

Pengaruh Genistein terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen α & β pada Kultur Sel Endometriosis

Rahayu Khairiah¹, Sutrisno², Sanarto Santoso³

¹Program Studi Magister Kebidanan, ²Divisi Fertilitas Endokrinologi Reproduksi, Departemen Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya/Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang

³Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRAK

Terapi genistein dikembangkan karena bersifat anti-estrogenik, berfungsi sebagai antioksidan, inhibitor proliferasi, dan anti-kanker. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh pemberian genistein terhadap ekspresi Reseptor Estrogen α (RE- α) dan Reseptor Estrogen β (RE- β) pada kultur sel endometriosis. Desain penelitian ini menggunakan studi eksperimental, yang dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Menggunakan jaringan endometriosis yang diambil dari pasien endometriosis melalui laparoskopi, kemudian dilakukan kultur sel hingga konfluen. Kelompok kultur dibagi menjadi 7 kelompok, yaitu : kontrol, kultur + genistein 5 μ M/L, kultur + genistein 10 μ M/L, kultur + genistein 20 μ M/L, kultur + genistein 30 μ M/L, kultur + genistein 40 μ M/L, kultur + genistein 50 μ M/L dengan waktu inkubasi 6 jam, 24 jam dan 48 jam. Ekspresi RE- α & RE- β diperiksa dengan menggunakan flowcytometri. Data hasil pengamatan di analisis dengan uji ANOVA dan uji regresi. Terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) ekspresi RE- α dan RE- β antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Pemberian genistein dosis 50 μ M/L menunjukkan nilai rerata ekspresi RE- α (2.15 ± 1.42 %) & RE- β (4.00 ± 3.54 %) terendah dibandingkan dosis lain. Waktu inkubasi 24 jam dapat menurunkan ekspresi RE- α (0.85 ± 0.39 %) & RE- β (1.78 ± 0.6 %) paling rendah. Simpulan, Ada pengaruh pemberian genistein terhadap ekspresi RE- α dan RE- β pada kultur sel endometriosis. (MOG 2014;22:86-93)

Kata Kunci: endometriosis, genistein, RE- α , RE- β

ABSTRACT

Genistein therapy is developed as it is anti-estrogenic, has a function as antioxidant, proliferatory inhibitor, and anti-cancer. The aim of this study was to demonstrate the effect of genistein on estrogen α receptor (ER- α) and estrogen β receptor (ER- β) expression in endometriosis cell culture. The design of this study was experimental, the study had been performed in Physiology Laboratory Medical Faculty of Brawijaya University Malang. This study used endometriosis tissue from patients with endometriosis via laparoscopy, cultured to make confluent. Culture group was divided into 7 groups: control, culture + genistein 5 μ M / L, culture + genistein 10 μ M/L, culture + genistein 20 μ M/L, culture + genistein 30 μ M/L, culture + genistein 40 μ M/L, culture + genistein 50 μ M/L with an incubation time of 6 hours, 24 hours and 48 hours. Estrogen α receptor & Estrogen β reseptor expression was determined by examination flowcytometri. The data were analyzed with ANOVA and regression test. There was significant difference ($p < 0.05$) ER- α and ER- β expression control group compared with treatment group Dose of genistein 50 μ M/L indicated the mean ER- α (2.15 ± 1.42 %) & ER- β (4.00 ± 3.54 %) Expression in the lowest dose when compared with other treatment dose. 24- hour incubation time was decrease the lowest ER- α (0.85 ± 0.39 %) & ER- β (1.78 ± 0.6 %) expression. In conclusion, there is the significant of genistein on the ER- α & ER- β expression in endometriosis cell culture. (MOG 2014;22:86-93)

Keywords: endometriosis, genistein, ER- α , ER- β

Correspondence: Rahayu Khairiah, Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, raeayufairuz@gmail.com.

PENDAHULUAN

Kejadian endometriosis mengalami peningkatan dalam 30 tahun terakhir, ditemukan 5 – 15% diantara semua operasi pelvik.¹ Endometriosis merupakan penyakit inflamasi yang bergantung dengan kadar estrogen, akibat P450 aromatase dan defisiensi 17 beta-hidroksisteroid dehidrogenase.^{2,3} 17 beta-hidroksisteroid dehidrogenase mengubah estradiol menjadi estron yang kurang aktif, yang tidak ditemukan pada fase luteal

jaringan endometriosis.^{3,4} Oleh karena itu endometriosis banyak terjadi pada wanita usia reproduksi.⁵

Terapi endometriosis sampai saat ini belum ada yang terbaru. Pengobatan medis yang paling banyak digunakan adalah Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) agonist dan kontrasepsi oral. Selain itu dapat juga dipergunakan beta agonis reseptor estrogen.⁶ Amberkar, et al., (2010) menyebutkan salah satu terapi hormonal sebagai strategi terapi terbaru dalam pengobatan adalah genistein. Genistein merupakan

golongan fitoestrogen, bekerja sebagai Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs), sehingga memiliki efek estrogenik dan antiestrogenik. Untuk menimbulkan respon biologis genistein berikatan dengan reseptor estrogen alpha (RE- α) dan reseptor estrogen betha (RE- β), dimana afinitas RE- β lebih besar dibandingkan RE- α .^{7,8}

