunjukkan dengan model persamaan regresi linier yaitu  $\hat{y} = -0,626x + 43,111$  atau kadar\_IL-6 = -0,626 dosis + 43,111 dengan  $p\text{-value} = 0,000<$  Adapun prosentase pengaruh dosis genestein terhadap kadar IL-6 adalah koefisien determinasi  $\times 100\% = 0,659 \times 100\% = 65,9\%$ . Hal ini berarti bahwa dalam penelitian ini kadar IL-6 waktu inkubasi 6 jam pada kultur jaringan endometriosis dipengaruhi oleh dosis genistein sebesar 89,6% dan kadar IL-6 dipengaruhi oleh variabel lain selain dosis genistein yang tidak diteliti dalam penelitian ini sebesar 10,4%.

Tabel 8. Hasil analisis regresi pengaruh dosis terhadap kadar IL-6

Waktu inkubasi	Persamaan regresi	Prosentase pengaruh	p-value
6 jam	$\hat{y} = -1,149x + 64,744$	89,6%	0,000
24 jam	$\hat{y} = -0,772x + 51,971$	86%	0,000
48 jam	$\hat{y} = -0,626x + 43,111$	65,9%	0,000

Keterangan : Hasil analisis regresi pengaruh berbagai dosis genistein dan inkubasi waktu terhadap kadar IL-6

Adanya perbedaan yang bermakna kadar TNF- dan IL-6 antara kelompok kontrol dengan semua kelompok yang dipapar genistein dosis 5  $\mu\text{M/L}$ , 10  $\mu\text{M/L}$ , 20  $\mu\text{M/L}$ , 30  $\mu\text{M/L}$ , 40  $\mu\text{M/L}$  dan 50  $\mu\text{M/L}$  dengan waktu inkubasi 6 jam, 24 jam dan 48 jam. Hasil menunjukkan ada pengaruh pemberian genistein pada kultur sel endometriosis ( $p<0,000$ ). Hal ini juga didukung hasil uji regresi yang diperoleh bahwa terdapat pengaruh yang sangat bermakna antara dosis (5  $\mu\text{M/L}$ , 10  $\mu\text{M/L}$ , 20  $\mu\text{M/L}$ , 30  $\mu\text{M/L}$ , 40  $\mu\text{M/L}$  dan 50  $\mu\text{M/L}$ ) dan waktu inkubasi (6 jam, 24 jam dan 48 jam) ( $p<0,000$ ), semakin

tinggi dosis genistein dan semakin cepat waktu paparannya maka kadar TNF- dan IL-6 semakin menurun.

Penelitian terhadap sel *line RAW 264,7* yang diinduksi inflamasi dipapar *genistein* dengan dosis 5 µM/L dan 10µM/L selama 12 jam, 24 jam, dan 48 jam terbukti menurunkan kadar TNF- dan IL-6.<sup>8</sup> Penelitian lain mengatakan induksi estrogen (E2) secara signifikan meningkatkan ekspresi mRNA TNF- , IL-1 dan IL-6, sementara dengan pemberian *genistein*, secara signifikan menurunkan ekspresi TNF- , IL-1 dan IL-6 yang diinduksi oleh estrogen (E2). Peningkatan kadar TNF- pada kultur sel memainkan peranan dalam merangsang proliferasi sel stroma endometriosis dan secara langsung mempengaruhi sel endometriosis dengan meningkatkan perlekatan sel stroma endometrium pada kultur sel, hal tersebut mempromosikan perlekatan dan peningkatan proliferasi sel endometriosis. Hal ini dimediasi efek biologis dan fungsional dari reseptor estrogen ER dan . ER- adalah reseptor yang dominan dalam rahim dewasa dan mediator utama efek estrogenik pada lesi endometriosis sehingga di harapkan dengan pemberian *genistein* yang merubah kondisi menjadi anti estrogenik dapat menurunkan kadar TNF- dan IL-6. *Genistein* sebagai salah satu strategi pengobatan terbaru, merupakan unsur utama dari fitoestrogen golongan isoflavan.<sup>9</sup> *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs) adalah cara kerja *genistein*, pada tulang berefek *estrogenic* (bekerja seperti estrogen atau pengganti estrogen) dan berefek anti estrogenik (bekerja menekan fungsi estrogen) pada jaringan reproduksi seperti ovarium dan endometrium.<sup>6</sup> Sifat SERMs membuat *genistein* pada kadar estrogen tinggi seperti pada kanker dan endometriosis, akan bekerja sebagai antiestrogenik, dengan adanya kemiripan struktur dengan 17- estradiol, *genistein* mampu mengikat reseptor estrogen (ER) yaitu estrogen reseptor dan estrogen reseptor ( ER dan ER ).<sup>10</sup> Pengobatan dengan ER antagonis murni mengakibatkan penghambatan peningkatan TNF- dan IL-6.<sup>11</sup>

