

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Endometriosis menjadi salah satu masalah reproduksi utama saat ini oleh karena angka kejadiannya cukup tinggi (Giudice, 2010). Endometriosis mempengaruhi 6-10% wanita usia reproduksi dari segala etnis dan kelompok sosial (Burney dan Giudice, 2012). Ditemukan 1 dari 10 wanita usia produktif (15-49 tahun) atau sekitar 176 juta wanita di seluruh dunia mengalami endometriosis.

Di Amerika Serikat kejadian endometriosis pada wanita usia subur sekitar 10% (Dunnihoo, 1992). Di Rumah Sakit dr. Soetomo Surabaya tahun 1987-1991 didapatkan angka kejadian endometriosis pada kasus infertilitas sebesar 23,8%, dan pada tahun 1992-1993 angka kejadiannya 37,2% (Prajitno, 1994). Kejadian berdasarkan gejala yang bersifat asimtomatik berkisar antara 2-22%, dengan gejala dismenorea dan tumor 40-60%, nyeri pelvis 13%-33 %, dysperiunea 12-27%, dan infertilitas 20-30% (Dunnihoo, 1992).

Endometriosis dan perjalanan etiopatogenesis penyakit ini telah banyak diteliti secara mendalam dan diungkapkan dalam beragam teori mulai dari teori klinik hingga biomolekuler (Prayitno, 1994; Speroff L, 2005; Taylor *et al.*, 2010; Burney *et al.*, 2012). Namun demikian sampai saat ini belum didapatkan satu teori yang disepakati sebagai teori baku pathogenesis endometriosis. Dmowski *et al.*, (2004) dan Soares *et al.*, (2012) mengajukan teori inflamasi dan ini paling rasional menjelaskan banyak fenomena pada endometriosis.

Hormon estrogen merupakan induktor inflamasi dan memicu kaskade reaksi inflamasi. Estrogen berikatan dengan reseptor estrogen α (RE- α) dan reseptor estrogen β (RE- β) dan ikatan yang dominan menentukan efek akhirnya. RE- α bersifat stimulasi dan RE- β akan menghambat RE- α . Rasio RE- α / RE- β

menentukan efek estrogen/SERM bersifat estrogenic atau antiestrogenik.

Estrogen memicu aktifitas sitokin proinflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor - α* (TNF- α), *Interleukin 1 β* (IL1- β), *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF κ B) dan memicu reaktifitas makrofag peritoneal untuk menjadi hipereaktif dan memicu kaskade reaksi proinflamasi dan menyebabkan reaksi berantai dengan hasil akhir proliferasi sel meningkat, apoptosis turun, pembuluh darah meningkat, kerusakan dan progresifitas endometriosis bertambah (Taylor *et al.*, 2010; Burney *et al.*, 2012; Soares, 2012). Berdasarkan hal di atas maka patofisiologi endometriosis

melalui teori inflamasi ini mempunyai penjelasan yang rasional untuk menjelaskan berbagai keluhan, gejala klinik dan terapi saat ini dan masa depan.

Endometriosis merupakan penyakit tumor jinak, namun memiliki karakteristik menyerupai keganasan seperti sifatnya yang invasif, memiliki kecenderungan untuk bermetastasis dan kambuh (Agarwal *and* Subramanian, 2010; Barrier *et al.*, 2010; Leyland, *et al.*, 2010). Proliferasi sel pada endometriosis telah dipelajari oleh berbagai penelitian, namun belum banyak diungkap mengenai mekanismenya secara pasti. Kenaikan sensitivitas endometriosis terhadap proses proliferasi sel dapat menjadi salah satu kemungkinan patogenesis penyakit ini. Penelitian oleh Agarwal (2010), menunjukkan adanya peningkatan signifikan proliferasi sel pada penderita endometriosis dibandingkan dengan bukan penderita endometriosis (Agarwal, 2010). Proliferasi sel endometriosis menjadi target terapi untuk mengendalikan progresifitas klinis endometriosis dengan tujuan menekan laju proliferasi sel endometriosis diharapkan tingkat perkembangan endometriosis menjadi lambat atau terhenti. PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) adalah salah satu petanda proliferasi sel, sehingga pada endometriosis, status proliferasinya bisa diukur dari kadar PCNA. Tingkat proliferasi sel merupakan salah satu penjelasan yang logis dan rasional terkait progresifitas endometriosis dan memerlukan kajian lebih lanjut.

Nisolle (2000) melaporkan adanya apoptosis pada endometrium manusia setelah mengemukakan konsep apoptosis yang dipopulerkan oleh Kerr. Bukti-bukti yang terkumpul menunjukkan bahwa proses apoptosis ini membantu mengatur homeostasis seluler selama siklus menstruasi dengan membatasi sel-sel yang tidak dibutuhkan dari lapisan fungsional endometrium selama fase sekresi akhir dan fase menstruasi (Hull, 2008; Sourial, 2014). Sehingga dapat disimpulkan bahwa proses apoptosis ini mempunyai peranan menentukan pada progresifitas endometriosis terkait dengan pengaturan keseimbangan proliferasi sel yang diinisiasi oleh hormon estrogen. Apoptosis yang normal akan membuat sel-sel endometrium yang refluk segera bersih dari rongga peritoneum namun bila apoptosisnya mengalami anomali, sel-sel endometriunya akan bertahan hidup dan tumbuh progresif menjadi endometriosis. Anti apoptosis menjadi target terapi yang terus di eksplorasi karena menjanjikan sebagai modalitas terapi.

Gen Bcl-2 atau Bc lymphoma/leukemia-2 berlokasi pada kromosom 18, adalah penentu penting apakah sebuah sel akan berkomitmen secara menetap terhadap apoptosis. Protein Bcl-2 adalah molekul khas yang berhubungan dengan apoptosis dan data sekarang ini mendukung secara jelas peran protein Bcl-2 sebagai penekan kematian sel (Mylonas, 2005). Bax adalah anggota anggota keluarga Bcl-2 yang mendukung kematian sel, mekanismenya dengan membalikkan pengaruh Bcl-2 pada survival sel melalui interaksi heterodimer. Kadar protein Bax rendah pada endometrium fase proliferasi dan meningkat secara dramatis pada fase sekresi saat apoptosis sangat menonjol. Dmowski *et al.* (2001) menemukan adanya apoptosis yang menurun seiring stadium endometriosis. Olive *et al.*, (2004) dan Harada *et al.*, (2007) mendapatkan fakta adanya proliferasi yang meningkat dan apoptosis yang menurun berhubungan dengan semakin tingginya progresifitas endometriosis. Secara normal BCL-2 dan Bax tereksresi di membran sel mitokondria namun perubahan jumlahnya

menentukan kecenderungan sebuah sel ke arah survive atau apoptosis.

Perbandingan (rasio) jumlah Bcl-2 dan Bax mempunyai peran sebagai indikator

kecenderungan sebuah sel untuk berproses menuju apoptosis, sehingga rasio ini

mempunyai peran yang baik sebagai indikator apoptosis.

Penduduk Asia dikenal sebagai pengkonsumsi kacang-kacangan dalam

menu hariannya. Konsumsi kacang-kacangan dikaitkan dengan rendahnya

insiden kanker payudara dan kanker prostat, sehingga kacang-kacangan

merupakan alternatif pencegah berbagai jenis kanker pada wanita (Adlercreutz,

1995; Rice, 2002; Riggs *et al.*, 2003, Andreas *et al.*, 2011). Karena adanya

kemiripan antara kanker dan endometriosis, maka mekanisme pada kanker akan

terjadi pula pada endometriosis. Yavuz (2007) dan Soares (2012) membuktikan

adanya manfaat genistein dalam menekan memburuknya endometriosis.

Penelitian yang dilakukan pada binatang coba dan manusia, Yavuz (2007) dan

Soares (2012) membuktikan bahwa genistein berefek multipel, dalam dosis

tertentu bersifat stimulasi proliferasi sel dan dalam dosis lainnya bersifat inhibisi

terhadap proliferasi sel sehingga genistein disebut sebagai SERM (*Selective*

Estrogen Receptor Modulator) alami.

Sebuah tinjauan pustaka mengenai beberapa studi mengenai pengaruh

genistein terhadap kardiovaskuler pada kultur sel endotel tali pusat, binatang

coba dan pada manusia, Cano (2010) dan Yuan-jing (2009) mendapatkan hasil

bahwa mekanisme kerja genistein menyerupai hormon estrogen (melalui

reseptor estrogen). Rabiau (2010) melakukan studi dengan kultur sel kanker

prostat yang mendapat berbagai dosis genistein mulai 10 μM sd 100 μM

menyimpulkan bahwa genistein mampu berfungsi sebagai bahan yang menekan

pertumbuhan kanker melalui jalur siklin dan jalur *Epidermal Growth Factor* (EGF)

dan *Insulin like growth factor* (IGF). Li (2010) dalam tinjauan pustaka-nya

berbagai studi pada binatang dan manusia menyimpulkan bahwa genistein

menekan perkembangan kanker hematologi melalui berbagai jalur apoptosis.

Grossner (2006) melakukan studi pada kultur sel kanker ovarium, menemukan bahwa genistein menghambat perkembangan kanker ovarium melalui jalur apoptosis dan autophagositosis. Yang (2016) melakukan studi pada kultur sel kanker serviks yang diberi genistein dan mendapatkan kesimpulan genistein menyebabkan apoptosis melalui jalur retikulum endoplasma. Mekanisme genistein pada endometriosis perlu dieksplorasi lebih lanjut.

Studi eksperimental pada tikus endometriosis didapatkan data bahwa genistein yang merupakan fitoestrogen paling poten saat ini, mampu menginduksi penurunan perkembangan sel-sel endometriosis yang terjadi pada tikus model endometriosis (Yavuz *et al*, 2007; Soares, 2012). Sementara studi lain menyatakan bahwa injeksi intramuskuler genistein pada model tikus endometriosis ovariectomi, menyatakan bahwa genistein mempertahankan pertumbuhan implant jaringan endometriosis (Cai Q *et al.*, 1996). Studi yang kedua ini terjadi karena obyek studi adalah tikus menopause sehingga genistein bersifat estrogenik. Namun dalam praktek klinik, sebagian besar kasus endometriosis manusia ditemukan pada periode reproduksi sehingga penelitian Yavuz *et al.*, (2007) lebih mempunyai kemiripan dan lebih alami. Dari penelitian tersebut diketahui bahwa genistein mempunyai peran antiendometriosis melalui jalur antioksidan dan antiinflamasi.

Ditingkat molekuler efek genistein pada sel meliputi inhibisi proliferasi, induksi diferensiasi, apoptosis, dan terhentinya sel pada siklus sel berhubungan dengan *transforming growth factor* (TGF) β 1. Genistein menghambat pertumbuhan sel dengan memodulasi jalur signal *transforming growth factor* (TGF) β 1. Peptida *growth factor* ini telah teridentifikasi sebagai faktor utama yang meregulasi proliferasi sel eukariotik dengan melemahkan aliran pasase yang melalui titik siklus sel (*cell cycle checkpoint*) sehingga hasil akhirnya dapat

menghambat perkembangan sel endometriosis (Akiyama, 1987; Constantinou *et al.*, 1995). Mekanisme di tingkat molekuler dari genistein perlu dipahami untuk memperoleh penjelasan yang rasional bagaimana molekul genistein bekerja pada penyakit endometriosis.

Mempelajari patomekanisme endometriosis mengalami kesulitan tersendiri karena endometriosis hanya terjadi pada primata. Eksperimen pada manusia dan primata terkendala pada etika dan biaya. Pada kelinci, hamster, tikus dan mencit endometriosis dapat diinduksi dengan mengimplan jaringan endometrium ke lokasi ektopik secara autolog maupun heterolog. Yesilgar (2011)

memasukkan cacahan uterus ke rongga peritoneum, Cumming dan Metcalf (1995) memasukkan endometrium ke rongga peritoneum tikus, Somigliana

(1999) memasukkan jaringan endometrium yang diisolasi ke dalam rongga peritoneum tikus, namun tingkat keberhasilannya untuk menjadi endometriosis sekitar 30 persen. Percobaan lain oleh Nisole (2000) dan Grummer (2001)

memasukkan endometrium manusia pada peritoneum tikus yang mengalami defisiensi limfosit T matur dan kemudian terjadi proses endometriosis, namun tingkat keberhasilannya juga tidak lebih dari 30 persen. Awwad (1999)

melakukan hal serupa pada tikus yang mengalami *severe combined immunodeficient* (SCID) dan tingkat endometriosisnya lebih tinggi. Sa'adi (2010)

melakukan implantasi endometrium manusia pada tikus yang dibuat imunodefisien dengan suntikan siklosporin A dengan dosis 10 mg/kg/hari, satu kali sebelum perlakuan, dan ternyata didapatkan keberhasilan sekitar 30 persen

juga. Vannuccini S (2017) menyatakan bahwa adenomiosis dan endometriosis memiliki karakter yang sama yaitu adanya jaringan epitel, stroma dan kelenjar yang ektopik, neovaskularisasi, invasi dan proliferasi. Adenomiosis dianggap merupakan varian endometriosis namun mempunyai daya infiltrasi yang lebih kuat dari endometriosis umumnya karena patofisiologi adenomiosis berbeda

dengan endometriosis peritoneal, kista dan *Deep infiltrating endometriosis (DIE)*.

Implantasi sel adenomiosis perlu dikaji sebagai alternatif untuk meningkatkan tingkat keberhasilan memperoleh binatang coba untuk eksperimen endometriosis.

Etiopatogenesis endometriosis serta berbagai alternatif pengobatannya telah lama diketahui, namun hasil akhir pengobatan selalu menyisakan banyak masalah yang berupa kekambuhan, efek samping, harga yang mahal serta efektifitas yang terentang luas. Sehingga genistein merupakan salah satu bahan yang baik sebagai salah satu alternatif terapi endometriosis di masa depan.

Namun sampai dengan saat ini mekanisme genistein dalam menurunkan atau menghambat proliferasi dan apoptosis sel endometriosis masih belum sepenuhnya diketahui. Oleh sebab itu diperlukan suatu studi dengan mencit model endometriosis untuk mempelajari mekanisme kerja genistein pada endometriosis ini.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Apakah genistein berbagai dosis berpengaruh terhadap proliferasi dan apoptosis sel endometriosis melalui perubahan rasio ER α /ER β dan NF κ B pada mencit model endometriosis?

1.2.2 Rumusan Masalah Khusus

Penelitian tahap 1 :

1. Apakah asal implan berpengaruh terhadap luas endometriosis, inflamasi dan granuloma, ekspresi reseptor estrogen alfa, reseptor estrogen beta dan reseptor progesteron pada mencit model endometriosis.

2. Apakah jaringan adenomiosis merupakan sumber implan terbaik untuk membuat mencit model endometriosis

Penelitian tahap 2 :

1. Apakah genistein berbagai dosis berpengaruh terhadap proliferasi sel endometriosis pada mencit model endometriosis?
2. Apakah genistein berbagai dosis berpengaruh terhadap perubahan rasio ER α /ER β pada mencit model endometriosis?
3. Apakah genistein berbagai dosis berpengaruh perubahan NF κ B pada mencit model endometriosis?
4. Apakah genistein berbagai dosis berpengaruh terhadap proliferasi sel endometriosis melalui perubahan rasio RE α /RE β pada mencit model endometriosis?
5. Apakah genistein berbagai dosis berpengaruh terhadap proliferasi sel endometriosis melalui perubahan NF κ B pada mencit model endometriosis?
6. Apakah genistein berbagai dosis berpengaruh terhadap apoptosis sel endometriosis pada mencit model endometriosis?
7. Apakah genistein berbagai dosis berpengaruh terhadap apoptosis sel endometriosis melalui perubahan rasio RE α /RE β pada mencit model endometriosis?
8. Apakah genistein berbagai dosis berpengaruh terhadap apoptosis sel endometriosis melalui perubahan NF κ B pada mencit model endometriosis?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk membuat menci model endometriosis yang efisien untuk penelitian endometriosis dan membuktikan mekanisme genistein dalam mempengaruhi proliferasi dan apoptosis sel endometriosis melalui perubahan rasio $ER\alpha/ER\beta$ dan NF κ B pada menci model endometriosis.

1.3.2 Tujuan Khusus

Penelitian tahap 1 :

1. Membuktikan perbedaan luas endometriosis peritoneum pada menci model endometriosis yang mendapat implan dari jaringan kerokan endometrium, kapsul kista endometriosis dan supernatan jaringan adenomiosis.
2. Membuktikan jaringan adenomiosis sebagai sumber implan terbaik untuk membuat menci model endometriosis

Penelitian tahap 2 :

1. Membuktikan pengaruh genistein berbagai dosis terhadap proliferasi sel endometriosis pada menci model endometriosis
2. Membuktikan pengaruh genistein berbagai dosis terhadap rasio $ER\alpha/ER\beta$ pada menci model endometriosis
3. Membuktikan pengaruh genistein berbagai dosis terhadap NF κ B pada menci model endometriosis

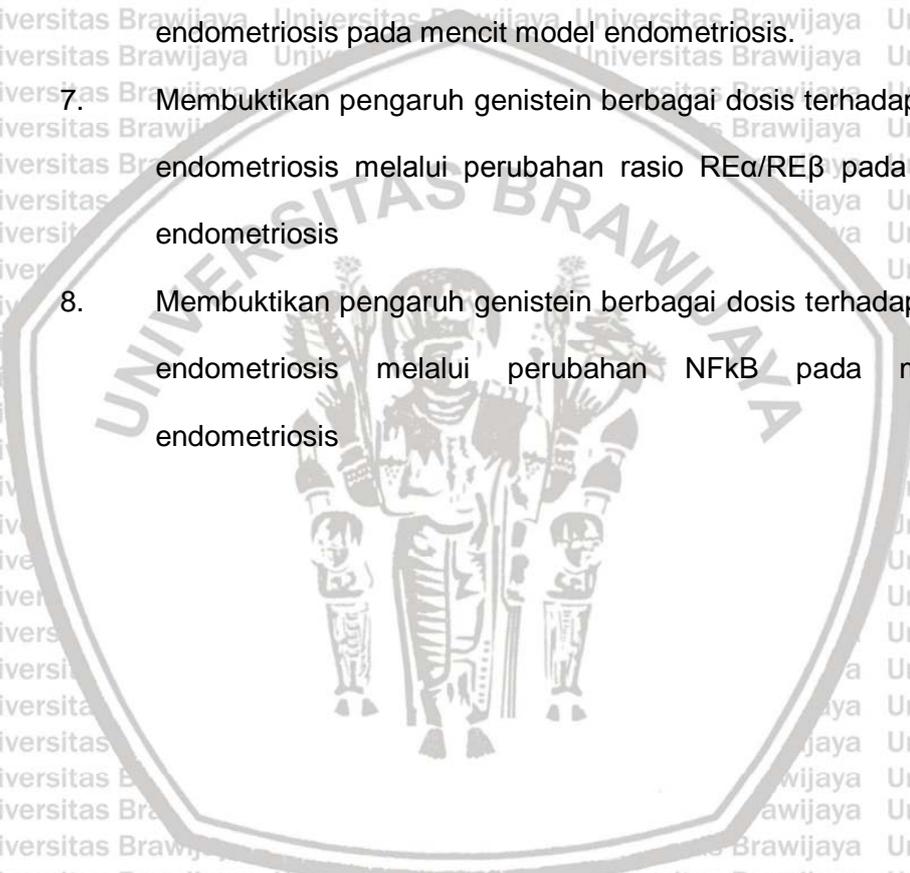
4. Membuktikan pengaruh genistein berbagai dosis terhadap proliferasi sel endometriosis melalui perubahan rasio $RE\alpha/RE\beta$ pada mencit model endometriosis?

5. Membuktikan pengaruh genistein berbagai dosis terhadap proliferasi sel endometriosis melalui perubahan NFkB pada mencit model endometriosis

6. Membuktikan pengaruh genistein berbagai dosis terhadap apoptosis sel endometriosis pada mencit model endometriosis.

7. Membuktikan pengaruh genistein berbagai dosis terhadap apoptosis sel endometriosis melalui perubahan rasio $RE\alpha/RE\beta$ pada mencit model endometriosis

8. Membuktikan pengaruh genistein berbagai dosis terhadap apoptosis sel endometriosis melalui perubahan NFkB pada mencit model endometriosis



1.4 Manfaat Penelitian

1. Secara keilmuan berguna untuk mendapatkan metode dan teknik yang baik dalam pembuatan mencit model endometriosis sehingga dapat dipergunakan untuk mempelajari patofisiologi endometriosis.
2. Riset pengobatan endometriosis akan mendapatkan manfaat berupa metode baku dan efektif untuk membuat mencit model endometriosis untuk penelitian terkait terapi endometriosis di masa depan.
3. Bagi institusi dan peneliti, diharapkan mendapatkan paten untuk pembuatan mencit model endometriosis yang menjadi wahana penelitian lebih lanjut serta genestein sebagai terapi untuk endometriosis di masa yang akan datang.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Endometriosis**2.1.1 Definisi**

Endometriosis adalah suatu keadaan dimana jaringan endometrium yang masih berfungsi, terdiri dari sel epitel, sel kelenjar dan stroma, hidup diluar cavum uteri. Kata endometriosis berasal dari kata endometrium sehingga secara klinis endometriosis berarti jaringan endometrium yang terdapat di luar kavum uteri (Dunnihoo DR., 1992).

Endometriosis merupakan salah satu kelainan ginekologi yang pada umumnya menyerang wanita usia reproduksi. Penyakit ini telah diketahui sejak tahun 1600 SM, dan pertama kali dipublikasikan secara lengkap oleh Sampson pada tahun 1921 (Sampson, 1927). Meskipun sudah diketahui sejak lama, sampai dengan saat ini masih banyak hal yang belum dapat diketahui dengan jelas, terutama mengenai patogenesisnya. "*Retrograde menstruation*" merupakan sebuah fenomena yang biasa diantara para wanita diusia subur, tetapi tidak semua dapat menyebabkan terjadinya endometriosis (D'Hooghe *et al.*, 2002; Speroff *et al.*, 2005;). Diduga kuat bahwa endometriosis merupakan sebuah proses yang kompleks yang difasilitasi oleh berbagai macam faktor, diantaranya jumlah dan kualitas dari sel sel endometrium dalam cairan peritoneum, adanya peningkatan respon pemicu dalam cairan peritoneum, dan peningkatan adhesi endometrial-peritoneal dan angiogenesis. Adanya respon imunologis selama pertumbuhan endometriosis, dapat berguna sebagai suatu petanda diagnostik (Kyama CM *et al.*, 2003).

2.1.2 Epidemiologi

Angka kejadian endometriosis sangat bervariasi. Menurut beberapa literatur berkisar antara 1-50%. Di Amerika Serikat kejadian endometriosis pada wanita usia subur sekitar 10% (Dunnihoo, 1992). Di Rumah Sakit dr. Soetomo Surabaya tahun 1987–1991 didapatkan angka kejadian endometriosis pada kasus infertilitas sebesar 23,8%, dan pada tahun 1992-1993 angka kejadiannya 37,2% (Prajitno, 1994). Kejadian berdasarkan gejala yang bersifat asimtomatik berkisar antara 2-22%, dengan gejala dismenorea 40-60%, nyeri pelvis 13%-33%, dysperiunea 12-27%, dan infertilitas 20-30% (Dunnihoo DR, 1992).

Endometriosis menjadi salah satu masalah reproduksi utama saat ini oleh karena angka kejadian penyakit ini yang cukup tinggi (Giudice L, 2010).

Endometriosis mempengaruhi 6-10% wanita usia reproduksi dari segala etnis dan kelompok sosial (Burney and Giudice, 2012). Ditemukan 1 dari 10 wanita usia reproduktif (15-49 tahun) atau sekitar 176 juta wanita di seluruh dunia terinfeksi endometriosis. Kejadian endometriosis diantara semua operasi pelvik berkisar 5-15%, dan yang menarik perhatian ditemukan pada wanita yang belum menikah dan usia muda. Umumnya endometriosis akan menyebabkan keluhan dismenorea, dispareunia, disuria, nyeri kronik abdomen, nyeri pelvik dan nyeri waktu defekasi (Giudice L, 2010; Burney and Giudice, 2012).

Dampak yang ditimbulkan adalah nyeri pelvik menahun, gangguan haid dan infertilitas (Leyland N *et al.*, 2010; Farrell and Garad, 2012). Diperkirakan sekitar 50-70% dari wanita dengan keluhan nyeri panggul kronis dan 38% wanita tidak subur atau sebanyak 90 juta wanita di seluruh dunia mengalami nyeri pelvik dan infertilitas (Farrell & Garad, 2012). Endometriosis dapat meningkatkan kejadian resiko kanker ovarium dan infertil (Leyland N *et al.*, 2010). Lebih lanjut penyakit endometriosis ini merupakan salah satu indikasi yang paling umum

untuk dilakukan operasi histerektomi sebelum usia 30 tahun di Amerika Serikat (Taylor R and Lebovic DI, 2010).

2.1.3 Etiologi

Sebagian besar ahli berpendapat bahwa penyebab endometriosis adalah multifaktorial, kompleks dan bervariasi antar individu. Terdapat beberapa teori yang mencoba menjelaskan patogenesis terjadinya endometriosis. Teori-teori tersebut adalah sebagai berikut:

Tabel 2-1. Berbagai Teori Patogenesis Terjadinya Endometriosis.

| Teori | Mekanisme |
|-------------------------------|--|
| Retrograde menstruation | Adanya aliran darah menstruasi ke dalam kavum pelvis yang mengandung sel endometrium, sehingga lesi endometrial tersebut mengadakan implantasi |
| Metaplasia | Perubahan jaringan/sel peritoneal menjadi jaringan endometrial yang disebabkan oleh karena faktor hormonal dan/atau imunologi |
| Hormon | Estrogen – menyebabkan proliferasi dari lesi endometrial. Resistensi progesteron – memediasi pengaturan proliferasi endometrial |
| Stres oksidatif dan inflamasi | Aktivasi sel imun beserta produk sel imun berupa sitokin yang menyebabkan tumbuhnya lesi endometrium |
| Disfungsi sistem imun | Menyebabkan penghambatan eliminasi debris darah menstruasi sehingga memicu implantasi dan pertumbuhan lesi endometrial |
| Supresi apoptosis | Menyebabkan kemampuan hidup sel endometrial dan menyebabkan down-regulasi jalur apoptosis |
| Genetik | Perubahan fungsi seluler sehingga meningkatkan kemampuan sel endometrial untuk bertahan terhadap sistem imun |
| Stem sel | Inisiasi deposit endometriotik oleh <i>undifferentiated cell</i> yang memiliki kemampuan natural berregenerasi |

(dikutip dari Sourial *et al*, 2014)

Ada beberapa teori yang mencoba menjelaskan mekanisme pertumbuhan endometriosis, tetapi Teori Sampson yang sampai dengan saat masih tetap dianut secara luas yaitu adanya aliran balik darah menstruasi melalui tuba dan masuk kedalam rongga peritoneal. Kesimpulan Sampson didukung oleh beberapa pengamatan (D’Hooghe TM and Hill JA, 2002).

Sampson (1927) mengemukakan bahwa adanya lesi di luar rahim terjadi karena darah haid mengalir balik melalui tuba ke dalam rongga pelvis

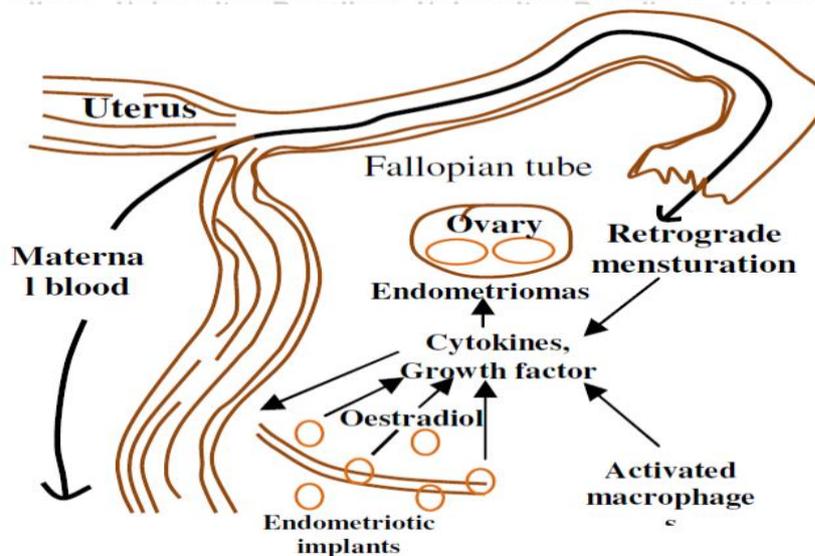
(*retrograde*). Sel-sel endometriosis yang masih hidup (*viable*) ini kemudian mengadakan implantasi di peritonium. Teori *retrograde* menstruasi, dikenal sebagai teori implantasi jaringan endometrium yang hidup dikemukakan oleh John Sampson. Teori ini menjelaskan tentang sel-sel endometrium yang dilepaskan pada saat menstruasi bergerak mundur ke tuba falopii kemudian masuk ke dalam pelvik dan tumbuh di dalam rongga pelvik (Leyland, 2010).

- Ditemukannya darah dalam cairan peritoneum pada 90 % wanita dengan tuba yang patent pada saat fase peri menstrual, dengan pemeriksaan laparaskopi.
- Sel endometrium dapat tumbuh pada kultur yang diambil dari cairan peritoneum wanita yang sedang menstruasi.
- Terdapat peningkatan kejadian endometriosis pada pasien dengan peningkatan *retrograde* menstrual.
- Tempat implantasi endometriosis umumnya tergantung dari bagian pelvis.

Terdapat tiga asumsi dalam teori *retrograde menstruation* yaitu: 1)

Terdapat darah haid berbalik melewati tuba falopii, 2) Sel-sel endometrium yang mengalami aliran balik (*reflux*) tersebut hidup dalam rongga peritoneum, 3) Sel-sel endometrium yang mengalami *refluks* tersebut dapat menempel ke peritoneum dengan melakukan invasi, implantasi dan proliferasi (Giudice, 2010).

Skema patofisiologi terjadinya endometriosis sesuai dengan Teori Sampson tampak seperti Gambar 2.1



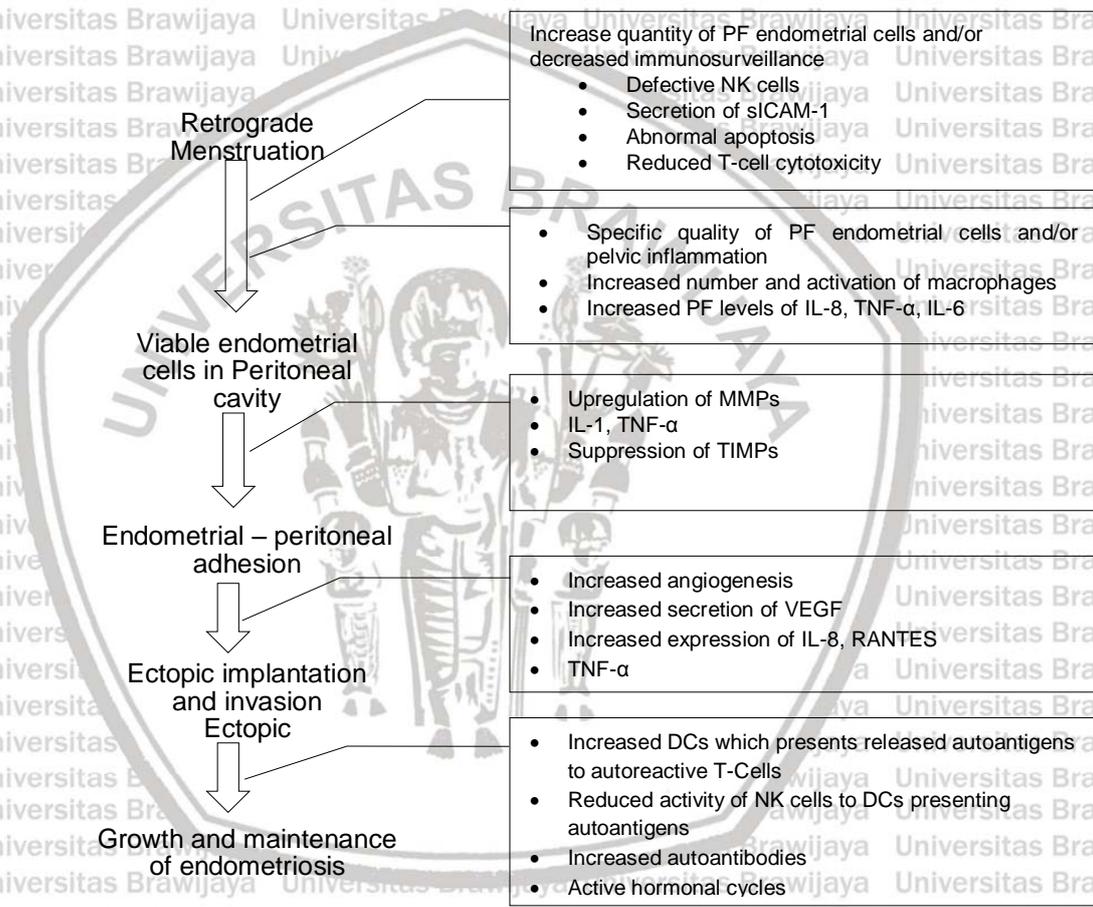
Gambar 2-1 Skema Retrograde Menstruasi

Keterangan: Sel-sel endometrium yang dilepaskan pada saat menstruasi bergerak mundur melewati tuba fallopii kemudian masuk ke dalam rongga pelvik, sel-sel endometrium tumbuh dan hidup di rongga peritoneum seperti di ovarium dengan melakukan invasi, implantasi dan proliferasi. Implantasi sel endometriosis mensekresi estradiol lokal dan sistemik. Sel-sel *reflux* yang tidak dihanurkan akan menyebabkan inflamasi melalui aktivasi makrofag. Makrofag memfasilitasi perkembangan endometriosis melalui *growth factor* dan menginduksi produksi sitokin dalam jumlah abnormal (Amberkar et al., 2010).

2.1.4 Patogenesis

Secara histologi, teori *reflux implantation* Sampson didukung oleh adanya distribusi lesi di dalam rongga abdomen, demonstrasi viabilitas fragmen endometrium yang meluruh pada kultur jaringan, tingginya prevalensi endometriosis pelvis pada gadis dengan obstruksi aliran menstruasi kongenital dan eksperimen pada hewan dimana terjadinya endometriosis diawali dengan membuat fistula utero-pelvis. Hipotesis implantasi Sampson adalah mekanisme yang dapat menjelaskan sebagian besar lesi endometriotik, namun tidak dapat menjelaskan mengapa endometriosis berkembang pada beberapa wanita, namun tidak pada sebagian besar wanita. *Retrograde menstruation* adalah fenomena universal dimana ditemukannya sel-sel endometrium viabel di dalam cairan peritoneum 76-90% wanita, suatu prevalensi yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan prevalensi endometriosis. Dimana endometriosis terjadi

hanya pada 5-10% wanita usia reproduksi. Satu dari dua mekanisme berikut dapat menjelaskan keberhasilan implantasi endometrium yang refluks pada permukaan peritoneum: defek molekular atau abnormalitas imunologis (atau keduanya). Gambar berikut ini mengilustrasikan berbagai kejadian yang menyebabkan tetap hidupnya sel endometrium dalam rongga peritoneum, perlekatan, implantasi, invasi dan progresivitas penyakit (Gavzani *et al.*, 2002; Kyama *et al.*, 2003; Bulun *et al.*, 2012).



Gambar 2-2 Gambaran Peran Sistem Imun dalam Perkembangan dan Terpeliharanya Endometriosis

Keterangan : Berbagai kejadian yang menyebabkan tetap hidupnya sel endometrium dalam rongga peritoneum, perlekatan, implantasi, invasi dan progresivitas penyakit.

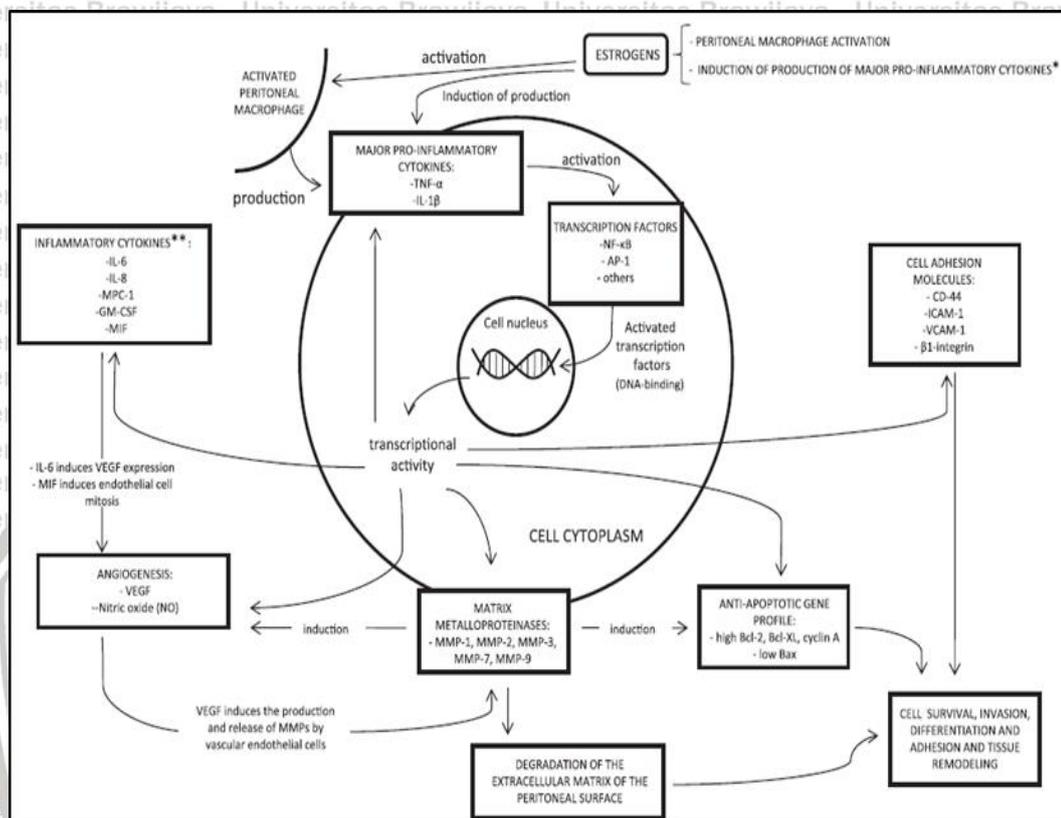
Seperti yang telah diduga sebelumnya, *immune "disposal system"* yaitu suatu sistem imun yang bertugas mengeliminasi benda-benda asing di tubuh, menghilangkan sel endometrium ektopik dan mencegah implantasi dan

perkembangannya menjadi lesi endometriotik pada wanita sehat. Proses ini mungkin difasilitasi oleh perubahan apoptosis sel endometrium. Pada wanita sehat, sel-sel endometrium yang tersebar pada lokasi ektopik mungkin diprogram untuk mati dan mudah dieliminasi oleh sistem imun. Defisiensi sistem imun yang dimediasi sel dan penurunan apoptosis sel endometrium pada akhirnya dapat mengarah pada implantasi dan bertahannya sel ektopik. Gangguan respon imun menyebabkan pemusnahan debris refluks darah menstruasi yang tidak efektif, dan mungkin menjadi faktor penyebab perkembangan penyakit ini. Bukti yang ada menunjukkan bahwa aktivitas mereka malah lebih memicu penyakit ini daripada mencegahnya (Dmowski dan Braun, 2004).

Pertumbuhan endometrium ektopik, infiltrasi oleh sel imun, peningkatan produksi sitokin proinflamasi, *growth factors*, dan faktor angiogenesis adalah seluruh gambaran respon inflamasi tampak di sekitar *endometriotic implants*. Kondisi ini kemudian menyebabkan mobilisasi fibroblast dan proliferasi jaringan ikat sebagai mekanisme homeostatik untuk mengisolasi dan menyembuhkan lokasi injuri. Intensitas reaksi ini bervariasi, tergantung pada derajat dan karakter aktivasi imun. Tidak ada keraguan lagi bahwa sistem imun memang dimobilisasi dan didapatkan suatu respon imun. Kemunculan mereka memainkan peran yang penting dalam patogenesis penyakit ini. Namun masih belum jelas, apakah abnormalitas imunologis ini merupakan penyebab atau konsekuensi dari endometriosis (Dmowski dan Braun, 2004).

Pertumbuhan endometrium ektopik akan merangsang produksi makrofag yang berlebihan, produk sitokin proinflamasi dan faktor pertumbuhan dalam cairan peritoneal, sehingga menyebabkan pertumbuhan yang lebih lanjut. Sitokin pro-inflamasi mayor yaitu TNF- α dan IL-1 β dilepaskan makrofag peritoneal dan sel endometriosis yang selanjutnya mengaktivasi faktor transkripsi seperti nuclear factor-kappa B (NF-kB) dan activator protein 1 (AP-1). Faktor transkripsi

yang aktif mengikat DNA sel endometriosis dan merangsang aktivitas transkripsi gen selanjutnya seperti tampak pada Gambar 2.3 (Bukulmez, O *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2012).



Gambar 2-3 Mekanisme patofisiologi endometriosis

Gambaran jalur molekuler yang paling relevan pada sel epitel dan stroma endometrium ektopik yang terlibat dalam patofisiologi endometriosis. *) Sitokin utama pro inflamasi diproduksi oleh makrofag peritoneal dan sel endometriosis. **) Perubahan imunitas seluler peritoneal yang tampak pada endometriosis berhubungan dengan ekspresi sitokin inflamasi. Estrogen memberi pengaruh pada aktivasi dari makrofag di peritoneal dan menginduksi produksi sitokin pro inflamasi mayor yaitu *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α) dan *Interleukin-1 Beta* (IL-1 β) dilepaskan oleh makrofag peritoneal dan sel endometriosis yang selanjutnya mengaktifasi factor transkripsi seperti *Nuclear Factor-kappa B* (NF- κ B) dan *Activator Protein-1* (AP-1) dan yang lainnya. Faktor transkripsi yang telah aktif akan mengikat dan berinteraksi dengan rangkaian *Deoxy Ribonucleic Acide* (DNA) spesifik elemen respon estrogen sel endometriosis di dalam promotor gen reaktif, kemudian merangsang aktivitas transkripsi gen untuk menyandi produk-produk berikut ini yaitu: a) Sitokin lain seperti IL-6, IL-8, *macrophage migration inhibitory factor* (MIF), *monocyte chemoattractant protein* (MCP-1), *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), b) *Nitric oxide* (NO) dan VEGF yang merupakan faktor pro angiogenik dominan pada endometriosis, c) *Matrix*

metalloproteinases (MMPs) MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, dan MMP-9, yang terlibat dalam degradasi dan remodeling matriks ekstraseluler permukaan peritoneal, d) Merangsang peningkatan profil gen antiapoptosis seperti B cell Lymphoma-2 (Bcl-2), BCL-XL (Extra Large), Cycin-A dan penurunan kadar Bcl-2 Associated X Protein (Bax) sebagai proapoptosis. Molekul adhesi yaitu CD-44, *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) dan *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1). Tingginya protein apoptosis pada kasus endometriosis menyebabkan sel memiliki kemampuan untuk melakukan invasi, adhesi dan diferensiasi, remodeling tissue dan sel survival sehingga terjadilah pembentukan jaringan endometriosis. (Disadur dari Soares *et al.*, 2012)

2.2 Proliferasi

2.2.1 Definisi

Proliferasi sel adalah proses dimana sel-sel memperbanyak diri dengan tumbuh dan kemudian membagi diri menjadi dua salinan yang sama. Faktor pertumbuhan (*growth factor*) menggunakan berbagai jalur sinyal pertumbuhan untuk mengaktifkan sel-sel dalam memasuki siklus sel. *Growth factor* harus melakukan 2 hal dalam mengaktifkan proliferasi sel, diantaranya yaitu mendorong sel untuk memasuki siklus sel dan mengontrol pertumbuhan sel dengan meningkatkan masa sel melalui peningkatan makromolekul biosintesis (Foley *et al.*, 1993).

2.2.2 Proliferasi Sel Normal

Pada jaringan normal, proliferasi sel mengarah kepada penambahan jaringan. Dimana jumlah sel tidak hanya tergantung kepada proliferasi sel tetapi juga oleh kematian sel. Kematian sel terprogram (apoptosis) adalah proses dikeluarkannya sel-sel yang rusak. Keseimbangan antara produksi sel baru dan kematian sel itulah yang mempertahankan sel yang tepat pada jaringan (homeostasis) (Khan *et al.*, 2012).

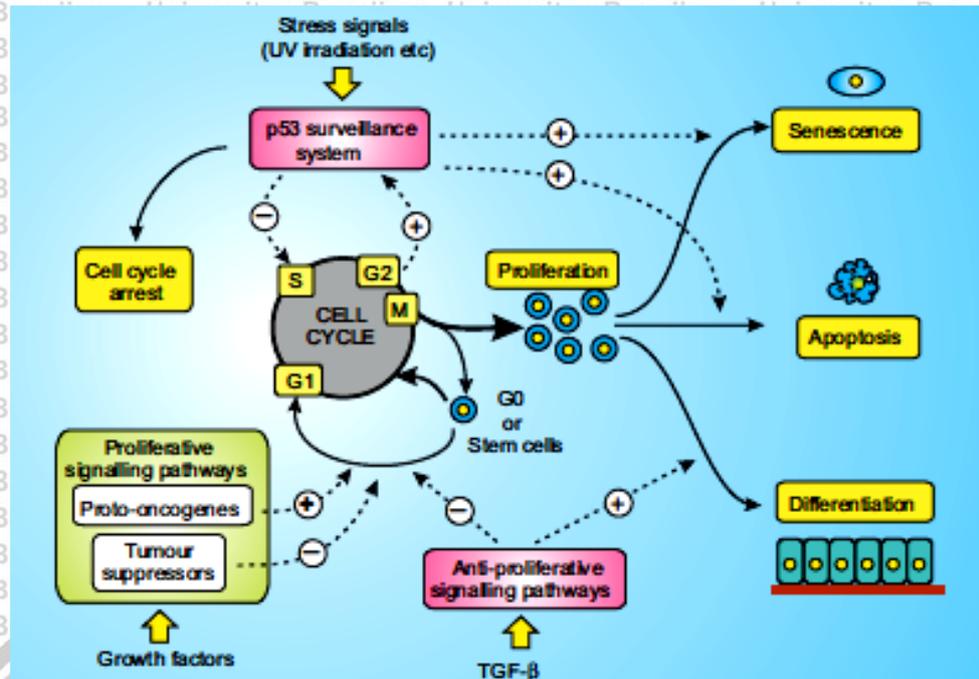
Pertumbuhan, perbanyakannya dan fungsi dari sel-sel normal diatur sesuai dengan kebutuhan hidup suatu individu (Suryo, 2011). Keberhasilan proliferasi sel dalam satu siklus diperlukan 2 hal penting. **Pertama:** sel yang akan

membelah haruslah cukup tumbuhnya agar besarnya memadai untuk pembelahan serta dapat menghasilkan cukup komponen sel. Komponen tersebut misalnya DNA, RNA, protein, organela, membran plasma, garam dan cairan.

Kedua: sel tersebut haruslah memiliki sarana untuk mengkoordinasikan langkah-langkah dalam siklus proliferasi sel dengan produksi bahan-bahan sel (Subowo, 2010).

2.2.2.1 SiklusSel

Sel-sel memiliki dua jenis proses proliferasi dan siklus sel yang cukup berbeda, yakni 1). Proses fertilisasi yang merupakan suatu proses yang sangat unik dan, 2). Proses proliferasi yang diaktifkan melalui *growth factors* (faktor-faktor pertumbuhan). Proses siklus sel yang kedua terjadi pada saat sel pada fase G₀ akan distimulasi oleh growth factor untuk berproliferasi. Terdapat suatu proses yang sangat kompleks yang melibatkan interaksi berbagai jalur signaling sehingga sel dapat tumbuh dan membelah. Growth factor akan bekerja pada fase G₁ melalui *growth factor signaling/cell cycle interface system* yang selanjutnya melibatkan *cell cycle signaling system* akan mengambil alih dan melanjutkan urutan proses pada pembelahan sel sampai dengan terbentuk sel-sel baru. Jika terdapat suatu defek pada siklus sel maka akan menyebabkan terjadinya berbagai macam kelainan seperti tampak pada Gambar 2.4 (Berridge, 2014).



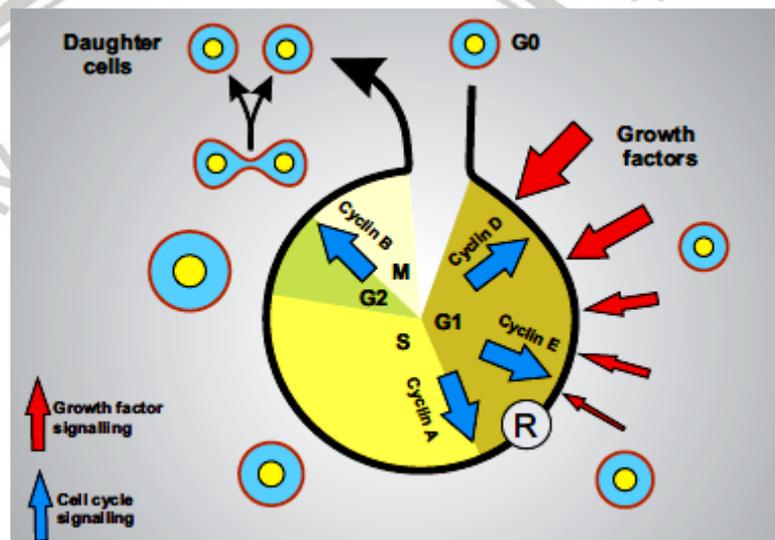
Gambar 2-4 Jaringan Sistem Signaling Siklus Sel yang Mengendalikan Proliferasi sel dan Berbagai Proses Seluler Lainnya.

Keterangan: Siklus sel memusatkan sejumlah sistem signaling seluler mayor yang tidak hanya mengendalikan proliferasi, namun juga menentukan proses selanjutnya dari sel-sel yang baru dengan cara mengontrol proses diferensiasi, apoptosis atau penuaan (*senescence*). Beberapa dari komponen signaling mayor telah diketahui mekanisme kerjanya seperti terlihat pada skema tersebut (Berridge, 2012).

Proses yang terjadi saat sebuah sel distimulasi untuk tumbuh dan membelah adalah terjadinya siklus sel. Sel yang berada pada keadaan istirahat (tidak ada pertumbuhan/*zero growth/Go*), harus distimulasi oleh *growth factor* dahulu untuk memasuki suatu siklus sel, yang dimulai dengan periode pertumbuhan pertama (G1) dimana fase ini merupakan periode penyiapan sintesis DNA (S). Pada akhir G1, terdapat titik pembatasan (*restriction/R*), yang merupakan titik point dimana sel menjadi irreversibel untuk kembali pada fase istirahat lagi. Pengontrolan proses yang semula dikendalikan oleh faktor pertumbuhan selanjutnya akan diambil alih oleh sistem signaling siklus sel (*cell cycle signaling sistem*) itu sendiri secara interna. Kemudian selama proses fase

S, akhir G dan mitosis (saat sel membelah) akan dikendalikan oleh sistem signaling siklus sel (Berridge, 2014).

Saat pembelahan sel telah lengkap, pengontrolan akan kembali pada jalur signaling faktor pertumbuhan. Bagaimana pengendalian proses proliferasi oleh *growth factor* tampak pada Gambar 3, terutama selama proses G1 sampai dengan R. Pada saat fase R telah tercapai, sel akan bersifat independen terhadap *growth factors*, sehingga progresi proses proliferasi akan dikendalikan oleh sistem kontrol siklus sel itu sendiri (panah warna biru pada Gambar 2.5 (Berridge, 2014).



Gambar 2-5 Peranan Growth Factor dan Cell Cycle Signaling System pada Berbagai Fase Siklus Sel.

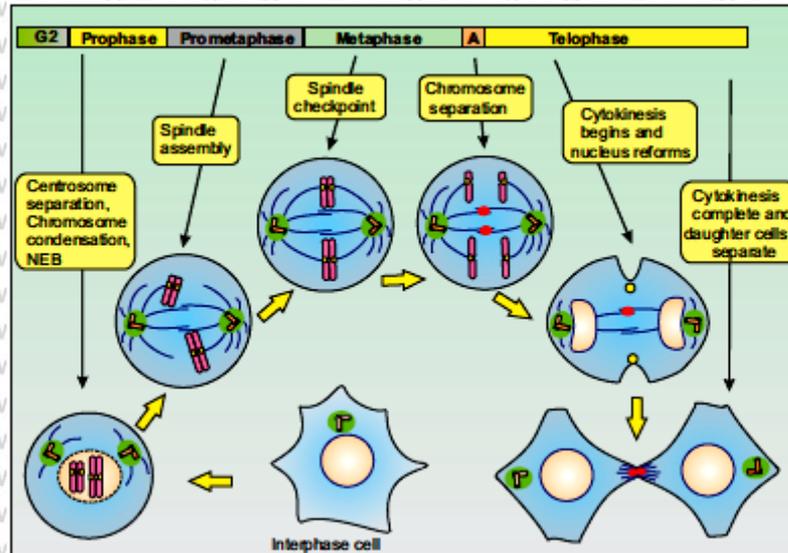
Keterangan: *Growth factor signalling* (tanda panah merah) beroperasi selama fase G1 sampai dengan sel mencapai titik restriksi (*point restriction/R*), selanjutnya kendali akan dialihkan pada *cell cycle signalling system* internal (panah biru). Protein cyclin yang berbeda, akan memiliki pengaruh signaling yang berbeda serta pada fase yang berbeda pula pada siklus sel (Berridge, 2014).

Berdasarkan pengamatan yang hati-hati serta seksama pada sel yang sedang tumbuh dan membelah, terungkap bahwa proliferasi sel diatur melalui setiap peristiwa, langkah-langkah, serta urutan yang tepat dan teratur. Terdapat dua peristiwa penting yang mudah dibedakan selama siklus sel. Peristiwa pertama yaitu replikasi atau pembentukan molekul DNA dalam fase S (sintesis)

dan disusul peristiwa kedua yang merupakan pemisah komponen-komponen sel dalam jumlah yang sama banyak sehingga dapat dimiliki oleh kedua anak sel sebagai hasil pembelahan sel. Peristiwa kedua ini berlangsung pada fase mitosis (M). Fase M hanya berlangsung selama 1-2 jam, sedangkan fase S membutuhkan waktu beberapa jam (Subowo, 2010).

Pada fase M dan S ini terdapat peristiwa antara yang masing-masing disebut fase G_1 dan fase G_2 . Pada Fase ini berlangsung sintesis bahan-bahan baku yang diperlukan dalam fase berikutnya. Pada fase G_1 sel-sel tersebut menimbun enzim-enzim yang diperlukan untuk duplikasi genom dalam DNA nantinya, serta komponen lain yang diperlukan yang nantinya diberikan pada anak sel dengan sumber yang sesuai. Fase S baru dapat berlangsung setelah melalui pengontrolan sebelumnya. Pada pengontrolan tersebut ditentukan apakah bahan-bahan untuk keperluan duplikasi molekul DNA sudah cukup. Pada akhir fase S, setiap batang kromosom dalam sel harus telah memiliki dua anak kromosom atau kromatid. Selama fase G_2 setelah fase S dilampaui sebelum masuk fase M, sel bersangkutan menyediakan sendiri keperluan untuk mitosis dan sekaligus diperiksa apakah DNA telah disintesis secara sempurna. Dengan demikian sel-sel dalam siklus pembelahan secara tetap memonitor apa yang telah diselesaikan dalam tiap langkah sebelum maju ke peristiwa berikutnya (Subowo, 2010).

Pada saat kromosom telah berduplikasi, sel akan memasuki periode kedua pertumbuhan (growth 2/ G_2), dimana pada saat ini akan dilakukan persiapan untuk membelah menjadi dua sel baru (*daughter cells*) selama periode mitosis (M). Fase M dipisah dalam dua tahapan, yaitu dimulai dengan tahapan profase melalui profase, metafase, anafase dan tahapan kedua melalui proses sitokin dimana sel akan membelah menjadi dua sel yang sama seperti tampak pada Gambar 2.6 (Berridge, 2014).



Gambar 2-6 Ringkasan Perubahan Morfologi yang Terjadi pada Fase Mitotik.

Keterangan: akhir dari siklus sel dimulai saat sel meninggalkan fase G2 dan memasuki fase mitotik (M). Proses yang terjadi pada fase mitotik adalah perubahan morfologi dimana sel akan mengalami pembelahan. Begitu sel melalui batas antara G2-M, sel akan mulai membelah menjadi dua sel yang sama (Berridge, 2014). NEB : *nuclear envelope breakdown*.

2.2.2.2 Protein dan Molekul yang Berperan pada Siklus Sel

Komponen utama siklus sel adalah sekelompok protein yang termasuk dalam famili *cyclin* dan cyclin-dependent kinases (CDKs). Berbagai kombinasi kedua komponen tersebut akan meregulasi siklus sel sehingga menjadi teratur.

Disamping itu, terdapat beberapa inhibitor CDKs (Cip/Kip dan famili dari p16) dan sejumlah molekul lain yang juga meregulasi jalur pada bagian hilir seperti pocket protein (Rb, p107, p130), faktor-faktor transkripsi seperti E2F dan komponen mitotik seperti *Polo-like kinases* (Plks), *checkpoint kinases*, *regulatory phosphatases*, *centrosome* dan *spindle components*, *chromosome separation proteins* dan *spindle midzone complex*. Beberapa elemen-elemen pengontrol siklus sel tersebut, bekerja pada fase G1 awal dan mempresentasikan target pada jalur signaling proliferasi yang merupakan bagian dari jaringan siklus sel (Schafer, 1998).

Cyclin-dependent kinases (CDKs) bertanggung jawab terhadap regulasi *cyclin*. Aktifitas CDKs tergantung pada hubungannya dengan *cyclin* untuk

membentuk suatu kompleks cyclin-CDK yang akan mengontrol progresi siklus sel.

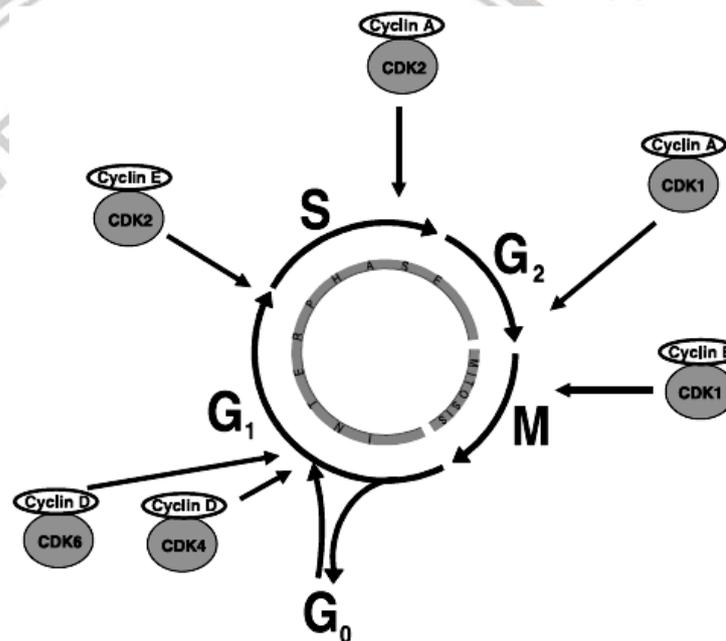
Untuk mengaktifasi CDKs, beberapa cyclin seperti cyclin B, juga turut

menentukan lokasi seluler kompleks cyclin-CDK. Komplek cyclin-CDK memiliki

fungsi ganda pada signaling siklus sel (seperti tampak pada Gambar 2.7); yaitu

(Schafer KA, 1998):

- Cyclin A mengontrol sintesis DNA.
- Cyclin B/cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) mengontrol mitosis.
- Cyclin D menontrol progresi G₁.
- Cyclin E mengontrol progresi G₁ dan sintesis DNA.



Gambar 2-7 Gambar Skematik Progresi Siklus sel Normal.

Keterangan: Tampak pada gambar bahwa progresi siklus sel akan diregulasi oleh kompleks cyclin-CDK dimana *cyclin A* mengontrol sintesis DNA, *cyclin B/cyclin-dependent kinase 1* (CDK1) mengontrol mitosis, *cyclin D* menontrol progresi G₁, *cyclin E* mengontrol progresi G₁ dan sintesis DNA (Schafer, 1998).

2.2.2.3 Regulasi Cyclin-Dependent Kinase (CDK)

Transisi dari satu fase siklus sel menuju fase berikutnya berlangsung secara tertib dan teratur, serta diregulasi oleh berbagai protein seluler. Protein regulator yang memegang peranan penting adalah *cyclin-dependent kinases*

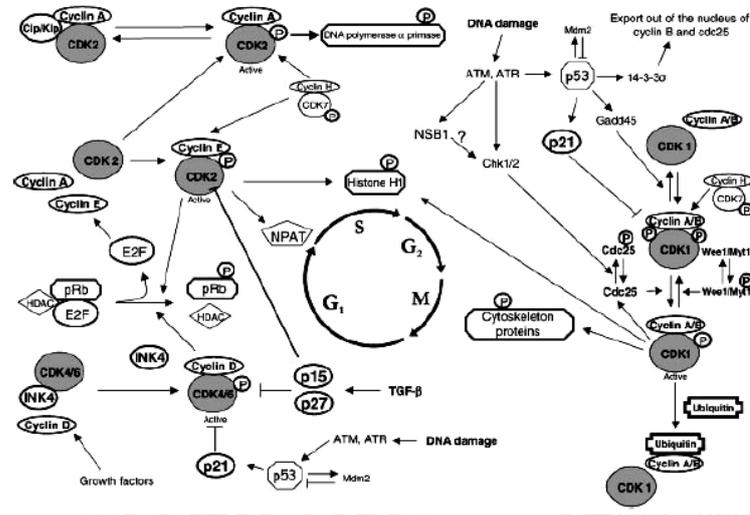
(CDK), yaitu salah satu kelompok protein serin/threonine protein kinase yang diaktifkan pada beberapa titik pada siklus sel. Sampai dengan saat ini, terdapat 9 jenis CDK yang telah dapat diidentifikasi, dan 5 diantaranya adalah aktif pada siklus sel yaitu pada fase G1 (CDK4, CDK6, dan CDK2), fase S (CDK2), fase G2 dan M (CDK1). Saat diaktifasi, CDK akan menginduksi proses pada bagian hilir dengan cara melakukan fosforilasi beberapa protein (Morgan 2007; Pines 1995).

CDK7 bekerja saat dikombinasikan dengan cyclin H membentuk CDK activating kinase (CAK). CDK lainnya sampai dengan saat ini masih belum diketahui efeknya pada progresi siklus sel normal (Rickert *et al.* 1996). Kadar protein CDK akan stabil selama siklus sel, sebaliknya dengan protein pengaktifannya yaitu cyclin. Kadar protein cyclin akan meningkat dan menurun selama siklus sel dan secara periodik akan mengaktifasi CDK (Evans *et al.* 1983; Pines 1995). Cyclin yang berbeda akan dibutuhkan pada fase-fase yang berbeda pula selama siklus sel.

Tiga jenis cyclin D (cyclin D1, cyclin D2 dan cyclin D3) akan berikatan dengan CDK6. Komplek CDK-cyclin D penting pada saat akan memasuki fase G1 (Sherr 1994). Tidak seperti cyclin yang lainnya, cyclin D tidak tereksresi secara periodik, tetapi disintesis saat ada stimulasi *growth factor*. Cyclin G2 lainnya adalah cyclin E yang berhubungan dengan CDK2, untuk meregulasi progresi dari G1 menuju fase S (Nisolle *et al.*, 1997).

Cyclin A berikatan dengan CDK2 dan kompleks tersebut dibutuhkan selama fase S (Gambar 2.8) (Wingfield *et al.*, 1995). Pada fase G2 akhir dan fase M awal, kompleks cyclin A dengan CDK1 akan menjadi promotor untuk memasuki fase M. Mitosis selanjutnya diregulasi oleh cyclin B yang membentuk kompleks dengan CDK1 (Wingfield *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2007). Sejauh ini telah diidentifikasi cyclin sebanyak 16, namun sama seperti halnya CDK, tidak

semua cyclin tersebut terkait dengan proses siklus sel (Wingfield *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2007).



Gambar 2-8 Gambar Skematik Beberapa jalur Penting pada Siklus Sel. (Kim *et al.*, 2007)

Keterangan: →: activation;
⊣: inhibisi

2.2.3 Proliferasi pada Sel Endometriosis

Meskipun endometriosis merupakan penyakit tumor jinak, namun karakteristik pada sel endometriosis memiliki kemiripan dengan keganasan seperti sifatnya yang invasive, memiliki kecenderungan untuk bermetastasis dan kambuh (Baldi *et al.*, 2008; Agarwal & Subramanian, 2010; Leyland *et al.*, 2010).

Proliferasi sel pada endometriosis telah dipelajari oleh berbagai penelitian, namun belum banyak diungkap mengenai mekanismenya secara pasti.

Kenaikan sensitivitas endometriosis terhadap proliferasi sel dapat menjadi salah satu kemungkinan patogenesis penyakit ini. Sebuah penelitian menunjukkan adanya peningkatan signifikan proliferasi sel pada penderita endometriosis dibandingkan dengan bukan penderita endometriosis (Park & Surh, 2004).

Jaringan endometriosis mensekresikan estradiol (E2) lokal yang bersifat estrogenik. Estradiol yang dihasilkan oleh jaringan endometriosis berikatan dengan RE- α dan RE- β , membentuk ikatan kompleks estrogen dan reseptor estrogen. Ikatan kompleks estrogen dan reseptor estrogen berikatan dengan bagian spesifik DNA yang disebut promotor gen pada ERE. Proses transkripsi tidak hanya terjadi melalui ikatan kompleks estrogen dan reseptor estrogen pada ERE tetapi juga melalui ikatan dengan protein-protein yang lain yaitu protein *co-regulator*, dalam hal ini protein *co-regulator* yang diaktifkan adalah *co-activator* sehingga terjadilah proses transkripsi, mRNA dan juga sintesis protein.

2.2.4 Berbagai Studi Proliferasi Endometriosis

Etiopatogenesis endometriosis sampai dengan saat masih belum dapat ditentukan. Endometriosis memiliki sifat yang menyerupai proses tumor ganas dimana lesi endometriosis bersifat kronis, dengan sifat fenotip mudah rekuren, proliferasif, infiltratif dan invasif (Horn *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009). Oleh karena sifatnya tersebut, maka meningkatkan ketertarikan para peneliti untuk mengamati proses proliferasi pada penyakit ini. Salah satunya adalah dengan pemeriksaan Ki 67 antibodi monoklonal. Ki 67 merupakan antigen yang dapat menggambarkan sifat proliferasi suatu sel. Semakin tinggi ekspresi antigenik, maka semakin tinggi pula Ki 67, yang berarti bahwa suatu sel memiliki proliferasi yang bersifat agresif dan metastasis (Brown and Gatter, 1990).

Li *et al.* (1993), melakukan suatu studi dengan membandingkan antara proliferasi indeks pada sel endometrial eutopik dan ektopik. Proliferasi indeks pada sel endometriotik secara stabil lebih tinggi dibandingkan endometrium normal terlepas dari status hormonal selama siklus menstruasi dan postmenopause. Proliferasi indeks pada endometrial ektopik postmenopause tinggi dibandingkan dengan proliferasi indeks pada endometrium atropik. Hal ini

mendukung hipotesa bahwa dengan stimulus hormonal, proliferasi pada lesi implantasi endometrial ektopik dikendalikan oleh faktor-faktor lain. Hal tersebut juga didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Toki *et al.* (1996), Nisolle *et al.*, (1997), dan Matsumoto *et al.*, (1999). Sedangkan Park *et al.*, (2009) menemukan adanya aktivitas proliferasi yang tinggi pada sel-sel endometrial pasien dengan endometriosis dibandingkan dengan pasien tanpa endometriosis.

Sebaliknya, Jones *et al* mengamati adanya proliferasi indeks yang rendah selama siklus menstruasi dari sel-sel endometrial ektopik yang hasilnya sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Suzuki (2010).

Kahyaoglu *et al.*, (2012) menemukan bahwa dengan peningkatan stadium penyakit, maka proliferasi sel endometriotik juga meningkat. Peningkatan aktivitas proliferasi seiring dengan peningkatan keparahan penyakit ditunjukkan dengan peningkatan indeks Ki 67. Saat sel-sel endometriotik memiliki proliferasi yang meningkat, maka akan memiliki sifat autonom sebagai sel tumor. Sel-sel tersebut akan menyerang jaringan disekitarnya, dan pada saat menyentuh jaringan padat maka akan terjadi adesi dan secara anatomi akan mengalami distorsi. Kasus-kasus endometriosis postmenopausal dan peningkatan Bcl-2 (gen yang mensupresi apoptosis), dan Ki 67 dapat membuktikan adanya autonomi (Toki *et al.*, 1996). Meskipun endometriosis dianggap memiliki sifat hormon dependen, namun endometriosis memiliki karakteristik tumor seperti tingginya angka invasi, bisa bersifat autonomi, peningkatan proliferasi serta dapat menyebabkan kerusakan organ target oleh karena progresi penyakit (Kahyaoglu *et al.*, (2012).

Pada beberapa studi yang dilakukan pada wanita dengan atau tanpa endometriosis didapatkan adanya kadar Ki 67 yang ekuivalen (Jurgensen *et al.*, 1996; Mettler *et al.*, 1997). Namun, terdapat tiga studi lainnya yang menemukan adanya peningkatan Ki 67 pada pemeriksaan imunohistokimia pada wanita-

wanita dengan endometriosis (Johnson *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2009). Aktifitas telomerase juga telah dipelajari oleh Kim *et al.*, (2007), dengan hasil bahwa tidak didapatkan berbeda pada hampir keseluruhan wanita dengan endometriosis.

Sedangkan studi terakhir menunjukkan adanya aktifitas telomerase yang meningkat pada fase sekretori (Hapangama *et al.*, 2008, 2009). Sedangkan penelitian lanjutannya menyebutkan adanya pemanjangan telomerase yang meningkat pada wanita dengan endometriosis selama siklus sel (Hapangama *et al.*, 2008).

Pada pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan prolifering cell nuclear antigen (PCNA) untuk menilai proliferasi sel endometrium wanita dengan endometriosis telah dilakukan, dan menemukan bahwa terdapat peningkatan jumlah proliferasi sel pada endotelium, stroma dan kelenjar, serta epitelium luminal dari wanita dengan endometriosis (Wingfield *et al.*, 1995).

Hapangama *et al.* (2009) melakukan suatu studi lain terhadap marker proliferasi sel pada endometrium. Dia menemukan bahwa terdapat peningkatan nucleolin dan PCNA pada biopsi wanita endometriosis pada fase sekretori.

Sebaliknya, kadar gH2AX (marker terhadap kerusakan DNA), tampaknya menurun selama fase sekretori. Penelitian peningkatan pewarnaan PCNA juga ditemukan oleh Khan *et al.*, (2003), tetapi hasil tersebut tidak sesuai dengan hasil yang dilakukan oleh Braun *et al.*, (2007).

Kadar Pak-1 (p21 activated kinase-1) yang merupakan protein esensial pada kemampuan hidup sel yang juga memiliki peranan pada beberapa jalur signaling, tampaknya juga meningkat pada wanita dengan endometriosis, terutama pada fase mid-sekretori (Kim *et al.*, 2009). Phosphorylated ERK $\frac{1}{2}$ (upregulator penting terhadap cyclin D1 dan setelah melewati fase G1) juga meningkat pada stroma dan epitelium selama fase sekretori awal dan fase proliferasi awal (Murk *et al.*, 2008). Studi kedua menunjukkan hal yang serupa

yakni adanya peningkatan, namun selama fase sekretori awal pada jenis sel (Velarde *et al.*, 2009).

Kadar c-myc (yang terlibat sebagai promotor pertumbuhan dan proliferasi sel) meningkat pada endometriosis selama fase proliferasi (Johnson *et al.*, 2005).

Kadar c-fos juga meningkat selama siklus sel (Pan *et al.*, 2008). Namun begitu, terdapat studi lainnya tidak mendapatkan hasil yang sama dengan penelitian tersebut (Morsch *et al.*, 2009).

Survivin merupakan sebuah protein yang dapat meregulasi apoptosis dan proliferasi sel. Kadar protein ini pada awalnya tampak tidak ada perbedaan antara wanita dengan endometriosis atau tanpa endometriosis (Fujino *et al.*, 2006). Namun begitu, terdapat studi lain yang mengungkapkan bahwa terdapat peningkatan proliferasi pada endometrium wanita dengan endometriosis (Zhang *et al.*, 2009). Ekspresi p27Kip1 (protein yang terlibat pada regulasi cyclin, serta mencegah progresi fase G1 menuju S) juga ditemukan mengalami down-regulasi pada endometrium wanita dengan endometriosis (Schor *et al.*, 2009).

2.2.5 Siklus Sel pada Toksikologi

Memahami dasar-dasar siklus sel merupakan hal yang sangat penting pada toksikologi. Beberapa toksin/obat mempengaruhi siklus sel misalnya seperti pada penggunaan kemoterapi kanker. Oleh karena agen-agen tersebut memiliki kerja yang bervariasi dan seringkali berlainan titik kerjanya pada siklus sel, maka mempelajari siklus sel sangat penting untuk mengetahui mekanisme kerja suatu agen. Sehingga siklus sel dapat digunakan untuk mengeksplorasi mekanisme kerja berbagai toksin dan obat. Sebagai contoh, misalkan sebuah obat menginduksi penghentian siklus pada fase S, maka dapat dikatakan bahwa obat tersebut memiliki efek menghambat sintesis DNA (Schafer, 1998).

Tabel 2-2 Marker Siklus Sel

| Marker | Teknik | Informasi yang Diperoleh | Kelebihan | Kekurangan |
|-------------|--------------|---|--|---|
| BrdU | FCM, IHC | Kinetik siklus sel, fraksi fase S | Sangat sensitif jika mendeteksi dengan MAb | Tidak dapat digunakan pada studi retrospektif |
| H-thymidine | AR | Kinetik siklus sel, fraksi fase S | Sangat sensitif | Radioaktif, tidak dapat digunakan pada studi retrospektif |
| Ploidy | FCM | Kinetik siklus sel, fraksi fase S, <i>cell cycle arrest</i> | Sangat tepat dan akurat, Very precise and accurate, mudah diulang, mudah dikombinasikan dengan deteksi yang menggunakan marker lain | Tidak dapat membedakan fase G2 dan M, terjadi overlap pada fase siklus sel |
| Ki-67 | FCM, IHC | Indeks proliferasi (<i>Proliferative index</i>) | Tereksprei pada semua sel yang mengalami siklus sel | Antigen yang sangat labil, tidak diketahui fungsinya |
| PCNA | FCM, IHC | Indeks proliferasi (<i>Proliferative index</i>), <i>cell cycle distribution</i> (IHC) | Dapat membedakan berbagai fase siklus sel, antigen yang stabil | Diinduksi oleh agen perusak DNA, memiliki half-life yang panjang sehingga dapat terjadi overestimasi fraksi proliferasi |
| Cyclin | FCM, IHC, WB | <i>Proliferative index</i> (IHC), indikator prognostik yang potensial (<i>cyclin D</i>) | Dapat mendeteksi sel-sel pada fase spesifik tergantung pada cyclin yang digunakan, kemungkinan dapat membagi fase siklus sel jika digunakan dengan marker lain (FCM) | Dapat berubah pada sel neoplasma atau sel yang berubah, membutuhkan sinkronisasi sel (WB) |

Keterangan: Berbagai marker yang digunakan untuk mempelajari siklus sel. AR: autoradiography, BrdU: bromodeoxyuridine, FCM: flow cytometry, IHC: immunohistochemistry, Mab: monoclonal antibody, WB: western blot. (Dikutip dari Schafer, 1998).

Berbagai macam marker telah banyak digunakan untuk menentukan status siklus sel, yaitu diantaranya DNA ploidy, bromodeoxy-uridine (BrdU) incorporation, tritiated thymidine (³H-thymidine) incorporation, ekspresi Ki-67, ekspresi PCNA, ekspresi cyclin, ekspresi CDK, dan status CDK-fosforilasi. Penggunaan marker-marker tersebut dapat bervariasi mulai dari pemeriksaan sederhana seperti pemeriksaan proporsi relatif sel pada sebuah populasi pada siklus sel, sampai dengan pemeriksaan yang rumit seperti pinpointing lokasi sel yang diberikan pada suatu siklus atau menentukan kinetik siklus sel. Tabel diatas menunjukkan berbagai marker dan teknik yang digunakan untuk mengukur perubahan siklus sel (Schafer, 1998). Pada makalah ini akan dibahas salah satu marker siklus sel yaitu PCNA.

2.2.6 PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*)

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) merupakan marker proliferasi sel saat siklus sel berada pada fase G1 awal dan fase S. Pemeriksaan imunohistokimia PCNA telah banyak digunakan pada penelitian-penelitian dasar dan telah banyak dipergunakan sebagai alat prognostik pada patologi kasus bedah (Kato *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2009), serta memiliki korelasi yang baik dengan ekspresi KI-67 (Ben Izhak *et al.*, 2002).

Proliferating cell nuclear antigen merupakan sebuah protein tambahan DNA polimerase delta dengan berat molekul 36.000 kD, yang merupakan enzim penting untuk replikasi DNA (Bravo *et al.*, 1987). Sintesis protein ini dimulai pada fase G1 dan puncaknya saat fase S. Penelitian menunjukkan bahwa PCNA merupakan sebuah protein yang sangat stabil yang ditemukan di berbagai jaringan. Pemeriksaan pengukuran replikasi sel dengan menggunakan imunohistokimia (IRC) telah menunjukkan bahwa PCNA terdapat pada sel normal dan mentransformasikan proliferasi.

Akhir-akhir ini, PCNA telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi replikasi sel. Fungsi PCNA sebagai faktor prosesivitas terhadap polimerase dan merupakan faktor yang penting terhadap replikasi DNA. Beberapa penelitian pada binatang membandingkan deteksi PCNA dengan analisis kuantitative thymidine dengan penanda tritium (Foley *et al.* 1993, Li 1994). Hasilnya menunjukkan bahwa PCNA berperan sebagai marker endogenus terhadap proliferasi sel. Disamping memiliki peran dalam replikasi DNA, PCNA juga terlibat dalam perbaikan DNA yang rusak. Hal ini terbukti dengan adanya overekspresi PCNA pada DNA yang tidak disertai dengan proliferasi sel pada sel yang terpapar radiasi sehingga mengalami kerusakan DNA (Nichols & Sancar 1992).

PCNA juga terekspresi selama regresi jaringan, misalnya pada korpus luteum selama luteolisis struktural, kelenjar prostat setelah dilakukan kastrasi dan

apoptosis neural setelah adanya stimulasi dopamin. Lebih jauh lagi, studi terkini menunjukkan bahwa PCNA dapat bertindak sebagai docking site yang berinteraksi dengan beberapa protein yang terlibat dalam regulasi siklus sel dan perbaikan DNA (DNA repair). Dengan demikian, adanya interaksi antara PCNA dengan berbagai protein lain yang memiliki berbagai aktivitas selular menunjukkan bahwa PCNA memiliki peranan multifungsional dalam proses replikasi DNA (Foley *et al.*, 1993).

Pemeriksaan imunohistokimia mampu mendeteksi antigen nuklear seperti PCNA yang akan terekspresi pada sel yang sedang berproliferasi selama siklus sel, sehingga mudah mempelajari proliferasi sel. Jumlah sel yang mengekspresikan aktivitas imunoreaktif PCNA per 100 sel dapat dilakukan menggunakan mikroskop cahaya standart yang dilakukan oleh 2 orang pemeriksa independen. Kemudian dihitung jumlah total sel epitelial dalam 10 lapang pandang yang representative. Gambaran pewarnaan nukleus dianggap sebagai hasil yang positif (Turner & Wass, 1999).

2.3 Apoptosis

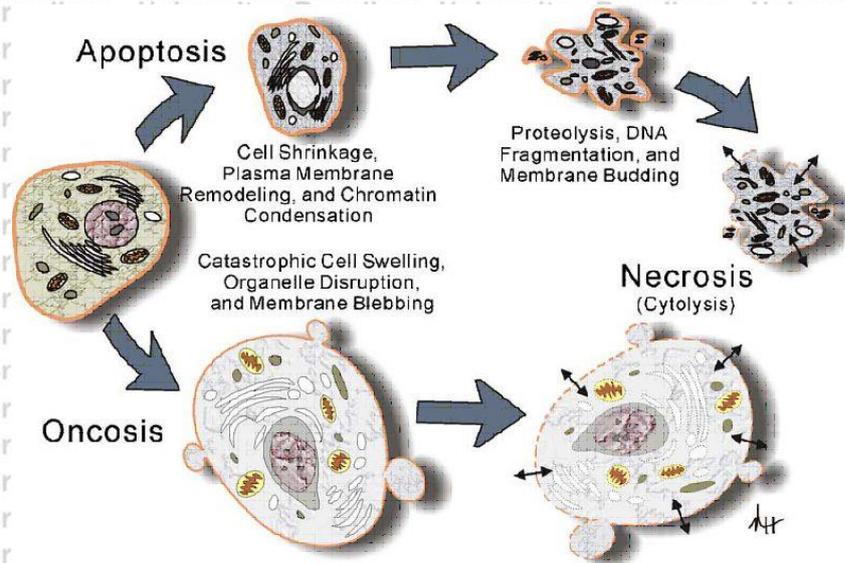
2.3.1 Definisi

Apoptosis berasal dari bahasa Yunani yang berarti "gugurnya helai mahkota bunga". Apoptosis pertama kali diperkenalkan oleh Kerr pada tahun 1972, yaitu proses kematian sel yang bersifat "*self destruction*", yang langsung dipengaruhi oleh gen. Apoptosis didefinisikan sebagai suatu proses kematian sel tunggal yang terjadi secara terencana (*programmed cell death*), ditandai dengan gambaran morfologi dan biokimia khas sebagai akibat dari inisiasi oleh stimuli fisiologis maupun patologis tanpa menimbulkan reaksi inflamasi. Berbeda dengan nekrosis, apoptosis merupakan proses bunuh diri yang memerlukan energi dan melibatkan berbagai tahap (Kerr *et al.*, 1972).

Apoptosis merupakan suatu proses yang terregulasi dan membutuhkan energi. Berbeda dengan nekrosis, walaupun proses keduanya sama-sama mengakibatkan kematian sel, namun keduanya berbeda dalam hal morfologis dan regulasi struktur seluler seperti tampak pada Gambar dibawah ini (Krijnen *et al.*, 2002).

Proses apoptosis dicirikan dengan terjadinya pengerutan sel dan nukleus yang telah terprogram jangka waktunya. Kromatin nukleus pada proses apoptosis mengalami kondensasi, yang kemudian pecah. Pecahan ini kemudian dibungkus dalam suatu vesikel, disebut sebagai *apoptotic bodies*, yang mengandung pula sisa-sisa organel sel dan fragmen DNA lain, untuk selanjutnya difagositosis baik oleh sel-sel tetangganya maupun mengalami degradasi otomatis. Sekilas proses ini memiliki kemiripan dengan nekrosis sehingga sering disebut sebagai nekrosis sekunder, namun pada apoptosis tidak terjadi ruptur membran plasma. Proses apoptosis ini tidak menginduksi terjadinya reaksi inflamasi, namun prosesnya diinduksi oleh reaksi inflamasi sebelumnya (Krijnen *et al.*, 2002).

Apoptosis dan nekrosis sama-sama mengakibatkan kematian sel, namun keduanya berbeda dalam hal morfologis dan regulasi struktur selulernya. Nekrosis ditandai dengan hilangnya homeostasis sel dengan cepat, pembengkakan yang cepat oleh akumulasi air dan elektrolit, ruptur membran sel dan kebocoran material sel keluar sel. Terjadinya nekrosis sel menginduksi reaksi inflamasi. Nekrosis umumnya melibatkan sekelompok sel secara yang bersamaan karena jejas yang berat dalam waktu singkat seperti faktor mekanik, trauma, panas dan toksin (Harada, 1996, 2004).