Genistein telah terbukti dapat menghambat proliferasi sel pada kanker payudara secara in vitro di dosis > 10 $\mu\text{mol/L}$ dan menstimulasi proliferasi sel pada dosis <10 $\mu\text{mol/L}$.⁸ Studi in vitro lainnya menunjukkan bahwa genistein kisaran 5 – 50 $\mu\text{mol/L}$ dapat menghambat pertumbuhan sel tumor leukemia, limfoma, kanker prostat, kanker payudara dan kanker paru-paru, sedangkan konsentrasi kisaran 1 – 5 $\mu\text{mol/L}$ tidak cukup mampu melindungi endometrium.⁹ Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian genistein dosis tinggi terhadap ekspresi RE- α dan RE- β pada kultur sel endometriosis, diharapkan penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar terapi endometriosis.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental, Posttest only with control group, dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan September – Desember 2013. Sampel yang dipergunakan adalah jaringan endometriosis, dari perempuan yang telah terdiagnosis mengalami endometriosis dan menjalani laparoskopi. Jumlah replikasi pada penelitian ini adalah 4 replikasi dengan 1 kelompok tanpa perlakuan dan 6 kelompok dengan perlakuan genistein yaitu 5 $\mu\text{M/L}$, 10 $\mu\text{M/L}$, 20 $\mu\text{M/L}$, 30 $\mu\text{M/L}$, 40 $\mu\text{M/L}$, 50 $\mu\text{M/L}$ dengan waktu inkubasi 6 jam, 24 jam, 48 jam.

Alat yang digunakan meliputi seperangkat alat bedah steril, cawan metri, lemari es (Panasonic) dengan freezer (-20°C), pH meter, LAF (Laminar Air Flow) vertical (Esco), Tissue Culture (TC) Plate (Corning), mikroskop inverted (Olympus CKX 41), mikroskop binokuler (Olympus CX 21), camera digital (Olympus), incubator (Binder) dan tabung CO₂, Micro Sentrifuge Tube 1,5 ml (eppendorf), syringe microfilter 0.2 μm (corning), pipet mikro 1000 μL dan 500 μL (Gilson), tip falcon (BD) 15 ml, spuit (Terumo), Sentrifuge (Hittich), water bath (Mettler), laboratory bottle 250 ml (Duran), timbangan analitik (Sartorius), lampu spritus dan autoclave (Tomy), serta Rabbit Anti-Estrogen Related Receptor Beta Polyclonal Antibody, PE Conjugated (bs-6212R-PE) (Bioss, USA), Rabbit Anti Phosphoestrogen Receptor Alpha (SER104 + SER106) Polyclonal Antibody, FIT C Conjugated (bs-3131R-

FITC) (Bioss, USA), Cuvet Flowcyto, Flowcytometer (BD FACS Calibur).

Jaringan endometriosis diperoleh saat laparoskopi sebanyak 0,5-1 gram. Tiga macam larutan terdiri atas larutan I, larutan II dan larutan III. Larutan I merupakan larutan transfort dengan pencucian yang berisi HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) dengan gentamicin 50 $\mu\text{g/ml}$. Larutan II berisi 0,14% kolagenase IV (500 $\mu\text{g/ml}$), 0,1% Dnase (2,5 $\mu\text{g/ml}$) dalam HBSS. Larutan III berisi 8,29 gram NH₄CL, 1,0 gram NaHCO₂, 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 Essential Medium) 1:1 dengan 10% FCS (Fetal Calfs Serum), penicillin 50-100 $\mu\text{g/ml}$, L-Glutamine 2 mm, streptomycin 50-100 $\mu\text{g/ml}$ merk Sigma, Fungizone 250 $\mu\text{g/ml}$.

Prosedur Kultur

Specimen akan diproses secara aseptik dan diantarkan dengan es dalam larutan I tempat jaringan akan ditaruh dalam cawan petri steril diameter 9 cm, kemudian jaringan dicincang sehingga didapatkan potongan-potongan yang berukuran 0,5-2,0 mm² dan tebal 1 mm² 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. Spesimen diinkubasi secara horizontal dalam tabung sentrifugasi untuk menyebarkan potongan jaringan keseluruh bagian tabung, selama 7 menit sampai terlihat suspensi sel yang telah terdisosiasi (terpisah) berwarna keruh, homogen, terdapat bagian jaringan yang sudah seperti bubur sehingga tampak medium dan sel terpisah.