*Genistein* dikenal sebagai komponen utama isoflavan, yang hadir dalam kedelai. *Genistein* telah menerima banyak perhatian karena efek kemopreventif dan terapi pada berbagai jenis kanker. Sebuah afinitas yang lebih tinggi untuk reseptor estrogen adalah salah satu penjelasan atas kemampuannya untuk mengurangi risiko endometriosis. Melalui mekanisme *genomic* *genistein* langsung berikatan dengan reseptor estrogen sehingga dapat menimbulkan efek seperti estrogen sedangkan<sup>12</sup>. *Genistein* dapat digunakan sebagai gen kemopreventif. Penyimpangan ekspresi IL-6 telah dikaitkan dengan berbagai kondisi patologi inflamasi dan perkembangan tumor.<sup>13</sup>

*Genistein* diidentifikasi memiliki kemiripan dengan struktur estrogen dan disebut sebagai sebagai *phytoestrogen*. *Genistein* bersifat antiestrogenik bila berhubungan dengan masalah.<sup>14</sup> Jadi, dengan interaksi terhadap reseptor estrogen, *genistein* dapat mengikat lebih kuat sehingga mempengaruhi metabolisme estrogen, berperan secara potensial dalam pencegahan kanker yang berhubungan dengan hormon. Sejumlah obat telah terbukti menghambat ekspresi dan signaling TNF- dan IL-6 yang salah satunya adalah estrogen. Mekanisme estrogen diketahui efektif dalam pengobatan dengan penghambatan IL-6 adalah dengan cara menghambat faktor transkripsi. Mekanisme *genistein* yang bersifat antiestrogenik dapat meningkatkan afinitas ER dan menekan ER menghambat estrogen dalam menginduksi aktivasi makrophag dan ekspresi TNF- dan IL-6.<sup>15,16</sup>

Temuan ini menunjukkan bahwa TNF- dan IL-6 memainkan peranan penting dalam berbagai penyakit inflamasi. Keberhasilan mengobati penyakit inflamasi khususnya endometriosis melalui penghambatan produksi TNF- dan IL-6. Sejauh ini, sejumlah obat telah terbukti menghambat ekspresi dan signaling TNF- dan IL-6 yang salah satunya adalah estrogen. *Genistein* yang memiliki struktur menyerupai estrogen diketahui efektif dalam pengobatan dengan penghambatan TNF- dan IL-6. Pemberian *genistein* dengan dosis yang tinggi dapat melindungi perempuan dari endometriosis melalui penghambatan produksi TNF- dan IL-6 dengan waktu paparan sesegera mungkin dan dalam waktu jangka panjang, hal ini diduga karena *genistein* bekerja bergantung tempat, dosis dan waktu..