Gambar 2-9 Skema Sel yang Mengalami Nekrosis dan Apoptosis

Keterangan Nekrosis (bawah) digambarkan dengan adanya kebocoran membran sehingga menyebabkan lisosim keluar dan menimbulkan reaksi inflamasi sedangkan pada apoptosis (atas) sel akan mengalami penyusutan ukuran menjadi lebih kecil (*apoptotic body*) yang selanjutnya akan difagositosis sehingga tidak terjadi proses inflamasi sel (Harada, 2004)

Apoptosis memiliki peranan yang penting dalam regulasi sel dan homeostasis jaringan (Weyhenmeyer *et al.*, 2012). Gangguan apoptosis dapat menyebabkan penyakit autoimun atau kanker, sedangkan apoptosis yang berlebihan dapat menyebabkan penyakit degeneratif pada sistem kardiovaskular dan saraf. Apoptosis merupakan mekanisme defensif untuk melawan infeksi mikroorganisme dan membunuh sel-sel kanker (Brunelle *and* Letai, 2009).

2.3.2 Mekanisme Apoptosis

Apoptosis memainkan peranan penting dalam menyeimbangkan homeostasis jaringan dan menghasilkan sebuah fungsi normal dengan cara mengurangi sel-sel yang berlebihan atau sel-sel yang mengalami disfungsi.

Apoptosis dapat diinisiasi oleh "signal kematian" baik ekstraseluler maupun intraseluler. Apoptosis merupakan hasil dari serangkaian proses morfologi dan biokimia yang saling berkaitan. Secara morfologi, sel apoptotik ditandai dengan adanya kromatin yang mengalami kondensasi, apoptotik bodi (*apoptotic bodies*),

dan mengalami penyusutan. Secara biokimia, apoptosis dikarakteristikan dengan adanya fragmen-fragmen nukleosomal 180-base pasang baik monomerik maupun multimerik yang merupakan hasil dari pemecahan *double-stranded nuclear deoxyribonucleic acid* (DNA) (Kerr *et al.*, 1972; Oberhammer *et al.*, 1993).

Apoptosis dikendalikan oleh ekspresi sejumlah gen regulator yakni c-myc, p53, Fas, nuclear factor (NF)-kB dan kelompok famili sel B limfoma/leukemia-2 (*B-cell lymphoma/leukemia-2/Bcl-2*) (Sattler *et al.*, 1997).

Proses kematian sel dapat terjadi melalui beberapa jalur yaitu proses nekrosis, apoptosis (*programmed cell death type-1*) dan autofagi (*programmed cell death type-2*) (Yasuhara *et al.*, 2007). Jalur apoptosis merupakan sebuah regulasi program intraseluler, dimana sel yang mati akan mengkativasi enzim untuk mendegradasi deoxyribonucleic acid (DNA) pada nukleus dan protein sitoplasma sel itu sendiri (Kumar *et al.*, 1998, 2010). Apoptosis diregulasi oleh berbagai protein diantaranya famili protein Bcl-2. Famili protein ini terdiri dari protein pro-apoptosis (seperti Bax, Bak, Bad, Bag, and Bcl-xs) dan protein antiapoptosis (seperti Bcl-2, Bcl-xl, and Mcl-1). Rasio antara heterodimer Bcl-2/Bax dibanding dengan homodimer Bax/Bax akan menentukan apakah sebuah sel akan mengalami apoptosis ataukah tidak, dimana Bax adalah protein yang mempromosikan kematian sel (Erickson, 1997; Akcali *et al.*, 2003). Kelompok famili anti-apoptosis Bcl-2 banyak diekspresikan pada sel kanker, termasuk diantaranya tumor padat. Bcl-2 dapat mencegah kematian sel dan meningkatkan resistensi sel terhadap perlakuan (Takahashi *et al.*, 2013).

Proses terjadinya apoptosis dibagi kedalam 3 fase yaitu (Hadi, 2011):

1. Fase induksi

Fase induksi tergantung pada sinyal penyebab kematian yang menstimulasi sinyal proapoptotik dan memulai kaskade. Sinyal penyebab kematian tersebut antara lain *reactive oxygen species* (ROS), aktivasi berlebihan dari

Ca²⁺, protein family *B-cell lymphoma-2* (Bcl2) seperti *Bcl2 associated x protein* (Bax) dan *Bcl-2 associated death promoter* (Bad).

2. Fase efektor

Pada fase ini sel akan mengalami kematian karena kerja pusat pengatur yaitu mitokondria mengarahkan pada kematian sel.

3. Fase degradasi

Fase ini melibatkan serangkaian peristiwa yang terjadi baik di sitoplasma maupun di dalam inti sel.

Dikenal 2 jalur apoptosis, yaitu jalur ekstrinsik (tipe 1 dan 2) serta jalur intrinsik. Jalur intrinsik (*mitochondria pathway*) diawali dengan pelepasan faktor pemicu oleh mitokondria di dalam sel. Sebaliknya jalur ekstrinsik (*death receptor pathway*) diawali dengan rangsangan terhadap *death receptor* dipermukaan sel (Harada, 2004).

2.3.2.1 Jalur Intrinsik

Mitokondria merupakan pusat pengaturan apoptosis pada jalur intrinsik.

Selain memediasi dan memperkuat jalur ekstrinsik pada apoptosis, mitokondria juga memainkan peran sentral dalam integrasi dan meneruskan signal kematian yang berasal dari dalam sel seperti kerusakan DNA, oksidatif stress, kelaparan atau kondisi akibat pemaparan dengan obat kemoterapi. Kebanyakan apoptosis yang menginduksi jalur ini akan diikuti dengan kerusakan membran dalam mitokondria yang menyebabkan perubahan membran potensial menurun, akibatnya permeabilitas *membrane transition* meningkat, sehingga molekul dengan berat 1,5 kDa dapat menembus. Berikutnya diikuti oleh pembengkakan mitokondria dan akhirnya akan terjadi kerusakan membran luar mitokondria, terlepasnya protein proapoptosis dari ruang intermembran mitokondria ke dalam sitoplasma, sitokrom c, yang mengaktifkan *apoptosome*, sehingga mulailah

reaksi berantai kaspase. Selain itu *apoptosome* juga mengaktifasi faktor lain *apoptosing inducing factor* (AIF); endonuclease endoG, smac/Diablo dan Htr/Omi (Friedlander, 2007)

Akibat lain dari kerusakan mitokondria adalah homeostasis biokimia intraseluler; pembentukan ATM terhenti, redok molekuler seperti NADPH dan NADH, glutathione akan teroksidasi, ROS akan meningkat. Peningkatan ROS akan menyebabkan oksidasi dari lemak, protein dan asam nukleat (Friedlander, 2007).

Jalur intrinsik dipicu oleh stress seluler, terutama stress pada mitokondria disebabkan oleh berbagai faktor antara lain kerusakan DNA, hilangnya faktor pertumbuhan dan *heat shock*. Stress seluler ini akan merangsang protein proapoptosis dalam sitoplasma, *Bax*, *Bad* dan *Bim*, sehingga berikatan dengan membran terluar mitokondria yang selanjutnya merangsang keluarnya kandungan internal dari mitokondria tersebut. Tetapi rangsangan *Bax*, *Bad* dan *Bim* tidak cukup kuat untuk mengeluarkan seluruh kandungan mitokondria.

Gangguan internal sel akan menyebabkan *Bax* melakukan penetrasi dalam membran mitokondria yang menyebabkan keluarnya sitokrom c. Sitokrom c dan Apaf-1 akan mengikat molekul kaspase-9 dan membentuk kompleks yang disebut *apoptosom*. Kompleks tersebut akan menginisiasi urutan aktivasi kaspase sampai pada fagositosis sel tersebut. Selain terjadi pelepasan sitokrom c, akan ada mekanisme alternative yang melibatkan pelepasan protein mitokondria lain yaitu *apoptosis-inducing factor* (AIF). AIF terbukti memiliki aktivitas proteolitik yang bisa dihambat oleh inhibitor kaspase spektrum luas, tetapi tidak bisa dihambat oleh inhibitor spesifik untuk kaspase-1 dan kaspase-7 (Hadi 2011).

Bcl2 banyak ditemukan terutama pada membran mitokondria bagian luar, retikulum endoplasma dan membran inti. Beberapa anggota keluarga *Bcl2*

proapoptotik ditemukan dalam sel pada konsentrasi yang cukup untuk menyebabkan apoptosis. Meskipun demikian anggota Bcl2 tersebut tidak bisa secara langsung menyebabkan apoptosis, sebab aktivitasnya dikontrol dalam bentuk laten. Protein Bax dan *BH-3 interacting domain death* (Bid) ditemukan dalam sitoplasma sel hidup. Adanya sinyal letal yang diterima akan menyebabkan Bax mengalami perubahan konformasi dan bergerak menuju sitosol. Setelah dipecah oleh kaspase-8 Bid bergerak menuju mitokondria akan menyebabkan pelepasan sitokrom-c. Dengan cara yang sama Bax mengalami perubahan konformasi bentuk inaktif menjadi aktif. Mekanisme seluler inilah yang bertanggungjawab terhadap pengaturan aktivitas famili gen Bcl2 dalam mengontrol apoptosis (Hadi, 2011)

Sebagian besar kehidupan sel tergantung pada tetap tidaknya suplai sitokin maupun *growth factors*. Tidak adanya sitokin penekan faktor apoptosis berarti akan menyebabkan apoptosis berlangsung. *Bcl2 associated death promoter* adalah anggota famili Bcl2 yang bersifat proapoptotik yang akan tersisih jika terdapat sitokin dalam sitoplasma. Sitokin berikatan dengan reseptor menyebabkan aktivasi *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K), sehingga protein kinase B (PKB) dan Bad mengalami fosforilasi. Penghilangan sitokin akan menyebabkan jalur kinase berhenti, status fosforilasi Bad akan bergeser menjadi defosforilasi, dimana bentuk defosforilasi tersebut akan menyebabkan terlepasnya sitokrom c mitokondria. Penekanan kelompok antiapoptotik atau aktivasi kelompok proapoptotik famili Bcl2 mengakibatkan perubahan permeabilitas membran mitokondria sehingga menyebabkan terlepasnya sitokrom c dalam mitokondria. Sitokrom c awalnya terdapat dalam fraksi mitokondria sel normal (*non-apoptotic cell*) dan dalam fraksi sitoplasma non mitokondria yang ditambahkan Bax, Bid dan ekstrak sel yang akan mempercepat pelepasan sitokrom c mitokondria (Hadi, 2011).

2.3.2.2 Jalur ekstrinsik

Inisiasi apoptosis melalui jalur ekstrinsik melibatkan ikatan antara sinyal protein kematian ekstraseluler seperti TNF- α , Fas-Ligand (Fas-L), *TNF related apoptosis including ligand* (TRAIL) dan Apo3 Ligand (Apo3L) dengan reseptor permukaan sel sasaran. Setelah berikatan dengan ligand yang sama, *death receptor* akan membentuk kompleks homotrimetrik yang menyebabkan protein adaptor intraseluler tertarik ke membran sel seperti TNF-R1 dan DR-3 yang disebut *TNFR-associated death domain protein* (FADD). FADD dan TRADD tidak berinteraksi dengan DR5 sehingga diduga ada protein lain yang terlibat. Sinyal yang diaktivasi oleh TNF-R1 atau DR3 terpecah pada tingkat TRADD. Translokasi inti faktor *transkripsi nuclear factor kB* (NF-kB) dan aktivasi *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) dimulai. Sinyal TNF- α akan berikatan dengan sinyal jalur Fas menyebabkan interaksi antara TRADD dengan FADD. Ikatan tersebut mengirimkan sinyal ke sitoplasma untuk mengaktivasi kaspase-8 selanjutnya terjadi kaskade kaspase untuk apoptosis (Hadi, 2011).

Jalur ekstrinsik, molekul pemicunya adalah *ligands* yang berasal dari sel lainnya. *Ligands* akan berikatan dengan *death receptors transmembran* pada sel target untuk memicu terjadinya sel apoptosis. Sebagai contoh Fas ligand (FasL) pada permukaan suatu sel akan berikatan dengan reseptor Fas (suatu *death receptor*) pada permukaan sel target. Ikatan ini akan merangsang agregasi beberapa reseptor pada permukaan sel target. Agregasi ini karena mengikat protein adaptor yang disebut *Fas-associated death domain protein* (FADD), pada ujung sitoplasma dari reseptor. FADD selanjutnya akan berikatan dengan kaspase-8, suatu protein inisiator membentuk *death-inducing signal complex* (DISC). Dengan ikatan ini kaspase 8 akan teraktivasi dan akan langsung menaktivasi kaspase-3, suatu protein eksekutor yang akan mengawali degradasi sel. Kaspase 8 aktif ini juga memecah protein Bid menjadi Bid C terminal, yang

bisa sebagai sinyal pada permukaan mitokondria untuk merangsang pengeluaran sitokrom c seperti pada jalur intrinsik.

Pada jalur ekstrinsik, pro-kaspase-8 terikat pada kelompok DED yang merupakan bagian dari reseptor permukaan sel yang pada bagian luarnya terdapat reseptor famili dari *tumor necrotizing factor receptor* (TNFR) yang apabila berikatan dengan ligan tertentu (fasL, TNF α , TRAIL), maka beberapa molekul pro-kaspase pada sisi dalam adaptor (FADD, TRADD) akan terlepas dan saling mendekat membentuk aktif kaspase-8 (Friedlander, 2007).

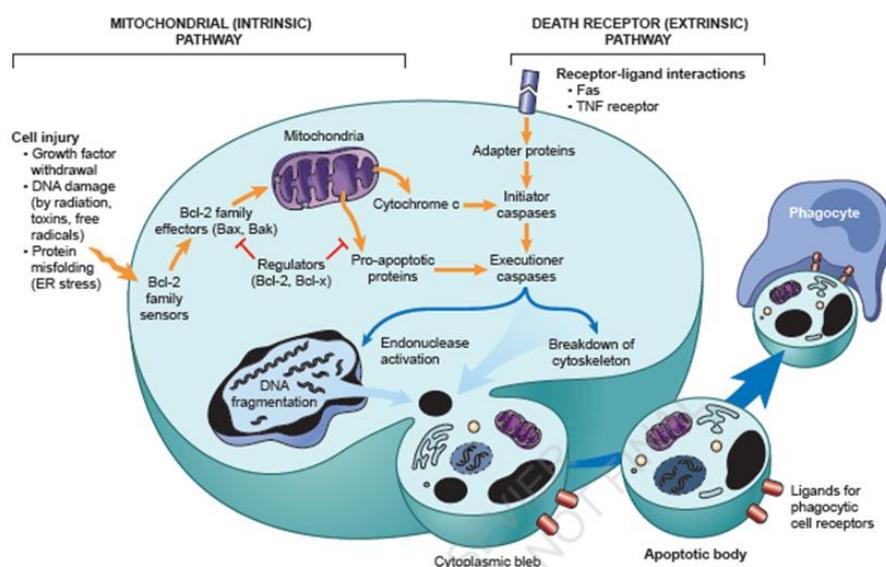
Jalur apoptosis intrinsik melibatkan kaspase-9 yang berawal dari sampainya rangsangan apoptosis pada mitokondria yang akan mengeluarkan sitokrom c yang akan bergabung dengan Apaf-1, ditambahkan dATP membentuk hexamerik apoptosom, dimana pro-kaspase-9 akan berikatan dengan "inert hub" region apoptosome membentuk kaspase-9 dimmer (Friedlander, 2007).

Mitokondria merupakan pusat pengaturan apoptosis pada jalur intrinsik.

Selain memediasi dan memperkuat jalur ekstrinsik pada apoptosis, mitokondria juga memainkan peran sentral dalam integrasi dan meneruskan signal kematian yang berasal dari dalam sel seperti kerusakan DNA, oksidatif stress, kelaparan atau kondisi akibat pemaparan dengan obat kemoterapi. Kebanyakan apoptosis yang menginduksi jalur ini akan diikuti dengan kerusakan membran dalam mitokondria yang menyebabkan perubahan membran potensial menurun, akibatnya permeabilitas *membrane transition* meningkat, sehingga molekul dengan berat 1,5 kDA dapat menembus. Berikutnya diikuti oleh pembengkakan mitokondria dan akhirnya akan terjadi kerusakan membran luar mitokondria, terlepasnya protein proapoptosis dari ruang intermembran mitokondria ke dalam sitoplasma, *cytochrome c*, yang mengaktifkan *apoptosome*, sehingga mulailah reaksi berantai kaspase. Selain itu, *apoptosome* juga mengaktifasi faktor lain

apoptosing inducing factor (AIF), endonuclease endoG, smac/Diablo dan Htr/Omi (Friedlander, 2007)

Akibat lain dari kerusakan mitokondria adalah homeostasis biokimia intraseluler, pembentukan ATM terhenti, redok molekuler seperti NADPH dan NADH, glutathione akan teroksidasi, ROS akan meningkat. Peningkatan ROS akan menyebabkan oksidasi dari lemak, protein dan asam nukleat. (gambar 5 dan gambar 6) (Friedlander, 2007).



Gambar 2-10 Mekanisme Apoptosis Melalui Dua Jalur yang Berbeda

Keterangan: Proses apoptosis pada fase induksi dan regulasi, keduanya berujung pada aktivasi dari kaspase dan sitokrom-c. Induksi apoptosis tergantung pada keseimbangan antara sinyal pro-apoptosis dan anti-apoptosis dan intraseluler protein (Fauston., 2006).

2.3.3 Apoptosis pada Endometrium Eutopik dan Endometriosis

Morfologi jaringan endometrial eutopik wanita dengan endometriosis memiliki kemiripan dengan jaringan endometrium normal, tetapi memiliki morfologi dan biokimia yang berbeda. Studi terakhir menyebutkan adanya kemampuan hidup yang abnormal dari epitelial dan stroma endometrium wanita dengan endometriosis yang kemungkinan dapat menyebabkan pertumbuhannya menjadi berlanjut (Beliard *et al.*, 2004).

2.3.3.1 Apoptosis pada Endometrium Normal

Siklus sel endometrium secara teratur mengalami 3 fase yang berbeda melalui siklus menstruasi yaitu fase proliferasi, sekretori, dan menstruasi.

Berbagai studi yang telah dikumpulkan, menunjukkan bahwa apoptosis membantu dalam

Keseimbangan homeostasis seluler pada siklus menstruasi yang normal, melalui pembatasan jumlah sel yang berlebihan pada lapisan fungsional endometrium uterus selama fase sekretori akhir dan fase menstruasi (Harada, 2004; Vignano, 2004). Selanjutnya diikuti dengan adanya proliferasi sel-sel baru dari lapisan basal selama fase proliferasi. Pada fase sekretori akhir, kematian sel melalui proses apoptosis meningkat pada lapisan fungsional endometrium yang normal. Fragmentasi DNA nukleus spesifik terkait dengan apoptosis telah dibuktikan pada endometrium manusia. Hopwood dan Levinson (1976) melaporkan adanya proses apoptosis pada sel-sel endometrial manusia dengan pemeriksaan mikroskop elektron.

Apoptosis memainkan peranan penting dalam menjaga homeostasis jaringan dan mencerminkan fungsi normal dalam mengeliminasi sel yang berlebih jumlahnya ataupun yang mengalami disfungsi. Berbagai bukti menyebutkan bahwa apoptosis membantu menjaga homeostasis seluler selama siklus menstruasi dengan cara mengeliminasi sel yang rusak dari lapisan fungsional endometrium uterus selama fase sekretorik lanjut dan fase menstruasi. Apoptosis terdeteksi pada kelenjar epitel saat fase sekretorik lanjut dan endometrium menstruasi, dan terdeteksi sangat sedikit selama fase proliferasi atau di awal fase sekretorik. Proliferasi endometrium pada fase proliferasi berhubungan secara umum dengan aksi hormon estrogen, sedangkan progesteron diduga mengarahkan sel menuju jalur difrensiasi, yang menghasilkan terhentinya pertumbuhan (Harada, *et al.*, 2004).

Hingga saat ini, mekanisme pasti mengenai apoptosis pada endometrium manusia masih belum dapat dijelaskan secara jelas, meskipun Bcl-2 dianggap menghambat apoptosis pada endometrium manusia selama fase proliferasi, dikatakan bahwa Bcl-2 merupakan gen penting untuk kelangsungan hidup sel kelenjar endometrial dan sel otot polos miometrium. Kelompok Bcl-2 yang lain yang juga berperan dalam meningkatkan kematian sel adalah BAX, dengan cara melawan efek Bcl-2 pada kelangsungan hidup sel melalui interaksi heterodimer.

Tingkat/kadar protein BAX tidak terlalu tinggi pada endometrium yg berproliferasi dan meningkat secara dramatis pada saat fase sekretorik (Harada, *et al.*, 2004).

2.3.3.2 Apoptosis pada Endometrium Eutopik Wanita dengan Endometriosis

Pada fase sekretori, kematian sel melalui proses apoptosis meningkat pada lapisan fungsional endometrium normal. Meskipun demikian peningkatan apoptosis yang diharapkan dari sel-sel selama fase sekretori akhir tidak dapat dijumpai pada endometrium eutopik wanita dengan endometriosis (Braun *et al.*, 2002). Jumlah sel—sel yang mengalami apoptosis lebih rendah baik pada epitelium maupun stroma endometrium eutopik wanita dengan endometriosis jika dibandingkan dengan endometrium yang normal (Szymanowski, 2007).

Disamping itu, pada endometrium eutopik wanita dengan endometriosis, baik sel epitelial maupun stromal memiliki tingkat kapasitas proliferasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan endometrium normal (Wingfield *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 2005).

2.3.3.3 Apoptosis pada Endometriosis

Kemampuan hidup sel-sel endometriotik pada lokasi ektopik juga telah banyak dipelajari secara lebih spesifik yakni mengenai proses apoptosis jaringan

endometriosis (Dmowski *et al.*, 1998; Harada *et al.*, 2004; Izawa *et al.*, 2006).

Telah dibuktikan bahwa apoptosis pada lesi endometriotik adalah lebih rendah dibandingkan dengan endometrium pada eutopik penderita yang sama maupun endometrium wanita yang normal (kontrol) (Dmowski *et al.*, 1998; Izawa *et al.*, 2006). Sehingga saat ini diyakini bahwa kerentanan sel epitelial endometriotik dan stromanya terhadap apoptosis adalah memiliki peranan terhadap etiologi endometriosis (Dmowski *et al.*, 1998; Izawa *et al.*, 2006). Ketahanan sel-sel endometriotik terhadap apoptosis diyakini berasal dari faktor intrinsik atau disebabkan oleh faktor-faktor lingkungan. Sel-sel endometriotik resisten sitotoksitas yang dihasilkan oleh makrofag dan staurosporine-induced apoptosis (Izawa *et al.*, 2006). Sel-sel stroma endometriotik memiliki kapasitas proliferasi yang lebih besar dibandingkan dengan sel-sel stroma endometrial eutopik.

Kemampuan hidup sel-sel endometritik kemungkinan bersifat antagonis terhadap apoptosis yang melalui jalur caspase-3 (Peiro *et al.*, 2001). Jones *et al.* (1998) melaporkan bahwa tidak didapatkan apoptosis pada sel-sel stroma endometriotik dari jaringan endometriotik peritoneal. Tidak didapatkan adanya fenomena apoptosis yang diteliti pada sel-sel epitelial endometriotik dari endometriosis ovarium. Sedangkan Harada *et al* (1996) menemukan bahwa apoptosis meningkat pada endometriosis ovarium. Beliard *et al.*, (2004) juga telah mendemonstrasikan adanya penurunan apoptosis pada lesi endometriotik.

Adanya data yang saling bertolak belakang tersebut kemungkinan disebabkan oleh adanya perbedaan metodologi dan perbedaan lesi endometriosis yang digunakan (endometriosis ovarium dengan endometriosis peritoneal).

Endometriosis ovarium dan peritoneal diyakini memiliki perbedaan patogenesis terjadinya. Oleh sebab itu, lesi-lesi endometriosis tersebut dapat memiliki penampakan biologis yang berbeda. Manipulasi yang dilakukan pada garis sel-

sel yang berasal dari lesi endometriotik pada lokasi yang berbeda kemungkinan dapat menghasilkan sistem eksperimental untuk mempelajari proses molekuler dan seluler yang mendasari patogenesis dari penyakit ini.

Jaringan endometrium eutopik wanita dengan endometriosis memiliki beberapa perbedaan jika dibandingkan dengan endometrium normal wanita tanpa endometriosis. Perbedaan tersebut terletak pada struktur, kapasitas proliferasi, komponen imun, molekul adhesi, enzim proteolitik dan inhibitorynya, steroid dan produksi sitokin dan responsif, ekspresi gen dan produksi protein.

Perbedaan ini dapat berkontribusi pada kelangsungan sel endometrial yang berregurgitasi ke dalam rongga peritoneal dan perkembangan endometriosis (Harada, *et al.*, 2004). Salah satu mekanisme yang baru-baru ini mendapatkan perhatian adalah bahwa apoptosis terjadi pada endometrium eutopik dan ektopik pasien dengan endometriosis (Harada *et al.*, 2004).

Prosentase apoptosis pada sel-sel endometrium tereduksi dalam jumlah besar pada wanita dengan endometriosis, mengimplikasikan bahwa jumlah sel-sel yang dapat bertahan hidup yang memasuki kavum peritoneum lebih besar daripada wanita yang menderita endometriosis. Indeks apoptosis epitel glandula secara signifikan lebih rendah pada wanita dengan endometriosis dibandingkan kontrol. Perbedaan ini diakibatkan terutama oleh penurunan apoptosis yang signifikan selama fase sekresi atau menstruasi dan pada fase proliferasi awal pada wanita dengan endometriosis (Harada *et al.*, 2004).

Terdapat sebuah spekulasi yang menyebutkan bahwa penurunan apoptosis dalam memperantarai survival dan implementasi sel-sel endometrium ektopik kemungkinan berhubungan terbalik antara level apoptosis dan beratnya penyakit. Untuk menguji hipotesis ini Dmowski *et al* (2001) menganalisa apoptosis berdasarkan stadium endometriosis dan menemukan bahwa terdapat

kecenderungan penurunan apoptosis seiring peningkatan stadium penyakit, tetapi perbedaannya tidak bernilai secara statistik (Dmowski *et al.*, 2001).

Sel endometrial wanita dengan endometriosis mempertinggi proliferasi dan meningkatkan kemampuan untuk berimplantasi dan bertahan di lokasi ektopik. Gangguan sensitivitas jaringan endometrium untuk apoptosis spontan memberikan kontribusi pada implantasi normal dan pertumbuhan endometrium di lokasi ektopik. Ketidakmampuan sel endometrium untuk mengirimkan sinyal "kematian" atau kemampuan mereka untuk menghindari kematian sel dikaitkan dengan peningkatan ekspresi faktor anti-apoptosis (misalnya Bcl-2) dan penurunan faktor ekspresi pro-apoptosis (misalnya Bax). Proliferasi sel endometrium diluar kavum uterus juga berhubungan jelas dengan estrogen, sehingga endometriosis juga disebut dengan penyakit estrogen-dependen. Pada kasus hiperplasia endometrium, stimulasi estrogen endogen dan eksogen merupakan pemicu proliferasi endometrium yang tidak terkontrol (Olive, *et al.*, 2004; Harada, *et al.*, 2007).

2.3.4 Apoptosis pada Tumor Ginekologi dan Endometriosis

Endometriosis dan kanker serupa dalam beberapa aspek seperti invasi sel, pertumbuhan yang tidak dapat dihentikan, perkembangan pembuluh darah baru dan penurunan jumlah sel yang mengalami apoptosis. Abnormalitas dalam pengontrolan proliferasi dan apoptosis pada endometrium normal mempengaruhi perkembangan neoplasia. Kanker yang sangat metastatik menunjukkan resistensi yang lebih tinggi terhadap apoptosis kematian sel dibandingkan dengan tumor dengan tingkat metastasi rendah. Sama halnya, sel-sel endometriotik menunjukkan kerentanan lebih rendah terhadap apoptosis.

Jaringan endometriotik menunjukkan ekspresi gen survivin lebih tinggi (Ueda *et al.*, 2002). Survivin memiliki efek antagonis terhadap apoptosis yang diperantarai

kaspase-3 dan akhirnya membantu perkembangan endometriosis dan berhubungan dengan fenotip sel-sel kanker yang lebih agresif. Bagaimanapun, masih dibutuhkan studi tambahan untuk memperjelas peristiwa molekuler yang mengatur ekspresi gen surviving pada endometriosis dan sel-sel tumor ginekologi.

Peiro *et al.* (2001) menemukan ekspresi protein dan gen pre-apoptosis yang lebih tinggi (gen CAS, Bax dan Kaspase 3) dan ekspresi gen anti apoptosis yang lebih rendah, Bcl-2, pada jaringan kanker endometrial dibandingkan dengan endometrium normal. Sebagai tambahan, peningkatan level CAS dan Kaspase-3 dihubungkan dengan perilaku tumor yang lebih agresif dan survival pasien yang lebih pendek (Peiro *et al.*, 2001)

Penurunan ekspresi Bcl-2 dari tumor ovarium jinak ke borderline dan ganas juga telah dilaporkan. Nezhat *et al.* (2002) melaporkan ekspresi Bcl-2 yang lebih jarang pada kista endometrium jinak disbanding karsinoma endometrioid, *clear cell*, dan papiler, berhasil menunjukkan bahwa pola ekspresi Bcl-2 berbeda-beda berdasarkan tipe histology tumor ovarium. Sebaliknya, Fauvet *et al.*, (2003) menunjukkan tidak ada perbedaan ekspresi Bcl-2 pada endometrioma, tumor ovarium jinak dan ganas. Jelaslah bahwa ekspresi protein dan gen apoptosis pada tumor ginekologi masih menjadi kontroversi. Perbedaan yang ditemukan dalam studi-studi ini mungkin menunjukkan distribusi nBcl-2 yang berbeda-beda pada sel-sel tumor, juga tingkat histologi tumor, atau perbedaan metodologi yang dilakukan dalam identifikasi faktor apoptosis.

Protein supresor tumor p53, penginduksi apoptosis poten lain, nampaknya memiliki pengaruh dalam transformasi endometriosis menjadi ganas.

Aktivasi p53 dapat meningkatkan apoptosis sel-sel yang rusak atau sel-sel tua yang berlaku sebagai supresor tumor yang efektif. Gen p53, yang berlokasi pada lengan pendek kromosom 17, mengkode protein nuklear yang secara normal

bekerja menahan proliferasi seluler yang tidak normal dan meregulasi secara negatif pembelahan sel. Nezhath *et al.*, (2002) berspekulasi bahwa perubahan p53 mungkin berhubungan dengan transformasi ganas kista endometriosis. Dalam studi itu, pengecatan p53 negatif pada kista endometriotik jinak dan positif pada 37-55% kista ganas. Sebaliknya pada studi oleh Fauvet *et al.*, (2003), ekspresi p53 meningkat pada endometrioma dibandingkan dengan tumor jinak, tetapi tidak ada perbedaan yang dijumpai pada endometriom dan lesi ovarium jinak.

Apoptosis mewakili salah satu titik pusat perkembangan karsinoma pada pasien endometriosis. Bagaimanapun, masih diperlukan lebih banyak penelitian untuk memperjelas peran faktor apoptosis dalam tranformasi malignan lesi endometriosis. Saat ini sedang berkembang berbagai upaya untuk mengidentifikasi faktor-faktor dalam proses apoptosis yang dapat digunakan pada wanita dengan endometriosis yang beresiko tinggi berkembang menjadi tumor.

2.3.5 Molekul-Molekul yang Berperan pada Apoptosis

Apoptosis diregulasi secara ketat oleh berbagai jenis protein regulator. Diantara modulator-modulator tersebut, kelompok famili Bcl-2 merupakan regulator kunci terjadinya apoptosis yakni meliputi protein anti-apoptosis (misalnya Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, dan A1) dan protein-protein pro-apoptosis (misalnya Bak, Bax, Bad, and Bid). Protein Bcl-2 telah banyak dipelajari pada berbagai jaringan endometriotik manusia. Sedangkan dilain pihak, protein lain yang terkait apoptosis seperti Bax dan Fas masih sedikit dipelajari. Pada sebuah studi yang menggunakan analisis *cDNA microarray*, didapatkan bahwa terdapat beberapa gen terkait apoptosis yang tampaknya mengalami downregulasi pada jaringan endometriotik (Arimoto *et al.*, 2003). Penemuan tersebut sesuai dengan hasil observasi adanya penurunan apoptosis spontan pada jaringan endometrium

eutopik dan ectopik pada wanita dengan endometriosis. Observasi tersebut menjadi sebuah pijakan yang penting terhadap penemuan adanya kandidat gen yang kemungkinan melakukan regulasi apoptosis pada endometriosis, sehingga kemungkinan dapat digunakan sebagai target molekul untuk diagnosis ataupun upaya terapi terhadap endometriosis.

Berbagai perbedaan ekspresi protein terkait apoptosis telah banyak dilaporkan sesuai dengan lokasi lesi endometriotiknya seperti terlihat pada Tabel berikut (Harada *et al.*, 1996; Nezhat *et al.*, 2002; Dufournet *et al.*, 2006).

Perbedaan ekspresi protein-protein terkait apoptosis berdasarkan lokasi endometriosis menunjukkan adanya jalur-jalur apoptosis yang berbeda dan dapat dijelaskan dengan etiopatologi yang berbeda.

Tabel 2-3. Ringkasan Ekspresi Molekul-Molekul yang berkaitan dengan Apoptosis pada Lesi Endometriosis

| | Eutopic endometrium with endometriosis | Ovarian endometriotic cyst | Peritoneal endometriotic lesion |
|-----------|--|----------------------------|---------------------------------|
| Bcl-2 | Unaffected | Downregulated | Upregulated |
| Bcl-XL | N.D. | Upregulated | N.D. |
| Bax | Unaffected | Upregulated | N.D. |
| Bad | N.D. | Unaffected | N.D. |
| Fas | Upregulated | Downregulated | Upregulated |
| TNF-RII | Downregulated | N.D. | N.D. |
| NF-kB | N.D. | Upregulated | N.D. |
| p38 MAPK | N.D. | Upregulated | N.D. |
| Survivin | N.D. | N.D. | Upregulated |
| Ubiquitin | N.D. | Upregulated | N.D. |
| p53 | Unaffected | Upregulated | Unaffected |
| p21 | N.D. | Upregulated | Unaffected |
| c-myc | Upregulated | N.D. | N.D. |
| COX-2 | Upregulated | Upregulated | Upregulated |
| Caspase-1 | Downregulated | Downregulated | Downregulated |

Keterangan: N.D: *not described.* (sumber: Harada *et al.*, 1996)

2.3.6 B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2)

Protein Bcl-2 merupakan protein yang paling karakteristik sebagai molekul yang terkait dengan apoptosis. Gen Bcl-2 didefinisikan sebagai sebuah kelas dari proto-onkogen yang melakukan blok terhadap kematian sel dengan cara meregulasi fungsi membran mitokondria tanpa menyebabkan proliferasi sel

(Korsmeyer, 1992). Sehingga jelas bahwa aktivitas kerja Bcl-2 bergantung pada konsentrasi dan interaksinya dengan sebuah protein antagonis yang poten, yaitu Bax. Bax merupakan sebuah protein anggota gen famili Bcl-2 dengan berat molekul sebesar 21 kDa, yang membagi asam amino homolog dengan Bcl-2, heterodimer dengan Bcl-2, dan homodimer dengan Bax sendiri. Saat Bcl-2 teroverekspresi, heterodimer Bcl-2 dengan Bax dan sel akan mengalami kematian. Sehingga rasio antara Bcl-2 terhadap Bax merupakan hal yang penting dalam menentukan kerentanan terhadap apoptosis (Chao and Korsmeyer, 1998). Sedangkan studi yang terbaru menunjukkan adanya data yang bertentangan mengenai perbedaan ekspresi Bcl-2 antara jaringan endometrium yang normal dengan jaringan eutopik/ektopik wanita dengan endometriosis. Harada *et al.*, (1996) menyebutkan bahwa Bcl-2 tidak ditemukan pada hampir seluruh sampel endometriosis ovarial (Harada *et al.*, 1996), namun Jones *et al.* menyebutkan bahwa Bcl-2 meningkat bermakna pada sel epitelial dan stroma endometriotik (Jones *et al.*, 1998). Beberapa studi yang lebih mendalam mendemonstrasikan bahwa ekspresi Bcl-2 dideteksi pada sel epitelial dan stroma jaringan sel epitelial kelenjar dan stroma dari jaringan endometriotik dan endometrium eutopik baik dengan ataupun tanpa endometriosis, yakni dengan ekspresi puncak pada saat fase proliferasi (Meresman *et al.*, 2000).

Studi-studi sebelumnya telah mendeskripsikan bahwa terdapat sebuah penurunan ekspresi Bcl-2 pada endometriosis ovarial (Meresman *et al.*, 2000) sedangkan endometriosis peritoneal memiliki ekspresi Bcl-2 yang tinggi (Beliard *et al.*, 2004). Studi-studi lain menunjukkan bahwa ekspresi Bcl-2 adalah lebih rendah pada lesi endometriotik kistik dibandingkan lesi endometriotik non-kistik (Suganuma *et al.*, 1997; Nezhat *et al.*, 2002), hal ini menunjukkan bahwa ekspresi Bcl-2 berbeda berdasarkan lokasi dari lesi endometriotik (Nezhat and Kalir, 2002). Ekspresi upregulasi protein Bcl-2 dari sel stroma ovarial

endometriotik dibandingkan dengan sel stroma endometrium eutopik dari wanita dengan dan tanpa endometriosis (Nishida *et al.*, 2004, 2005). Makrofag peritoneal dari wanita dengan endometriosis bersifat resisten terhadap apoptosis, berdasarkan ekspresi protein anti-apoptosis Bcl-2 yang meningkat. Ekspresi reseptor estrogen tinggi pada lesi endometriotik dibandingkan pada jaringan endometrial eutopik dari pasien yang sama. Peningkatan konsentrasi reseptor estrogen pada endometriosis dapat menyebabkan upregulasi Bcl-2, sehingga dapat mencegah terjadinya apoptosis pada sel-sel stroma maupun epitelial (Nishida *et al.*, 2004, 2005).

2.3.7 Bcl-2 associated x (Bax)

Bax merupakan sebuah anggota famili Bcl-2 yang menjadi promotor kerentanan terhadap kematian sel, yang kemungkinan dengan cara kerja berlawanan dengan efek Bcl-2 pada kemampuan hidup seluler melalui interaksi heterodimer. Ekspresi Bax terdeteksi pada sel epitelial stroma jaringan endometriosis dan endometrium eutopik wanita dengan maupun tanpa endometriosis di sepanjang siklus menstruasi tanpa mengubah siklus (McLaren *et al.*, 1997; Goumenou *et al.*, 2004). Bax sangat diekspresikan pada sel epitelial endometriosis ovarium (Fauvet *et al.*, 2003). Goumenou *et al.*, (2001) menemukan sebuah korelasi kuat antara ekspresi Bax yang tinggi dengan Bcl-2 yang rendah pada endometriosis ovarial. Meskipun perbedaan tersebut tidak signifikan secara statistik, ekspresi Bax cenderung menjadi lebih rendah pada kolorektal daripada endometriosis ovarial (Dufournet *et al.*, 2006).

Pada kultur primer, ekspresi protein Bax pada sel stroma endometriosis dari jaringan endometriosis ovarial memiliki kemiripan dengan sel stroma endometrial dari wanita dengan atau tanpa endometriosis (Nishida *et al.*, 2005).

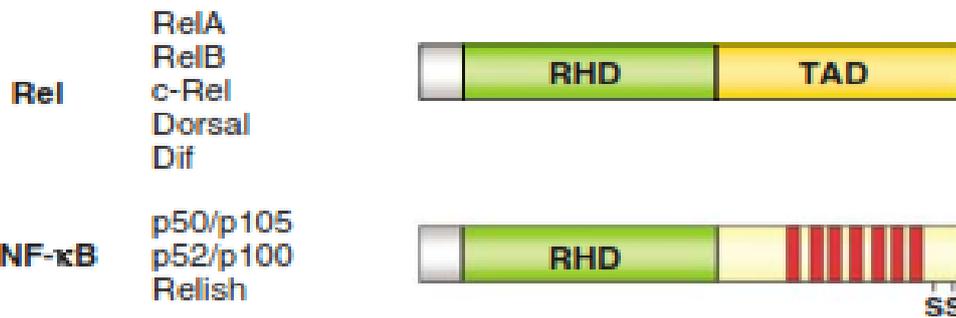
2.4 Nuclear Factor- Kappa Beta (NF- κ B)

2.4.1 Definisi Nuclear- Factor Kappa Beta (NF- κ B)

Nuclear Factor- Kappa Beta (NF- κ B) merupakan famili dari faktor transkripsi yang dapat memodulasi proses inflamasi, imunologi, kelangsungan hidup sel, adhesi, invasi, dan angiogenesis dalam endometrium (Ramos *et al.*, 2012). NF- κ B mengadakan ikatan dengan DNA yang menyebabkan terjadinya transkripsi gen, berkontribusi terhadap tumorigenesis, antara lain: inflamasi, gen anti apoptosis, dan regulator positif proliferasi sel, angiogenesis, metastase secara *in vivo* (Chattopadhyay *et al.*, 2012). NF- κ B pertama kali diidentifikasi oleh Send dan Baltimore tahun 1986 yang ditemukan di dalam nukleus yang berikatan dengan elemen imunologi yaitu rantai kappa di sel B. Namun, akhir- akhir ini, NF- κ B dapat ditemukan ada dalam setiap sel (Prasad *et al.*, 2010).

2.4.2 Famili Nuclear- Factor Kappa Beta (NF- κ B)

Famili NF- κ B protein terdiri dari dua subfamili yaitu protein NF- κ B dan Rel protein. Protein NF- κ B memiliki anggota seperti p105, p100, dan *Drosophila* Relish. Masing-masing anggota dapat dibedakan berdasarkan panjang domain C terminal yang terdiri dari beberapa salinan ankyrin ulangan. Protein NF- κ B ini secara aktif mengikat DNA yaitu p105 untuk p50 dan p100 untuk p52 dengan proteolisis yang terbatas atau kadang-kadang dengan *arrested translation*. Anggota protein NF- κ B umumnya bukan merupakan aktivator transkripsi, kecuali mereka membentuk dimer dengan anggota Rel protein (Gilmore, 2006).



Gambar 2-11 Struktur Kedua Subfamili NF- κ B (Rel dan NF- κ B) (Gilmore, 2006)

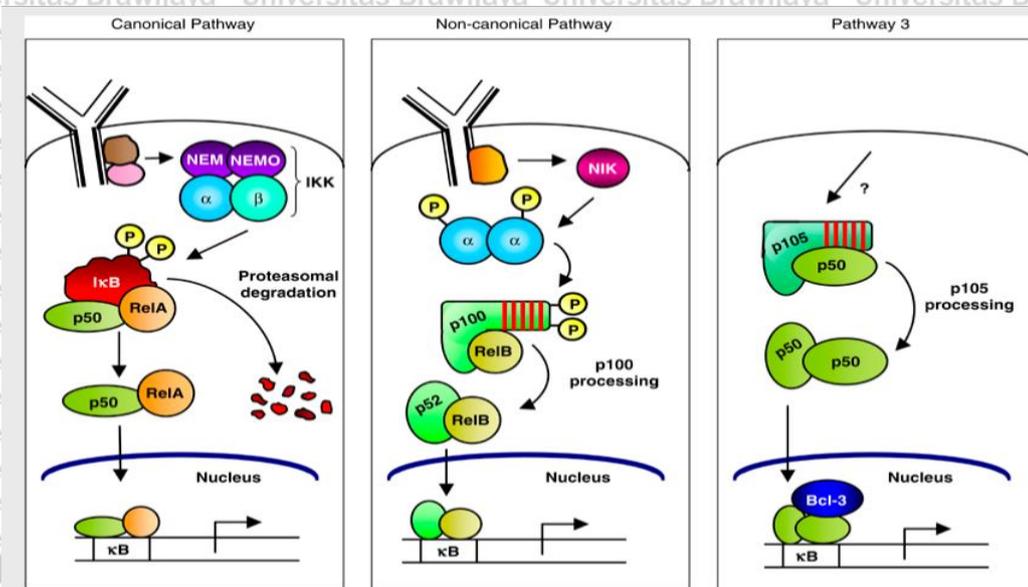
Keterangan: Berdasarkan gambar 2-11 di atas, kedua subfamili (Rel dan NF- κ B) sama- sama memiliki *Rel Homolog Domain* (RHD) yang penting untuk dimerisasi faktor transkripsi NF- κ B. Pada bagian C terminal Rel protein memiliki *transcriptional activation domains* (TAD). Sedangkan bagian C terminal protein NF- κ B memiliki ankyrin ulangan yang memuat *inhibitory domain-domain* (bar merah).

Anggota protein NF- κ B tersebut berbagi domain homolog *conserved Rel* di N terminal yang bertanggung jawab dalam proses dimerisasi, translokasi *nuclear*, ikatan DNA, dan berhubungan dengan *inhibitor* NF- κ B (I κ B protein) (Sas *et al*, 2012). Sedangkan Rel protein meliputi Rel C, Rel B, Rel A (alias p65), *Drosophila dorsal* dan Dif. Rel protein memuat domain C terminal transaktivasi yang seringkali tidak berlangsung kekal pada level sekuen spesies (Gilmore, 2006). Adapun struktur kedua subfamili NF- κ B ditunjukkan pada Gambar 2.17.

2.4.3 Regulasi Aktivasi Nuclear- Factor Kappa Beta (NF- κ B)

Aktivitas NF- κ B diatur melalui interaksi dengan protein *inhibitory* I κ B, dimana interaksi ini mencakup lokalisasi *nuclear* sinyal dari NF- κ B dimer dan mengganggu sekuens yang terlibat dalam pengikatan DNA. Sedangkan aktivasi NF- κ B meliputi dua dan mungkin tiga jalur. Dua jalur utama yaitu jalur klasik (*Canonical*) dan Jalur Alternatif (*Non Canonical*). Tahap awal pengaturan pada kedua jalur tersebut adalah dengan aktivasi kompleks I κ B Kinase (IKK) yang

terdiri dari sub unit katalisis kinase (IKKa dan atau IKKb) dan NF- κ B essential modulator (NEMO) (Gilmore, 2006).



Gambar 2-12 Signal Transduksi NF- κ B (Gilmore, 2006)

Keterangan: Pada jalur **Canonical**, RelA/p50 berinteraksi dengan I κ B, IKK memfosforilasi I κ B yang menyebabkan degradasi oleh struktur sel yang disebut proteasome, dengan adanya degradasi I κ B, kompleks NF- κ B memasuki inti sel untuk mengaktifkan sel target sehingga menghasilkan respon fisiologis, antara lain: peradangan atau respon imun, *cell survival*, atau proliferasi sel. **Jalur Non Canonical** : NF- κ B merangsang NIK yang menyebabkan fosforilasi dan selanjutnya terjadilah pengolahan proteasomal NF- κ B2 dengan prekursor p100 ke sub unit p52, kemudian p52 berikatan dengan Rel B. NF- κ B masuk ke inti untuk menghasilkan sel target. Sedangkan **Jalur tiga** : belum diketahui secara pasti. Pada ketiga jalur , berbagai modifikasi pasca-translasi (misalnya , fosforilasi , dan asetilasi prolyl isomerisasi) dari subunit NF - κ B dapat memodulasi aktivitas transkripsi sel. Semua jalur NF- κ B dilakukan di dalam sitoplasma.

Pada jalur klasik (*Canonical*), melibatkan peran Rel A (p65) yang dapat membentuk dimer dengan p50 maupun p52. Jalur ini dapat diaktivasi secara cepat dan dapat merespon secara akut dari berbagai sinyal (Araki *et al.*, 2008).

Aktivasi jalur klasik NF- κ B melibatkan stimulasi proinflamatori, seperti: IL-1 β , TNF α , lipopolisakarida dari derivat bakteri (Ramos *et al.*, 2012). Jalur alternatif (*Non Canonical*) melibatkan peran Rel B dan p52, dimana aktivasi jalur ini

memerlukan waktu yang lama karena p52 tersedia dalam bentuk prekursor (p100) sehingga diperlukan proses transformasi dari p100 menjadi p52 (Araki *et al.*, 2008). Sedangkan jalur yang belum diketahui secara pasti yaitu jalur 3, dimana p50 maupun p52 homodimers memasuki inti, kemudian keduanya menjadi aktivator transkripsi berdasarkan interaksi dengan *Inhibitor Kappa Beta* ($\text{I}\kappa\text{B}$) seperti *co-activator Bcl-3* (Gilmore, 2006).

2.5 Reseptor Estrogen

2.5.1 Struktur dan Jenis Reseptor Estrogen

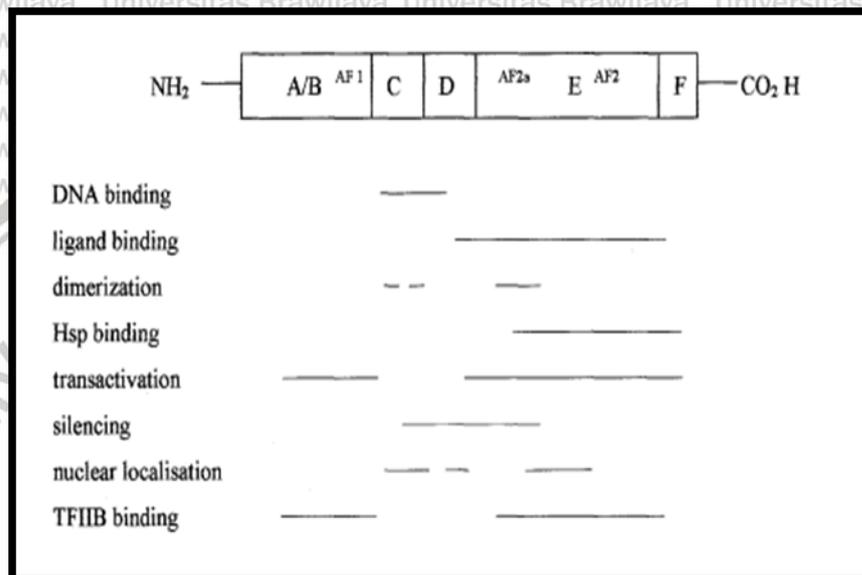
Telah terbukti bahwa aktivitas biologis estrogen diperantarai oleh reseptor estrogen (RE), yang merupakan bagian dari kelompok reseptor inti, dan berfungsi mengaktifkan faktor transkripsi ligan. Reseptor tersebut mempunyai struktur dan fungsi tertentu yang sesuai dengan ikatan ligan, *Estrogen Response Element (ERE)* di DNA dan pola aktivasi proses transkripsi setelah terjadi ikatan antara estrogen (E) dan reseptor estrogen (RE) (Riggs *and* Hartmann, 2003). Reseptor estrogen (RE) berfungsi untuk mengubah dan melanjutkan proses transkripsi gen jika berikatan dengan ligan spesifik (E) dan berkaitan molekul lain yang sesuai yang dinamakan molekul koregulator (koaktivator atau korepresor) (Gruber *et al.*, 2002).

Sampai saat ini ditemukan dua jenis reseptor estrogen, yaitu reseptor estrogen alfa (RE- α) dan reseptor estrogen beta (RE- β). Reseptor estrogen alfa (RE- α) diisolasi tahun 1960-an. Pada tahun 1996 RE- β diisolasi dari prostat tikus yang ternyata homolog dengan RE- α . RE- α dan RE- β mampu melakukan ekspresi gen bila teraktivasi oleh ligan yang sesuai. Pola ini sama seperti pola reseptor hormon steroid lainnya. Reseptor estrogen dapat diidentifikasi di pembuluh darah, uterus, ovarium, vesika urinaria, paru, otak dan tulang. RE- β lebih banyak terdapat pada mukosa intestinal, parenkim paru, sumsum tulang,

tulang, otak, sel endothelial dan kelenjar prostat dan sel endometriosis.

Sedangkan RE- α lebih banyak pada endometrium, payudara, jaringan hipotalamus dan stroma ovarium (Gruber *et al.*, 2002; Bulun *et al.*, 2010)

Struktur RE- α menunjukkan 6 fungsi domain yang berbeda, yaitu A/B, C, D, E, dan F yang menunjukkan 4 fungsi penting : pengikat ligan, dimerisasi, pengikat DNA dan pengaktivasi transkripsi.



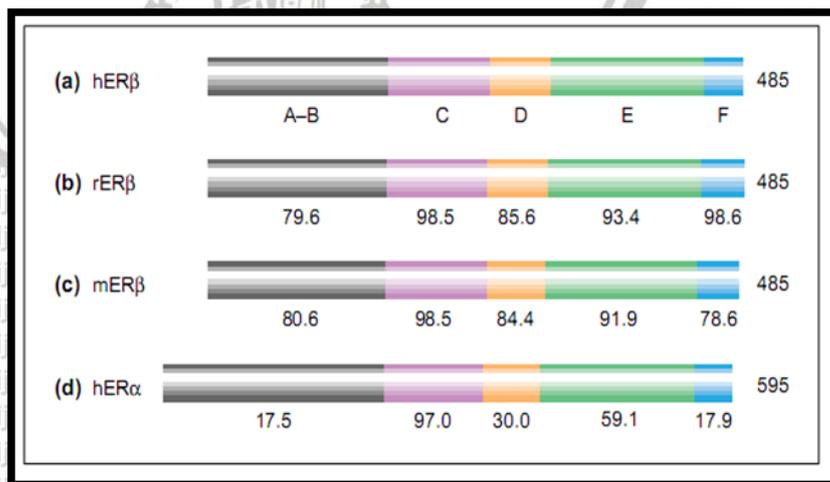
Gambar 2-13 Domain fungsi dari reseptor Estrogen (Rollerova and Urbancikova, 2000).

Keterangan : Susunan reseptor steroid dapat dibedakan menjadi 6 domain : A, B, C, D, E dan F. Didapatkan 4 fungsi penting dari domain-domain tersebut yaitu: pengikat ligan, dimerisasi, pengikat DNA dan pengaktivasi transkripsi .

Hal khusus mengenai RE- β adalah telah dapat diduplikasi dari cDNA prostat tikus oleh Kuiper *et al.* (1996) dan testis manusia oleh Mosselman *et al.* (1996). Reseptor estrogen beta pertama yang lengkap penduplikasiannya berasal dari manusia dan terbukti mengandung 530 buah asam amino. RE- β terletak pada kromosom manusia ke 14. Reseptor estrogen beta ini terbukti sangat serupa dengan RE- α , khususnya pada DBD dan LBD terminal C (Rollerova and Urbancikova, 2000; Gruber CJ *et al.*, 2002).

Bila kedua reseptor tersebut ditemukan secara bersamaan dalam satu jaringan, RE- β berfungsi menurunkan sensitifitas sel terhadap E yang telah berikatan dengan RE- α , seperti yang terjadi pada saluran urogenital, sehingga mekanisme ini memiliki peran perlindungan terhadap hiperproliferasi dan karsinogenesis. Perbedaan dalam distribusi jaringan adalah sangat penting bila ditinjau dari sudut pandang pathogenesis penyakit dan farmakologis suatu obat-obatan. Perkembangan estrogen agonis dengan RE- β yang umum dinamakan modulator reseptor estrogen selektif (*SERM – Selective Estrogen Receptor Modulator*) akan berfungsi pada jaringan yang dituju dan bersifat spesifik namun tidak mempengaruhi jaringan lain (Gruber *et al.*, 2002).

Penemuan RE- β telah membuka jalan yang selama ini tertutup bagi identifikasi isoform RE yang lain. Proses kloning RE- β , yang baru pada manusia yang diambil dari testis, ovarium dan timus. Karakter estrogen yang lebih kompleks menambahkan identifikasi terbaru dari isoform RE- β yang disebut RE- β 2 yang dideteksi dari prostat tikus. Terdapat beberapa temuan varian sambungan RE- β yang telah dilaporkan (Kuiper *et al.*, 1997; Dechering *et al.*, 2000). Susunan domain RE- β tampak pada Gambar 2.14.



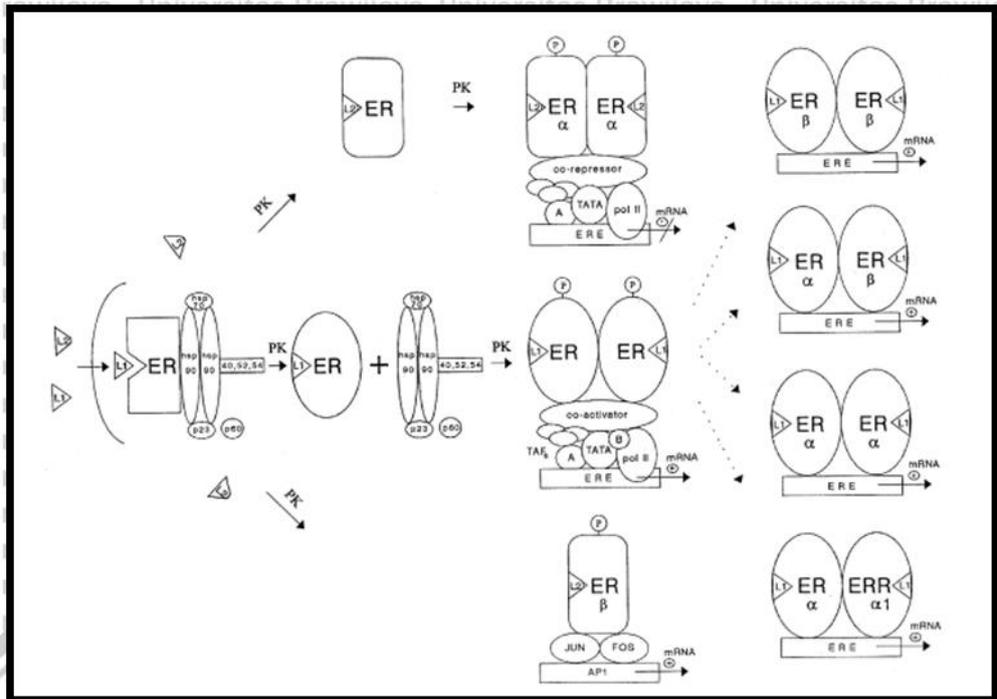
Gambar 2-14 Susunan domain reseptor estrogen beta (RE- β) (Dechering *et al.*, 2000)

Keterangan : Lokasi dari berbagai domain yang berbeda (A-B,C,D,E dan F) ditunjukkan pada (a) hER β dan persentase asam amino yang homolog (memiliki persamaan struktur) antara RE β pada manusia reseptor yang homolog telah teridentifikasi pada tikus dan mencit (b, c). Persamaan struktur antara RE- β dan RE- α (d) ditampilkan sebagai bahan perbandingan. Sebagai catatan bahwa RE- β dari ketiga spesies memiliki persamaan struktur yang signifikan termasuk domain ikatan DNA (C).

RE yang berikatan dengan ligan (E atau SERM), akan mengawali sebuah rangkaian aktivitas proses transkripsi terhadap gen target dengan ERE yang sesuai. Penyatuan kompleks ikatan RE kepada ERE yang sesuai akan menghasilkan formasi/susunan faktor-faktor inti sel yang kompleks (protein regulator) serta aktifasi aktivitas enzim untuk memfasilitasi proses tersebut secara spesifik. Diantara faktor-faktor ko-regulator tersebut terdiri dari ko-aktivator (*activators*) yang bersifat stimuli dan ko-represor yang bersifat menghambat (Gruber *et al.*, 2002; Hanstein *et al.*, 2002; Bulun *et al.*, 2010).

Afinitas relatif dari berbagai estrogen dan SERM terhadap kedua reseptor ini juga berbeda. Tikus yang dihilangkan kedua reseptor ini secara genetik menunjukkan adanya perbedaan fenotip. RE- α dominan pada organ reproduksi sehingga disimpulkan RE- α yang memberikan pengaruh terbesar pada sistem reproduksi (Rollerova *and* Urbancikova, 2000).

Tikus tanpa gen RE- α akan terjadi kekacauan sistim endokrin reproduksinya serta akan terjadi osteoporosis secara dini. Sementara tikus tanpa gen RE- β akan terjadi perubahan kecil pada prostat dan akan terjadi hipertensi. Perubahan formasi dalam bentuk dimer (homodimer atau heterodimer) juga akan menentukan hasil akhir ikatan dengan hormon estrogen atau ligan lain dengan hasil akhir berupa agonis atau antagonis atau agonis parsial dan antagonis parsial seperti tampak pada Gambar 2.15 (Rollerova *and* Urbancikova, 2000).



Gambar 2-15 Sebuah model aktivitas reseptor estrogen (Rollerova and Urbancikova, 2000).

Keterangan : RE yang tidak mengadakan ikatan dengan ligan/E/SERM berada dalam bentuk heterokompleks dengan protein lain antara lain *heat shock protein*, imunofilis dan protein chaperonin tertentu. Ikatan dengan ligan yang bersifat agonis (L.1) mendorong perubahan pola ikatan dengan protein kompleks tersebut dan sifat ini berbeda bila yang mengadakan ikatan dengan RE adalah ligan yang bersifat antagonis (L.2). Reseptor yang telah diaktifkan akan membentuk pola dimer dan melakukan ikatan dengan ERE pada rangkaian DNA yang sesuai. *Protein Kinase* (PK) bereaksi sebagai efek dari adanya ikatan reseptor dan ligan baik permukaan sel maupun di inti sel yang akan memfasilitasi proses fosforilasi jalur transduksi dan memobilisasi protein ko-regulator yang dibutuhkan untuk fungsi reseptor lebih lanjut. Peran protein koregulator adalah untuk pengontrolan efisiensi proses transkripsi dimana protein koregulator yang ada bergantung pada jenis sel dan jenis ligan yang berhubungan dengan aktivitas promotor (agonis/antagonis).

2.5.2 Rasio reseptor estrogen alfa (RE α) dan beta (RE β)

Secara konseptual, RE- α dan RE- β akan berikatan dengan elemen-elemen DNA yang responsif terhadap estrogen (*Estrogen Respons Element-ERE*) dan mengaktivasi promotor yang mengandung ERE sebagai reaksi terhadap 17β -estradiol (EA2) dan ligan lain. Agar terjadi proses transkripsi maksimal, RE- β membutuhkan konsentrasi E₂ sekitar 5 sampai dengan 10 kali lipat dibandingkan RE- α , sehingga dapat disimpulkan bahwa efisiensi RE- β

hanya sebesar 30% dibandingkan RE- α . Contoh nyata di klinik untuk pola ini adalah bahan anti estrogen, tamoksifen, yaitu gabungan agonis/antagonis pada RE- α tapi merupakan antagonis murni pada RE- β (Pettersson *and* Guttafsson, 2001).

2.5.3 Perbedaan Fungsi RE- α dan RE- β

RE- α dan RE- β telah diketahui memiliki perbedaan fungsi. pada tikus betina. RE- α yang rusak akan terjadi kegagalan ovulasi dan ovarium tidak berespon terhadap stimulus gonadotropin. Tikus ini memiliki level estradiol, testosteron dan LH yang rendah. Perkembangan uterus terganggu namun pertumbuhan fisik normal. Tidak didapatkan perkembangan kelenjar payudara. Tikus betina yang tidak memiliki RE- α tidak menunjukkan perilaku seksual yang normal. Perkembangan fisik fetus tetap normal pada tikus yang tidak memiliki RE- α , hal ini menunjukkan bahwa perkembangan fisik fetus ini diatur oleh RE- β (Pettersson *and* Guttafsson, 1995; Gruber *et al.*, 2002).

Eksresi yang berbeda dari RE- α dan RE- β terjadi pada banyak organ, menyebabkan respon yang berbeda dari organ tersebut dan selektif terhadap hormon estrogen. Sel granulosa manusia dari folikel ovarium mengandung RE- β , jaringan payudara mengekspresikan RE- α dan RE- β . Area tertentu di otak mengandung sebagian RE- β , sebagian hanya RE- α dan sebagian RE- α dan RE- β . RE- α banyak ditemukan di stroma ovarium dan jaringan hipotalamus sedangkan RE- β banyak ditemukan di ginjal, otak, tulang, jantung, paru-paru, mukosa intestinal, prostat dan sel endothelial (Speroff, 2005).

RE- α mendominasi RE dalam endometrium baik dalam keadaan normal maupun keganasan, sedangkan RE- β mendominasi pada jaringan payudara. Keadaan yang berbeda tersebut memberikan reaksi yang berbeda pula terhadap pengaruh jenis estrogen dan SERMs, misalnya tamoxifen. Tamoxifen

menyebabkan efek yang berbeda terhadap RE- α dan RE- β , ia bersifat *agonist* bila berikatan dengan RE- α dan antagonis bila berikatan dengan RE- β . Secara logis pemakaian jangka panjang tamoxifen memberikan efek karsinogenik terhadap endometrium karena endometrium banyak mengekspresikan RE- α (Riggs *and* Hartmann, 2003; Rice *and* Whitehead, 2006).

Mekanisme kerja RE- β adalah menurunkan transkripsi gen yang diregulasi RE- α pada beberapa jaringan, sehingga bersifat sebagai antagonis RE- α , namun bila tidak ada RE- α , RE- β dapat berfungsi sebagai regulator RE-

RE- β berfungsi sebagai supresor alami dari RE- α pada jaringan payudara. Kolon hanya mengandung RE- β dan kejadian penurunan resiko keganasan *colon* pada terapi sulih hormon pasca menopause merefleksikan aktivitas antiproliferasi dari RE- β , sedangkan RE- α memiliki aktivitas yang berhubungan dengan proliferasi sel dan karsinogenik pada penyakit tumor dengan estrogen dependent (Rice *and* Whitehead, 2006).

Estrogen yang berikatan dengan RE- α dan RE- β dapat menyebabkan efek yang berlawanan dalam transkripsinya. Contohnya estradiol dapat menstimulasi transkripsi gen RE- α dengan ERE (*Estrogen response element*) yang spesifik, tetapi estradiol menghambat transkripsi gen bila berikatan dengan RE- β pada sistem yang sama. Kesimpulannya bahwa hasil kombinasi tersebut dipengaruhi oleh jenis ligan/ estrogen, RE- α , RE- β dan ERE. Perbedaan RE- α dan RE- β dipengaruhi oleh aktivasi pada *activation function-1* dan 2 (AF-1 dan AF-2) , yaitu suatu domain yang mampu mencampur efek agonis dan antagonis dari estrogen. AF-1 pada RE- α akan menyebabkan efek agonis sedangkan AF-1 pada RE- β akan menyebabkan efek antagonis pada sel. RE- α dan RE- β mempunyai pola ikatan dengan peptida koaktivator dan korepresor secara berbeda sehingga efek yang ditimbulkan juga berbeda (Rice *and* Whitehead, 2006).

Respon jaringan terhadap hormon estrogen berbeda dari satu jaringan dengan jaringan lainnya, seperti antara jaringan endometrium dengan jaringan endometriosis meskipun sama – sama mengekspresikan reseptor estrogen. Perbandingan jumlah RE- α dan RE- β dalam suatu jaringan menentukan respon terhadap estrogen. Dalam permasalahan menopause, endometriosis, kanker payudara, kanker prostat, penyakit kardiovaskuler dan lain – lainnya rasio antara RE- α dan RE- β menentukan respon terhadap terapi (Bulun *et al.*, 2010).

2.6 Model endometriosis

Model hewan coba yang ideal dalam penelitian endometriosis adalah primata, tidak terlalu besar (bukan gorila), tidak agresif (rhesus), mudah dikembangbiakkan, tidak terlalu mahal, defisiensi imun (defisiensi imun berat sel T dan sel B, misalnya tikus SCID). Primata telah secara luas digunakan dalam penelitian endometriosis; namun sangat mahalnya penanganan hewan ini membatasi penggunaan monyet (kera) sebagai model eksperimental. Untuk alasan ini, laboratorium hewan kecil terutama rodent, dikembangkan sebagai model endometriosis. Selanjutnya, rodent imunodefisien (misalnya mencit SCID) sangat berarti dalam studi tentang endometriosis (Yesildaglar, 2011).

Tidak seperti halnya pada primata, mencit tidak mengalami menstruasi, sehingga endometriosis tidak terjadi secara spontan. Namun demikian, penyakit ini dapat diinduksi pada kelinci, hamster, tikus atau mencit dengan mentransplantasikan jaringan endometrium pada lokasi ektopik, baik dengan menggunakan teknik autologus maupun heterologus, seperti yang akan dibicarakan lebih detail dibawah. Model autologus/homologus telah dikembangkan dengan melakukan transplantasi endometrium melalui pembedahan pada hewan imunokompeten yang sama atau sejenis. Sedangkan model heterologus,

fragmen endometrium manusia ditransfer baik secara intraperitoneal atau subkutan pada mencit imunodefisien (Grümmer, 2006; Nowak, 2008).

Model endometriosis autologus pertama kali dilakukan pada kelinci. Pada pendekatan ini, fragmen endometrium yang berasal dari salah satu cornu uterus ditransplantasikan pada peritoneum dan 14 hari kemudian lesi seperti endometriosis dapat dikonfirmasi secara histologi. Vernon dan Wilson mencoba teknik ini pada tikus, menjahit potongan uterus pada peritoneum (1985) dengan hasil yang sama. Pada hamster, dikembangkan dua model transplantasi autologus, satu dengan bahan biopsi uterus pada peritoneum (Steinleitner *et al.*, 1991), lainnya dengan fragmen endometrium ditempatkan pada otot lurik kulit pada rongga lipatan kulit punggung (Laschke *et al.*, 2006). Model hewan coba yang sering digunakan untuk penelitian endometriosis adalah model mencit, baik dengan melalui pendekatan heterologus, autologus ataupun *syngeneic* (Nowak, 2008).

2.6.1 Karakteristik model mencit homologus/ autologus

Autotransplantasi jaringan uterus pada lokasi ektopik pada laboratorium mini telah dikembangkan pada tikus dan mencit (Golan *et al.*, 1984; Vernon dan Wilson, 1985; Rossi *et al.*, 2005). Pada model endometriosis ini, uterus diambil dan dipotong menjadi potongan-potongan kecil yang kemudian dimasukkan kembali, sebagian besar dengan menjahitnya pada rongga peritoneum. Pada sebagian besar penelitian tersebut, endometrium tidak dipisahkan dari miometrium; dengan demikian, kedua kompartemen diimplantasikan (Vernon and Wilson, 1985; Cummings and Metcalf, 1995). Pada tikus, jaringan uterus berkembang menjadi berisi cairan, *ovoid*, struktur kistik yang terdiri dari jaringan miometrium dan endometrium. Kista-kista akan tumbuh dan mencapai ukuran

yang relatif stabil pada bulan ke-2 dan tetap viabel hingga setidaknya 10 bulan (Yesildaglar, 2011).

Pada mencit, fragmen uterus ektopik memperlihatkan karakteristik histologis seperti endometriosis pada manusia, termasuk bentukan multipel, lesi hipervaskular yang mengandung kelenjar, stroma dan kista endometrium, independen dalam lokalisasi peritonealnya di rongga abdomen. (Cummmings dan Metcalf, 1995). Sebuah eksperimen terbatas memisahkan endometrium dari miometrium, dengan hanya menginokulasikan endometrium pada lokasi ektopik, telah dilakukan pada mencit (Somigliana *et al.*, 1999; Hirata *et al.*, 2005).

Keuntungan model ini adalah tingginya *take-rate* karena lesi yang terfiksasi dan mudah ditemukan. Pada studi yang dilakukan Somigliana *et al.*, (1999), jaringan endometrium yang telah diisolasi, dipotong dan dimasukkan ke dalam rongga peritoneum hewan resipien sejenis (*syngeneic*). Keduanya, mencit donor dan resipien telah dilakukan ovariektomi dan menerima terapi estrogen. Pada studi ini, seluruh hewan resipien memperlihatkan bukti adanya endometriosis peritoneal setelah 3 minggu, dan neovaskularisasi dapat ditemukan pada permukaan lesi-lesi. Namun demikian, *take-rate*, yaitu jumlah lesi yang ditemukan kembali setelah sejumlah fragmen endometrium yang telah diinokulasikan secara acak diketahui, rata-rata 30% dari jaringan yang diinokulasikan (Grümmer, 2006; Nowak, 2008).

Untuk identifikasi lokasi dan ukuran lesi endometriosis ektopik yang lebih baik setelah transplantasi, Hirata *et al.* (2005) mengembangkan suatu model mencit homologus dengan menggunakan *green mice* yang seluruh tubuhnya mengekspresikan protein fluoresen hijau (*green fluorescent protein* (GFP)) sebagai donor dan mentransplantasikan jaringan endometrium berfluoresen pada mencit resipien. Jaringan fluoresen ini lebih mudah dideteksi dan secara signifikan lebih tinggi pada mencit yang mendapat suplemen estrogen dibanding

pada mencit kontrol, hal ini mendukung adanya ketergantungan lesi-lesi endometrium ektopik ini terhadap estrogen (Hirata *et al.*, 2005; Grümmer, 2006).

Keterbatasan model-model ini adalah tidak adanya menstruasi dan diikuti dengan endometriosis spontan. Sebagai tambahan, penggunaan seluruh lapisan uterus termasuk miometrium pada model yang dijahit tidak secara tepat menyerupai situasi lesi endometriotik pada manusia. Namun demikian, berbagai macam studi telah dilakukan menggunakan model mencit autologus.

Kesempatan untuk mempelajari kelompok hewan coba yang secara genetik mirip yang lebih besar, dalam tenggang waktu yang lebih panjang, biaya rendah, dan karakteristik gen murine dan sistem imun yang baik, merupakan keuntungan-keuntungan penting dari model ini. Keuntungan lain adalah dapat dimungkinkannya penyelidikan terhadap pengaruh lingkungan seperti dioxin dalam pertumbuhan dan terpeliharanya lesi (Cummings *and* Metcalf, 1996) atau pengaruhnya terhadap infertilitas (Cummings *and* Metcalf, 1996). Model-model ini sangat cocok untuk menguji obat-obat imunomodulator atau komponen anti-inflamasi (Nowak, 2008).

2.6.2 Aplikasi model mencit homologus/ autologus

Telah diketahui bahwa endometriosis merupakan penyakit *estrogen-dependent* pada perempuan, dan penekanan kadar estrogen serum akan menekan pertumbuhan lesi-lesi ektopik tersebut. Jaringan uterus yang diautotransplantasikan menunjukkan ketergantungan terhadap hormon steroid, dan dengan demikian model ini telah digunakan secara luas untuk menentukan responsivitas lesi ektopik terhadap hormon steroid dan obat-obatan yang mengganggu kerja steroid. Pada mencit yang telah diovariektomi 3 minggu setelah transplantasi jaringan uterus, fragmen ektopik mengalami pemulihan

lebih baik pada mencit yang mendapat estrogen saja, dibandingkan dengan mencit yang mendapat kombinasi estrogen dan progesteron (Rice, 2002).

Berdasarkan situasi ini pada perempuan, regresi implan uterus ektopik dapat diinduksi pada mencit dengan membuat kondisi hipoestrogen, contohnya dengan ovariectomi, dengan pemberian GnRH agonis, dengan memberikan terapi komponen progestagen sintetik seperti levonorgestrel atau dienogest atau danazol. Efek serupa dapat diperoleh pada model ini dengan mengurangi konsentrasi estrogen dengan pemberian antiestrogen dengan menggunakan *selective estrogen receptor modulator* (raloxifen) atau dengan memberikan terapi aromatase inhibitor yang mengganggu sintesa estrogen (Nowak, 2008).

Lebih jauh lagi, model mencit autologus telah digunakan secara luas untuk mempelajari obat-obat imuno modulator dan agent anti-inflamasi pada endometriosis membuktikan bahwa uterus autotransplantasi pada mencit, memicu infiltrasi sel-sel yang berhubungan dengan inflamasi alergi pada stroma peritoneum yang melekat dengan jaringan uterus ektopik. Model ini juga membuka peluang untuk meneliti efek kontaminan dari lingkungan, dioxin pada tumbuhnya implan uterus ektopik (Cummings and Metcalf, 1996; Nowak, 2008).

Baru-baru ini, telah dipublikasikan suatu studi yang meneliti efek lesi endometrium ektopik pada perilaku nyeri pada model mencit endometriosis. Disini didapatkan bahwa fragmen kista endometrium ektopik hasil autotransplantasi membuat inervasi sendiri yang terdiri dari serat saraf simpatik dan sensoris, yang mungkin berpengaruh pada sistem saraf secara umum (Grümmer, 2006).

2.6.3 Karakteristik model mencit heterologus

Karena faktor penyebab tumbuh dan terpeliharanya endometriosis dapat berasal dari endometrium itu sendiri dan mungkin tidak terdapat dalam

endometrium rodent, maka telah dikembangkan model dengan mengimplantasikan jaringan endometrium manusia dalam strain mencit imunodefisien. Yang paling luas digunakan untuk tujuan ini adalah mencit polos, dengan defisiensi limfosit T matur. Fragmen endometrium manusia yang sedang dalam fase proliferaatif atau sekresi dari siklus menstruasi (Nisolle *et al.*, 2000; Grümmer *et al.*, 2001) juga endometrium menstruasi (Nisolle *et al.*, 2000) telah berhasil diimplantasikan baik secara subkutan maupun intraperitoneal pada mencit polos. Fragmen-fragmen implan ini dan bentukan lesi seperti endometrium yang sangat mirip dalam penampakan makroskopik maupun histologis dengan pasien, dimana fase dalam siklus menstruasi saat pengambilan jaringan endometrium tidak memiliki pengaruh dalam pertumbuhan lesi ektopik tersebut (Nisolle *et al.*, 2000). Preservasi reseptor estrogen dan progesteron dan responsivitas steroid telah diperlihatkan pada jaringan ektopik manusia (Grümmer *et al.*, 2001). Angiogenesis menjamin terpeliharanya transplan dan transportasi obat-obatan yang diberikan secara sistemik pada jaringan endometrium manusia. Terbentuknya pembuluh darah pada mencit terjadi mulai 4 hari setelah transplantasi dan seterusnya, tidak tergantung pada lokasi lesi ektopik (Grümmer *et al.*, 2001; Hull *et al.*, 2008).

Ketika jaringan endometrium diinokulasikan ke dalam rongga peritoneum secara acak, perlekatan pada peritoneum terjadi mulai 2 hari setelah implantasi dan seterusnya. Lokasi implantasi fragmen endometrium terutama pada usus, otot-otot dinding abdomen, hepar dan jaringan lemak di sekitar organ-organ abdomen (Grümmer *et al.*, 2001;). Namun demikian rata-rata ditemukannya lesi tampaknya sangat bervariasi dari satu hewan coba dengan hewan coba lainnya, rata-rata tidak lebih dari 30% (Bruner-Tran *et al.*, 2002; Grümmer *et al.*, 2001).

Take rate ini diketahui berkurang jika jaringan endometrium telah dilakukan kultur *in vitro* 24 jam sebelum ditransplantasikan; tapi dapat ditingkatkan hingga 100%

dengan menjahit fragmen-fragmen pada berbagai lokasi berbeda di rongga peritoneum (Grümmer *et al.*, 2001). Kondisi ini cukup menjanjikan untuk kepentingan uji coba obat-obatan, karena perbedaan jumlah lesi pada dua kelompok hewan coba dapat terjadi lebih karena perbedaan *take rate* sejak awal eksperimen daripada efek dari obat.

Karena pada model mencit heterologus, jaringan manusia ditransplantasikan, batas waktu untuk memelihara jaringan yang intak dan dalam kondisi utuh dan baik sangat terbatas. Pada sebagian besar studi yang telah dilakukan, kultur endometrium manusia pada mencit polos bertahan tidak lebih dari periode waktu 4 minggu. Sejak 3 minggu setelah inokulasi dan seterusnya, dapat ditemukan dediferensiasi parameter dan infiltrasi limfosit (Grümmer *et al.*, 2001).

Karena pemeliharaan jangka panjang jaringan manusia pada model hewan coba ini akan sangat menguntungkan untuk pendekatan eksperimental yang khusus, mencit dengan sistem imun yang lebih rentan telah dikembangkan sebagai model heterologus untuk endometriosis. Jaringan endometrium manusia telah berhasil ditransplantasikan pada mencit *severe combined immunodeficient* (SCID) (Awwad *et al.*, 1999) seperti halnya pada mencit SCID *non-obese diabetic* (NOD) (Grümmer *et al.*, 2001), yang mana keduanya memperlihatkan kombinasi defisiensi kongenital dalam fungsi limfosit T dan B. Dibandingkan dengan model mencit polos, endometrium manusia yang diimplantasikan pada tikus SCID/NOD-SCID memperlihatkan lebih tingginya *take rate* fragmen-fragmen dan morfologi yang terpreservasi dengan lebih baik dan mengekspresikan reseptor hormon steroid lebih dari 4 minggu (Grümmer *et al.*, 2001). Walaupun mencit model ini sangat kekurangan limfosit B dan T, mereka memiliki beberapa aktivitas sel *natural killer* (NK). Baru-baru ini, Matsuura-Sawada *et al.*, (2005) melakukan kultur jaringan endometrium manusia secara subkutan pada mencit

imunodefisien NOD/ SCID/ γ C^{null} (NOG) yang ditambahi dengan defek pada aktivitas sel NK. Pada model ini, mereka membuat suatu siklus menstruasi manusia buatan yang terdiri dari 28 hari dengan pemberian hormon pada hewan coba yang sudah dilakukan ovariektomi. Secara histologi, tampak bahwa perubahan siklik juga didapatkan pada endometrium eutopik manusia tetapi tanpa tanda-tanda desidualisasi (Matsuura K *et al.*, 1999).

Greenberg dan Slayden (2004) mengimplantasikan jaringan endometrium manusia secara subkutan pada mencit transgenik *recombinase-activating gene-2 knockout* [RAG-2/ γ (c)KO], yang tidak hanya kekurangan limfosit T dan B namun juga kekurangan sel-sel NK. Hanya spesimen biopsi endometrium yang mengandung kelenjar endometrium yang dapat berkembang menjadi lesi yang visibel. Lesi peritoneum merah, namun bukan spesimen biopsi endometrioma ovarium, membentuk pertumbuhan yang pesat. Pada model hewan coba endometriosis, mereka membuat empat siklus berturut-turut yang menyerupai siklus menstruasi manusia dengan cara memberikan estrogen dan progesteron melalui kapsul-kapsul yang melepaskan hormon tersebut. Potongan implan yang tumbuh memiliki vaskularisasi yang baik dan reseptor-reseptor hormon steroid yang terpelihara baik.

2.6.4 Aplikasi model tikus heterologus

Model hewan coba endometriosis yang berbasis *xenotransplantation* dari jaringan endometrium manusia membuka peluang untuk menerangkan berbagai mekanisme yang terlibat dalam terjadinya endometriosis dan menguji efek komponen terapi potensial pada jaringan manusia. Salah satu pendekatan untuk mencegah pertumbuhan endometriosis peritoneal dapat ditujukan pada perlekatan jaringan endometrium dan invasinya pada dinding peritoneum. MMPs terlibat dalam proses invasi tersebut (Hudelist *et al.*, 2005). Selain itu juga dapat

dijelaskan bahwa MMPs diregulasi oleh hormon steroid dan sitokin pada jaringan endometrium. Dan supresi MMPs menghambat bertahannya lesi ektopik dari jaringan endometrium manusia pada tikus putih (Bruner-Tran *et al.*, 2002).

Target yang akan dicapai adalah luas daerah implan, pertumbuhan pembuluh darah-pembuluh darah baru dan ekspresi berbagai *marker* sel endometrium. *Xenograft* endometrium pada mencit polos ternyata memproduksi kadar kadar VEGF yang tinggi (Nisolle *et al.*, 2000), dan agen anti angiogenik seperti reseptor *soluble* VEGF (sflt-1) dan antibodi VEGF-A yang secara signifikan menghambat pertumbuhan lesi endometrium ektopik pada mencit polos (Hull *et al.*, 2003).

Berlawanan dengan model mencit homologus, mencit yang digunakan sebagai model heterologus memiliki sistem imun yang defisien dan sehingga sangat sulit bila digunakan dalam studi untuk mengevaluasi efek obat-obatan imuno-modulator. Pemberian penghambat COX-2, yang diketahui meningkatkan regulasi pada lokasi inflamasi, tidak memiliki pengaruh terhadap jumlah ataupun ukuran lesi endometrium ektopik pada mencit polos (Hull *et al.*, 2005). Namun demikian komponen anti-inflamasi, yang terkandung dalam cairan peritoneum perempuan dengan endometriosis, dapat diteliti dalam model ini. Tabibzadeh *et al.* (1999) memaparkan bahwa sel-sel endometrium yang dilarutkan dalam cairan peritoneum perempuan tanpa endometriosis secara signifikan membentuk lebih sedikit lesi ektopik jika dibandingkan lesi ektopik yang dibentuk dari sel-sel endometrium yang dilarutkan dalam cairan peritoneum perempuan dengan endometriosis setelah injeksi intraperitoneal pada mencit polos (Nowak, 2008).