Preparat sel tersebut disentrifugasikan pada 1700 rpm dalam waktu 7 menit, larutan disosiasi dibuang dengan menggunakan pipet steril. Sel-sel diresuspensi (dilarutkan kembali) dalam 10 ml medium kultur (DMEM), dilakukan setrifuge dan supernatan dibuang. Ditambahkan 10 ml 10 ml medium kultur komplet (DMEM, FCS, Penicillin, L-Glutamine, Streptomycin, Fungizone). 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% CO₂ 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.¹⁰

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 pengulangan 3 kali dan diinkubasi selama 6 jam, 24 jam dan 48 jam.

Prosedur Flowcytometri Pemeriksaan Ekspresi RE-α dan RE-β

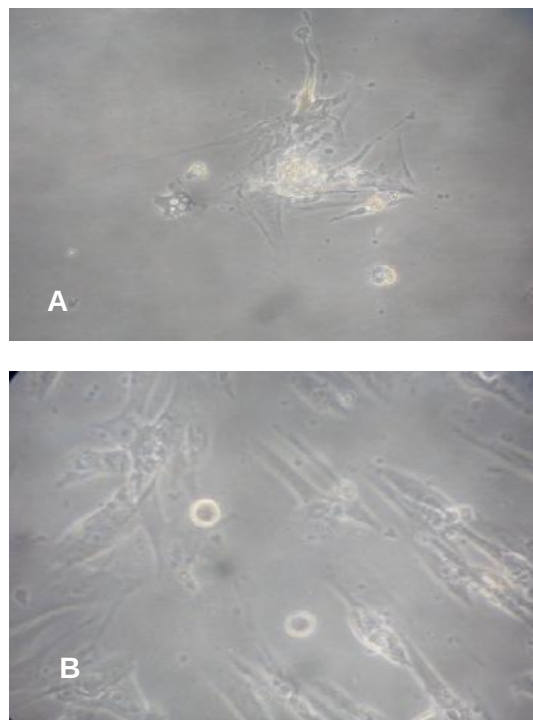
Medium dibuang dengan menggunakan mikropipet setelah inkubasi selama 6 jam, 24 jam dan 48 jam. Diberikan 0,25% Trypsin – EDTA Solution 300 µL pada setiap well di TC Plate, diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C selama 7 menit. Sel diamati dibawah mikroskop inverted untuk memastikan sel telah terlepas dan TC flask ditepuk-tepuk untuk membantu sel terlepas. Sel dipindahkan dari masing-masing well ke dalam tabung sentrifugasi 2 ml (Eppendorf) kemudian diberikan medium kultur (Medium serum free + 2% FBS) sebanyak 200 µL. Sel tersebut disentrifugasikan pada 2500 rpm selama 5 menit. Medium dibuang dan diberikan PBS + 2% FBS sebanyak 200 µL, kemudian disentrifugasikan pada 2500 rpm selama 5 menit, setelah itu medium dibuang. Tindakan ini diulangi sebanyak 2 kali. Diberikan Fixation Buffer Cat No. 420801 (Biolegend) sebanyak 100 µL dan difortex secara perlahan, diinkubasi pada suhu ruang dalam gelap selama 20 – 30 menit. Tanpa dicuci ditambahkan Permeabilization Wash Buffer 1 X Cat No. 421002 (Biolegend) sebanyak 400 µL ke dalam masing-masing tube, disentrifugasikan pada 2200 rpm selama 5 menit, kemudian medium dibuang. Permeabilization Wash Buffer 1 X sebanyak 400 µL dimasukkan kembali ke dalam masing-masing tube, disentrifugasikan pada 2200 rpm selama 5 menit, kemudian medium dibuang. Permeabilization Wash Buffer 1 X ditambahkan sebanyak 50 µL ke dalam masing-masing tube dan

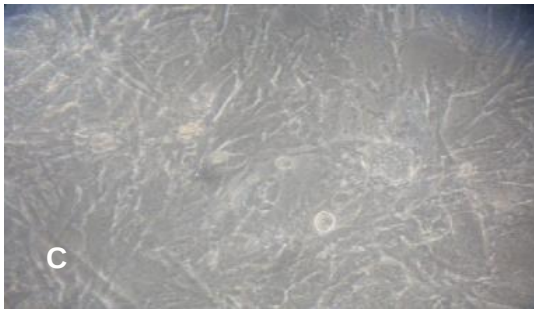
diberikan Antibodi RE-α bs-3131R Rabbit anti Phosphoestrogen receptor alpha (SER 104 + SER 106) Polyclonal antibody serta antibodi RE-β bs-6212R-FITC Rabbit anti estrogen related receptor beta polyclonal antibody, FITC dikonjugasikan sebanyak 100 µL, diinkubasi pada suhu ruang gelap selama 20 – 30 menit. Tube diletakkan pada parutan es dan diinkubasi pada suhu 4 °C sebelum dilakukan pemeriksaan flowcytometri. PBS +2% FBS diberikan ke masing-masing tube sebanyak 200 µL. Sel dipindahkan dari masing-masing tube ke cuvet flowcytometri untuk dilakukan pembacaan ekspresi RE-α & RE-β pada flowcytometer (BD FACSCalibur) dengan software Cell Quest Pro.