## SIMPULAN

Pemberian *genistein* menurunkan kadar TNF- dan IL-6 pada kultur jaringan endometriosis.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Shen KJ., Wang Q., Huang W., High Prevalence Of Endometrial Polyps In Endometriosis-Associated Infertility. *Fertile Steri*, 2011;95 (8):2722-4
2. Hadisaputra, 2006. The Role of Laparoscopic Surgery in Current Treatment of Endometriosis. Departement of Obstetric and Gynologic, Faculty of Medicine University of Indonesia. Vol 15.
3. Wahcyu. Kombinasi Petanda Biologis (IL-6, TNF- , MMP2, VEGF) dan Gejala Serta Tanda Klinis Sebagai Model Prediktor Diagnosis Endometriosis Perempuan Masa Reproduksi. Universitas Indonesia. 2012

4. Martinez S., Garrindo N., Coperias J., Pardo F., Desco J., Viasco JG. Serum Interleukin-6 Levels are Elevated in Woman With Minimal Mild Endometriosis Human Reproduction. 2007;22 (3); 836-42
5. Tedja DO. Kandungan TNF- Dalam Zalir Peritoneal Dan Dalam Serum Penderita Endometriosis. Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta. Biodiversita. 2006; (7)3 : 208-211
6. Darmoutomo E., Phytoestrogen. 2009;Diakses pada tanggal 13 Maret 2013. <http://endangadi.wordpress.com/2009/02/09/phytoestrogen/>
7. Gui-Hua Sha And Shou-Qing Lin. Genistein Inhibits Proliferation Of Human Endometrial Endothelial Cell In Vitro. Chin Med Sci J.2008: Vol. 23, No. 1: 49 -53
8. Giyuan Ji, Zhang Y., Yang Q., Cheng S., Hao J. Genistein Menekan LPS-induced inflamasi Respon melalui Menghambat NF-kB berikut AMP Kinase Aktivasi di RAW 264,7 Makrofag. PLoS ONE 7.2012; (12): e53101.
9. Amberkar MV., Meena K., Mor V., Semwal A, Adiga S. PPAR-gamma: a Dagger in Endometriosis. Australian Medical Journal AMJ. 2010;3, 12: 814-820.
10. Muchtadi, D., Anggraini, W., Rahardjo, T., Ichramsyah, A. Pengaruh Isoflavon Kedelai terhadap Deplesi Estrogen pada Tikus Betina. Sprague Dawley.2008; 23 (2).
11. Gori I., Chiara P., Davide S., Ronan R., Caroline J., Geraldine O., Canny. Tumor Necrosis Alpha Activates Estrogen Signaling Pathways in Endometrial Epithelial Cells via Estrogen Receptor . Molecular and Cellular Endocrinology. 2011;34;27-37.
12. Sutrisno. Efek Genistein Terhadap Ekspresi eNOS, BCL2 dan Apoptosis Pada Kultur sel Endotel Umbilikus (HUVECs) yang Mengalami Stres Okidatif. Universitas Airlangga. 2010
13. Kyung K.M., Kidong K., Jae Y.H., Jeong M.L., Yong S.S. Modulation of Inflammatory Signaling Pathways by Phytochemicals in Ovarian Cancer.Genes Nutr. 2011; 6 : 109-115
14. Eustache F., Mondon F., Canivenc-Lavier MC., Lesaffre C., Fulla Y., Berges R., Cravedi JP., Vaiman D., Auger J., Chan WH. Chronic Dietary Exposure to a Low Dose Mixture of Genistein and Vinclozolin Modifies the Reproductive Axis, Testis Transcriptome, and Fertility. Environ Health Perspect. 2009;117 : 1272-1279
15. Rimbach G., Hall WL., William CM. Isoflavon And Endothelial Function. Nutrition Research Review. 2005; 18:130-144
16. Lee JY., Hee SK., Yong SS. Genistein as a Potential Anticancer Agent Against Ovarian Cancer. Journal of Traditional and Complementary Medicine. 2011;Vol 1,2 No. 2; 96-104.