2.6.5 Evaluasi model heterologus

Model ini memiliki beberapa keuntungan yang sama dengan yang didapat dari model homologus, seperti mudah didapat dan biaya murah, dan beberapa

keterbatasan seperti perbedaan fisiologi antara manusia dan tikus/mencit.

Namun demikian, model heterologus tidak memiliki sistem imun yang intak.

Selanjutnya, model mencit endometriosis heterologus merupakan sarana yang menjanjikan untuk pendekatan eksperimental untuk mengevaluasi penyebab penyakit ini dan menguji efek terapi preparat farmakologi dan regulasi hormon karena model ini berbasis endometrium manusia. Untuk penelitian ini jaringan endometrium manusia dapat diambil dari perempuan dengan dan tanpa endometriosis, serta dari lesi endometriosis. Mekanisme regulasi, misalnya setelah pemberian obat, dapat dievaluasi pada jaringan ektopik manusia dalam kondisi *in vivo*. Penelitian jangka panjang yang tidak mungkin dilakukan pada manusia dapat dilakukan pada model ini, dan dapat diatur status hormonal menyerupai siklus menstruasi manusia pada hewan coba yang telah dilakukan ovariectomi (Nowak, 2008).

Metode terbaru dengan menggunakan fluoresensi memungkinkan pencitraan *in vivo* dan dapat meningkatkan kualifikasi baik ukuran maupun jumlah lesi ektopik. Sebagai tambahan, saat ini teknik menggunakan *magnetic resonance imaging* (MRI) untuk monitoring *in vivo* terhadap lesi sedang berkembang (Nowak, 2008).

2.6.6 Induksi endometriosis pada mencit yang mengalami penekanan sistem imun dan tikus *Severe Combined Immunodeficient* (SCID)

Kemampuan untuk melakukan transplantasi endometrium manusia pada hewan membuka kesempatan menarik dengan beberapa keuntungan dari hewan coba yang sudah ada, namun tetap dibatasi oleh reaksi penolakan imunologis terhadap jaringan implan. mencit yang mengalami penekanan sistem imun menawarkan kesempatan yang unik untuk mempelajari perilaku dan ekspresi biokimia endometrium manusia jika ditransplantasikan pada lokasi ektopik *in*

vivo. Mencit *Severe Combined Immunodeficient* (SCID) memiliki suatu kombinasi defisiensi fungsi limfosit-T dan limfosit-B kongenital, dan telah berhasil menjadi *host* untung bermacam-macam *heterotransplant*. SCID adalah suatu kelainan kongenital pada individu, dimana terjadi ketidakmampuan dalam memberikan respon imun spesifik terhadap antigen yang penting untuk melindungi diri dari penyakit infeksi oleh karena adanya limfosit gagal berdiferensiasi menjadi limfosit matur, karena terjadi mutasi pada *recombinase-activating genes* 1 dan 2, atau *deoxyribonucleic acid* (DNA)-*dependent protein kinase* (DNA-PK). Kondisi ini juga terjadi jika limfosit yang berdiferensiasi tidak mampu melengkapi jalur sinyal transduksi karena defek pada reseptor permukaan sel untuk interleukin (IL). Mutasi spontan pada DNA-PKcs dari tikus BALB/c menghasilkan kondisi SCID, dan hal yang sama terjadi pula pada eksperimen yang menginduksi mutasi dalam RAG1 dan RAG2 (Nowak, 2008).

Jaringan manusia yang ditransplantasikan secara serial pada mencit SCID ternyata mempertahankan karakteristik morfologi dan biokimianya. Implan endometrium manusia pada mencit SCID memperlihatkan karakteristik histologi, fisiologi dan biokimia spesifik sesuai jaringan asalnya, sehingga dapat disimpulkan bahwa mencit SCID merupakan model hewan coba yang menarik untuk mempelajari endometriosis (Awwad *et al.*, 1999).

Sebuah studi yang dilakukan di Laboratorium reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, 2010; membuktikan bahwa model mencit yang mendapatkan suntikan Siklosporin A, dengan dosis 10 mg/kg/hari, satu kali selama 1 minggu sebelum perlakuan, dapat menyebabkan penurunan imunitas mencit sehingga tidak terjadi reaksi penolakan implan seperti halnya pada mencit SCID (Sa'adi A, 2010).

2.7 Genistein

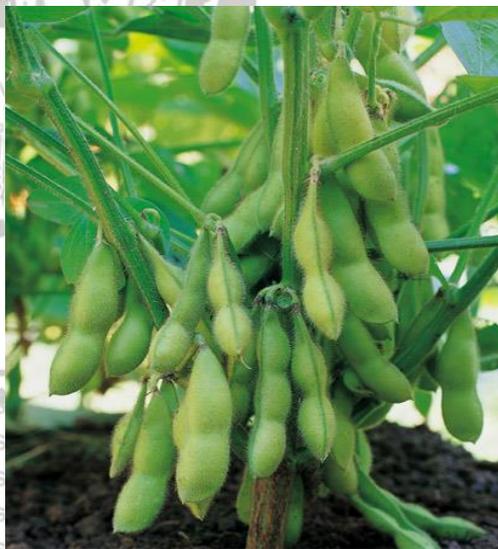
2.7.1 Sejarah Penemuan sampai dengan Aplikasi Genistein

Pada tahun 1931, Walz menemukan fitoestrogen pada kacang kedelai (Walz, 1931). Tahun 1946 ditemukan bahwa isoflavon termasuk genistein yang dapat menyebabkan infertilitas pada domba di daerah Australia barat, yang akhirnya dikenal sebagai “*clover disease*”. Setelah 40 tahun berselang, masalah yang berhubungan dengan reproduksi yang sama terjadi disertai dengan penyakit oklusi vena liver pada binatang chitah yang mendapat diet kacang kedelai. Hal ini menunjukkan bahwa genistein yang berasal dari kedelai memiliki aktivitas estrogenik yang rendah. Akhirnya pada tahun 1987, dinyatakan bahwa senyawa ini merupakan suatu inhibitor poten yang spesifik pada enzim protein tirosin kinase (Jung *et al.*, 2011). Berbagai pro dan kontra muncul sejak saat itu. Namun yang jelas penemuan bahan ini dapat membawa sinar terang dalam pencegahan dan pengobatan kanker.

Pada tahun 1989, Markovits melaporkan bahwa genistein dapat menjadi inhibitor topoisomerase II, yaitu suatu enzim nuklear yang terlibat dalam replikasi seluler (Markovits *et al.*, 1989; Jung *et al.*, 2011). Disusul pada 4 tahun kemudian, ditemukan aktivitas genistein sebagai modulator pada sel-sel MDR (multi drug resistant) non-Pgp, yaitu suatu resistensi multiobat yang dimediasi oleh non P-glikoprotein), serta sel-sel MDR Pgp. Zhou *and* Lee (1998) menemukan bahwa genistein dapat menghambat ekspresi gen-gen stres sehingga berhubungan dengan respon sel-sel kanker terhadap stress. Hal ini dikukuhkan oleh *National Cancer Institute* (NCI) sebagai obat antikanker yang potensial (Lee *et al.*, 2012).

Pada tahun 1995, divisi pencegahan dan pengaturan kanker, NCI, merekomendasikan genistein untuk dikembangkan sebagai agen kemopreventif terhadap kanker. Berbagai perusahaan makanan mengembangkannya dalam bentuk ekstrak kedelai sebagai makanan tambahan harian yang sehat dan menguntungkan. Berbagai penelitian juga telah dilakukan untuk membuktikan kemampuan makanan produk kedelai (*soy food*) sebagai produk makanan untuk terapi preventif penyakit keganasan (Nechuta *et al.*, 2012).

Kandungan isoflavon dalam kedelai diketahui sebesar 1,2 - 4,2 mg/gram protein kedelai (Prakash *and* Gupta, 2011). Sedangkan konsentrasi genistein dalam isoflavon kedelai adalah antara 0,2–1 mg/g, yang sebagian besar berasal dari konjugat glikosidik (Barnes *et al.*, 1995). Genistein juga dihasilkan oleh spesies *Trifolium*, namun juga dapat dihasilkan dari fermentasi beberapa mikroorganisme (*Streptomyces* sp, dan *Pseudomonas* sp.). Awalnya, genistein diketahui memiliki aktivitas estrogenik sehingga disebut sebagai fitoestrogen.



Gambar 2-16 Tanaman Kedelai Golongan *Leguminoceae* sebagai Sumber Isoflavon terutama Genistein.

Keterangan: Genistein merupakan golongan isoflavan yang terdapat dalam kedelai dan lebih dikenal dengan sebutan fitoestrogen (Genistein.net, 2013).

2.7.2 Peran Biologis Genistein

Berbagai percobaan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa genistein mempengaruhi jalur biokimia dengan pola aktivitas yang kompleks dan melalui berbagai arah (*multidirection*). Sejumlah target biokimia genistein adalah protein tyrosine kinase, topoisomerase II, enzim-enzim yang bekerja dalam perubahan fosfatidilinositol, reseptor-reseptor estrogen, transporter ABC, dan protein-protein lain seperti: ribosomal S6 kinase; faktor nuklear Y/CCAAT; TGF- β ; CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*); aromatas; tipe I 17 β -hidroksisteroid oksidoreduktase (Polkowski and Mazurek, 2000). Genistein memiliki efek pleiotrofik pada proses metabolik, inflamasi, dan proses keganasan (Nagaraju *et al.*, 2013).

Secara keseluruhan riset-riset yang telah dilakukan menunjukkan bahwa genistein mempunyai peranan sebagai berikut :

- a. Induksi apoptosis
- b. Induksi diferensiasi
- c. Inhibisi proliferasi sel
- d. Modulasi progresivitas siklus sel,
- e. Efek antioksidan
- f. Anti resistensi multiterapi pada obat-obatan antikanker
- g. Inhibisi angiogenesis
- h. Supresi aktivitas osteoklastik
- i. Supresi aktivitas limfosit dan proliferasi
- j. Stabilisasi mast cells dan bahan anti-inflamasi

2.7.3 Target Molekul Genistein

Protein-protein yang dipengaruhi secara langsung oleh genistein meliputi beberapa famili, diantaranya adalah reseptor nukleus, protein tirosin-spesifik

kinase, topoisomerase, transporter ABC dan protein-protein transpor yang terdapat dalam aliran darah. Mekanisme genistein pada tingkat molekuler ditunjukkan melalui perannya dalam menghambat sejumlah enzim-enzim intraseluler. Sebagian besar adalah golongan enzim yang mekanisme kerjanya memakai ATP yaitu seperti protein tirosine kinase, topoisomerase II, fosfatidilinositol kinase, transporter dan ABC. Mekanisme ini dapat melalui ikatan genistein terhadap rantai senyawa tinggi pada area pengikatan ATP, sehingga menyebabkan suatu inhibisi kompetitif terhadap ATP (Akiyama *et al.*, 1987).

Tabel 2-4 Ikatan Genistein dan Berbagai Protein Beserta Jenis Pengaruhnya terhadap Aktivitas Kerja Protein

| Kelas Protein yang terikat Genistein | Protein | Pengaruh pada Aktivitas Protein | Afinitas Ikatan (Ki) atau Konsentrasi inhibitori 50% (IC50) | Sumber |
|--|----------------------|---------------------------------|---|---|
| Reseptor Estrogen | ER-α | Agonis | Ki=370 nM IC50=1.97-14 μM | Matsuda <i>et al.</i> , 2001, Güngör <i>et al.</i> , 2006, Kostelac <i>et al.</i> , 2003 |
| | ER-β | Agonis Parsial | Ki=24nM; IC50=1.3-395 nM | Pike <i>et al.</i> , 1999, Matsuda <i>et al.</i> , 2001, Chesworth <i>et al.</i> , 2005; |
| | ERR-α | Agonis | IC50=2.4 μM | Mewshaw <i>et al.</i> , 2007 Suetsugi <i>et al.</i> , 2003 |
| Estrogen related Receptors | ERR-β | Agonis | IC50>10 μM | Suetsugi <i>et al.</i> , 2003 |
| | ERR-γ | Agonis | IC50>10 μM | Suetsugi <i>et al.</i> , 2003 |
| Peroxisome proliferator activator receptor | PPAR-γ | Agonis | Ki=5.7 μM IC50=16.7 μM | Dang <i>et al.</i> , 2003, Salam <i>et al.</i> , 2008 |
| | Reseptor Androgen | RA | Tanpa Aktivitas transkripsi | Ki>>1 μM |
| Reseptor Liver X | LXR-α | Agonis | IC50=31 μM | Dodo <i>et al.</i> , 2008 |
| Tirosin kinase | LXR-β | Agonis | IC50=22 μM | Dodo <i>et al.</i> , 2008 |
| | EGFR | Inhibitor | IC50=22 μM | Akiyama <i>et al.</i> , 1987 |
| | Pp60 v-src | Inhibitor | IC50=26 μM | Akiyama <i>et al.</i> , 1987 |
| | Pp110 | Inhibitor | IC50=24 μM | Akiyama <i>et al.</i> , 1987 |
| | gag-fes | Inhibitor | IC50=0,4 μM | Xu <i>et al.</i> , 2009 |
| | MEK4 | Inhibitor | IC50=10 μM | Traxler <i>et al.</i> , 1995 |
| | ABL Protein kinase C | Inhibitor | IC50=15 μM | Traxler <i>et al.</i> , 1995 |
| | Tyrosine Kinase Syk | Inhibitor | IC50=39 μM | Xie <i>et al.</i> , 2009 |
| FGF receptor 1 | FGF1 | Inhibitor | IC50<25 μM | Rao, 1997 |
| Kanal ion | CFTR | Potensiator | Ki=1,8 μM | Melani <i>et al.</i> , 2010 |
| Transporter glukosa | GLUT1 | Inhibitor | Ki=4-12 μM | Afzal <i>et al.</i> , 2002; Vera <i>et al.</i> 1996 |

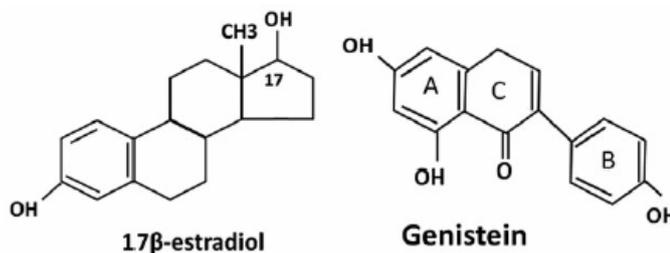
| | | | |
|-----------------------------|--|---|---|
| GLUT4 | Inhibitor | IC50=20 µM | Bazuine <i>et al.</i> , 2005 |
| protein MDR ABC G2 | Substrat | n.a | Imai <i>et al.</i> , 2004; Zhang <i>et al.</i> , 2004; Perez <i>et al.</i> , 2009 |
| Topoisomerase I | Topo I Inhibitor | n.a. | Okura <i>et al.</i> , 1988 |
| Topoisomerase II | Topo II α Inhibitor | IC50<30 µM | Bandeled & Osheroff, 2007 |
| | Topo IIβ Inhibitor | IC50=30 µM | Constantinou <i>et al.</i> , 1995; Okura <i>et al.</i> , 1988; Markovitz <i>et al.</i> , 1989 |
| Bacterial gyrase | Inhibitor | IC50>200 µM | Bernard <i>et al.</i> , 1997 |
| Bacterial topo IV | Inhibitor | IC50=93 µM | Bernard <i>et al.</i> , 1997 |
| Reseptor adenosine | A1 Inhibitor | IC50=2.6 µM | Schulte & Fredholm, 2002 |
| | A2A Inhibitor | IC50=15.3 µM | Schulte & Fredholm, 2002 |
| Aromatase | Cyp 19 Inhibitor | Ki=100 µM | Paoletta <i>et al.</i> , 2008 |
| Tubulin | Tubulin Inhibitor polimerisasi | Ki=20 µM IC50>87 µM | Mukherjee <i>et al.</i> , 2010 |
| Ornithine decarboxylase | ODC Inhibitor | >10 µM | Fang & Cassida, 1999 |
| Ornithine decarboxylase | ODC Inhibitor | >10 µM | Fang & Cassida, 1999 |
| Sex hormonebinding globulin | hSHBG Competitive binding terhadap testosterone dan estradiol | Ka=1.7x105 M ⁻¹ (Testosteron) Ka=6.3 x105 M ⁻¹ (estradiol) | Dechaud <i>et al.</i> , 1999 |
| Albumin | HSA | K=2.4x104 M ⁻¹ | Mandeville <i>et al.</i> , 2009; Bian <i>et al.</i> 2004 |
| Haemoglobin | | n.a. | Yuan <i>et al.</i> , 2008 |
| Transthyretin | TTR Competitor T4 | Ki=70nM | Radovic <i>et al.</i> , 2006 |
| | Stabilisator tetramer | Kd1=40 nM, Kd2=1.4 µM | Green <i>et al.</i> , 2005 |

(Disadur dari Sourial *et al.*, 2014)

Genistein juga dapat memodulasi berbagai proses biokimia di dalam sel dianggap karena struktur dan fungsinya yang menyerupai estrogen, yaitu hormon steroid wanita yang telah diketahui memiliki berbagai peran penting dalam kehidupan seluler (Polkowski *and* Mazurek, 2000).

2.4.3 Struktur Molekul dan Biologis Genistein

Genistein adalah sebuah fitoestrogen yang pertamakali ditemukan oleh Perkin dan Newburry pada tahun 1899. Pada awalnya genistein diisolasi dari tanaman spesies *Genista tinctoria* (dyer's broom), yang tampaknya memiliki kemiripan struktur dengan estrogen (Kuiper *et al.*, 1998). Terdapat dua lingkaran benzen, yang terikat pada sebuah lingkaran piran heterosiklik, sehingga membentuk dasar dari inti flavon. Fenol C4' dan C7 genistein memiliki struktur dan fungsi yang memiliki kemiripan dengan kelompok -OH aktif pada 17 β -estradiol (Trivella DB *et al.*, 2010). Oleh karena itu, genistein berkompetisi dengan 17 β -estradiol pada *estrogen receptor binding assay*. Afinitas ikatan genistein pada reseptor estrogen- α adalah 4% sedangkan pada reseptor- β adalah 87% jika dibandingkan dengan ikatan pada estradiol (Kuiper *et al.*, 1998).



Gambar 2-17 Struktur Generik 17- β -estradiol dan Genistein (Kuiper *et al.*, 1998)

Oleh karena genistein memiliki aktivitas yang bersifat agonis terhadap RE- β , maka genistein memiliki potensi manfaat yang besar (Myung *et al.*, 2009).

Setelah dikonsumsi, genistein akan dimetabolisme sehingga berubah menjadi dihydrogenistein dan 6-hydroxy-O-desmethylangolensin. Farmakokinetik dan farmakodinamik genistein telah banyak dievaluasi pada penderita kanker dan subyek yang sehat. Sesaat setelah mengkonsumsi isoflavon dari kacang-kacangan unkonjugated (yang mengandung genistein) pada penderita kanker, konsentrasi genistein dalam plasma tampaknya memiliki aktivitas antineoplastik

dimana pada studi *in vitro* konsentrasi tersebut adalah aman. Efeknya pada reseptor estrogen, genistein dapat menghambat beberapa protein tirosin kinase dan beberapa jalur seluler (Suetsugi *et al.*, 2003).

2.4.4 Efek Pleiotropik Genistein

Genistein merupakan sebuah isoflavan yang secara biologis bersifat aktif, yang memiliki mikronutrient aktif yang diperkirakan memiliki sifat pleiotropik dalam perbaikan kesehatan manusia. Genistein dikaitkan dengan efek anti-adipogenik, yang diyakini memiliki potensi besar menghambat terjadinya sindroma metabolik. Genistein dipercaya memiliki peran dalam terjadinya penurunan kadar sitokin pro-inflamasi dan berbagai *reactive oxygen species* (ROS), peran pada proses antiinflamasi dan antioksidan (Węgrzyn *et al.*, 2010).

Pada tingkat selular, disebutkan bahwa inflamasi kronik, sindroma metabolik, dan karsinogenesis memiliki jalur yang sama yang dapat menerangkan hubungannya dengan proses terjadinya obesitas, diabetes, penyakit inflamasi dan kanker (Jung *et al.*, 2011). Peran genistein adalah melalui modulasi berbagai jalur selular tersebut, yang bersifat multifaceted (melalui berbagai jalur), sehingga dapat menurunkan resiko kanker, penyakit inflamasi dan gangguan metabolik.

Genistein memiliki peran dengan fungsi pleiotropik pada kanker, metabolisme dan inflamasi dan menghasilkan efek antikardiogenik melalui banyak mekanisme. Genistein mempengaruhi homeostasis lipid dan resistensi insulin, melawan sitokin inflamasi, dan memiliki properti antidiabetik. Fungsi genistein sebagai agen antineoplastik adalah melalui efeknya pada siklus sel, proses apoptosis seluler, angiogenesis, invasi dan metastasis. Mekanismenya meliputi modulasi berbagai jalur yang berbeda seperti Akt, NF- κ B, MMPs dan jalur signaling Bax/Bcl-2. Meskipun efek preklinik genistein sangat menjanjikan, studi masih diperlukan studi klinis untuk membuktikan efek genistein pada

berbagai kondisi. Saat ini dimana biaya kesehatan menjadi hal yang diperhitungkan, produk natural seperti genistein memiliki peluang besar dan cukup menjanjikan untuk digunakan sebagai upaya preventif maupun terapi terhadap berbagai penyakit yang paling banyak menyebabkan morbiditas dan mortalitas, seperti diabetes, obesitas, kanker, dan penyakit aterosklerotik. Perkembangan makna klinis genistein telah menghadapkan kita pada beberapa tantangan diantaranya adalah tidak adanya standard formula, pendanaan yang minimal, serta sedikitnya penerimaan genistein oleh para klinisi (Nagaraju *et al.*, 2013).

2.4.5 Peran Genistein dalam Menginduksi Apoptosis

Suatu fenomena pengobatan proliferasi sel kanker oleh genistein adalah melalui jalur apoptosis. Hal ini ditunjukkan oleh isoflavon dalam aktivitasnya berikut ini:

- Inhibisi topo II dan memicu patahnya rantai DNA
- Perusakan terhadap siklus sel
- Inhibisi protein tirosine kinase, karena enzim ini diketahui mampu melindungi sel-sel dari proses apoptosis.
- Mempengaruhi kaskade fosfatidilinositol pada transduksi sinyal
- Mengubah faktor pengikat Y/CCAAT menjadi bentuk inaktif sehingga dapat menurunkan ekspresi gen-gen stress.

2.4.5.5 Genistein pada sel Kanker

Peranan genistein dalam menginduksi apoptosis banyak dipelajari mekanismenya pada sel kanker. Beberapa peneliti menunjukkan adanya peluang besar genistein untuk digunakan dalam upaya preventif maupun terapi oleh karena efek biologisnya yang mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker.

Pada studi preklinis, telah dibuktikan bahwa genistein dapat menghambat pertumbuhan beberapa sel kanker (Pagliacci *et al.*, 1994; Peterson *and* Barnes, 1996). Disamping itu, telah diketahui genistein memiliki fungsi sebagai agen kemopreventif yang potent dengan kemampuan untuk mencegah karsinogenesis.

Beberapa studi *in vivo* berhasil menunjukkan adanya efek anti-kanker genistein. Telah dibuktikan bahwa diet kacang-kacangan dapat menghambat adenokarsinoma prostat dan menurunkan proliferasi sel tumor serta angiogenesis pada tikus (Zhou *et al.*, 1999). Diet genistein dan daidzein menghambat metastase sel melanoma pada tikus C57Bl/6. Genistein dan konsentrat kacang-kacangan kaya isoflavon efektif dalam menurunkan ukuran tumor lebih dari 50%. Penurunan ini dikaitkan dengan adanya proses induksi apoptosis sel dan penghambatan angiogenesis pada sel kanker kandung kemih dari 253J *BV-induced tumor*. Genistein menjadi senyawa protektif dalam melawan efek jangka panjang penggunaan psoralen dan radiasi ultraviolet A, yang berkaitan dengan peningkatan resiko kanker jenis squamous cell carcinoma dan melanoma maligna. Genistein dipercaya memiliki efek pada siklus sel, efek apoptosis, jalur signaling sel (seperti NF- κ B, AP-1 dan Akt), angiogenesis dan metastasis, serta memiliki efek epigenetik (Lu *et al.*, 1996).

2.4.5.6 Genistein dan Efek Pro-apoptosis

Genistein menginduksi apoptosis pada beberapa garis jenis sel, termasuk diantaranya adalah kanker payudara, *non-small-cell lung cancer*, kanker pankreas, dan kanker sel squamous kepala dan leher (Lu *et al.*, 1996). Sejauh ini analisis mekanistik telah mengungkapkan adanya downregulasi ekspresi protein Bcl-2, upregulasi ekspresi Bax, dan aktivasi kaspase yang kesemuanya merupakan komponen penting dari apoptosis yang dimediasi oleh genistein.

Genistein juga memediasi terjadinya inhibisi proteosom serta menginduksi

p27KIP1, inhibitor *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B), dan pro-apoptosis protein Bax (Kim *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2004). Genistein juga menginduksi rusaknya DNA dan apoptosis pada sel kanker ovarium dengan cara memodulasi fosforilasi dan aktivasi p53, dengan menurunkan Bcl-xL/Bax dan rasio Bcl-2/Bax, serta dengan mengurangi level Akt terfosforilasi (Pagliacci *et al.*, 1994). Genistein menghambat ekspresi p53 disfungsi dan meningkatkan ekspresi p21 pada sel kanker payudara MDA-MB-231, dimana diketahui dengan reseptor estrogen negatif dan p53 yang mengalami mutasi (Banerjee *et al.*, 2008). Yeh *et al.*, (2007) mendemonstrasikan sebuah penelitian bahwa genistein menginduksi aktivitas berbagai regulator stres retikulum endoplasma, termasuk diantaranya m-calpain, GADD153, GRP78, dan kaspase-12 pada garis sel kanker hepatoseluler. Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa terdapat jalur multipel yakni genistein yang memediasi induksi apoptosis, termasuk stres retikulum endoplasma, aktivasi kaspase, menghambat proteosom, dan men-downregulasi Bcl-2 dan Bcl-xL.

2.7.3.1 Peran Genistein pada Berbagai Tinjauan Pustaka

Dalam tinjauan pustakanya, Wang *et al* (2010) menyebutkan bahwa genistein juga dapat menginduksi terjadinya apoptosis pada sel-sel tumor hematologi melalui berbagai mekanisme namun dapat melindungi sel normal dari toksisitasnya. Genistein juga merupakan penghambat pertumbuhan yang kuat terhadap sel tumor payudara, prostat, pankreas, melanoma dan ginjal secara *in vitro* (Wang *et al.*, 2010).

Sebuah tinjauan pustaka mengenai beberapa studi mengenai pengaruh genistein terhadap kardioavaskuler pada kultur sel endotel tali pusat, binatang coba dan pada manusia, Cano (2010) dan Yuan-jing (2009) mendapatkan hasil bahwa mekanisme kerja genistein menyerupai hormon estrogen (melalui

reseptor estrogen). Rabiau (2010) melakukan studi dengan kultur sel kanker prostat yang mendapat berbagai dosis genistein mulai 10 μM sd 100 μM menyimpulkan bahwa genistein mampu berfungsi sebagai bahan yang menekan pertumbuhan kanker melalui jalur siklin dan jalur *Epidermal Growth Factor* (EGF) dan *Insulin like growth factor* (IGF).

Genistein dilaporkan dapat menekan sel HeLa tergantung pada dosis yang diberikan (*dose dependent manner*). Genistein dapat menyebabkan apoptosis pada sel-sel HeLa secara *dose dependent manner*. *Endoplasmic Reticulum stress* (ER stress) berperan dalam proses apoptosis oleh genistein pada sel-sel kanker serviks. Oleh sebab itu, genistein merupakan suatu agen yang sangat menjanjikan sebagai terapi kanker serviks (Yang *et al.*, 2010).

Sebuah penelitian yang dilakukan pada garis sel kanker prostat DU-145, menghasilkan suatu kombinasi terapi kanker atau sel tumor menggunakan survivin RNAi dan genistein. Genistein dapat menghambat viabilitas sel DU-145 sebanyak 28-56% dan mampu menghambat viabilitas sel HeLa sebesar 17-22% secara *dose dependent*. Caspase-3 merupakan enzim yang memainkan peranan penting dalam program kematian sel (apoptosis). Genistein memediasi terjadinya apoptosis pada sel DU-145 melalui kaskade caspase-3. Sedangkan kombinasi terapi menggunakan survivin RNAi dan berbagai konsentrasi genistein menunjukkan adanya efek apoptosis yang kuat (59%) pada sel DU-145. Meskipun demikian, genistein dapat menginduksi apoptosis secara independen dan memiliki efek sinergi terhadap penghambatan sel kanker prostat (Yuan-jing *et al.*, 2009).

Penelitian lain menunjukkan bahwa genistein merupakan agen sitotoksik terhadap sel kanker ovarium. Mekanisme genistein dalam menginduksi terjadinya kematian sel dapat melalui apoptosis dan autofagi. Oleh karena autofagi merupakan suatu respon adaptif terhadap kelaparan nutrisi, Gossner *et al.*,

(2007) membuat hipotesis bahwa genistein dapat menginduksi adanya signal respon menyerupai kelaparan (*starvation-like signaling*). Terapi menggunakan genistein terbukti dapat menghambat *up-take* glukosa secara dramatis pada sel kanker ovarium, sedangkan *methyl piruvate* dan sintesis asam lemak dapat mencegah autofagi yang diinduksi oleh genistein. Terapi menggunakan genistein dapat mengurangi tingkat fosforilasi Akt sehingga dapat menyebabkan sebuah mekanisme pembatasan penggunaan glukosa. Kebanyakan agen kemoterapi konvensional bekerja dengan cara menginduksi terjadinya apoptosis sel. Sedangkan genistein dapat menginduksi apoptosis dan autofagi pada sel yang mati, sehingga dapat menghindari adanya kemoresisten yang disebabkan adanya perubahan signal apoptosis (Gossner *et al.*, 2007).

Wang *et al* (2010), melaporkan sebuah penelitian genistein pada sel fibroblast kulit. Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa genistein dapat melindungi *UVB-induced senescence-like characteristic* pada HDFs melalui penyeimbangan antara aktivitas enzim antioksidan dan memodulasi stres oksidasi mitokondria melalui mekanisme down-regulasi jalur signaling dependen p66Shc (*p66Shc-dependent signaling pathway*). Oleh karenanya, dapat disimpulkan bahwa terdapat kemungkinan adanya efek kuat perlindungan melawan penuaan kulit dan bahkan photoaging (Wang *et al.*, 2010).

Genistein sebagai modulator sitokin belum banyak di teliti. Sitokin memegang peranan dalam berbagai patologi pada kelainan ginekologi termasuk endometriosis, sindroma ovarium polikistik, infertilitas, hidrosalping, infeksi, onkologi dan kelainan-kelainan di bidang obstetri. Obat- obat atau bahan yang berfungsi sebagai modulator sitokin terbukti mempunyai peran yang menguntungkan sebagai bagian terapi dari kelainan-kelainan di bidang obstetri dan ginekologi tersebut. Lyva-lopez *et al.*, (2016) melakukan revidu berbagai jurnal dan menampilkan hasil sebagai berikut:

Tabel 2.5 Peran flavanoid sebagai modulator sitokin

| Flavanoid | Peran |
|------------|---|
| Apigenin | Menurunkan NO dan prostaglandin E2 (PGE2) Menurunkan sekresi IL-6, IL1- β , IL-12 dan TNF- α |
| Fisetin | Menurunkan produksi dan ekspresi TNF- α , IL-6 dan IL-8 |
| Luteolin | Menurunkan produksi NO, IL-6, MCP-1, TNF- α , IL1- β , dan INF- δ Stimulasi produksi IL-10 |
| Naringenin | Menurunkan sekresi NO, MCP-1, IL-6 dan TNF- α |
| Quercetin | Menghambat produksi NO, TNF- α , IL1- β , IL-6 dan INF- δ Menstimuli produksi IL-10 |

disadur dari Lyva-lopez *et al* (2016)

Terlihat bahwa genistein belum banyak diteliti sebagai alternatif terapi untuk kelainan terkait dengan abnormalitas dalam bidang ginekologi tersebut.

Genistein adalah flavanoid yang terkuat, dengan ikatan pada reseptor estrogen beta (RE- β) yang mendekati kemampuan ikatan 17- β Estradiol (80%) (Kuiper *et al.*, 1997) dan lebih poten dari flavanoid lainnya dalam modulasi reseptor estrogen, sehingga efeknya dalam memodulasi sitokin lebih kuat dari flavanoid lainnya

Secara keseluruhan dalam riset ini hal-hal baru yang didapatkan adalah

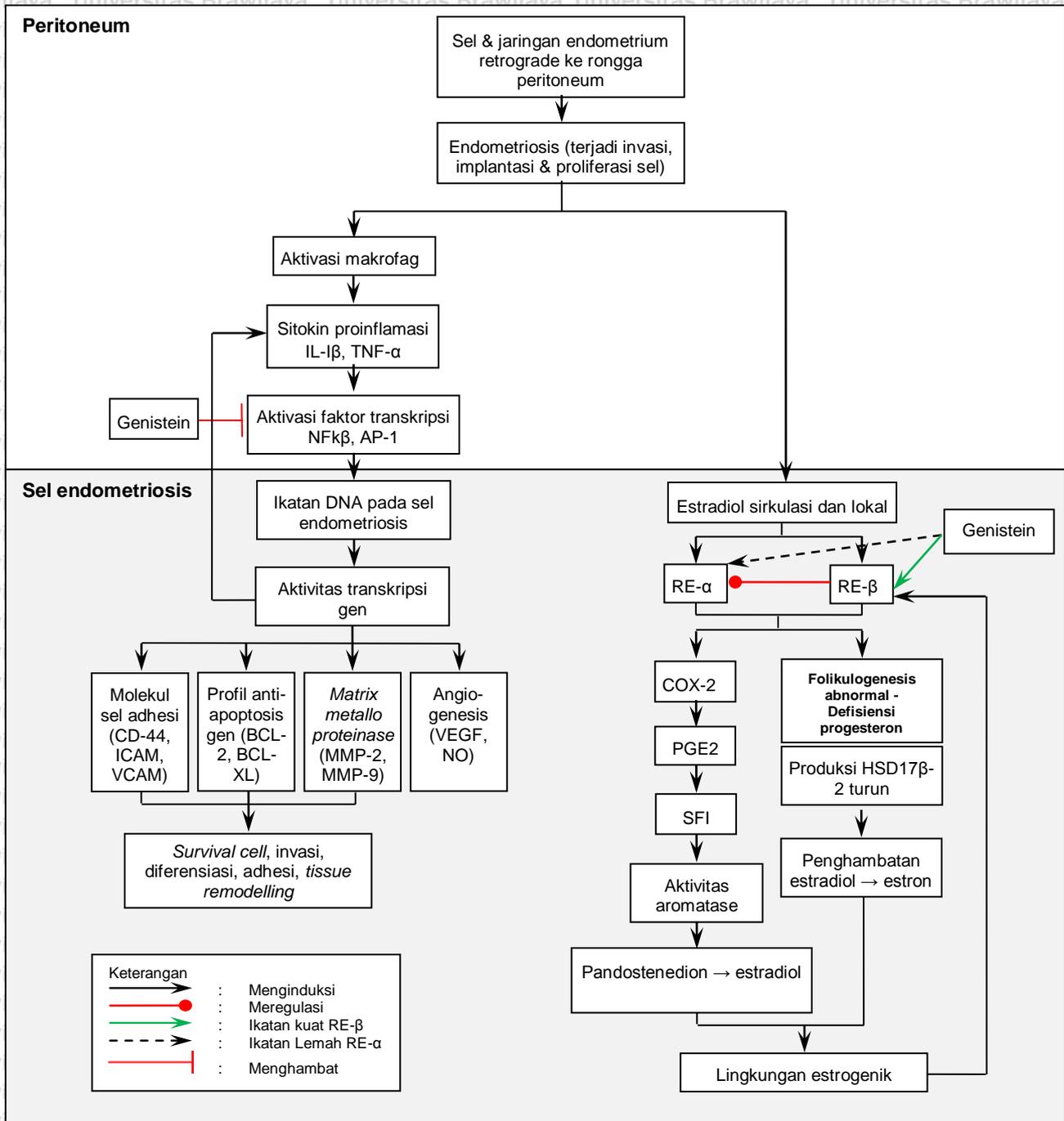
1. Mendapatkan metode membuat mencit model endometriosis yang efisien untuk penelitian
2. Membuktikan peran genistein sebagai modulator poten sekaligus menjelaskan jalur mekanisme molekulernya
3. Membuktikan peran rasio RE- α / RE- β sebagai marker untuk mekanisme kerja genistein dan rasio BAX/BCI-2 sebagai marker apoptosis dalam endometriosis yang terkait dengan genistein
4. Membuktikan peran genistein sebagai salah satu terapi untuk endometriosis di masa depan sekaligus mendapatkan dosis yang sesuai.

BAB 3

KERANGKA KONSEP, TEORI DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori

Patogenesis Endometriosis



Keterangan kerangka teori:

Sel-sel endometrium yang berkarakter sebagai endometriosis bila mengalami aliran balik (refluk) ke dalam rongga peritoneum akan mengalami proses proliferasi, implantasi dan invasi (Amberkar *et al.*, 2010). Hormon estrogen (estradiol) adalah pemicu inflamasi yang poten sehingga memicu aktifitas makrofag peritoneal untuk hipereaktif memicu reaksi Inflamasi. Reaksi inflamasi yang telah terinisiasi ini akan dilanjutkan dengan meningkatnya sintesa sitokin proinflamasi yang poten seperti IL-1 β dan TNF- α dan selanjutnya akan memicu kaskade reaksi melalui berbagai mediator proinflamasi yang poten antara lain NF-kB dan AP-1 (Soares *et al.*, 2012). NF-kB akan berinteraksi dengan bagian promotor di DNA sel endometriosis dan akan menjadi faktor transkripsi untuk sintesa berbagai protein. NF-kB adalah mediator yang poten untuk memicu kaskade reaksi inflamasi dan transkripsi gen yang hasil akhirnya berupa meningkatnya molekul adesi (CD-44, ICAM, VCAM), kecenderungan apoptosis (BCL-2, BCL-XL) yang rendah, meningkatnya enzim *matrix metalloproteinase* (MMP-2, MMP-9), meningkatnya proses angiogenesis (VEGF, NO) dan sitokin proinflamasi lainnya, dan hasil akhirnya akan memperberat progresifitas endometriosis.

Hormon estrogen memegang peranan yang sangat penting sebagai faktor pertumbuhan (*growth factor*) yang memiliki peran membuat suasana menjadi estrogenik dengan RE- α dominan dan membuat pertumbuhan sel endometriosis lebih mudah. Suasana yang estrogenik akan memicu enzim-enzim proinflamasi COX-2, PGE2, SF1 dan akhirnya aktifitas aromatase meningkat dan kadar estradiol lokal (di dalam lesi endometriosis) akan meningkat dan memicu memburuknya perkembangan endometriosis. Suasana endometriosis dengan estradiol yang tinggi abnormal akan menyebabkan folikulogenesis dalam ovarium tidak normal sehingga produksi progesteron lebih rendah dan berantai

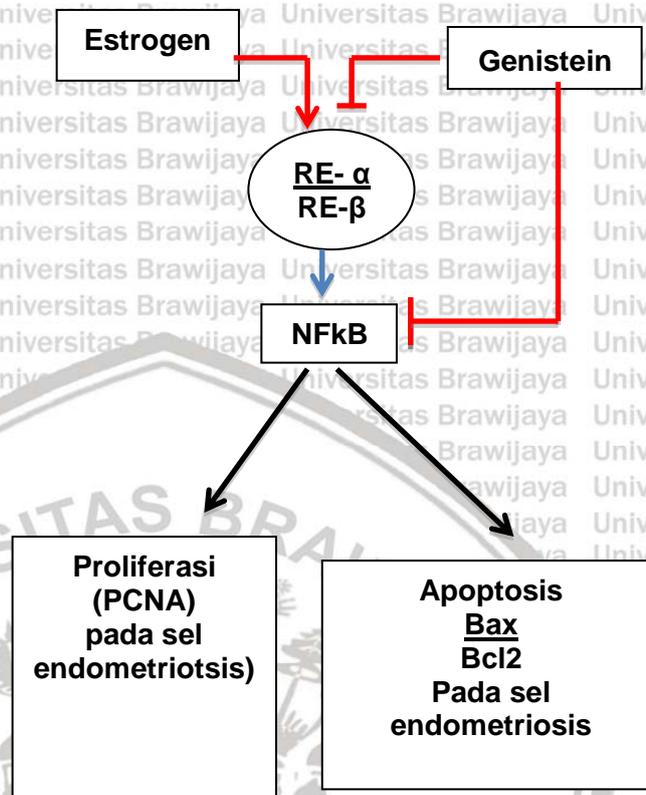
menyebabkan produksi HSD-17 β 2 berkurang dan akibatnya konversi dari estradiol (poten) ke estron (kurang poten) menjadi turun dan hasil akhirnya estradiol tetap tinggi dan membuat suasana makin estrogenik. Bila RE- β dominan akan menghambat peran RE- α sehingga terjadi hambatan kaskade sintesa estradiol. Pada akhirnya rasio RE- α dan RE- β berperan penting ke arah mana hormon estrogen berperan. Bila RE- α dominan maka akan berperilaku sebagai stimulator, bila RE- β dominan maka berperilaku sebagai inhibitor.

Genistein adalah molekul yang mempunyai afinitas yang kuat terhadap RE- β , sehingga genistein mengubah rasio RE- α dan RE- β . Adanya proses kompetitif inhibitor melalui interaksi dengan RE- β , mengakibatkan efek antiestrogenik dengan menurunkan aktivasi makrofag peritoneal dan meningkatkan aktivitas gen proapoptosis (Bax) dan menghambat antiapoptosis (Bcl2) (terjadinya peningkatan aktivitas Bax dan penurunan aktivitas Bcl2), sehingga terjadinya penurunan daya hidup sel, invasi, diferensiasi, adhesi dan remodeling jaringan sehingga dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan endometriosis.

Dengan demikian rasio RE- α dan RE- β dan NF- κ B akan menentukan perilaku hormon estrogen terhadap jaringan endometriosis.

3.2 Kerangka Konsep

Mekanisme Kerja Genistein pada Endometriosis



Keterangan kerangka konsep penelitian :

Genistein merupakan isoflavon yang mempunyai struktur kimia yang mirip dengan estrogen 17- β estradiol. Genistein secara umum bekerja sebagai SERM (*selected estrogen receptor modulator*) yang memiliki efek estrogenik dan efek antiestrogenik yang dapat berikatan dengan RE- β (87%) dan RE- α (4%) dibandingkan dengan estradiol. Ikatan genistein dan reseptor estrogen membentuk kompleks reseptor estrogen dan mengaktivasi *estrogen responsive element* (ERE) sehingga mempengaruhi (menginhibisi) proses transkripsi.

Genistein lebih kuat berikatan dengan RE- β sehingga mengubah rasio RE- α dan RE- β , sehingga RE- β dominan. Rasio yang berubah dengan RE- β dominan akan menjadikan suasana sistemik atau lokal menjadi antiestrogenik.

Melalui interaksinya dengan RE- β , genistein merupakan inhibitor aktifasi NFKB (*nuclear factor KB*) dan selanjutnya akan menghambat proses transkripsi molekul yang memicu proliferasi sel (PCNA) dan menjadikan proliferasi sel endometriosis menurun. Pada sisi lain juga akan menggeser rasio Bax dan Bcl-2 dengan BAX dominan sehingga terjadi peningkatan apoptosis sel. Genistein juga bisa berfungsi langsung sebagai penghambat NFKB dengan hasil akhir yang serupa dengan interaksinya pada RE- β . Perpaduan penurunan proliferasi sel dan peningkatan apoptosis akan menghambat progresifitas endometriosis.



3.3 Hipotesis

3.3.1 Hipotesis umum

Genistein berbagai dosis menurunkan proliferasi dan meningkatkan apoptosis sel endometriosis dengan melalui penurunan rasio ER α /ER β dan penurunan NF κ B pada mencit model endometriosis.

3.3.2 Hipotesis khusus

Penelitian tahap 1:

1. Asal jaringan implan berpengaruh terhadap luas lesi endometriosis, reaksi inflamasi dan granuloma, ekspresi reseptor estrogen alfa, reseptor estrogen beta dan reseptor progesteron pada mencit model endometriosis.
2. Jaringan adenomiosis merupakan sumber implan terbaik untuk membuat mencit model endometriosis

Penelitian tahap 2 :

1. Genistein berbagai dosis menurunkan proliferasi sel endometriosis pada mencit model endometriosis
2. Genistein berbagai dosis menurunkan rasio ekspresi RE α /RE β pada mencit model endometriosis
3. Genistein berbagai dosis menurunkan ekspresi NF κ B pada mencit model endometriosis
4. Genistein berbagai dosis menurunkan proliferasi sel endometriosis melalui penurunan rasio ER α /ER β pada mencit model endometriosis?
5. Genistein berbagai dosis menurunkan proliferasi sel endometriosis melalui penurunan NF κ B pada mencit model endometriosis

6. Genistein berbagai dosis menaikkan apoptosis sel endometriosis pada mencit model endometriosis.

7. Genistein berbagai dosis menaikkan apoptosis sel endometriosis melalui penurunan rasio RE α /RE β pada mencit model endometriosis

8. Genistein berbagai dosis menaikkan apoptosis sel endometriosis melalui penurunan NF κ B pada mencit model endometriosis



BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental murni (*true eksperimental*) yang dikerjakan di laboratorium secara *in vivo* pada mencit (*Mus musculus*) betina dengan rancangan penelitian *Post-Test Only With Control Group Design*. Penelitian ini terdiri dari :

1. Penelitian Tahap I : merupakan prosedur pembuatan model mencit endometriosis.
2. Penelitian Tahap II : merupakan prosedur perlakuan pemberian genistein terhadap model mencit endometriosis.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi, Laboratorium Patologi Anatomi, dan Laboratorium Fisiologi Reproduksi Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, dilaksanakan pada bulan Januari 2017 sampai dengan Maret 2017.

4.3 Populasi dan Besar sampel**4.3.1 Populasi dan Besar Sampel Pembuatan Model Mencit Endometriosis**

Penelitian tahap I menggunakan mencit *Mus musculus* dengan pertimbangan karena mudah dipelihara, hewan yang sehat dan cocok untuk digunakan pada berbagai jenis penelitian percobaan serta dapat diamati respon imunologinya. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok mencit, yaitu:

Kelompok mencit A: Mencit yang disuntik isolat endometriosis yang berasal dari kerokan endometrium.

Kelompok mencit B: Mencit yang disuntik isolat endometriosis yang berasal dari dinding/kapsul kista endometrioma.

Kelompok mencit C: Mencit yang disuntik isolat endometriosis yang berasal dari jaringan adenomiosis.

Kelompok mencit D: Mencit yang tidak mendapatkan perlakuan sebagai kontrol (mencit betina sehat)

Besar sampel yang diperlukan pada penelitian tahap I ditentukan dengan rumus Hanafiah (2012): $(n-r) (t-1) \geq 15$

Dimana t adalah jumlah kelompok perlakuan sedangkan r adalah jumlah ulangan tiap perlakuan. Pada penelitian ini jumlah perlakuan sebanyak 3 kelompok, maka sampel yang diperlukan adalah:

$$(n-1) (t-1) \geq 15 \text{ dengan } t = 3, \text{ maka didapatkan}$$

$$(n- 1) (3 - 1) \geq 15$$

$$n- 1(2) \geq 15$$

$$2n-2 \geq 15$$

$$n \geq 8,5 \text{ (dibulatkan menjadi 9)}$$

Jadi penelitian tahap I menggunakan sampel mencit betina sebanyak 9 ekor pada masing-masing kelompok (jumlah total 36 ekor), dengan usia 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram.

4.3.2 Populasi dan Besar Sampel Paparan Genistein Berbagai Dosis Pada Penelitian tahap II

Populasi pada penelitian tahap II merupakan model mencit endometriosis yang dibagi menjadi 6 kelompok secara acak, meliputi: kelompok kontrol negatif (mencit sehat tanpa diberikan genistein), kelompok kontrol positif (mencit model endometriosis tanpa diberikan genistein) dan 4 kelompok perlakuan yaitu kelompok mencit model endometriosis yang diberikan genistein

berbagai dosis. Besarnya dosis yang digunakan berdasarkan pertimbangan hasil penelitian sebelumnya (Sutrisno *et al.*, 2014, Amelia *et al.*, 2016, Maharani *et al.*, 2016). Dosis dikonversi dari dosis manusia ke dosis mencit dengan koefisien konversi senilai 0,0026 (Syamsudin *and* Damono, 2011). Adapun hasil perhitungan konversi didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 4-1 Perhitungan Dosis Genistein pada Masing-masing Kelompok dari konversi dosis manusia ke dosis mencit

| Kelompok Hewan Coba | Dosis pada Manusia (mg/hari) | Faktor Konversi | Dosis pada Mencit (mg/hari) |
|---------------------|------------------------------|-----------------|-----------------------------|
| P1 | 500 | 0,0026 | 1,30 |
| P2 | 750 | 0,0026 | 1,95 |
| P3 | 1000 | 0,0026 | 2,60 |
| P4 | 1250 | 0,0026 | 3,25 |

Keterangan: Perhitungan dosis genistein pada mencit setelah dikonversikan dari dosis pada manusia.

Sehingga didapatkan:

1. Kelompok negatif (-) : Kelompok mencit tidak dijadikan model endometriosis (mencit sehat) dan tanpa pemberian genistein.
2. Kontrol positif (+) : Kelompok mencit endometriosis tanpa pemberian genistein.
3. Kelompok 1 (P1) : Kelompok mencit endometriosis diberi genistein dengan dosis 1,30 mg/hari
4. Kelompok 2 (P2) : Kelompok mencit endometriosis diberi genistein dengan dosis 1,95 mg/hari
5. Kelompok 3 (P3) : Kelompok mencit endometriosis diberi genistein dengan dosis 2,60 mg/hari
6. Kelompok 4 (P4) : Kelompok mencit endometriosis diberi genistein dengan dosis 3,25 mg/hari.

Penghitungan jumlah sampel mempergunakan rumus besar sampel (Hanafiah, 2011), yaitu:

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15$$

Dimana t adalah jumlah kelompok, sedangkan r adalah jumlah replikasi (banyaknya ulangan) pada tiap perlakuan. Berdasarkan rumus tersebut, sampel yang diperlukan adalah:

$$(6 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$5 (r - 1) \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r = 4$$

Dari perhitungan di atas didapatkan jumlah replikasi 4. Pada penelitian ini replikasi diperbanyak menjadi 6 ekor untuk menghindari kekurangan sampel akibat kematian sebesar 20%, sehingga jumlah keseluruhan sampel sebesar 6 x 6 kelompok menjadi 36 ekor mencit yang terdiri dari 30 ekor mencit model endometriosis dan 6 ekor mencit sehat.

4.4 Kriteria Subyek Penelitian, Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Kriteria Subyek

Kriteria inklusi penelitian tahap I dan II:

1. Mencit (*Mus musculus*) jenis kelamin betina.
2. Berusia 3 bulan, belum pernah melahirkan.
3. Berat mencit 20-30 gr.
4. Kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif, bulu putih bersih, dan mata cerah.

Kriteria eksklusi penelitian tahap I: Mencit betina cacat/sakit/mati selama perlakuan.

Kriteria putus uji penelitian tahap I: Mencit betina yang sakit atau mati sejak perlakuan dan adaptasi 1 minggu di kandang

4.4.2 Variabel Penelitian

Variabel bebas:

- Berbagai dosis genistein.

Variabel antara:

- Rasio RE- α dan RE- β
- NFKB

Variabel tergantung :

- Proliferasi sel (PCNA)
- Apoptosis sel (yang diukur dengan rasio BCL-2 dan BAX)

4.4.3 Definisi operasional

1. **Isolat kerokan endometrium:** Biopsi/kerokan yang diambil dari endometrium wanita, yang disimpan dalam PBS (*phosphate buffered saline*).
2. **Isolat dinding kista endometriosis (endometrioma):** Jaringan yang diambil dari biopsi dinding/kapsul endometrioma yang disimpan dalam PBS.
3. **Isolat adenomiosis:** Jaringan adenomiosis yang diambil dari uterus wanita yang mengalami adenomiosis yang disimpan dalam PBS. Vannuccini S (2017) menyatakan bahwa adenomiosis dan endometriosis memiliki karakter yang sama yaitu adanya jaringan epitel, stroma dan kelenjar yang ektopik, neovaskularisasi, invasi dan proliferasi. Jin-Jiao Li (2017) menyatakan hal yang serupa.
4. **Luas implan endometriosis :** Luas implan endometriosis dinilai secara makroskopis pada daerah hiperemi yang kemudian dibuktikan dengan

mengambil sampel pada daerah yang paling hiperemi untuk diperiksa patologi anatomi adanya endometriosis. Bila secara mikroskopis didapatkan endometriosis, maka luas lesi kemerahan pada dinding peritoneum diasumsikan sebagai luas implan endometriosis diukur dengan satuan mm² dengan cara dibuat skala 1 mm pada dinding peritoneum kemudian dihitung manual kotak milimeter dan evaluasi dibantu dengan menggunakan perangkat lunak *Motic Image*.

5. **Gambaran histopatologi endometriosis** : Secara mikroskopis dengan menggunakan pengecatan haematoxin-eosin dari irisan sagital jaringan peritoneum didapatkan gambaran adanya kelenjar endometrium diluar latar belakang dari stroma dan sel inflamasi. Sediaan tersebut diambil dari peritoneum pada daerah yang paling hiperemi dari seluruh mencit model endometriosis setelah dikorbankan dengan dislokasi servikal. Gambaran kelenjar endometrium pada peritoneun mencit ini disebut *endometriosis-like lesion*.

6. **Genistein berbagai dosis**: genistein (diproduksi oleh *Tokyo Chemical Industry*, Jepang, nomor batch OW86I-QF) diberikan pada mencit secara per oral (sonde) dalam berbagai dosis (menggunakan acuan dosis manusia yang dikoncersikan ke mencit). Skala : miligram (rasio) 500 mg/hari, 750 mg/hari, 1000 mg/hari, 1250 mg/hari (Amelia, 2016, Maharani, 2016, Sutrisno, 2016).

7. **Ekspresi reseptor alfa (RE- α)** : Penilaian imunohistokimia tingkat imunoreaktivitas *mouse monoclonal antibody* terhadap RE- α , dengan melihat intensitas pewarnaan dan dihitung jumlah sel yang positif mengandung RE- α , menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400x pada 1000 sel yang tersebar pada 5 lapang pandang yang berbeda, kemudian dibandingkan dengan kontrol positifnya berupa preparat jaringan

peritoneum yang juga telah dilakukan pemeriksaan imunohistokimia terhadap reseptor RE- α . Pewarnaan yang terjadi pada RE- α terletak pada epitel permukaan, epitel kelenjar dan stroma lesi endometriosis jaringan peritoneum mencit model, dimana dengan pemeriksaan mikroskopis hasil positif adalah dengan adanya warna kecoklatan pada inti sedangkan pada sitoplasma tidak terwarnai.

Skala : ordinal (semikuantitatif)

Nilai :

Intensitas pewarnaan RE- α yang dinyatakan:

1. 0 atau (-), jika tidak ada ekspresi warna coklat
2. 1 (+) atau intensitas lemah, jika warna coklat tampak sangat lemah
3. 2 (+) atau intensitas sedang, jika warna coklat lebih lemah dibandingkan kontrol positif
4. 3 (+) atau intensitas kuat, jika intensitas warna coklat sama atau lebih kuat dibandingkan kontrol positif

8. **Ekspresi reseptor beta (RE- β)** : Penilaian imunohistokimia tingkat imunoreaktivitas *mouse monoclonal antibody* terhadap RE- β , dengan melihat intensitas pewarnaan dan dihitung jumlah sel yang positif mengandung RE- β , menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400x pada 1000 sel yang tersebar pada 5 lapang pandang yang berbeda, kemudian dibandingkan dengan kontrol positifnya berupa preparat jaringan peritoneum yang juga telah dilakukan pemeriksaan imunohistokimia terhadap reseptor RE- β . Pewarnaan yang terjadi pada RE- β terletak pada epitel permukaan, epitel kelenjar dan stroma lesi endometriotik jaringan peritoneum mencit model, dimana dengan pemeriksaan mikroskopis hasil positif adalah dengan adanya warna kecoklatan pada inti sedangkan pada sitoplasma tidak terwarnai.

Skala : ordinal (semikuantitatif)

Nilai :

Intensitas pewarnaan RE- β yang dinyatakan:

- 0 atau (-), jika tidak ada ekspresi warna coklat

- 1 (+) atau intensitas lemah, jika intensitas warna coklat sangat lemah

- 2 (+) atau intensitas sedang, jika intensitas warna coklat lebih lemah dibandingkan kontrol positif

- 3 (+) atau intensitas kuat, jika intensitas warna coklat sama atau lebih kuat dibandingkan kontrol positif

9. **Ekspresi Bcl-2** : Pewarnaan pada sitoplasma, dimana dengan pemeriksaan mikroskop sediaan imunohistokimia menggunakan antibodi Bcl-2 didapatkan hasil positif jika menunjukkan perubahan warna menjadi coklat. Ekspresi Bcl-2 dinilai dengan persentase (%) pewarnaan (*staining*) Bcl-2. Penghitungan dilakukan pada 5 lapangan pandang dengan pembesaran 400x yang dihitung pada 1000 sel. Persentase (%) ekspresi Bcl-2 adalah jumlah sel positif/1000 sel x 100%.

Skala : ordinal (semikuantitatif)

Nilai : Skoring ekspresi Bcl-2 adalah :

- 0 (-) jika tidak ada ekspresi warna coklat

- 1 (\pm) atau intensitas lemah, jika intensitas warna coklat sangat lemah

- 2 (+) atau intensitas sedang, jika intensitas warna coklat lebih lemah dibandingkan kontrol positif

- 3 (+) atau intensitas kuat, jika intensitas warna coklat sama atau lebih kuat dibandingkan kontrol positif

10. **Ekspresi Bax** : Pewarnaan pada sitoplasma, dimana dengan pemeriksaan mikroskop sediaan imunohistokimia menggunakan antibodi Bax didapatkan hasil positif jika menunjukkan perubahan warna menjadi coklat. Ekspresi Bax dinilai dengan persentase (%) pewarnaan (*staining*) Bax. Penghitungan dilakukan pada 5 lapangan pandang dengan pembesaran 400x pada 1000 sel yang diamati. Persentase (%) ekspresi Bax adalah jumlah sel positif/1000 sel x 100%.

Skala : ordinal (semikuantitatif)

Nilai : Skoring ekspresi Bax adalah :

- 0 (-) jika tidak ada ekspresi warna coklat
- 1 (±) atau intensitas lemah, jika intensitas warna coklat sangat lemah
- 2 (+) atau intensitas sedang, jika intensitas warna coklat lebih lemah dibandingkan kontrol positif
- 3 (+) atau intensitas kuat, jika intensitas warna coklat sama atau lebih kuat dibandingkan kontrol positif

11. **Ekspresi PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*)**: ekspresi gen penanda proliferasi PCNA yang tampak pada preparat lesi endometriotik peritoneum mencit model endometriosis yang diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x dihitung pada 1000 sel. Sel-sel yang menunjukkan aktivitas proliferasi akan ditunjukkan oleh inti yang berwarna kecoklatan.

Skala : ordinal (semikuantitatif)

Nilai : Skoring ekspresi PCNA adalah :

- 0 (-) jika tidak ada ekspresi warna coklat

1 (±) atau intensitas lemah, jika intensitas warna coklat sangat lemah

2 (+) atau intensitas sedang, jika intensitas warna coklat lebih lemah dibandingkan kontrol positif

3 (+) atau intensitas kuat, jika intensitas warna coklat sama atau lebih kuat dibandingkan kontrol positif

14. **Ekspresi NFkB:** ekspresi NFkB yang tampak pada preparat lesi endometriotik peritoneum mencit model endometriosis yang diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x dihitung pada 1000 sel.

Skala : ordinal (semikuantitatif)

- **Nilai** : Skoring ekspresi NFkB adalah :

- 0 (-) jika tidak ada ekspresi warna coklat

- 1 (±) atau intensitas lemah, jika intensitas warna coklat sangat lemah

- 2 (+) atau intensitas sedang, jika intensitas warna coklat lebih lemah dibandingkan kontrol positif

- 3 (+) atau intensitas kuat, jika intensitas warna coklat sama atau lebih kuat dibandingkan kontrol positif

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan dan Alat Pembuatan Model Mencit Endometriosis

1. Mencit (mus musculus) normal

2. Pakan pelet; mencit akan mendapatkan makanan dan minuman dengan jenis dan porsi yang sama, dengan masa adaptasi 1 minggu sebelum perlakuan.
3. Siklosporin A.
4. *Ethynil estradiol*.
5. Isolat endometriosis :
 - Kerokan endometrium
 - Dinding kista endometrioma
 - Biopsi jaringan adenomiosis
6. PBS (*phosphate buffered saline*).
7. Bahan pembuatan slide histopatologi: buffer formalin 7%, xylol (I dan II), ethanol absolut (I, II, III), ethanol (70%, 80%, 90%, dan 96%), poly-L-Lysine, parafin cair dan II.
8. Bahan pewarnaan immunohistokimia, antara lain: larutan hydrogen peroksida (Novocastra Peroxidase Block)

Alat:

1. Kandang perawatan.
2. Tube centrifuge 1,5 mL, 2 mL, 15 mL dan 50 mL (BD Lab)
3. Spuit 1 cc, 3 cc, 5 cc
4. Yellow tip, blue tip
5. Vacum trainer
6. QuantiChrom Peroxide Assay Kit (DIOX-250)
7. Micropipet 50, 100 dan 1000 μ L
8. Seperangkat alat bedah
9. Sentrifus (Hettich, Jerman)
10. Freezer

4.5.2 Bahan dan Alat Pemeriksaan Imunohistokimia untuk model mencit endometriosis

Bahan:

1. PBS (*phosphate buffered saline*).
2. Antibodi RE- α (*monoclonal mouse ER- α*)
3. Antibodi RE- β (*monoclonal mouse ER- β*)
4. Antibodi PCNA (*monoclonal anti-mouse PCNA antigen*)
5. Antibodi Bcl-2 (*monoclonal mouse anti-human Bcl-2 oncoprotein*).
6. Antibodi Bax (*monoclonal mouse anti-human-Bax*)
7. Antibodi NFkB (*monoclonal anti-mouse NFkB antigen*)
8. Bahan pembuatan slide histopatologi, antara lain: lesi endometriosis pada jaringan peritoneum mencit, Buffer Formalin 7%, Xylol (I dan II); Ethanol absolut (I, II, III), Ethanol (70%, 80%, 90%, dan 96%), *Poly L-Lysine*, Parafin cair dan II.
9. Bahan pewarnaan imunohistokimia, antara lain: slide jaringan lesi peritoneum mencit model endometriosis yang sudah melalui persiapan preparat histopatologis, larutan hydrogen peroksida (Novocastra Peroxidase Block)

Alat :

1. *Tube centrifuge* 1,5 mL, 2 mL, 15 mL dan 50 mL (BD Lab)
2. S spuit 1 cc, 3 cc, 5 cc
3. *Yellow tip, blue tip*
4. *Vaccum trainer*
5. *Quanti Chrom Peroxide Assay Kit (DIOX-250)*
6. Micropipet 50, 100 dan 1000 μ L
7. Seperangkat alat bedah
8. Sentrifus (Hettich, Jerman)

9. Freezer

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Prosedur Pembuatan Model Mencit Endometriosis dari berbagai asal isolat endometriosis

4.6.1.1 Prosedur Pembuatan Isolat Jaringan Endometrium

Isolat jaringan endometrium yang digunakan pada penelitian tahap I berasal dari jaringan endometrium, kapsul endometrioma dan jaringan adenomiosis. Adapun cara pengambilan jaringan tersebut adalah sebagai berikut:

1. Endometrium

Jaringan endometrium diambil dengan cara dilakukan kerokan pada dinding kavum uteri dengan menggunakan sendok kuret, sehingga didapatkan jaringan endometrium yang viabel.

2. Kapsul endometrioma

Jaringan diambil melalui kistektomi dinding/kapsul dengan ukuran jaringan 2x2 cm pada kista yang pada saat operasi didapatkan gambaran klinis berupa kista coklat yang selanjutnya dikonfirmasi dengan hasil patologi anatomi.

3. Jaringan adenomiosis

Jaringan adenomiosis berasal dari uterus wanita dengan gambaran klinis adenomiosis yang selanjutnya dikonfirmasi dengan pemeriksaan patologi anatomi. Jaringan diambil durante-op dengan ukuran 2x2 cm.

Isolat endometriosis didapatkan dari bahan kerokan endometrium, dinding endometrioma dan jaringan adenomiosis, kemudian disimpan dengan PBS.

Dilakukan sentrifugasi dengan putaran sebesar 2500 rpm. Pelet dibuang, diambil

supernatannya, kemudian ditambahkan PBS bersama dengan penisilin 200 IU/ml dan streptomisin 200 µg/ml.

4.6.1.2 Prosedur Pemeliharaan dan Adaptasi Mencit Coba

Seluruh hewan coba yang digunakan diambil dari Laboratorium Fisiologi Reproduksi Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga (FKH Unair) Surabaya. Hewan coba yang digunakan adalah mencit betina (mus musculus) yang berumur kurang lebih tiga bulan dengan berat 20-30 gr yang dipilih berdasar kriteria inklusi dan eksklusi.

Mencit diadaptasikan dalam kondisi lingkungan penelitian yang baru dengan diberi pakan standart dan minum air secara *ad libitum*. Mencit dipelihara dan diaklimatisasikan dalam laboratorium untuk menyesuaikan diri dengan lingkungannya selama 7 hari pada kondisi suhu dan kelembaban lingkungan yang stabil dan baik sesuai kebutuhan fisiologi mencit (antara 27°C – 28°C). Cahaya ruangan di kontrol 12 jam terang (pukul 06.00 sampai dengan 18.00 WIB) dan 12 jam gelap (pukul 18.00 sampai dengan 06.00 WIB).

Kandang tempat mencit terbuat dari plastik yang tampak dari luar (ember plastik ukuran 20x30x40 cm) masing-masing 3 ekor mencit dan penutup kandang terbuat dari kawat kasa halus sehingga mencit dapat terlihat serta kandang dialasi sekam dengan tebal 0,5-1 cm dan diganti setiap 2 hari sekali pada pagi hari dan penutup kandang yang terbuat dari kawat berjaring.

Makanan hewan coba adalah makanan ternak pakan pelet dan minuman hewan coba adalah air matang diberikan *ad libitum*. Pakan mencit berbentuk pelet dengan komposisi terdiri dari protein kasar, lemak kasar, serat kasar, kalsium, fosfor dan tepung terigu. Saat diberikan pada mencit dicampur merata dengan air sehingga konsistensinya tidak keras. Konsumsi mencit adalah *ad libitum*.

4.6.1.3 Tahapan Pembuatan Model Mencit Endometriosis

Tahapan pembuatan model mencit endometriosis adalah sebagai:

- Setelah dilakukan proses adaptasi mencit pada kandang dengan mendapatkan makan dan minuman yang sama selama 1 minggu.
- Pada hari ke-1 dilakukan penyuntikkan *Siklosporin A* pada mencit kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dengan dosis 10 mg/kg/BB. Sediaan obat tersebut yang tersedia di Indonesia adalah *Sandimmun* produksi Novartis. Satu ampul berisi 50 mg/ml. Adapun dosis yang dibutuhkan 10 mg/kg/BB untuk dosis manusia, dalam hal ini mencit berat sekitar 20-30 mg, maka dosis juga disesuaikan.

Total dosis untuk manusia $10 \text{ mg/ml} \times 70 \text{ kg} = 700 \text{ mg}$ perorang. Dosis ini di konversi ke mencit, $700 \times 0,0026 = 1,82 \text{ mg}$ permencit. 1 ampul berisi 50 mg/ml diencerkan dengan 4 ml *water for injection* maka menjadi 5 ml.

50 mg siklosporin A dalam 5 ml air injeksi (dibuat menjadi homogen)

10 mg siklosporin A dalam 1 ml air injeksi

1,82 mg setara dengan 0,2 ml larutan siklosporin A

- Pada mencit yang telah mengalami imunodefisien, diberikan implan jaringan endometrium, dinding kista endometriosis dan jaringan adenomiosis dari dari satu penderita yang dilakukan operasi histerektomi dan pengangkatan kedua ovarium (setelah dilakukan pemberian *informed consent*) . Jaringan yang digunakan selanjutnya disimpan pada PBS (*phosphate buffered saline*). Jaringan endometrium, dinding kista endometriosis dan adenomiosis diambil sekitar 1 cm^3 kemudian digerus dan disuspensi dengan larutan PBS sebanyak 10 ml dan di sentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm dalam suhu 4°C selama 10 menit, diambil supernatan bagian bawah yang kaya kandungan stroma, kelenjar dan sel epitel. Setiap mencit akan mendapatkan jaringan implan 0,1 ml kemudian

disuntikan secara *blind* (intraperitoneal) pada cavum peritoneum mencit dengan spuit 1 ml.

Dilakukan penyuntikan *ethinyl estradiol* dengan dosis 5,4 µg/mencit (54 IU/mencit) (Grummer *et al.*, 2001; Sutrisno *et al.*, 2014) pada hari ke-1 dan ke-5, dimana 1 µgr setara 10 IU. 1 vial sediaan *ethinyl estradiol* berisi 30 ml yang mengandung 20000 IU, maka setiap mencit akan mendapat 0,1 cc (54/20.000 x 30 ml), disuntikan secara *intramuscular* pada paha mencit dengan *dysposable syringe* 1 cc dengan jarum 1 cc.

Pada hari ke-15 mencit dikorbankan dengan teknis dislokasi servikal dan dilakukan pembedahan pada perut mencit. Selanjutnya dilakukan penghitungan luas implantasi endometriosis pada peritoneum, pemeriksaan histopatologi, dan pemeriksaan imunohistokimia terhadap ekspresi ER- α , ER- β dan reseptor Progesteron (RP) untuk meyakinkan adanya jaringan endometriosis.

4.6.1.4 Prosedur Pengambilan Lesi Endometriosis Peritoneum Mencit Model Endometriosis

Sampel diambil segera setelah mencit dikorbankan dengan dislokasi tulang servikal (*cervical dislocation*). Bagian kulit dan peritoneum mencit dipisahkan, kemudian peritoneum dieksisi dan dibentangkan pada kertas millimeter dan dilakukan pemotretan untuk melihat luas endometriosis. Kemudian dibuat preparat histopatologi dan imunohistokimia. Setelah itu dilakukan pemeriksaan dengan mikroskop dan data dicatat dalam lembar pengumpulan data dan dianalisa secara statistik.

Pengambilan preparat untuk pemeriksaan patologi anatomi dilakukan dengan cara jaringan peritoneum yang paling merah yang diambil untuk dibuat

preparat. Kemudian dimasukkan ke tempat yang tersedia dengan formalin 10% sebagai pengawetnya.

4.6.1.5 Prosedur Pemeriksaan Lesi Endometriosis

Tahapan pemeriksaan lesi endometriosis adalah meliputi pemeriksaan berikut ini:

- Pemeriksaan luas implantasi pada peritoneum

Luas implan endometriosis dinilai secara makroskopis pada daerah hiperemia yang kemudian dibuktikan dengan mengambil sampel pada daerah yang paling hiperemia untuk diperiksa patologi anatomi apakah terdapat lesi endometriosis. Bila secara mikroskopis didapatkan lesi endometriosis, pengukuran luas implantasi lesi endometriosis dilakukan dengan menghitung luas lesi kemerahan pada dinding peritoneum yang diukur dengan satuan mm^2 yang dihitung dengan menggunakan perangkat lunak *Motic Image*. Penghitungan dilakukan oleh 3 orang yang berbeda kemudian dirata-rata.

- Pemeriksaan histopatologi

Pemeriksaan histopatologi bertujuan untuk mengetahui derajat kerusakan pada peritoneum dengan memeriksa infiltrasi sel radang dan adanya massa granuloma. Derajat kerusakan peritoneum dilakukan dengan menggunakan sistem skoring yakni dengan menggunakan sistem skoring menurut Metode Klopfleisch (2013) yang telah dimodifikasi, dengan cara menjumlah seluruh skor dari lesi-lesi. Sistem skoring tersebut terdiri dari dua penilaian, yakni penilaian berdasarkan infiltrasi sel radang dan terbentuknya massa granuloma.

Tabel 4-2. Skoring Derajat Kerusakan Peritoneum Berdasarkan Infiltrasi Sel Radang Menurut Metode Klopffleisch

| Bentuk lesi | Skor | Keterangan |
|-----------------------|------|---|
| Infiltrasi sel radang | 0 | Tidak terdapat infiltrasi sel radang |
| | 1 | Jumlah infiltrasi sel radang < 10 pada 5 lp (400x) |
| | 2 | Jumlah infiltrasi sel radang antara 11-50 pada 5 lp (400x) |
| | 3 | Jumlah infiltrasi sel radang antara 51-100 pada 5 lp (400x) |
| | 4 | Jumlah infiltrasi sel radang antara > 100 pada 5 lp (400x) |

Tabel 4-3. Skoring Derajat Kerusakan Peritoneum Berdasarkan Massa Granuloma Menurut Metode Klopffleisch.

| Bentuk lesi | Skor | Keterangan |
|-------------|------|--|
| Granuloma | 0 | Tidak terdapat masa granuloma |
| | 2 | Jika terdapat masa granuloma |
| | 4 | Jika terdapat masa granuloma disertai abses |
| | 6 | Jika terdapat masa granuloma disertai abses dan nekrosis jaringan otot |
| | 8 | Jika terdapat masa granuloma disertai abses, nekrosis jaringan otot dan fibrosis |

Total derajat kerusakan merupakan jumlah total dari dua lesi diatas dimana interval derajat kerusakan adalah 0 – 12 (Klopffleisch, 2013).

– Pemeriksaan Immunohistokimia

Pemeriksaan immunohistokimia pada penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui ekspresi RE- α , RE- β dan RP pada peritoneum. Tahapan pemeriksaan immunohistokimia disajikan dalam Lampiran 3.

Seluruh pemeriksaan pada penelitian ini menggunakan mikroskop cahaya biasa merk *Nikon H600L* yang dilengkapi dengan kamera digital

DS Fi2 300 megapixel dan *soft ware* pengolah gambar *Nikkon Image System*. Penilaian dilakukan dengan melakukan pemotretan pada fokus

tersebut dan selanjutnya dilakukan penilaian intensitas pewarnaan

ekspresi ER- α , ER- β dan PR pada setiap sampel secara semikuantitatif menggunakan Metode Remmele yang sudah dimodifikasi (Remmele

dan Schicketanz, 2001, Nowak *et al*, 2007). Indeks Skala Remmele

(*Immuno Reactive Score/IRS*) merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel

immunoreaktif. Data setiap sampel merupakan nilai rata-rata IRS yang diamati pada 5 lapang pandang berbeda pada pembesaran 400x.

Tabel 4-4. Skala Semikuantitatif IRS

| A | B |
|---|----------------------------------|
| Skor 0 : tidak ada sel positif | Skor 0 : tidak ada reaksi warna |
| Skor 1 : Sel positif kurang dari 10% | Skor 1 : Intensitas warna rendah |
| Skor 2 : Sel positif antara dari 11% - 50% | Skor 2 : Intensitas warna sedang |
| Skor 3 : Sel positif antara dari 51% - 80% | Skor 3 : Intensitas warna kuat |
| Skor 4 : Sel positif antara dari lebih dari 80% | |

Keterangan : IRS merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel positif (A) dengan skor intensitas reaksi warna (B), jadi $IRS = (A \times B)$

4.6.1.6 Prosedur Pembuangan Hewan Coba

Setelah selesai diambil organ yang digunakan, mencit dikumpulkan dan dilakukan penguburan ke dalam tanah di tempat yang aman dan terpilih untuk menguburkan sisa-sisa hasil penelitian.

4.6.2 Prosedur Paparan Genistein Berbagai Dosis (penelitian tahap 2)

4.6.2.1 Pembuatan Model Mencit Endometriosis

Model mencit endometriosis dibuat berdasarkan metode yang dilakukan pada penelitian tahap I, yakni menggunakan metode pembuatan model dengan hasil akhir terbaik sebagai mencit model endometriosis. Untuk meyakinkan bahwa model yang terjadi sudah menjadi endometriosis maka tiap-tiap grup akan diambil 1 mencit untuk dikorbankan dan dievaluasi endometriosisnya. Diambil 1 mencit untuk mewakili tiap kelompok dimana mencit tersebut berasal.

4.6.3 Prosedur Pemberian Genistein

a. Sumber Bahan Genistein

Genistein yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak genistein merk dagang *Genistein* diproduksi oleh *Tokyo Chemical Industry*, Jepang, nomor batch OW86I-QF, kemasan botol, yang dimurnikan dari kacang kedelai. Adapun langkah-langkah pembuatan larutan genistein sebagai berikut :

- Serbuk genestein ditimbang sesuai dengan dosis yang diperlukan yakni 1,30 mg/hari, 1,95 mg/hari, 2,60 mg/hari dan 3,25 mg/hari. Dosis ditimbang setiap hari untuk 6 mencit dengan rincian sebagai berikut :

1) $P1 = 1,30 \text{ mg/hari} \times 6 \text{ mencit} = 7,80 \text{ mg/hari}$

2) $P2 = 1,95 \text{ mg/hari} \times 6 \text{ mencit} = 11,70 \text{ mg/hari}$

3) $P3 = 2,60 \text{ mg/hari} \times 6 \text{ mencit} = 15,60 \text{ mg/hari}$

4) $P4 = 3,25 \text{ mg/hari} \times 6 \text{ mencit} = 19,50 \text{ mg/hari}$

- Dosis genestein yang sudah ditimbang masing-masing dimasukkan kedalam evendorf dan diberi label P1-P4.

- Masing-masing genestein dalam evendorf P1-P4 diencerkan menggunakan minyak wijen 100% sebanyak 1 ml (Maharani *et al*, 2016).

Kemudian disentrifuse. Dari hasil proses pengenceran tadi masing-masing mencit akan mendapatkan genestein sebanyak 0,20 ml. Minyak wijen digunakan sebagai pelarut genestein untuk mempermudah proses pemberian per oral menggunakan sonde dan mencegah iritasi pada daerah kerongkongan. Cara ini mudah dan memungkinkan untuk mengontrol dosis yang diberikan.

b. Proses Pemberian Genestein kepada mencit model endometriosis

Genestein yang telah dilarutkan didalam minyak wijen diberikan per-oral dengan sonde. Lama pemberian genestein pada kelompok mencit perlakuan adalah mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh Yavuz *et al*. (2007). Pemberian genestein per oral selama 14 hari menggunakan sonde yang dengan frekuensi satu kali sehari diluar pemberian pakan standar. Adapun langkah-langkah pemberian genestein adalah sebagai berikut:

- Genistein yang telah dilarutkan dengan minyak wijen dimasukkan kedalam spuit 1 ml yang telah dipasang sonde pada bagian ujungnya.
- Bagian tengkuk mencit dipegang dengan pelan dan hati-hati.
- Sonde dimasukkan ke dalam mulut mencit melalui langit-langit secara perlahan sampai ke faring lalu ke esophagus.
- Kemudian, genistein di dalam spuit didorong ke esophagus sehingga mencapai lambung.
- Setelah pemberian genistein selesai, mencit dilepaskan dan dikembalikan ke kandang

4.6.3.1 Prosedur Pengambilan Bahan Pemeriksaan

Pengambilan bahan pemeriksaan dilakukan setelah 28 hari perlakuan dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- a. Melakukan pengorbanan pada mencit dengan metode *cervical dislocation* yaitu ibu jari dan jari telunjuk ditempatkan di kedua sisi leher di dasar tengkorak, tangan lainnya ditempatkan pada pangkal ekor atau kaki belakang dan dengan cepat ditarik sehingga menyebabkan pemisahan tulang leher dan tengkorak.
- b. Mencit diletakkan di atas alas papan dengan perut menghadap ke atas. Setelah itu, ditancapkan paku payung pada kaki mencit, kulit perut dibuka dengan menggunakan gunting dan pinset secara hati-hati, sayatan pada garis tengah dilanjutkan ke samping kiri dan kanan pada sisi atas dan bawah dan diafragma dibuka.
- c. Selanjutnya, jaringan peritoneum diambil untuk menilai ekspresi RE- α , RE- β , ekspresi NFkB, ekspresi Bcl-2, ekspresi Bax, dan ekspresi PCNA.

4.6.3.2 Pembuangan hewan coba.

Prosedur pembuangan hewan coba adalah sama dengan metode yang digunakan pada penelitian tahap I.

4.7 Teknik Analisis Data

Dalam penelitian ini teknik analisis data dilakukan 3 tahapan berturut-turut yaitu (1) uji normalitas data sampel dengan uji *Shapiro-Wilk*, (2) uji komparasi digunakan uji t sampel bebas (*independent sample t test*) jika data terdistribusi normal, tetapi jika tidak terdistribusi normal maka digunakan uji *Mann-Whitney*, dan (3) uji *Anova One Way* (uji F) (bila data terdistribusi normal) atau uji *Kruskal Wallis* (bila data tidak terdistribusi normal). Semua penghitungan dilakukan dengan bantuan piranti lunak (*soft-ware*) *SPSS for Windows* 19.0. Secara lengkap dijelaskan di bawah ini.

4.7.1 Uji Prasyarat Parametrik

Untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan maka dipilih pendekatan uji statistik yang digunakan yaitu uji statistika parametrik. Sebelum dilakukan analisis data dengan menggunakan uji pada statistika parametrik, maka data akan dianalisis terlebih dahulu dengan uji prasyarat parametrik, yaitu data sampel dari variabel terukur diuji terlebih dahulu apakah data tersebar atau terdistribusi normal. Uji normalitas data dalam penelitian ini digunakan uji *Shapiro-Wilk*. Pada uji ini kriteria keputusan dengan melihat nilai probabilitas kesalahan empirik pada nilai Sig atau dikenal dengan *p-value*. Jika nilai Sig atau *p-value* menunjukkan nilai yang lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$, maka disimpulkan data terdistribusi normal, sehingga uji parametrik dapat digunakan.

Sedangkan jika nilai Sig atau *p-value* menunjukkan nilai yang lebih kecil dari taraf

signifikansi $\alpha = 0.05$, maka disimpulkan data tidak terdistribusi normal, sehingga uji parametrik tidak dapat digunakan (Santoso, 2005). Adapun variabel terukur yang diuji dengan uji prasyarat parametrik adalah data semikuantitatif ekspresi RE- α , RE- β , Bcl-2, Bax, dan PCNA dari pemeriksaan imunohistokimia.

4.7.2 Uji t Sampel Bebas

Teknik analisis data uji t sampel bebas (*independent sample t test*) ini digunakan untuk membandingkan atau komparasi antara 2 kelompok sampel yang bebas (*independent*) antara kelompok kontrol negatif (mencit sehat tanpa diberikan genistein), kelompok kontrol positif (mencit model endometriosis tanpa diberikan genistein). Teknik ini digunakan untuk membandingkan dua nilai rerata variabel terukur (data berskala interval atau rasio) dengan ketentuan bahwa data terdistribusi normal, bila tidak terdistribusi normal maka digunakan uji *Mann-Whitney* (Santoso, 2005).

4.7.3 Uji Anova One Way

Pengujian dengan *Anova One Way* (uji F) digunakan untuk membandingkan rerata variabel terukur antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan (pemberian genistein berbagai dosis). Analisis ini dilakukan yaitu terhadap data semikuantitatif ekspresi RE- α , RE- β , Bcl-2, Bax, PCNA dan NFkB. Tujuan teknik analisis ini digunakan adalah untuk mengetahui ada atau tidak ada pengaruh pemberian genistein berbagai dosis terhadap indeks proliferasi dan apoptosis pada lesi endometriotik peritoneal mencit model endometriosis. Jika pada uji *Anova One Way* ini menghasilkan kesimpulan H_0 ditolak atau kesimpulan ada perbedaan yang bermakna (signifikan), maka analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda, yaitu dipilih uji *Beda Nyata Terkecil/BNT (Least Significant Difference/LSD)* (Steel dan Torrie, 1995).