Data dianalisis dengan uji ANOVA, dilanjutkan uji perbandingan berganda LSD dan uji regresi. Uji statistik dikatakan bermakna bila $p < 0,05$. Proses penghitungan dilakukan dengan bantuan piranti lunak (soft-ware) SPSS for windows 19.0

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang pada bulan September - Desember 2013. Sampel berasal dari jaringan endometriosis pasien penderita endometriosis yang diambil melalui laparoskopi. Sampel sel endometriosis ini ditumbuhkan dengan baik sampai sel menjadi konfluent.





Gambar 1. Pertumbuhan Kultur Sel Endometriosis A. kultur hari ke-3 sudah mulai terlihat sel epitel dan sel stroma, B Kultur hari ke-6, Sel stroma dan sel epitel mulai memenuhi flask 70% C. Kultur hari ke 9, Sel stroma dan sel epitel mulai memenuhi flask 85 – 90% confluent.

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 Ekspresi RE- α Berdasarkan Dosis Genistein

Ada perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) ekspresi RE- α antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan berbagai dosis. Terlihat rerata yang paling tinggi terdapat pada kelompok kontrol (5,06 + 5,87 %). Penurunan ekspresi RE- α yang paling terendah terdapat pada kelompok yang mendapatkan genistein dosis 50 $\mu\text{M/L}$ (2,15 + 1,42 %). Hal ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Ekspresi RE- α (%) Berdasarkan Dosis Genistein

Kelompok Pengamatan	Waktu Inkubasi (Mean $\pm$ SD)			Σ	p
	6 Jam	24 Jam	48 Jam		
Kontrol	12.75 $\pm$ 2.80 ^a	1.22 $\pm$ 0.44 ^{ab}	1.20 $\pm$ 0.17 ^a	5.06 $\pm$ 5.87 ^a	0.000 $<\alpha$
5 $\mu\text{M/L}$	7.74 $\pm$ 1.16 ^b	0.69 $\pm$ 0.16 ^c	0.93 $\pm$ 0.13 ^{ab}	3.12 $\pm$ 3.47 ^b	
10 $\mu\text{M/L}$	10.37 $\pm$ 1.64 ^c	0.59 $\pm$ 0.16 ^c	1.31 $\pm$ 0.30 ^a	4.09 $\pm$ 4.73 ^c	
20 $\mu\text{M/L}$	6.62 $\pm$ 1.56 ^b	0.65 $\pm$ 0.08 ^c	0.94 $\pm$ 0.16 ^{ab}	2.74 $\pm$ 2.99 ^{bd}	
30 $\mu\text{M/L}$	8.00 $\pm$ 1.60 ^b	0.78 $\pm$ 0.24 ^{bc}	0.99 $\pm$ 0.22 ^a	3.26 $\pm$ 3.61 ^b	
40 $\mu\text{M/L}$	6.96 $\pm$ 0.89 ^b	0.71 $\pm$ 0.09 ^c	0.61 $\pm$ 0.39 ^b	2.76 $\pm$ 3.14 ^{bd}	
50 $\mu\text{M/L}$	3.98 $\pm$ 0.59 ^d	1.36 $\pm$ 0.57 ^a	1.12 $\pm$ 0.13 ^a	2.15 $\pm$ 1.42 ^d	

Keterangan : Pada Rerata + SD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value}<0,05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value}>0,05$).

Tabel 2. Ekspresi RE- α (%) Berdasarkan Waktu Inkubasi

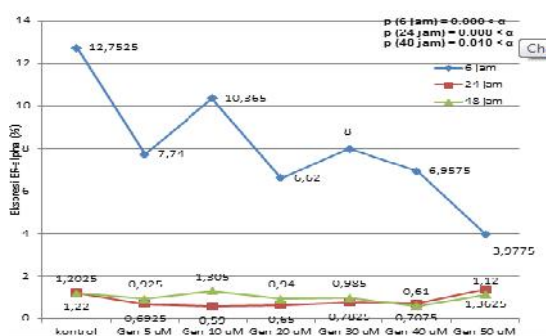
Waktu Inkubasi	Dosis Genistein (Mean $\pm$ SD)							P
	Kontrol	5 $\mu\text{M/L}$	10 $\mu\text{M/L}$	20 $\mu\text{M/L}$	30 $\mu\text{M/L}$	40 $\mu\text{M/L}$	50 $\mu\text{M/L}$	
6 jam	12.75 $\pm$ 2.80 ^a	7.74 $\pm$ 1.16 ^b	10.37 $\pm$ 1.64 ^c	6.62 $\pm$ 1.56 ^b	8.00 $\pm$ 1.60 ^b	6.96 $\pm$ 0.89 ^b	3.98 $\pm$ 0.59 ^d	8.06 $\pm$ 3.0 ^a
24 jam	1.22 $\pm$ 0.44 ^{ab}	0.69 $\pm$ 0.16 ^c	0.59 $\pm$ 0.16 ^c	0.65 $\pm$ 0.08 ^c	0.78 $\pm$ 0.24 ^b	0.71 $\pm$ 0.09 ^c	1.36 $\pm$ 0.57 ^a	0.85 $\pm$ 0.39 ^b
48 jam	1.20 $\pm$ 0.17 ^a	0.93 $\pm$ 0.13 ^b	1.31 $\pm$ 0.30 ^c	0.94 $\pm$ 0.16 ^b	0.99 $\pm$ 0.22 ^b	0.61 $\pm$ 0.39 ^b	1.12 $\pm$ 0.13 ^d	1.01 $\pm$ 0.3 ^b