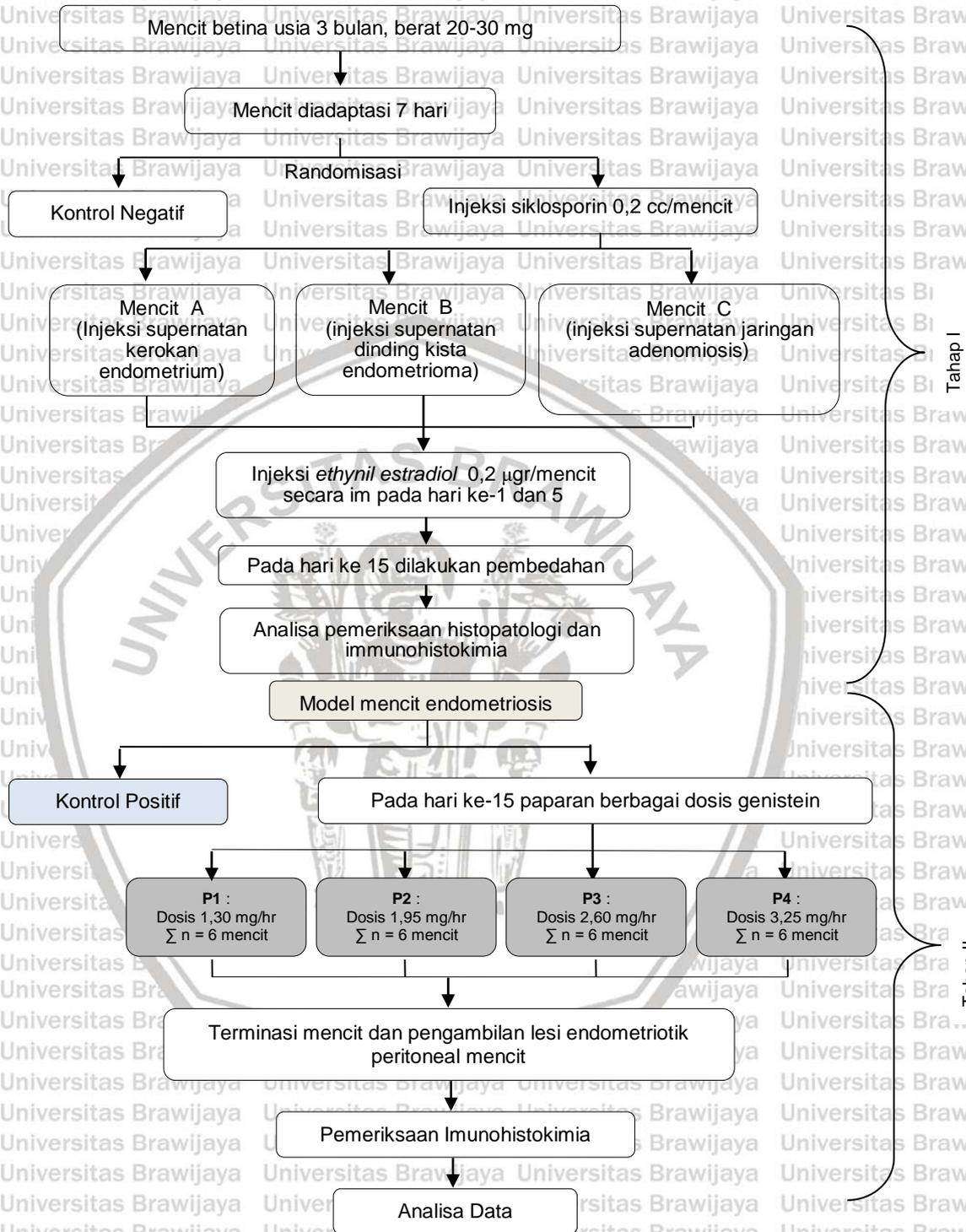
Tujuan digunakan uji LSD adalah untuk menemukan dosis berapa yang paling berpengaruh terhadap ekspresi RE- α , RE- β , NFkB, Bcl-2, Bax, dan PCNA pada lesi endometriosis peritoneal mencit model endometriosis.

4.7.4 Analisa Jalur

Kemudian dilakukan analisa jalur untuk melihat hubungan antara berbagai variabel yang diteliti.



4.8 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4-1 Kerangka operasional penelitian

Penelitian ini terdiri dari 2 tahapan, yakni tahap I merupakan tahapan pembuatan model mencit endometriosis dan tahap II merupakan tahapan pemberian genistein berbagai dosis pada model mencit endometriosis.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1. Hasil Penelitian Tahap I

5.1.1 Luas Implantasi pada Peritoneum

Luas implan endometriosis dinilai secara makroskopis pada daerah hiperemia yang kemudian dibuktikan dengan mengambil sampel pada daerah yang paling hiperemia untuk diperiksa patologi anatomi apakah terdapat lesi endometriosis. Bila secara mikroskopis didapatkan lesi endometriosis, maka luas lesi kemerahan pada dinding peritoneum diasumsikan sebagai luas implan endometriosis diukur dengan satuan mm² dengan cara dibuat skala 1 mm pada dinding peritoneum kemudian dihitung manual kotak milimeter tersebut. Penghitungan dilakukan oleh 3 orang yang berbeda kemudian dirata-rata.

5.1.2 Data Luas Implantasi pada Peritoneum

Pada penelitian ini didapatkan nilai rerata luas area implan bercak endometriosis yang berbeda antar kelompok perlakuan, yakni pada kelompok A didapatkan nilai rerata 21,98±0,88 mm², pada kelompok B sebesar 10,68±1,41 mm², dan pada kelompok C sebesar 42,75±3,28 mm².

Tabel 5-1 Perbandingan Luas Area Implan Endometriosis Mencit Model Endometriosis

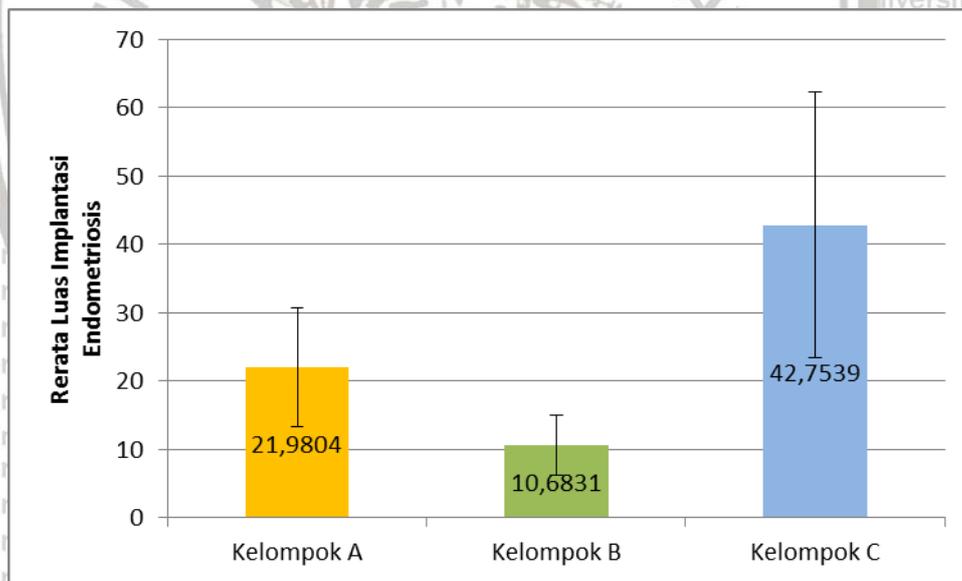
| Kelompok | n | Mean (mm ²) ± SD | P-value |
|----------|---|------------------------------|---------|
| A | 9 | 21.98 ± 8.63 ^b | 0,000 |
| B | 9 | 10.68 ± 4.37 ^a | |
| C | 9 | 42.75 ± 19.43 ^c | |

Tampak bahwa pada kelompok C memiliki nilai rerata luas implan area bercak endometriosis yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok lain.

Hasil pemeriksaan luas implan endometriosis pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada Lampiran 4.

Berdasarkan derajat luas implan bercak endometriosis yang terbentuk tampak bahwa pada kelompok C (kelompok mencit model yang mendapatkan suntikan supernatan lesi adenomiosis) menghasilkan luas implan endometriosis peritoneum yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok lainnya. Sedangkan kelompok B (suntikan supernatan dinding/kapsul endometrioma) menghasilkan endometriosis dengan luas implan dengan nilai rerata yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok A (suntikan supernatan kerokan endometrium).

Perbandingan tersebut dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 5-1 Histogram Rerata Pengukuran Luas Hipervaskularisasi/Implantasi Endometriosis pada Mencit Model Endometriosis (mm²).

Keterangan :

- A Kelompok kerokan endometrium
- B Kelompok kapsul endometrioma
- C Kelompok adenomiosis

5.1.2.1 Analisis Data Luas Implantasi pada Peritoneum

Uji Asumsi Normalitas dan Homogenitas Ragam

Sebelum dilakukan pengujian dengan menggunakan ANOVA, dilakukan pengujian asumsi yang melandasi ANOVA. Terdapat dua asumsi yang melandasi ANOVA, yakni asumsi normalitas dan homogenitas ragam. Pengujian asumsi normalitas dilakukan dengan menggunakan uji Saphiro-Wilk. Asumsi normalitas dikatakan terpenuhi jika p-value hasil penghitungan lebih besar dari $\alpha = 0,05$.

Sedangkan pengujian asumsi homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan uji Levene. Asumsi homogenitas ragam dikatakan terpenuhi jika p-value hasil penghitungan lebih besar daripada $\alpha = 0,05$. Hasil pengujian asumsi normalitas dan homogenitas ragam dengan menggunakan bantuan software SPSS dapat dilihat pada Lampiran 5.

Berdasarkan hasil uji asumsi diketahui bahwa pada uji asumsi normalitas, didapatkan p-value lebih besar dari $\alpha = 0,05$ yang menunjukkan bahwa asumsi normalitas telah terpenuhi. Sedangkan pada uji asumsi homogenitas ragam, didapatkan p-value kurang dari $\alpha = 0,05$ yang menunjukkan bahwa asumsi homogenitas ragam belum terpenuhi. Sehingga diperlukan proses transformasi data. Salah satu jenis transformasi data yang digunakan adalah transformasi logaritma. Proses transformasi data dilakukan dengan mengubah data asli ke dalam bentuk logaritma ($\text{Log}(Y)$). Berikut hasil pengujian asumsi normalitas dan homogenitas ragam untuk data yang telah ditransformasi :

Tabel 5-2. Uji Normalitas dan Homogenitas Luas Implant Endometriosis yang Ditransformasi Log (Y)

| Asumsi | Koefisien | p-value | Keterangan |
|-------------|-----------|---------|------------|
| Normalitas | 0.940 | 0.089 | Normal |
| Homogenitas | 1.738 | 0.195 | Homogen |

Dengan menggunakan data hasil transformasi *Log (Y)* ditunjukkan bahwa pada pengujian asumsi normalitas didapatkan p-value lebih dari 0,05.

Demikian juga pada pengujian asumsi homogenitas ragam didapatkan p-value lebih dari 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa asumsi yang melandasi ANOVA pada variabel luas implant endometriosis telah terpenuhi dengan melakukan transformasi logaritma.

Pengujian dengan menggunakan ANOVA bertujuan untuk mengevaluasi apakah terdapat perbedaan respon secara bermakna antar kelompok. Hipotesis yang digunakan adalah :

H_0 : Tidak terdapat perbedaan kelompok secara signifikan terdapat respon yang diamati (luas)

H_1 : Terdapat perbedaan kelompok secara signifikan terdapat respon yang diamati (luas)

Berikut hasil pengujian dengan menggunakan ANOVA dan LSD 5% dengan menggunakan bantuan software SPSS :

Tabel 5-3. Pengujian ANOVA dan LSD 5% Data Rerata Luas Implant Endometriosis

| Kelompok | n | Mean ± SD | p-value |
|----------|---|----------------------------|---------|
| A | 9 | 21.98 ± 8.63 ^b | 0.000 |
| B | 9 | 10.68 ± 4.37 ^a | |
| C | 9 | 42.75 ± 19.43 ^c | |

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

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0,000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) yang berarti H_0 ditolak. Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat

perbedaan yang signifikan rata-rata luas implant endometriosis. Untuk mengetahui perbedaan lebih lanjut rata-rata luas implant endometriosis pada masing-masing kelompok dilakukan pengujian dengan menggunakan LSD 5%. Berdasarkan pada hasil uji LSD 5% pada Tabel 8 di atas, ditunjukkan bahwa kelompok B memiliki nilai rata-rata luas implant endometriosis yang paling rendah. Sedangkan kelompok C memiliki rata-rata luas implant endometriosis yang paling tinggi. Ketiga kelompok tersebut menunjukkan perbedaan rata-rata luas implant endometriosis yang signifikan. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd tiap kelompok memuat huruf yang berbeda.

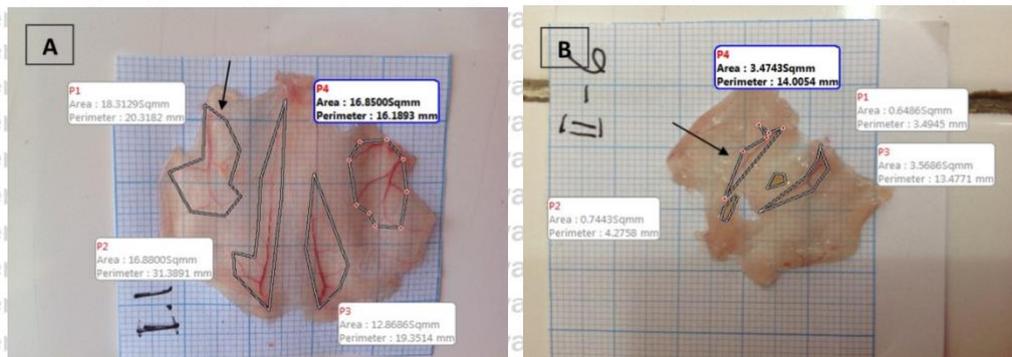
Tabel 5-4. Pengujian LSD 5% Luas Implant Endometriosis

| Perbandingan | | p-value |
|--------------|---|---------|
| A | B | 0.002 |
| | C | 0.013 |
| B | C | 0.000 |

Berdasarkan pada tabel 5-4 di atas, ditunjukkan bahwa p-value perbandingan antara kelompok A, B, dan C kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Hal ini mengandung pengertian bahwa semua kelompok baik A, B, maupun C memiliki perbedaan signifikan rata-rata luas implant endometriosis dimana kelompok C memiliki rata-rata luas implant endometriosis tertinggi dan kelompok B memiliki rata-rata luas implant endometriosis terendah.

5.1.2.2 Gambaran Makroskopis Luas Implantasi Bercak Endometriosis

Secara makroskopis, kelompok C menghasilkan mencit model endometriosis dengan bentukan lesi endometriosis yang memiliki gambaran hiperemi yang lebih luas yang merupakan pertanda adanya hipervaskularisasi/implantasi yang lebih baik dibandingkan dengan kelompok A dan B seperti tampak pada gambar berikut:



Gambar 5-2 Pengukuran Luas Hipervaskularisasi pada Mencit Model Endometriosis.

Keterangan: Gambaran luas implantasi lesi endometriosis pada mencit model yang diberi suntikan supernatan kerokan endometrium (A), supernatan dinding kista endometrioma (B) dan supernatan jaringan endometrium dan miometrium uterus wanita dengan adenomiosis (C).

5.1.3 Histopatologi Peritoneum

5.1.3.1 Data Histopatologi Derajat Kerusakan Peritoneum

Pemeriksaan ini bertujuan untuk mengetahui derajat kerusakan pada peritoneum. Metode skoring derajat kerusakan peritonium dilakukan menurut metode Klopffleisch (2013) yang telah dimodifikasi, dimana derajat kerusakan ditentukan dengan cara menjumlah seluruh skor dari lesi-lesi histopatologik (Tabel 10 dan 11).

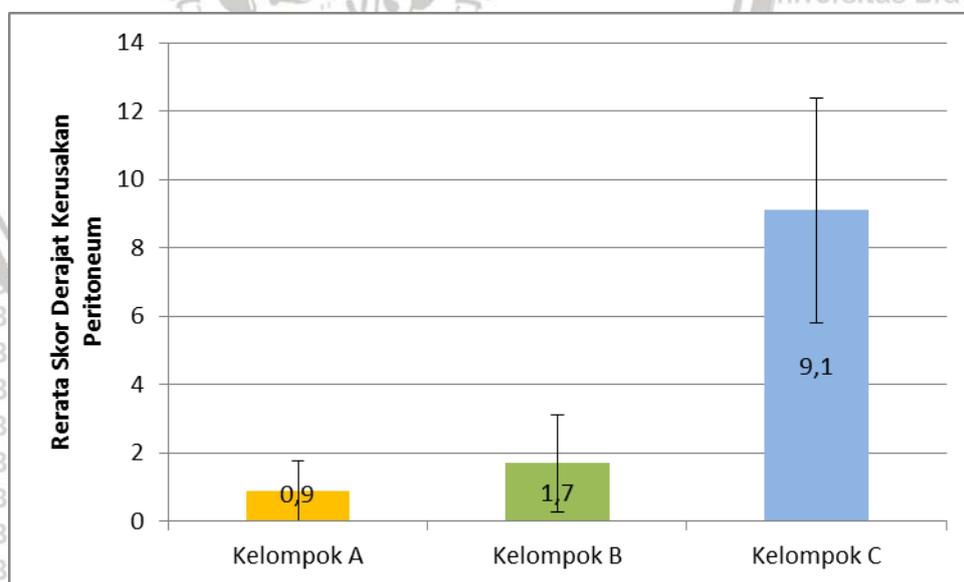
Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa dengan menggunakan sistem skoring Metode Klopffleisch, didapatkan besarnya skor pada kelompok A adalah $0,9 \pm 0,88$, sedangkan skor kelompok B adalah $1,7 \pm 1,42$ dan skor kelompok C adalah $9,1 \pm 3,28$. Hasil pemeriksaan skoring masing-masing kelompok tersebut disajikan dalam tabel berikut:

Tabel 5-5. Skoring Derajat Kerusakan Peritoneum berbagai kelompok perlakuan

| Kelompok | n | Mean ± SD | P-value |
|----------|---|-------------------------|---------|
| A | 9 | 0.9 ± 0.88 ^a | 0,000 |
| B | 9 | 1.7 ± 1.42 ^a | |
| C | 9 | 9.1 ± 3.28 ^b | |

Berdasarkan penghitungan dengan menggunakan sistem skoring Metode Klopfleisch, tampak bahwa kelompok yang mendapatkan supernatan lesi endometriosis uterus memiliki nilai skor yang lebih tinggi dibandingkan kelompok yang mendapatkan suntikan supernatan kerokan endometrium maupun supernatan dinding kista. Sedangkan kelompok yang mendapatkan suntikan supernatan dinding kista memiliki skor yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok yang mendapatkan suntikan supernatan kerokan endometrium.

Perbandingan skoring tersebut dapat dilihat pada histogram berikut ini:



Gambar 5-3 Histogram Perbedaan Derajat Kerusakan Peritoneum berbagai kelompok perlakuan

- A Kelompok kerokan endometrium
- B Kelompok kapsul endometrioma
- C Kelompok adenomiosi

5.1.3.2 Analisis Data Histopatologi Derajat Kerusakan Peritoneum

Uji Asumsi Normalitas dan Homogenitas Ragam

Berdasarkan pada data penelitian, didapatkan beberapa angka 0. Oleh karena itu, sebelum dianalisis lebih lanjut, diperlukan proses transformasi data salah satunya dengan transformasi akar kuadrat ($\sqrt{Y + 0.5}$). Berdasarkan uji asumsi normalitas, didapatkan p-value lebih besar dari $\alpha = 0,05$ yang menunjukkan bahwa asumsi normalitas telah terpenuhi. Demikian juga pada pengujian asumsi homogenitas ragam didapatkan p-value dari 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa asumsi yang melandasi ANOVA pada variabel derajat kerusakan peritoneum telah terpenuhi.

Hasil Pengujian dengan ANOVA

Pengujian dengan menggunakan ANOVA bertujuan untuk mengevaluasi apakah terdapat perbedaan respon secara bermakna antar kelompok.

Berikut hasil pengujian dengan menggunakan ANOVA dan LSD 5% dengan menggunakan bantuan software SPSS :

Tabel 5-6. Pengujian ANOVA dan LSD 5% Data Rerata Derajat Kerusakan Peritoneum

| Kelompok | n | Mean ± SD | P-value |
|----------|---|-------------------------|---------|
| A | 9 | 0.9 ± 0.88 ^a | 0,000 |
| B | 9 | 1.7 ± 1.42 ^a | |
| C | 9 | 9.1 ± 3.28 ^b | |

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

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0,000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$).

Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 %, ditunjukkan bahwa kelompok A memiliki

rata-rata derajat kerusakan peritoneum yang paling rendah, namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok B. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd pada kelompok A dan B memuat huruf yang sama. Sedangkan kelompok C memiliki rata-rata derajat kerusakan peritoneum yang paling tinggi. Derajat kerusakan peritoneum pada kelompok C menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok A dan B. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok C memuat huruf berbeda.

Tabel 5-7. Pengujian LSD 5% Derajat Kerusakan Peritoneum

| Perbandingan | | p-value |
|--------------|---|---------|
| A | B | 0.194 |
| | C | 0.000 |
| B | C | 0.000 |

Berdasarkan pada tabel 5-7 di atas, ditunjukkan bahwa p-value perbandingan antara kelompok A dengan kelompok B lebih dari 0.05 ($p > 0.05$).

Hal ini mengandung pengertian bahwa antara kelompok A dengan kelompok B tidak terdapat perbedaan signifikan rata-rata derajat kerusakan peritoneum.

Sedangkan perbandingan antara kelompok A dengan kelompok C didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Demikian juga pada perbandingan antara kelompok B dengan kelompok C didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$).

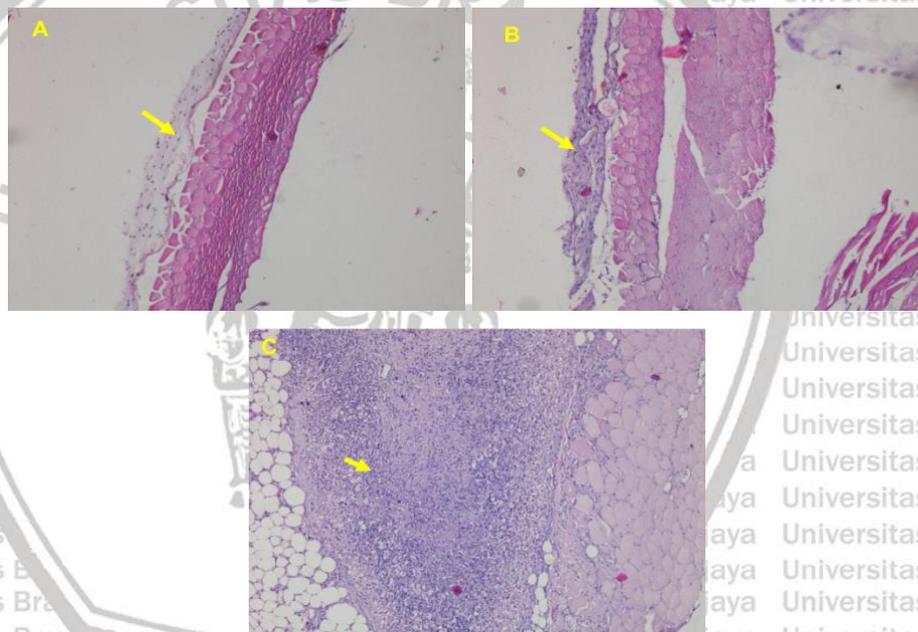
Hal ini mengandung pengertian bahwa derajat kerusakan peritoneum pada kelompok C menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok A dan B, dimana kelompok C memiliki rata-rata derajat kerusakan peritoneum yang paling tinggi.

5.1.3.3 Gambaran Histopatologi Lesi Endometriosis

Pada pemeriksaan histopatologi lesi endometriosis yang terbentuk pada masing-masing kelompok, didapatkan bahwa kelompok mencit model A dan B tampak timbul peradangan dimana pada umumnya peradangan tersebut bersifat

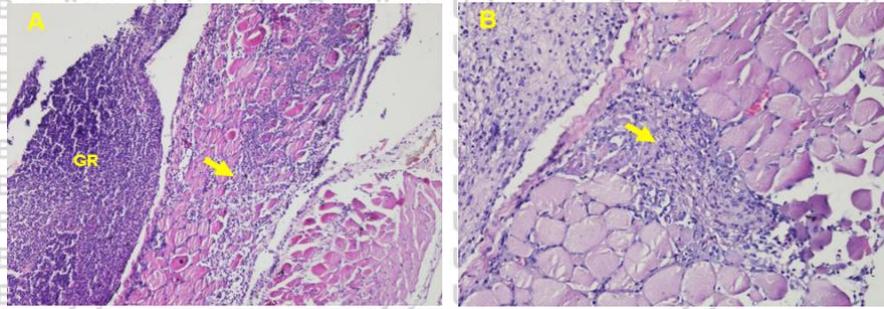
ringan dengan skor antara 1 hingga 5. Sedangkan pada kelompok mencit perlakuan C juga timbul peradangan yang secara umum dengan peradangan berat, dimana beberapa diantaranya diikuti dengan kematian sel-sel miosit dan pembentukan jaringan ikat fibrous. Perbandingan pemeriksaan histopatologi tersebut dapat dilihat pada Gambar 12.

Pada mencit model kelompok C didapatkan gambaran massa granuloma, dan infiltrasi masif sel-sel radang dan terjadi pembentukan jaringan ikat fibrous pada jaringan otot. Sedangkan pada mencit yang mendapatkan supernatan kerokan endometrium tidak didapatkan massa granuloma. Pewarnaan tersebut dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 5-4 Gambaran Histopatologi Derajat Kerusakan Peritoneum.

Keterangan : Pada kelompok model mencit A dan B peradangan umumnya bersifat ringan dengan skor antara 1 hingga 3, sedangkan pada kelompok mencit perlakuan C secara umum terjadi peradangan berat, dimana beberapa diantaranya diikuti dengan kematian sel-sel miosit dan pembentukan jaringan ikat fibrous (pewarnaan HE, Pembesaran 100x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel).



Gambar 5-5. Gambaran massa granuloma, infiltrasi sel-sel radang dan jaringan ikat pada jaringan otot pada kelompok mencit yang mendapatkan injeksi isolat endometrium-miometrium uterus dari wanita dengan adenomiosis.

Keterangan : Gambar A menunjukkan masa granuloma (GR) dan infiltrasi masif sel-sel radang pada jaringan otot (panah). B pembentukan jaringan ikat fibrous (panah) diantara masa sel otot (pewarnaan HE; Pembesaran 200x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel).



5.1.4 Imunohistokimia Peritoneum

Pemeriksaan imunohistokimia dimaksudkan untuk mengetahui ekspresi RE- α , RE- β dan RP pada peritoneum. Ekspresi reseptor pada setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut Metode Remmele yang sudah dimodifikasi (Nowak et al., 2007). Indeks skala Remmele (*Immuno Reactive Score/IRS*) merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif. Data setiap sampel merupakan nilai rata-rata IRS yang teramati pada lima lapangan pandang yang berbeda pada pembesaran 400x.

5.1.4.1 Ekspresi Reseptor Estrogen- α

Data Ekspresi Reseptor Estrogen- α

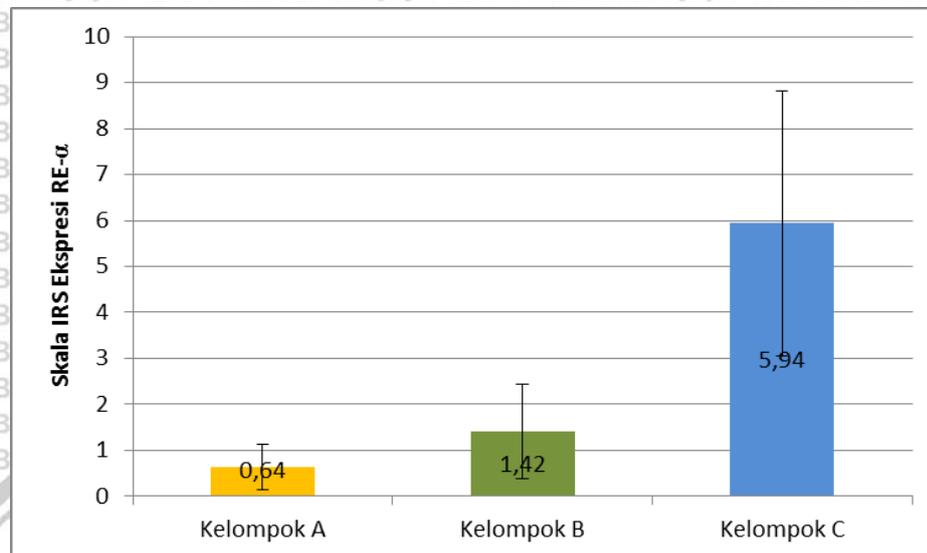
Pemeriksaan imunohistokimia yang dilakukan pada mencit percobaan pada masing-masing kelompok, didapatkan nilai rerata skor IRS sebesar $0,64 \pm 0,5$ (kelompok A), $1,42 \pm 1,023$ (kelompok B), dan $5,94 \pm 2,88$ (kelompok C). Kelompok C (mencit yang mendapatkan suntikan supernatan lesi endometrium uterus) memiliki nilai rerata skor IRS yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok lainnya, seperti tampak pada Tabel 13 berikut:

Tabel 5-8. Perbandingan Skala Semikuantitatif IRS Ekspresi RE- α

| Kelompok | Mean \pm SD | P-value |
|----------|------------------------------|---------|
| A | 0.64 ± 0.5 ^a | 0,000 |
| B | 1.42 ± 1.03 ^a | |
| C | 5.94 ± 2.88 ^b | |

Pada kelompok mencit yang mendapatkan suntikan supernatan dinding endometrioma memiliki nilai skor IRS yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang mendapatkan suntikan supernatan kerokan endometrium.

Perbandingan ekspresi reseptor RE- α yang dihasilkan dari perlakuan yang dilakukan antar kelompok tersebut dapat dilihat pada histogram berikut ini:



Gambar 5-6 Histogram Perbandingan Data Rerata Ekspresi RE- α pada Sel Mesotel Peritoneum.

- A Kelompok kerokan endometrium
- B Kelompok kapsul endometrioma
- C Kelompok adenomiosis

Analisa Data Ekspresi RE- α

Uji Asumsi Normalitas dan Homogenitas Ragam

Berdasarkan pada data penelitian, didapatkan beberapa Ekspresi RE- α dengan angka 0. Oleh karena itu, sebelum dianalisis lebih lanjut, diperlukan proses transformasi data salah satunya dengan transformasi akar kuadrat ($\sqrt{Y + 0.5}$). Berikut hasil pengujian asumsi normalitas dan homogenitas ragam dengan menggunakan bantuan software SPSS dapat dilihat pada Lampiran 7.

Berdasarkan pada uji asumsi normalitas, didapatkan p-value lebih besar dari $\alpha = 0,05$ yang menunjukkan bahwa asumsi normalitas telah terpenuhi. Demikian juga pada pengujian asumsi homogenitas ragam didapatkan p-value dari 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa asumsi yang melandasi ANOVA pada variabel ekspresi RE- α telah terpenuhi.

Hasil Pengujian dengan ANOVA

Berikut hasil pengujian dengan menggunakan ANOVA dan LSD 5% dengan menggunakan bantuan software SPSS :

Tabel 5-9. Pengujian ANOVA dan LSD 5% Data Rerata Ekspresi RE- α

| Kelompok | n | Mean \pm SD | P-value |
|----------|---|------------------------------|---------|
| A | 9 | 0.64 \pm 0.5 ^a | 0.000 |
| B | 9 | 1.42 \pm 1.03 ^a | |
| C | 9 | 5.94 \pm 2.88 ^b | |

Keterangan : Pada rata-rata \pm sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0,000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata ekspresi RE- α . Untuk mengetahui perbedaan lebih lanjut rata-rata ekspresi RE- α pada masing-masing kelompok dilakukan pengujian dengan menggunakan LSD 5%. Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 %, ditunjukkan bahwa kelompok A memiliki rata-rata ekspresi RE- α yang paling rendah, namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok B. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd pada kelompok A dan B memuat huruf yang sama. Sedangkan kelompok C memiliki rata-rata ekspresi RE- α yang paling tinggi. Ekspresi RE- α pada kelompok C menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok A dan B. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok C memuat huruf berbeda.

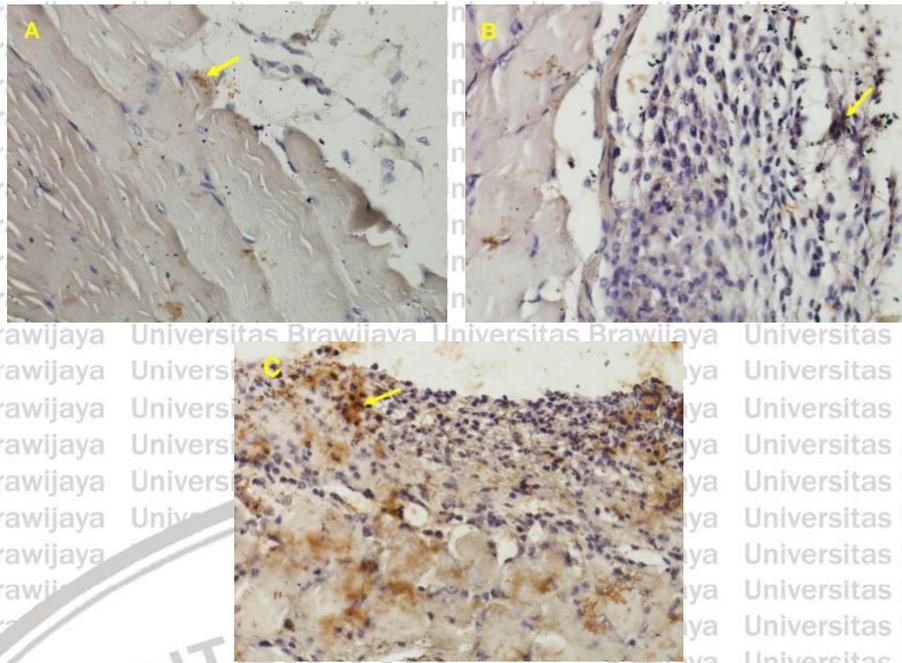
Tabel 5-10. Pengujian LSD 5% Ekspresi RE- α

| Perbandingan | | p-value |
|--------------|---|---------|
| A | B | 0.130 |
| A | C | 0.000 |
| B | C | 0.000 |

Berdasarkan pada tabel 5-10 di atas, ditunjukkan bahwa p-value perbandingan antara kelompok A dengan kelompok B lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Hal ini mengandung pengertian bahwa antara kelompok A dengan kelompok B tidak terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi RE- α . Sedangkan perbandingan antara kelompok A dengan kelompok C didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Demikian juga pada perbandingan antara kelompok B dengan kelompok C didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Hal ini mengandung pengertian bahwa ekspresi RE- α pada kelompok C menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok A dan B, dimana kelompok C memiliki rata-rata ekspresi RE- α yang paling tinggi.

Gambaran Immunohistokimia RE- α

Pada pewarnaan lesi endometrium yang didapatkan dari masing-masing kelompok, didapatkan gambaran ekspresi RE- α yang paling kuat terjadi pada kelompok mencit perlakuan C diikuti dengan kelompok mencit perlakuan B dan A. Hasil pewarnaan lesi endometriosis yang terbentuk dari masing-masing kelompok yang representatif dapat dilihat pada Gambar 19. Tampak bahwa ekspresi RE- α pada sel mesotel peritoneum dan sel radang yang dihasilkan dari masing-masing perlakuan berbeda antar kelompok.



Gambar 5-7. Perbandingan ekspresi RE- α (panah) pada sel mesotel peritoneum dan sel radang diantara kelompok perlakuan.

Keterangan : Pada slide diatas nampak bahwa ekspresi RE- α paling kuat terjadi pada kelompok mencit perlakuan C diikuti dengan kelompok mencit perlakuan B dan A (pewarnaan immuno histokimia, Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS F12 300 megapixel).

5.1.4.2 Ekspresi Reseptor RE- β

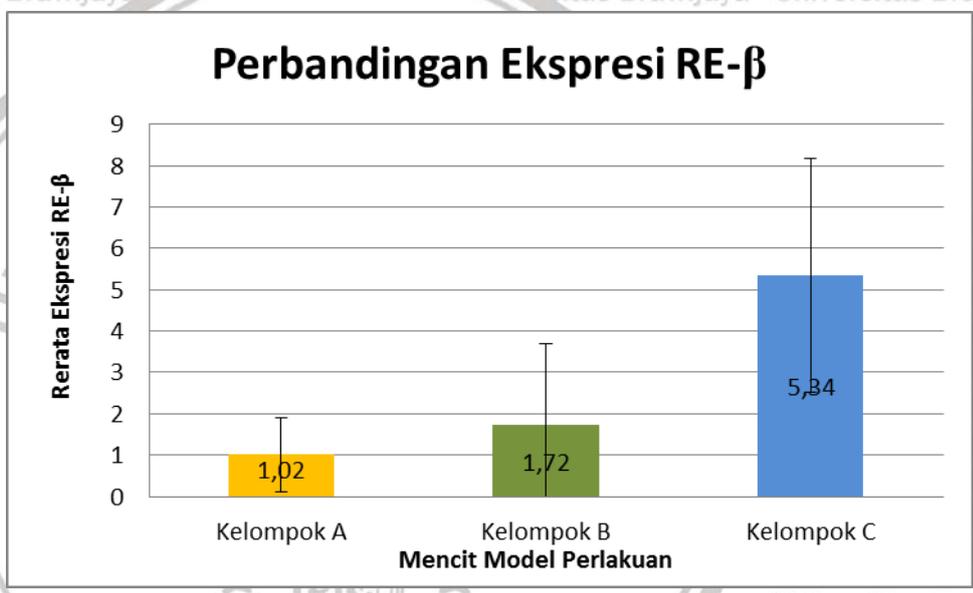
Data Ekspresi RE- β

Pemeriksaan histopatologi ini dimaksudkan untuk mengetahui ekspresi RE- β pada peritonium yang dihasilkan dari perlakuan pada masing-masing mencit. Hasil pemeriksaan ekspresi RE- β dengan menggunakan skala semikuantitatif IRS dapat dilihat pada Lampiran 4. Tampak bahwa pada mencit yang mendapatkan perlakuan suntikan supernatan kerokan endometrium didapatkan nilai skor IRS sebesar $1,02 \pm 0,9$. Pada mencit yang mendapatkan perlakuan suntikan supernatan dinding kista didapatkan nilai skor IRS sebesar $1,72 \pm 1,98$. Sedangkan pada mencit yang mendapatkan suntikan supernatan lesi endometrium-miometrium uterus dengan adenomiosis didapatkan nilai skor IRS sebesar $5,34 \pm 2,82$.

Tabel 5-11. Perbandingan Nilai Rerata Skala Semikuantitatif IRS Ekspresi RE-β

| Kelompok | n | Mean ± SD | P-value |
|----------|---|-------------|---------|
| A | 9 | 1.02 ± 0.9 | a |
| B | 9 | 1.72 ± 1.98 | a |
| C | 9 | 5.34 ± 2.82 | b |

Berdasarkan skala semikuantitatif IRS masing-masing kelompok, tampak bahwa nilai skala IRS kelompok C memiliki angka lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok A dan B. Berikut ini adalah histogram perbandingan ekspresi RE-β pada masing-masing kelompok perlakuan:



Gambar 5-8 Histogram Perbandingan Ekspresi RE-β pada Sel Mesotel Peritoneum.

- A Kelompok kerokan endometrium
- B Kelompok kapsul endometrioma
- C Kelompok adenomiosis

Analisa Data Ekspresi RE-β

Uji Asumsi Normalitas dan Homogenitas Ragam

Berdasarkan data penelitian yang didapatkan, terdapat beberapa nilai skoring IRS ekspresi RE-β dengan angka 0. Oleh karena itu, sebelum dianalisis lebih lanjut,

diperlukan proses transformasi data salah satunya dengan transformasi akar kuadrat ($\sqrt{Y + 0.5}$).

Berdasarkan uji asumsi normalitas, didapatkan p-value lebih besar dari $\alpha = 0,05$ yang menunjukkan bahwa asumsi normalitas telah terpenuhi. Demikian juga pada pengujian asumsi homogenitas ragam didapatkan p-value dari 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa asumsi yang melandasi ANOVA pada variabel ekspresi RE- β telah terpenuhi.

Hasil Pengujian dengan ANOVA

Pengujian dengan menggunakan ANOVA bertujuan untuk mengevaluasi apakah terdapat perbedaan respon secara bermakna antar kelompok.

Berikut hasil pengujian dengan menggunakan ANOVA dan LSD 5% dengan menggunakan bantuan software SPSS :

Tabel 5-12. Pengujian ANOVA dan LSD 5% Data Rerata Ekspresi RE- β

| Kelompok | n | Mean \pm SD | P-value |
|----------|---|------------------------------|---------|
| A | 9 | 1.02 \pm 0.9 ^a | 0.000 |
| B | 9 | 1.72 \pm 1.98 ^a | |
| C | 9 | 5.34 \pm 2.82 ^b | |

Keterangan : Pada rata-rata \pm sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0,000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) yang berarti H_0 ditolak. Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata ekspresi RE- β . Untuk mengetahui perbedaan lebih lanjut rata-rata ekspresi RE- β pada masing-masing kelompok dilakukan pengujian dengan menggunakan LSD 5%. Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 %, ditunjukkan bahwa kelompok A memiliki rata-rata ekspresi RE- β yang paling rendah, namun tidak

berbeda signifikan dengan kelompok B. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd pada kelompok A dan B memuat huruf yang sama. Sedangkan kelompok C memiliki rata-rata ekspresi RE- β yang paling tinggi. ekspresi RE- β pada kelompok C menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok A dan B. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok C memuat huruf berbeda.

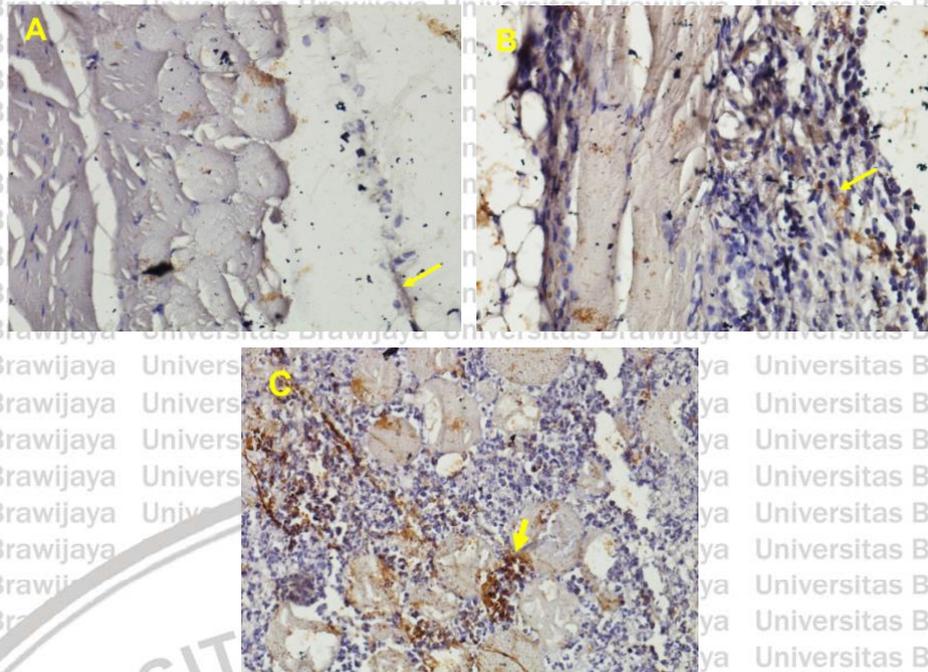
Tabel 5-13. Pengujian LSD 5% Ekspresi RE- β

| Perbandingan | | p-value |
|--------------|---|---------|
| A | B | 0.450 |
| | C | 0.000 |
| B | C | 0.000 |

Berdasarkan pada tabel di atas, tampak bahwa p-value perbandingan antara kelompok A dengan kelompok B lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Hal ini mengandung pengertian bahwa antara kelompok A dengan kelompok B tidak terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi RE- β . Sedangkan perbandingan antara kelompok A dengan kelompok C didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Demikian juga pada perbandingan antara kelompok B dengan kelompok C didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Hal ini mengandung pengertian bahwa ekspresi RE- β pada kelompok C menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok A dan B, dimana kelompok C memiliki rata-rata ekspresi RE- β yang paling tinggi.

Gambaran Pemeriksaan Immunohistokimia RE- β

Pemeriksaan immunohistokimia yang dilakukan pada bercak endometriosis yang didapatkan pada masing-masing mencit, menunjukkan bahwa pada kelompok mencit C memiliki ekspresi RE- β paling kuat dibandingkan dengan kelompok A dan B.



Gambar 5-9 Perbandingan RE-β pada sel-sel mesotel dan sel radang (panah) diantara kelompok perlakuan.

Keterangan : Ekspresi RE-β paling kuat ditemukan pada kelompok mencit perlakuan C diikuti oleh kelompok mencit perlakuan B dan A (*pewarnaan immuno histokimia, Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel*).

Sedangkan kelompok mencit B memiliki ekspresi yang lebih kuat dibandingkan dengan kelompok A seperti tampak pada Gambar 17. Sehingga dapat dilihat bahwa mencit yang mendapatkan suntikan supernatan lesi endometriosis uterus memiliki RE-β yang lebih besar, sedangkan mencit dengan perlakuan suntikan supernatan dari kerokan endometrium memiliki tingkat ekspresi RE-β yang paling lemah diantara ketiga kelompok.

5.1.4.3 Ekspresi Reseptor Progesteron

Data Ekspresi Reseptor Progesteron

Pemeriksaan imunohistokimia ekspresi RP pada semua mencit dari masing-masing kelompok didapatkan nilai skor IRS sebesar $1,4 \pm 1,21$ pada kelompok A, nilai

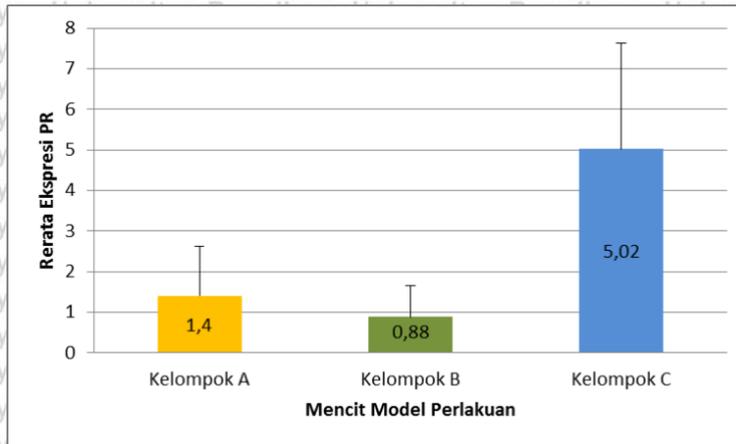
skor $0,88 \pm 0,77$ pada kelompok B dan $5,02 \pm 2,6$ pada kelompok C. Ekspresi RP tersebut pada masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel 19 berikut ini:

Tabel 5-14. Skala Semikuantitatif IRS Ekspresi RP.

| Kelompok | n | Mean \pm SD | P-value |
|----------|---|------------------------------|---------|
| A | 9 | $1,4 \pm 1,21$ ^a | 0,000 |
| B | 9 | $0,88 \pm 0,77$ ^a | |
| C | 9 | $5,02 \pm 2,6$ ^b | |

Pemeriksaan Immunohistokimia ini dimaksudkan untuk mengetahui ekspresi RP pada peritonium. Ekspresi RP pada setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut metode Remmele yang sudah dimodifikasi (Nowak *et al.*, 2007), dimana Indeks skala Remmele (*Immuno Reactive Score/IRS*) merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif. Data setiap sampel merupakan nilai rata-rata IRS yang teramati pada lima lapangan pandang berbeda pada pembesaran 400x.

Berdasarkan skala semikuantitatif IRS masing-masing kelompok, tampak bahwa ekspresi RP pada kelompok yang mendapatkan suntikan supernatan jaringan endometrium-miometrium uterus wanita dengan adenomiosis memiliki angka skor IRS yang lebih besar dibandingkan dengan dua kelompok lainnya. Sedangkan mencit yang mendapat perlakuan suntikan supernatan kerokan endometrium memiliki ekspresi yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok mencit yang mendapatkan suntikan supernatan dinding endometrioma. Berikut ini adalah diagram perbandingan ekspresi RP pada masing-masing kelompok perlakuan:



Gambar 5-10 Histogram Perbandingan Ekspresi PR Mesotel Peritonium.

Analisa data Ekspresi Reseptor Progesteron

Uji Asumsi Normalitas dan Homogenitas Ragam

Berdasarkan uji asumsi normalitas, didapatkan p-value lebih besar dari $\alpha = 0,05$ yang menunjukkan bahwa asumsi normalitas telah terpenuhi. Demikian juga pada pengujian asumsi homogenitas ragam didapatkan p-value dari $0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa asumsi yang melandasi ANOVA pada variabel ekspresi RP telah terpenuhi.

Hasil Pengujian dengan ANOVA

Pengujian dengan menggunakan ANOVA bertujuan untuk mengevaluasi apakah terdapat perbedaan respon secara bermakna antar kelompok.

Berikut hasil pengujian dengan menggunakan ANOVA dan LSD 5% dengan menggunakan bantuan software SPSS :

Tabel 5-15. Pengujian ANOVA dan LSD 5% Data Rerata Ekspresi RP

| Kelompok | n | Mean \pm SD | P-value |
|----------|---|------------------------------|---------|
| A | 9 | 1.4 \pm 1.21 ^a | 0.000 |
| B | 9 | 0.88 \pm 0.77 ^a | |
| C | 9 | 5.02 \pm 2.6 ^b | |

Keterangan : Pada rata-rata \pm sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0,000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) yang berarti H_0 ditolak.

Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata ekspresi RP. Untuk mengetahui perbedaan lebih lanjut rata-rata ekspresi RP pada masing-masing kelompok dilakukan pengujian dengan menggunakan LSD 5%. Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 %, ditunjukkan bahwa kelompok A memiliki rata-rata ekspresi RP yang paling rendah, namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok B. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd pada kelompok A dan B memuat huruf yang sama. Sedangkan kelompok C memiliki rata-rata ekspresi RP yang paling tinggi. Ekspresi RP pada kelompok C menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok A dan B. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok C memuat huruf berbeda.

Tabel 5-16. Pengujian LSD 5% Ekspresi RP

| Perbandingan | | p-value |
|--------------|---|---------|
| A | B | 0.433 |
| | C | 0.000 |
| B | C | 0.000 |

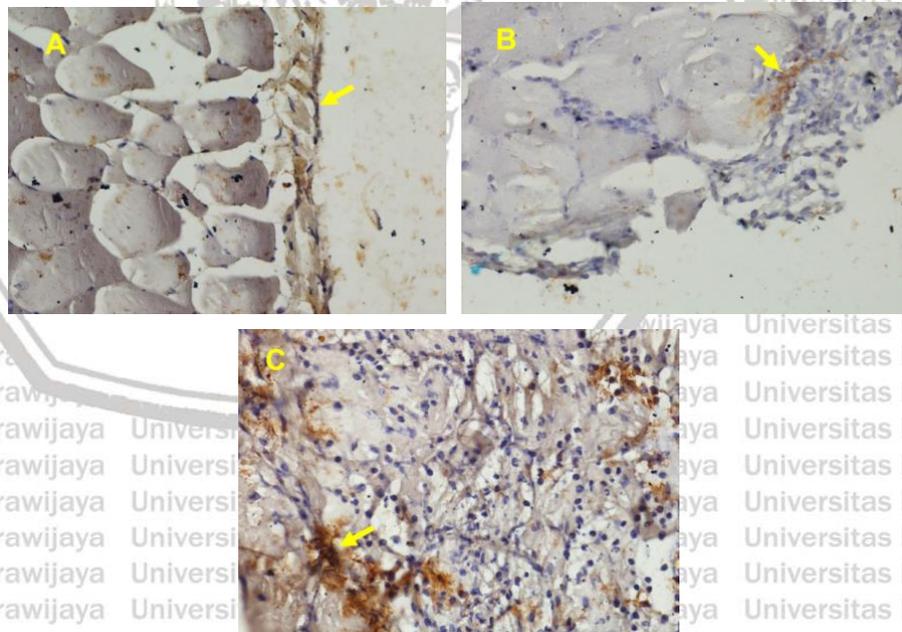
Berdasarkan pada tabel di atas, tampak bahwa p-value perbandingan antara kelompok A dengan kelompok B lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Hal ini mengandung pengertian bahwa antara kelompok A dengan kelompok B tidak terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi RP. Sedangkan perbandingan antara kelompok A dengan kelompok C didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Demikian juga pada perbandingan antara kelompok B dengan kelompok C didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Hal ini mengandung pengertian bahwa ekspresi RP pada

kelompok C menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok A dan B, dimana kelompok C memiliki rata-rata ekspresi RP yang paling tinggi.

Gambaran Pemeriksaan Immunohistokimia RP

Pemeriksaan imunohistokimia dengan pewarnaan HE, didapatkan gambaran ekspresi reseptor progesteron pada semua kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa masing-masing kelompok perlakuan dapat menghasilkan suatu *endometriotic implant* yang memiliki reseptor progesteron.

Dengan teknik pengecatan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi spesifik, didapatkan gambaran reseptor progesteron pada lapisan mesotel peritoneum mencit model. Penelitian ini menghasilkan lesi endometriotik dengan gambaran ekspresi PR yang bervariasi antar kelompok perlakuan. Gambar 19 menunjukkan bahwa kelompok mencit model perlakuan C memiliki ekspresi yang lebih kuat dibandingkan dengan kelompok B dan A.



Gambar 5-11 Perbandingan Ekspresi RP (panah) pada Lapisan Mesotel Peritoneum.

Keterangan : Ekspresi RP pada lapisan mesotel peritoneum kelompok mencit perlakuan C lebih kuat dibandingkan kelompok B dan A (pewarnaan *immuno-histokimia*, Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel).

5.2 Hasil Penelitian Tahap II

5.2.1 Gambaran Umum Hasil Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Reproduksi Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Pelaksanaan dilaksanakan selama 3 bulan terhitung mulai bulan Agustus sampai dengan Oktober 2017, dengan rincian selama 1 minggu dilakukan adaptasi, 15 hari dilakukan perlakuan, selanjutnya digunakan untuk pembuatan sediaan pemeriksaan imunohistokimia dan histopatologi. Selanjutnya dilakukan analisa data.

5.2.2 Pengujian Asumsi yang Melandasi ANOVA

Sebelum dilakukan pengujian dengan menggunakan ANOVA, terlebih dahulu dilakukan pengujian asumsi yang melandasi ANOVA. Terdapat dua asumsi yang melandasi ANOVA, yakni asumsi normalitas dan homogenitas ragam. Pengujian asumsi normalitas dilakukan dengan menggunakan uji Saphiro-Wilk. Asumsi normalitas dikatakan terpenuhi jika p-value hasil penghitungan lebih besar dari $\alpha = 0,05$. Dengan menggunakan bantuan software SPSS didapatkan hasil pengujian asumsi normalitas sebagai berikut :

Tabel 5-17 Uji Asumsi Normalitas

| Variabel | Koefisien | p-value | Keterangan |
|---------------------------------|-----------|---------|--------------|
| Ekspresi BAX | 0.931 | 0.006 | Tidak Normal |
| Ekspresi BCL-2 | 0.977 | 0.448 | Normal |
| Ekspresi PCNA | 0.919 | 0.002 | Tidak Normal |
| Ekspresi NFkB | 0.968 | 0.192 | Normal |
| Ekspresi RE- α | 0.864 | 0.000 | Tidak Normal |
| Ekspresi RE- β | 0.945 | 0.021 | Tidak Normal |
| Rasio BAX/BCL-2 | 0.916 | 0.002 | Tidak Normal |
| Rasio RE- α /RE- β | 0.866 | 0.000 | Tidak Normal |

Berdasarkan pada tabel 5-17 di atas, pada variabel ekspresi BCL-2 dan Ekspresi NFkB didapatkan p-value lebih dari $\alpha = 0,05$ ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa asumsi normalitas pada kedua variabel tersebut telah terpenuhi. Sedangkan pada variabel yang lain, didapatkan p-value kurang dari $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa asumsi normalitas pada variabel-variabel tersebut tidak terpenuhi. Oleh karena itu diperlukan proses transformasi data.

Pengujian asumsi homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan uji Levene. Asumsi homogenitas ragam dikatakan terpenuhi jika p-value hasil penghitungan lebih besar daripada $\alpha = 0,05$. Berikut hasil pengujian asumsi homogenitas ragam :

Tabel 5-18 Uji Asumsi Homogenitas Ragam

| Variabel | Koefisien | p-value | Keterangan |
|---------------------------------|-----------|---------|---------------|
| Ekspresi BAX | 4.349 | 0.005 | Tidak Homogen |
| Ekspresi BCL-2 | 4.036 | 0.007 | Tidak Homogen |
| Ekspresi PCNA | 28.488 | 0.000 | Tidak Homogen |
| Ekspresi NFkB | 9.896 | 0.000 | Tidak Homogen |
| Ekspresi RE- α | 2.140 | 0.091 | Homogen |
| Ekspresi RE- β | 4.454 | 0.004 | Tidak Homogen |
| Rasio BAX/BCL-2 | 8.778 | 0.000 | Tidak Homogen |
| Rasio RE- α /RE- β | 2.172 | 0.087 | Homogen |

Berdasarkan pada hasil pengujian asumsi homogenitas ragam pada tabel di atas, ditunjukkan bahwa pada variabel ekspresi RE- α dan Rasio RE- α /RE- β didapatkan p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Oleh karena itu, asumsi homogenitas ragam pada kedua variabel tersebut telah terpenuhi. Namun pada variabel-variabel yang lain, didapatkan p-value kurang dari $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa asumsi homogenitas ragam pada variabel-variabel tersebut tidak terpenuhi. Oleh karena itu diperlukan proses transformasi data.

Salah satu transformasi data yang dapat diterapkan adalah dengan transformasi Logaritma Natural Ln (Y). Berikut hasil pengujian asumsi normalitas dan homogenitas ragam pada data yang telah ditransformasi :

Tabel 5-19 Uji Asumsi Normalitas dan Homogenitas Ragam Variabel yang Telah Ditransformasi

Uji Asumsi Normalitas

| Variabel | Koefisien | P-value | Keterangan |
|---------------------------------|-----------|---------|------------|
| Ekspresi BAX | 0.985 | 0.792 | Normal |
| Ekspresi BCL-2 | 0.970 | 0.226 | Normal |
| Ekspresi PCNA | 0.957 | 0.066 | Normal |
| Ekspresi NFkB | 0.960 | 0.085 | Normal |
| Ekspresi RE- α | 0.964 | 0.125 | Normal |
| Ekspresi RE- β | 0.961 | 0.102 | Normal |
| Rasio BAX/BCL-2 | 0.971 | 0.263 | Normal |
| Rasio RE- α /RE- β | 0.982 | 0.660 | Normal |

Uji Asumsi Homogenitas Ragam

| Variabel | Koefisien | p-value | Keterangan |
|---------------------------------|-----------|---------|---------------|
| Ekspresi BAX | 2.725 | 0.041 | Tidak Homogen |
| Ekspresi BCL-2 | 1.066 | 0.384 | Homogen |
| Ekspresi PCNA | 18.336 | 0.000 | Tidak Homogen |
| Ekspresi NFkB | 9.818 | 0.000 | Tidak Homogen |
| Ekspresi RE- α | 1.512 | 0.215 | Homogen |
| Ekspresi RE- β | 5.311 | 0.001 | Tidak Homogen |
| Rasio BAX/BCL-2 | 2.439 | 0.061 | Homogen |
| Rasio RE- α /RE- β | 2.918 | 0.031 | Tidak Homogen |

Berdasarkan tabel 5-19 di atas, hasil uji asumsi normalitas pada semua variabel penelitian yang telah ditransformasi, didapatkan p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$) yang menunjukkan bahwa asumsi normalitas pada semua variabel sudah terpenuhi dengan melakukan transformasi data. Pada hasil uji asumsi homogenitas ragam, variabel ekspresi BCL-2, Ekspresi RE- α , dan Rasio BAX/BCL-2 memiliki p-

value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$) yang menunjukkan asumsi homogenitas ragam telah terpenuhi setelah dilakukan transformasi data. Oleh karena itu, proses analisis pada variabel ekspresi BCL-2, Ekspresi RE- α , dan Rasio BAX/BCL-2 dilakukan dengan menggunakan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji LSD 5%. Sedangkan pada variabel yang lain didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) yang menunjukkan bahwa asumsi homogenitas ragam belum terpenuhi meskipun sudah dilakukan transformasi data. Oleh karena itu, proses pengujian secara statistik pada variabel yang lain dilakukan dengan menggunakan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Dunnet T3 5%.

5.2.3 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi BAX dengan Uji ANOVA

Sebagaimana telah dijelaskan dalam hasil pengujian asumsi normalitas dan asumsi homogenitas ragam, variabel ekspresi BAX telah terpenuhi asumsi normalitas namun tidak terpenuhi asumsi homogenitas ragam. Selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh pemberian genistein terhadap ekspresi BAX secara parametrik dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Dunnet T3 5%. Berikut hasil pengujian pengaruh pemberian Genistein dengan beberapa level dosis terhadap ekspresi BAX dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Dunnet T3 5%.

Tabel 5-20 Perbandingan Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi BAX dengan Uji ANOVA dan Uji Dunnet T3 5%

| Perlakuan | n | Mean ± SD | p-value |
|-----------|---|-----------------------------|---------|
| K+ | 6 | 123 ± 18.89 ^a | 0.000 |
| P1 | 6 | 172 ± 47.46 ^{ab} | |
| P2 | 6 | 429.5 ± 124.85 ^c | |
| P3 | 6 | 559.4 ± 74.3 ^c | |
| P4 | 6 | 189.3 ± 33.3 ^b | |

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

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian genistein terhadap ekspresi BAX. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi BAX akibat pemberian genistein dengan dosis yang berbeda.

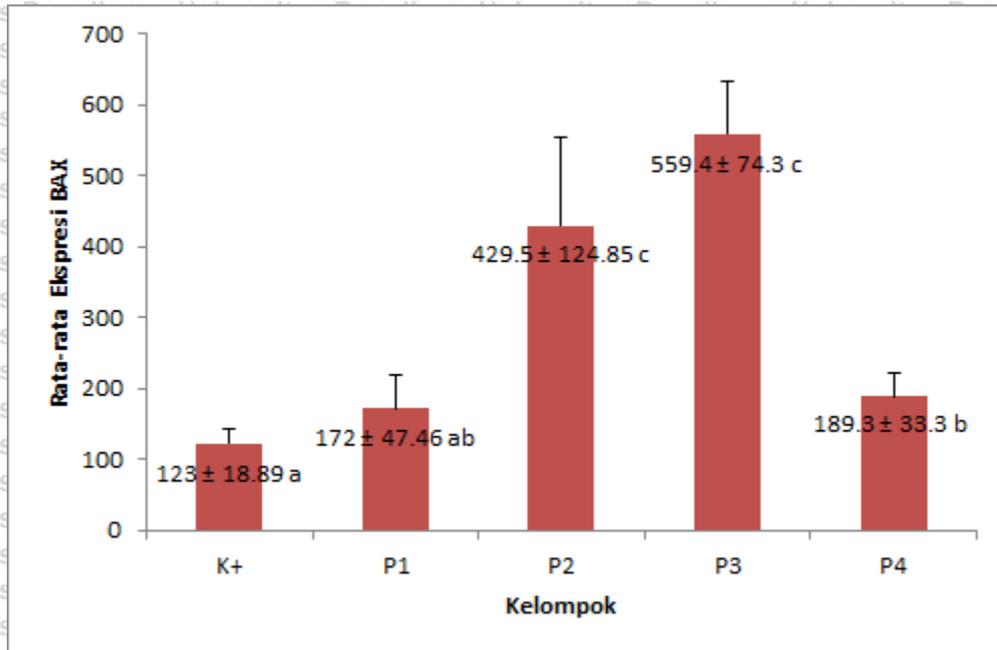
Berdasarkan pada hasil uji Dunnet T3 5 % pada tabel di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa peningkatan ekspresi BAX secara signifikan ditunjukkan pada kelompok perlakuan P2, P3, dan P4. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata ± sd kelompok perlakuan P2, P3, dan P4 lebih tinggi dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif.

Tabel 5-21 Perbandingan Ekspresi BAX Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji Dunnet T3 5%

| Perbandingan | | Beda Rata-Rata | p-value |
|--------------|----|----------------|---------|
| K+ | P1 | -0.311 | 0.074 |
| | P2 | -1.221 | 0.000 |
| | P3 | -1.518 | 0.000 |
| | P4 | -0.428 | 0.000 |
| P1 | P2 | -0.910 | 0.000 |
| | P3 | -1.207 | 0.000 |
| | P4 | -0.117 | 0.941 |
| P2 | P3 | -0.297 | 0.121 |
| | P4 | 0.793 | 0.000 |
| P3 | P4 | 1.090 | 0.000 |

Berdasarkan pada hasil uji Dunnet T3 5 % pada Tabel 5-21 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa pada kelompok P2, P3, dan P4 didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) yang menunjukkan terjadinya peningkatan ekspresi BAX secara signifikan. Sedangkan pada kelompok P1 didapatkan p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Dari pengujian ini dibuktikan bahwa peningkatan ekspresi BAX secara signifikan terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dosis 1,95 mg/hari (P2), 2,6 mg/hari (P3), dan 3,25 mg/hari (P4). Pada perbandingan antar kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa pada perbandingan antara P1 dengan P4 dan P2 dengan P3 didapatkan p-value lebih dari 0,05 ($p > 0.05$). Rata-rata ekspresi BAX pada kelompok pemberian genistein 1,30 mg/hari (P1) tidak berbeda signifikan dengan kelompok pemberian genistein 3,25 mg/hari (P4). Demikian juga rata-rata ekspresi BAX pada kelompok pemberian genistein 1,95 mg/hari (P2) tidak berbeda signifikan dengan kelompok pemberian genistein 2,60 mg/hari (P3).

Rata-rata ekspresi BAX kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :

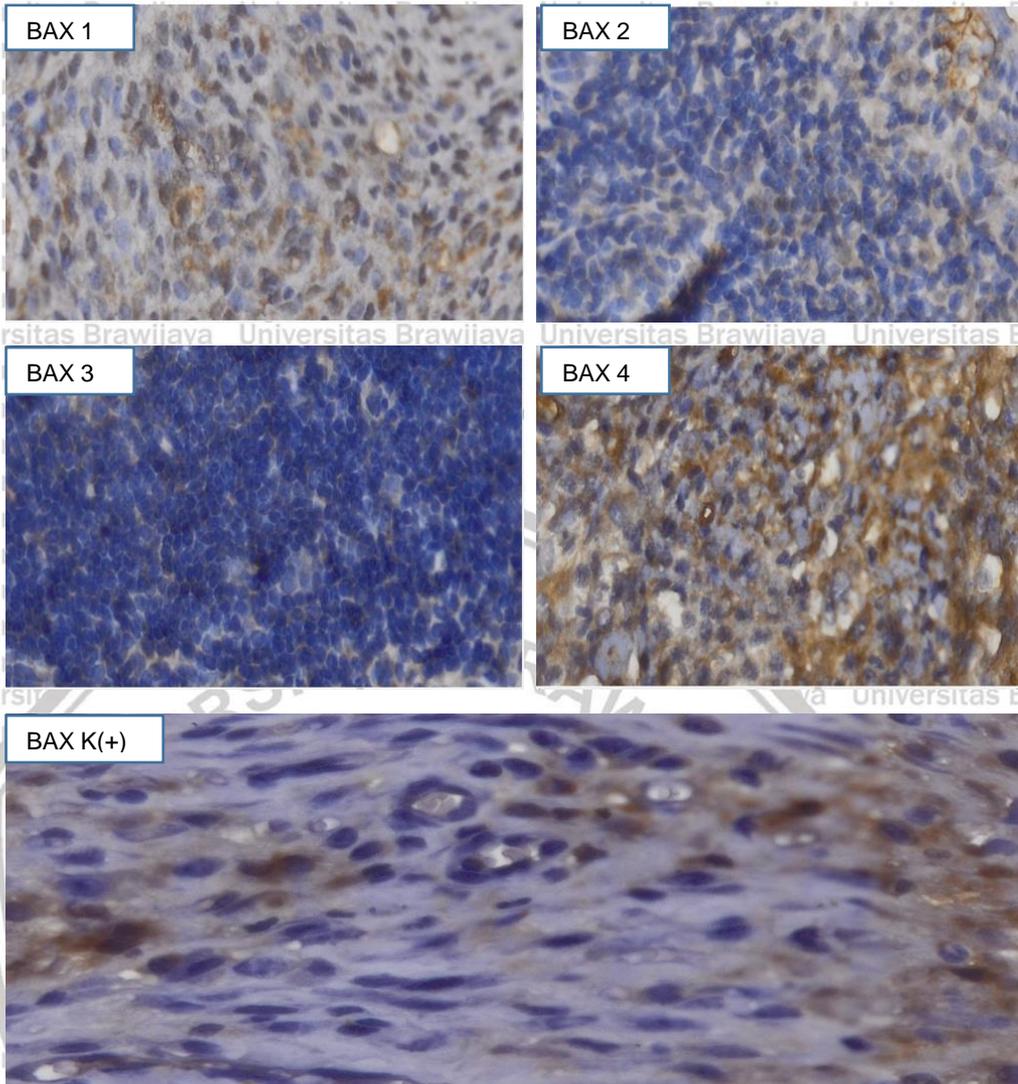


Gambar 5-12 Histogram Rata-Rata Ekspresi BAX

Pada Gambar 5-12 ditunjukkan histogram rata-rata ekspresi BAX semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok K+, terlihat bahwa rata-rata ekspresi BAX meningkat pada semua kelompok perlakuan pemberian genistein. Secara statistik, terbukti bahwa peningkatan signifikan ekspresi BAX terjadi pada pemberian genistein dengan dosis 1,95 mg/hari (P2), 2,6 mg/hari (P3), dan 3,25 mg/hari (P4).

Gambaran Histopatologi Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi Bax

Pada pemeriksaan histopatologi didapatkan semakin tinggi dosis genistein yang diberikan, terjadi peningkatan ekspresi Bax pada mencit model endometriosis.



Gambar 5-13 Gambaran Histopatologi Ekspresi BAX

Keterangan : Perbandingan ekspresi BAX pada mencit model endometriosis. Pada kelompok K(+) didapatkan reaksi warna, reaksi warna semakin kuat didapatkan pada perlakuan 3. (pewarnaan immunohistokimia, Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2300 megapixel)

5.2.1. Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi BCL-2 dengan Uji ANOVA

Sebagaimana telah dijelaskan dalam hasil pengujian asumsi normalitas dan asumsi homogenitas ragam, variabel ekspresi BCL-2 telah terpenuhi asumsi normalitas dan homogenitas ragam. Selanjutnya dilakukan pengujian untuk

mengetahui pengaruh pemberian genistein terhadap ekspresi BCL-2 secara parametrik dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji LSD 5%.

Berikut hasil pengujian pengaruh pemberian Genistein dengan beberapa level dosis terhadap ekspresi BCL-2 dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji LSD 5%.

Tabel 5-22 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi BCL-2 dengan Uji ANOVA dan Uji LSD 5%

| Perlakuan | n | Mean \pm SD | p-value |
|-----------|---|--------------------------------|---------|
| K+ | 6 | 143.2 \pm 36.87 ^a | 0.000 |
| P1 | 6 | 187.4 \pm 41.83 ^b | |
| P2 | 6 | 141.5 \pm 27.00 ^a | |
| P3 | 6 | 323.4 \pm 54.91 ^c | |
| P4 | 6 | 161 \pm 19.92 ^{ab} | |

Keterangan: Pada rata-rata \pm sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian genistein terhadap ekspresi BCL-2. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi BCL-2 akibat pemberian genistein dengan dosis yang berbeda.

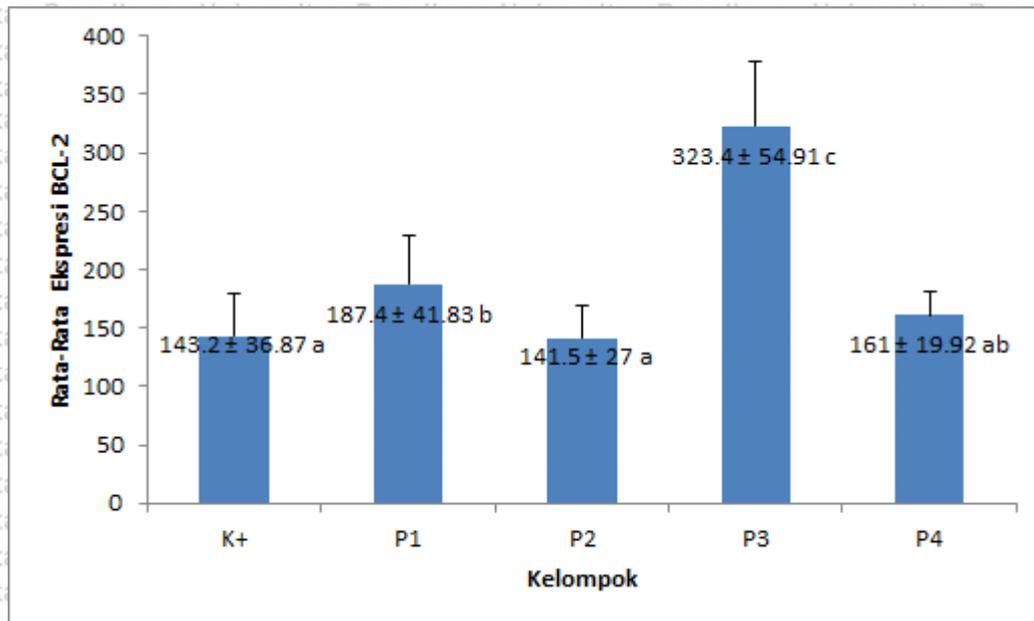
Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 % pada Tabel 5-22 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa peningkatan ekspresi BCL-2 secara signifikan ditunjukkan pada kelompok perlakuan P1 dan P3. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok perlakuan P1 dan P3 lebih tinggi dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif.

Tabel 5-23 Perbandingan Ekspresi BCL-2 Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji LSD 5%

| Perbandingan | | Beda Rata-Rata | p-value |
|--------------|----|----------------|---------|
| K+ | P1 | -0.272 | 0.002 |
| | P2 | 0.000 | 0.997 |
| | P3 | -0.827 | 0.000 |
| | P4 | -0.136 | 0.113 |
| P1 | P2 | 0.273 | 0.002 |
| | P3 | -0.554 | 0.000 |
| | P4 | 0.137 | 0.111 |
| | P3 | -0.827 | 0.000 |
| P2 | P4 | -0.136 | 0.112 |
| | P4 | 0.691 | 0.000 |

Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 % pada Tabel 5-23 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa pada kelompok P1 dan P3 didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) yang menunjukkan terjadinya peningkatan ekspresi BCL-2 secara signifikan. Sedangkan pada kelompok P2 dan P4 didapatkan p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Dari pengujian ini dibuktikan bahwa peningkatan ekspresi BCL-2 secara signifikan terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dosis 1,30 mg/hari (P1) dan 2,6 mg/hari (P3). Pada perbandingan antar kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa pada perbandingan antara P1 dengan P4 dan P2 dengan P4 didapatkan p-value lebih dari 0,05 ($p > 0.05$). Rata-rata ekspresi BCL-2 pada kelompok pemberian genistein 1,30 mg/hari (P1) dan 1,95 mg/hari (P2) tidak berbeda signifikan dengan kelompok pemberian genistein 3,25 mg/hari (P4).

Rata-rata ekspresi BCL-2 kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :

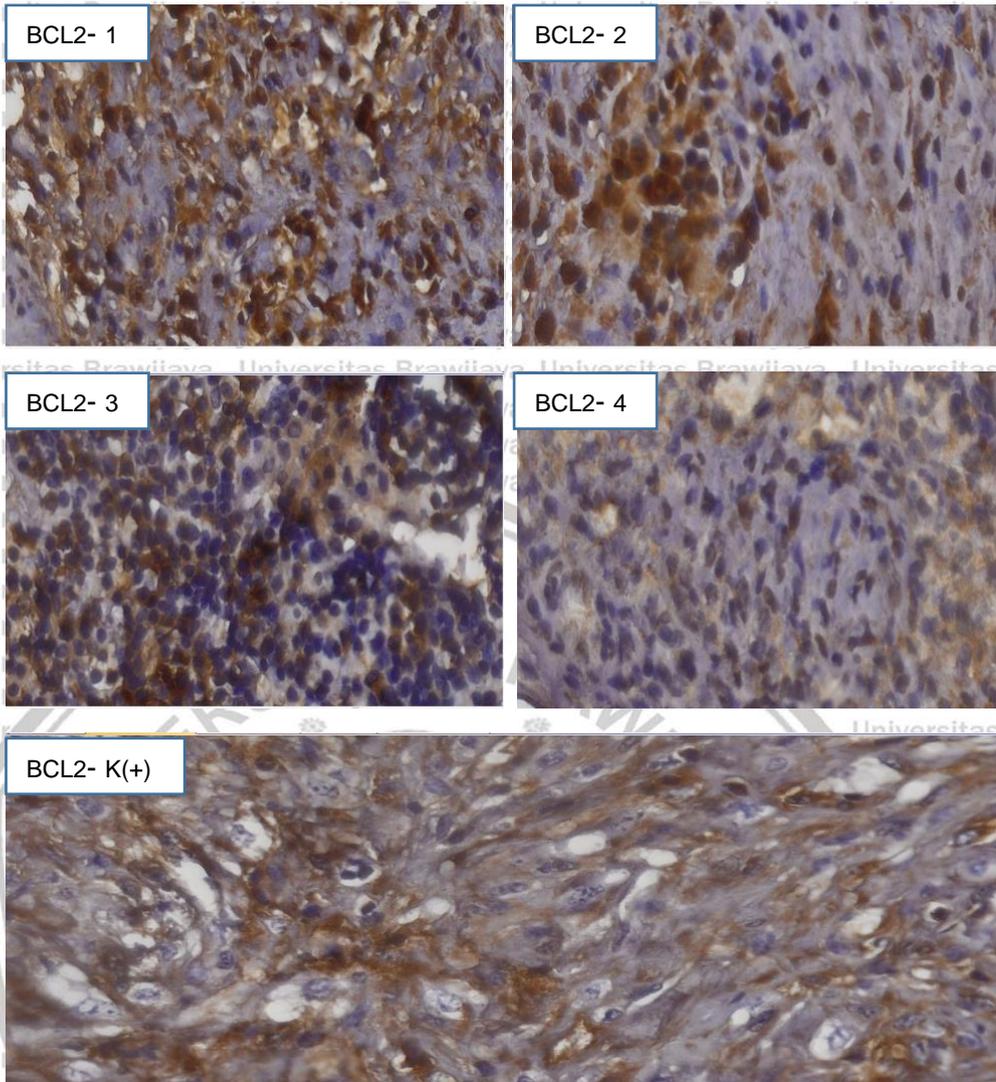


Gambar 5-14 Histogram Rata-Rata Ekspresi BCL-2

Pada Gambar 5-14 ditunjukkan histogram rata-rata ekspresi BCL-2 semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok K+, terlihat bahwa rata-rata ekspresi BCL-2 meningkat pada kelompok perlakuan pemberian genistein P1, P3, dan P4. Secara statistik, terbukti bahwa peningkatan signifikan ekspresi BCL-2 terjadi pada pemberian genistein dengan dosis 1,30 mg/hari (P1) dan 2,6 mg/hari (P3).

Gambaran Histopatologi Ekspresi BCL-2

Pada pemeriksaan histopatologi didapatkan semakin tinggi dosis genistein yang diberikan, terjadi peningkatan ekspresi BCL-2 pada mencit model endometriosis.



Gambar 5-15. Gambaran Histopatologi Ekspresi BCL-2

Keterangan : Pada gambaran histopatologi didapatkan peningkatan ekspresi BCL-2 pada perlakuan 1, 2 dan 3. (pewarnaan immunohistokimia, Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2300 megapixel)

5.2.4 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dengan Uji ANOVA

Sebagaimana telah dijelaskan dalam hasil pengujian asumsi normalitas dan asumsi homogenitas ragam, variabel ekspresi PCNA telah terpenuhi asumsi normalitas namun tidak terpenuhi asumsi homogenitas ragam. Selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh pemberian genistein terhadap ekspresi PCNA

secara parametrik dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Dunnet T3 5%. Berikut hasil pengujian pengaruh pemberian Genistein dengan beberapa level dosis terhadap ekspresi PCNA dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Dunnet T3 5%.

Tabel 5-24. Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dengan Uji ANOVA dan Uji Dunnet T3 5%

| Perlakuan | n | Mean ± SD | p-value |
|-----------|---|-----------------------------|---------|
| K+ | 6 | 119.8 ± 19.19 ^a | 0.000 |
| P1 | 6 | 151.3 ± 21.42 ^b | |
| P2 | 6 | 367 ± 173.17 ^c | |
| P3 | 6 | 490.1 ± 66.20 ^c | |
| P4 | 6 | 155.7 ± 31.38 ^{ab} | |

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

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian genistein terhadap ekspresi PCNA. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi PCNA akibat pemberian genistein dengan dosis yang berbeda.

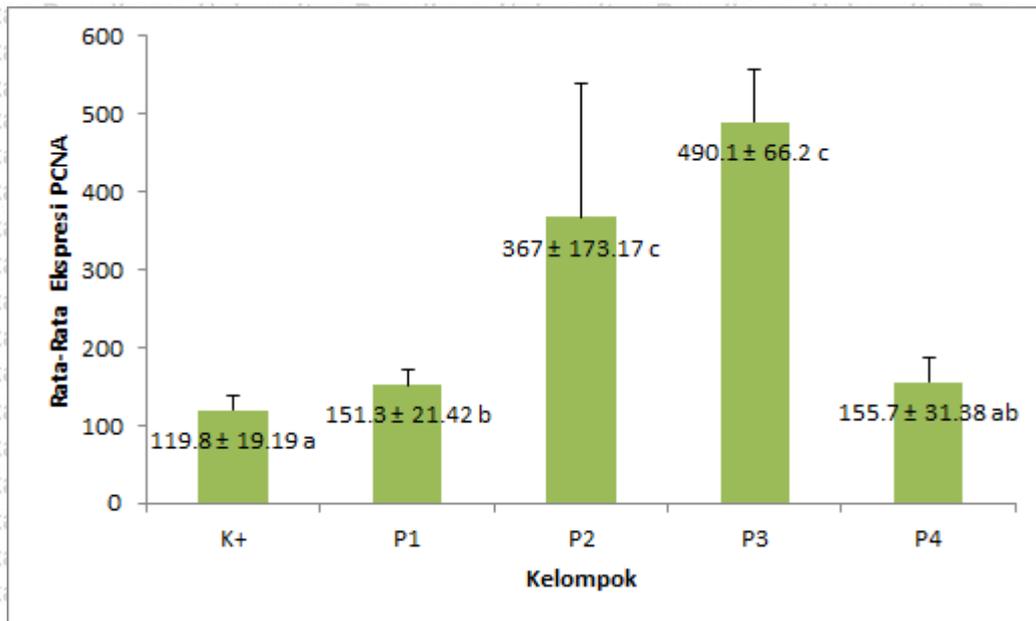
Berdasarkan pada hasil uji Dunnet T3 5 % pada Tabel 5-24 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa peningkatan ekspresi PCNA secara signifikan ditunjukkan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata ± sd kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 lebih tinggi dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif.

Tabel 5-25. Perbandingan Ekspresi PCNA Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji Dunnet T3 5%

| Perbandingan | | Beda Rata-Rata | p-value |
|--------------|----|----------------|---------|
| K+ | P1 | -0.236 | 0.027 |
| | P2 | -1.005 | 0.002 |
| | P3 | -1.412 | 0.000 |
| | P4 | -0.256 | 0.055 |
| P1 | P2 | -0.769 | 0.015 |
| | P3 | -1.176 | 0.000 |
| | P4 | -0.020 | 1.000 |
| | P3 | -0.407 | 0.329 |
| P2 | P4 | 0.750 | 0.018 |
| | P4 | 1.157 | 0.000 |

Berdasarkan pada hasil uji Dunnet T3 5 % pada Tabel 5-25 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa pada kelompok P1, P2 dan P3 didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) yang menunjukkan terjadinya peningkatan ekspresi PCNA secara signifikan. Sedangkan pada kelompok P4 didapatkan p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Dari pengujian ini dibuktikan bahwa peningkatan ekspresi PCNA secara signifikan terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dosis 1,30 mg/hari (P1), 1,95 mg/hari (P2), dan 2,6 mg/hari (P3). Pada perbandingan antar kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa pada perbandingan antara P1 dengan P4 dan P2 dengan P3 didapatkan p-value lebih dari 0,05 ($p > 0.05$). Rata-rata ekspresi PCNA pada kelompok pemberian genistein 1,30 mg/hari (P1) dan 3,25 mg/hari (P4) tidak berbeda signifikan, demikian juga dengan kelompok pemberian genistein 1,95 mg/hari (P2) dan 2,6 mg/hari (P3) tidak berbeda signifikan.

Rata-rata ekspresi PCNA kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :

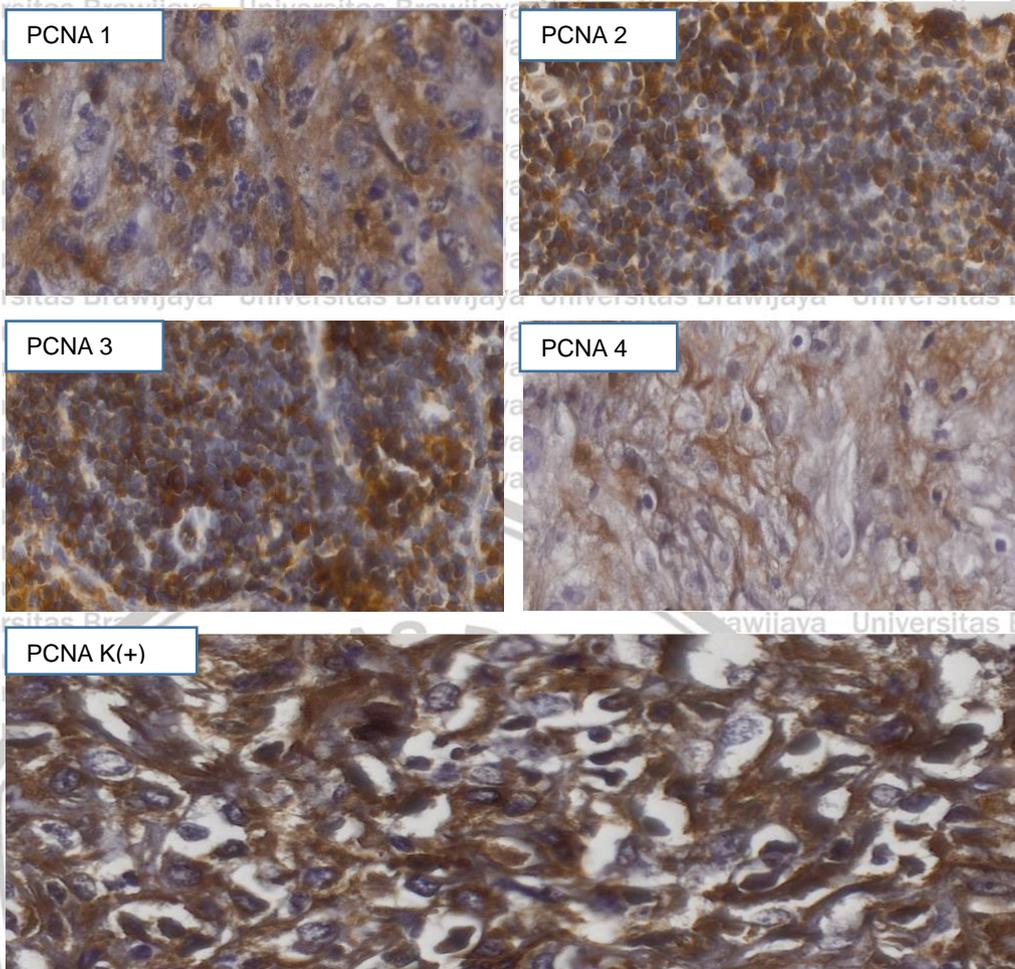


Gambar 5-16. Histogram Rata-Rata Ekspresi PCNA

Pada Gambar 5-16 ditunjukkan histogram rata-rata ekspresi PCNA semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok K+, terlihat bahwa rata-rata ekspresi PCNA meningkat pada semua kelompok perlakuan pemberian genistein. Secara statistik, terbukti bahwa peningkatan signifikan ekspresi PCNA terjadi pada pemberian genistein dengan dosis 1,30 mg/hari (P1), 1,95 mg/hari (P2), dan 2,6 mg/hari (P3).

Gambaran Histopatologi Ekspresi PCNA

Pada pewarnaan lesi endometrium yang didapatkan dari masing masing kelompok, didapatkan gambaran ekspresi PCNA yang paling kuat terjadi pada kelompok 3 diikuti dengan kelompok perlakuan 2 dan 1. Hasil pewarnaan lesi endometriosis yang terbentuk dari masing-masing kelompok yang representatif dapat dilihat pada gambar di bawah ini. Tampak bahwa ekspresi PCNA yang dihasilkan dari masing masing perlakuan berbeda antar kelompok.



Gambar 5-17. Gambaran Histopatologi Ekspresi PCNA

Keterangan : Pada gambar diatas tampak bahwa ekspresi PCNA paling kuat terjadi pada kelompok perlakuan 3, diikuti kelompok perlakuan 2 dan 1. (*pewarnaan immunohistokimia, Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2300 megapixel*)

5.2.5 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi NFkB dengan Uji ANOVA

Sebagaimana telah dijelaskan dalam hasil pengujian asumsi normalitas dan asumsi homogenitas ragam, variabel ekspresi NFkB telah terpenuhi asumsi normalitas namun tidak terpenuhi asumsi homogenitas ragam. Selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh pemberian genistein terhadap ekspresi NFkB secara parametrik dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Dunnet T3 5%. Berikut hasil pengujian pengaruh pemberian Genistein dengan

beberapa level dosis terhadap ekspresi NFkB dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Dunnet T3 5%.

Tabel 5-26. Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi NFkB dengan Uji ANOVA dan Uji Dunnet T3 5%

| Perlakuan | n | Mean ± SD | p-value |
|-----------|---|-----------------------------|---------|
| K+ | 6 | 102.5 ± 21.36 ^a | 0.000 |
| P1 | 6 | 102.2 ± 57.28 ^{ab} | |
| P2 | 6 | 148.6 ± 26.96 ^b | |
| P3 | 6 | 511.9 ± 95.53 ^c | |
| P4 | 6 | 75.5 ± 47.04 ^a | |

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

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian genistein terhadap ekspresi NFkB. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi NFkB akibat pemberian genistein dengan dosis yang berbeda.

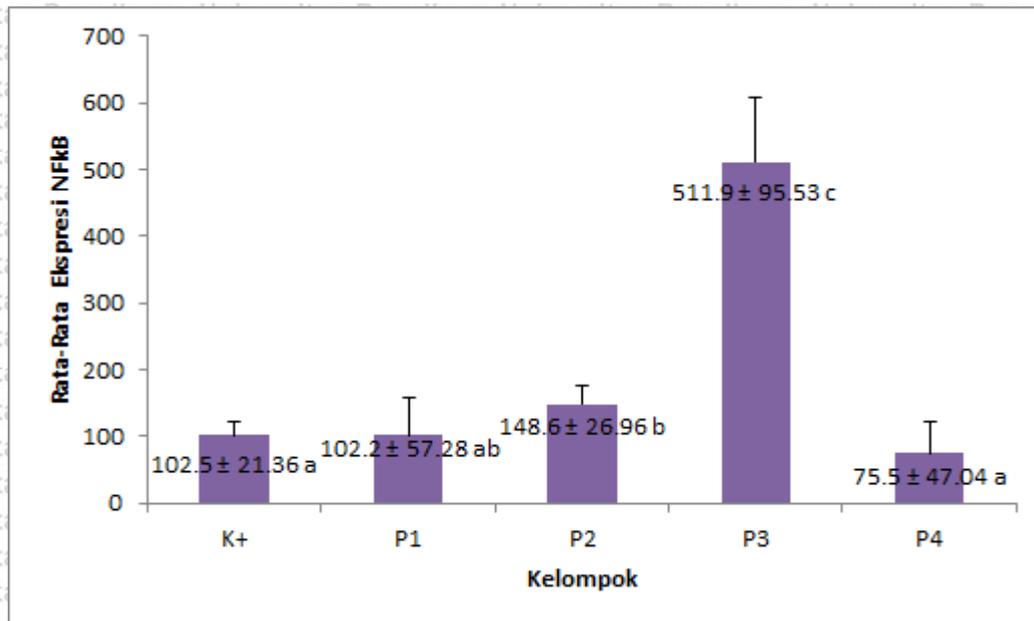
Berdasarkan pada hasil uji Dunnet T3 5 % pada Tabel 5-26 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa peningkatan ekspresi NFkB secara signifikan ditunjukkan pada kelompok perlakuan P2 dan P3. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata ± sd kelompok perlakuan P2 dan P3 lebih tinggi dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif.

Tabel 5-27. Perbandingan Ekspresi NFkB Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji Dunnet T3 5%

| Perbandingan | | Beda Rata-Rata | p-value |
|--------------|----|----------------|---------|
| K+ | P1 | 0.30 | 1.000 |
| | P2 | -46.10 | 0.005 |
| | P3 | -409.40 | 0.000 |
| | P4 | 27.00 | 0.653 |
| P1 | P2 | -46.40 | 0.274 |
| | P3 | -409.70 | 0.000 |
| | P4 | 26.70 | 0.932 |
| P2 | P3 | -363.30 | 0.000 |
| | P4 | 73.10 | 0.007 |
| P3 | P4 | 436.40 | 0.000 |

Berdasarkan pada hasil uji Dunnet T3 5 % pada Tabel 5-27 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa pada kelompok P2 dan P3 didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) yang menunjukkan terjadinya peningkatan ekspresi NFkB secara signifikan. Sedangkan pada kelompok P1 dan P4 didapatkan p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Dari pengujian ini dibuktikan bahwa peningkatan ekspresi NFkB secara signifikan terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dosis 1,95 mg/hari (P2) dan 2,6 mg/hari (P3). Pada perbandingan antar kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa pada perbandingan antara P1 dengan P2 dan P1 dengan P4 didapatkan p-value lebih dari 0,05 ($p > 0.05$). Rata-rata ekspresi NFkB pada kelompok pemberian genistein 1,30 mg/hari (P1), 1,95 mg/hari (P2) dan 3,25 mg/hari (P4) tidak berbeda signifikan.

Rata-rata ekspresi NFkB kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :

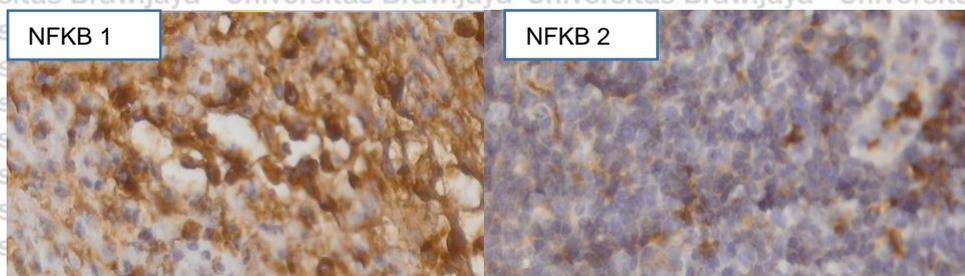


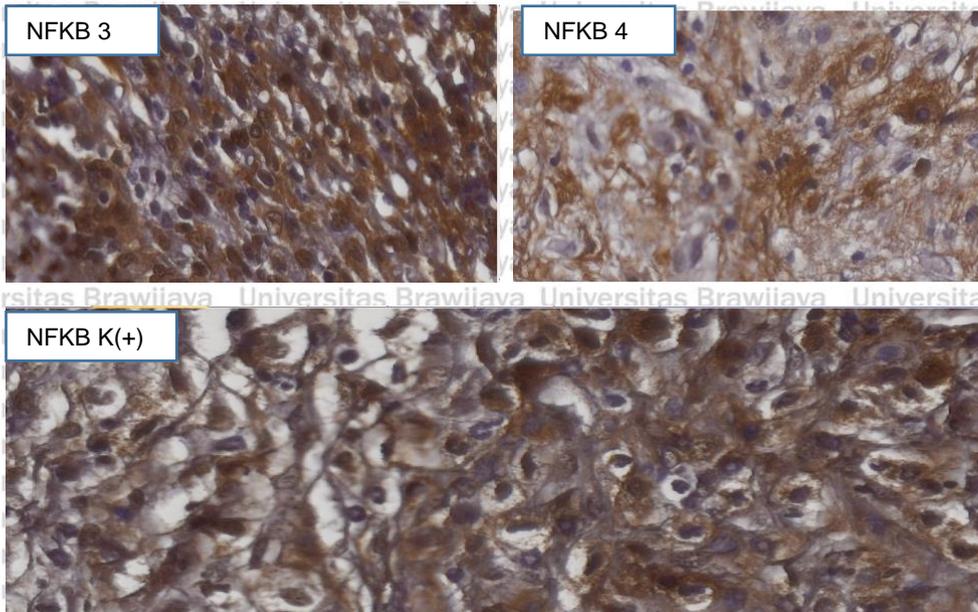
Gambar 5-18. Histogram Rata-Rata Ekspresi NFkB

Pada Gambar 5-18 ditunjukkan histogram rata-rata ekspresi NFkB semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok K+, terlihat bahwa rata-rata ekspresi NFkB meningkat pada kelompok perlakuan pemberian genistein P1, P2 dan P3. Secara statistik, terbukti bahwa peningkatan signifikan ekspresi NFkB terjadi pada pemberian genistein dengan dosis 1,95 mg/hari (P2) dan 2,6 mg/hari (P3).

Gambaran Histopatologi Ekspresi NFkB

Pemeriksaan immunohistokimia yang dilakukan pada bercak endometrisosis yang didapatkan pada masing-masing mencit, menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan 3 memiliki ekspresi NFkB paling kuat dibandingkan kelompok lainnya.





Gambar 5-19. Gambaran Histopatologi Ekspresi NFkB

Keterangan : Ekspresi NFkB paling kuat ditemukan pada kelompok perlakuan 3 diikuti kelompok perlakuan 2 dan 1. (pewarnaan *immunohistokimia*, Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2300 megapixel)

5.2.6 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi RE- α dengan Uji ANOVA

Sebagaimana telah dijelaskan dalam hasil pengujian asumsi normalitas dan asumsi homogenitas ragam, variabel ekspresi RE- α telah terpenuhi asumsi normalitas dan homogenitas ragam. Selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh pemberian genistein terhadap ekspresi RE- α secara parametrik dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji LSD 5%. Berikut hasil pengujian pengaruh pemberian Genistein dengan beberapa level dosis terhadap ekspresi RE- α dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji LSD 5%.

Tabel 5-28 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi RE- α dengan Uji ANOVA dan Uji LSD 5%

| Perlakuan | n | Mean \pm SD | p-value |
|-----------|---|------------------------------|---------|
| K+ | 6 | 4.7 \pm 0.21 ^b | 0.000 |
| P1 | 6 | 4.78 \pm 0.26 ^b | |
| P2 | 6 | 5.17 \pm 0.32 ^c | |
| P3 | 6 | 5.95 \pm 0.09 ^d | |
| P4 | 6 | 4.44 \pm 0.23 ^a | |

Keterangan: Pada rata-rata \pm sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian genistein terhadap ekspresi RE- α . Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi RE- α akibat pemberian genistein dengan dosis yang berbeda.

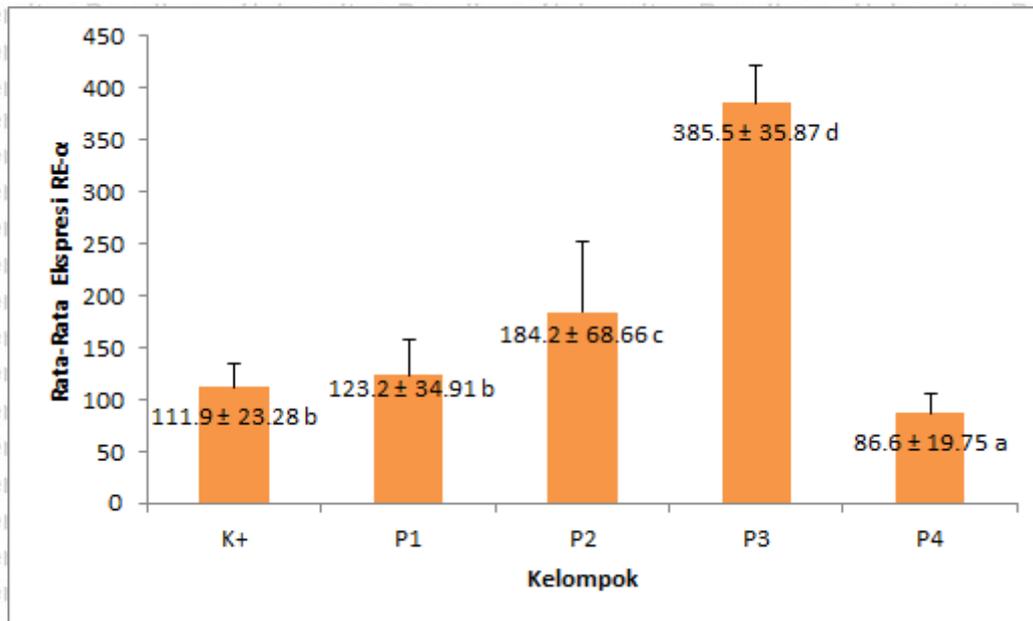
Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 % pada Tabel 5-28 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa peningkatan ekspresi RE- α secara signifikan ditunjukkan pada kelompok perlakuan P2 dan P3. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok perlakuan P2 dan P3 lebih tinggi dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif.

Tabel 5-29. Perbandingan Ekspresi RE- α Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji LSD 5%

| | | Beda Rata-Rata | p-value |
|--------------|----|----------------|---------|
| Perbandingan | | | |
| K+ | P1 | -0.084 | 0.425 |
| | P2 | -0.468 | 0.000 |
| | P3 | -1.252 | 0.000 |
| | P4 | 0.261 | 0.016 |
| P1 | P2 | -0.383 | 0.001 |
| | P3 | -1.168 | 0.000 |
| | P4 | 0.345 | 0.002 |
| P2 | P3 | -0.785 | 0.000 |
| | P4 | 0.729 | 0.000 |
| P3 | P4 | 1.513 | 0.000 |

Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 % pada Tabel 5-29 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa pada kelompok P2 dan P3 didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) yang menunjukkan terjadinya peningkatan ekspresi RE- α secara signifikan. Sedangkan pada P4, p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan adanya penurunan ekspresi RE- α secara signifikan. Pada kelompok P1 didapatkan p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Dari pengujian ini dibuktikan bahwa peningkatan ekspresi RE- α secara signifikan terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dosis 1,95 mg/hari (P2) dan 2,6 mg/hari (P3). Pada perbandingan antar kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa pada semua kelompok perlakuan memiliki p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) yang menunjukkan adanya perbedaan ekspresi RE- α antar kelompok perlakuan pemberian genistein.

Rata-rata ekspresi RE- α kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :

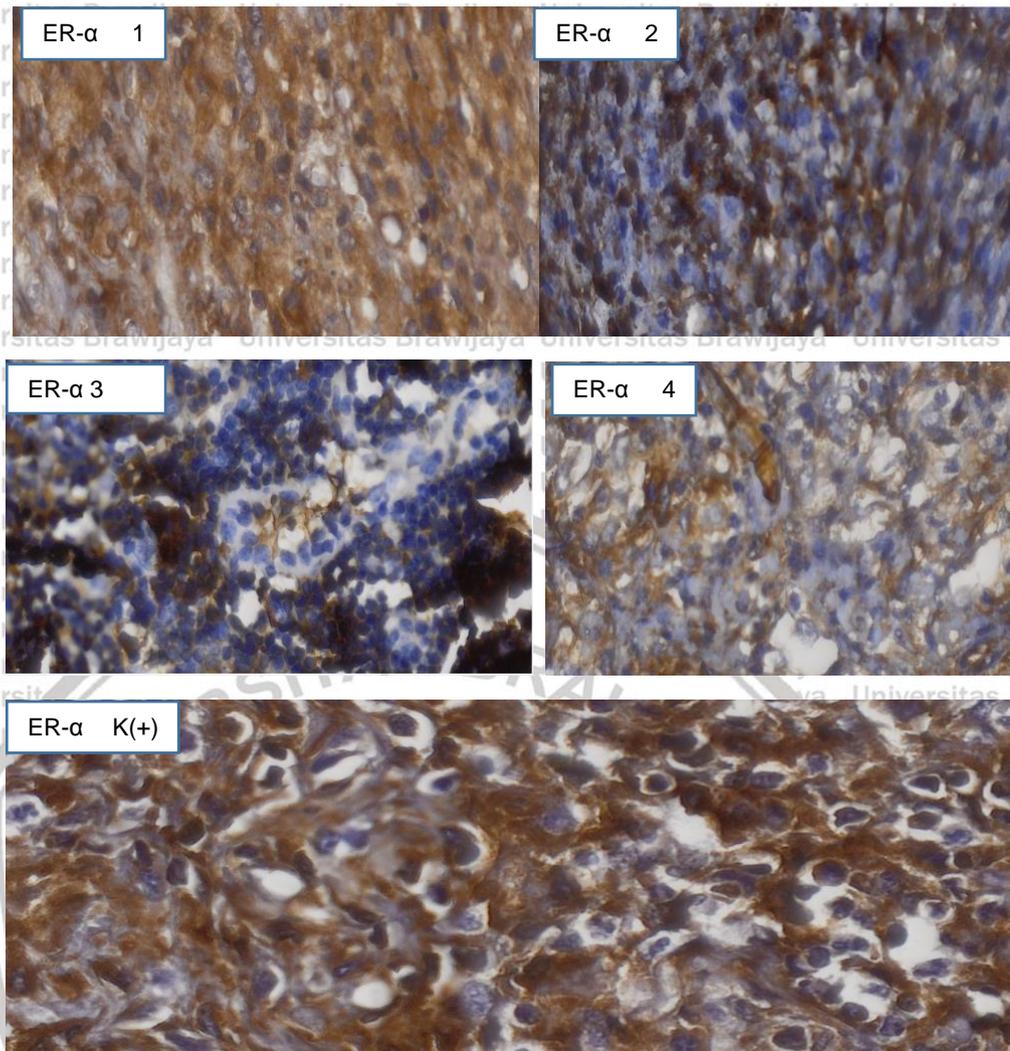


Gambar 5-20. Histogram Rata-Rata Ekspresi RE-α

Pada Gambar 5-20 ditunjukkan histogram rata-rata ekspresi RE-α semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok K+, terlihat bahwa rata-rata ekspresi RE-α meningkat pada kelompok perlakuan pemberian genistein P1, P2 dan P3. Pada kelompok P4 ditunjukkan adanya penurunan ekspresi RE-α. Secara statistik, terbukti bahwa peningkatan signifikan ekspresi RE-α terjadi pada pemberian genistein dengan dosis 1,95 mg/hari (P2) dan 2,6 mg/hari (P3).

Gambaran Histopatologi Ekspresi RE- α

Pemeriksaan immunohistokimia dengan pewarnaan HE, didapatkan gambaran ekspresi RE- α pada semua kelompok perlakuan bervariasi. Penelitian ini menghasilkan lesi endometriotik dengan gambaran ekspresi ER- α pada kelompok perlakuan 3 memiliki ekspresi yang lebih kuat dibandingkan kelompok lainnya.



Gambar 5-21. Gambaran Histopatologi Ekspresi ER- α

Keterangan : Ekspresi ER- α paling kuat ditemukan pada kelompok perlakuan 3 diikuti kelompok perlakuan 2 dan 1. (pewarnaan immunohistokimia, Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS F12300 megapixel)

5.2.7 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi RE- β dengan Uji ANOVA

Sebagaimana telah dijelaskan dalam hasil pengujian asumsi normalitas dan asumsi homogenitas ragam, variabel ekspresi RE- β telah terpenuhi asumsi normalitas namun tidak terpenuhi asumsi homogenitas ragam. Selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh pemberian genistein terhadap ekspresi RE- β secara parametrik dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji

Dunnet T3 5%. Berikut hasil pengujian pengaruh pemberian Genistein dengan beberapa level dosis terhadap ekspresi RE- β dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Dunnet T3 5%.

Tabel 5-30. Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi RE- β dengan Uji ANOVA dan Uji Dunnet T3 5%

| Perlakuan | n | Mean \pm SD | p-value |
|-----------|---|------------------------------|---------|
| K+ | 6 | 4.71 \pm 0.13 ^a | 0.000 |
| P1 | 6 | 5.23 \pm 0.13 ^b | |
| P2 | 6 | 5.23 \pm 0.12 ^b | |
| P3 | 6 | 5.87 \pm 0.06 ^c | |
| P4 | 6 | 5.15 \pm 0.25 ^b | |

Keterangan: Pada rata-rata \pm sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian genistein terhadap ekspresi RE- β . Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi RE- β akibat pemberian genistein dengan dosis yang berbeda.

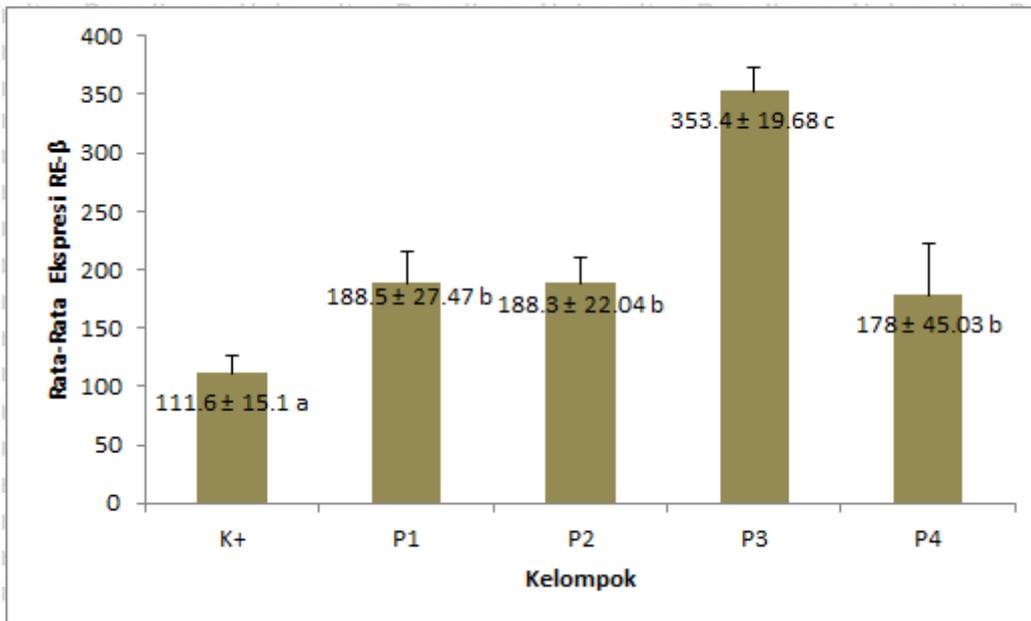
Berdasarkan pada hasil uji Dunnet T3 5 % pada Tabel 5-30 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa peningkatan ekspresi RE- β secara signifikan ditunjukkan pada kelompok semua kelompok perlakuan P1, P2, P3, dan P4. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd semua kelompok perlakuan lebih tinggi dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif.

Tabel 5-31. Perbandingan Ekspresi RE-β Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji Dunnet T3 5%

| Perbandingan | | Beda Rata-Rata | p-value |
|--------------|----|----------------|---------|
| K+ | P1 | -0.523 | 0.000 |
| | P2 | -0.525 | 0.000 |
| | P3 | -1.159 | 0.000 |
| | P4 | -0.447 | 0.002 |
| P1 | P2 | -0.001 | 1.000 |
| | P3 | -0.636 | 0.000 |
| | P4 | 0.077 | 0.987 |
| P2 | P3 | -0.634 | 0.000 |
| | P4 | 0.078 | 0.982 |
| P3 | P4 | 0.712 | 0.000 |

Berdasarkan pada hasil uji Dunnet T3 5 % pada Tabel 5-31 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa pada semua kelompok perlakuan didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) yang menunjukkan terjadinya peningkatan ekspresi RE-β secara signifikan. Dari pengujian ini dibuktikan bahwa peningkatan ekspresi RE-β secara signifikan terjadi pada semua kelompok pemberian genistein dengan berbagai dosis. Pada perbandingan antar kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa pada perbandingan antara P1 dengan P2, P1 dengan P4, dan P2 dengan P4 didapatkan p-value lebih dari 0,05 ($p > 0.05$). Rata-rata ekspresi RE-β pada kelompok pemberian genistein 1,30 mg/hari (P1), 1,95 mg/hari (P2) dan 3,25 mg/hari (P4) tidak berbeda signifikan.

Rata-rata ekspresi RE-β kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :

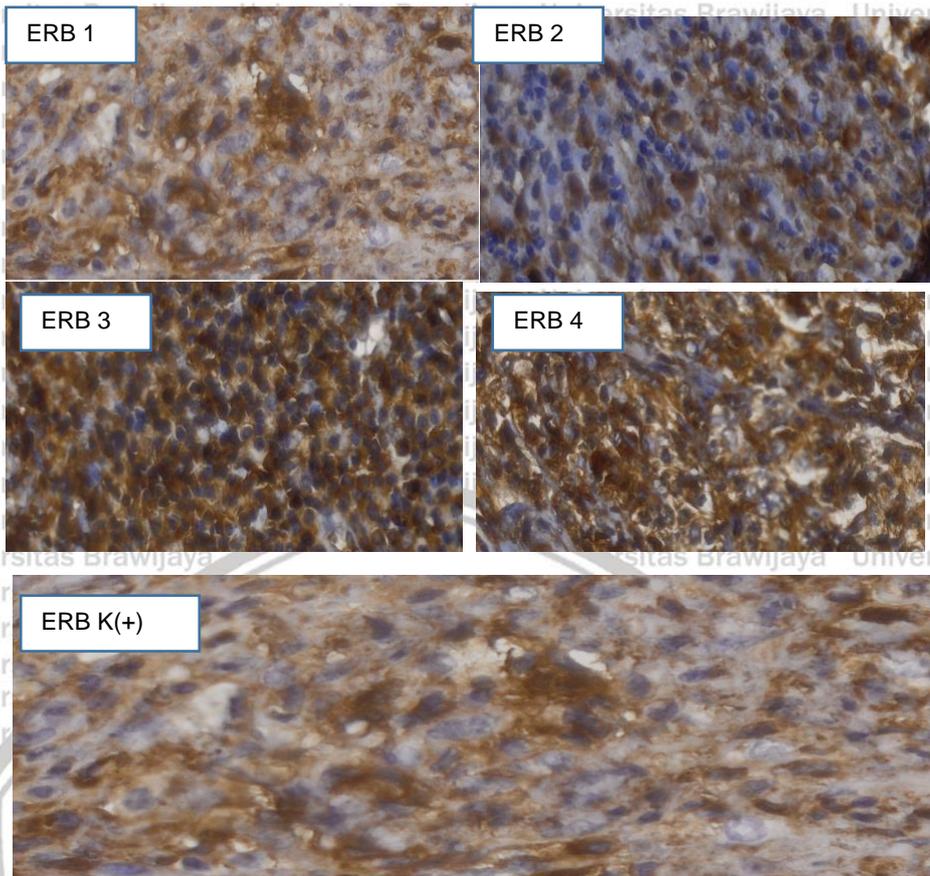


Gambar 5-22. Histogram Rata-Rata Ekspresi RE-β

Pada Gambar 5-22 ditunjukkan histogram rata-rata ekspresi RE-β semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok K+, terlihat bahwa rata-rata ekspresi RE-β meningkat pada semua kelompok perlakuan pemberian genistein. Secara statistik, terbukti bahwa peningkatan signifikan ekspresi RE-β terjadi pada semua kelompok pemberian genistein dengan berbagai dosis dengan rata-rata ekspresi RE-β didapatkan pada kelompok pemberian genistein dengan dosis 2,6 mg/hari (P3).

Gambaran Histopatologi Ekspresi RE- β

Pada pewarnaan lesi endometrium yang didapatkan dari masing masing kelompok, didapatkan gambaran ekspresi RE- β yang paling kuat terjadi pada kelompok perlakuan 3 diikuti dengan kelompok perlakuan 2 dan 1. Hasil pewarnaan lesi endometriosis yang terbentuk dari masing-masing kelompok yang representatif dapat dilihat pada gambar di bawah ini. Tampak bahwa ekspresi RE- β yang dihasilkan dari masing masing perlakuan berbeda antar kelompok.



Gambar 5-23. Gambaran Histopatologi Ekspresi ER-β

Keterangan : Ekspresi ER-β paling kuat ditemukan pada kelompok perlakuan 3 diikuti kelompok perlakuan 2 dan 1. (pewarnaan *immunohistokimia*, Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS F12300 megapixel)

5.2.8 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Rasio BAX/BCL-2 dengan Uji ANOVA

Sebagaimana telah dijelaskan dalam hasil pengujian asumsi normalitas dan asumsi homogenitas ragam, variabel rasio BAX/BCL-2 telah terpenuhi asumsi normalitas dan homogenitas ragam. Selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh pemberian genistein terhadap rasio BAX/BCL-2 secara parametrik dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji LSD 5%.

Berikut hasil pengujian pengaruh pemberian Genistein dengan beberapa level dosis terhadap rasio BAX/BCL-2 dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji LSD 5%.

Tabel 5-32. Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Rasio BAX/BCL-2 dengan Uji ANOVA dan Uji LSD 5%

| Perlakuan | Mean ± SD | p-value |
|-----------|--------------------------|---------|
| K+ | 2.17 ± 0.34 ^a | 0.000 |
| P1 | 2.2 ± 0.42 ^{ab} | |
| P2 | 3.39 ± 0.35 ^d | |
| P3 | 2.86 ± 0.28 ^c | |
| P4 | 2.46 ± 0.1 ^b | |

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

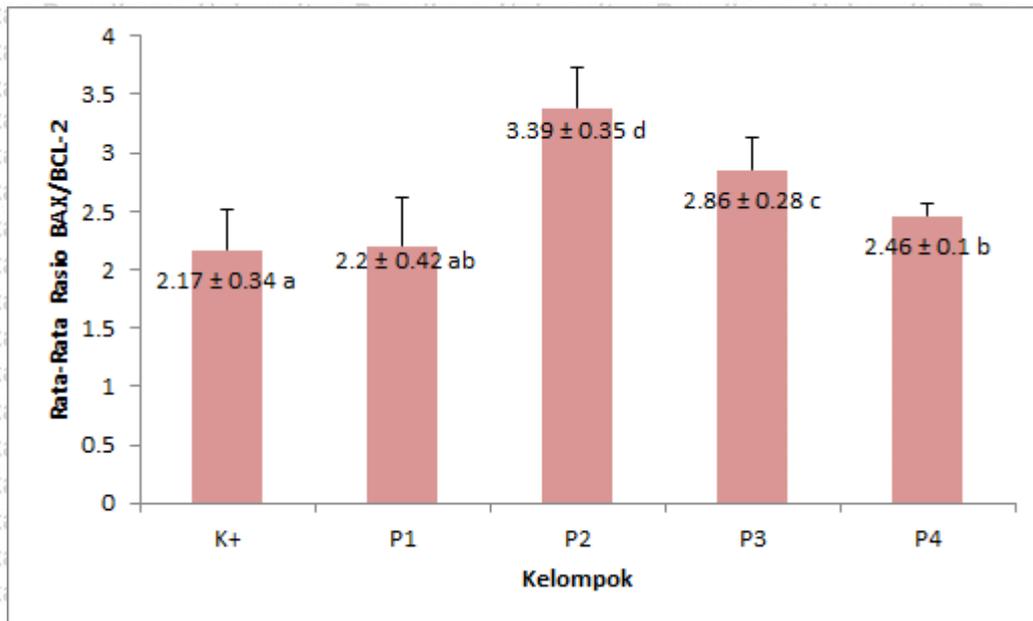
Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian genistein terhadap rasio BAX/BCL-2. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan rasio BAX/BCL-2 akibat pemberian genistein dengan dosis yang berbeda.

Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 % pada Tabel 5-32 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa peningkatan rasio BAX/BCL-2 secara signifikan ditunjukkan pada kelompok perlakuan P2, P3, dan P4. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata ± sd kelompok perlakuan P2, P3, dan P4 lebih tinggi dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif.

Tabel 5-33 Perbandingan Rasio BAX/BCL-2 Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji LSD 5%

| Perbandingan | | Beda Rata-Rata | p-value |
|--------------|----|----------------|---------|
| K+ | P1 | -0.039 | 0.787 |
| | P2 | -1.222 | 0.000 |
| | P3 | -0.691 | 0.000 |
| | P4 | -0.292 | 0.046 |
| P1 | P2 | -1.183 | 0.000 |
| | P3 | -0.653 | 0.000 |
| | P4 | -0.253 | 0.082 |
| P2 | P3 | 0.530 | 0.001 |
| | P4 | 0.930 | 0.000 |
| P3 | P4 | 0.399 | 0.007 |

Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 % pada Tabel 5-33 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan P2, P3, dan P4 didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) yang menunjukkan terjadinya peningkatan rasio BAX/BCL-2 secara signifikan. Sedangkan pada P1 didapatkan p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Dari pengujian ini dibuktikan bahwa peningkatan rasio BAX/BCL-2 secara signifikan terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dosis 1,95 mg/hari (P2), 2,6 mg/hari (P3) dan 3,25 mg/hari (P4). Pada perbandingan antar kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa pada perbandingan antara P1 dengan dengan P4, didapatkan p-value lebih dari 0,05 ($p > 0.05$). Rata-rata rasio BAX/BCL-2 pada kelompok pemberian genistein 1,30 mg/hari (P1) dan 3,25 mg/hari (P4) tidak berbeda signifikan. Rata-rata rasio BAX/BCL-2 kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :



Gambar 5-24. Histogram Rata-Rata Rasio BAX/BCL-2

Pada Gambar 5-24 ditunjukkan histogram rata-rata rasio BAX/BCL-2 semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok K+, terlihat bahwa rata-rata rasio BAX/BCL-2 meningkat pada semua kelompok perlakuan pemberian genistein. Secara statistik, terbukti bahwa peningkatan signifikan rasio BAX/BCL-2 terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dengan dosis 1,95 mg/hari (P2), 2,6 mg/hari (P3) dan 3,25 mg/hari (P4).

5.2.9 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Rasio RE- α /RE- β dengan Uji ANOVA

Sebagaimana telah dijelaskan dalam hasil pengujian asumsi normalitas dan asumsi homogenitas ragam, variabel rasio RE- α /RE- β telah terpenuhi asumsi normalitas namun tidak terpenuhi asumsi homogenitas ragam. Selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh pemberian genistein terhadap rasio RE- α /RE- β secara parametrik dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Dunnet T3 5%. Berikut hasil pengujian pengaruh pemberian Genistein dengan

beberapa level dosis terhadap rasio RE- α /RE- β dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Dunnet T3 5%.

Tabel 5-34. Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Rasio RE- α /RE- β dengan Uji ANOVA dan Uji Dunnet T3 5%

| Perlakuan | Mean \pm SD | p-value |
|-----------|-------------------------------|---------|
| K+ | 2.29 \pm 0.22 ^b | 0.000 |
| P1 | 1.85 \pm 0.33 ^a | |
| P2 | 2.24 \pm 0.36 ^{ab} | |
| P3 | 2.39 \pm 0.10 ^b | |
| P4 | 1.59 \pm 0.37 ^a | |

Keterangan: Pada rata-rata \pm sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian genistein terhadap rasio RE- α /RE- β . Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan rasio RE- α /RE- β akibat pemberian genistein dengan dosis yang berbeda.

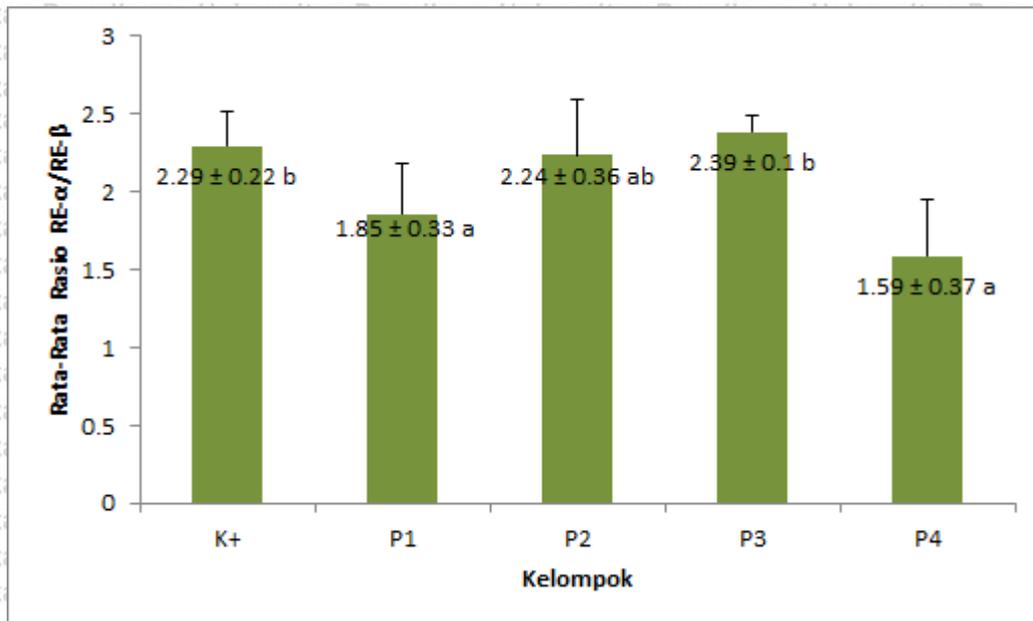
Berdasarkan pada hasil uji Dunnet T3 5 % pada Tabel 5-34 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa penurunan rasio RE- α /RE- β secara signifikan ditunjukkan pada kelompok kelompok perlakuan P1 dan P4. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok perlakuan P1 dan P4 lebih rendah dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif. Sedangkan pada kelompok P2 dan P3 memiliki rata-rata rasio RE- α /RE- β yang relatif sama dengan kelompok kontrol positif (K+).

Tabel 5-35. Perbandingan Rasio RE- α /RE- β Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji LSD 5%

| Perbandingan | | Beda Rata-Rata | p-value |
|--------------|----|----------------|---------|
| K+ | P1 | 0.342 | 0.036 |
| | P2 | 0.013 | 1.000 |
| | P3 | -0.080 | 0.970 |
| | P4 | 0.496 | 0.001 |
| P1 | P2 | -0.329 | 0.365 |
| | P3 | -0.422 | 0.001 |
| | P4 | 0.154 | 0.630 |
| P2 | P3 | -0.093 | 0.998 |
| | P4 | 0.483 | 0.059 |
| P3 | P4 | 0.576 | 0.000 |

Berdasarkan pada hasil uji Dunnet T3 5 % pada Tabel 5-35 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan P1 dan P4 didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) yang menunjukkan terjadinya penurunan rasio RE- α /RE- β secara signifikan. Sedangkan pada P2 dan P3 didapatkan p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Dari pengujian ini dibuktikan bahwa penurunan rasio RE- α /RE- β secara signifikan terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dosis 1,3 mg/hari (P1) dan 3,25 mg/hari (P4). Pada perbandingan antar kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa pada perbandingan antara P1 dengan P2 dan P4 serta P2 dengan P3 dan P4 didapatkan p-value lebih dari 0,05 ($p > 0.05$) yang menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan rasio RE- α /RE- β secara statistik.

Rata-rata rasio RE- α /RE- β kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :

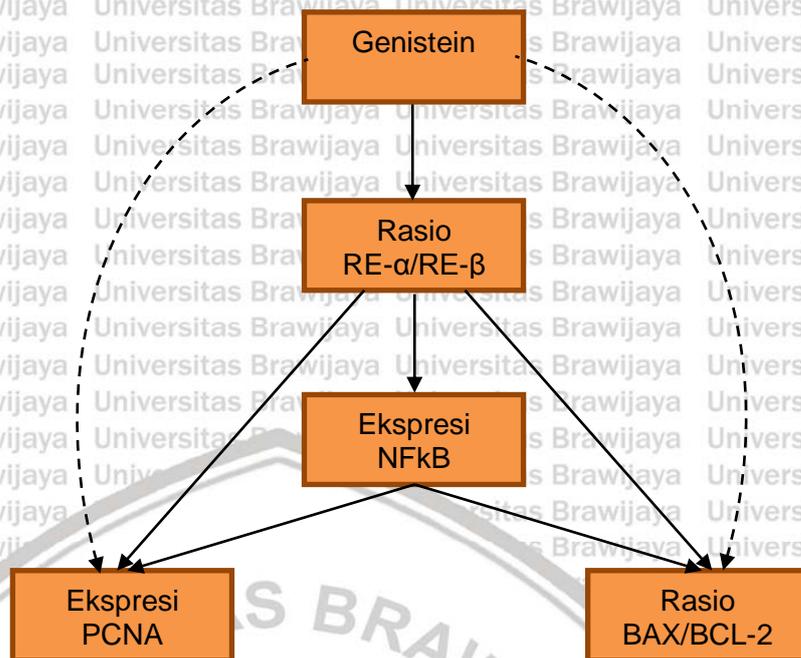


Gambar 5-25. Histogram Rata-Rata Rasio RE-α/RE-β

Pada Gambar 5-25 ditunjukkan histogram rata-rata rasio RE-α/RE-β semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok K+, terlihat bahwa rata-rata rasio RE-α/RE-β menurun pada kelompok perlakuan pemberian genistein P1, P2, dan P4. Pada kelompok P3 justru terjadi peningkatan rasio RE-α/RE-β. Secara statistik, ditunjukkan bahwa penurunan signifikan rasio RE-α/RE-β terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dengan dosis 1,3 mg/hari (P1) dan 3,25 mg/hari (P4).

5.2.10 Hasil Analisis Jalur

Untuk mengetahui hubungan antar variabel penelitian, dilakukan proses analisis dengan menggunakan analisis jalur. Proses analisis jalur dilakukan dengan pendekatan Partial Least Square (PLS). Pada pemodelan persamaan struktural pendekatan PLS pada penelitian ini, beberapa pengujian yang dilakukan yaitu: (1) pengujian goodness of fit model struktural, (2) pendugaan model struktural (inner model). Berikut adalah model struktural yang akan diuji :



Keterangan :
 → Pengaruh Langsung
 - - - → Pengaruh Tak Langsung

Gambar 5-26. Model Struktural Konseptual

Berdasarkan gambar model struktural konsep di atas, dapat dijelaskan bahwa variabel eksogen adalah genistein yang diberikan dalam berbagai dosis. Variabel intervening adalah Rasio RE-α/RE-β dan Ekspresi NFκB. Sedangkan variabel endogen dalam penelitian ini adalah Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2. Secara konseptual, proses pengujian ini dilakukan untuk menguji pengaruh pemberian genistein terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan melalui Rasio RE-α/RE-β dan Ekspresi NFκB.

5.2.11 Pengujian Goodness of Fit Model Struktural

Pengujian *Goodness of Fit* model struktural pada *inner model* menggunakan nilai *predictive-relevance* (Q²). Berikut hasil penghitungan *predictive-relevance* (Q²) model struktural adalah sebagai berikut :

Tabel 5-36. Goodness of Fit Model Struktural

| Variabel | R-Square | Q-Square |
|-----------|----------|----------|
| RE-α/RE-β | 0.064 | |
| NFκB | 0.181 | 0.638 |
| PCNA | 0.499 | |
| BAX/BCL-2 | 0.057 | |

$$Q^2 = 1 - (1 - R_1^2)(1 - R_2^2) \dots (1 - R_p^2)$$

$$Q^2 = 1 - (1 - 0.064)(1 - 0.181)(1 - 0.499)(1 - 0.057)$$

$$= 1 - 0.362$$

$$= 0.638$$

Hasil perhitungan memperlihatkan nilai *predictive-relevance* (Q^2) sebesar 0.638 atau 63.8%. Nilai *predictive relevance* sebesar 63.8% mengindikasikan bahwa keragaman data yang dapat dijelaskan oleh model tersebut adalah sebesar 63.8% atau dengan kata lain informasi yang terkandung dalam data 63.8% dapat dijelaskan oleh model tersebut. Sedangkan sisanya 36.2% dijelaskan oleh variabel lain (yang belum terkandung dalam model) dan error.

5.2.12 Hasil Pengujian Model Struktural (Inner Model)

Pengujian *inner model* (*structural model*) pada intinya menguji hipotesis dalam penelitian. Pengujian hipotesis dilakukan dengan uji t (T-statistic) pada masing-masing jalur pengaruh langsung secara parsial. Tabel berikut menyajikan hasil pengujian hipotesis pengaruh langsung.

Tabel 5-37. Hasil Pengujian Pengaruh Langsung Inner Model

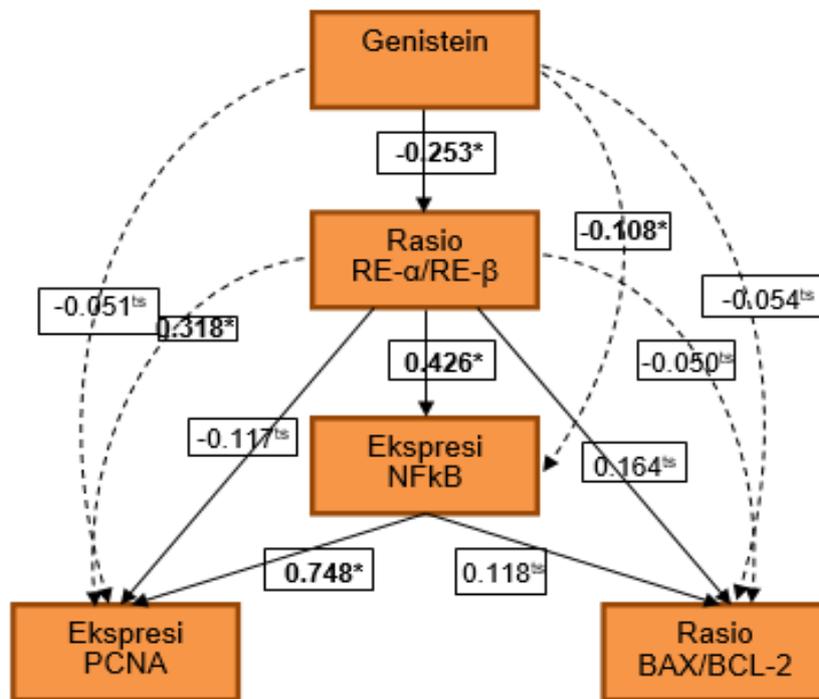
| Jalur Pengaruh Langsung | Koefisien Jalur | p-value | Keterangan |
|-------------------------|-----------------|---------|------------------|
| Genistein -> RE-α/RE-β | -0.253 | 0.032 | Signifikan |
| RE-α/RE-β -> NFκB | 0.426 | 0.000 | Signifikan |
| RE-α/RE-β -> PCNA | -0.117 | 0.096 | Tidak Signifikan |
| RE-α/RE-β -> BAX/BCL-2 | 0.164 | 0.212 | Tidak Signifikan |
| NFκB -> PCNA | 0.748 | 0.000 | Signifikan |
| NFκB -> BAX/BCL-2 | 0.118 | 0.404 | Tidak Signifikan |

Selain pengaruh langsung, proses pengujian juga dilakukan pada pengaruh tak langsung. Berikut disajikan tabel hasil pengujian pengaruh tak langsung:

Tabel 5-38. Hasil Pengujian Pengaruh Tak Langsung Inner Model

| Pengaruh Tak Langsung | Koefisien Jalur | p-value | Keterangan |
|--|-----------------|---------|------------------|
| Genistein -> NFkB | -0.108 | 0.049 | Signifikan |
| Genistein -> PCNA | -0.051 | 0.184 | Tidak Signifikan |
| Genistein -> BAX/BCL-2 | -0.054 | 0.094 | Tidak Signifikan |
| RE- α /RE- β -> PCNA | 0.318 | 0.000 | Signifikan |
| RE- α /RE- β -> BAX/BCL-2 | 0.050 | 0.474 | Tidak Signifikan |

Hasil pengujian hipotesis jalur-jalur baik pengaruh langsung maupun pengaruh tak langsung juga dapat dilihat pada gambar diagram jalur sebagai berikut.



Keterangan:
 ————— : Pengaruh Langsung
 - - - - - : Pengaruh Tak Langsung

(*) Berarti bermakna secara statistik, ^{ts} berarti tidak signifikan

Gambar 5-27. Diagram Jalur Hasil Pengujian Hipotesis Inner Model

Hasil pengujian hipotesis pengaruh langsung dan pengaruh tak langsung berdasarkan, dapat dijelaskan sebagai berikut :

a. Pengujian Pengaruh Langsung Genistein terhadap Rasio RE- α /RE- β

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh langsung genistein terhadap Rasio RE- α /RE- β , didapatkan koefisien jalur sebesar -0.253 dengan p-value sebesar 0.032. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh langsung pemberian genistein terhadap rasio RE- α /RE- β . Koefisien jalur bernilai negatif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh negatif terhadap rasio RE- α /RE- β . Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap penurunan rasio RE- α /RE- β .

b. Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Ekspresi NF κ B melalui Rasio RE- α /RE- β

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh tak langsung genistein terhadap ekspresi NF κ B melalui Rasio RE- α /RE- β , didapatkan koefisien jalur sebesar -0.108 dengan p-value sebesar 0.049. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap ekspresi NF κ B melalui rasio RE- α /RE- β . Koefisien jalur bernilai negatif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh negatif terhadap ekspresi NF κ B. Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap penurunan rasio RE- α /RE- β dan secara tidak langsung akan berdampak pada penurunan ekspresi NF κ B.

c. Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Ekspresi PCNA melalui Rasio RE- α /RE- β dan Ekspresi NF κ B

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh tak langsung genistein terhadap ekspresi PCNA melalui Rasio RE- α /RE- β Ekspresi dan NF κ B, didapatkan koefisien jalur sebesar -0.051 dengan p-value sebesar 0.184. P-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$)

membuktikan bahwa tidak terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap ekspresi PCNA dengan melalui rasio RE- α /RE- β dan Ekspresi NFkB.

d. Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Rasio BAX/BCL-2 melalui Rasio RE- α /RE- β dan Ekspresi NFkB

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh tak langsung genistein terhadap rasio BAX/BCL-2 melalui Rasio RE- α /RE- β Ekspresi dan NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar -0.054 dengan p-value sebesar 0.094. P-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$) membuktikan bahwa tidak terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap rasio BAX/BCL-2 dengan melalui rasio RE- α /RE- β dan Ekspresi NFkB.

e. Pengujian Pengaruh Langsung Rasio RE- α /RE- β terhadap Ekspresi NFkB

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh langsung Rasio RE- α /RE- β terhadap Ekspresi NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.426 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh langsung Rasio RE- α /RE- β terhadap Ekspresi NFkB. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa peningkatan yang terjadi pada Rasio RE- α /RE- β berpengaruh terhadap peningkatan Ekspresi NFkB.

f. Pengujian Pengaruh Tak Langsung Rasio RE- α /RE- β terhadap Ekspresi PCNA melalui Ekspresi NFkB

Berdasarkan pada hasil pengujian tak pengaruh langsung Rasio RE- α /RE- β terhadap Ekspresi PCNA dengan melalui Ekspresi NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.318 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung signifikan Rasio RE- α /RE- β terhadap Ekspresi PCNA dengan melalui Ekspresi NFkB. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa peningkatan yang terjadi pada Rasio RE- α /RE- β berpengaruh terhadap peningkatan Ekspresi NFkB dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan Ekspresi PCNA.

g. Pengujian Pengaruh Tak Langsung Rasio RE- α /RE- β terhadap Rasio BAX/BCL-2 melalui Ekspresi NFkB

Berdasarkan pada hasil pengujian tak pengaruh langsung Rasio RE- α /RE- β terhadap Rasio BAX/BCL-2 dengan melalui Ekspresi NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.050 dengan p-value sebesar 0.474. P-value lebih dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa tidak terdapat pengaruh tak langsung Rasio RE- α /RE- β terhadap Rasio BAX/BCL-2 dengan melalui Ekspresi NFkB.

5.2.13 Hasil Analisis Jalur Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan Melalui Ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB sebagai Variabel Mediasi

Pengujian pengaruh langsung pada hasil analisis jalur untuk menguji pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan melalui Ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB sebagai Variabel Mediasi dijelaskan dalam tabel berikut menyajikan.

Tabel 5-39. Hasil Pengujian Pengaruh Langsung Model Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan Melalui Ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB sebagai Variabel Mediasi

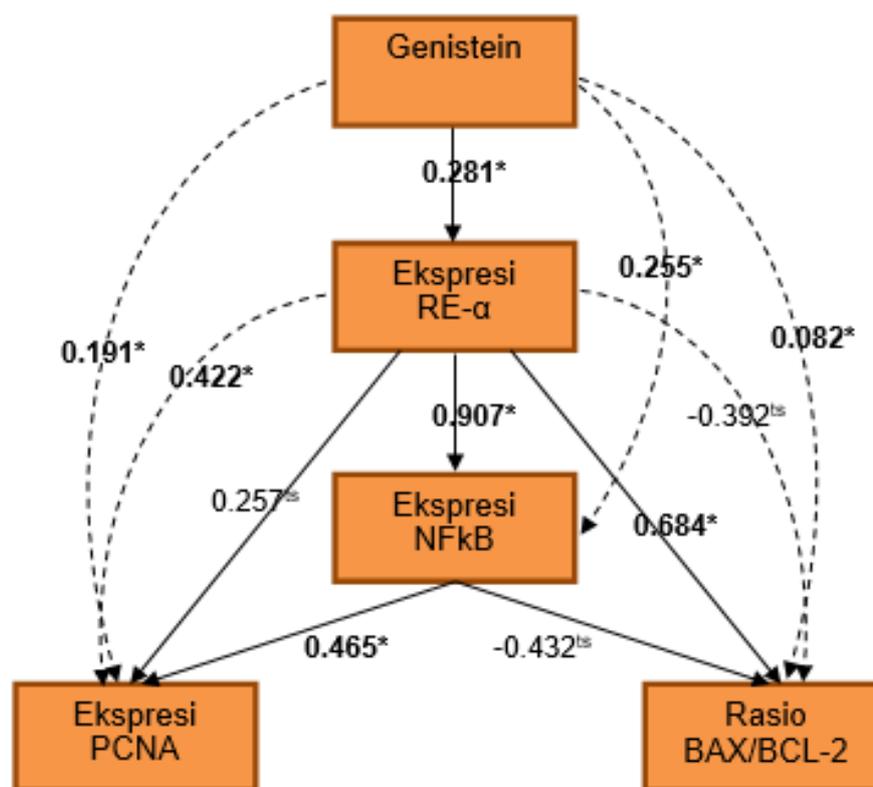
| Jalur Pengaruh | Koefisien Jalur | p-value | Keterangan |
|--------------------------------------|-----------------|---------|------------------|
| Genistein \rightarrow RE- α | 0.281 | 0.010 | Signifikan |
| RE- α \rightarrow NFkB | 0.907 | 0.000 | Signifikan |
| RE- α \rightarrow PCNA | 0.257 | 0.328 | Tidak Signifikan |
| RE- α \rightarrow BAX/BCL-2 | 0.684 | 0.010 | Signifikan |
| NFkB \rightarrow PCNA | 0.465 | 0.046 | Signifikan |
| NFkB \rightarrow BAX/BCL-2 | -0.432 | 0.140 | Tidak Signifikan |

Selain pengaruh langsung, proses pengujian juga dilakukan pada pengaruh tak langsung. Berikut disajikan tabel hasil pengujian pengaruh tak langsung:

Tabel 5-40. Hasil Pengujian Pengaruh Tak Langsung Langsung Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan Melalui Ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB sebagai Variabel Mediasi

| Pengaruh Tak Langsung | Koefisien | | Keterangan |
|---------------------------|-----------|---------|------------------|
| | Jalur | p-value | |
| Genistein -> NFkB | 0.255 | 0.011 | Signifikan |
| Genistein -> PCNA | 0.191 | 0.021 | Signifikan |
| Genistein -> BAX/BCL-2 | 0.082 | 0.047 | Signifikan |
| RE- α -> PCNA | 0.422 | 0.043 | Signifikan |
| RE- α -> BAX/BCL-2 | -0.392 | 0.150 | Tidak Signifikan |

Hasil pengujian hipotesis jalur-jalur baik pengaruh langsung maupun pengaruh tak langsung juga dapat dilihat pada gambar diagram jalur sebagai berikut.



Keterangan :
 —————> : Pengaruh Langsung
 - - - - -> : Pengaruh Tak Langsung

Gambar 5-28. Diagram Jalur Hasil Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan Melalui Ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB sebagai Variabel Mediasi

Hasil pengujian hipotesis pengaruh langsung dan pengaruh tak langsung berdasarkan, dapat dijelaskan sebagai berikut :

a. Pengujian Pengaruh Langsung Genistein terhadap Ekspresi RE- α

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh langsung genistein terhadap Ekspresi RE- α , didapatkan koefisien jalur sebesar 0.281 dengan p-value sebesar 0.010. p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh langsung pemberian genistein terhadap ekspresi RE- α . Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh positif terhadap ekspresi RE- α . Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap peningkatan ekspresi RE- α .

b. Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Ekspresi NFkB melalui Ekspresi RE- α

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh tak langsung genistein terhadap ekspresi NFkB melalui Ekspresi RE- α , didapatkan koefisien jalur sebesar 0.255 dengan p-value sebesar 0.011. p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap ekspresi NFkB melalui ekspresi RE- α . Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh positif terhadap ekspresi NFkB. Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap peningkatan ekspresi RE- α dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan ekspresi NFkB.

c. Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Ekspresi PCNA melalui Ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh tak langsung genistein terhadap ekspresi PCNA melalui Ekspresi RE- α Ekspresi dan NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.191 dengan p-value sebesar 0.021. p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap ekspresi PCNA dengan melalui ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB. Koefisien jalur

bernilai positif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh positif terhadap ekspresi PCNA. Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap peningkatan ekspresi RE- α dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan ekspresi NFkB dan ekspresi PCNA.

d. Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Rasio BAX/BCL-2 melalui Ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh tak langsung genistein terhadap rasio BAX/BCL-2 melalui Ekspresi RE- α Ekspresi dan NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.082 dengan p-value sebesar 0.047. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap rasio BAX/BCL-2 dengan melalui ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh positif terhadap rasio BAX/BCL-2. Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap peningkatan ekspresi RE- α dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan ekspresi NFkB dan rasio BAX/BCL-2.

e. Pengujian Pengaruh Langsung Ekspresi RE- α terhadap Ekspresi NFkB

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh langsung Ekspresi RE- α terhadap Ekspresi NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.907 dengan p-value sebesar 0.000. p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh langsung Ekspresi RE- α terhadap Ekspresi NFkB. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa peningkatan yang terjadi pada Ekspresi RE- α berpengaruh terhadap peningkatan Ekspresi NFkB.

f. Pengujian Pengaruh Tak Langsung Ekspresi RE- α terhadap Ekspresi PCNA melalui Ekspresi NFkB

Berdasarkan pada hasil pengujian tak pengaruh langsung Ekspresi RE- α terhadap Ekspresi PCNA dengan melalui Ekspresi NFkB, didapatkan koefisien jalur

sebesar 0.422 dengan p-value sebesar 0.043. p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung signifikan Ekspresi RE- α terhadap Ekspresi PCNA dengan melalui Ekspresi NFkB. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa peningkatan yang terjadi pada Ekspresi RE- α berpengaruh terhadap peningkatan Ekspresi NFkB dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan Ekspresi PCNA.

g. Pengujian Pengaruh Tak Langsung Ekspresi RE- α terhadap Rasio BAX/BCL-2 melalui Ekspresi NFkB

Berdasarkan pada hasil pengujian tak pengaruh langsung Ekspresi RE- α terhadap Rasio BAX/BCL-2 dengan melalui Ekspresi NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar -0.392 dengan p-value sebesar 0.150. p-value lebih dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa tidak terdapat pengaruh tak langsung Ekspresi RE- α terhadap Rasio BAX/BCL-2 dengan melalui Ekspresi NFkB.

5.2.14 Hasil Analisis Jalur Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan Melalui Ekspresi RE- β dan Ekspresi NFkB sebagai Variabel Mediasi

Pengujian pengaruh langsung pada hasil analisis jalur untuk menguji pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan melalui Ekspresi RE- β dan Ekspresi NFkB sebagai Variabel Mediasi tampak di tabel berikut.

Tabel 5-41. Hasil Pengujian Pengaruh Langsung Model Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan Melalui Ekspresi RE- β dan Ekspresi NFkB sebagai Variabel Mediasi

| Jalur Pengaruh | Koefisien | | Keterangan |
|--------------------------|-----------|---------|------------------|
| | Jalur | p-value | |
| Genistein -> RE- β | 0.538 | 0.000 | Signifikan |
| RE- β -> NFkB | 0.846 | 0.000 | Signifikan |
| RE- β -> PCNA | 0.447 | 0.011 | Signifikan |
| RE- β -> BAX/BCL-2 | 0.224 | 0.192 | Tidak Signifikan |
| NFkB -> PCNA | 0.320 | 0.039 | Signifikan |
| NFkB -> BAX/BCL-2 | -0.001 | 0.996 | Tidak Signifikan |

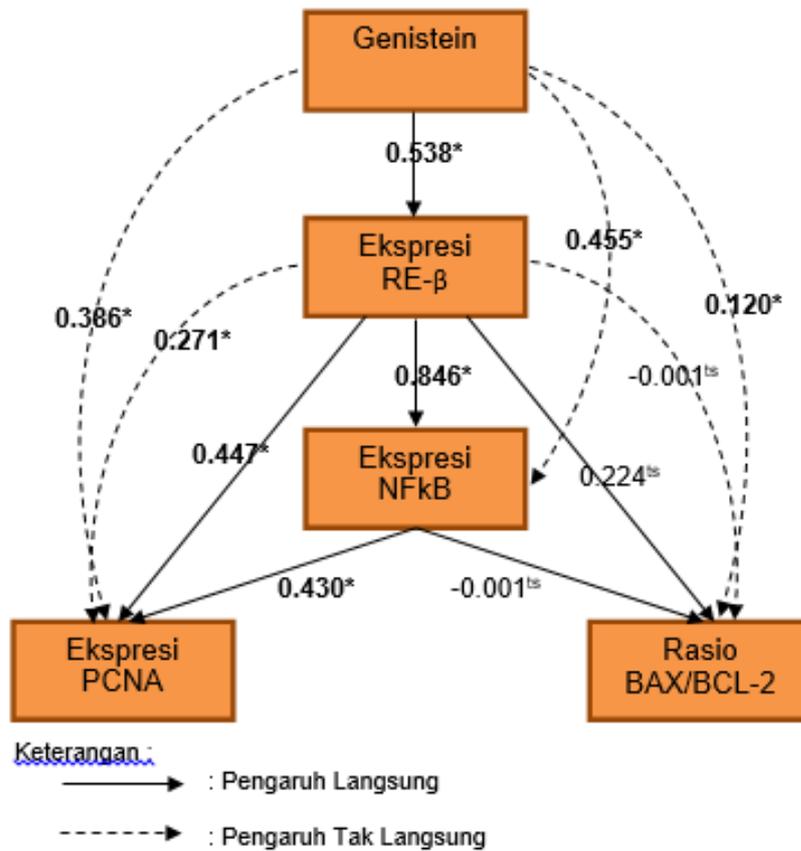
Selain pengaruh langsung, proses pengujian juga dilakukan pada pengaruh tak langsung. Berikut disajikan tabel hasil pengujian pengaruh tak langsung:

Tabel 5-42. Hasil Pengujian Pengaruh Tak Langsung Langsung Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan Melalui Ekspresi RE- β dan Ekspresi NF κ B sebagai Variabel Mediasi

| Pengaruh Tak Langsung | Koefisien | | Keterangan |
|----------------------------|-----------|---------|------------------|
| | Jalur | p-value | |
| Genistein -> NF κ B | 0.455 | 0.000 | Signifikan |
| Genistein -> PCNA | 0.386 | 0.000 | Signifikan |
| Genistein -> BAX/BCL-2 | 0.120 | 0.041 | Signifikan |
| RE- β -> PCNA | 0.271 | 0.033 | Signifikan |
| RE- β -> BAX/BCL-2 | -0.001 | 0.996 | Tidak Signifikan |

Hasil pengujian hipotesis jalur-jalur baik pengaruh langsung maupun pengaruh tak langsung juga dapat dilihat pada gambar diagram jalur sebagai berikut.





Gambar 5-29. Diagram Jalur Hasil Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan Melalui Ekspresi RE-β dan Ekspresi NFκB sebagai Variabel Mediasi

Hasil pengujian hipotesis pengaruh langsung dan pengaruh tak langsung berdasarkan, dapat dijelaskan sebagai berikut :

a. Pengujian Pengaruh Langsung Genistein terhadap Ekspresi RE-β

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh langsung genistein terhadap Ekspresi RE-β, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.538 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh langsung pemberian genistein terhadap ekspresi RE-β. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh positif terhadap ekspresi

RE- β . Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap peningkatan ekspresi RE- β .

b. Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Ekspresi NFkB melalui Ekspresi RE- β

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh tak langsung genistein terhadap ekspresi NFkB melalui Ekspresi RE- β , didapatkan koefisien jalur sebesar 0.455 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap ekspresi NFkB melalui ekspresi RE- β . Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh positif terhadap ekspresi NFkB. Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap peningkatan ekspresi RE- β dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan ekspresi NFkB.

c. Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Ekspresi PCNA melalui Ekspresi RE- β dan Ekspresi NFkB

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh tak langsung genistein terhadap ekspresi PCNA melalui Ekspresi RE- β Ekspresi dan NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.386 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap ekspresi PCNA dengan melalui ekspresi RE- β dan Ekspresi NFkB. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh positif terhadap ekspresi PCNA. Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap peningkatan ekspresi RE- β dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan ekspresi NFkB dan ekspresi PCNA.

d. Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Rasio BAX/BCL-2 melalui Ekspresi RE- β dan Ekspresi NF κ B

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh tak langsung genistein terhadap rasio BAX/BCL-2 melalui Ekspresi RE- β Ekspresi dan NF κ B, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.120 dengan p-value sebesar 0.041. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap rasio BAX/BCL-2 dengan melalui ekspresi RE- β dan Ekspresi NF κ B. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh positif terhadap rasio BAX/BCL-2. Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap peningkatan ekspresi RE- β dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan ekspresi NF κ B dan rasio BAX/BCL-2.

e. Pengujian Pengaruh Langsung Ekspresi RE- β terhadap Ekspresi NF κ B

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh langsung Ekspresi RE- β terhadap Ekspresi NF κ B, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.846 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh langsung Ekspresi RE- β terhadap Ekspresi NF κ B. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa peningkatan yang terjadi pada Ekspresi RE- β berpengaruh terhadap peningkatan Ekspresi NF κ B.

f. Pengujian Pengaruh Tak Langsung Ekspresi RE- β terhadap Ekspresi PCNA melalui Ekspresi NF κ B

Berdasarkan pada hasil pengujian tak pengaruh langsung Ekspresi RE- β terhadap Ekspresi PCNA dengan melalui Ekspresi NF κ B, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.271 dengan p-value sebesar 0.033. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$)

membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung signifikan Ekspresi RE- β terhadap Ekspresi PCNA dengan melalui Ekspresi NFkB. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa peningkatan yang terjadi pada Ekspresi RE- β berpengaruh terhadap peningkatan Ekspresi NFkB dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan Ekspresi PCNA.

g. Pengujian Pengaruh Tak Langsung Ekspresi RE- β terhadap Rasio BAX/BCL-2 melalui Ekspresi NFkB

Berdasarkan pada hasil pengujian tak pengaruh langsung Ekspresi RE- β terhadap Rasio BAX/BCL-2 dengan melalui Ekspresi NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar -0.001 dengan p-value sebesar 0.996. P-value lebih dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa tidak terdapat pengaruh tak langsung Ekspresi RE- β terhadap Rasio BAX/BCL-2 dengan melalui Ekspresi NFkB.

5.2.15 Pengujian Hubungan antara Dosis Genistein dengan Variabel Pengamatan

Pengujian hubungan antara dosis genistein dengan variabel-variabel pengamatan dilakukan dengan menggunakan uji Korelasi Pearson. Berikut hasil pengujian hubungan antara dosis genistein dengan variabel-variabel pengamatan:

Tabel 5-43. Hasil Pengujian Hubungan antara Dosis Genistein dengan Variabel Pengamatan

| Hubungan | Koefisien Korelasi | p-value | Keterangan |
|--|--------------------|---------|------------------|
| Dosis Genistein dengan Ekspresi BAX | 0.523 | 0.000 | Signifikan |
| Dosis Genistein dengan Ekspresi BCL-2 | 0.351 | 0.012 | Signifikan |
| Dosis Genistein dengan Ekspresi PCNA | 0.438 | 0.001 | Signifikan |
| Dosis Genistein dengan Ekspresi NFkB | 0.189 | 0.188 | Tidak Signifikan |
| Dosis Genistein dengan Ekspresi RE- α | 0.194 | 0.176 | Tidak Signifikan |
| Dosis Genistein dengan Ekspresi RE- β | 0.605 | 0.000 | Signifikan |
| Dosis Genistein dengan Rasio BAX/BCL-2 | 0.357 | 0.011 | Signifikan |
| Dosis Genistein dengan Rasio RE- α /RE- β | -0.312 | 0.027 | Signifikan |

Berdasarkan hasil pengujian korelasi antara dosis genisten dengan ekspresi BAX, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.523 dengan p-value sebesar 0.000. p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi BAX. Koefisien korelasi bernilai positif menggambarkan arah hubungan positif. Artinya, peningkatan dosis genistein yang diberikan, akan diikuti pula peningkatan pada ekspresi BAX.

Pada hasil pengujian korelasi antara dosis genisten dengan ekspresi BCL-2, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.351 dengan p-value sebesar 0.012. p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi BCL-2. Koefisien korelasi bernilai positif menggambarkan arah hubungan positif. Artinya, peningkatan dosis genistein yang diberikan, akan diikuti pula peningkatan pada ekspresi BCL-2.

Pada hasil pengujian korelasi antara dosis genisten dengan ekspresi PCNA, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.438 dengan p-value sebesar 0.001. p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi PCNA. Koefisien korelasi bernilai positif menggambarkan arah hubungan positif. Artinya, peningkatan dosis genistein yang diberikan, akan diikuti pula peningkatan pada ekspresi PCNA.

Pada hasil pengujian korelasi antara dosis genisten dengan ekspresi NFkB, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.189 dengan p-value sebesar 0.188. p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$) menunjukkan tidak terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi NFkB.

Pada hasil pengujian korelasi antara dosis genisten dengan ekspresi RE- α , didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.194 dengan p-value sebesar 0.176. p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$) menunjukkan tidak terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi RE- α .

Pada hasil pengujian korelasi antara dosis genisten dengan ekspresi RE- β , didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.605 dengan p-value sebesar 0.000. p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi RE- β . Koefisien korelasi bernilai positif menggambarkan arah hubungan positif. Artinya, peningkatan dosis genistein yang diberikan, akan diikuti pula peningkatan pada ekspresi RE- β .

Pada hasil pengujian korelasi antara dosis genisten dengan rasio BAX/BCL-2, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.357 dengan p-value sebesar 0.011. p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan rasio BAX/BCL-2. Koefisien korelasi bernilai positif menggambarkan arah hubungan positif. Artinya, peningkatan dosis genistein yang diberikan, akan diikuti pula peningkatan pada rasio BAX/BCL-2.

Pada hasil pengujian korelasi antara dosis genisten dengan rasio RE- α /RE- β , didapatkan koefisien korelasi sebesar -0.312 dengan p-value sebesar 0.027. p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan rasio RE- α /RE- β . Koefisien korelasi bernilai negatif menggambarkan arah hubungan negatif. Artinya, peningkatan dosis genistein yang diberikan, akan diikuti penurunan rasio RE- α /RE- β .

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Penelitian Tahap I

Telah dilakukan penelitian terhadap 30 mencit yang dikelompokkan dalam 3 kelompok, yakni kelompok yang mendapatkan injeksi supernatan kerokan endometrium (Kelompok A), injeksi supernatan dinding kista endometrioma (Kelompok B), dan injeksi supernatan jaringan endometrium-miometrium uterus wanita dengan adenomiosis (Kelompok C). Selanjutnya masing-masing kelompok mencit akan dilakukan analisa terhadap jaringan endometriosis yang terbentuk pada peritoneum dengan melakukan evaluasi terhadap luas implantasi, histopatologi dan imunohistokimia. Hasil pengumpulan data masing-masing kelompok perlakuan akan dibandingkan sehingga didapatkan mencit model endometriosis yang ideal.

Penelitian ini menganut teori dari Sampson, dimana sel-sel endometrium yang masih hidup (*viable*) yang dimasukkan dalam rongga peritoneum akan mengadakan implantasi di peritoneum dan membentuk bercak endometriosis.

6.1.1 Luas Implantasi pada Peritoneum

Endometriosis didefinisikan sebagai adanya jaringan endometrium di luar dari rongga uterus. Daerah yang paling sering terkena adalah organ pelvis dan peritoneum, walaupun daerah yang lain juga bisa terkena. Manifestasi klinisnya dapat berupa lesi, biasanya didapatkan pada permukaan peritoneum dari organ reproduksi, tetapi dapat saja muncul di daerah mana saja di tubuh wanita. Ukuran dari lesi sangat bervariasi mulai dari mikroskopik hingga massa invasif yang luas yang mengikis bagian dalam organ dan menyebabkan perlengketan luas (Barrier, 2010).

Hasil analisis makroskopis (*gross examination*) dalam penelitian ini, didapatkan bercak endometriosis, didapatkan adanya jaringan implan yang berbentuk

nodul-nodul yang bulat utuh yang melekat kuat pada jaringan peritoneum dibawahnya, dengan ukuran bervariasi.

Derajat keparahan yang timbul pada nodul endometriosis akibat perlakuan yang dilakukan pada mencit percobaan tersebut bervariasi antar kelompok. Untuk menentukan derajat keparahan tersebut adalah salah satunya dengan menentukan derajat luasnya area implan endometriosis yang terbentuk pada peritoneum mencit model. Pada data tampak bahwa pada kelompok mencit yang mendapatkan suntikan supernatan kerokan endometrium, kapsul/dinding endometrioma dan supernatan endometriosis-miometrium uterus didapatkan rerata luas area implan endometriosis berturut-turut adalah $21,98 \pm 0,88 \text{ mm}^2$ pada Kelompok A, $10,68 \pm 1,41 \text{ mm}^2$ pada Kelompok B dan $42,75 \pm 3,28 \text{ mm}^2$ pada Kelompok C.

Berdasarkan uji asumsi normalitas dan homogenitas terhadap data luas area implantasi lesi endometriotik pada mencit model, didapatkan p-value lebih besar dari $\alpha = 0,05$ yang menunjukkan bahwa asumsi normalitas telah terpenuhi. Sedangkan pada uji asumsi homogenitas ragam, didapatkan p-value kurang dari $\alpha = 0,05$ yang menunjukkan bahwa asumsi homogenitas ragam belum terpenuhi. Sehingga diperlukan proses transformasi data. Pada penelitian ini dipilih jenis transformasi data logaritma yakni dilakukan dengan mengubah data asli ke dalam bentuk logaritma ($\text{Log}(Y)$).

Data hasil transformasi $\text{Log}(Y)$ dilakukan uji asumsi normalitas yang didapatkan nilai p-value lebih dari 0,05. Sedangkan hasil pengujian asumsi homogenitas ragam didapatkan p-value lebih dari 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa asumsi yang melandasi ANOVA pada variabel luas implant endometriosis telah terpenuhi dengan melakukan transformasi logaritma.

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0,000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) yang dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata luas implant endometriosis.

Untuk mengetahui perbedaan lebih lanjut rata-rata luas implant endometriosis pada masing-masing kelompok dilakukan pengujian dengan menggunakan LSD 5%.

Berdasarkan pada hasil uji LSD 5%, ditunjukkan bahwa kelompok B memiliki rata-rata luas implant endometriosis yang paling rendah. Sedangkan kelompok C memiliki rata-rata luas implant endometriosis yang paling tinggi. Ketiga kelompok tersebut menunjukkan perbedaan rata-rata luas implant endometriosis yang signifikan. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd tiap kelompok memuat huruf berbeda.

Berdasarkan uji LSD tampak bahwa p-value perbandingan antara kelompok A, B, dan C kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Hal ini mengandung pengertian bahwa semua kelompok baik A, B, maupun C memiliki perbedaan signifikan rata-rata luas implant endometriosis dimana kelompok C memiliki rata-rata luas implant endometriosis tertinggi dan kelompok B memiliki rata-rata luas implant endometriosis terendah

Sehingga dapat disimpulkan bahwa untuk mendapatkan model endometriosis dengan luas implan yang paling luas adalah dengan menggunakan injeksi supernatan uterus wanita dengan adenomiosis.

6.1.2 Histopatologi Lesi Endometriosis pada Peritoneum

Pada penelitian ini, pemeriksaan histopatologi digunakan untuk mengetahui derajat kerusakan pada peritoneum yang dilakukan dengan menentukan derajat kerusakan berdasarkan infiltrasi sel radang dan penampakan massa granuloma yang timbul. Metode skoring derajat kerusakan tersebut menggunakan sistem skoring dengan menggunakan Metode Klopfleisch yang telah dimodifikasi (Klopfleisch, 2013).

Secara mikroskopis dengan pewarnaan *haematoxylin-eosin* dari potongan implan, menunjukkan bahwa pada kelompok mencit model C, didapatkan gambaran histopatologi sel radang dengan nilai rerata infiltrasi sel radang adalah antara > 100 pada 5 lp (pembesaran 400x). Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok mencit model C dihasilkan peradangan dengan derajat berat dimana beberapa diantaranya diikuti dengan kematian sel-sel miosit dan pembentukan jaringan ikat fibrous. Sedangkan pada kelompok mencit model A dan B, didapatkan peradangan dengan derajat ringan dengan skor antara 1 sampai dengan 3.

Berdasarkan pemeriksaan histopatologi lesi endometriosis pada peritoneum masing-masing kelompok perlakuan pada penelitian ini, tampak bahwa derajat kerusakan paling berat didapatkan pada Kelompok mencit dengan perlakuan injeksi supernatan adenomiosis uterus (mencit model C) yakni dengan rerata total skor $9,1 \pm 3,28$.

Pada mencit model kelompok C didapatkan gambaran massa granuloma, dan infiltrasi masif sel-sel radang dan terjadi pembentukan jaringan ikat fibrous pada jaringan otot. Sedangkan pada mencit yang mendapatkan supernatan kerokan endometrium tidak didapatkan massa granuloma. Berdasarkan pemeriksaan massa granuloma, pada mencit model endometriosis Kelompok A tidak didapatkan gambaran massa granuloma. Pada Kelompok B, didapatkan

massa granuloma hanya pada satu ekor mencit model. Sedangkan pada Kelompok C didapatkan massa granuloma pada hampir semua mencit model (hanya satu ekor mencit model yang tidak menunjukkan adanya massa granuloma).

Data yang didapatkan dari skoring derajat kerusakan peritoneum, didapatkan beberapa data dengan angka 0. Oleh karena itu, sebelum dianalisis lebih lanjut, diperlukan proses transformasi data yang salah satunya dengan transformasi akar kuadrat ($\sqrt{Y + 0,5}$). Berdasarkan uji asumsi normalitas, didapatkan p-value lebih besar dari $\alpha = 0,05$ yang menunjukkan bahwa asumsi normalitas telah terpenuhi. Demikian juga pada pengujian asumsi homogenitas ragam didapatkan p-value dari 0,05.