Keterangan : Pada Rerata + SD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value}<0,05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value}>0,05$).

Tabel 3. Ekspresi RE- α (%) Berdasarkan Dosis Genistein dan Waktu Inkubasi

Kelompok Pengamatan	6 Jam		24 Jam		48 Jam	
	Rata-Rata $\pm$ SD	p	Rata-Rata $\pm$ SD	p	Rata-Rata $\pm$ SD	p
Kontrol	12.75 $\pm$ 2.80 ^a		1.22 $\pm$ 0.44 ^{ab}		1.20 $\pm$ 0.17 ^a	
Genistein 5 μ M/L	7.74 $\pm$ 1.16 ^b		0.69 $\pm$ 0.16 ^c		0.93 $\pm$ 0.13 ^{ab}	
Genistein 10 μ M/L	10.37 $\pm$ 1.64 ^c		0.59 $\pm$ 0.16 ^c		1.31 $\pm$ 0.30 ^a	
Genistein 20 μ M/L	6.62 $\pm$ 1.56 ^b	0,000	0.65 $\pm$ 0.08 ^c	0,008	0.94 $\pm$ 0.16 ^{ab}	0,010
Genistein 30 μ M/L	8.00 $\pm$ 1.60 ^b		0.78 $\pm$ 0.24 ^{bc}		0.99 $\pm$ 0.22 ^a	
Genistein 40 μ M/L	6.96 $\pm$ 0.89 ^b		0.71 $\pm$ 0.09 ^c		0.61 $\pm$ 0.39 ^b	
Genistein 50 μ M/L	3.98 $\pm$ 0.59 ^d		1.36 $\pm$ 0.57 ^a		1.12 $\pm$ 0.13 ^a	

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).

Gambar 2. Trend rerata ekspresi RE- α

Hasil Uji Ekspresi RE- α Berdasarkan Waktu Inkubasi

Ada perbedaan yang signifikan secara statistik antara ekspresi RE- α dengan waktu inkubasi 6 jam, 24 jam, dan 48 jam karena nilai $p < 0,05$. Tampak Rata-rata ekspresi RE- α tertinggi pada waktu inkubasi 6 jam (8,06 + 3,0 %). Hal ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil Uji Ekspresi RE- α Berdasarkan Dosis Genistein dan Waktu Inkubasi

Ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi RE- α pada waktu inkubasi 6 jam antara kelompok kontrol (12.75 $\pm$ 2.80%), dengan kelompok perlakuan pemberian genistein dosis. Hal ini ditunjukkan dengan nilai p-value < 0.05. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Tren penurunan rerata ekspresi RE- α pada waktu inkubasi 6 jam, 24 jam, maupun 48 jam seiring dengan

peningkatan dosis genistein. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil Analisa Regresi Pengaruh Dosis terhadap Ekspresi RE- α

Hasil regresi yang paling besar prosentase pengaruh dosis genistein terhadap ekspresi RE- α adalah pada waktu inkubasi 6 jam, yaitu 41.5% dan sangat bermakna secara statistik. Nilai negatif pada koefisien pengaruh - 0.089 menjelaskan ada pengaruh yang bersifat kebalikan. Bila dosis genistein meningkat maka akan berakibat terjadi penurunan ekspresi RE- α pada kultur sel endometriosis. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 4.

Hasil Uji Ekspresi RE- β Berdasarkan Dosis Genistein

Terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) ekspresi RE- β antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan berbagai dosis. Terlihat rerata yang paling tinggi terdapat pada kelompok kontrol (6.70 $\pm$ 6.79%), Penurunan ekspresi RE- β yang paling terendah pada kelompok genistein dosis 50 μ M/L (4.00 $\pm$ 3.54%). Hal ini dapat dilihat pada Tabel 5.