Pengujian dengan menggunakan ANOVA bertujuan untuk mengevaluasi apakah terdapat perbedaan respon secara bermakna antar kelompok perlakuan. Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan nilai p-value sebesar 0,000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata derajat kerusakan peritoneum.

Untuk mengetahui perbedaan lebih lanjut rata-rata derajat kerusakan peritoneum pada masing-masing kelompok dilakukan pengujian dengan menggunakan LSD 5%.

Berdasarkan pada hasil uji LSD 5%, tampak bahwa Kelompok A memiliki rata-rata derajat kerusakan peritoneum yang paling rendah, namun tidak berbeda signifikan dengan Kelompok B. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd pada Kelompok A dan B memuat huruf yang sama. Sedangkan Kelompok C memiliki rata-rata derajat kerusakan peritoneum yang paling tinggi. Derajat kerusakan peritoneum pada Kelompok C menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan

Kelompok A dan B. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd Kelompok C memuat huruf berbeda.

Pada pemeriksaan LSD tampak bahwa p-value perbandingan antara Kelompok A dengan Kelompok B lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Hal ini mengandung pengertian bahwa antara Kelompok A dengan Kelompok B tidak terdapat perbedaan signifikan rata-rata derajat kerusakan peritoneum. Sedangkan perbandingan antara Kelompok A dengan Kelompok C didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Demikian juga pada perbandingan antara Kelompok B dengan Kelompok C didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Hal ini mengandung pengertian bahwa derajat kerusakan peritoneum pada Kelompok C menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan Kelompok A dan B, dimana Kelompok C memiliki rata-rata derajat kerusakan peritoneum yang paling tinggi.

Hal ini menunjukkan bahwa model C merupakan model yang paling baik untuk mendapatkan gambaran infiltrasi radang dan gambaran massa granuloma yang baik pula diantara ketiga kelompok perlakuan.

Sistem imun yang berperan pada perkembangan penyakit endometriosis yaitu imunitas selular (sel-sel imun spesifik melawan penyakit) dan imunitas humoral (dibentuk antibodi untuk menyerang antigen). Pada penderita endometriosis memperlihatkan terjadinya gangguan sistem imun yang ditandai dengan berkurangnya sel T dan respon sel *natural killer* (Barrier, 2010). Penyakit ini juga memperlihatkan adanya peningkatan respon imun humoral dan aktivitas makrofag (Soares *et al.*, 2012). Lesi endometriosis mensekresikan *haptoglobulin* yang mengakibatkan makrofag bukannya bertindak sebagai pembersih untuk menghilangkan sel endometrium ektopik, tetapi menghambat fungsi pembersihnya (Giudice, 2010).

Teori imunologi menjelaskan bahwa perekatan sel-sel endometrium yang terlepas ke permukaan peritoneum dan invasi ke subperitonium melibatkan

tampilan molekul perekatan membran ekstraselular (*extracellular membrane adhesion molecules*, ECAM) dan koreseptornya. Fragmen-fragmen endometrium dapat menumpuk di tempat-tempat tertentu di dalam rongga pelvis dan melekat pada permukaan peritorium. Cacat-cacat mikroskopik mengakibatkan sel-sel endometrium bersentuhan langsung dengan matriks submesotelium, sehingga sel-sel tersebut berproliferasi, menyebar, tumbuh dan terkadang menyerbu sampai ke lapisan subperitonium. Oleh karena tidak dapat mendegradasi jaringan endometriosis yang masuk ke dalam peritoneum, penyakit endometriosis sering ditemukan pada wanita dengan imunitas selular yang rendah (Barrier, 2010).

Monosit dan makrofag dalam cairan peritoneal merupakan unsur penting sistem imun yang terdapat dalam cairan peritoneal. Makrofag merupakan tipe sel yang paling banyak ditemukan pada cairan peritoneal dan memegang peranan dalam patogenesis endometriosis. Makrofag peritoneal dan monosit endometriosis memberikan efek peningkatan produksi sitokin, faktor pertumbuhan, faktor angiogenik, molekul adhesi, enzim sitolitik, *reactive oxygen radicals*, serta substansi lain yang menstimulasi proliferasi endometrium ektopik dan menurunkan apoptosis. Peningkatan produksi sitokin memediasi beberapa gejala endometriosis seperti nyeri dan infertilitas pada wanita usia reproduksi (Dmowski dan Braun, 2004; Giudice, 2010).

Pertumbuhan endometrium ektopik, infiltrasi oleh sel imun, peningkatan produksi sitokin proinflamasi, *growth factors*, dan faktor angiogenesis adalah seluruh gambaran respon inflamasi tampak di sekitar *endometriotic implants*.

Kondisi ini kemudian menyebabkan mobilisasi fibroblast dan proliferasi jaringan ikat sebagai mekanisme homeostatik untuk mengisolasi dan menyembuhkan lokasi injuri. Intensitas reaksi ini bervariasi, tergantung pada derajat dan karakter aktivasi imun. Tidak ada keraguan lagi bahwa sistem imun memang dimobilisasi

dan didapatkan suatu respon imun. Kemunculan mereka memainkan peran yang penting dalam patogenesis penyakit ini. Namun masih belum jelas, apakah abnormalitas imunologis ini merupakan penyebab atau konsekuensi dari endometriosis (Dmowski *et al.*, 2004).

Pertumbuhan endometrium ektopik akan merangsang produksi makrofag yang berlebihan, produk sitokin proinflamasi dan faktor pertumbuhan dalam cairan peritoneal, sehingga menyebabkan pertumbuhan yang lebih lanjut. Sitokin pro-inflamasi mayor yaitu TNF- α dan IL-1 β dilepaskan makrofag peritoneal dan sel endometriosis yang selanjutnya mengaktifasi faktor transkripsi seperti nuclear factor-kappa B (NF-kB) dan activator protein 1 (AP-1). Faktor transkripsi yang aktif mengikat DNA sel endometriosis dan merangsang aktivitas transkripsi gen selanjutnya (Soares *et al.*, 2012).

Pemahaman kita tentang etiologi endometriosis peritoneal masih sangat terbatas. Penjelasan yang paling banyak diterima (dan didukung) adalah "*Sampson hypothesis*", yang menunjukkan bahwa hal itu terjadi karena menstruasi retrograde, di mana jaringan endometrium melewati tuba falopi menuju ke dalam rongga peritoneum dimana jaringan tersebut akan mengalami implantasi (Sampson, 1925). Namun, mekanisme ini gagal untuk menjelaskan mengapa endometriosis hanya terjadi pada beberapa wanita ketika menstruasi retrograde diperkirakan terjadi pada sekitar 90% wanita (Halme *et al.*, 1984).

Metaplasia kolon, hipotesis lain yang umum, menunjukkan bahwa epitel dapat diubah menjadi endometrium oleh metaplasia. Namun, teori ini gagal menjelaskan mengapa endometriosis tidak umum terjadi pada laki-laki, mengapa endometriosis umumnya terlokalisasi pada rongga perut dan mengapa penyakit ini tidak meningkat dengan bertambahnya usia, seperti penyakit metaplasia lainnya (Meyer, 1919). Teori implantasi menunjukkan pembentukan endometriosis dalam rongga peritoneum memerlukan jaringan endometrium atau

sel untuk menyelesaikan proses adesi, invasi dan proliferasi. Sebagian besar penelitian hingga saat ini terfokus pada perbedaan antara endometrium dari pasien endometriosis atau perbedaan antara endometrium eutopik dan ektopik. Beberapa penelitian telah menyelidiki apakah peritoneum pelvis berperan dalam pembentukan dan pemeliharaan endometriosis atau apakah bagian ini mengalami perubahan pada wanita dengan endometriosis. Sejumlah peran potensial dari peritoneum dalam patofisiologi endometriosis dipertimbangkan dan dibahas. Hal ini meliputi penyediaan tempat perlekatan sel endometrium ektopik, fasilitasi invasi sel endometrium, potensi transisi epitel-mesenkim, perubahan aktivasi/perekrutan sel imun dan ekspresi yang berbeda dari sitokin inflamasi

Pada *endometriotic implant* terdapat epitel, stroma dan kelenjar endometrial yang histologinya sama dengan endometrium eutopik (Leyland *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2010). Pemeriksaan analisis mikroskopis menunjukkan endometriosis terdiri dari kelenjar endometrium, stroma, terkadang dijumpai serat otot halus dan seperti endometrium eutopik, endometrium ektopik juga merespon peredaran hormon (Woodward *et al.*, 2001).

6.1.3 Imunohistokimia Peritoneum Mencit model

Endometriosis didefinisikan sebagai adanya jaringan endometrium viabel di luar cavum uteri. Teori *retrograde menstruation* dengan implantasi fragmen endometrium berpadu dengan faktor peritoneum, menstimulasi pertumbuhan sel adalah penjelasan yang paling diterima secara luas. *Retrograde menstruation*, *adhesi* jaringan endometrium pada peritoneum dan pertumbuhan lebih lanjut sel-sel, kelenjar, dan stroma endometrium ini merupakan elemen esensial dalam patogenesis endometriosis, menurut teori implantasi klasik Sampson. Oleh karena jaringan endometriosis mirip jaringan endometrium maka tumbuh

mengikuti siklus haid, pada umumnya pada masa reproduksi dan menghilang saat menopause (Gavzani *et al.*, 2002).

Seperti halnya endometrium normal, maka jaringan endometriosis juga mempunyai reseptor steroid yaitu RE- α dan RE- β sehingga estrogen yang disuntikkan didalam tubuh akan berikatan dengan reseptornya tersebut. Dalam penelitian ini, diharapkan bahwa jaringan endometriosis yang terbentuk pada mencit model endometriosis merupakan jaringan yang sesuai dengan endometrium, sehingga didapatkan ekspresi RE- α , RE- β dan PR pada pemeriksaan immunohistokimia.

Reseptor Estrogen (RE) memiliki 2 bentuk berbeda yaitu alpha (α) dan beta (β), yang bervariasi terhadap aktivitas transkripsi dan ekspresi spesifik jaringan. RE- α terutama banyak ditemukan di endometrium, payudara, stroma ovarium dan jaringan hipotalamus. Sedangkan RE- β banyak dijumpai di ginjal, otak, tulang, hati, paru-paru, mukosa instestinal, prostat dan sel endotel. Aktivasi RE- α berhubungan dengan proliferasi sel dan karsinogenik pada tumor tergantung estrogen. Pada uterus, RE- α merupakan reseptor dominan dan merupakan mediator dari efek estrogen untuk menstimulasi proliferasi. Ekspresi RE- α dan RE- β pada endometrioma endometriosis lebih tinggi dibandingkan endometrium eutopik dengan RE- α lebih dominan daripada RE- β (Bukulmez *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012).

Efek estrogenik berhubungan keberadaan RE- α dengan terhadap proliferasi dan sebaliknya RE- β menekan aktifitas pertumbuhan (Chang *et al.*, 2008). RE- β yang memiliki sifat antiproliferasi dapat menghambat tindakan RE- α sebagai aktivator yang memediasi proliferasi sel dengan membentuk heterodimer (Riggs dan Hartmann, 2003). Pengikatan estrogen yang sama pada RE- α dan RE- β dapat menimbulkan efek yang berlawanan dalam transkripsinya. Estradiol dapat menstimulasi transkripsi gen dengan RE- α dan ERE, tetapi pada sistem

yang sama estradiol menghambat transkripsi gen bila berikatan dengan RE- β (Rice & Whitehead, 2006); (Speroff dan Fritz, 2006).

6.1.4 Imunohistokimia Ekspresi Reseptor Estrogen- α

Nilai rata-rata IRS yang teramati pada 5 lapangan pandang berbeda pada pembesaran 400x dengan menggunakan mikroskop cahaya biasa merk *Nikon H600L* pada masing-masing kelompok. Tampak bahwa pada kelompok mencit model C memiliki nilai rerata skala semikuantitatif IRS yang paling besar yakni dengan skor $5,94 \pm 2,88$. Sedangkan pada mencit model B adalah dengan nilai rerata $1,42 \pm 1,02$ dan pada mencit model A didapatkan nilai rerata $0,64 \pm 0,5$.

Perbandingan ekspresi RE- α (panah) pada sel mesotel peritonium dan sel radang diantara kelompok perlakuan tampak pada gambar. Tampak bahwa ekspresi RE- α paling kuat terjadi pada kelompok mencit model C diikuti dengan kelompok mencit model B dan A. Hal ini menunjukkan bahwa RE- α lebih banyak dihasilkan pada kelompok perlakuan C dibandingkan dengan kedua kelompok lainnya.

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0,000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) yang dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata ekspresi RE- α . Untuk mengetahui perbedaan lebih lanjut rata-rata ekspresi RE- α pada masing-masing kelompok dilakukan pengujian dengan menggunakan LSD 5%.

Berdasarkan pada hasil uji LSD 5%, ditunjukkan bahwa kelompok A memiliki rata-rata ekspresi RE- α yang paling rendah, namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok B. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd pada kelompok A dan B memuat huruf yang sama. Sedangkan kelompok C memiliki rata-rata ekspresi RE- α yang paling tinggi. Ekspresi RE- α pada Kelompok C menunjukkan

perbedaan yang signifikan dengan Kelompok A dan B. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd Kelompok C memuat huruf berbeda.

Uji LSD 5% data ekspresi RE- α menunjukkan bahwa p-value perbandingan antara Kelompok A dengan Kelompok B lebih dari 0.05 ($p > 0.05$).

Hal ini mengandung pengertian bahwa antara kelompok A dengan kelompok B tidak terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi RE- α . Sedangkan

perbandingan antara Kelompok A dengan Kelompok C didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Demikian juga pada perbandingan antara Kelompok

B dengan Kelompok C didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Hal ini mengandung pengertian bahwa ekspresi RE- α pada Kelompok C menunjukkan

perbedaan yang signifikan dengan Kelompok A dan B, dimana Kelompok C memiliki rata-rata ekspresi RE- α yang paling tinggi.

Hal ini menunjukkan bahwa pemeriksaan immunohistokimia terhadap ekspresi RE- α paling banyak didapatkan pada kelompok mencit model C.

Sehingga dapat disimpulkan bahwa dengan perlakuan mencit model dengan injeksi supernatan jaringan endometrium-miometrium uterus wanita dengan

adenomiosis dihasilkan suatu mencit model endometriosis dengan reseptor estrogen paling besar dengan nilai rerata $5,94 \pm 2,88$.

Hormon estrogen secara definitif memiliki peran aktif dalam perkembangan penyakit endometriosis. Meskipun sebagian besar hormon

estrogen pada wanita adalah produk yang langsung oleh ovarium, sejumlah jaringan perifer dikenal untuk membuat hormon estrogen melalui aromatase

androgen dan adrenal ovari (Hoffman *et al.*, 2012). Perkembangan dan pertumbuhan endometriosis tergantung pada hormon estrogen, penyimpanan

sintesa dan metabolisme estrogen telah diimplikasikan dalam patogenesis endometriosis. Estrogen yang diproduksi lokal dalam jaringan endometriosis,

khususnya estradiol mempunyai dua peranan penting dalam proliferasi sel

endometrial dan stimulator sitokin pro-inflamasi (Bulun *et al.*, 2012; Giudice, 2010).

Endometrium merupakan salah satu jaringan yang paling dinamis dalam tubuh manusia, oleh karena dapat mengalami perubahan proliferasi dan sekretori yang secara primer dikendalikan oleh hormon steroid ovarium yakni estrogen dan progesteron. Hormon estrogen dan progesteron pada endometrium manusia berfungsi melalui ikatan dengan RE dan RP. Pada beberapa studi, kedua reseptor tersebut dianalisis dengan menggunakan parafin blok jaringan endometrium normal manusia (Garcia *et al.*, 1988; Snijders *et al.*, 1992; Mylonas *et al.*, 2004; Mylonas *et al.*, 2005; Lessey, 2011) dan diisolasi dari sel epitel dengan pemeriksaan imunohistokimia (Mylonas *et al.*, 2000).

Sampai dengan beberapa tahun, dipercaya bahwa hanya ada reseptor tunggal RE dan RP. Akan tetapi, penemuan adanya RE yang baru dengan sifat yang spesifik terhadap estrogen telah memberikan pandangan baru terhadap sistem signaling estrogen. Reseptor RE- β memiliki sifat homolog terhadap RE-klasik (RE- α), dimana RE- β dapat berikatan dengan estradiol dengan afinitas tinggi dan menstimulasi transkripsi gen target reseptor estrogen (Kuiper *et al.*, 1998).

6.1.5 Imunohistokimia Ekspresi Reseptor Estrogen β

Berdasarkan penilaian ekspresi RE- β dengan menggunakan skala semikuantitatif IRS, tampak bahwa perbandingan antar kelompok, kelompok C memiliki skala semikuantitatif IRS lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok A dan B. Tampak pada gambar perbandingan RE- β pada sel-sel mesotel dan sel radang diantara kelompok perlakuan. Ekspresi RE- β paling kuat ditemukan pada kelompok mencit model C diikuti oleh B dan A (pewarnaan immuno histokimia, Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel).

Berdasarkan uji asumsi normalitas, didapatkan p-value lebih besar dari $\alpha = 0,05$ yang menunjukkan bahwa asumsi normalitas telah terpenuhi. Demikian juga pada pengujian asumsi homogenitas ragam didapatkan p-value dari 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa asumsi yang melandasi ANOVA pada variabel ekspresi RE- β telah terpenuhi.

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0,000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) yang berarti H_0 ditolak. Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata ekspresi RE- β . Untuk mengetahui perbedaan lebih lanjut rata-rata ekspresi RE- β pada masing-masing kelompok dilakukan pengujian dengan menggunakan LSD 5%. Berdasarkan pada hasil uji LSD 5%, ditunjukkan bahwa kelompok A memiliki rata-rata ekspresi RE- β yang paling rendah, namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok B. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd pada kelompok A dan B memuat huruf yang sama. Sedangkan kelompok C memiliki rata-rata ekspresi RE- β yang paling tinggi. ekspresi RE- β pada kelompok C menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok A dan B. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok C memuat huruf berbeda.

Berdasarkan pada tabel di atas, tampak bahwa p-value perbandingan antara kelompok A dengan kelompok B lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Hal ini mengandung pengertian bahwa antara kelompok A dengan kelompok B tidak terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi RE- β . Sedangkan perbandingan antara kelompok A dengan kelompok C didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Demikian juga pada perbandingan antara kelompok B dengan kelompok C didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Hal ini mengandung pengertian bahwa ekspresi RE- β pada kelompok C menunjukkan perbedaan yang signifikan

dengan kelompok A dan B, dimana kelompok C memiliki rata-rata ekspresi RE- β yang paling tinggi.

Dapat disimpulkan bahwa mencit model endometriosis dengan perlakuan injeksi supernatan lesi endometrium-miometrium uterus dengan adenomiosis menghasilkan mencit model dengan implan endometriotik yang memiliki skoring IRS ekspresi RE- β paling besar dibandingkan dengan kelompok mencit model dengan injeksi supernatan kerokan endometrium maupun dinding endometrioma.

6.1.6 Imunohistokimia Ekspresi Reseptor Progesteron

Seperti halnya endometrium normal, seharusnya implantasi dari jaringan endometriosis ini juga mempunyai reseptor terhadap progesteron.

Penelitian menunjukkan hasil perbandingan ekspresi RP pada lapisan mesotel peritonium diantara kelompok perlakuan seperti terlihat Lampiran 4. Berdasarkan skala semikuantitatif IRS masing-masing kelompok, tampak bahwa ekspresi RP pada kelompok C memiliki angka lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok A dan B.

Dengan pewarnaan imunohistokimia, tampak bahwa ekspresi RP pada lapisan mesotel peritonium kelompok mencit model C lebih kuat dibandingkan kelompok mencit model A dan B. Hal ini kemungkinan bahwa pada kelompok dengan perlakuan injeksi supernatan jaringan endometrium-miometrium uterus wanita dengan adenomiosis, menghasilkan lesi endometriotik yang memiliki RP lebih banyak dibandingkan dengan kedua kelompok perlakuan lainnya.

Pemeriksaan imunohistokimia ekspresi RP pada semua mencit dari masing-masing kelompok didapatkan nilai skor IRS sebesar $1,4 \pm 1,21$ pada kelompok A, nilai skor $0,88 \pm 0,77$ pada kelompok B dan $5,02 \pm 2,6$ pada kelompok C.

Reseptor progesteron diekspresikan dalam 2 bentuk mayor isoform, yaitu RP-A dan RP-B, dimana meningkat dari transkripsi alternatif pada tempat yang berbeda pada gen yang sama. RP-A mengkode 769 asam amino dan kekurangan 164 asam amino pertama pada N-terminus dari RP-B (933 asam amino) (Horwitz *et al.*, 1983; Krett *et al.*, 1988; Graham *et al.*, 1995; Graham and Clarke, 2002). Meskipun RP-A dan RP-B diperkirakan dalam jumlah sama, namun telah diketahui dengan jelas bahwa mereka terekspresi serta memiliki fungsi yang berbeda pada beberapa jaringan, termasuk jaringan endometrium manusia (Graham *et al.*, 1995; Leslie *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 1998).

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0,000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$), dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata ekspresi RP. Untuk mengetahui perbedaan lebih lanjut rata-rata ekspresi RP pada masing-masing kelompok dilakukan pengujian dengan menggunakan LSD 5%. Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 %, ditunjukkan bahwa kelompok A memiliki rata-rata ekspresi RP yang paling rendah, namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok B. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd pada kelompok A dan B memuat huruf yang sama. Sedangkan kelompok C memiliki rata-rata ekspresi RP yang paling tinggi. Ekspresi RP pada kelompok C menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok A dan B. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok C memuat huruf berbeda.

Berdasarkan uji LSD 5%, tampak bahwa p-value perbandingan antara kelompok A dengan kelompok B lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Hal ini mengandung pengertian bahwa antara kelompok A dengan kelompok B tidak terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi RP. Sedangkan perbandingan antara kelompok A dengan kelompok C didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Demikian juga pada perbandingan antara kelompok B dengan kelompok C

didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Hal ini mengandung pengertian bahwa ekspresi RP pada kelompok C menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok A dan B, dimana kelompok C memiliki rata-rata ekspresi RP yang paling tinggi.

Hal ini dapat disimpulkan bahwa pada mencit model perlakuan dengan injeksi supernatan lesi endometrium-miometrium uterus wanita dengan adenomiosis, menghasilkan *endometriotic implant* dengan ekspresi RP yang lebih besar dibandingkan dengan mencit model dengan perlakuan injeksi supernatan kerokan endometrium maupun supernatan dinding endometrioma.

6.2 Pembahasan penelitian tahap 2

Melihat sebaran data normalitas dan homogenitas, perlu dilakukan transformasi data untuk mendapatkan jenis analisa statistik yang sesuai dengan jenis datanya, dan hasil uji asumsi normalitas pada semua variabel penelitian yang telah ditransformasi, didapatkan p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$) yang menunjukkan bahwa asumsi normalitas pada semua variabel sudah terpenuhi dengan melakukan transformasi data. Pada hasil uji asumsi homogenitas ragam, variabel ekspresi BCL-2, Ekspresi RE- α , dan Rasio BAX/BCL-2 memiliki p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$) yang menunjukkan asumsi homogenitas ragam telah terpenuhi setelah dilakukan transformasi data. Oleh karena itu, proses analisis pada variabel ekspresi BCL-2, Ekspresi RE- α , dan Rasio BAX/BCL-2 dilakukan dengan menggunakan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji LSD 5%. Sedangkan pada variabel yang lain didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) yang menunjukkan bahwa asumsi homogenitas ragam belum terpenuhi meskipun sudah dilakukan transformasi data, proses pengujian secara statistik pada variabel yang lain dilakukan dengan menggunakan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Dunnett T3 5%.

6.2.1 Pengaruh genistein terhadap ekspresi Bax

Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan akibat pengaruh berbagai dosis genistein. Kelompok perlakuan 1 (1,3 mg genistein perhari) mengekspresikan BAX terendah mendekati kelompok tanpa pemberian genistein (K+). Kelompok perlakuan 2 (1,9 mg genistein/hari) dan perlakuan ke 3 (2,6 mg genistein/hari) menunjukkan ekspresi semakin tinggi. Kelompok perlakuan ke 4 (3,25 mg genistein/hari) terjadi penurunan ekspresi Bax. Dosis genistein 2,60 mg/hari adalah dosis dengan ekspresi Bax maksimal, kemudian terjadi penurunan ekspresi Bax bila dosis dinaikkan menjadi 3,25 mg genistein/hari yang setara dengan 1250 mg genistein per hari pada manusia.

Vaclav V., 2016 *et al.*, mekanisme apoptosis pada endometriosis belum sepenuhnya dapat dimengerti mekanisme molekulernya. Apoptosis terkait dengan proses homeostasis imun di dalam lingkungan peritoneum. Hubungan antara makrofag dan sel endometriosis didalam lingkungan peritoneum sangat kompleks, dan terkait dengan progresifitas endometriosis, tampilan klinik endometriosis dan keluhan endometriosis. Meskipun 90 persen wanita mengalami aliran balik darah haid setiap bulannya, namun tidak semuanya mengalami endometriosis. Diyakini ada perubahan lingkungan mikro di dalam peritoneum sehingga pada wanita tertentu mudah terjadi endometriosis bila didapatkan aliran balik darah haid. Pada kondisi normal, sel-sel endometrium yang mengalami aliran balik ke dalam peritoneum akan dimusnahkan oleh sel-sel fagosit dan sel NK, namun bila sel-sel ini mengalami malfungsi makan sel endometrium tersebut akan berkembang menjadi endometriosis. Mekanisme apoptosis mempunyai peranan yang besar pada tahap berikutnya, melalui mekanisme kerja molekul BAX. Semakin tinggi ekspresi BAX dalam membran sel mitokondria, akan mengubah rasio terhadap BCL2 sehingga membuat sel bergeser menuju rentan apoptosis.

Sutrisno *et al.* (2014), pada penelitian pada kultur sel endometriosis yang diberi intervensi dengan genistein, ternyata genistein dapat meningkatkan ekspresi protein BAX. Peningkatan protein BAX akan diikuti dengan peningkatan apoptosis kultur sel endometriosis dibandingkan dengan kultur sel yang didapatkan ekspresi BAX yang lebih rendah.

Admir Agic *et al.*, (2009) menyatakan bahwa apoptosis merupakan fenomena penting terkait progresifitas endometriosis. Ada jalur tertentu terkait dengan keseimbangan antara BCL-2 dan BAX dalam aktifasi sinyal apoptosis.

Sementara Agarwal N *et al.*, (2010), menyatakan banyak protein yang terlibat dalam aktifasi proses apoptosis. Sinyal dari luar sel maupun dari dalam sel mempunyai jalur untuk mengaktifasi tahapan reaksi apoptosis. Obat-obatan tertentu (sitostatika, antibiotika, dll) dapat berfungsi sebagai *ligand* kematian yang ketika berikatan dengan reseptor kematian akan menyebabkan terinisiasinya kaskade reaksi apoptosis. Sementara itu bahan- bahan yang bisa mengganggu keseimbangan antara BCL-2 dan BAX di membrane sel akan menyebabkan kerusakan dinding mitokondria dan menyebabkan aktifasi kaskade reaksi apoptosis dengan hasil kematian sel. Genistein merupakan bahan alami yang mampu menginisiasi jalur apoptosis melalui jalur tertentu.

Banerjee S *et al.*, (2008) menyatakan bahwa genistein mempunyai kemampuan menghentikan perkembangbiakan sel kanker melalui berbagai target molekuler. Dosis anti kanker tergantung kepada jenis sel kanker, organ dan lamanya paparan. Tiap organ dan jenis sel mempunyai kepekaan tersendiri

terhadap genistein. Cai Q *et al.*, (1996) menyatakan bahwa genistein mempunyai kemampuan sebagai antioksidan tetapi dalam dosis tinggi bersifat menyerupai oksidan dan mengaktifkan apoptosis, inilah yang menjadi dasar bahwa genistein adalah jenis SERM (selected estrogen receptor modulator) alami, dimana dosis tinggi mengaktifkan apoptosis.

6.2.2 Pengaruh genistein terhadap ekspresi BCL-2

Bila dilakukan analisis secara cermat, terlihat bahwa rata-rata ekspresi BCL-2 meningkat pada kelompok perlakuan pemberian genistein P1, P3, dan P4.

Secara statistik, terbukti bahwa peningkatan signifikan ekspresi BCL-2 terjadi pada pemberian genistein dengan dosis 1,30 mg/hari (P1), 2,6 mg/hari (P3) dan 3,25 mg/hari (P4). Hal ini sangat menarik mengapa pada kelompok P2 (1,90 mg/hr) tidak terjadi peningkatan ekspresi BCL-2. Penelitian pada kultur sel endometriosis, Sutrisno *et al.*, (2014) mendapatkan hasil bahwa dosis genistein menampakkan pengaruh yang berbeda terhadap parameter sel apoptosis dan pengaruhnya spesifik untuk tiap dosis dan efeknya tidak bisa ditebak secara asumsi, melainkan dengan dilakukan uji coba dengan dosis yang diinginkan. Hal ini dijelaskan dengan karakter genistein sebagai SERM.

Chaoqun W *et al.*, (2015), BCL-2 memodulasi jalur intrinsik proses apoptosis dengan cara menghambat terbukanya permeabilitas pori mitokondria sehingga mencegah keluarnya sitokrom C dari mitokondria. Bila membrane sel mitokondria terbuka, maka sitokrom C akan terlepas, kemudian bergabung dengan *protease activating factor 1* dan mengaktifkan procaspase-9, kemudian deretan reaksi berikutnya adalah aktifasi procaspase-3 dan mengaktifkan apoptosis. Pada manusia, BCL-2 pada endometrium berfungsi mencegah apoptosis pada fase proliferasi. Pada endometriosis juga didapatkan peningkatan yang signifikan ekspresi BCL-2 dibanding dengan endometrium normal. Namun peranan BCL-2 dalam endometriosis juga masih belum bisa dijelaskan dengan baik mengingat pada endometriosis proses apoptosis juga ada yang meningkat.

Pada pemberian genistein, dimana genistein mempunyai fungsi sebagai molekul proapoptosis, faktanya terjadi peningkatan ekspresi BCL-2, yang bisa diartikan sebagai antiapoptosis. Penjelasan yang rasional adalah bahwa parameter

prediktor apoptosis bukan saja BAX atau BCL-2 secara tunggal, tetapi melalui rasio kedua molekul tersebut.

Sutrisno *et al.*, 2014, pada penelitian kultur sel endometriosis didapatkan bahwa genistein dosis rendah mampu menekan proliferasi sel endometriosis dalam kultur. Semakin tinggi kadar genistein yang diberikan akan semakin kuat menekan ekspresi BCL2. Hal ini memberikan bukti bahwa genistein mempunyai kapabilitas meningkatkan apoptosis melalui penekanan ekspresi BCL2. Dari studi ini dibuktikan bahwa peningkatan ekspresi BCL-2 secara signifikan terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dosis 1,30 mg/hari (P1) dan 2,6 mg/hari (P3). Pada histogram rata-rata ekspresi BCL-2 semua kelompok kontrol dan perlakuan, pada kelompok K+, terlihat bahwa rata-rata ekspresi BCL-2 meningkat pada kelompok perlakuan pemberian genistein P1, P3, dan P4. Secara statistik, terbukti bahwa peningkatan signifikan ekspresi BCL-2 terjadi pada pemberian genistein dengan dosis 1,30 mg/hari (P1) dan 2,6 mg/hari (P3). Karakter dasar genistein adalah SERM, sehingga efek terhadap jaringan target tergantung pada dosis, lama ekspose dan waktu pemberian. Dosis 2,6 mg/hari menampakkan ekspresi BCL2 yang tertinggi disbanding dengan dosis lainnya.

Vetvicka V *et al.*, 2016, menyatakan bahwa dalam konteks endometriosis, pertumbuhan sel-sel endometriosis di lingkungan peritoneum difasilitasi oleh adanya abnormal sel-sel imun di dalam peritoneum, dimana terjadi "immunoescaping" dari sel endometriosis karena ketidakmampuan sel imun melakukan aksi yang normal terhadap sel endometriosis. Keseimbangan BCL 2 dan BAX adalah kunci kearah mana mekanisme apoptosis akan berjalan, karena keseimbangan BAX dan BCL2 merupakan kunci dimulainya kaskade reaksi apoptosis. Tampak bahwa pada dosis tertinggi (P4), genistein menyebabkan penurunan ekspresi BCL-2 sehingga menyebabkan meningkatnya kecenderungan ke arah apoptosis. Fenomena ini memberikan bukti bahwa setiap

dosis genistein mempunyai efek yang berbeda terhadap endometriosis. Dosis yang tinggi menyebabkan sel-sel endometriosis cenderung bergerak ke arah apoptosis. Karakter ini merupakan ciri khas molekul genistein sebagai SERM.

6.2.3 Pengaruh genistein terhadap ekspresi PCNA

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$).

Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian genistein terhadap ekspresi PCNA. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi PCNA akibat pemberian genistein dengan dosis yang berbeda. Dari pengujian ini dibuktikan bahwa peningkatan ekspresi PCNA secara signifikan terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dosis 1,30 mg/hari (P1), 1,95 mg/hari (P2), dan 2,6 mg/hari (P3). ditunjukkan histogram rata-rata ekspresi PCNA semua kelompok kontrol dan perlakuan. Genistein berikatan dengan reseptor estrogen dan bertindak sebagai stimulator dan menyebabkan peningkatan faktor-faktor transkripsi dan hasil akhirnya stimulasi terhadap proliferasi sel. Soares SR *et al.* (2012) menyatakan bahwa kaskade proses inflamasi yang menjadi dasar patomekanisme endometriosis diawali dengan aktivasi reseptor estrogen, berlanjut kepada stimulasi faktor-faktor transkripsi termasuk interleukin proinflamasi dengan hasil akhir proliferasi sel endometriosis, yang tercermin dari meningkatnya ekspresi PCN.

Pada kelompok perlakuan ke empat (Genistein 3,25 mg/hari) mampu menekan ekspresi PCNA, dan secara statistik berbeda bermakna dengan kelompok P1, P2 dan P3. Wegrzyn G *et al.* (2010) membuktikan bahwa genistein mempunyai kemampuan menghambat progresifitas proliferasi sel endometriosis, karena endometriosis mempunyai latar belakang yang kuat peranan genetik

pada patofisiologinya. Wingfield M. *et al.* (1995), membuktikan bahwa sel endometriosis mempunyai kemampuan untuk berproliferasi secara lebih cepat daripada sel endometrium alami, sehingga hormon estrogen akan memicu proliferasi sel endometriosis. Genistein mempunyai bentuk molekul yang menyerupai estrogen sehingga mampu berikatan dengan reseptor estrogen dan menstimuli proliferasi sel endometriosis. Hal ini tampak pada kelompok P1, P2 dan P3. Sedangkan kelompok P4 menampakkan ekspresi PCNA yang rendah karena genistein dosis tinggi mempunyai karakter antiestrogen sehingga menurunkan fungsi estrogen sebagai stimulator.

Yavuz E1. *et al.*, (2007) membuktikan bahwa genestein dosis tinggi menyebabkan regresi sel endometriosis. Genistein adalah SERM alami dimana karakter efeknya terhadap target organ (endmetriosis) tergantung pada dosis, lamanya paparan dan jenis jaringan/organ. Pada kelompok P4 ternyata dengan dosis 3,25 mg/hari setara dengan 1250 mg genistein pada manusia ternyata mampu bersifat antiestrogen sehingga menekan proliferasi sel endometriosis dengan. Karakter SERM inilah yang memberikan penjelasan mengapa dengan dosis tinggi justru menekan ekspresi PCNA.

6.2.4 Pengaruh genistein terhadap ekspresi NFkB

Berdasarkan pada hasil uji Dunnet T3 5 %, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa pada kelompok P2 dan P3 didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) yang menunjukkan terjadinya peningkatan ekspresi NFkB secara signifikan.

Sedangkan pada kelompok P1 dan P4 didapatkan p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Dari pengujian ini dibuktikan bahwa peningkatan ekspresi NFkB secara signifikan terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dosis 1,95 mg/hari (P2) dan 2,6 mg/hari (P3). Pada perbandingan antar kelompok perlakuan,

ditunjukkan bahwa pada perbandingan antara P1 dengan P2 dan P1 dengan P4 didapatkan p-value lebih dari 0,05 ($p > 0.05$). Rata-rata ekspresi NFkB pada kelompok pemberian genistein 1,30 mg/hari (P1), 1,95 mg/hari (P2) dan 3,25 mg/hari (P4) tidak berbeda signifikan. Pada Gambar 29 ditunjukkan histogram rata-rata ekspresi NFkB semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok K+, terlihat bahwa rata-rata ekspresi NFkB meningkat pada kelompok perlakuan pemberian genistein P1, P2 dan P3. Secara statistik, terbukti bahwa peningkatan signifikan ekspresi NFkB terjadi pada pemberian genistein dengan dosis 1,95 mg/hari (P2) dan 2,6 mg/hari (P3).

Bianco B. *et al.*, (2012). Didalam penelitiannya pada endometriosis mendapatkan hasil bahwa telah terjadi mutase insersi/delesi ATTG pada promotor grn NFkB1 dan terkait erat dengan tingkat keparahan dari endometriosis dan infertilitas. Shukla V *et al.*, (2015), dalam penelitiannya pada kultur sel endometrium yang mengalami hiperplasia (suatu kondisi yang menyerupai endometriosis / kanker endometrium) mendapatkan hasil bahwa genistein mampu menghambat pertumbuhan sel-sel endometrium melalui penghambatan terhadap EGFR dan menurunkan ekspresi PI3K/Akt dan NFkB, genistein meningkatkan apoptosis pada sel endometrium melalui jalur intrinsik. Genistein juga menurunkan ekspresi NFkB dan mempengaruhi kerja protein p53 yang pada akhirnya berpengaruh pada peningkatan apoptosis sel endometrium. Pada studi ini nampak bahwa pada kelompok perlakuan 4 (P4) terjadi penurunan secara konsisten ekspresi NFkB. Dosis genistein 3,25 mg/hari secara konsisten menurunkan ekspresi NFkB.

Sutrisno *et al.*, (2017), data penelitian pada tikus model endometriosis dengan pemberian genistein berbagai dosis dengan dosis dibawah 1,3 mg/hari, menunjukkan bahwa genistein berpengaruh terhadap ekspresi NFkB, namun pengaruhnya masih tidak konsisten dan tidak memberikan prediksi untuk dosis-

dosis yang lebih tinggi. Pada penelitian ini dengan dinaikkan dosisnya, ternyata baru dosis 3,25 mg/hari secara konsisten menurunkan ekspresi NFkB pada tikus model endometriosis.

6.2.5 Pengaruh genistein terhadap ekspresi RE- α

Pada penelitian ini dieksplorasi efek pemberian genistein dosis tinggi terhadap ekspresi reseptor estrogen alfa karena karakteristik dasar dari estrogen alfa (RE- α) adalah efek stimulasi. Perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa peningkatan ekspresi RE- α secara signifikan ditunjukkan pada kelompok perlakuan P2 dan P3. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok perlakuan P2 dan P3 lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol positif. Dari pengujian ini dibuktikan bahwa peningkatan ekspresi RE- α secara signifikan terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dosis 1,95 mg/hari (P2) dan 2,6 mg/hari (P3). Pada perbandingan antar kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa pada semua kelompok perlakuan memiliki p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) yang menunjukkan adanya perbedaan ekspresi RE- α antar kelompok perlakuan pemberian genistein. Pada dosis yang tertinggi (P4) dengan genistein dosis 3,25 mg/hari didapatkan efek yang berbeda dimana terjadi penurunan yang lebih rendah dari control positif. Hal ini bermakna bahwa dengan dosis 3,25 mg/hari adalah dosis yang secara konsisten menurunkan ekspresi reseptor estrogen alfa.

Sutrisno *et al.*, 2014, pada penelitian kultur sel endometriosis, mendapatkan hasil bahwa genistein mampu menurunkan proliferasi kultur sel endometriosis dengan cara menurunkan ekspresi reseptor estrogen alfa (RE- α) dan beta (RE- β). Penurunan konsisten untuk setiap dosisnya sehingga sebagai konklusinya genistein menekan ekspresi RE- α pada studi *in vitro*. Pada penelitian

ini dengan menggunakan tikus model endometriosis (*invivo*) ternyata sampai

dosis 2,6 mg/hari masih menunjukkan peningkatan ekspresi RE- α , sehingga masih menampakkan efek stimulasi. Khairiyah R *et al.*, 2014, penelitian kultur sel endometriosis yang terpapar genistein, juga mendapatkan hasil yang serupa. Pada penelitian ini, ketika dosis diberikan sebesar 3,25 mg/hari (P4), terlihat secara konsisten menurunkan ekspresi RE- α , dan penurunan ekspresi RE- α akan diikuti dengan penurunan proliferasi sel endometriosis. Dapat disimpulkan bahwa dengan dosis 3,25 mg/hari genistein mampu menurunkan ekspresi RE- α pada tikus model endometriosis.

Controneo MS *et al.*, (2001). Mendapatkan hasil yang berbeda antar pemberian genistein melalui jalur injeksi dan jalur oral. Dengan menggunakan dosis rendah yang diberikan pada tikus yang telah diimplan jaringan endometriosis, ternyata pemberian secara injeksi justru terjadi pertumbuhan implan endometriosis sedangkan pemberian secara oral menyebabkan tidak tumbuhnya atau regresi implan endometriosis. Pemberian secara oral adalah rute alami untuk obat dan nutrisi sehingga makanan yang mengandung genistein tinggi (golongan kacang-kacangan) akan sangat bermanfaat bila diberikan melalui rute oral.

Yavuz E1. *et al.*, (2007) membuktikan bahwa genestein dosis tinggi menyebabkan regresi sel endometriosis. Genistein adalah SERM alami dimana karakter efeknya terhadap target organ (endometriosis) tergantung pada dosis, lamanya paparan dan jenis jaringan/organ. Pada kelompok P4 ternyata dengan dosis 3,25 mg/hari setara dengan 1250 mg genistein pada manusia ternyata mampu bersifat antiestrogen sehingga menekan proliferasi sel endometriosis dengan. Karakter SERM inilah yang memberikan penjelasan mengapa dengan dosis tinggi justru menekan ekspresi RE- α .

6.2.6 Pengaruh genistein terhadap ekspresi RE- β

Pada penelitian ini dari hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) yang berarti terdapat pengaruh yang signifikan pemberian genistein terhadap ekspresi RE- β atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi RE- β akibat pemberian genistein dengan dosis yang berbeda. Pada histogram rata-rata ekspresi RE- β semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok K+, terlihat bahwa rata-rata ekspresi RE- β meningkat pada semua kelompok perlakuan pemberian genistein. Tampak bahwa sampai dengan dosis 2,6 mg/hari (P3) terjadi peningkatan ekspresi RE- β , namun ketika dosisnya ditingkatkan lagi mencapai 3,25 mg/hari (P4) terjadi penurunan ekspresi RE- β yang bermakna secara statistik dengan kelompok lainnya. Penurunan ini secara konsisten terjadi juga pada variabel lainnya sehingga dengan dosis 3,25 mg/hari, genistein mampu menekan ekspresi RE- β dan berakibat penurunan proliferasi dan peningkatan apoptosis sel endometriosis.

Secara normal hormon estrogen mengaktifasi reseptor estrogen alfa dan beta di inti sel dan berikatan dengan estrogen responsive elements (EREs) dan akan menginisiasi respon berikutnya. Estrogen selain bekerja secara genomik, bisa juga bekerja secara non genomik sehingga responnya bisa sangat cepat atau jangka lama. Endometriosis dan kanker endometrium adalah kelainan yang sangat bergantung penuh kepada kerja hormon estrogen, sehingga regulasi hormon estrogen akan berpengaruh pada kedua penyakit tersebut (Dogan S. *et al*, 2016). Khairiah R *et al.*, 2014 juga mendapatkan yang serupa dalam studinya pada kultur sel endometriosis, dimana pemberian genistein pada kultur sel endometriosis menyebabkan penurunan ekspresi RE- β .

Sutrisno *et al.*, 2014. Dalam studinya di kultur sel endometriosis, dengan pemberian genistein ternyata terjadi penurunan ekspresi RE- α dan RE- β dan

disertai peningkatan apoptosis. Disimpulkan bahwa perubahan ekspresi kedua reseptor estrogen tersebut terkait erat dengan peningkatan apoptosis. Pada penelitian ini didapatkan pola yang berbeda dimana didapatkan peningkatan ekspresi reseptor estrogen, dan ketika dosis sudah tinggi baru terjadi efek yang sebaliknya. Genistein termasuk golongan SERM dan afinitasnya lebih tinggi pada RE- β . RE- β di level molekuler mempunyai fungsi meregulasi RE- α dan berakibat menekan fungsi aktivasi RE- α . Pada studi ini hasilnya konsisten dimana pemberian genistein mampu meregulasi apoptosis dan proliferasi progresifitas endometriosis pada tikus model endometriosis.

Pada studi pada tikus model endometriosis yang diberikan genistein dosis rendah, Sutrisno *et. al.*, 2015, mendapatkan hasil adanya peningkatan ekspresi RE- β yang secara konsisten menurun dengan kenaikan dosis, namun tetap diatas normal. Pada penelitian ini penurunan secara bermakna terjadi ketika dosis mencapai 3,25 mg/ hari (P4). Dosis ini adalah dosis tinggi, pada manusia jika dikonversikan akan mencapai sekitar 1250 mg per hari. Genistein diketahui mempunyai efek menekan ketika dosisnya mencapai dosis tinggi, mengingat secara molekuler harus bersaing dengan hormon estrogen endogen yang mempunyai afinitas jauh lebih tinggi terhadap resepto estrogen baik alfa maupun beta.

Yavuz E1. *et al.*, (2007) membuktikan bahwa genestein dosis tinggi menyebabkan regresi sel endometriosis. Genistein adalah SERM alami dimana karakter efeknya terhadap target organ (endometriosis) tergantung pada dosis, lamanya paparan dan jenis jaringan/organ. Pada kelompok P4 ternyata dengan dosis 3,25 mg/hari setara dengan 1250 mg genistein pada manusia ternyata mampu bersifat antiestrogen sehingga menekan proliferasi sel endometriosis dengan. Karakter SERM inilah yang memberikan penjelasan mengapa dengan dosis tinggi justru menekan ekspresi RE- β

6.2.7 Pengaruh genistein terhadap rasio BAX/BCL2

Data dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian genistein terhadap rasio BAX/BCL-2. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan rasio BAX/BCL-2 akibat pemberian genistein dengan dosis yang berbeda. Peningkatan rasio BAX/BCL-2 secara signifikan ditunjukkan pada kelompok perlakuan P2, P3, dan P4. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok perlakuan P2, P3, dan P4 lebih tinggi dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif. Pada histogram rata-rata rasio BAX/BCL-2 semua kelompok kontrol dan perlakuan tampak meningkat dengan perlakuan pemberian genistein. Secara statistik, terbukti bahwa peningkatan signifikan rasio BAX/BCL-2 terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dengan dosis 1,95 mg/hari (P2), 2,6 mg/hari (P3) dan 3,25 mg/hari (P4). Terlihat bahwa peningkatan dosis genistein disertai peningkatan rasio BAX/BCL-2 secara konsisten tinggi dan relatif meningkat. Hal ini berbeda bila yang dilihat hanya dari pola BAX saja atau BCL-2 saja. Rasio BAX/BCL-2 lebih konsisten menggambarkan efek pemberian genistein terhadap apoptosis.

Sutrisno *et al.*, 2014 mendapatkan hasil bahwa ekspresi BAX seirama dengan apoptosis, yaitu peningkatan ekspresi BAX disertai peningkatan apoptosis. Studi tersebut di kerjakan pada kultur sel endometriosis (invitro) dengan variabel lingkungan yang bisa dikontrol dengan baik, sangat berbeda bila studi dilakukan *invivo*, dimana variasi antar individu sangat besar. Pada studi *invivo* ini ternyata rasio BAX/BCL-2 lebih konsisten dengan dosis, dimana peningkatan dosis diikuti rasio BAX/BCL-2 yang tinggi secara konsisten. Rasio BAX/BCL-2 merupakan variabel yang terbukti secara konsisten melihat efek genistein terhadap variabel apoptosis dibandingkan BAX atau BCL-2 secara sendiri-sendiri.

Geotakis *et al.*, 2016 menyatakan bahwa rasio BAX/BCL-2 yang tinggi merupakan prediktor prognostik yang baik pada kanker laring, ditandai dengan umur harapan hidup yang lebih panjang, periode bebas kanker yang lebih lama. Rasio BAX/BCL-2 menjadi variabel yang baik untuk dijadikan faktor prediktor prognostik untuk keganasan. Sharawat *et al.*, 2013, studi pada kanker darah pada anak, didapatkan konklusi bahwa rasio BAX/BCL-2 yang tinggi terkait erat dengan tingginya tingkat apoptosis sel kanker. Pada penelitian ini dengan menggunakan rasio BAX/BCL-2 ternyata lebih konsisten tinggi, baik pada kelompok P1 sd P4, dan tidak tergantung pada proporsi ekspresi BAX dan BCL-2 tiap kelompoknya. Maka dengan demikian penggunaan rasio BAX/BCL-2 pada endometriosis, menjadi variabel yang lebih baik dan bernilai prognostik untuk progresifitas endometriosis.

Stefanie Staar *et al.*, (2005) menyatakan bahwa genistein dan daidzein mempunyai pengaruh terhadap ekspresi ER- α dan ER- β mRNA dengan menstimuli kaskade reaksi seluler dengan hasil akhir proliferasi, dan hal ini yang mendasari fenomena meningkatnya proliferasi sel endometriosis. Namun dosis tinggi ternyata bersifat antiproliferasi dengan menstimuli proses apoptosis sel endometriosis, dan ini yang menyebabkan meningkatnya ekspresi BAX. Genistein sebagai SERM alami telah terbukti di banyak penelitian-penelitian para ahli.

6.2.8 Pengaruh genistein terhadap rasio RE- α /RE- β

Studi ini menunjukkan bahwa terjadi penurunan rasio RE- α /RE- β secara signifikan. Sedangkan pada P2 dan P3 didapatkan p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Dari pengujian ini dibuktikan bahwa penurunan rasio RE- α /RE- β secara signifikan terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dosis 1,3 mg/hari (P1) dan 3,25 mg/hari (P4). Histogram rata-rata rasio RE- α /RE- β terlihat bahwa

rata-rata rasio RE- α /RE- β menurun pada kelompok perlakuan pemberian genistein P1, P2, dan P4. Penurunan rasio RE- α /RE- β berarti terjadi kenaikan ekspresi yang lebih tinggi ekspresi RE- β daripada RE- α sehingga efek RE- β lebih dominan dalam meregulasi efek RE- α , dan hasil akhirnya inhibisi efek RE- α . Bila dalam satu sel / jaringan terdapat ekspresi RE- α dan RE- β secara bersamaan, maka RE- β berfungsi menginhibisi kerja RE- α . Inhibisi RE- α sangat penting untuk menurunkan laju proliferasi sel endometriosis.

Sutrisno *et al.*, 2015 mendapatkan hasil bahwa peningkatan ekspresi RE- β terkait dengan penurunan kondisi inflamasi (TNF- α) sel endometriosis yang diberi genistein. Penurunan variabel inflamasi ini akan disertai penurunan proliferasi sel endometriosis dan peningkatan apoptosis. Minutolo F *et al.*, (2011) menyatakan bahwa RE- β merupakan target terapi yang prospektif ke depan mengingat akan semakin banyak penyakit yang inisiasi RE- α . Manipulasi RE- β akan menjadi alternatif terapi endometriosis, kanker uteri dan lain-lainnya.

Khairiyah R. *et al.*, 2014. Pada studinya di kultur sel endometriosis menunjukkan bahwa ekspresi RE- α /RE- β menurun dengan peningkatan pemberian genestein. Namun pada studi ini terjadi peningkatan secara konsisten rasio RE- α /RE- β dan menunjukkan bahwa ekspresi RE- β secara konsisten tetap tinggi, sehingga ketika dilakukan analisis rasio terlihat lebih konsisten dalam level tinggi, tidak seperti bila dianalisis secara sendiri-sendiri RE- α atau RE- β .

Helguero LA *et al.*, menyatakan bahwa RE- β menjadi regulator RE- α sehingga selama ada RE- β maka efek proliferasi RE- α dapat diimbangi dan dikendalikan. Sehingga rasio RE- α /RE- β menjadi lebih sensitif untuk menjadi prediktor terhadap apoptosis pada keganasan payudara (cell line). Lin KH *et al.*, 2017 dalam penelitiannya pada jantung menyatakan bahwa rasio RE- α /RE- β terkait dengan tingkat apoptosis sel-sel jantung dan ekspresi yang tinggi dari rasio RE- α /RE- β berkorelasi dengan tingginya apoptosis pada sel-sel otot

jantung. Agic A. *Et al.*, 2009, dalam studinya mendapatkan data bahwa keseimbangan RE- α dan RE- β merupakan kunci terjadinya apoptosis pada endometriosis. Rasio RE- α /RE- β akan berpengaruh pada ekspresi BAX dan ekspresi BAX tinggi akan menggeser menuju apoptosis dan mempunyai nilai prognostik pada perbaikan progresifitas endometriosis. Pada penelitian ini, bila dibandingkan dengan ekspresi RE- α dan RE- β secara sendiri-sendiri terlihat naik turun dengan pola yang tidak teratur, namun bila dilihat dari rasio RE- α /RE- β sebagai satu-kesatuan, maka hasilnya konsisten untuk tiap kelompok dan pada kelompok ke 4 (P4) terlihat penurunan yang bermakna secara statistik. Rasio yang stabil menjadikan rasio RE- α /RE- β bisa menjadi parameter yang baik untuk melihat progresifitas endometriosis. Rasio yang rendah menunjukkan bahwa ekspresi RE- β lebih dominan dan efek supresi proliferasi sel dan progresifitas endometriosis akan menurun. Rasio RE- α /RE- β bisa dijadikan parameter yang baik untuk melihat efek obat / genistein terhadap endometriosis.

6.2.9 Analisis jalur

Analisa jalur digunakan untuk melihat bagaimana kekuatan hubungan antar variable. Variabel bebasnya adalah genistein berbagai dosis dan variable tergantungnya adalah ekspresi PCNA dan rasio BAX/BCL2, dengan variabel interveningnya rasio RE- α /RE- β dan Ekspresi NF κ B. Secara konseptual, proses pengujian ini dilakukan untuk menguji pengaruh pemberian genistein terhadap Ekspresi PCNA (yang mencerminkan tingkat proliferasi sel endometriosis) dan Rasio BAX/BCL-2 (yang mencerminkan tingkat apoptosis) dengan melalui Rasio RE- α /RE- β dan Ekspresi NF κ B. Hasil perhitungan memperlihatkan nilai *predictive-relevance* (Q^2) sebesar 0.638 atau 63.8%. Nilai *predictive relevance* sebesar 63.8% mengindikasikan bahwa keragaman data yang dapat dijelaskan

oleh model tersebut adalah sebesar 63.8% atau dengan kata lain informasi yang terkandung dalam data 63.8% dapat dijelaskan oleh model tersebut, sedangkan sisanya (37,2 %) disebabkan oleh mekanisme diluar model tersebut. Burney RO *et al.*, 2012 menjelaskan dengan baik berbagai patogenesis dari endometriosis dimana terjadinya endometriosis tidak bisa secara keseluruhan dijelaskan dengan 1 teori saja. Apek genetik, imunologi, lingkungan, racun dioxin, regurgitasi, inflamasi, kecenderungan keluarga, dan lain-lainnya saling berinteraksi secara kompleks. Penyederhanaan dengan desain dalam penelitian ini cukup wajar bila mencakup sekitar 63 persen pola relasi pathogenesis endometriosis, sedangkan 37 persennya oleh peran serta di luar variabel dalam studi ini.

6.2.9.1 Pengujian Pengaruh Langsung Genistein terhadap Rasio RE- α / RE- β

Pengujian pengaruh langsung genistein terhadap Rasio RE- α /RE- β , didapatkan koefisien jalur sebesar -0.253 dengan p-value sebesar 0.032. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh langsung pemberian genistein terhadap rasio RE- α /RE- β . Koefisien jalur bernilai negatif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh negatif terhadap rasio RE- α /RE- β . Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap penurunan rasio RE- α /RE- β . Semakin tinggi dosis genistein yang diberikan akan diikuti penurunan rasio RE- α /RE- β . Mengandung makna adanya peningkatan ekspresi RE- β bila dosis genistein ditingkatkan dosisnya.

Distribusi RE- α dan RE- β diketahui spesifik untuk tiap organ. RE- α diketahui banyak ditemukan di uterus, payudara, sel teka di ovarium, endotel, liver, prostat, kelenjar hipofisis dan bagian tertentu dari otak. Sedangkan RE- β diketahui tereksresi cukup tinggi di bagian tertentu di otak, paru, kolon dan sel

granulosa di ovarium. Perbandingan jumlah RE- α dan RE- β di tiap organ memiliki efek tertentu di organ tersebut. Genistein diketahui mempunyai afinitas yang lebih tinggi terhadap RE- β daripada terhadap RE- α . Stimulasi terhadap RE- β akan berakibat inhibisi terhadap RE- α (Minutolo F., 2011)

6.2.9.2 Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Ekspresi NFkB melalui Rasio RE- α /RE- β

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh tak langsung genistein terhadap ekspresi NFkB melalui Rasio RE- α /RE- β , didapatkan koefisien jalur sebesar -0.108 dengan p-value sebesar 0.049. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap ekspresi NFkB melalui rasio RE- α /RE- β . Koefisien jalur bernilai negatif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh negatif terhadap ekspresi NFkB. Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap penurunan rasio RE- α /RE- β dan secara tidak langsung akan berdampak pada penurunan ekspresi NFkB.

Soares, 2012, menyatakan bahwa NFkB adalah suatu jenis faktor transkripsi yang memegang peranan penting dalam proliferasi sel endometriosis. Aktifasi RE- α akan menyebabkan sel endometriosis terstimulasi dan akan terjadi proliferasi. Genistein mengubah rasio RE- α /RE- β dan menekan ekspresi NFkB, dan pada akhirnya menekan proliferasi sel endometriosis

6.2.9.3 Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Ekspresi PCNA melalui Rasio RE- α /RE- β dan Ekspresi NFkB

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh tak langsung genistein terhadap ekspresi PCNA melalui Rasio ekspresi RE- α /RE- β dan NFkB,

didapatkan koefisien jalur sebesar -0.051 dengan p-value sebesar 0.184. P-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$) membuktikan bahwa tidak terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap ekspresi PCNA dengan melalui rasio RE- α /RE- β dan Ekspresi NFkB.

PCNA merupakan sebuah protein yang diekspresikan oleh sel yang sedang mengalami proliferasi. Semakin tinggi proliferasi sel nya semakin tinggi ekspresinya. Nagendraprabhu P. (2009), dalam studinya pada kanker kolon yang diberi astasantin, mendapatkan hasil bahwa astasantin mampu menekan proliferasi sel-sel kanker kolon dengan menurunkan ekspresi PCNA. Pada studi ini tidak didapatkan pengaruh tak langsung genistein terhadap ekspresi PCNA.

Terlihat bahwa ekspresi PCNA lebih dipengaruhi oleh peran NFkB yang berfungsi sebagai faktor transkripsi. Genistein mengubah rasio RE- α /RE- β dan menekan ekspresi NFkB. NFkB yang menurun akan diikuti oleh menurunnya proliferasi sel endometriosis dengan diikuti oleh membaiknya tampilan klinis dari endometriosis.

6.2.9.4 Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Rasio BAX/BCL-2 melalui Rasio RE- α /RE- β dan Ekspresi NFkB

Berdasarkan pada hasil pengujian pengaruh tak langsung genistein terhadap rasio BAX/BCL-2 melalui Rasio RE- α /RE- β Ekspresi dan NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar -0.054 dengan p-value sebesar 0.094. P-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$) membuktikan bahwa tidak terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap rasio BAX/BCL-2 dengan melalui rasio RE- α /RE- β dan Ekspresi NFkB.

Vinothini G. et al., 2008 dalam penelitiannya pada sel-sel kanker kelenjar payudara didapatkan fakta adanya korelasi yang terbalik antara ekspresi RE- α , NFkB dengan ekspresi BAX dan berbanding lurus dengan ekspresi BCL-2.

Peneliti tersebut menyimpulkan bahwa ada jalur transkripsi yang jelas antara RE- α , NFkB, BAX, BCL-2 dan apoptosis. Pada penelitian ini didapatkan hubungan yang jelas antara rasio RE- α /RE- β dan NFkB dengan rasio BAX/BCL-2, sedangkan jalur genistein terhadap rasio BAX/BCL-2 didapatkan angka yang tidak bermakna secara statistik. Hal ini bisa diartikan bahwa genistein tidak bekerja langsung terhadap rasio BAX/BCL-2, tetapi bekerja melalui rasio RE- α /RE- β dan NFkB terlebih dahulu. Debatin KM. *et al.*, 2004 menyatakan hal yang serupa bahwa BAX dan BCL-2 merupakan protein kunci dalam proses apoptosis sel-sel kanker. Jumlah BAX dan BCL-2 menentukan prognostic dari kanker yang bersangkutan. Terdapat jalur tertentu yang berpengaruh pada ekspresi akhir dari BAX dan BCL-2.

6.2.9.5 Pengujian Pengaruh Langsung Rasio RE- α /RE- β terhadap Ekspresi NFkB

Uji pengaruh langsung Rasio RE- α /RE- β terhadap Ekspresi NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.426 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh langsung Rasio RE- α /RE- β terhadap Ekspresi NFkB. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa peningkatan yang terjadi pada Rasio RE- α /RE- β berpengaruh terhadap peningkatan Ekspresi NFkB. Peningkatan ekspresi RE- α tanpa diikuti peningkatan RE- β akan meningkatkan ekspresi NFkB, demikian juga sebaliknya. Genistein diketahui mempunyai afinitas yang lebih tinggi terhadap RE- β , sehingga peningkatan ekspresi RE- β akan diikuti penurunan NFkB. Genistein mempunyai peran menekan factor transkripsi NFkB melalui perubahan rasio RE- α /RE- β dengan menggeser ke arah dominasi RE- β .

Bulun SE *et al.*, 2010, menyatakan hal yang serupa RE- α dan RE- β mempunyai peran yang sangat menentukan dalam terapi endometriosis. Rasio

RE- α /RE- β berpengaruh pada resistensi terhadap progesteron. Ekspresi RE- β yang tinggi mempunyai prognosis yang baik dalam terapi endometriosis. Pada penelitian ini pemberian genistein menekan rasio RE- α /RE- β dengan menggeser kearah dominasi RE- β , sehingga menekan ekspresi NF κ B, yang mempunyai peran stimulasi terhadap proliferasi sel endometriosis. Secara umum diketahui bahwa tingkat keparahan klinis dari endometriosis tergantung kepada tingkat proliferasi sel endometriosis, makin tinggi proliferasi, makin tinggi gradasi endometriosisnya dan makin tinggi skor keparahan secara klinik. Kemampuan genistein menekan NF κ B melalui penurunan rasio RE- α /RE- β , akan menurunkan gradasi klinik dari endometriosis.

6.2.9.6 Pengujian Pengaruh Tak Langsung Rasio RE- α /RE- β terhadap Ekspresi PCNA melalui Ekspresi NF κ B

Pengujian statistik membuktikan bahwa pengaruh rasio RE- α /RE- β terhadap Ekspresi PCNA dengan melalui Ekspresi NF κ B, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.318 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung signifikan rasio RE- α /RE- β terhadap Ekspresi PCNA dengan melalui Ekspresi NF κ B. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa peningkatan yang terjadi pada rasio RE- α /RE- β berpengaruh terhadap peningkatan Ekspresi NF κ B dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan Ekspresi PCNA. PCNA adalah marker dari proliferasi sel. Semakin tinggi PCNA semakin tinggi tingkat proliferasi sel.

Zhdanov AV., 2003, dalam studinya terhadap kasus hiperplasia endometrium, dimana kondisi ini mempunyai kemiripan yang tinggi dengan endometriosis, mendapatkan hasil adanya penurunan tingkat hiperplasia sel endometrium seiring penurunan faktor transkripsi, yang ditandai dengan

rendahnya ekspresi PCNA. NFkB adalah salah satu faktor transkripsi yang poten sehingga penurunan NFkB akan menekan laju proliferasi sel. Dominasi RE- β akan menekan ekspresi NFkB dan akan menekan proliferasi sel. Hal ini seirama dengan data yang didapatkan dalam penelitian ini, dimana terdapat pengaruh positif tak langsung antara rasio RE- α /RE- β dengan ekspresi PCNA. Secara klinis genistein akan menurunkan ekspresi PCNA melalui penekanan ekspresi NFkB dengan melalui dominasi ekspresi RE- β .

6.2.9.7 Pengujian Pengaruh Tak Langsung Rasio RE- α /RE- β terhadap Rasio BAX/BCL-2 melalui Ekspresi NFkB

Hasil pengujian statistic pengaruh tak langsung rasio RE- α /RE- β terhadap rasio BAX/BCL-2 dengan melalui Ekspresi NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.050 dengan p-value sebesar 0.474. P-value lebih dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa tidak terdapat pengaruh tak langsung Rasio RE- α /RE- β terhadap rasio BAX/BCL-2 dengan melalui Ekspresi NFkB. Rasio BAX/BCL-2 tidak terkait dengan rasio RE- α /RE- β melalui NFkB. Tingkat ekspresi NFkB tidak menentukan rasio BAX/BCL-2, mengingat efek keduanya berlainan arah. Ada mekanisme lain atau melalui jalur lain bagaimana ekspresi RE- α dan RE- β berpengaruh terhadap rasio BAX/BCL-2 (apoptosis).

Colleti D. *et al.*, 2002. Mendapatkan hasil yang serupa dalam studinya bahwa adanya penurunan atau peningkatan ekspresi NFkB tidak berpengaruh pada ekspresi dan rasio BAX/BCL-2 dan apoptosis. Peneliti menyimpulkan adanya jalur transkripsi/inhibisi lain yang berpengaruh terhadap ekspresi rasio BAX dan BCL-2 bila dilakukan manipulasi terhadap faktor-faktor transkripsi.

Genistein pada satu sisi megubah rasio RE- α /RE- β dengan dominasi RE- β , sehingga pada tahap berikutnya akan menekan NFkB. Sebagai faktor transkripsi NFkB akan menstimulasi proliferasi sel dan lainnya. Namun bila dikaitkan dengan

apoptosis maka peran NFKB berada pada sisi yang berlawanan. RE- β akan menggunakan jalur lain untuk berperan pada apoptosis, antara lain lewat ligan kematian, dimana berkurangnya faktor transkripsi (dalam hal ini hormone estrogen / genistein yang bersifat antiestrogenik) menjadi pemicu apoptosis.

Bila dilakukan analisis secara terpisah terhadap pengaruh reseptor estrogen α , maka didapatkan hasil sebagai berikut :

6.2.9.8 Pengujian Pengaruh Langsung Genistein terhadap Ekspresi RE- α

Hasil pengujian mengenai pengaruh langsung genistein terhadap ekspresi RE- α , didapatkan koefisien jalur sebesar 0.281 dengan p-value sebesar 0.010. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh langsung pemberian genistein terhadap ekspresi RE- α yang signifikan secara statistik. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh positif terhadap ekspresi RE- α . Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap peningkatan ekspresi RE- α . Pemberian genistein dengan dosis yang lebih tinggi akan meningkatkan ekspresi RE- α , namun peningkatannya tidak terlalu tinggi, terlihat dari koefisien jalur sebesar 0,281. Ekspresi RE- α secara tunggal mencerminkan telah terjadinya stimulasi dari reseptor estrogen sehingga akan mengaktifkan jalur sinyal estrogen.

Siti Rosmani *et al.*, 2013, menunjukkan bahwa pemberian genistein berpengaruh langsung terhadap ekspresi RE- α dan menimbulkan efek sesuai dengan organ yang mengekspresikan RE- α tersebut. Hal ini membuktikan bahwa genistein mampu bekerja secara langsung terhadap RE- α dan efeknya sesuai dengan sifat RE- α yaitu stimulasi. Namun bila RE- α ada bersama dengan RE- β maka hasil akhirnya tergantung resultante peran dari kedua reseptor estrogen

tersebut, mengingat bila RE- α ada bersama dengan RE- β , maka RE- β merupakan inhibitor dari RE- α .

6.2.9.9 Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Ekspresi NFkB melalui Ekspresi RE- α

Bila dilakukan pengujian mengenai pengaruh tak langsung genistein terhadap ekspresi NFkB melalui Ekspresi RE- α , didapatkan koefisien jalur sebesar 0.255 dengan p-value sebesar 0.011. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap ekspresi NFkB melalui ekspresi RE- α . Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh positif terhadap ekspresi NFkB. Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap peningkatan ekspresi RE- α dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan ekspresi NFkB. Hal ini konsisten dengan peran RE- α sebagai stimulator NFkB. Peningkatan peran RE- α akan diikuti peningkatan NFkB karena karakternya adalah sama, yaitu sebagai faktor transkripsi.

Soares *et al.*, 2012 membuktikan secara skematik bahwa peningkatan peran hormon estrogen pada endometriosis diperantarai RE- α . Peningkatan RE- α akan diikuti peningkatan faktor – faktor transkripsi, antara lain NFkB, interleukin pro inflamasi dan lainnya. Genistein berperan stimulasi pada RE- α namun tingkat stimulasinya lebih rendah dari RE- β , sehingga efek RE- β lebih menonjol.

6.2.9.10 Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Ekspresi PCNA melalui Ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB

Analisis statistik pengaruh tak langsung genistein terhadap ekspresi PCNA melalui Ekspresi RE- α Ekspresi dan NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.191 dengan p-value sebesar 0.021. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$)

membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap ekspresi PCNA dengan melalui ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh positif terhadap ekspresi PCNA. Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap peningkatan ekspresi RE- α dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan ekspresi NFkB dan ekspresi PCNA. RE- α bersifat stimulasi, dan efek stimulasinya melalui RE- α , NFkB dan PCNA. Peningkatan genistein akan menstimulasi RE- α , selanjutnya akan menstimulasi NFkB dan pada akhirnya menstimulasi PCNA. Namun terlihat bahwa efek stimulasinya masih dalam level rendah, mengingat genistein lebih tinggi afinitasnya terhadap RE- β .

Sourial ST.,(2014) Menyatakan bahwa dalam pathogenesis endometriosis, RE- α mempunyai peran yang sangat signifikan mengingat RE- α berperan sebagai jalur stimulasi yang diperankan hormon estrogen. Bahan-bahan yang menyerupai hormon estrogen bila berikatan dengan RE- α akan menjadi stimulator jalur reaksi yang diperantarai RE- α . Genestein mampu berikatan dengan RE- α , sehingga fungsi stimulatornya akan berfungsi dengan baik. Dalam penelitian ini fungsi stimulasi melalui RE- α meskipun positif namun masih rendah bila dibandingkan dengan RE- β , sehingga hasil akhirnya bukan stimulasi tetapi represi.

6.2.9.11 Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Rasio BAX/BCL-2 melalui Ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB

Uji statistik mengenai pengaruh tak langsung genistein terhadap rasio BAX/BCL-2 melalui Ekspresi RE- α Ekspresi dan NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.082 dengan p-value sebesar 0.047. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung pemberian

genistein terhadap rasio BAX/BCL-2 dengan melalui ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh positif terhadap rasio BAX/BCL-2. Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap peningkatan ekspresi RE- α dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan ekspresi NFkB dan rasio BAX/BCL-2. Data ini konsisten dengan temuan-temuan sebelumnya bila melalui jalur RE- α , maka karakter genistein adalah positif sebagai stimulator. Pada kasus ini rasio BAX/BCL-2 mengalami peningkatan karena dengan melalui RE- α , genistein berfungsi sebagai antiapoptosis.

Soares SR *et al.*, 2012. Menyatakan hal serupa bahwa genistein merupakan bahan alami yang mempunyai karakter SERM, sehingga pola kerjanya tergantung dosis, organ dan lama ekspose. Efek terhadap organ tidak bisa diprediksi dari hanya sekedar analisa statistic dari riset sebelumnya, sehingga perlu dicoba satu persatu untuk setiap dosisnya terhadap organ target. Penelitian yang dilakukan Sutrisno *et al*, 2015, mendapatkan hasil bahwa ekspresi sitokin proinflamasi sangat variabel terhadap dosis, dan garis korelasinya tidak lurus, sehingga meskipun efeknya secara keseluruhan bersifat menekan inflamasi namun untuk tiap dosisnya berbeda-beda polanya (Sutrisno, 2015)

6.2.9.12 Pengujian Pengaruh Tak Langsung Ekspresi RE- α terhadap Ekspresi PCNA melalui Ekspresi NFkB

Pengujian statistik mengenai ekspresi RE- α terhadap Ekspresi PCNA dengan melalui Ekspresi NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.422 dengan p-value sebesar 0.043. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung signifikan Ekspresi RE- α terhadap Ekspresi PCNA dengan melalui Ekspresi NFkB. Koefisien jalur bernilai positif

mengindikasikan bahwa peningkatan yang terjadi pada Ekspresi RE- α berpengaruh terhadap peningkatan Ekspresi NFkB dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan Ekspresi PCNA. Hasil ini konsisten bahwa melalui RE- α , genistein bersifat stimulasi, baik terhadap NFkB maupun PCNA, baik secara langsung maupun tak langsung. Dampak dari mekanisme ini adalah bila hanya melalui RE- α saja, maka genistein bersifat stimulator murni dan akan memperberat endometriosis karena sel-sel endometriosis akan mengalami peningkatan proliferasi dan gradasi klinisnya akan meningkat.

6.2.9.13 Pengujian Pengaruh Tak Langsung Ekspresi RE- α terhadap Rasio BAX/BCL-2 melalui Ekspresi NFkB

Pengujian statistik mengenai pengaruh tak langsung Ekspresi RE- α terhadap Rasio BAX/BCL-2 dengan melalui Ekspresi NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar -0.392 dengan p-value sebesar 0.150. P-value lebih dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa tidak terdapat pengaruh tak langsung ekspresi RE- α terhadap Rasio BAX/BCL-2 dengan melalui Ekspresi NFkB. NFkB dengan apoptosis berada pada posisi yang berlawanan, semakin tinggi NFkB akan semakin rendah apoptosis yang terjadi, demikian juga sebaliknya. Pada penelitian ini didapatkan nilai negatif namun angka yang ada tidak bermakna secara statistik. Hal ini menjadi fenomena menarik dan menyisakan tanda tanya yang memerlukan penelitian lebih lanjut bagaimana peran genistein terhadap apoptosis, apakah memerlukan peran RE- α dan NFkB atau tidak.

Kuiper GG *et al.*, 1997 menyatakan bahwa setiap bahan kimia yang menyerupai molekul estrogen memiliki afinitas yang berbeda-beda terhadap reseptor estrogen alfa dan beta. Genistein mampu berikatan baik terhadap reseptor estrogen alfa maupun beta, namun ikatan terhadap beta jauh lebih kuat terhadap beta, namun efeknya terhadap jaringan sangat bervariasi tergantung

kepada dosis, jenis organ dan lamanya paparan. Ikatan langsung terhadap reseptor estrogen alfa maupun beta tidak berpengaruh langsung terhadap apoptosis karena pada dasarnya hormone estrogen adalah stimulator. Sedangkan hasil akhir dari aktifitas reseptor estrogen alfa dan beta ditentukan oleh rasio RE- α /RE- β .

6.2.9.14 Pengujian Pengaruh Langsung Genistein terhadap Ekspresi RE- β

Bila dilakukan analisis mengenai pengaruh langsung genistein terhadap Ekspresi RE- β , didapatkan koefisien jalur sebesar 0.538 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh langsung pemberian genistein terhadap ekspresi RE- β . Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh positif terhadap ekspresi RE- β . Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap peningkatan ekspresi RE- β . Genistein bersifat estrogenik baik terhadap reseptor estrogen alfa maupun beta secara individual. Sehingga bila dilihat dari aspek reseptor estrogen beta saja, maka genistein bersifat estrogenik (stimulator).

Sutrisno *et al.*, 2015, dalam penelitian dengan genistein dengan dosis yang lebih rendah pada mencit model endometriosis, juga mendapatkan data yang konsisten bahwa genistein bersifat stimulasi terhadap reseptor estrogen beta sehingga terjadi respon berupa peningkatan ekspresinya bila diberikan genistein berbagai dosis. Karakter reseptor estrogen memang unik karena saat suatu organ/jaringan hanya terdapat reseptor estrogen beta saja, maka responnya adalah estrogenik, namun bila ada bersama reseptor estrogen alfa, maka sifat reseptor estrogen beta adalah antiestrogenik.

6.2.9.15 Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Ekspresi NFkB melalui Ekspresi RE- β

Uji statistik terhadap pengaruh tak langsung genistein terhadap ekspresi NFkB melalui Ekspresi RE- β , didapatkan koefisien jalur sebesar 0.455 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap ekspresi NFkB melalui ekspresi RE- β . Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh positif terhadap ekspresi NFkB. Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap peningkatan ekspresi RE- β dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan ekspresi NFkB. Hal ini konsisten terhadap temuan sebelumnya bahwa melalui jalur reseptor estrogen beta, genistein bersifat estrogenik dan menstimulasi NFkB. Sifat yang sama juga ditemukan bila melalui reseptor estrogen alfa.

Jean-Christophe Lousse *et al.*, 2008, mendapatkan data bahwa terjadi peningkatan ekspresi NFkB pada makrofag yang diisolasi dari peritoneum penderita endometriosis dan berbeda secara bermakna jika dibandingkan dengan yang bukan penderita endometriosis. Kemudian disimpulkan bahwa endometriosis mempunyai karakter spesifik dimana peningkatan ekspresi NFkB terjadi secara bermakna dan terkait dengan perjalanan penyakitnya. Pada penelitian ini, secara statistik peran reseptor estrogen beta adalah stimulasi terhadap faktor-faktor transkripsi lainnya, termasuk NFkB.

6.2.9.16 Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Ekspresi PCNA melalui Ekspresi RE- β dan Ekspresi NFkB

Uji statistik terhadap pengaruh tak langsung genistein terhadap ekspresi PCNA melalui Ekspresi RE- β Ekspresi dan NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.386 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$)

membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap ekspresi PCNA dengan melalui ekspresi RE- β dan Ekspresi NFkB. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh positif terhadap ekspresi PCNA. Peningkatan dosis genistein, berdampak secara langsung terhadap peningkatan ekspresi RE- β dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan ekspresi NFkB dan ekspresi PCNA. Temuan ini konsisten dengan temuan pengaruh genistein bila melalui reseptor estrogen alfa. Demikian juga, konsisten bila dievaluasi terhadap jalur NFkB.

Brante P Sampey *et al.*, 2011, dalam risetnya mendapatkan hal yang berbeda dimana pada kultur sel endometrium, genestein secara tunggal menghambat proliferasi sel endometrium dan dicurigai pengaruhnya melalui reseptor estrogen beta. Namun pada penelitiannya tidak dilakukan analisis terhadap rasio reseptor estrogen alfa dan beta. Pada penelitian ini terlihat lebih jelas bahwa efek positif stimulasi proliferasi sel (PCNA) terjadi melalui NFkB dan reseptor estrogen beta. Perbedaan ini terjadi karena obyek penelitiannya berbeda dan analisisnya juga berbeda.

6.2.9.17 Pengujian Pengaruh Tak Langsung Genistein terhadap Rasio BAX/BCL-2 melalui Ekspresi RE- β dan Ekspresi NFkB

Analisis statistik terhadap pengaruh tak langsung genistein terhadap rasio BAX/BCL-2 melalui Ekspresi RE- β dan NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar 0,120 dengan p-value sebesar 0.041. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$)

membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung pemberian genistein terhadap rasio BAX/BCL-2 dengan melalui ekspresi RE- β dan Ekspresi NFkB. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa pemberian genistein berpengaruh positif terhadap rasio BAX/BCL-2. Peningkatan dosis genistein,

berdampak secara langsung terhadap peningkatan ekspresi RE- β dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan ekspresi NFkB dan rasio BAX/BCL-2. Koefisien yang kecil menunjukkan.

Mohamed Laban *et al.*, 2015, mendapatkan data bahwa BCL-2 berperan penting dalam progresifitas hiperplasia pada endometrium, sehingga terkait dengan stimulasi awal dari kanker endometrium. Kanker endometrium mempunyai kemiripan dengan endometriosis, berasal dari sel yang sama dengan karakter proliferasi yang tidak terbatas, infiltrasi, namun tidak metastase bila pada endometriosis. Sedangkan kanker endometrium bersifat infiltrative, metastase, destruktif dan mematikan. Reseptor estrogen beta merupakan awal proses signaling yang disebabkan oleh genistein, sehingga bila dilihat melalui reseptor estrogen beta saja, genistein berpengaruh positif terhadap NFkB dan BCL-2.

6.2.9.18 Pengujian Pengaruh Langsung Ekspresi RE- β terhadap Ekspresi NFkB

Uji statistik mengenai pengaruh langsung ekspresi RE- β terhadap Ekspresi NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.846 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh langsung Ekspresi RE- β terhadap Ekspresi NFkB. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa peningkatan yang terjadi pada Ekspresi RE- β berpengaruh terhadap peningkatan Ekspresi NFkB. Koefisien jalur juga besar menunjukkan pengaruhnya kuat. NFkB akan terstimulasi oleh genistein melalui reseptor estrogen beta. Pada kasus endometriosis fenomena ini tidak menguntungkan, namun pada kasus menopause hal ini menguntungkan. Fakta ini menunjukkan bahwa genistein sangat situasional pengaruhnya terhadap organ manusia, tergantung pada ada tidaknya hormon estrogen endogen dan keberadaan reseptor estrogen alfa.

Luisa A Helguero *et al.*, 2005, reseptor estrogen alfa dan beta mempunyai efek yang berbeda terhadap proliferasi jaringan sel *line*. Reseptor estrogen alfa cenderung proliferaatif dan reseptor estrogen beta cenderung nonproliferaatif. Hal ini mendukung/sesuai dengan hasil penelitian ini, dimana secara individual bersifat stimulasi namun bila bersama-sama, reseptor estrogen beta bersifat antiproliferasi. Pada penelitian dengan kondisi endometriosis, NFkB merupakan faktor transkripsi yang aktif dalam proses proliferasi sel, sehingga tereksprese dalam kadar yang tinggi baik intranuklear atau intrasitoplasma. Soares SR., 2012, menyatakan bahwa NFkB merupakan faktor transkripsi utama yang berperan penting pada proliferasi sel-sel endometriosis.

6.2.9.19 Pengujian Pengaruh Tak Langsung Ekspresi RE- β terhadap Ekspresi PCNA melalui Ekspresi NFkB

Uji statistik mengenai pengaruh tak langsung Ekspresi RE- β terhadap Ekspresi PCNA dengan melalui Ekspresi NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar 0.271 dengan p-value sebesar 0.033. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa terdapat pengaruh tak langsung signifikan Ekspresi RE- β terhadap Ekspresi PCNA dengan melalui Ekspresi NFkB. Koefisien jalur bernilai positif mengindikasikan bahwa peningkatan yang terjadi pada Ekspresi RE- β berpengaruh terhadap peningkatan Ekspresi NFkB dan secara tidak langsung akan berdampak pada peningkatan Ekspresi PCNA. Koefisien jalur bernilai kecil menunjukkan masih ada faktor lain yang menentukan selain NFkB. Sedangkan dosis menentukan pengaruhnya, dimana semakin tinggi dosisnya maka efeknya terhadap NFkB dan PCNA semakin kuat. Pada sisi ini terlihat bahwa genistein juga meningkatkan proliferasi sel endometriosis bila hanya reseptor estrogen beta saja yang bekerja.

Gui Hua Sha *et al.*, 2008, mendapatkan data bahwa genistein menghambat proliferasi sel endometrium pada kultur sel epitel endometrium.

Studi invitro ini menunjukkan bahwa tanpa pengaruh variabel lainnya, tidak seperti dalam studi invivo, terlihat bahwa genistein bersifat inhibisi terhadap proliferasi sel (PCNA). Temuan yang bertentangan ini merupakan pekerjaan rumah yang perlu dibuktikan dalam penelitian-penelitian lebih lanjut.

6.2.9.20 Pengujian Pengaruh Tak Langsung Ekspresi RE- β terhadap Rasio BAX/BCL-2 melalui Ekspresi NFkB

Uji statistik terhadap pengaruh tak langsung ekspresi RE- β terhadap Rasio BAX/BCL-2 dengan melalui Ekspresi NFkB, didapatkan koefisien jalur sebesar -0.001 dengan p-value sebesar 0.996. P-value lebih dari 0.05 ($p < 0.05$) membuktikan bahwa tidak terdapat pengaruh tak langsung Ekspresi RE- β terhadap Rasio BAX/BCL-2 dengan melalui Ekspresi NFkB. Hubungan antara NFkB dengan kecenderungan apoptosis berada dalam posisi yang berlawanan, karena NFkB bersifat antiapoptosis. Pada studi ini terlihat bahwa keberadaan jalur NFkB dan kecenderungan apoptosis tidak terbukti keberadaannya.

Vaclav vetvicka *et al.*, 2016, mendapatkan data bahwa telah terjadi kekacauan sistim imun dalam peritoneum penderita dengan endometriosis. Kekacauan imun ini menyebabkan ketidakmampuan tubuh untuk menyingkirkan sel-sel endometrium yang masuk ke dalam peritoneum dalam proses mentruasi rutin. Sel-sel imun yang seharusnya menyingkirkan benda asing justru mensekresi dan menstimuli keluarnya faktor transkripsi, terutama NFkB, dengan akibat meningkatnya proliferasi sel endometriosis. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan dosis genisteinakan meningkatkan NFkB namun tidak berpengaruh pada apoptosis, dalam arti lain, apoptosis melewati jalur yang berbeda.

6.2.9.21 Korelasi antar berbagai variable pengamatan

Uji korelasi antara dosis genistein dengan ekspresi BAX, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.523 dengan p-value sebesar 0.000. p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi BAX. Koefisien korelasi bernilai positif menggambarkan arah hubungan positif. Artinya, peningkatan dosis genistein yang diberikan, akan diikuti pula peningkatan pada ekspresi BAX. Angka korelasi sebesar 0,523 menunjukkan hubungan yang cukup kuat. Genistein melalui ikatan dengan reseptor estrogen alfa dan beta mampu menstimuli ekspresi BAX. BAX berperan serta dalam proses apoptosis. Semakin tinggi BAX semakin besar kemungkinan apoptosis. Peran BAX dalam apoptosis tidak tunggal tetapi terkait dengan BCL-2.

Hasil uji korelasi antara dosis genistein dengan ekspresi BCL-2, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.351 dengan p-value sebesar 0.012. p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi BCL-2. Koefisien korelasi bernilai positif menggambarkan arah hubungan positif. Artinya, peningkatan dosis genistein yang diberikan, akan diikuti pula peningkatan pada ekspresi BCL-2. Koefisien korelasi dengan BCL-2 lebih rendah daripada BAX. Dengan pendekatan rasio menunjukkan kecenderungan membesarnya pembilang (BAX) sehingga akan semakin besar kemungkinan kearah apoptosis. Genestein mempunyai kecenderungan proapoptosis bila diberikan dalam dosis yang tinggi dan bekerja melalui reseptor estrogen beta.

Uji korelasi antara dosis genistein dengan ekspresi PCNA, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.438 dengan p-value sebesar 0.001. P-value kurang

dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi PCNA. Koefisien korelasi bernilai positif menggambarkan arah hubungan positif. Artinya, peningkatan dosis genistein yang diberikan, akan diikuti pula peningkatan pada ekspresi PCNA. Reseptor estrogen alfa bersifat stimulasi dan proliferasi sehingga bisa dimengerti dengan baik bila genistein bersifat proliferasi bila bekerja melalui ikatan dengan reseptor estrogen alfa. Namun bila didapatkan reseptor estrogen alfa dan beta ada bersamaan dalam satu organ, maka aktifitas reseptor estrogen beta adalah inhibisi terhadap reseptor estrogen alfa.

Pada hasil pengujian korelasi antara dosis genistein dengan ekspresi NFkB, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.189 dengan p-value sebesar 0.188. P-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$) menunjukkan tidak terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi NFkB. Fakta ini menarik karena dosis genistein tidak seirama dengan ekspresi NFkB. Karakter genistein sebagai SERM bisa menjelaskan hal ini, yaitu respon genistein sangat berbeda tergantung pada organ, dosis, lama pemberian dan kondisi kadar estrogen endogen. Bila didapatkan kadar estrogen endogen tinggi, maka genistein bersifat antiestrogen, tetapi bila kadar estrogen endogen rendah, maka genistein bertindak sebagai estrogen (Akiyama *T et al.*, 1987)

Pada hasil pengujian korelasi antara dosis genistein dengan ekspresi RE- α , didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.194 dengan p-value sebesar 0.176. P-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$) menunjukkan tidak terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi RE- α . Data ini khas untuk karakter SERM yaitu peningkatan dosis responnya berbeda-beda. Yang paling ideal adalah dilakukan penelitian respon genistein untuk tiap organnya, sehingga diketahui dengan pasti bagaimana respon organ tersebut bila terpapar genistein berbagai dosis dan berbagai durasi waktu (Khairiyah R *et al.*, 2014)

Hasil uji korelasi antara dosis genisten dengan ekspresi RE- β , didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.605 dengan p-value sebesar 0.000. p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi RE- β . Koefisien korelasi bernilai positif menggambarkan arah hubungan positif. Artinya, peningkatan dosis genistein yang diberikan, akan diikuti pula peningkatan pada ekspresi RE- β . Kuiper GG *et al.*, 1997 dan Kuiper GG *et al.*, 1998, dalam penelitiannya mendapatkan data bahwa afinitas genistein terhadap reseptor estrogen beta lebih tinggi daripada terhadap reseptor estrogen alfa, dimana terhadap beta sebesar 85% bila dibandingkan dengan estrogen endogen. Genistein lebih erat terikat dengan reseptor estrogen beta sehingga efek reseptor estrogen beta lebih dominan.

Hasil uji korelasi antara dosis genisten dengan rasio BAX/BCL-2, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0.357 dengan p-value sebesar 0.011. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan rasio BAX/BCL-2. Koefisien korelasi bernilai positif menggambarkan arah hubungan positif. Artinya, peningkatan dosis genistein yang diberikan, akan diikuti pula peningkatan pada rasio BAX/BCL-2. Temuan ini konsisten dengan ekspresi estrogen reseptor beta dimana semakin tinggi aktifitas genistein melalui reseptor estrogen beta, maka aktifitas proapoptosisnya lebih menonjol sehingga rasio BAX dan BCL-2 akan semakin membesar (Sutrisno *et al.*, 2014b)

Pada hasil pengujian korelasi antara dosis genistein dengan rasio RE- α /RE- β , didapatkan koefisien korelasi sebesar -0.312 dengan p-value sebesar 0.027. P-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan rasio RE- α /RE- β . Koefisien korelasi bernilai negatif menggambarkan arah hubungan negatif. Artinya, peningkatan dosis genistein yang diberikan, akan diikuti penurunan rasio RE- α /RE- β . Fakta ini

konsisten bahwa genistein berikatan lebih dominan dengan reseptor estrogen beta. Semakin tinggi kadar genistein akan semakin tinggi ekspresi reseptor estrogen beta, sehingga rasionya dengan reseptor estrogen alfa akan menurun. Semakin besar kadar genistein semakin rendah rasionya dan efek inhibisinya makin dominan (Kuiper GG *et al.*, 19980).



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

Penelitian tahap 1:

1. Asal jaringan implan endometriosis terbukti berbeda secara signifikan pengaruhnya dalam hal luas lesi endometriosis, gambaran histologi sel radang dan granuloma, ekspresi ER α , ekspresi ER β dan ekspresi RP pada mencit model endometriosis.
2. Implan jaringan adenomiosis terbukti merupakan metode terbaik untuk membuat mencit model endometriosis

Penelitian tahap 2:

1. Genistein dosis 3,25 mg/hari terbukti signifikan menurunkan ekspresi PCNA (proliferasi sel).
2. Genistein berbagai dosis terbukti berpengaruh secara signifikan terhadap rasio RE- α /RE- β . Semakin tinggi dosis genistein diberikan akan terjadi penurunan rasio RE- α /RE- β .
3. Genistein dosis 3,25 mg/hari terbukti secara signifikan menurunkan ekspresi NF κ B.
4. Genistein berbagai dosis terbukti menurunkan ekspresi PCNA melalui penurunan rasio RE- α /RE- β .
5. Genistein berbagai dosis terbukti bermakna menurunkan ekspresi PCNA melalui rasio RE- α /RE- β dan NF κ B.
6. Genistein dosis 1,95 mg/hari dan 2,6 mg/hari meningkatkan rasio BAX/BCL-2 (apoptosis).

7. Genistein berbagai dosis terbukti tidak bermakna pengaruhnya terhadap rasio BAX/BCL-2 melalui rasio RE- α /RE- β .

8. Genistein berbagai dosis terbukti tidak bermakna pengaruhnya terhadap rasio BAX/BCL-2 melalui NF κ B.

7.2. Saran

1. Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menilai pengaruh pemberian genistein terhadap berbagai faktor yang memiliki pengaruh terhadap lesi endometriosis, terutama melalui berbagai jalur signal yang berpengaruh terhadap proliferasi dan apoptosis sel seperti thyrosine kinase, topoisomerasi, berbagai petanda sel punca (*stem cell*), dan lain- lainnya.
2. Dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi peran genistein terhadap apoptosis melalui jalur yang berbeda
3. Dilakukan ujicoba genistein murni/alami pada manusia penderita endometriosis

DAFTAR PUSTAKA

Adlercreutz CH, Goldin BR, Gorbach SL, Hockerstedt KA, Watanabe S, Hamalainen EK, Markkanen MH, Makela TH, Wahala KT, Adlercreutz T. 1995. *Soybean phytoestrogen intake and cancer risk*. The Journal of Nutrition , 125(3 Suppl) : 757S-770S.

Admir A., Schima D., Klaus D. and Daniela H., 2009. Apoptosis in Endometriosis Gynecol Obstet Invest; 68:217–223

Agarwal N., Subramanian A. 2010. *Endometriosis-Morphology, Clinical Presentations and Molecular Pathology*. Journal of Laboratory Physicians , 2(1): 1-9.

Akali, KC., Gibori, G., Khan, SA. 2003. *The involvement of apoptotic regulators during in vitro decidualization*. Europe Journal Endocrinology , 149 : 69-75.

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y. 1987. *Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases*. Journal of Biological Chemistry , 262 (12): 5592-5595.

Alessandra B., Roberta G., Onofrio T., Daniela V., Daniele 'M., Domenico G., Domenica A., Herbert M., Elena B A., Piero A N., Rosario D'Anna, Francesco S., 2010. *Genistein aglycone: A New Therapeutic Approach To reduce Endometrial Hyperplasia*. Phytomedicine 17: 844-850

Amberkar M.V., Kumari M.K., Mor V., Semwal A., Adiga S. (2010.). *PPAR-gamma: a dagger in endometriosis*. Australian Medical Journal AMJ. , 12 (3) : 814-820.

Amelia SWN., Yueniwati Y., Sutrisno S. 2016. *The expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is affected by Hypoxia inducible factor-1a in peritoneal mice endometriosis treated with genistein*. Middle East Fertility Society Journal , 21: 180-183.

Andreas, S., Abraham, K., Appel, KE., Lampen, A. 2011. *Risks and benefits of dietary isoflavones for cancer*. Critical Reviews in Toxicology , 41, 463-506.

Andrisa, R. 2013. *Eksresi Ki-67, Reseptor Progesteron, Bcl-2, MDM-2, E-Kaderin, MMP-2, TIMP-2 dan Polimorfisme Gen mdm-2 SNP-309 Sebagai Prediktor Progresivitas Meningioma Orbita*. Medis Jurnal Indonesia , 22 (2) : 18-23.

Araki, K., Kawachi, N., Tanaka. (2008). *NF- κ B Signaling Pathway Inhibits Cell Cycle Progression by a Novel Rb Independent Suppressor System for*



- E2F Transcription Factor*. Departement of Molecular Oncology, Institute of Gerontology. Nippon Medical School, Kanagawa, Japan.
- Arimoto, T., Katagiri, T., Oda, K., Tsunoda T, Yasugi T, Osuga Y, Yoshikawa H, Nishii O, Yano T, Taketani Y, Nakamura, Y. (2003 Mar). *Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis*. *Journal of Oncology*, 22(3):551-60.
- Awwad J.T., R.A.Sayegh, X.J.Tao, T.Hassan, S.T.Awwad, K.Isaacson, 1999. *The SCID Mouse: an Experimental Model for Endometriosis*, *Human Reproduction Update*. 14 (12): 3107–3111.
- Baldi, A., Campioni, M., Signorile, P.G. 2008. *Endometriosis: Pathogenesis, Diagnosis, Therapy And Association With Cancer (Review)*. *Oncology Reports* , 19 : 843 – 846.
- Banerjee, S., Li, Y., Wang, Z. and Sarkar, F.H., . 2008. *Multi-target Therapy of Cancer by Genistein*. *Cancer Letters* , 269 (2) : 226-242.
- Barnes, S., Peterson, TG., Coward, L. 1995. *Rationale for the use genistein-containing soy matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer*. *J. Cell. Biochem* , 59 (22) : 181-187.
- Barrier, B. (2010). *Immunology Of Endometriosis*. *Clinical Obstetrics And Gynecology*, 53(2) : 397-402.
- Beliard, A., Noel, A., Foidart, JM. 2004. *Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis*. *Fertil Steril*, 82(1):80-5.
- Ben Izhak O, Bar-Chana M, Sussman L, Dobiner V, Sandbank J, Cagnano M, Cohen H, Sabo E. 2002. *Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma*. *Histopathology*, 41:519-525.
- Benagiano, G. 2006. *History of adenomyosis*. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, Vol. 20, No. 4, pp. 449-463.
- Benjamin C.Lin, Miyuki Suzawa, Raymond D. Blind, Sandra C. Tobias, Serdar E.Bulun, Thomas S.Scanlan, Holly A. Ingraham. 2009. *American Association for Cancer Research Journals*. 69(13): 5415-23
- Berridge, J. 2014. *Cell Cycle and Proliferation*. *Cell Signalling Biology*, Module 9, p.g1-g41. DOI: 10.1042/csb0001009.
- Brante P.Sampey, Terrence D.Lewis, Claire S.Barbier, Liza Makowski, David G. Kaufman. 2011. *Genistein Effects on Stromal Cells Determines Epithelial Proliferation in Endometrial Co-Cultures*. *Experimental and Molecular Pathology* ; 90(3): 257-263
- Braun, DP., Ding, J., Shaheen, F., Willey, JC., Rana, N., Dmowski, WP. 2007. *Quantitative expression of apoptosis-regulating genes in endometrium from women with and without endometriosis*. *Fertil Steril*, 87 : 263–268.

Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A., MacDonald-Bravo, H. 1987. *Cyclin/ PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta*. Nature, 326: 515-517.

Brown, D.C. and Gatter, K.C. 1990. *Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology*. Histopathology, 17: 489-503.

Brunelle JK. and Letai A. 2009. *Control of Mitochondrial Apoptosis by The Bcl-2 Family*. Journal of Cell Science, 122 : 437-441.

Bruner-Tran K.L, Eisenberg E., Yeaman G.R. 2002. *Steroid and Cytokine Regulation Of Matrix Metalloproteinase Expression In Endometriosis and the Establishment of Experimental Endometriosis in Nude Mice*. Journal Clinical Endocrinology Metabolism, 87: 4782-4791.

Bukulmez O., Hardy D.B., Bruce R., Carr R., Word R.A., Mendelson C.R. 2008. *Inflammatory Status Influences Aromatase and Steroid Receptor Expression in Endometriosis*. Endocrinology, 149 (3) : 1190-1204.

Bulun S.E., Monsavais D., Pavone M.E., Dyson M., Xue Q., Attar E., Tokunaga H., Su E.J.S. 2012. *Role of Estrogen Receptor- β in Endometriosis*. Semim Reprod Med, 30 (1) : 39-45.

Bulun, S.E., Monsavais, D., Pavone, M.E., Dyson, M., Xue, Q., Attar, E., Tokunaga, H., Su, E.J.S. 2012. *Role of Estrogen Receptor- β in Endometriosis*. Semim Reprod Med, 30 (1) : 39-45.

Bulun, SE., You-Hong Cheng, Pavone ME, Qing Xue, Erkut Attar, Elena, T., Tokunaga H., Hiroki U., Ping Y., Xia L., Zhihong L., Gonca I., Thung S., Julie J. 2010. *Estrogen Receptor- β , Estrogen Receptor- α , and Progesterone Resistance in Endometriosis*. Semin Rep Med, January; 28(1): 36–43. doi:10.1055/s-0029-1242991.

Burney RO, Giudice LC. (2012). *Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis*. Fertility and Sterility, p. 1-9.

Cai Q. and Wei H. (1996). *Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice*. J. Nutr. Cancer , 25, 1.

Cano A., Garcia-perez M.A., Tarin J.J. (2010). *Isoflavon and Cardiovascular disease*. Maturitas , 67:210-216.

Chang, E. C. (2008). *Estrogen Receptors alfa dan beta as Determinants of Gene Expression: Influence of Ligand, Dose and Chromatin Binding*. Molecular Endocrinology, 22 (5) : 1032-1043.

Chao, DT. and Korsmeyer, SJ. 1998. *BCL-2 family: regulators of cell death*. Annu Rev Immunol, 16:395-419.

Chaoqun W., Aihong J., Wenqing H., Lai L T., Zhiming C., Xiaping Z., Hao C., and Hsiao C C., 2015. *Up-regulation of Bcl-2 by CD147 Through ERK Activation Results in Abnormal Cell Survival in Human Endometriosis*. J Clin Endocrinol Metab 100: E955–E965

Chatsri D., Sutthasinee P., 2013. *Activation of Chloride Secretion by Isoflavone Genistein in Endometrial Epithelial Cells*. *Cellular Physiology Biochemistry Journal* ; 32: 1473-1486

Chattopadhyay, M., Kodela, R., Nath, N., Barsegian, A., Boring, D., Kashfi, K. 2012. *Hydrogen Sulfide- Releasing Aspirin Suppresses NFkB Signaling in Estrogen Receptor Negative Breast Cancer Cells in Vitro and in Vivo*. *Biochemical Pharmacology* , 83:723-732.

Coletti D., Yang E., Marazzi G., Sassoon D., 2002. *TNF[alpha] inhibits skeletal myogenesis through a PW1-dependent*. *EMBO Journal*; Feb 15; 21, 4; ProQuest pg. 631

Constantinou A. and Huberman E. 1995. *Genistein as an inducer of tumor cell differentiation: possible mechanisms of action*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* , 208, 109.

Controneo MS., Lamartiniere CA., 2001. *Pharmacologic, but not dietary Genistein support endometriosis in a rat model*. *Toxicology Science* 61, 68-75

Cummings A.M. and Metcalf J.L. 1995. *Induction of endometriosis in mice: a new model sensitive to estrogen*. *Reprod Toxicol* , 9: 233-238.

Cummings A.M. and Metcalf J.L. 1996. *Effect of surgically induced endometriosis on pregnancy and effect of pregnancy and lactation on endometriosis in mice*. *Proc Soc Exp Biol Med* , 212: 332-337.

Cummings AM, M. J. 1995. *Induction of Endometriosis in Mice: a New Model Sensitive to Estrogen*. *Reproduction Toxicology*, 9: 233-238.

D'Hooghe TM, Hill JA. 2002. *Endometriosis* in. *Dalam B. JS, Novak's Gynecology Thirteenth edition* (hal. 931-959). Baltimore: Williams & Wilkins.

Debatin KM., *Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy*, 2004. *Cancer Immunol Immunother*: 53; 153-159

Dechering, K., Boersma, C., Mosselman, S. 2000. *Estrogen receptors alpha and beta : two receptors of a kind?* *Current Med Chem* , 7 : 561-576.

Dmowski W.P. and Braun D.P. 2004. *Immunology of endometriosis*. In *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* (pp. 18; 245-263).

Dmowski WP, Gebel H, Braun DP. 1998. *Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage mediated cytotoxicity of endometrial cells in endometriosis*. *Hum Reprod Update*, 4(5):696-701.

Dmowski, WP., Ding, J., Shen, J., Rana, N., Fernandez, BB., Braun, DP. 2001. *Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis*. *Hum Reprod*, 16(9):1802-8.

Dogan S., Simsek T., 2016. *Possible relationship between endocrine disrupting chemicals and hormone dependent gynecologic cancer*. Medical Hypotheses 92 : 84-87

Dufournet C, Uzan C, Fauvet R, Cortez A, Siffroi JP, Daraï E. 2006. *Expression of apoptosis-related proteins in peritoneal, ovarian and colorectal endometriosis*. J Reprod Immunol , 70(1-2):151-62. Epub 2005 Dec 27.

Dunnihoo, Dale R. 1992. *Endometriosis and Adenomyosis*. Dalam *Fundamentals of Gynecology and Obstetrics, 2nd edition*. JP Lippincott Co.

Eggermont J, D. J.-R. 2005. *Time course of pelvic endometriotic lesion revascularization in a nude mouse model*. Fertil Steril , 84: 492-499.

Emrah Y., Mesut O., Ibrahim E., Serap AT., and Hulusi B. Z., 2007. *Genistein causes regression of Endometriotic Implants in The Rat Model*. American Society For Reproductive Medicine ; 88(Suppl 2): 1129-34

Erickson, G. 1997. *Defining apoptosis: Players and systems*. J Soc Gynecol Investig , 4 : 219-28.

Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., Hunt, T. 1983. *Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division*. Cell , 33: 389.

Fabio P., Paola V., Massimo C., Luigi F., 2013. *Diet and Endometriosis Risk*. A Literature Review; 26, 323-336

Farrell E. and Garad R. 2012. *Endometriosis*. Australian Nursing Journal, 20 (5) : 37-39.

Fausto, N. 2006. *Cell Injury Cell Death*. Washington.

Fauvet, R., Poncelet, C., Hugol, D., Lavaur, A., Feldmann, G., Daraï, E. 2003. *Expression of apoptosis-related proteins in endometriomas and benign and malignant ovarian tumours*. Virchows Arch , 443(1) : 38-43. Epub 2003 May 20.

Foley, J., Ton, T., Maronpot, R., Butterworth, B., Goldsworthy, T.L. 1993. *Comparison of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating hepatocytes in rats*. Environmental Health Perspectives , 101 (Suppl 5): 199-206.

Friedlander, R. 2003. *Mechanisme of programmed cell death in apoptosis and caspase in neurodegenerative disease*. N Engl J Med , 348 : 1365-75.

Fujino, K., Ueda, M., Takehara, M., Futakuchi, H., Kanda, K., Yamashita, Y., Terai, Y., Ueki, M. 2006. *Transcriptional expression of survivin and its splice variants in endometriosis*. Mol Hum Reprod , 12 : 383-388.

Gail B, Mahady. 2005. *Do Soy Isoflavones Cause Endometrial Hyperplasia?*. Nutrition Reviews, Vol. 63, No 11; 392-397

Garcia E, B. P. 1988. *Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating*. J Clin Endocrinol Metab, 67:80–87.

Gazvani R. & Templeton A. 2002. *Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis*. Reproduction, 123; 217-226.

Giotakis, Aris I; Kontos, Christos K; Manolopoulos, Leonidas D; Sismanis, Aristides; Konstadoulakis, Manousos M, 2016. High BAX/BCL2 mRNA ratio predicts favorable prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma, particularly in patients with negative lymph nodes at the time of diagnosis. Clinical biochemistry vol.49, iss. 12: 890-896

Giudice, L. 2010. *Clinical Practice Endometriosis*. The New England Journal of Medicine , 362 (35), 2389-2398.

Glimore. 2006. *Introduction of NF- κ B, Players, Pathways, Perspectives*. Biology Departement. Boston University. Oncogene, 25: 6680-6689.

Golan, A., Winston, R.M., Dargenio, R. 1984. *Experimental endometriosis: a microsurgical animal model in rats*. Isr J Med Sci , 20: 1094-1096.

Gossner G., Choi M., Tan L., Fogoros S., Griffith K.A., Kuenker M., Liu J.R. 2007. *Genistein-induced apoptosis and autophagocytosis in ovarian cancer cells*. Gynaecologic Oncology , 105:23-30.

Goumenou A., Panayiotides I., Matalliotakis I., Vlachonikolis I., Tzardi M. and Koumantakis E. 2001. *Bcl-2 and Bax expression in human endometriotic and adenomyotic tissues*. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. , 99, 256-260.

Graham J.D., Y. C. 1995. *Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer*. Cancer. Res. , 55, 5063-5068.

Greenberg L.H., and Slayden O.D. 2004. *Human endometriotic xenografts in immunodeficient RAG-2/gamma(c)KO mice*. Am J Obstet Gynecol , 190: 1788-1795; discussion 1795-1786.

Greg Peterson. 1995. *Evaluation of The Biochemical Targets of Genistein in Tumor Cells*. The Journal of Nutrition. 125: 784-789

Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., Huber, J.C. 2002. *Production and Action of Estrogen*. The New England Journal of Medicine , 346 (5) : 340-352.

Grümmer R., Schwarzer F., Bainsczyk K. 2001. *Peritoneal Endometriosis: Validation of an In-vivo Model*. Human Reproduction , 16 (8): 1736-1743.

Grümmer, R. 2006. *Animal Models in Endometriosis Research*. Human Reproduction Update, 12 (5); 641-649.

Gui Hua Sha, Shou Qing Lin. 2008. *Genistein Inhibits Proliferation of Human Endometrial Endothelial Cell in vitro*. Chinese Medical Sciences Journal. Vol 23; No 1: 49-53

Guillermo R., Julie C., Dana SW., Hubertus J., Wolfgang W.. 2007. *Effects of Chronic Genistein Treatment in Mammary Gland, Uterus and Vagina*. The American Journal of Cancer. 115(Suppl 1): 62-68

Hadi, R. 2011. *Mekanisme Apoptosis Pada Regresi Sel Luteal*. Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran FKUI. Majalah Kesehatan Pharma Medika, (3) 1 : 1-6.

Halme J, H. M. 1984. *Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis*. Obstet Gynecol, 64: 151-154.

Hanstein, B., Liu, H., Yancisin, MC. 2000. *functional analysis of novel estrogen receptor beta isoform*. Mol Endocrinol, 13 : 129-137.

Hapangama, DK., Turner, MA., Drury, JA., Quenby, S., Hart, A., Maddick, M., Martin-Ruiz, C., von, ZT. 2009. *Sustained replication in endometrium of women with endometriosis occurs without evoking a DNA damage response*. Hum Reprod, 24 : 687–696.

Hapangama, DK., Turner, MA., Drury, JA., Quenby, S., Saretzki, G., Martin-Ruiz, C., von Zglinicki, T. 2008. *Endometriosis is associated with aberrant endometrial expression of telomerase and increased telomere length*. Hum Reprod , 23 : 1511–1519.

Harada M, Suganuma N, Furuhashi M, Nagasaka T, Nakashima N, Kikkawa F, Tomoda Y, Furui K. 1996. *Detection of apoptosis in human endometriotic tissues*. Mol Hum Reprod , 2(5):307-15.

Harada, C., Nakamura, K., Guo, X., Kitaichi, ., Mitamura, Y., Yoshida, K., Ohno, S., Yoshida, H., Harada, T. 2007. *Neuroprotective Effect Of Geranylgeranylacetone Against Ischemia-Induced Retinal Injury*. Molecular Vision , 13 : 1601-7.

Harada, T., Kaponis, A., Iwabe, T. 2004. *Apoptosis in Human Endometrium and Endometriosis*. Human Reproduction Update , (10) 1.

Helen Kim, T Greg Peterson, Stephen Barnes, 2005. *Mechanisms of Action of The Soy Isoflavone Genistein: Emerging Role for Its Effects Via Transforming Growth Factor β Signalling Pathway*. The American Journal of Clinical Nutrition; 68(suppl): 1418-25

Luisa A Helguero, Malin Hedengran Faulds, Jan-A`ke Gustafsson and Lars-Arne Haldosé'n, 2005. *Estrogen receptors alfa (ERa) and beta (ERb)*

differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene*; 24, 6605–6616

Hirata T., Osuga Y., Yoshino O., et al., 2005. *Development of an Experimental Model of Endometriosis using Mice that Ubiquitously Express Green Fluorescent Protein*. *Human Reproduction*, 20: 2092-2096.

Hongwei Si, Dongmin Liu. 2007. *Phytochemical Genistein in The Regulation of Vascular Function: New Insights*. *Current Medicinal Chemistry*. 14: 2581-2589

Hopwood, D., and Levison, DA. 1976. *Atrophy and apoptosis in cyclical human endometrium*. *J. Pathol* , 119: 159–165.

Horn, LC., Hentschel, B., Meinel, A., Alexander, H., Leo, C. 2009. *Cyclooxygenase-2 expression, Ki-67 labeling index, and perifocal neovascularization in endometriotic lesions*. *Ann Diagn Pathol* , 13 : 373-377.

Hudelist G, Lass H, Keckstein J, Walter I, Wieser F, Wenzl R, Mueller R, Czerwenka K, Kubista E, Singer CF. 2005. *Interleukin 1alpha and tissue-lytic matrix metalloproteinase-1 are elevated in ectopic endometrium of patients with endometriosis*. *Hum Reprod* , 20: 1695-1701.

Hull M.L, Escareno C.R., Godsland J.M. 2008. *Endometrial-Peritoneal Interactions during Endometriotic Lesion Establishment*. *The American Journal of Pathology* , 173 (3): 700-715.

Izawa M, Harada T, Deura I, Taniguchi F, Iwabe T, Terakawa N. 2006. *Drug-induced apoptosis was markedly attenuated in endometriotic stromal cells*. *Hum Reprod* , 21(3):600-4.

Jakobsen, J.N., Sørensen, J.B. 2013. *Clinical impact of ki-67 labeling index in non-small cell lung cancer*. *Lung Cancer*, 79 : 1– 7.

Jean-Christophe Lousse., Anne Van Langendonck., Reinaldo Gonzalez-Ramos., Sylvie Defrere., Emmanuelle Renkin., Jacques Donnez., 2008. *Increased activation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in isolated peritoneal macrophages of patients with endometriosis*. *Fertil Steril*; 90:217–20.

Jin-Jiao Li, Jacqueline P. W. Chung, Sha Wng, Tin-Chiu Li, and Hua Duan., 2017. *The Investigation and Management of Adenomyosis in Women Who Wish to Improve or Preserve Fertility*. *Hindawi, BioMed Research International*, Volume 2018, Article ID 6832685, <https://doi.org/10.1155/2018/6832685>

John C., Mohammed A., Bin Yu and Jeremy L., 2005. *Cyclophilin A-Deficient Mice Are Resistant to Immunosuppression by Cyclosporine*. *J Immunol*, 174:6030-6038.

Johnson MC, Torres M, Alves A, Bacallao K, Fuentes A, Vega M, Boric, MA. 2005. *Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes*. *Reprod Biol Endocrinol* , 8;3:45.

Jones, RK., Searle, RF., Bulmer, JN. 1998. *Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis*. *Hum Reprod* , 13 : 3496-502.

Jun H K., Young J K., 2015. *Effects of genistein in combination with conjugated estrogens on endometrial hyperplasia and metabolic dysfunction in ovariectomized mice*. *Endocrine Journal*. 62(6) , 531-542

Jung, YL., Hee, SK., Yong, SS. 2011. *Genistein as a Potensial Anticancer Agent Against Ovarian Cancer*. *Journal of Traditional and Coplementary Medicine. Taiwan* , 2(2) : pp96-104.

Jurgensen, A., Mettler, L., Volkov, NI., Parwaresch, R. 1996. *Proliferative activity of the endometrium throughout the menstrual cycle in infertile women with and without endometriosis*. *Fertil Steril* , 66 : 369–375.

Kahyaoglu I, Kahyaoglu S, Moraloglu O, Zergeroglu S, Sut N, Batioglu, S. 2012. *Comparison of Ki-67 proliferative index between eutopic and ectopic endometrium: A case control study*. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* , 51 : 393-396.

Katie M.E, Alison C.H, Denis J.C, Sanjay K.A, Warren G.F. 2005. *The effects of dietary phytoestrogens on aromatase activity in human endometrial stromal cells*. *Reproduction Nutrition. Development Journals*. 45 (2005) 709-720

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1972. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer* , 26(4) : 239-57.

Khan, N., Adhami, V.M., Mukhtar, H. 2012. *Apoptosis By Dientry Agents for Prevention and Treatment of Prostat Cancer*. *Endokrine-Related cancer* , 17 : R39 - R52.

Khairiyah R, Sutrisno, Sanarto Santoso, 2014. *Pengaruh genistein terhadap ekspresi reseptor estrogen alfa dan beta pada kultur sel endometriosis*, *Majalah Obstetri dan Ginekologi*, Vol. 22 no. 2, Mei – Agustus : 86-93

Kim SH, Kim CW, Jeon SY, Go RE, Hwang KA, Choi KC. 2014. *Chemopreventive and chemotherapeutic effects of genistein a soy isoflavone, upon cancer development and progression in preclinical animal models*. *Laboratory Animal Research Journal* : 30940, 143-150

Kim, CM., Oh, YJ., Cho, SH., Chung, DJ., Hwang, JY., Park, KH., Cho, DJ., Choi, YM., Lee, BS. 2007. *Increased telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in the endometrium of patients with endometriosis*. *Human Reproduction* , 22 : 843–849.

Kim, H., Peterson, TG., Arnes, S. 1998. *Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways*. The American Journal of Clinical Nutrition , 68 (Suppl), 1418.

Kim, S., Shin, HJ., Kim, SY., Kim, JH., Lee, YS., Kim, DH., Lee, MO. 2004. *Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPAR γ* . Molecular and Cellular Endocrinology , Vol.220, No.1-2, (May 2004), pp 51-58.

Klopfleisch, R. 2013. *Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse histopathology - a systematic review model*. BMC Veterinary Research, 9:123.

Konstantinos, K., Marios, S., Anna, M., Nikolaos, K., Efstratios, P., Paulina, A., 2011. *Expression of Ki-67 as Proliferation Biomarker in Imprint Smears of Endometrial Carcinoma*. Diagnostic Cytopathology , 41 (3) : 212 – 217.

Korsmeyer, S. 1992. *Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death*. Review. Blood , 15; 80(4): 879-86.

Krijnen, PA., Nijmeijer, R., Meijer, CJ., Visser, CA., Hack, CE., Niessen, HW. 2002. *Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction*. Journal of Clinical Pathology , 55(11) : 801-11.

Kuan-Ho L., Wei-Wen K., Marthandam AS., Cecilia-Hsuan D. , You-Liang H., Li-Chin C., Ray-Jade C., Su-Ying W., Vijaya Padma V., and Chih-Yang H., 2017. *E2/ER β Enhances Calcineurin, Protein Degradation and PI3K/Akt/MDM2 Signal Transduction to Inhibit ISO-Induced Myocardial Cell Apoptosis*. *Int. J. Mol. Sci.*; 18, 892.

Kuiper G.G., S. P. 1998. *The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems*. Front. Neuroendocrinol, 19, 253-286.

Kuiper, G.G., Enmark, E., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. 1996. *Cloning of a Novel Receptor Expressed in rat prostate and ovary*. Proc Natl Acad U S A , 93 : 5925-30.

Kuiper, GG., Carlsson, B., Grandien, K. 1997. *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β* . Endocrinology , 138:863-70.

Kuiper, GG., Lemmen, JG., Carlsson, B., et al. 1998. *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*. Endocrinology , 139 : 4252–4263.

Kumar N.S., Richer J., Owen G., Litman E., Horwitz K.B., Leslie K.K. 1998. *Selective down-regulation of progesterone receptor isoform B in poorly differentiated human endometrial cancer cells: implications for unopposed estrogen action*. Cancer Res , 58: 1860-1865.

Kumar, V., Abbas, AK., Fausto, N., Aster, JC. 2010. *Robins and Cotran: Pathologic Basis of Disease. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier*, p. 25-32.

Kyama CM., Debrock S., Mwenda JM., D'Hooghe TM. 2003. *Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. Reproductive Biology and Endocrinology* , 123; 1-9.

Langendonck AV., C.-R. F. 2002. *Oxidative stress and peritoneal endometriosis. Fertility and Sterility*, 77; 861-870.

Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD. 2006. *Combined inhibition of vascularendothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. Hum Reprod* , 21: 262-268.

Lee, Y. H. 2012. *Genistein as a Potential Anticancer agent Against Ovarium Cancer. Journal of Traditional and Complementary Medicine* , 2 (2): 96-104.

Leonardo G., Andrei N. Tchernitchin, Rodrigo B., Joan V., Igor L., Manuel G., Gustavo C., omar C., 2011. *Genistein Selectivity Inhibits Estrogen-induced Cell Proliferation and Other Responses to Hormone Stimulation in the Prepubertal Rat Uterus. Journal Of Medicinal Food* : 14 (12); 1597-1603

Leslie K.K., S. M.-N. 2005. *Progesterone receptor isoform identification and subcellular localization in endometrial cancer. Gynecol. Oncol*, 96, 32-41.

Lessey, D. 2011. *Assessment of endometrial receptivity. Fertil Steril*, 96:522–529.

Leyla-Lopez N., Gutierrez-Grijalva E., Ambriz-Perez DL, Heredia JB., 2016. *Flavonoid as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases. Int.J.Mol.Sci.* 17; 921

Leyland, N., Casper, R., Laberge, P. & Singh, S.S. 2010. *Endometriosis Diagnosis and Management. Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada (JOGC)*, 32(7) : S1-S32.

Li W., Frame L.T., Hirsch S., Cobos E. 2010. *Genistein and hematological malignancies. Cancer Letters* , 296: 1-8.

Li, S.F., Nakayama K., Masuzawa H., Fujii, S. 1993. *The number of proliferating cell nuclear antigen positive cells in endometriotic lesions differs frothat in the endometrium. Analysis of PCNA positive cells during the menstrual cycle and in post-menopause. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* , 423: 2.

Lu, L.J., Anderson, KE., Grady, JJ., Nagamani M. 1996. *Effects of soya consumption for one month on steroid hormones in premenopausal*



- women: implications for breast cancer risk reduction. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev*, 5, 63.
- Machando, D. B. 2010. *Higher Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor VEGFR-2 (Flk-1) and Metalloproteinase-9 (MMP-9) in a Rat Model of Peritoneal Endometriosis is Similar to Cancer Disease*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29 (4) : 1-9.
- Maharani M., Wahyuni E.S., Sutrisno S. 2016. *Effect of Genistein on Endometriosis Lesion, Matrix Metalloproteinase-2, and -9 Level of Endometriosis: In Silico and In vivo Study*. *iMedPub Journals*, Vol 1 No 1:4.
- Markovits, J., Linassier, C., Fosse, P., Couprie, J., Pierre, J., Jacquemin-Sablon, A., Saucier, J.M., Le Pecq J.B., Larsen A.K. 1989. *Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II*. *Cancer Res.*, 49: 5111.
- Masaki T., Tsutomu M., Tomoyuki H., Motoki I., Hiroshi S., Tadao T., Hiroyuki N., Takahiko K., Tsuyomu I., Michinori K., Shoichiro T., 2007. *Effects of Soy Isoflavons on Endometriosis Interaction With Estrogen Receptor 2 Gene Polymorphism*. Lippincott Williams & Wilkins. Volume 18;402-408
- Matsumoto, Y., Iwasaka, T., Yamasaki, F., Sugimori, H. 1999. *Apoptosis and Ki-67 expression in adenomyotic lesions and in the corresponding eutopic endometrium*. *Obstet Gynecol*, 94 : 71-77.
- Matsuura K., Ohtake H., Katabuchi H., Okamura H. 1999. *Coelomic metaplasia theory of endometriosis:evidence from in vivo studies and an in vitro experimental model*. *Gynecol Obstet Invest*, 47 Suppl 1: 18-20; discussion 20-12.
- Matthias W, Laschke MD, Christine Schwender MD, Brigitte Vollmar MD, Michael D. Menger MD. 2010. *Genistein Does Not Affect Vascularization and Blood Perfusion of Endometriotic Lesions and Ovarian Follicles in Dorsal Skinfold Chambers of Syrian Golden Hamsters*. *Reproductive Sciences* ; Vol 17: 586-577
- McLaren, J., Prentice, A., Charnock-Jones, DS., Sharkey, AM., Smith, SK. 1997. *Immunolocalization of the apoptosis regulating proteins Bcl-2 and Bax in human endometrium and isolated peritoneal fluid macrophages in endometriosis*. *Hum Reprod*, 12(1):146-52.
- Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M, Rumi LS. 2000. *Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis*. *Fertil Steril*, 74(4):760-6.
- Mettler, L., Jurgensen, A., Volkov, NI., Kulakov, V., Parwaresch, MR. 1997. *Immunohistochemical Profile of Endometrium in Patients With Genital Endometriosis*. *Diagn Ther Endosc*, 3 : 127-145.

Meyer, R. 2009. *Über eine adenomatöse Wucherung der Serosa in einer Bauchnarbe*. Z Geburtshilfe Gynakol, 49: 32-41.

Michelle S. Controneo, Coral A. Lamartiniere. 2001. *Pharmacologic, but Not Dietary, Genistein Supports Endometriosis in a Rat Model*. Toxicological Sciences 61, 68-75

Miguel A.G, Rosa N, Raquel d.V, Immaculada N, Carlos H, Anonio C. 2006. *Comparative effects of estradiol, raloxifene, and genistein on the uterus of ovariectomized mice*. Fertility and Sterility. Vol 86. No 4

Minutolo F., Macchia M., Benita SK., John AK., 2011. Estrogen receptor β ligand: recent advances and biomedical applications. Medical Research review 31 No. 3, 364-442

Mohamed L., Eman Abdel-Salam I., Wael A., Ahmed M. B E A., 2015. Bcl-2 may play a role in the progression of endometrial hyperplasia and early carcinogenesis, but not linked to further tumorigenesis. Journal of Microscopy and Ultrastructure 3; 19-24

Morgan, D. 2007. *The cell cycle: Principles of control*. London: New Science Press Ltd.

Morsch, DM., Carneiro, MM., Lecke, SB., Araujo, FC., Camargos, AF., Reis, FM., Spritzer, PM. 2009. *c-fos gene and protein expression in pelvic endometriosis: a local marker of estrogen action*. J Mol Histol, 3-58.

Mosselman, S., Polman, J., Dijkema, R. 1996. *ER-B: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor*. FEBS Lett , 392 : 49-53.

Murk, W., Atabekoglu, CS., Cakmak, H., Heper, A., Ensari, A., Kayisli, UA., Arici, A. 2008. *Extracellularly signal-regulated kinase activity in the human endometrium: possible roles in the pathogenesis of endometriosis*. J Clin Endocrinol Metab , 93 : 353.

Mylonas I., J. U. 2004. *Immunohistochemical analysis of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor in normal human endometrium*. Acta Histochem, 106: 245-252.

Mylonas I., Jeschke U., Shabani N., Kuhn C., Kriegel S., Kupka M.S. and Friese K. 2005. *Normal and malignant human endometrium express immunohistochemically estrogen receptor alpha (ER-alpha), estrogen receptor beta (ER-beta) and progesterone receptor (PR)*. Anticancer Research. , 25, 1679-1686.

Mylonas I., S. R. 2000. *Immunohistochemical analysis of steroid receptors and glycodeilin A (PP14) in isolated glandular epithelial cells of normal human endometrium*. Histochemystri Cell Biol, 114, 405-411.

Mylonas, I. J. 2007. *Steroid receptors ER α , ER β , PR-A and PR-B are differentially expressed in normal and atrophic human endometrium*. Histology and Histopathology, 22: 169-176.

Myung, SK., Ju, W., Choi, HJ., Kim, SC. 2009. *Soy intake and risk of endocrine-related gynaecological cancer: a meta-analysis*. British Journal of Obstetrics and Gynaecology , 116, 1697-1705.

Nadine M.B., Coral A.L., 2000. *Genistein Regulation of Transforming Growth Factor- α , Epidermal Growth Factor (EGF) and EGF Receptor Expression in The Rat Uterus and Vagina*. Cell Growth & Differentiation Journal, Vol 11; 255-260

Nagaraju, GP., Zafar, SF., El-Rayes, BF . 2013. *Pleiotropic effects of genistein in metabolic, inflammatory, and malignant diseases*. Nutrition Reviews® , Vol. 71(8):562–572.

Nagendraprabhu P., Sudhandiran G., 2011. *Astaxanthin inhibits tumor invasion by decreasing extracellular matrix production and induces apoptosis in experimental rat colon carcinogenesis by modulating the expressions of ERK-2, NF κ B and COX-2*. Invest New Drugs ; 29:207–224

Naguib S., Mohd Mokhtar H., Kasim Nor F., Soh Onn Y.. 2013. *Isoflavone Genistein Induces Fluid Secretion and Morphological Changes in the Uteri of Post-Pubertal Rats*. International Journal of Medical Sciences. Vol 10(6): 665-675

Nechuta, SJ., Caan, BJ., Chen, WY. 2012. *Soy food intake after diagnosis of breast cancer and survival: an in-depth analysis of combined evidence from cohort studies of US and Chinese women*. American Journal Clinical Nutrition , 96 : 123–132.

Nezhat FR., and Kalir, T., 2002. *Comparative immunohistochemical studies of endometriosis lesions and endometriotic cysts*. Fertil Steril , 78(4) : 820-4.

Nichols A.F. and Sancar, A., 1992. *Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein*. Nucleic Acids Research , 20: 2441–2446.

Nicki K., Martin R, L., Ian G. C., Michael A. Q., mark S. B, Harry MG., Gregory E. R., 2007. *Genistein-Induced Proteome Changes in the Human Endometrial Carcinoma Cell Line, Ishikawa*. Clinical Proteomics Vol 2, pp 153-167

Nishida M, Nasu K, Ueda T, Fukuda J, Takai N, Miyakawa, I. (2005 Jan). *Endometriotic cells are resistant to interferon-gamma-induced cell growth inhibition and apoptosis: a possible mechanism involved in the pathogenesis of endometriosis*. Molecular Human Reproduction , 11(1):29-34.

Nisolle M., Casanas-Roux F., Donnez J., 2000. *Early-stage Endometriosis: Adhesion and Growth of Human Menstrual Endometrium in Nude Mice*. Fertility and Sterility , 74: 306-312.

Nowak M., Madej J.A., Dziêgiel P. 2007. *Intensity of COX-2 expression in cells of soft tissue fibrosarcomas in dogs as related to grade of tumour malignancy*. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulway , 51 : 275-279.

Nowak, N.M. 2008. *Development and Evaluation of Two Mouse Models for Endometriosis Focused on the Involvement of the Immune System in Endometriosis Establishment*. Eingereicht im Fachbereich Biologie. Berlin: Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin.

Oberhammer F., Wilson J.W., Dive C., Morris I.D., Hickma J.A., Wakeling A.E., Walker PR., Sikorska M., 1993 Sep. *Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation*. The EMBO Journal, 12(9): 3679-84.

Olive, D., Lindhein, S., Pritts, E. 2004. *New medical treatments for endometriosis*. 18 (2) : 319–328.

Pagliacci, M.C., Smacchina, M., Migliorati, G., Grignani, F., Riccardi, C., Nicoretti, I. 1994. *Growth-inhibitory effects of the natural phyto-oestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells*. Europe Journal Cancer, 30A: 1675.

Pamela L, Horn-Ross, Esther M John, Alison J. Canchola, Susan L. Stewart, Marion M. Lee. 2003. *Phytoestrogen Intake and Endometrial Cancer Risk*. Journal of the National Cancer Institute, Vol 95, No 15

Pan, H., Sheng, JZ., Tang, L., Zhu, R., Zhou, TH., Huang, HF. 2008. *Increased expression of c-fos protein associated with increased matrix metalloproteinase-9 protein expression in the endometrium of endometriotic patients*. Fertility and Sterility, 90 : 1000–1007.

Park JS, Lee JH, Kim M, Chang HJ, Hwang KJ, Chang KH. 2009. *Endometrium from Women with Endometriosis Shows Increased Proliferation Activity*. Fertility and Sterility, 92(4) : 1246-1249.

Park, OJ., Surh, YJ. 2004. *Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies*. Toxicology Letters, 150(1) : 43-56.

Patrick D., Kai S., Thorsten S., Ute LL., Horst M., Gunter V., 2001. *Phytoestrogens and carcinogenesis-differential effects of genistein in experimental models of normal and malignant rat endometrium*. Human Reproduction : Vol 16, No 5 pp 997-1006

Peiro G, Diebold J, Baretton GB, Kimmig R, Löhrs U. (2001 Oct). *Cellular apoptosis susceptibility gene expression in endometrial carcinoma: correlation with Bcl-2, Bax, and caspase-3 expression and outcome*. International Journal Gynecological Pathology, 20(4):359-67.

Perkin, A.G. and Newbury, F.G. 1899. *The colouring matters contained in dyer's broom (Genista tinctoria) and heather (Calluna vulgaris)*. Journal of the Chemical Society, 75 : 830–839.

Peterson, G., Barnes, S. 1996. *Genistein inhibits both estrogen and growth factor stimulated proliferation of human breast cancer cells*. Cell Growth Differ, 7 : 1345–1351.

Petterson, K., Gustafsson, JA. 2001. *Role of estrogen receptor beta in estrogen action*. *Annu Rev Physiol* , 63 : 165-192.

Pines, J. 1995. *Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view*. *Biochem. J* , 308, 697 ± 711.

Polkowski, K., Mazurek, AP. 2000. *Biological Properties of Genistein. A Review of In Vitro and In Vivo Data*. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* , Vol. 57 No. 2 pp. 135-155.

Pongpat K., Chatsri D., Chutamas B., Sutthasinee P., 2015. *Soy Isoflavone Improves Endometrial Barrier Through Tight Junction Gene Expression*. *Society for Reproduction and Fertility*. 149;269-280

Prajitno, P. 1994. *Perkembangan baru tentang endometriosis*. *Majalah Obstetri dan Ginekologi* Vol 407, hal. 603-605.

Prakash D., Gupta C. 2011. *Role of fitoestrogens as nutraceuticals in human health*. *Pharmacologyonline* , 1 : 510 - 523.

Prasad S, Ravidran J, Aggarwal BB. 2010. *NF- κ B and Cancer : How intimate is this relationship*. *Mol Cell Biochem* , 336 (1-2) : 25-37.

Rabiau N., Kossai M., Braud M., Chalabi N., Satih S., Bignon YJ., Bernard-Gallon DJ. 2010. *Genistein and Daidzein act on a panel of genes implicated in cell cycle and angiogenesis by polymerase chain reaction arrays in human prostate cancer cell lines*. *Cancer Epidemiology* , 34: 200-206.

Ramos, RG., Rocco J., Rojas, C., Sovino, H., Poch, A., Kohen, P., Diaz, CA., Devoto, L. 2012. *Physiologic Activation of Nuclear Factor Kappa B in the Endometrium During the Menstrual Cycle is Altered in Endometriosis Patient*. *American Society for Reproductive Medicine* , 97 (3): 15-282.

Remmele W, Schicketanz KH. 2001. *Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer: computer-assisted image analysis (QIC score) vs subjective grading (IRS)*. *Pathol ResPract* , 189 : 862–866.

Rice, S., Whitehead, SA. 2006. *Phytoestrogens and Breast Cancer-Promoters or Protectors*. *Endocrine-Related Cancer* , 13: 995-1015.

Rice, V. 2002. *Conventional medical therapies for endometriosis*. *Ann N Y Acad Sci* , 955: 343-352.

Rickert, P., Seghezzi, W., Shanahan, F., Cho, H., Lees, E. (1996). *Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II*. *Oncogene* , 12, 2631.

Riggs, B.L. & Hartmann, L.C., . 2003. *Selective Estrogen-Receptor Modulators Mechanisms of Action and Application to Clinical Practice*. *The New England Journal of Medicine*, 348 : 618-629.

Roberta G., Alessandra B., Francesca P., Onofrio T., Domenico G., Angelo S., Francesco S., Rosario D., 2015. Botanic:Target and Therapy: 5 ;27-32

Rollerova, E., Urbancikova, M. 2000. Intracellular estrogen receptor : their characterition and function : Rreview. *Endocrine regulation* , 34 : 203-218.

Rossi M., Sharkey A.M., Vigano P., Fiore G., Furlong R., Florio P., Ambrosini G., Smith S.K., Petraglia F. 2005. *Identification of genes regulated by interleukin-1beta in human endometrial stromal cells*. *Reproduction* , 130: 721-729.

Sa'adi, A. 2010. *Efek Curcumin dan Progestin (MPA) terhadap Ekspresi VEGF dan Luas Implan Endometriosis (Studi eksperimental pada model mencit endometriosis)*. Surabaya: Divisi Fertilitas Endokrinologi dan Reproduksi, Lab/SMF Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Sammartino, C.Di Carlo, V.D. Mandato, G. Bifulco, M. Di Atefano, C. Nappi. 2003. *Effects of genistein on the endometrium: ultrasonographic evaluation*. *Gynecology Endocrinology moleculare* ; 17:45-49

Sampson, J. 1927. *Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity*. *Am J Obstet Gynecol* , 14: 422-429.

Sampson, J. A. 1925. *Heterotopic or misplaced endometrial tissue*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 10, no. 5, pp. 649–664.

Santoso, G. 2005. *Metodologi Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif*. Jakarta: Prestasi Pustaka.

Sas, L., Lardon, F., Vermeulen, P.B., Hauspy, J., Dam, P.V., Pauwels, P., Dirix, L.Y., Laere, S.J.V. 2012. *The Interaction Between ER and NFkB in Resistance to Endocrine Therapy*. *Breast Cancer Research* , 14: 212.

Sattler M., Liang H., Nettesheim D., Meadows RP., Harlan JE., Eberstadt M., Yoon HS., Shuker SB., Chang BS., Minn AJ., Thompson CB. and Fesik SW. 1997. *Structure of Bcl-xL-BaK peptide complex: recognition between regulators of apoptosis*. *Science* , 225, 983-986.

Schafer, K. 1998. *The Cell Cycle: A Review*. *Vet Pathol* , 35 : 461-478.

Schor, E., da Silva, I., Sato, H., Baracat, EC., Girao, MJ., de Freitas, V. 2009. *P27Kip1 is down-regulated in the endometrium of women with endometriosis*. *Fertil Steril* , 91 : 682–686.

Seung-Hee K., Cho-Won K., So-Ye J., Ryeo-Eun G., Kyung-A H., Kyung-Chul C., 2014. *Chemopreventive and Chemotherapeutic Effects of Genistein, A Soy Isoflavone, Upon Cancer Development and Progression In PreClinical Animal Models*. *Laboratory Animal Research Journals*. 30(4): 143-150

Shukla V., Chandra V., Sankhwar P., Kaushal J., Sirosi V., Dwivedi A., 2015. *The phytoestrogen genistein inhibits EGFR/PI3K/NF- κ B activation and induces apoptosis in human endometrial hyperplasia cells*. RSC Advances, download, November 25, 2018.

Siti Rosmani MZ., Siti Zawiah O., Norhayati LAK., Nurul IM., Srijit D., Normadiyah MK., 2013. *Effects of the phytoestrogen genistein on the development of the reproductive system of Sprague Dawley rats*. CLINICS, 68 (2) ; 253-262

Snijders M.P., 1992. *Immunocytochemical Analysis of Oestrogen Receptors and Progesterone Receptors in the Menopause*. J. Reprod. Fertil, 94, 363-371.

Soares SR., Martinez-Varea A., Hidalgo-Mora, J.J. & Pellicer, A. 2012. *Pharmacologic therapies in endometriosis: a systematic review*. Fertility and Sterility, 98 (3) : 529-555.

Somigliana E., Viganò P., Rossi G. 1999. *Endometrial Ability to Implant in Ectopic Sites can be Prevented by Interleukin-12 in a Murine Model of Endometriosis*. Human Reproduction, 14: 2944-2950.

Sourial, S. T. 2014. Review Article: Theories on the Pathogenesis of Endometriosis. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Reproductive Medicine, 1-10.

Speroff L, Fritz M.A. 2005. Endometriosis. Dalam Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility (hal. 7; 1103-1133.). USA: Lippincott Williams & Wilkins.

Steel, R. T. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistik Suatu Pendekatan Biometrik*. Jakarta: Pt Gramedia Pustaka Utama.

Stefanie S., Dagmar-Ulrike R., Josef Makovitzky, Volker B., Claudia B., 2005. *Stimulation of Endometrial Glandular Cells with Genistein and Daidzein and their Effects on ER- α and Er β -mRNA and Protein Expression*. Anticancer Research 25: 1713-1718

Steinleitner, A. L. 1991. *Immunomodulation in the treatment of endometriosis-associated subfertility: use of pentoxifylline to reverse the inhibition of fertilization by surgically induced endometriosis in a rodent model*. Fertil Steril, 56: 975-979.

Stratton P, B. K. 2011. *Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the relationship and implications*. Human Reproduction Update, 17:327-346.

Subowo. 2010. Biologi Sel : *Transformasi sel*. Edisi 6. . Jakarta: Sagung Seto.

Suetsugi, M., Su, L., Karlsberg, K., Yuan, YC., Chen, S. 2003. *Flavone and Isoflavone Phytoestrogens Are Agonists of Estrogen-Related Receptors*.



- Molecular Cancer Research , Vol.1, No.13, (November 2003), pp. 981–991.
- Suganuma N., Harada M., Furuhashi M., Nawa A., Kikkawa F., 1997. *Apoptosis in human endometrial and endometriotic tissues*. Horm Res , 48 Suppl 3:42-7.
- Suryo. 2011. *Genetika Manusia : Kanker Paling Ditakuti Masa Kini*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Sutrisno S., Mariyani M., Herawati I., Rinata E., Jehanara J., Yueniwati Y., Nurdiana N., Noorhamdani N., Santoso S., 2014a. *The effects of genistein as antiinflammatory and antiangiogenesis in primary endometriosis cell culture*. Asian Pacific Journal of Reproduction , 3 (4).
- Sutrisno S., Mastryagung D., Khairiah R., Tridiyawati F., Dewi NMSA., Hidayati D.Y.N., Noorhamdani N., Santoso S. (2014b). *The effect of genistein on estrogen receptor expression, cell proliferation, and apoptosis in endometriosis cell culture*. Journal of Experimental and Integrative Medicine , Vol 4 (3): 201-206.
- Sutrisno, Artina Nyoman, Noorhamdani. 2014. *Genistein Meningkatkan Kadar Bcl-2 Associated X Protein (Bax) pada Kultur Sel Endometriosis*. Majalah Obstetri & Gynecologi. Vol 2; 71-78
- Sutrisno, Chandra S., Eviyani M M., Lilik W., Noorhamdani, Sri W., 2017. *The Effect of Genistein on TGF- β signal, Dysregulation of Apoptosis, Cyclooxygenase-2 Pathway and Nf- κ B Pathway in Mice Peritoneum of Endometriosis Model*. Middle East Fertility Society Journal.1-4
- Sutrisno, Dwi Yuni, Dwina Mastryagung. 2014. *Pengaruh Genistein terhadap Peningkatan Apoptosis Sel Pada Kultur Sel Endometriosis*. Majalah Obstetri & Ginekologi; Vol 22(3): 31-38
- Sutrisno, Evi Rinata, Noorhamdani. 2014. *Pemberian Genistein Pada Kultur Sel Endometriosis dalam Menurunkan Kadar Interleukin- β* . Majalah Obstetri & Ginekologi; Vol 22(2): 39-45
- Sutrisno, Hardianti Aprina, Happy Marthalena Simanungkalit, Asti Adriyani, Wisnu Barlianto, Hidayat Sujuti, Sanarto Santoso, Pande Made Dwijayasa, Endang Sri Wahyuni, Edy Mustofa. 2017. *Genistein modulates the estrogen receptor and suppresses angiogenesis and inflammation in the murine model of peritoneal endometriosis*. Journal of Traditional and Complementary Medicine. 1-4
- Sutrisno, Ita Herawati, Nurdiana. 2014. *Penurunan Kadar TNF- α dan IL-6 pada Kultur Sel Endometriosis Melalui Pemberian Genistein*. Majalah Obstetri & Ginekologi; Vol 22(2): 58-65
- Sutrisno, Jehanara, Santoso. 2014. *Pengaruh Genistein terhadap Penurunan Kadar Vascular Endothelial Growth Factor-A pada Kultur Sel Endometriosis*. Majalah Obstetri & Ginekologi, Vol 22: 94-100

Sutrisno, Maharani, Endang Sri Wahyuni. 2016. *Effect of Genistein on Endometriosis Lesion, Matrix Metalloproteinase-2 and-9 Level of Endometriosis: In silico and In vivo Study*; Vol 1 No: 1-4

Sutrisno, Mariyani, Ita Herawati, Evi Rinata, Jehanara, Yuyun Yueniwati, Nurdiana, Noorhamdani, Sanarto Santoso. 2014. *The effects of genistein as antiinflammatory and antiangiogenesis in Primary Endometriosis Cell Culture*. Asian Pacific Journal of Reproduction; 3(4): 299-304

Sutrisno, Mariyani, Yuyun Yuenawati. 2014. *Genistein Menurunkan Kadar Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) pada Kultur Sel Endometriosis*. Majalah Obstetri & Ginekologi; Vol 22(2): 79-85

Sutrisno, Mastryagung, Khairiyah, Tridiyawati, Dewi, Hidayati, Noorhamdani, Santoso. 2014. *The effects of genistein on estrogen receptor expression, cell proliferation and apoptosis in endometriosis cell culture*. Journal of Experimentasl and Integrative Medicine.4 (3) : 1-6

Sutrisno, Rahayu Khairiah, Sanarto Santoso. 2014. *Pengaruh Genistein terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen α & β pada Kultur Sel Endometriosis*. Majalah Obstetri & Ginekologi; Vol 22(2): 86-93

Sutrisno, Rapa Yulianto, Dwijayasa Pande Made, Wiyasa Arsana. 2015. *The Effect of Giving Genistein In Various Doses In Level Receptor A Interleukin 8 (Cxcr 1) In Peritoneal Lesions Of Mice-Model Endometriosis*. Journal of Dental and Medical Sciences. Volume 14, Issue 2 Ver. VIII, pp 94-100

Sutrisno, RR Catur Leny Wulandari, Dwi Wahyu Wulan Sulistyowati, Ratna Feti Wulandari, Endang Sri Wahyuni, Yuyun Yuenawati, Sanarto Santoso. 2015. *Effect of Genistein on Proinflammatory Cytokines and Estrogen receptor- β in Mice Model of Endometriosis*. Asian Pasific of Reproduction Journal ; 4(2): 96-99

Sutrisno, S., Mastryagung, D., Khairiyah, R., Tridiyawati, F., Dewi, N., Hidayati, D., Noorhamdani, N., Santoso, S., 2014. *The effects of genistein on estrogen receptor expression, cell proliferation and apoptosis in endometriosis cell culture*. Journal of Experimentasl and Integrative Medicine.4 (3) : 1-6

Sutrisno, Santoso S, Jehenara. 2014. *Pengaruh Genistein terhadap Penurunan Kadar Vascular Endothelial Growth Factor-A pada Kultur Sel Endometriosis*. Majalah Obstetri & Ginekologi; Vol 22(2): 94-100

Sutrisno, Soehartono dan Arsana Wiyasa. 2010, *Efek Genistein terhadap Ekspresi eNOS, BCL2 dan Apoptosis pada kultur sel endotel umbilikus (HUVECs) yang mengalami stres oksidatif*. Laboratorium Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya

Sutrisno, Sylvi Wafda Nur Amellia, Yuyun Yueniwati. 2016. *The expression of vascular endothelial growth factor is affected by hypoxia inducible factor-1 α in peritoneum of endometriosis mice treated with genistein*. Middle East Society Journal. 21, 180-183.

Sutrisno, Tatit Nurseta, Vera Handayani. 2010. *Perbandingan Ekspresi Reseptor Estrogen β dengan Penambahan Berbagai Dosis Genistein Pada Sel Endotel HUVEC yang Mengalami Stres Oksidatif*. Indonesian Journal Obstetric Gynecology; 34-1: 24-30

Sutrisno, Tridiyawati Feva, Yuni Dwi. 2014. *Pengaruh Genistein terhadap Ekspresi Protein Ki-67 Pada Kultur Sel Endometriosis*. Majalah Obstetri & Ginekologi; Vol 22(1): 46-52

Suzuki, A., Horiuchi, A., Oka, K., Miyamoto, T., Kashima, H., Shiozawa, T. 2010. *Immunohistochemical detection of steroid receptor cofactors in ovarian endometriosis: involvement of down-regulated SRC-1 expression in the limited growth activity of the endometriotic epithelium*. Virchows Arch , 456 : 433-441.

Syamsudin and Darmono. 2011. *Buku Ajar Farmakologi Eksperimental*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.

Takahashi H., Chen MC., Pham H., Matsuo Y., Ishiguro H., Reber HA., 2013. *Simultaneous knock-down of Bcl-xL and Mcl-1 induces apoptosis through Bax activation in pancreatic cancer cells*. Biochim Biophys Acta , 1833 : 2980-7.

Taylor R, Lebovic DI. 2010. *Physiology Pathophysiology and Clinical Management: Endometriosis*. Reproductive Endocrinology, 565-585.

Toki, T., Horiuchi, A., Li, SF., Nakayama, K., Silverberg, SG., Fujii, S. 1996. *Proliferative activity of postmenopausal endometriosis: a histopathologic and immunocytochemical study*. Int J Gynecol Pathol , 15 : 45-53.

Trivella DB., Bleicher L., Palmieri LC., Wiggers HJ., Montanari CA., Kelly JW., Lima LM., Foguel D., Polikarpov I. 2010. *Conformational differences between the wild type and V30M mutant transthyretin modulate its binding to genistein: Implications to tetramer stability and ligand-binding*. Journal of Structural Biology , Vol.170, No.3, (June 2010), pp. 522–531.

Turner H.E. and Wass J.A. 1999. *Are markers of proliferation valuable in the histological assessment of pituitary tumours? Pituitary* , 1:147-151.

Ueda M., Yamashita Y., Takehara M., Terai Y., Kumagai K., Ueki K., Kanda K., Yamaguchi H., Akise D., Hung Y.-C. and Ueki M. 2002. *Survivin gene expression in endometriosis*. J. Clin. Endocrinol. Metab , 87, 3452-3459.

Vaclav V., Antonio Simone L., Francesca Maria S., Onofrio T., Vittorio Italo P., Salvatore Giovanni V., Vincenza S., Milena K., 2016. *Regulation of apoptotic pathways during endometriosis: from the molecular basis to the future perspectives*. Arch Gynecol Obstet: 294:897–904

Vannuccini S , Claudia Tosti , Francisco Carmona, S Joseph Huang, Chapron C, Sun-Wei Guo, Felice Petraglia, 2017. *Pathogenesis of adenomyosis: an update on molecular mechanisms*. Reproductive BioMedicine Online (2017), doi: 10.1016/j.rbmo.2017.06.016

Vinothini G., Paramasivame V., Letchoumy DP., Siddavaram N., 2008. *Immunohistochemical analysis of biomarkers in patients with adenocarcinoma of the breast: correlation with menopausal status and histological grade.* Arch Med Sci 2008; 4, 2: 129–139

Velarde, MC., Aghajanova, L., Nezhat, CR., Giudice, LC. 2009. *Increased mitogen-activated protein kinase/extracellularly regulated kinase activity in human endometrial stromal fibroblasts of women with endometriosis reduces 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate inhibition of cyclin D1.* Endocrinology , 150 : 4701–4712.

Vernon MW WE., 1985. *Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat.* Fertil Steril, 44: 684-694.

Vigano, P., Parazzini, F., Somigliana, E. 2004. *Endometriosis : Epidemiology and Aetiologycal Factors.* Best Practise & Reseach Clinical Obstetrics and Gynaecology Journal , (18) 2.

Walz, E. 1931. *Isoflavon- und Saponin-Glucoside in Soja hispida.* Justus Liebigs. Ann. Chem , 489: 118.

Wang Y.N., Wu W., Chen H.C., Fang H. 2010. *Genistein protects against UVB-induced senescence-like characteristic in human dermal fibroblast by p66Shc down-regulation.* Journal of Dermatological Science , 58:19-27.

Węgrzyn, G., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Gabig-Cimińska, M., Piotrowska, E., Narajczyk, M., Kloska, A., Malinowska, M., Dziejczak, D., Gołbiewska, I., Moskot, M., Węgrzyn, A. 2010. *Genistein: a natural isoflavone with a potential for treatment of genetic diseases.* Biochemical Society Transactions , Vol.38, No.2, (April 2010), pp. 695–701, ISSN 0300-5127.

Weyhenmeyer, B., Murphy, AC., Prehn, JHM. 2012. *Targeting The Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Members for The Treatment of Cancer.* Experimental Oncology Journal , (34) : 192-199.

Wingfield M., Macpherson A., Healy DL., Rogers PA. 1995. *Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis.* Fertil Steril , 64 : 340–346.

Woodward P., S. R. 2001. *From the Archives of the AFIP: Endometriosis: Radiologic-Pathologic Correlation.* RadioGraphics, 21 : 193-216.

Xiaoli L., Xiaou X., Hao W., Xiaomei X., 2016. *Genistein modulates MMP-26 and estrogen receptor expression in endometrial cancer cells.* Journal of Traditional Chinese Medical Sciences : Vol 3, 242-247

Yamaguchi M., Gao Y.H. 1997. *Anabolic effect of genistein on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of elderly rats is inhibited by the anti-estrogen tamoxifen*. Res. Exp. Med , 197, 101.

Yang Y.M., Yang Y., Dai W.W., Li X.M., Ma J.Q., Tang L.P. 2016. *Genistein-induced apoptosis is mediated by endoplasmic reticulum stress in cervical cancer cells*. European Review for Medical and Pharmacological Sciences , 20: 3292-3296.

Yasuhara S., Asai A., Sahani ND., Martyn JA., 2007. *Mitochondria, endoplasmic reticulum, and alternative pathways of cell death in critical illness*. Crit Care Med , 35 : S488-95.

Yavuz, E1., Oktem, M., Esinler, I., Toru, SA., Zeyneloglu, HB. 2007. *Genistein causes regression of endometriotic implants in the rat model*. Fertil Steril , 88(4 Suppl):1129-34.

Yeh, TC., Chiang, PC., Li, TK., Hsu, JL., Lin, CJ., Wang, SW., Peng, 2007. *Genistein induces apoptosis in human hepatocellular carcinomas via interaction of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial insult*. Biochem Pharmacol , Mar 15;73(6):782-92. Epub 2006 Dec 3.

Yesildaglar, N. 2011. *Experimental Animal Models for Endometriosis*. Istanbul: Yeditepe University Experimenta Research Center (YUDETAM).

Yuan-jing F., Nan-shan H., Lian X. 2009. *Genistein synergizes with RNA interference inhibiting survivin for inducing DU-145 of prostate cancer cells to apoptosis*. Cancer Letters , 284: 189-197.

Zenglin L., Kenji N., Keiko T., Midori H., Jigchun G., Yasuhiro Y., Hideki M., Teruhiko T., 2001. *Preventive Effects of Isoflavones, Genistein and Daidzein, on Estradiol-17 β -related Endometrial Carcinogenesis in Mice*. Japanese Journal of Cancer Research : 92, 726-734

Zhang, H., Li, M., Zheng, X., Sun, Y., Wen, Z., Zhao, X. 2009. *Endometriotic stromal cells lose the ability to regulate cell-survival signaling in endometrial epithelial cells in vitro*. Molecular Human Reproduction, 15 : 653-663.

Zhou, JR., Gugger, ET., Tanaka, T. 1999. *Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplantable human prostate carcinoma and tumor angiogenesis in mice*. J Nutr , 129:1628-1635.

Zhou, Y., Lee, AS. 1998. *Mechanism for the suppression of the mammalian stress response by genistein, an anticancer phytoestrogen from soy*. J. Natl. Cancer. Inst. , 90, 381.

Zhdanov AV., Sukhikh GT., Davydova, MP., Slukina TV., Chernukha GE., Samoilova TE., Smetnik V P., 2003. *Correlations in the Cytokine System in Endometrial Hyperplasia*, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*; Sept; 136; 3; ProQuest pg. 270

Lampiran 1. Prosedur Pemeriksaan Immunohistokimia

Prosedur Preparasi sampel untuk pemeriksaan imunohistokimia

1. *Embedding*

- Jaringan dilakukan perendaman dalam larutan fiksatif berupa formalin 10%, kemudian direndam dalam etanol 70% minimal 24 jam dan dilanjutkan dengan etanol 80 % selama 2 jam.
- Selanjutnya jaringan direndam dalam etanol 90% dan 95% secara berurutan selama masing-masing 30 menit.
- Perendaman dilanjutkan sebanyak 3 kali dalam etanol absolut selama 30 menit (masing-masing dalam botol yang berbeda).
- Selanjutnya dilakukan perendaman jaringan dalam *xylol* sebanyak 2 kali masing-masing 30 menit.
- Proses selanjutnya dikerjakan inkubasi dalam inkubator suhu 56-58 °C selama 24 jam.
- Jaringan direndam dalam *xylol*, kemudian parafin sebanyak 3 kali, kemudian dilanjutkan dengan *embedding* dengan mencelupkan jaringan dalam parafin cair yang telah dituang dalam wadah.
- Setelah beberapa saat parafin akan memadat dan jaringan berada dalam blok parafin.

2. Pembuatan Preparat Jaringan

- Preparat pada blok paraffin hasil *embedding* dimasukkan pada penjepit (*block holder*) mikrotom dan diatur kesejajaran permukaan potong dengan mata pisau mikrotom.
- Pemotongan diawali dengan mengatur ketebalan irisan diatas 10 µm untuk mempercepat pencapaian bidang potong jaringan.
- Jaringan diiris dengan ukuran 5 µm.

- Irisan diambil dengan kuas dan dimasukkan air (suhu ruang) untuk membuka lipatan yang mungkin terjadi pada preparat.

- Hasil irisan dipindahkan dengan kuas kedalam air hangat 38-40°C untuk meluruskan kerutan halus yang ada.

- Irisan yang terentang sempurna diambil dengan gelas obyek.

- Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan diatas *hot plate* 38-40°C sampai kering, selanjutnya preparat disimpan dalam inkubator suhu 38-40°C selama 24 jam.

- Semua jaringan sampel yang tersisa selanjutnya dikumpulkan untuk dimusnahkan sesuai prosedur Laboratorium Fisiologi Reproduksi Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

3. Proses Deparafinisasi

- Kaca gelas objek hasil blok parafin direndam dalam xilol 2 kali masing-masing selama 5 menit.

- Setelah itu dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol berseri (alkohol absolut 96%, 80%, 70%, 50% dan 30%) masing-masing selama 5 menit.

- Kemudian dibilas dalam H₂O selama 5 menit.

Prosedur Pengecatan Imunohistokimia

1. Inkubasi sel pada larutan *blocking buffer* menggunakan *prediluted blocking serum* (PBS-T) dengan antibodi primer pada suhu 4°C selama 24 jam.

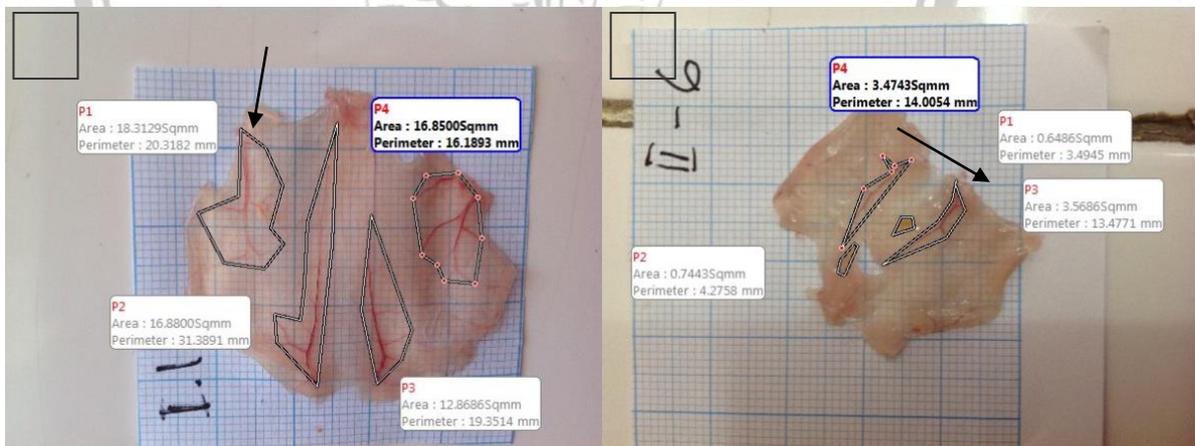
2. Dilakukan pencucian sel 3 kali dengan PBS-T masing-masing selama 5 menit. Antibodi primer yang digunakan adalah antibodi RE- α (*polyclonal rabbit anti-human ER- α*), antibodi RE- β (*polyclonal rabbit anti-human ER- β*), antibodi Bcl-2 (*monoclonal mouse anti-human Bcl-2 oncoprotein*), antibodi Bax (*anti-human-bax mouse monoclonal antibody*), antibodi

- NFKB (*monoclonal mouse anti-NFKB antibody*) dan antibodi PCNA (*monoclonal mouse anti-proliferating cell antigen*).
3. Dilakukan inkubasi sel pada larutan *blocking buffer* PBS-T dengan antibodi sekunder berlabel biotin (*Anti Rabbit IgG Biotin Labelled*) selama 1 jam pada suhu ruang.
 4. Dilakukan pencucian sel 3 kali dengan PBS-T pH 7,4 masing-masing selama 5 menit.
 5. Ditambah dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horseradish Peroxidase*) selama 40 menit.
 6. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Kemudian ditambah kromogen DAB (*Diamono Benzidine*) selama 10-20 menit pada suhu ruang. Preparat dibilas dengan aquades selama 3x5 menit. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Dilakukan counterstaining dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit dan dicuci dengan air keran.
 7. Preparat dikering-anginkan dan dilakukan *mounting* dengan satu tetes *mounting medium* (*Entellan*) dijatuhkan ke atas preparat. *Cover glass* ditutupkan ke atas preparat yang telah diberi *mounting medium*.
 8. Ekspresi RE- α , RE- β , PCNA, Bax, dan Bcl-2 diamati dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x.

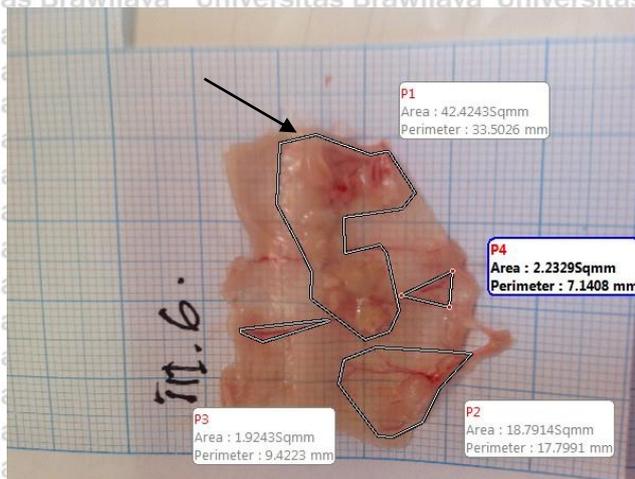
Lampiran 2

DATA PENGUKURAN LUAS IMPLAN PADA PERITONEUM

| NO SAMPEL | KEL.1 KEROKAN ENDO | KEL.2 DINDING KISTA | KEL.3 UTERUS ENDO |
|----------------|--------------------|---------------------|-------------------|
| 1 | 42.3228 | 16.0699 | 27.3528 |
| 2 | 21.1756 | 17.4542 | 38.18 |
| 3 | 20.6155 | 4.7986 | 51.0828 |
| 4 | 18.1514 | 8.8256 | 13.3314 |
| 5 | 29.9815 | 8.4358 | 12.0671 |
| 6 | 14.97 | 12.6429 | 65.3729 |
| 7 | 16.1486 | 13.4543 | 46.8085 |
| 8 | 24.62 | 11.0257 | 61.4657 |
| 9 | 18.24 | 4.2484 | 60.2371 |
| 10 | 13.5829 | 9.8814 | 51.6457 |
| RERAT A | 21.98083 | 10.68368 | 42.7544 |



Gambar 1. Pengukuran luas hipervaskularisasi pada mencit model endometriosis yang diberi kerokan endometriosis (A) dan ekstrak dinding kista (B)



Gambar 2 . Pengukuran luas hipervaskularisasi dan lesi pada mencit model endometriosis yang diberi ekstrak uterus endometriosis



Lampiran 3: Total luas area endometriosis dan hipervaskularisasi

| KELOMPOK | KODE | TOTAL LUAS AREA ENDOMETRIOSIS | TOTAL PANJANG HIPERVASKULARISASI |
|-----------|-----------|-------------------------------|----------------------------------|
| K+ | 1 | 104,58 mm | 101,07 mm |
| | 9 | 8,48 mm | 91,25 mm |
| | 10 | 22,62 mm | 16,58 mm |
| | 11 | 48,48 mm | 31,83 mm |
| | 12 | 55,98 mm | 70,6 mm |
| | 13 | 17,04 mm | 105,64 mm |
| P1 | 1 | 15,06 mm | 11,74 mm |
| | 2 | 69,71 mm | |
| | 4 | 7,72 mm | 96,37 mm |
| | 5 | 47,02 mm | 34,62 mm |
| | 7 | 10,56 mm | 13,49 mm |
| | 8 | - | 55,2 mm |
| P2 | 1 | 23,23 mm | 11,76 mm |
| | 2 | 18,47 mm | |
| | 3 | 44,90 mm | 46 mm |
| | 4 | 14,71 mm | 58,75 mm |
| | 6 | 53,92 mm | 56,8 mm |
| | P3 | 1 | 6,43 mm |
| 3 | | 12,84 mm | 42,71 mm |
| 4 | | 5,56 mm | 22,23 mm |
| 5 | | 4,64 mm | 30,83 mm |
| 6 | | 49,71 mm | 34,38 mm |
| 8 | | 14,24 mm | 9,60 mm |
| P4 | 1 | - | 82,42 mm |
| | 2 | 13,42 mm | 39,7 mm |
| | 3 | 4,43 mm | 32,40 mm |
| | 5 | 12,48 mm | 9,32 mm |
| | 6 | 26,71 mm | 28,8 mm |

Lampiran 4



Laboratorium Patologi Veteriner

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5992785,
Fax (031) 5993015; email : fkh@unair.ac.id

HASIL PEMERIKSAAN HISTOPATOLOGI

Nama Pemilik : Dr. Sutrisno
Instansi : FKH Unair
Alamat :
Telepon :
Sediaan : Peritonium
Pewarnaan : HE
Waktu Pemeriksaan : 2 Oktober 2014
Pemeriksa : Djoko Legowo, MKes., drh

Metode Pemeriksaan

Pemeriksaan ini bertujuan untuk mengetahui derajat kerusakan pada peritoneum. Metode skoring derajat kerusakan peritonium dilakukan menurut metode Klopffleisch (2013) yang telah dimodifikasi, dimana derajat kerusakan ditentukan dengan cara menjumlahkan seluruh skor dari lesi-lesi histopatologik seperti pada tabel 1. dibawah ini.

| BENTUK LESI | SKOR | KETERANGAN |
|------------------------------|------|---|
| Infiltrasi Sel Radang | 0 | Tidak terdapat infiltrasi sel radang |
| | 1 | Jumlah infiltrasi sel radang < 10 pada 5 LP (400x) |
| | 2 | Jumlah infiltrasi sel radang antara 11-50 pada 5 LP (400x) |
| | 3 | Jumlah infiltrasi sel radang antara 51-100 pada 5 LP (400x) |
| | 4 | Jumlah infiltrasi sel radang antara > 100 pada 5 LP (400x) |

| BENTUK LESI | SKOR | KETERANGAN |
|--|------|--|
| Granuloma | 0 | Tidak terdapat masa granuloma |
| | 2 | jika terdapat masa granuloma |
| | 4 | jika terdapat masa granuloma disertai abses |
| | 6 | jika terdapat masa granuloma disertai abses dan nekrosis jaringan otot |
| | 8 | jika terdapat masa granuloma disertai abses, nekrosis jaringan otot dan fibrosis |
| total derajat kerusakan merupakan jumlah total dari dua lesi diatas dimana interval derajat kerusakan adalah 0 - 12 | | |

Seluruh pemeriksaan ini menggunakan mikroskop cahaya biasa merk *Nikon H600L* yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel dan *soft ware* pengolah gambar Nikon Image System.

Surabaya, 2 Oktober 2014
Pemeriksa,

(Djoko Legowo, MKes., drh)
NIP. 1967 1214 199603 1 004

Sumber :
Klopfleisch R. 2013. Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology - a systematic review. *Veterinary Research*, 9:123.