Hasil Uji Ekspresi RE- β Berdasarkan Waktu Inkubasi

Ada perbedaan yang signifikan secara statistik antara ekspresi RE- β dengan waktu inkubasi 6 jam, 24 jam, dan 48 jam karena nilai $p < 0,05$. Tampak Rata-rata ekspresi RE- β tertinggi pada waktu inkubasi 6 jam (11.47 $\pm$ 2.77 %). Hal ini dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel.4. Hasil analisis regresi pengaruh genistein terhadap ekspresi ER α

Waktu inkubasi	Persamaan regresi	Prosentase pengaruh	<i>p-value</i>
6 jam	$y = 9.586 - 0.089 x$	41.5%	0.001
24 jam	$y = 0.481 + 0.012 x$	30.8%	0.005
48 jam	$y = 1.076 - 0.004 x$	3.8%	0.353

Keterangan: Hasil regresi ekspresi RE- α pada kultur sel endometriosis yang mendapatkan perlakuan genistein pada waktu inkubasi 6 jam memberikan pengaruh terhadap penurunan RE- α sebesar 41,5%.

Tabel 5. Ekspresi ER- β (%) Berdasarkan Dosis Genistein

Kelompok Pengamatan	Waktu Inkubasi (Mean $\pm$ SD)				Σ	<i>P</i>
	6 Jam	24 Jam	48 Jam			
Kontrol	15.26 $\pm$ 4.74 ^a	2.24 $\pm$ 0.20 ^a	2.61 $\pm$ 0.39 ^a		6.70 $\pm$ 6.79 ^a	0.000< α
5 μ M/L	11.44 $\pm$ 1.59 ^{bc}	1.97 $\pm$ 0.40 ^a	2.42 $\pm$ 0.11 ^a		5.28 $\pm$ 4.64 ^{bc}	
10 μ M/L	12.65 $\pm$ 1.79 ^{ab}	2.16 $\pm$ 0.60 ^a	2.21 $\pm$ 0.23 ^{ab}		5.67 $\pm$ 5.25 ^{ab}	
20 μ M/L	10.90 $\pm$ 0.77 ^{bc}	0.65 $\pm$ 0.08 ^b	1.86 $\pm$ 0.30 ^{bc}		4.47 $\pm$ 4.79 ^{cd}	
30 μ M/L	9.98 $\pm$ 1.33 ^{bc}	1.67 $\pm$ 0.36 ^a	1.58 $\pm$ 0.39 ^c		4.41 $\pm$ 4.18 ^{cd}	
40 μ M/L	11.41 $\pm$ 1.12 ^{bc}	1.97 $\pm$ 0.10 ^a	1.53 $\pm$ 0.16 ^c		4.97 $\pm$ 4.80 ^{bcd}	
50 μ M/L	8.66 $\pm$ 1.45 ^c	1.82 $\pm$ 0.49 ^a	1.51 $\pm$ 0.28 ^c		4.00 $\pm$ 3.54 ^d	

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. Ekspresi RE- α (%) Berdasarkan Waktu Inkubasi

Waktu Inkubasi	Dosis Genistein (Mean $\pm$ SD)								<i>P</i>
	Kontrol	5 μ M/L	10 μ M/L	20 μ M/L	30 μ M/L	40 μ M/L	50 μ M/L	Rerata total	
6 jam	15.26 $\pm$ 4.74 ^a	11.44 $\pm$ 1.59 ^{bc}	12.65 $\pm$ 1.79 ^{ab}	10.90 $\pm$ 0.77 ^b	9.98 $\pm$ 1.33 ^{bc}	11.41 $\pm$ 1.12 ^b	8.66 $\pm$ 1.45 ^c	11.47 $\pm$ 2.77 ^a	0.000< α
24 jam	2.24 $\pm$ 0.20 ^a	1.97 $\pm$ 0.40 ^a	2.16 $\pm$ 0.60 ^a	0.65 $\pm$ 0.08 ^b	1.67 $\pm$ 0.36 ^a	1.97 $\pm$ 0.10 ^a	1.82 $\pm$ 0.49 ^a	1.78 $\pm$ 0.6 ^b	
48 jam	2.61 $\pm$ 0.39 ^a	2.42 $\pm$ 0.11 ^a	2.21 $\pm$ 0.23 ^{ab}	1.86 $\pm$ 0.30 ^{bc}	1.58 $\pm$ 0.39 ^{cd}	1.53 $\pm$ 0.16 ^{bcd}	1.51 $\pm$ 0.28 ^d	1.96 $\pm$ 0.5 ^b	

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).

Hasil Uji Ekspresi RE- α Berdasarkan Dosis Genistein dan Waktu Inkubasi

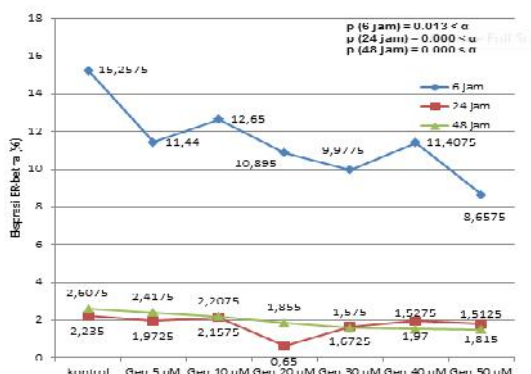
Ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi RE- α pada waktu inkubasi 6 jam antara kelompok kontrol (15.26 $\pm$ 4.74 %), dengan kelompok perlakuan pemberian genistein. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 7. Hasil regresi yang paling besar prosentase pengaruh dosis genistein terhadap ekspresi RE- β adalah pada waktu

inkubasi 48 jam, yaitu 61.7% dan sangat bermakna secara statistik. Nilai negatif pada koefisien pengaruh - 0.021 menjelaskan ada pengaruh yang bersifat kebalikan. Bila dosis genistein meningkat maka akan berakibat terjadi penurunan ekspresi RE- β pada kultur sel dinding kista endometriosis. Hal ini ditunjukkan pada Tabel 8.

Tabel 7. Ekspresi RE- β (%) Berdasarkan Dosis Genistein dan Waktu Inkubasi

Kelompok Pengamatan	6 Jam		24 Jam		48 Jam	
	Rata-Rata $\pm$ SD	p	Rata-Rata $\pm$ SD	p	Rata-Rata $\pm$ SD	p
Kontrol	15.26 $\pm$ 4.74 ^a		2.24 $\pm$ 0.20 ^a		2.61 $\pm$ 0.39 ^a	
Genistein 5 μ M/L	11.44 $\pm$ 1.59 ^{bc}		1.97 $\pm$ 0.40 ^a		2.42 $\pm$ 0.11 ^a	
Genistein 10 μ M/L	12.65 $\pm$ 1.79 ^{ab}		2.16 $\pm$ 0.60 ^a		2.21 $\pm$ 0.23 ^{ab}	
Genistein 20 μ M/L	10.90 $\pm$ 0.77 ^{bc}	0,013	0.65 $\pm$ 0.08 ^b	0,000	1.86 $\pm$ 0.30 ^{bc}	0,000
Genistein 30 μ M/L	9.98 $\pm$ 1.33 ^{bc}		1.67 $\pm$ 0.36 ^a		1.58 $\pm$ 0.39 ^c	
Genistein 40 μ M/L	11.41 $\pm$ 1.12 ^{bc}		1.97 $\pm$ 0.10 ^a		1.53 $\pm$ 0.16 ^c	
Genistein 50 μ M/L	8.66 $\pm$ 1.45 ^c		1.82 $\pm$ 0.49 ^a		1.51 $\pm$ 0.28 ^c	

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).

Gambar 3. Tren rerata penurunan ekspresi RE- β Tabel 8. Hasil analisis regresi pengaruh genistein terhadap ekspresi ER β

Waktu inkubasi	Persamaan regresi	Prosentase pengaruh	p-value
6 jam	$\hat{y} = 12.363 - 0.059x$	29.3%	0.006
24 jam	$\hat{y} = 1.711 + 0.001x$	0.01%	0.980
48 jam	$\hat{y} = 2.382 - 0.021x$	61.7%	0.000

Keterangan: perbedaan bermakna pada nilai p<0,05

Endometriosis merupakan salah satu gangguan pada sistem reproduksi yang paling banyak ditemukan, terkait dengan hormon estrogen dan tergolong penyakit inflamasi kronik.^{11,12} Kultur sel endometriosis pada penelitian ini menggunakan sel epitel dan sel stroma, tidak dilakukan pemisahan terhadap keduanya. Hal ini sesuai dengan penelitian yang pernah dilakukan oleh Matsuzaki, et al (2010), tentang pembuktian kehadiran sel stroma dan sel epitel pada endometrium eutopik dan ektopik secara in vitro. Sampey et al (2011) mengatakan

bahwa sel stroma dapat memproduksi faktor pertumbuhan secara parakrin yang dibutuhkan dalam menginduksi proliferasi sel epitel oleh estrogen pada sel kultur. Truchacheva, et al (2009), mengatakan bahwa terjadi peningkatan ekspresi RE- β dan penurunan ekspresi RE- α pada jaringan endometriosis manusia dan sel stroma bila dibandingkan dengan jaringan endometrium eutopik. Ekspresi RE- β pada jaringan dan sel-sel stroma endometrium 36 kali lebih tinggi bila dibandingkan dengan sel stroma atau endometrium normal.