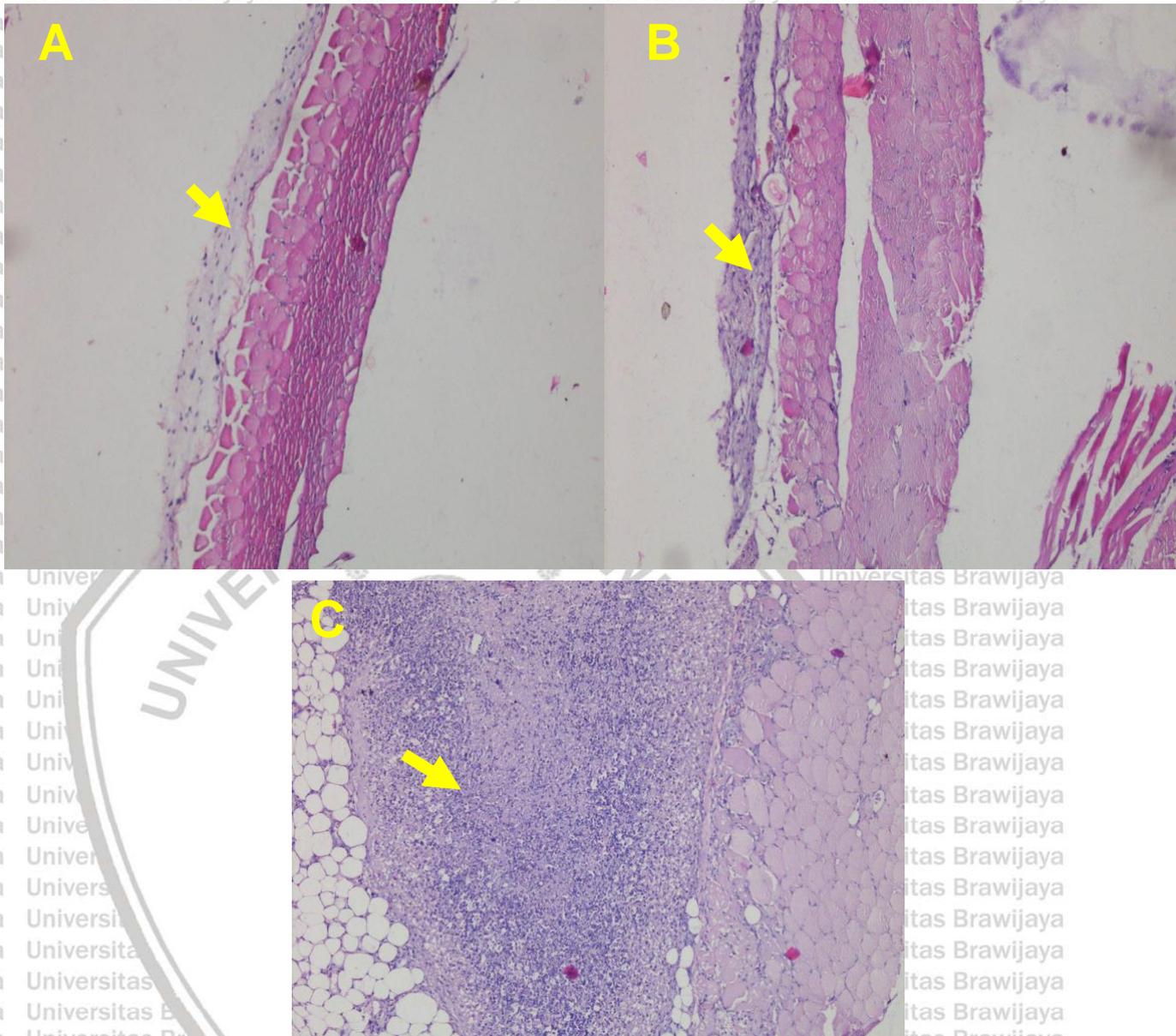
Hasil pemeriksaan infiltrasi sel radang dan granuloma

| NO | KODE PREPARAT | SKOR | | TOTAL SKOR | KETERANGAN |
|---------------|---------------|-----------------------|-----------|------------|------------|
| | | INFILTRASI SEL RADANG | GRANULOMA | | |
| 1 | P1.1 | 0 | 0 | 0 | |
| 2 | P1.2 | 2 | 0 | 2 | |
| 3 | P1.3 | 0 | 0 | 0 | |
| 4 | P1.4 | 2 | 0 | 2 | |
| 5 | P1.5 | 0 | 0 | 0 | |
| 6 | P1.6 | 1 | 0 | 1 | |
| 7 | P1.7 | 2 | 0 | 2 | |
| 8 | P1.8 | 1 | 0 | 1 | |
| 9 | P1.9 | 1 | 0 | 1 | |
| 10 | P1.10 | 0 | 0 | 0 | |
| 11 | P1.11 | 1 | 0 | 1 | |
| 12 | P1.12 | - | - | | |
| RERATA | | | | 0.9 | |

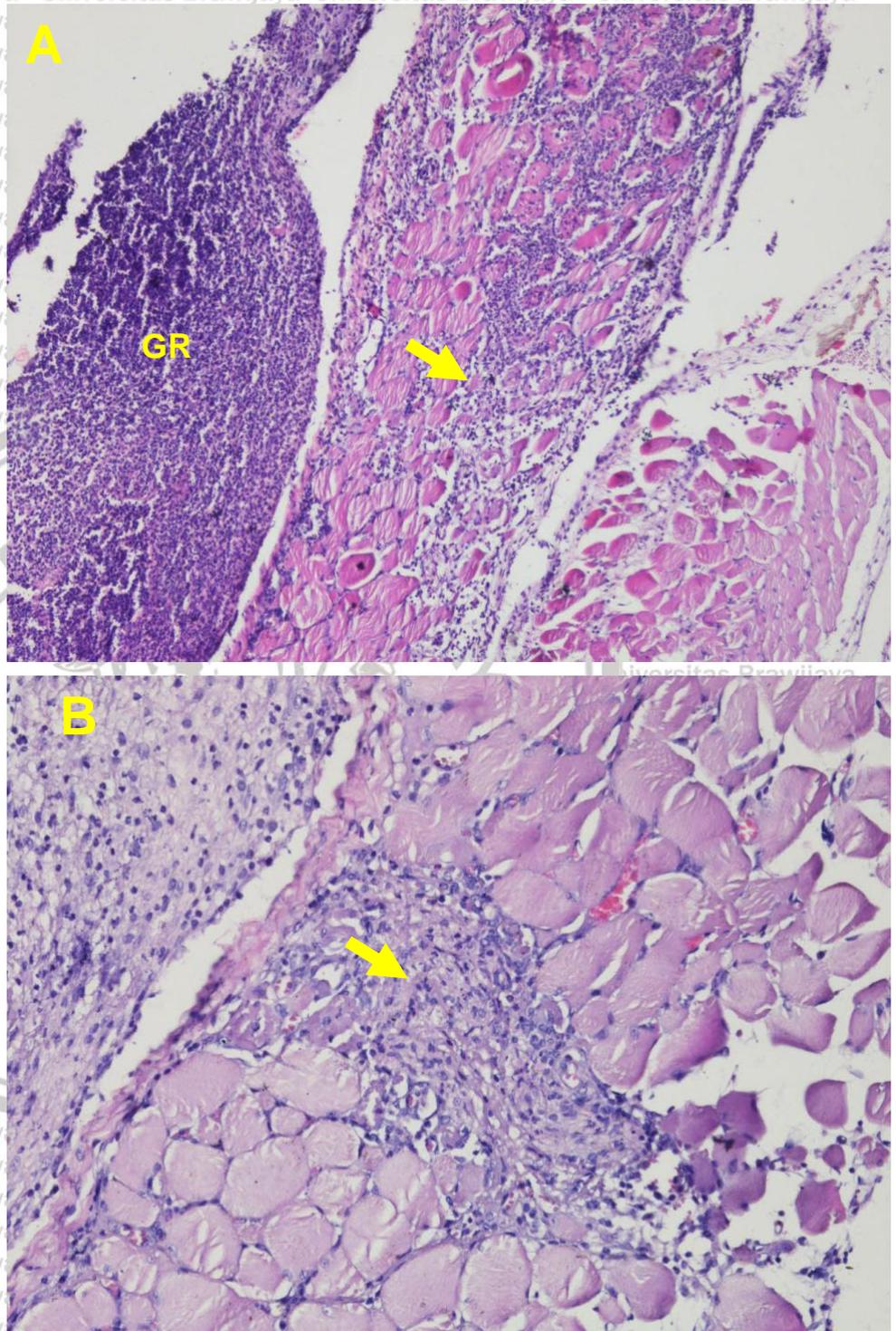
| NO | KODE PREPARAT | SKOR | | TOTAL SKOR | KETERANGAN |
|---------------|---------------|-----------------------|-----------|-------------|------------|
| | | INFILTRASI SEL RADANG | GRANULOMA | | |
| 1 | P2.1 | 1 | 0 | 1 | |
| 2 | P2.2 | 1 | 0 | 1 | |
| 3 | P2.3 | 3 | 2 | 5 | |
| 4 | P2.4 | 1 | 0 | 1 | |
| 5 | P2.5 | 0 | 0 | 0 | |
| 6 | P2.6 | 2 | 0 | 2 | |
| 7 | P2.7 | 1 | 0 | 1 | |
| 8 | P2.8 | 1 | 0 | 1 | |
| 9 | P2.9 | 3 | 0 | 3 | |
| 10 | P2.10 | 2 | 0 | 2 | |
| 11 | P2.11 | 3 | 2 | 5 | |
| 12 | P2.12 | 1 | 0 | 1 | |
| RERATA | | | | 1.91 | |

| NO | KODE PREPARAT | SKOR | | TOTAL SKOR | KETERANGAN |
|---------------|---------------|-----------------------|-----------|------------|------------|
| | | INFILTRASI SEL RADANG | GRANULOMA | | |
| 1 | P3.1 | 4 | 6 | 10 | |
| 2 | P3.2 | 4 | 6 | 10 | |
| 3 | P3.3 | 4 | 6 | 10 | |
| 4 | P3.4 | 4 | 8 | 12 | |
| 5 | P3.5 | 4 | 4 | 8 | |
| 6 | P3.6 | 4 | 6 | 10 | |
| 7 | P3.7 | 4 | 8 | 12 | |
| 8 | P3.8 | 4 | 8 | 12 | |
| 9 | P3.9 | 2 | 0 | 2 | |
| 10 | P3.10 | 3 | 2 | 5 | |
| 11 | P3.11 | - | - | - | |
| 12 | P3.12 | - | - | - | |
| RERATA | | | | 9.1 | |

Hasil pemeriksaan Sel radang dan Granuloma



Gambar 1. Menunjukkan perbedaan perubahan hitopatologis diantara perlakuan. Pada kelompok A dan B peradangan umumnya bersifat ringan dengan skor antara 1 hingga 5, sedangkan pada perlakuan C secara umum terjadi peradangan berat, dimana beberapa diantaranya diikuti dengan kematian sel-sel miosit dan pembentukan jaringan ikat fibrous (pewarnaan HE. Pembesaran 100x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel).



Gambar 2. Slide A menunjukkan masa granuloma (GR) dan infiltrasi massive sel-sel radang pada jaringan otot (panah). B pembentukan jaringan ikat fibrous (panah) diantara masa sel otot (pewarnaan HE. Pembesaran 200x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel).



Laboratorium Patologi Veteriner

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5992785,
Fax (031) 5993015; email : fkh@unair.ac.id

HASIL PEMERIKSAAN IMMUNOHISTOKIMIA RESEPTOR ESTROGEN ALFA

Nama Pemilik : DR. SUTRISNO
Instansi : FKH UNAIR
Alamat :
Telepon :
Sediaan : PERITONIUM
Pewarnaan : Immunohistokimia Reseptor Estrogen Alfa
Waktu Pemeriksaan : 16 September 2014
Pemeriksa : Djoko Legowo, MKes., drh

Metode Pemeriksaan

Pemeriksaan immunohistokimia ini dimaksudkan untuk mengetahui ekspresi reseptor estrogen alfa pada peritonium. Ekspresi reseptor estrogen alfa pada setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut metode Remmele yang sudah dimodifikasi (Novak *et al.*, 2007), dimana Indeks skala Remmele (*Immuno Reactive Score/IRS*) merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif (tabel 1). Data setiap sampel merupakan nilai rata-rata IRS yang teramati pada 5 (lima) Lapangan Pandang (LP) berbeda pada pembesaran 400x. Seluruh pemeriksaan ini menggunakan mikroskop cahaya biasa merk *Nikon H600L* yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel dan *soft ware* pengolah gambar *Nikkon Image System*.

Tabel 1. Skala semikuantitatif IRS merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel positif (A) dengan Skor Intensitas reaksi warna (B), jadi $IRS = (A \times B)$

| A | B |
|---|----------------------------------|
| Skor 0 : tidak ada sel positif | Skor 0 : tidak ada reaksi warna |
| Skor 1 : Sel positif kurang dari 10% | Skor 1 : Intensitas warna rendah |
| Skor 2 : Sel positif antara dari 11% - 50% | Skor 2 : Intensitas warna sedang |
| Skor 3 : Sel positif antara dari 51% - 80% | Skor 3 : Intensitas warna kuat |
| Skor 4 : Sel positif antara dari lebih dari 80% | |

Surabaya, 2 Oktober 2014

Pemeriksa,

(Djoko Legowo, Mkes., drh)

NIP. 196712141996031001



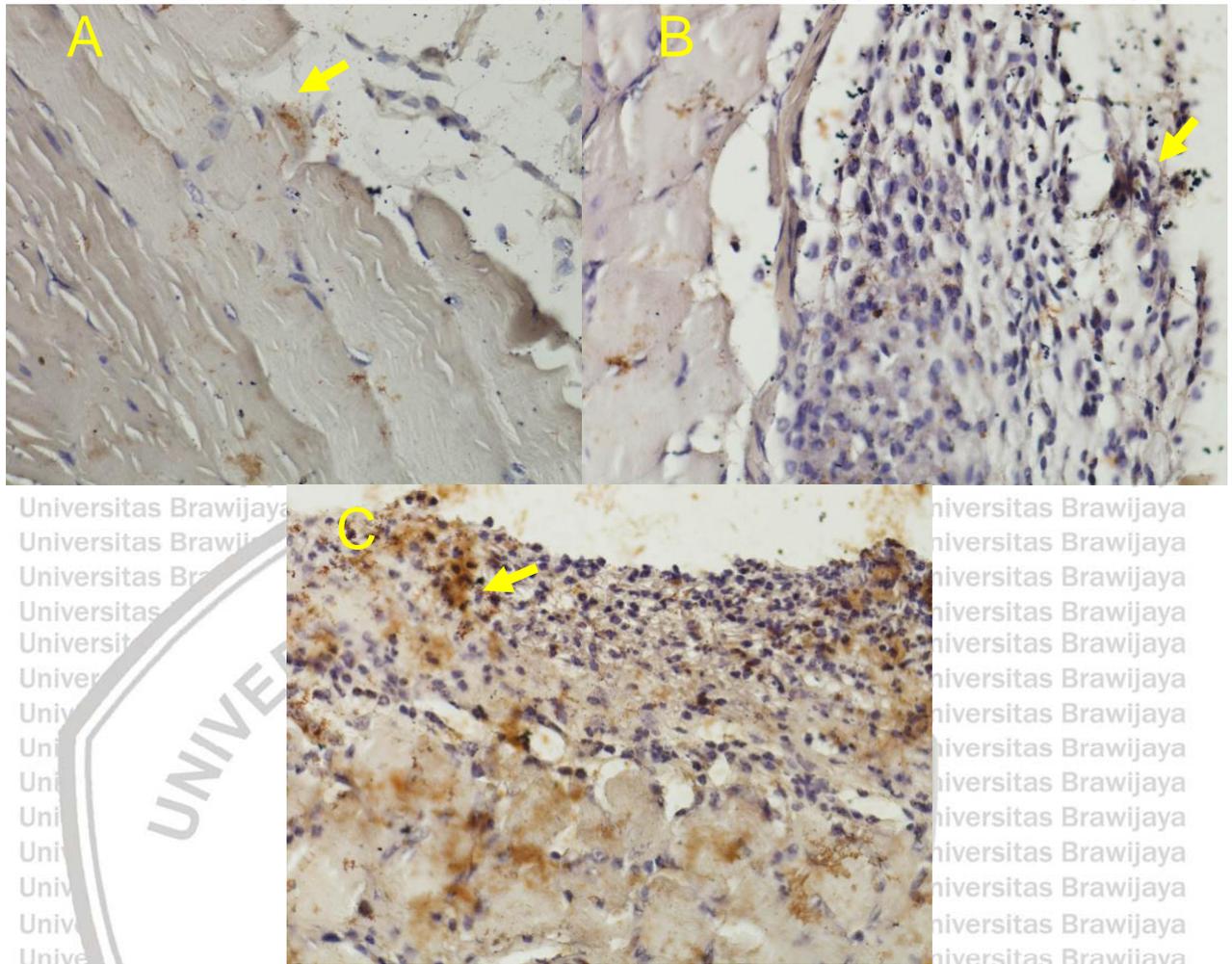
Referensi : Novak M, Madej JA, Dziegeil P. 2007 Intensity of Cox 2 expression inCell of Soft Tissue Fibrosarcomas in Dog As Related to Grade of Tumor malignation. Bull Vet inst Pulawy 51, 275-279. 2007

| NO | KODE PREPARAT | Immuno Reactive Score (IRS) /LP | | | | | Rerata Skor | KETERANGAN |
|---------------|------------------|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|----------------|------------|
| | | LP1 | LP2 | LP3 | LP4 | LP5 | | |
| 1 | P1.1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.4 | |
| 2 | P1.2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.4 | |
| 3 | P1.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 4 | P1.4 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0.6 | |
| 5 | P1.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 6 | P1.6 | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1.2 | |
| 7 | P1.7 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0.8 | |
| 8 | P1.8 | 4 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1.4 | |
| 9 | P1.9 | 2 | 3 | 1 | 0 | 0 | 1.2 | |
| 10 | P1.10 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.4 | |
| 11 | P1.11 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | |
| 12 | P1.12 | - | - | - | - | - | - | |
| Rerata | | | | | | | 0.67 | |

| NO | KODE PREPARAT | Immuno Reactive Score (IRS) /LP | | | | | Rerata Skor | KETERANGAN |
|----|------------------|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|----------------|------------|
| | | LP1 | LP2 | LP3 | LP4 | LP5 | | |
| 1 | P2.1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 0 | 1.6 | |
| 2 | P2.2 | 4 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2.6 | |
| 3 | P2.3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2 | |
| 4 | P2.4 | 4 | 3 | 2 | 2 | 1 | 2.4 | |
| 5 | P2.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 6 | P2.6 | - | - | - | - | - | - | |
| 7 | P2.7 | 3 | 2 | 2 | 0 | 0 | 1.4 | |
| 8 | P2.8 | 6 | 3 | 3 | 3 | 0 | 3 | |
| 9 | P2.9 | 4 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1.4 | |
| 10 | P2.10 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1.2 | |

| | | | | | | | |
|---------------|-------|---|---|---|---|---|-------------|
| 11 | P2.11 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.4 |
| 12 | P2.12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Rerata | | | | | | | 1.29 |

| NO | KODE PREPARAT | Immuno Reactive Score (IRS) /LP | | | | | Rerata Skor | KETERANGAN |
|---------------|------------------|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|----------------|------------|
| | | LP1 | LP2 | LP3 | LP4 | LP5 | | |
| 1 | P3.1 | 12 | 12 | 12 | 6 | 6 | 9.6 | |
| 2 | P3.2 | 12 | 12 | 12 | 12 | 9 | 11.4 | |
| 3 | P3.3 | 9 | 6 | 6 | 3 | 3 | 5.4 | |
| 4 | P3.4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 0 | 3 | |
| 5 | P3.5 | 12 | 6 | 3 | 3 | 3 | 5.4 | |
| 6 | P3.6 | 12 | 9 | 6 | 3 | 0 | 6 | |
| 7 | P3.7 | 9 | 6 | 6 | 3 | 0 | 4.8 | |
| 8 | P3.8 | 12 | 9 | 6 | 6 | 6 | 7.8 | |
| 9 | P3.9 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| 10 | P3.10 | - | - | - | - | - | - | |
| 11 | P3.11 | - | - | - | - | - | - | |
| 12 | P3.12 | - | - | - | - | - | - | |
| Rerata | | | | | | | 6.27 | |



Gambar 1. Perbandingan ekspresi reseptor estrogen alfa (panah) pada sel mesotel peritonium dan sel radang diantara kelompok perlakuan. Pada slide diatas nampak bahwa ekspresi reseptor estrogen alfa paling kuat terjadi pada kelompok P3 diikuti dengan P2 dan P1 (pewarnaan *immuno histokimia*, Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel)

Lampiran 6



Laboratorium Patologi Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5992785,
Fax (031) 5993015; email : fkh@unair.ac.id

HASIL PEMERIKSAAN IMMUNOHISTOKIMIA RESEPTOR ESTROGEN BETA

Nama Pemilik : DR. SUTRISNO
Instansi : FKH. UNAIR
Alamat :
Telepon :
Sediaan : PERITONIUM
Pewarnaan : Immunohistokimia Reseptor Estrogen Beta
Waktu Pemeriksaan : 16 September 2014
Pemeriksa : Djoko Legowo, MKes., drh

Metode Pemeriksaan

Pemeriksaan histopatologi ini dimaksudkan untuk mengetahui ekspresi **reseptor estrogen beta** pada peritonium. Ekspresi **reseptor estrogen beta** pada setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut metode Remmele yang sudah dimodifikasi (Novak *et al.*, 2007), dimana Indeks skala Remmele (*Immuno Reactive Score/IRS*) merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif (tabel 1). Data setiap sampel merupakan nilai rata-rata IRS yang teramati pada 5 (lima) Lapangan Pandang (LP) berbeda pada pembesaran 400x. Seluruh pemeriksaan ini menggunakan mikroskop cahaya biasa merk *Nikon H600L* yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel dan *soft ware* pengolah gambar Nikkon Image System.

Tabel1. Skala semikuantitatif IRS merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel positif (A) dengan Skor Intesitas reaksi warna (B), jadi $IRS = (A \times B)$

| A | B |
|---|----------------------------------|
| Skor 0 : tidak ada sel positif | Skor 0 : tidak ada reaksi warna |
| Skor 1 : Sel positif kurang dari 10% | Skor 1 : Intensitas warna rendah |
| Skor 2 : Sel positif antara dari 11% - 50% | Skor 2 : Intensitas warna sedang |
| Skor 3 : Sel positif antara dari 51% - 80% | Skor 3 : Intensitas warna kuat |
| Skor 4 : Sel positif antara dari lebih dari 80% | |

Surabaya, 2 Oktober 2014
Pemeriksa,

(Djoko Legowo, Mkes., drh)
NIP. 196712141996031001

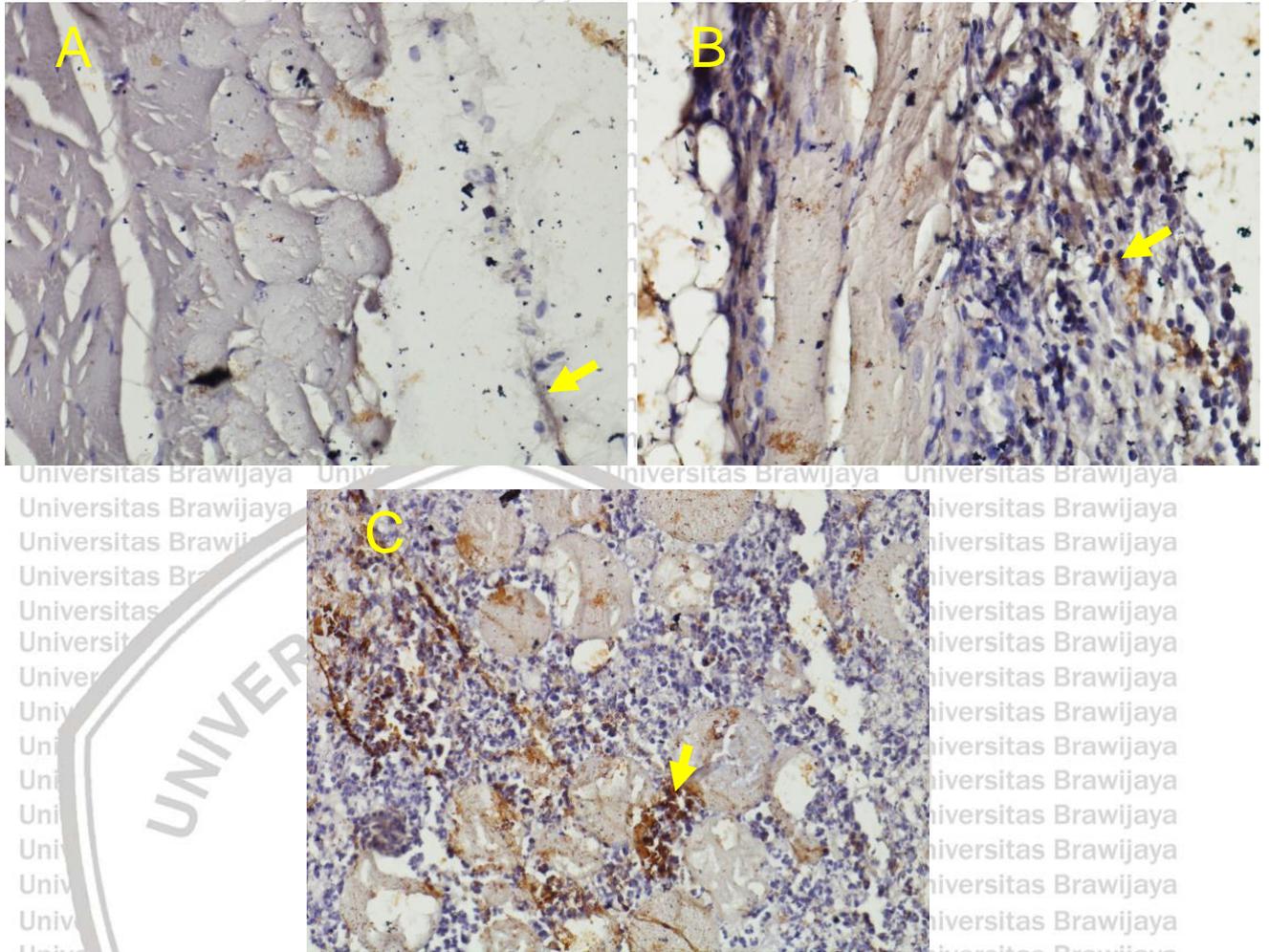
Referensi : Novak M, Madej JA, Dziegeil P. 2007 Intensity of Cox 2 expression inCell of Soft Tissue Fibrosarcomas in Dog As Related to Grade of Tumor malignation. Bull Vet inst Pulawy 51, 275-279. 2007

| NO | KODE PREPARAT | Immuno Reactive Score (IRS) /LP | | | | | Rerata Skor | KETERANGAN |
|---------------|------------------|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|----------------|------------|
| | | LP1 | LP2 | LP3 | LP4 | LP5 | | |
| 1 | P1.1 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.8 | |
| 2 | P1.2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | |
| 3 | P1.3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.4 | |
| 4 | P1.4 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.6 | |
| 5 | P1.5 | 3 | 3 | 3 | 2 | 0 | 2.2 | |
| 6 | P1.6 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.8 | |
| 7 | P1.7 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.8 | |
| 8 | P1.8 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.6 | |
| 9 | P1.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 10 | P1.10 | 6 | 3 | 3 | 3 | 0 | 3 | |
| 11 | P1.11 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.6 | |
| 12 | P1.12 | - | - | - | - | - | - | |
| Rerata | | | | | | | 0.98 | |

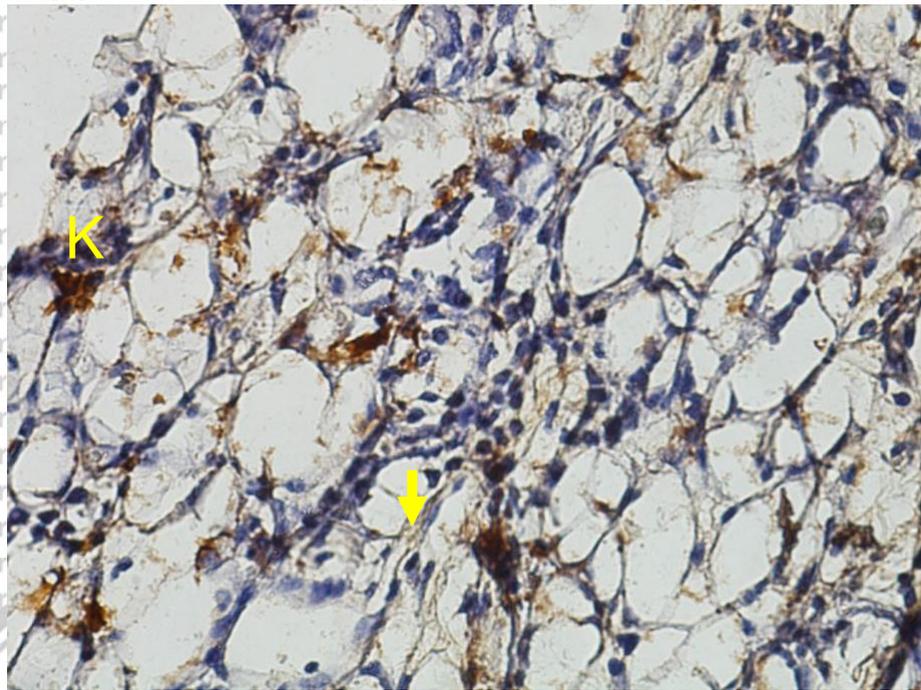
| NO | KODE PREPARAT | Immuno Reactive Score (IRS) /LP | | | | | Rerata Skor | KETERANGAN |
|----|------------------|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|----------------|------------|
| | | LP1 | LP2 | LP3 | LP4 | LP5 | | |
| 1 | P2.1 | 6 | 3 | 3 | 2 | 1 | 2.4 | |
| 2 | P2.2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2 | |
| 3 | P2.3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.4 | |
| 4 | P2.4 | 12 | 9 | 6 | 3 | 0 | 6 | |
| 5 | P2.5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2 | |
| 6 | P2.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 7 | P2.7 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | |
| 8 | P2.8 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2.2 | |
| 9 | P2.9 | 3 | 3 | 1 | 1 | 0 | 1.6 | |
| 10 | P2.10 | 8 | 2 | 2 | 1 | 0 | 2.6 | |

| | | | | | | | |
|---------------|-------|---|---|---|---|---|----------|
| 11 | P2.11 | 9 | 9 | 6 | 6 | 3 | 6.6 |
| 12 | P2.12 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0.8 |
| Rerata | | | | | | | 2 |

| NO | KODE PREPARAT | Immuno Reactive Score (IRS) /LP | | | | | Rerata Skor | KETERANGAN |
|---------------|------------------|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|----------------|------------|
| | | LP1 | LP2 | LP3 | LP4 | LP5 | | |
| 1 | P3.1 | 12 | 12 | 9 | 6 | 2 | 8.2 | |
| 2 | P3.2 | 8 | 6 | 3 | 3 | 3 | 4.6 | |
| 3 | P3.3 | 9 | 8 | 8 | 3 | 2 | 6 | |
| 4 | P3.4 | 9 | 6 | 3 | 3 | 3 | 4.8 | |
| 5 | P3.5 | 9 | 8 | 6 | 3 | 3 | 5.8 | |
| 6 | P3.6 | 3 | 3 | 3 | 2 | 0 | 2.2 | |
| 7 | P3.7 | 12 | 12 | 12 | 9 | 6 | 10.2 | |
| 8 | P3.8 | 12 | 9 | 6 | 6 | 3 | 7.2 | |
| 9 | P3.9 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.6 | |
| 10 | P3.10 | 9 | 6 | 3 | 1 | 0 | 3.8 | |
| 11 | P3.11 | - | - | - | - | - | - | |
| 12 | P3.12 | - | - | - | - | - | - | |
| Rerata | | | | | | | 5.34 | |



Gambar 1. Perbandingan **reseptor estrogen beta** pada sel-sel mesotel dan sel radang (panah) diantara kelompok perlakuan. Ekspresi **reseptor estrogen beta** paling kuat ditemukan pada kelompok P3 diikuti oleh P2 dan P1 (pewarnaan *immuno histokimia*, Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel)



Gambar 1. Perbandingan ekspresi NFκB (panah) antara kelompok K dan P. (pewarnaan immuno histokimia, Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel)

Lampiran 7



Laboratorium Patologi Veteriner
 Fakultas Kedokteran Hewan
 Universitas Airlangga
 Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5992785,
 Fax (031) 5993015; email : fkh@unair.ac.id

HASIL PEMERIKSAAN IMMUNOHISTOKIMIA RESEPTOR PROGESTERON

Nama Pemilik : DR.SUTRISNO
 Instansi : FKH. UNAIR
 Alamat :
 Telepon :
 Sediaan : PERITONIUM
 Pewarnaan : Immunihistokimia Reseptor progesteron
 Waku Pemeriksaan : 16 September 2014
 Pemeriksa : Djoko Legowo, MKes., drh

Metode Pemeriksaan

Pemeriksaan Immunohistokimia ini dimaksudkan untuk mengetahui ekspresi **Reseptor progesteron** pada peritonium. Ekspresi **Reseptor progesteron** pada setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut metode Remmele yang sudah dimodifikasi (Novak *et al.*, 2007), dimana Indeks skala Remmele (*Immuno Reactive Score/IRS*) merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif (tabel 1). Data setiap sampel merupakan nilai rata-rata IRS yang teramati pada 5 (lima) Lapangan Pandang (LP) berbeda pada pembesaran 400x. Seluruh pemeriksaan ini menggunakan mikroskop cahaya biasa merk *Nikon H600L* yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel dan *soft ware* pengolah gambar Nikkon Image System.

Tabel1. Skala semikuantitatif IRS merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel positif (A) dengan Skor Intesitas reaksi warna (B), jadi $IRS = (A \times B)$

| A | B |
|---|----------------------------------|
| Skor 0 : tidak ada sel positif | Skor 0 : tidak ada reaksi warna |
| Skor 1 : Sel positif kurang dari 10% | Skor 1 : Intensitas warna rendah |
| Skor 2 : Sel positif antara dari 11% - 50% | Skor 2 : Intensitas warna sedang |
| Skor 3 : Sel positif antara dari 51% - 80% | Skor 3 : Intensitas warna kuat |
| Skor 4 : Sel positif antara dari lebih dari 80% | |

Surabaya, 2 Oktober 2014
 Pemeriksa,

(Djoko Legowo, Mkes., drh)
 NIP. 196712141996031001

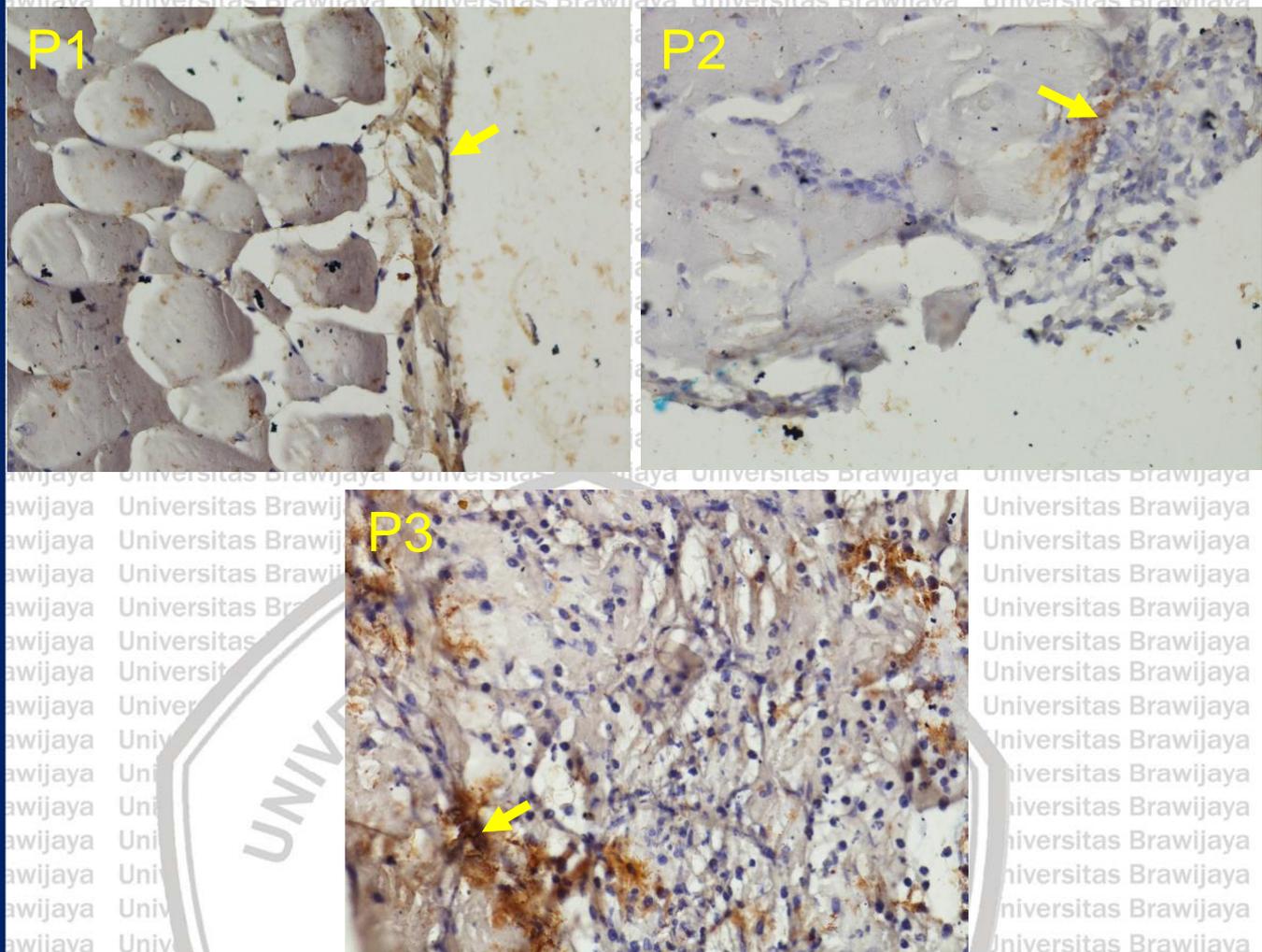
Referensi : Novak M, Madej JA, Dziegeil P. 2007 Intensity of Cox 2 expression inCell of Soft Tissue Fibrosarcomas in Dog As Related to Grade of Tumor malignation. Bull Vet inst Pulawy 51, 275-279. 2007

| NO | KODE PREPARAT | Immuno Reactive Score (IRS) /LP | | | | | Rerata Skor | KETERANGAN |
|---------------|------------------|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|----------------|------------|
| | | LP1 | LP2 | LP3 | LP4 | LP5 | | |
| 1 | P1.1 | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 1.4 | |
| 2 | P1.2 | - | - | - | - | - | - | |
| 3 | P1.3 | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 1.4 | |
| 4 | P1.4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.6 | |
| 5 | P1.5 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0 | 1.8 | |
| 6 | P1.6 | 9 | 3 | 3 | 3 | 0 | 3.6 | |
| 7 | P1.7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 8 | P1.8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 9 | P1.9 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0.8 | |
| 10 | P1.10 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1.2 | |
| 11 | P1.11 | 6 | 4 | 3 | 3 | 0 | 3.2 | |
| 12 | P1.12 | - | - | - | - | - | - | |
| Rerata | | | | | | | 1.4 | |

| NO | KODE PREPARAT | Immuno Reactive Score (IRS) /LP | | | | | Rerata Skor | KETERANGAN |
|----|------------------|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|----------------|------------|
| | | LP1 | LP2 | LP3 | LP4 | LP5 | | |
| 1 | P2.1 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | |
| 2 | P2.2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.6 | |
| 3 | P2.3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2 | |
| 4 | P2.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 5 | P2.5 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | |
| 6 | P2.6 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.6 | |
| 7 | P2.7 | 3 | 3 | 2 | 0 | 0 | 1.6 | |
| 8 | P2.8 | 4 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1.4 | |
| 9 | P2.9 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 2.4 | |
| 10 | P2.10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

| | | | | | | | |
|---------------|-------|---|---|---|---|---|-------------|
| 11 | P2.11 | 3 | 3 | 3 | 0 | 0 | 1.8 |
| 12 | P2.12 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1.2 |
| Rerata | | | | | | | 0.99 |

| NO | KODE PREPARAT | Immuno Reactive Score (IRS) /LP | | | | | Rerata Skor | KETERANGAN |
|---------------|------------------|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|----------------|------------|
| | | LP1 | LP2 | LP3 | LP4 | LP5 | | |
| 1 | P3.1 | 9 | 6 | 6 | 3 | 3 | 5.4 | |
| 2 | P3.2 | 12 | 9 | 6 | 3 | 3 | 6.6 | |
| 3 | P3.3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 0 | 2.4 | |
| 4 | P3.4 | 9 | 9 | 6 | 6 | 6 | 7.2 | |
| 5 | P3.5 | 6 | 3 | 3 | 2 | 2 | 3.2 | |
| 6 | P3.6 | 9 | 6 | 6 | 6 | 3 | 6 | |
| 7 | P3.7 | 9 | 9 | 9 | 9 | 3 | 7.8 | |
| 8 | P3.8 | 6 | 4 | 4 | 3 | 2 | 3.8 | |
| 9 | P3.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 10 | P3.10 | 12 | 12 | 9 | 3 | 3 | 7.8 | |
| 11 | P3.11 | - | - | - | - | - | - | |
| 12 | P3.12 | - | - | - | - | - | - | |
| Rerata | | | | | | | 5.02 | |



Gambar 1. Perbandingan ekspresi **Reseptor progesteron** (panah) pada lapisan mesotel peritonium diantara kelompok perlakuan. Ekspresi **Reseptor progesteron** pada lapisan mesotel peritonium kelompok P3 lebih kuat dibandingkan P2 dan P1 (pewarnaan *immuno-histokimia*, Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel)

**PENGARUH GENISTEIN TERHADAP PROLIFERASI DAN APOPTOSIS
SEL ENDOMETRIOSIS MELALUI PERUBAHAN RASIO RESEPTOR
ESTROGEN ALFA DAN RESEPTOR ESTROGEN BETA DAN NFK- β
STUDI PADA MENCIT MODEL ENDOMETRIOSIS**

DISERTASI

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Doktor



Oleh
SUTRISNO
NIM. 12707010011012

**PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
KEKHUSUSAN BIOMEDIK**

**PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

DISERTASI
PENGARUH GENISTEIN TERHADAP PROLIFERASI DAN APOPTOSIS
SEL ENDOMETRIOSIS MELALUI PERUBAHAN RASIO RESEPTOR
ESTROGEN ALFA DAN RESEPTOR ESTROGEN BETA DAN NFK- β
STUDI PADA MENCIT MODEL ENDOMETRIOSIS

Oleh

SUTRISNO

Dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal:
Dan dinyatakan memenuhi syarat

Komisi Pembimbing

Promotor

Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes

Ko-promotor 1

Ko-promotor 2

Dr. dr. I Wyan Arsana SpOG(K)

Dr.dr. Umi Kalsum, M Kes

Penguji 1

Penguji 2

Penguji luar

Prof.Dr.dr.Noorhamdani AS,
DMM., SpMK(K)

dr. Hidajat Suyuti,
PhD, SpM.

Dr.dr.Hendy Hendarto
SpOG.K

Malang,
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan

Dr.dr. Wisnu Barlianto, SpA (K)

IDENTITAS TIM PENGUJI DISERTASI

Judul Disertasi :

PENGARUH GENISTEIN TERHADAP PROLIFERASI DAN APOPTOSIS SEL ENDOMETRIOSIS MELALUI PERUBAHAN RASIO RESEPTOR ESTROGEN ALFA DAN RESEPTOR ESTROGEN BETA DAN NFK- β STUDI PADA MENCIT MODEL ENDOMETRIOSIS

NAMA : SUTRISNO

NIM : 127070100111012

PROGRAM STUDI : Doktor Ilmu Kedokteran

MINAT : Biomedik

KOMISI PEMBIMBING

Promotor : Dr. dr. Sri Andarini, MKes

Ko-Promotor 1 : Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG.K

Ko-Promotor 2 : Dr. dr. Umi Kalsum, MKes

TIM PENGUJI

Penguji 1 : Prof. Dr.dr. Noorhamdani AS, DMM.SpMK(K)

Penguji 1 : dr. Hidajat Suyuti, PhD.SpM

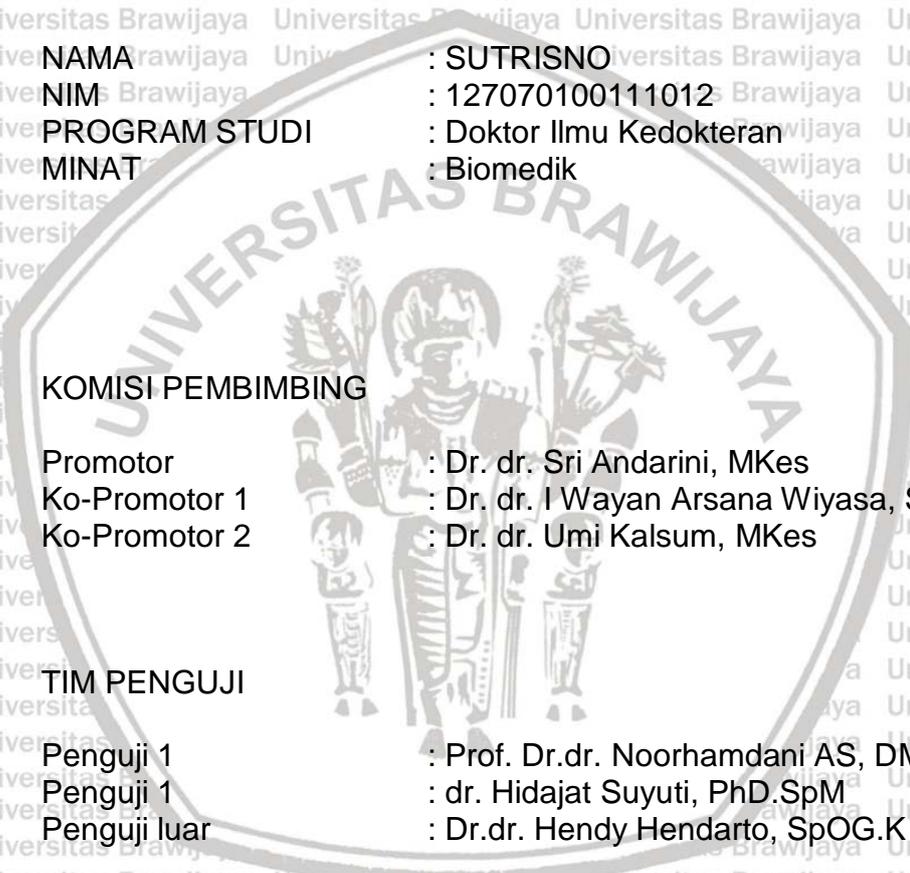
Penguji luar : Dr.dr. Hendy Hendarto, SpOG.K

Ujian Proposal : 21 Maret 2017

Seminar Hasil : 25 Februari 2019

Ujian Tertutup : 11 Maret 2019

Ujian Terbuka : 27 Maret 2019



PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah DISERTASI ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata dalam naskah DISERTASI ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia DISERTASI ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, 27 Maret 2019

Mahasiswa

Nama : Sutrisno, dr.SpOG.K

NIM : 127070100111012

PS : Ilmu Kedokteran

Prog. : Pasca Sarjana

Fak : Kedokteran Universitas Brawijaya

Kata Pengantar

Puji syukur, alhamdulillah, kami panjatkan kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tulisan disertasi yang berjudul: Pengaruh genistein terhadap proliferasi dan apoptosis sel endometriosis melalui perubahan rasio reseptor estrogen alfa dan reseptor estrogen beta dan NFk-B, studi pada mencit model endometriosis,

Pada penelitian ini peneliti mengeksplorasi peranan genistein terhadap proliferasi dan apoptosis sel-sel endometriosis dengan menganalisa perana reseptor estrogen alfa dan reseptor estrogen beta serta NFkB. Penyakit endometriosis merupakan penyakit yang sering ditemui pada wanita usia reproduksi terutama yang menghadapi masalah infertilitas dan nyeri haid. Banyak variabel yang berperan pada patofisiologi endometriosis serta terhadap keberhasilan terapi. Peneliti mencoba membangun sebuah model dan menganalisa perannya model tersebut bila diberikan genistein, suatu bahan alami yang strukturnya menyerupai hormon estrogen.

Karya ini bisa selesai karena peran dan bantuan banyak pihak. Oleh karena itu peneliti mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Dr. dr. Sri Andarini, MKes, selaku promotor dan pembimbing akademik, telah mengerahkan kesabarannya dalam membimbing, memberikan pencerahan, dan motivasi kepada penulis.
2. Dr. dr I Wayan Arsana Wiyasa., SpOG-K selaku ko-promotor dan pembimbing karya ilmiah yang telah memberikan banyak arahan dengan sabar, serta strategi bermakna dalam upaya pengembangan dan penyelesaian penelitian.
3. Dr. dr. Umi Kalsum, MKes, selaku ko-promotor telah memberikan arahan selama penelitian dengan penuh keikhlasan, ketelitian dan kesabaran, serta menggunakan langkah-langkah taktis dalam upaya penyelesaian penelitian.

4. Prof. Dr.dr. Noorhamdani AS, DMM., SpMK(K), penguji yang telah banyak memberikan bimbingan dan masukan serta motivasi selama pendidikan dan ujian ilmiah.

5. dr. Hidayat Suyuti, M.Sc., PhD., SpM selaku penguji yang telah banyak membantu memberikan masukan dan saran selama menyusun karya disertasi ini.

6. Dr.dr. Hendy Hendarto, SpOG-K selaku penguji yang telah banyak memberikan masukan, saran-saran dan semangat selama menyusun karya akhir.

7. Prof. Dr.dr. Kusworini Handono, M. Kes., SpPK, selaku Ketua Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Universitas Brawijaya Malang telah memberikan dorongan dan arahan selama mengikuti pendidikan.

8. Bapak Rektor Universitas Brawijaya, yang berkenan memberikan kesempatan untuk belajar di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

9. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang berkenan memberikan kesempatan untuk belajar serta memantik dan memicu kami untuk terus bersemangat menjalani studi.

10. Direktur RS Dokter Syaiful Anwar Malang yang telah memberikan kesempatan untuk melanjutkan studi S3 dengan tetap menjalankan pekerjaan rutin sehari-hari

11. Kepala Lab/SMF Obstetri dan Ginekologi FKUB/RSSA, Dr.dr. Kusnarman Keman, SpOG.K yang telah memberikan kesempatan untuk melanjutkan S3 serta nasehat-nasehat baik dan semangat untuk tetap melanjutkan pendidikan.

12. Istriku tercinta, dr. Lisa Andriani, anak-anakku tersayang, dr. Annisa Trissatharra dan Muhammad Thariq Faza, yang banyak memberiku dukungan, perhatian dan motivasi, kritikan, semangat, energi dan dorongan selama menjalani pendidikan.

13. Secara khusus kami menyampaikan terima kasih tak terhingga kepada ayahanda bapak Suparman (almarhum) dan ibunda Ibu Sarimi (almarhumah), yang telah mendidik dan menyanggah penulis, dengan cara

beliau sendiri yang tak terukur nilai kebaikan dan mulianya. Semoga pahala ilmu ini, Allah SWT berkenan mencurahkan kepada beliau berdua.

14. Secara khusus juga kepada ayahanda mertua bapak H. Soewarso dan ibunda mertua Hj. Endang Kusnaningsih yang selalu memberikan semangat, dorongan dan nasehat sehingga penulis bisa menyelesaikan disertasi ini.

15. Semua guruku semenjak pendidikan dasar, pendidikan menengah, pendidikan tinggi, pendidikan spesialisasi, pendidikan subspecialis, hingga pasca sarjana. Saya haturkan banyak terima kasih, yang telah membimbing saya sampai pada tingkat ini. Semoga amal baik bapak ibu guru menjadi amal jariyah dan mendatangkan manfaat dunia dan akherat, amiin.

16. Kepada semua sejawat di Lab/SMF Obstetri dan Ginekologi yang telah memberikan suasana dan dorongan untuk terus maju bersama.

17. Kepada Dr.drh. Wijati, di laboratorium embriologi FKH Unair Surabaya yang selama ini telah membantu dan berkenan kerja sama dalam banyak penelitian endometriosis.

18. Kepada Direktur RSIA Melati Husada, ibu Prapti Hariyanto dan bapak Hariyanto dan semua stafnya yang telah memberikan bantuan dan dorongan semangat dalam pendidikan.

19. Para sahabat di RS Ben Mari, Kendal Payak, Malang, Dr. M Ilyas, SpAn, dr. Tirta Hamijaya, SpB, dr. Agus Suhartono, SpOG.K, dr. M. Saiful Burhan, SpB, Ibu Valentin Riniati, SST dan seluruh staf medis dan non medis, yang selama ini selalu memberikan motivasi dan dorongan untuk terus maju.

20. Para kru IRNA 3 RSSA, yang terus aktif bekerja dengan sungguh-sungguh dan penuh semangat, meski saya tinggal belajar.

21. Terima kasih yang besar kepada para PPDS Obygn FKUB/RSSA Malang dan para mahasiswa S2 Kebidanan FKUB yang turut berpartisipasi secara langsung dan tidak langsung dalam pelaksanaan penelitian ini sehingga bisa selesai dengan baik.

22. Para pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, mohon maaf untuk ini, dengan doa semoga peran sertanya mendapat pahala yang berlimpah dari Allah SWT sehingga mendatangkan barokah dunia dan akherat. aamiin

Banyak keterbatasan yang ada pada penulis, sehingga masih dijumpai kekurangan disana sini. Kami mohon dibukakan pintu maaf bila ada kesalahan baik yang disengaja maupun yang tidak disengaja. Kepada pasien yang berkenan mendonasikan jaringan endometriosisnya, kami mengucapkan terima kasih yang tiada tara, semoga mendatangkan pahala dari sisi Allah SWT karena hasil penelitian ini berguna untuk pengobatan para penderita endometriosis di masa yang akan datang.

Dengan teriring doa semoga karya kecil ini berguna untuk diri sendiri, keluarga, nusa dan bangsa, agama dan seluruh umat manusia. Aaamiin.

Malang, 27 Maret 2019

Penulis

Sutrisno, dr. SpOG.K

RINGKASAN

SUTRISNO, NIM 127070100111012 Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, 2019. Pengaruh genistein terhadap proliferasi dan apoptosis sel endometriosis melalui perubahan rasio reseptor estrogen alfa dan reseptor estrogen beta dan NFk- β studi pada mencit model endometriosis.
Promotor: Sri Andarini, Ko-promotor 1: I Wayan Arsana Wiyasa, Ko-promotor 2: Umi Kulsum

Endometriosis merupakan penyakit tumor jinak, namun memiliki karakteristik menyerupai keganasan seperti sifatnya yang invasive, memiliki kecenderungan untuk bermetastasis dan kambuh. Proliferasi sel dan apoptosis pada endometriosis telah dipelajari oleh berbagai penelitian, namun belum banyak diungkap mengenai mekanismenya secara pasti. Peranan genistein terhadap endometriosis masih sedikit penelitian yang dipublikasikan sehingga menjadi sangat penting diungkap patofisiologinya

Penelitian tahap 1 mengungkapkan bahwa implan jaringan adenomiosis pada mencit model yang mendapat injeksi siklosporin dan hormon estrogen dengan dosis tertentu menghasilkan luas jaringan endometriosis, gradasi radang dan granuloma, ekspresi reseptor estrogen alfa, ekspresi reseptor estrogen beta dan ekspresi reseptor progesteron yang berbeda signifikan secara statistik dibanding dengan implan yang menggunakan jaringan kerokan endometrium dari rongga uteri dan jaringan kapsul kista endometriosis. Implan dengan jaringan adenomiosis mempunyai keberhasilan 100 persen untuk menjadi mencit model endometriosis.

Pada penelitian tahap 2 terbukti bahwa genistein menekan rasio ekspresi RE- α /RE- β dengan koefisien jalur -0,253, dengan nilai $p < 0,05$. Genestein mampu menurunkan ekspresi PCNA yang mencerminkan proliferasi sel endometriosis. Dosis 3,25 mg/hari merupakan dosis optimal untuk menekan ekspresi PCNA. Mekanisme penekanan terhadap PCNA terbukti melalui rasio ekspresi RE- α /RE- β dan NFk β . Genistein menekan ekspresi NFk β secara langsung namun dengan koefisien jalur -0,108 dengan $p > 0,05$ namun mekanisme utama penekanan ekspresi NFk β melalui penekanan rasio ekspresi RE- α /RE- β . Terhadap Rasio BAX/BCL-2 genistein terbukti tidak mempunyai pengaruh yang signifikan secara statistik baik melewati rasio ekspresi RE- α /RE- β maupun melewati NFk β . Hal ini mengandung makna ada jalur lain yang dilewati oleh genistein terkait pengaruhnya terhadap mekanisme apoptosis sel endometriosis. Analisis terpisah membuktikan bahwa dengan dengan dosis 1,95 mg/hari, 2,6 mg/hari dan 3,25 mg/hari mampu meningkatkan rasio BAX/BCL-2 secara statistik, sehingga bersifat proapoptosis.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah implan jaringan adenomiosis adalah jenis asal jaringan terbaik untuk membuat mencit model endometriosis, genistein mampu menekan proliferasi sel endometriosis melalui penekanan rasio ekspresi RE- α /RE- β dan NFk β . Genistein meningkatkan rasio ekspresi BAX/BCL-2 dengan jalur diluar jalur rasio ekspresi RE- α /RE- β dan NFk β .

SUMMARY

SUTRISNO, NIM 127070100111012 Doctoral Programme of Medical Faculty Brawijaya University, 2019. Effect of Genistein to endometriosis cell proliferation and apoptosis through suppression of *RE- α /RE- β ratio and NF κ B Promotor: Sri Andarini, Ko-promotor 1: I Wayan Arsana Wiyasa, Ko-promotor 2: Umi Kulsum*

Endometriosis is a benign tumor but having characteristics resembling the malignant one such as invasive properties and a tendency to metastasize and relapse. A research showed a significant increase of endometrial cell proliferation on patients with endometriosis compared with without endometriosis. Role of genistein to endometriosis still less published in scientific journals and need to be explored.

First study determined the superiority of adenomyosis tissue as strongest implant tissue to evoke the growth of peritoneal endometriosis in mice that already given cyclosporine and estradiol hormone injection. Implant of adenomyosis tissue could induced peritoneal endometriosis with 100 persen succeed rate.

Second study proved the role of genistein in suppressing the RE- α /RE- β ratio with coefficient pathway -0,253 with p value < 0,05. Genistein also suppress the expression of PCNA (index of cell proliferation). The pathway of PCNA suppression through the ratio of RE- α /RE- β and NF κ B. Genistein doses of 3,5 mg/day is to be the optimal doses for suppressing the variables. Genistein suppress the expression of NF κ B directly, with coefficient pathway -0,108, p value >0,05, that means the mechanism of suppression through ratio RE- α /RE- β itself. Genistein no statistically significant effect to ratio BAX/BCL-2 even through ratio of RE- α /RE- β or NF κ B. May be there is another pathway of the influence of genistein to ratio of BAX/BCL-2. Doses analysis showed that 1,95 mg/day, 2,6 mg/day and 3,25 mg/day of genistein could increase the BAX/BCL-2 ratio with statistically significant.

As conclusion, this research data proved that implant of adenomyosis tissue is the best of source tissue implant to produce mice model of endometriosis for research purposes, genistein could suppress the endometriosis cell proliferation through ratio of RE- α /RE- β and NF κ B, and genistein could improve the ratio of BAX/BCL-2 through another pathway.

| | | |
|-------|--|----|
| 2.2.3 | Proliferasi pada Sel Endometriosis | 28 |
| 2.2.4 | Berbagai Studi Proliferasi Endometriosis..... | 29 |
| 2.2.5 | Siklus Sel pada Toksikologi..... | 32 |
| 2.2.6 | PCNA (<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>)..... | 34 |
| 2.3 | Apoptosis..... | 35 |
| 2.3.1 | Definisi..... | 35 |
| 2.3.2 | Mekanisme Apoptosis..... | 37 |
| 2.3.3 | Apoptosis pada Endometrium Eutopik dan Endometriosis | 44 |
| 2.3.4 | Apoptosis pada Tumor Ginekologi dan Endometriosis | 49 |
| 2.3.5 | Molekul-Molekul yang Berperan pada Apoptosis..... | 51 |
| 2.3.6 | <i>B-cell lymphoma/leukemia-2</i> (Bcl-2)..... | 52 |
| 2.3.7 | <i>Bcl-2 associated x</i> (Bax) | 54 |
| 2.4 | <i>Nuclear Factor- Kappa Beta</i> (NF- κ B) | 55 |
| 2.4.1 | Definisi <i>Nuclear- Factor Kappa Beta</i> (NF- κ B)..... | 55 |
| 2.4.2 | Famili <i>Nuclear- Factor Kappa Beta</i> (NF- κ B)..... | 55 |
| 2.4.3 | Regulasi Aktivasi <i>Nuclear- Factor Kappa Beta</i> (NF- κ B)..... | 56 |
| 2.5 | Reseptor Estrogen | 58 |
| 2.5.1 | Struktur dan Jenis Reseptor Estrogen | 58 |
| 2.5.2 | Rasio reseptor estrogen alfa (RE α) dan beta (RE β)..... | 62 |
| 2.5.3 | Perbedaan Fungsi RE- α dan RE- β | 63 |
| 2.6 | Model endometriosis | 65 |
| 2.6.1 | Karakteristik model mencit homologus/ autologus..... | 66 |
| 2.6.2 | Aplikasi model mencit homologus/ autologus | 68 |
| 2.6.3 | Karakteristik model mencit heterologus | 69 |
| 2.6.4 | Aplikasi model tikus heterologus | 72 |
| 2.6.5 | Evaluasi model heterologus | 73 |
| 2.6.6 | Induksi endometriosis pada mencit yang mengalami penekanan sistem imun dan tikus <i>Severe Combined Immunodeficient</i> (SCID) | 74 |
| 2.7 | Genistein | 76 |
| 2.7.1 | Sejarah Penemuan sampai dengan Aplikasi Genistein..... | 76 |
| 2.7.2 | Peran Biologis Genistein | 78 |
| 2.7.3 | Target Molekul Genistein..... | 78 |
| 2.4.3 | Struktur Molekul dan Biologis Genistein..... | 81 |



| | | |
|--|--|-----------|
| 2.4.4 | Efek Pleiotropik Genistein..... | 82 |
| 2.4.5 | Peran Genistein dalam Menginduksi Apoptosis..... | 83 |
| Bab 3 KERANGKA KONSEP, TEORI DAN HIPOTESIS..... | | 89 |
| 3.1 | Kerangka Teori..... | 89 |
| 3.2 | Kerangka Konsep..... | 92 |
| 3.3 | Hipotesis..... | 94 |
| 3.3.1 | Hipotesis umum..... | 94 |
| 3.3.2 | Hipotesis khusus..... | 94 |
| Bab 4 METODOLOGI PENELITIAN..... | | 96 |
| 4.1 | Desain Penelitian..... | 96 |
| 4.2 | Tempat dan Waktu Penelitian..... | 96 |
| 4.3 | Populasi dan Besar sampel..... | 96 |
| 4.3.1 | Populasi dan Besar Sampel Pembuatan Model Mencit Endometriosis..... | 96 |
| 4.3.2 | Populasi dan Besar Sampel Paparan Genistein Berbagai Dosis Pada Penelitian tahap II..... | 97 |
| 4.4 | Kriteria Subyek Penelitian, Variabel Penelitian dan Definisi Operasional..... | 99 |
| 4.4.1 | Kriteria Subyek..... | 99 |
| 4.4.2 | Variabel Penelitian..... | 100 |
| 4.4.3 | Definisi operasional..... | 100 |
| 4.5 | Bahan dan Alat Penelitian..... | 105 |
| 4.5.1 | Bahan dan Alat Pembuatan Model Mencit Endometriosis..... | 105 |
| 4.5.2 | Bahan dan Alat Pemeriksaan Imunohistokimia untuk model mencit endometriosis..... | 107 |
| 4.6 | Prosedur Penelitian..... | 108 |
| 4.6.1 | Prosedur Pembuatan Model Mencit Endometriosis dari berbagai asal isolat endometriosis..... | 108 |
| 4.6.2 | Prosedur Paparan Genistein Berbagai Dosis (penelitian tahap 2)..... | 114 |
| 4.6.3 | Prosedur Pemberian Genistein..... | 114 |
| 4.7 | Teknik Analisis Data..... | 117 |
| 4.7.1 | Uji Prasyarat Parametrik..... | 117 |
| 4.7.2 | Uji t Sampel Bebas..... | 118 |



| | |
|---|-----|
| 4.7.3 Uji Anova One Way..... | 118 |
| 4.7.4 Analisa Jalur..... | 119 |
| 4.8 Kerangka Operasional Penelitian..... | 120 |
| Bab 5 HASIL PENELITIAN..... | 121 |
| 5.1. Hasil Penelitian Tahap I..... | 121 |
| 5.1.1 Luas Implantasi pada Peritoneum..... | 121 |
| 5.1.2 Data Luas Implantasi pada Peritoneum..... | 121 |
| 5.1.3 Histopatologi Peritoneum..... | 126 |
| 5.1.4 Imunohistokimia Peritoneum..... | 132 |
| 5.2 Hasil Penelitian Tahap II..... | 145 |
| 5.2.1 Gambaran Umum Hasil Penelitian..... | 145 |
| 5.2.2 Pengujian Asumsi yang Melandasi ANOVA..... | 145 |
| 5.2.3 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi BAX dengan Uji ANOVA..... | 148 |
| 5.2.4 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dengan Uji ANOVA..... | 156 |
| 5.2.5 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi NFkB dengan Uji ANOVA..... | 160 |
| 5.2.6 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi RE- α dengan Uji ANOVA..... | 164 |
| 5.2.7 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi RE- β dengan Uji ANOVA..... | 168 |
| 5.2.8 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Rasio BAX/BCL-2 dengan Uji ANOVA..... | 172 |
| 5.2.9 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Rasio RE- α /RE- β dengan Uji ANOVA..... | 175 |
| 5.2.10 Hasil Analisis Jalur..... | 178 |
| 5.2.11 Pengujian <i>Goodness of Fit</i> Model Struktural..... | 179 |
| 5.2.12 Hasil Pengujian Model Struktural (Inner Model)..... | 180 |
| 5.2.13 Hasil Analisis Jalur Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan Melalui Ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB sebagai Variabel Mediasi..... | 184 |
| 5.2.14 Hasil Analisis Jalur Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan Melalui | |

| | |
|---|-----|
| Ekspresi RE- β dan Ekspresi NF κ B sebagai Variabel Mediasi..... | 188 |
| 5.2.15 Pengujian Hubungan antara Dosis Genistein dengan Variabel Pengamatan | 193 |
| Bab 6 PEMBAHASAN | 196 |
| 6.1 Pembahasan Penelitian Tahap I..... | 196 |
| 6.1.1 Luas Implantasi pada Peritoneum..... | 196 |
| 6.1.2 Histopatologi Lesi Endometriosis pada Peritoneum | 199 |
| 6.1.3 Imunohistokimia Peritoneum Mencit model..... | 204 |
| 6.1.4 Imunohistokimia Ekspresi Reseptor Estrogen- α | 206 |
| 6.1.5 Imunohistokimia Ekspresi Reseptor Estrogen β | 208 |
| 6.1.6 Imunohistokimia Ekspresi Reseptor Progesteron..... | 210 |
| 6.2 Pembahasan penelitian tahap 2 | 212 |
| 6.2.1 Pengaruh genistein terhadap ekspresi Bax..... | 213 |
| 6.2.2 Pengaruh genistein terhadap ekspresi BCL-2..... | 215 |
| 6.2.3 Pengaruh genistein terhadap ekspresi PCNA..... | 217 |
| 6.2.4 Pengaruh genistein terhadap ekspresi NF κ B..... | 218 |
| 6.2.5 Pengaruh genistein terhadap ekspresi RE- α | 220 |
| 6.2.6 Pengaruh genistein terhadap ekspresi RE- β | 222 |
| 6.2.7 Pengaruh genistein terhadap rasio BAX/BCL2 | 224 |
| 6.2.8 Pengaruh genistein terhadap rasio RE- α /RE- β | 225 |
| 6.2.9 Analisis jalur | 227 |
| Bab 7 KESIMPULAN DAN SARAN | 249 |
| 7.1 Kesimpulan | 249 |
| 7.2 Saran | 250 |
| DAFTAR PUSTAKA | 251 |
| Lampiran 1. Prosedur Pemeriksaan Imunohistokimia | 274 |

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2-1 Skema Retrograde Menstruasi 16

Gambar 2-2 Gambaran Peran Sistem Imun dalam Perkembangan dan Terpeliharanya Endometriosis 17

Gambar 2-3 Mekanisme patofisiologi endometriosis 19

Gambar 2-4 Jaringan Sistem Signaling Siklus Sel yang Mengendalikan Proliferasi sel dan Berbagai Proses Seluler Lainnya. 22

Gambar 2-5 Peranan *Growth Factor* dan *Cell Cycle Signaling System* pada Berbagai Fase Siklus Sel. 23

Gambar 2-6 Ringkasan Perubahan Morfologi yang Terjadi pada Fase Mitotik. 25

Gambar 2-7 Gambar Skematik Progresi Siklus sel Normal..... 26

Gambar 2-8 Gambar Skematik Beberapa jalur Penting pada Siklus Sel. 28

Gambar 2-9 Skema Sel yang Mengalami Nekrosis dan Apoptosis 37

Gambar 2-10 Mekanisme Apoptosis Melalui Dua Jalur yang Berbeda 44

Gambar 2-11 Struktur Kedua Subfamili NF- κ B (Rel dan NF- κ B) (Gilmore, 2006)..... 56

Gambar 2-12 Signal Transduksi NF- κ B (Gilmore, 2006) 57

Gambar 2-13 Domain fungsi dari reseptor Estrogen (Rollerova *and* Urbancikova, 2000). 59

Gambar 2-14 Susunan domain reseptor estrogen beta (RE- β) (Dechering *et al.*, 2000)..... 60

Gambar 2-15 Sebuah model aktivitas reseptor estrogen (Rollerova *and* Urbancikova, 2000). 62

Gambar 2-16 Tanaman Kedelai Golongan *Leguminoceae* sebagai Sumber Isoflavon terutama Genistein. 77

Gambar 2-17 Struktur Generik 17- β -estradiol dan Genistein (Kuiper *et al.*, 1998)..... 81

Gambar 4-1 Kerangka operasional penelitian..... 120

| | |
|---|------------|
| Gambar 5-1 Histogram Rerata Pengukuran Luas Hipervaskularisasi/Implantasi Endometriosis pada Mencit Model Endometriosis (mm ²)..... | 122 |
| Gambar 5-2 Pengukuran Luas Hipervaskularisasi pada Mencit Model Endometriosis..... | 126 |
| Gambar 5-3 Histogram Perbedaan Derajat Kerusakan Peritoneum berbagai kelompok perlakuan..... | 127 |
| Gambar 5-4 Gambaran Histopatologi Derajat Kerusakan Peritoneum..... | 130 |
| Gambar 5-5. Gambaran massa granuloma, infiltrasi sel-sel radang dan jaringan ikat pada jaringan otot pada kelompok mencit yang mendapatkan injeksi isolat endometrium-miometrium uterus dari wanita dengan adenomiosis..... | 131 |
| Gambar 5-6 Histogram Perbandingan Data Rerata Ekspresi RE- α pada Sel Mesotel Peritoneum..... | 133 |
| Gambar 5-7. Perbandingan ekspresi RE- α (panah) pada sel mesotel peritoneum dan sel radang diantara kelompok perlakuan..... | 136 |
| Gambar 5-8 Histogram Perbandingan Ekspresi RE- β pada Sel Mesotel Peritoneum..... | 137 |
| Gambar 5-9 Perbandingan RE- β pada sel-sel mesotel dan sel radang (panah) diantara kelompok perlakuan..... | 140 |
| Gambar 5-10 Histogram Perbandingan Ekspresi PR Mesotel Peritonium..... | 142 |
| Gambar 5-11 Perbandingan Ekspresi RP (panah) pada Lapisan Mesotel Peritonium..... | 144 |
| Gambar 5-12 Histogram Rata-Rata Ekspresi BAX..... | 151 |
| Gambar 5-13 Gambaran Histopatologi Ekspresi BAX..... | 152 |
| Gambar 5-14 Histogram Rata-Rata Ekspresi BCL-2..... | 155 |
| Gambar 5-15. Gambaran Histopatologi Ekspresi BCL-2..... | 156 |
| Gambar 5-16. Histogram Rata-Rata Ekspresi PCNA..... | 159 |
| Gambar 5-17. Gambaran Histopatologi Ekspresi PCNA..... | 160 |
| Gambar 5-18. Histogram Rata-Rata Ekspresi NFkB..... | 163 |
| Gambar 5-19. Gambaran Histopatologi Ekspresi NFkB..... | 164 |

| | |
|--|-----|
| Gambar 5-20. Histogram Rata-Rata Ekspresi RE- α | 167 |
| Gambar 5-21. Gambaran Histopatologi Ekspresi ER- α | 168 |
| Gambar 5-22. Histogram Rata-Rata Ekspresi RE- β | 171 |
| Gambar 5-23. Gambaran Histopatologi Ekspresi ER- β | 172 |
| Gambar 5-24. Histogram Rata-Rata Rasio BAX/BCL-2 | 175 |
| Gambar 5-25. Histogram Rata-Rata Rasio RE- α /RE- β | 178 |
| Gambar 5-26. Model Struktural Konseptual | 179 |
| Gambar 5-27. Diagram Jalur Hasil Pengujian Hipotesis Inner Model | 181 |
| Gambar 5-28. Diagram Jalur Hasil Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan Melalui Ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB sebagai Variabel Mediasi | 185 |
| Gambar 5-29. Diagram Jalur Hasil Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan Melalui Ekspresi RE- β dan Ekspresi NFkB sebagai Variabel Mediasi | 190 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|-------------|--|-----|
| Tabel 2-1. | Berbagai Teori Patogenesis Terjadinya Endometriosis..... | 14 |
| Tabel 2-2. | Marker Siklus Sel..... | 33 |
| Tabel 2-3. | Ringkasan Ekspresi Molekul-Molekul yang berkaitan dengan Apoptosis pada Lesi Endometriosis..... | 52 |
| Tabel 2-4. | Ikatan Genistein dan Berbagai Protein Beserta Jenis Pengaruhnya terhadap Aktivitas Kerja Protein..... | 79 |
| Tabel 4-1 | Perhitungan Dosis Genistein pada Masing-masing Kelompok dari konversi dosis manusia ke dosis mencit..... | 98 |
| Tabel 4-2. | Skoring Derajat Kerusakan Peritoneum Berdasarkan Infiltrasi Sel Radang Menurut Metode Klopfleisch..... | 113 |
| Tabel 4-3. | Skoring Derajat Kerusakan Peritoneum Berdasarkan Massa Granuloma Menurut Metode Klopfleisch..... | 113 |
| Tabel 4-4. | Skala Semikuantitatif IRS..... | 114 |
| Tabel 5-1 | Perbandingan Luas Area Implan Endometriosis Mencit Model Endometriosis..... | 121 |
| Tabel 5-2. | Uji Normalitas dan Homogenitas Luas Implant Endometriosis yang Ditransformasi Log (Y)..... | 123 |
| Tabel 5-3. | Pengujian ANOVA dan LSD 5% Data Rerata Luas Implant Endometriosis..... | 124 |
| Tabel 5-4. | Pengujian LSD 5% Luas Implant Endometriosis..... | 125 |
| Tabel 5-5. | Skoring Derajat Kerusakan Peritoneum berbagai kelompok perlakuan..... | 127 |
| Tabel 5-6. | Pengujian ANOVA dan LSD 5% Data Rerata Derajat Kerusakan Peritoneum..... | 128 |
| Tabel 5-7. | Pengujian LSD 5% Derajat Kerusakan Peritoneum..... | 129 |
| Tabel 5-8. | Perbandingan Skala Semikuantitatif IRS Ekspresi RE- α | 132 |
| Tabel 5-9. | Pengujian ANOVA dan LSD 5% Data Rerata Ekspresi RE- α | 134 |
| Tabel 5-10. | Pengujian LSD 5% Ekspresi RE- α | 135 |

| | |
|---|-----|
| Tabel 5-11. Perbandingan Nilai Rerata Skala Semikuantitatif IRS Ekspresi RE- β | 137 |
| Tabel 5-12. Pengujian ANOVA dan LSD 5% Data Rerata Ekspresi RE- β | 138 |
| Tabel 5-13. Pengujian LSD 5% Ekspresi RE- β | 139 |
| Tabel 5-14. Skala Semikuantitatif IRS Ekspresi RP. | 141 |
| Tabel 5-15. Pengujian ANOVA dan LSD 5% Data Rerata Ekspresi RP | 142 |
| Tabel 5-16. Pengujian LSD 5% Ekspresi RP | 143 |
| Tabel 5-17 Uji Asumsi Normalitas | 145 |
| Tabel 5-18 Uji Asumsi Homogenitas Ragam | 146 |
| Tabel 5-19 Uji Asumsi Normalitas dan Homogenitas Ragam Variabel yang Telah Ditransformasi | 147 |
| Tabel 5-20 Perbandingan Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi BAX dengan Uji ANOVA dan Uji Dunnet T3 5%..... | 149 |
| Tabel 5-21 Perbandingan Ekspresi BAX Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji Dunnet T3 5% | 150 |
| Tabel 5-22 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi BCL-2 dengan Uji ANOVA dan Uji LSD 5%..... | 153 |
| Tabel 5-23 Perbandingan Ekspresi BCL-2 Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji LSD 5%..... | 154 |
| Tabel 5-24. Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dengan Uji ANOVA dan Uji Dunnet T3 5%..... | 157 |
| Tabel 5-25. Perbandingan Ekspresi PCNA Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji Dunnet T3 5% | 158 |
| Tabel 5-26. Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi NF κ B dengan Uji ANOVA dan Uji Dunnet T3 5%..... | 161 |
| Tabel 5-27. Perbandingan Ekspresi NF κ B Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji Dunnet T3 5%..... | 162 |
| Tabel 5-28 Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi RE- α dengan Uji ANOVA dan Uji LSD 5% | 165 |
| Tabel 5-29. Perbandingan Ekspresi RE- α Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji LSD 5%..... | 166 |

| | |
|--|-----|
| Tabel 5-30. Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi RE- β dengan Uji ANOVA dan Uji Dunnet T3 5%..... | 169 |
| Tabel 5-31. Perbandingan Ekspresi RE- β Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji Dunnet T3 5%..... | 170 |
| Tabel 5-32. Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Rasio BAX/BCL-2 dengan Uji ANOVA dan Uji LSD 5%..... | 173 |
| Tabel 5-33 Perbandingan Rasio BAX/BCL-2 Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji LSD 5%..... | 174 |
| Tabel 5-34. Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Rasio RE- α /RE- β dengan Uji ANOVA dan Uji Dunnet T3 5%..... | 176 |
| Tabel 5-35. Perbandingan Rasio RE- α /RE- β Kelompok Kontrol dan Perlakuan dengan Uji LSD 5% | 177 |
| Tabel 5-36. Goodness of Fit Model Struktural..... | 180 |
| Tabel 5-37. Hasil Pengujian Pengaruh Langsung Inner Model | 180 |
| Tabel 5-38. Hasil Pengujian Pengaruh Tak Langsung Inner Model | 181 |
| Tabel 5-39. Hasil Pengujian Pengaruh Langsung Model Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan Melalui Ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB sebagai Variabel Mediasi | 184 |
| Tabel 5-40. Hasil Pengujian Pengaruh Tak Langsung Langsung Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan Melalui Ekspresi RE- α dan Ekspresi NFkB sebagai Variabel Mediasi | 185 |
| Tabel 5-41. Hasil Pengujian Pengaruh Langsung Model Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan Melalui Ekspresi RE- β dan Ekspresi NFkB sebagai Variabel Mediasi | 188 |
| Tabel 5-42. Hasil Pengujian Pengaruh Tak Langsung Langsung Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dan Rasio BAX/BCL-2 dengan Melalui Ekspresi RE- β dan Ekspresi NFkB sebagai Variabel Mediasi | 189 |
| Tabel 5-43. Hasil Pengujian Hubungan antara Dosis Genistein dengan Variabel Pengamatan..... | 193 |

DAFTAR SINGKATAN

17β-HSD : 17β – Hidroxy Steroid Dehidrogenase

AP-1 : Apoptosis Protein-1

Bax : Bcl2 associated X protein

Bcl2 : B cell lymphoma 2

COX2 : Cyclooxygenase-2

DNA : Deoxy Ribonucleic Acid

EIA : Enzyme Immuno Assay

ERE : Estrogen Responsive Elemen

ERK : Extracellular signal regulated – kinase

GnRH : Gonadotropin releasing hormone

GPx : Gluthation Peroxidase

H₂O₂ : Hydrogen peroxide

HIF-1α : Hypoxia induceible factor 1 alpha

HPA : Hypophisis Pituitary Axis

ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule-1

IL : Interleukin

iNOS : inducible Nitric Oxyde Synthase

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MDA : Malondialdehyde

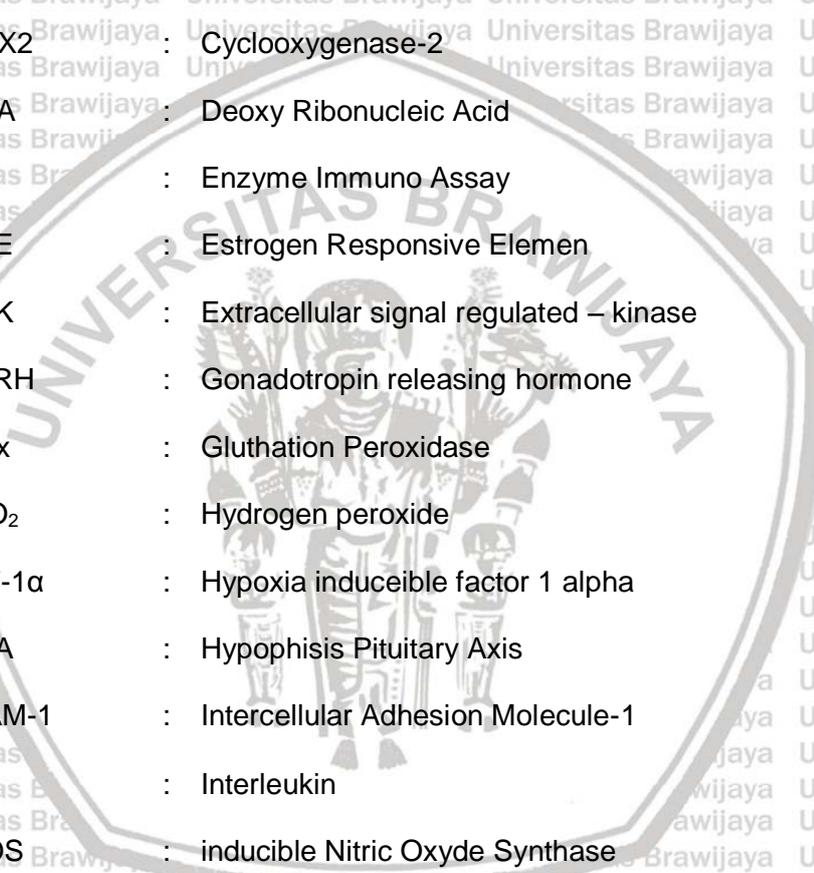
MMP : Matrix Metaloproteinase

MnSOD : Manganese Superoxide Dismutase

mRNA : messenger Ribonucleic Acid

NF-κβ : Nuclear Factor - κβ

NO : Nitric Oxide



- O₂⁻ : Superoxide anion
- ODMA : O – Dimethylarginin
- OH⁻ : Hydroxyl radical
- PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
- RANTES : Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
- RE-α : Reseptor Estrogen – α
- RE-β : Reseptor Estrogen – β
- SCID : Severe Combined Immunodeficient
- SERM : Selective Estrogen Receptor Modulator
- SHBG : Sex Hormon Binding Globulin
- STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
- TGF : Tumor Growth Factor
- TNF-α : Tumor Necrosis Factor – α
- VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule
- VEGF : Vascular Endothelial Growth Facto