Pada penelitian ini didapatkan ekspresi RE- β lebih tinggi bila dibandingkan dengan ekspresi RE- α . Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Bulun, et al (2012), dikatakan bahwa RE- β pada endometriosis 100 x lebih tinggi bila dibandingkan jaringan endometrium, hal ini disebabkan karena terjadinya over ekspresi patologis RE- β dalam sel stroma endometrium sehingga menyebabkan kekurangan promotor RE- β . Pendapat ini didukung oleh penelitian Trukhacheva et al (2009), dikatakan bahwa ekspresi yang berlebihan dari RE- β pada sel stroma endometrium menurunkan mRNA ER- α dan tingkat protein. Pendapat lain yang disampaikan pada penelitian Bulun et al (2010), RE- α dan RE- β adalah protein dengan afinitas tinggi untuk E2 dan dikodekan oleh gen terpisah. Meskipun RE- α dan RE- β ada dalam endometrium, tetapi RE- α menjadi mediator utama dari aksi estrogenik dalam jaringan ini.

Genistein bersifat antagonis dan menurunkan efek estrogenik pada kultur sel stroma dan kelenjar endometrium yang tinggi tingkat estrogenya.^{9,17} Genistein memiliki sifat SERM yang dapat berikatan dengan RE- α dan RE- β serta memiliki efek anti estrogenik pada beberapa jaringan reproduksi diantaranya endometrium.¹⁰

Hasil penelitian menunjukkan bahwa genistein mampu menurunkan ER- α & ER- β pada dosis 50 μ M/L dan waktu inkubasi 24 jam.

SIMPULAN

Genistein dapat menurunkan ekspresi RE- α dan RE- β baik dilihat dari dosis maupun waktu. Dosis yang tinggi dan waktu yang singkat sangat berpengaruh dalam menurunkan ekspresi RE- α dan RE- β .

DAFTAR PUSTAKA

1. Prabowo. Endometriosis. Ilmu Kandungan. Edisi 2. Sarwono Prawirohardjo. Jakarta: PT Bina Pustaka; 2009. h. 314-27.
2. Giudice, Linda C. Clinical Practice Endometriosis. The New England Journal of Medicine. 2010;362:2389-98.
3. Nurtjahyo A. Kupas Tuntas Kelainan Haid : Kelainan Haid Pada Endometriosis. Departemen Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran. 2011. h. 151-8.
4. Falcone T and Lebovic I. Clinical Management of Endometriosis. The American College of Obstetricians and Gynecologists. 2011;118(3):693-4.
5. Stratton P and Berkley K.J. Chronic Pelvic pain and Endometriosis : Translational Evidence of the Relationship and Implication. Human reproduction Update. 2011;7(3):327-46.
6. Panay N. Advances in the Medical Management of endometriosis. BJOG. 2008;115(8):814-7.
7. Matsukura H, Ken-ichi A, Katsuhide I, Yuko M, Jun K, Masaaki M, Katsuko S, Noriko S. Genistein Promotes DNA Demethylation of the Steroidogenic Factor 1 (SF-1) Promoter in Endometrial Stromal Cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2011;412:366-72.
8. Rajah TT, Du N, Drews N, Rachel C. Genistein in the Presence of 17- β estradiol Inhibits Proliferation of ER β Breast Cancer Cells. Pharmacology. 2009;84:68-73.
9. Sha G and Lin S. Genistein Inhibits Proliferation of Human Endometrial Endothelial Cell in Vitro. Chinese Medical Sciences Journal. 2008;23(1):49-53.
10. Handayani V, Tatit N, Sutrisno. Perbandingan Ekspresi Reseptor Estrogen β dengan Penambahan Berbagai Dosis Genistein pada Sel Endotel HUVEC yang Mengalami Stres Oksidatif. Majalah Obstetri Ginekologi Indonesia. 2010;34(1):24-30.
11. Farrell E and Garad R. Endometriosis. ANJ Clinical Update. Australian Nursing Journal. 2012;20(5).
12. Leyland N, Casper R, Laberge P, Singh. Endometriosis diagnosis and menegemen. Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada (JOGC). 2010;32(7):1-32.
13. Matsuzaki S, Murakami T, Uehara S, Canis M, Sasano H, Okamura. Expression of Estrogen Receptor Alpha and Beta in Peritoneal and Ovarian Endometriosis. Fertil Steril. 2001;75(6):198-205.
14. Sampey B, Lewis T, Barbier C, Makowski L, Kaufman D. Genistein Effects on Stromal Cells Determines Epithelial Proliferation in Endometrial Co-Cultures. NIH Public Access Author Manuscript. 2011; 90(3):257-63.
15. Bulun SE, Monsavais D, Pavone ME, Dyson M, Xue Q, Attar E, Tokunaga H, Su EJ. Role of estrogen receptor- β in endometriosis. Semin Reprod Med. 2012;30(1):39-45.
16. Bulun SE, Cheng Y, Pavone ME, Qing X, Attar E. Estrogen receptor- β , Estrogen Receptor- β , and progesteron Resistance in Endometriosis. Sermin Reprod Med. 2010;28(1):34-6.
17. Kayisli UA, Aksu CAH, Berkanoglu M, AndArici A. Estrogenicity of isoflavan on human endometrial stromal and glandular cells. The journal of clinical endocrinology and metabolism. 2002;87(12):5539-44.