PERBANDINGAN PENGARUH PEMBERIAN GENISTEIN, LEUPROLIDE ACETAT DAN DIENOGEST TERHADAP EKSPRESI COX-2 DAN PGE2 PADA MENCIT MODEL ENDOMETRIOSIS

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister

OLEH :
LILIK WINARSIH
136070400111010

PROGRAM STUDI MAGISTER KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
2016

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

PERNYATAAN
ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis di kutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia tesis ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.
(UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 Ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 05 Februari 2016

Mahasiswa,

Nama : Lilik Winarsih
NIM : 136070400111010
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran UB

TESIS

PERBANDINGAN PENGARUH PEMBERIAN GENISTEIN, LEUPROLIDE ACETAT DAN DIENOGEST TERHADAP EKSPRESI COX-2 DAN PGE2 PADA MENCIT MODEL ENDOMETRIOSIS

Oleh :
LILIK WINARSIH
136070400111010

Dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal: 05 Februari 2016
Dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PEMBIMBING

Dr. Dra. Sri Winarsih, APT. MSi
NIP 195408231981032001
Ketua

dr. Sutrisno,SpOG (K)
NIP 196802031998031005
Anggota

Malang, 11 FEB 2016
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,

Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes
NIP 195804141987012001

TESIS

PERBANDINGAN PENGARUH PEMBERIAN GENISTEIN, LEUPROLIDE ACETAT DAN DIENOGEST TERHADAP EKSPRESI COX-2 DAN PGE2 PADA MENCIT MODEL ENDOMETRIOSIS

Oleh :
LILIK WINARSIH
136070400111010

Dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal: 05 Februari 2016
Dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PENGUJI

Dr. Dra. Sri Winarsih, APT. MSi
NIP 195408231981032001
Ketua

dr. Sutrisno SpOG (K)
NIP 19680203199803100 5
Anggota Penguji

Dr. dr. Siti Candra Windu, SpOG (K)
NIP 196710232003122001
Anggota Penguji

Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes
NIP 195804141987012001
Anggota Penguji

KATA PENGANTAR

Dengan mengucap puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa, atas limpahan rahmat dan berkatnya penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul : **Perbandingan Pengaruh Pemberian Genistein, Leuprolide Asetat, dan Dienogest terhadap Ekspresi COX-2 dan PGE-2 pada mencit model endometriosis**.

Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi kajian tentang endometriosis, genistein, leuprolide asetat, dienogest, COX-2 dan PGE-2

Dengan selesainya tesis ini penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Muhammad Bisri, MS selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang, beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan Program Studi Magister Kebidanan Universitas Brawijaya Malang.
2. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Penguji II, atas izin yang dierikan selama penulis menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Nurdiana, M.Kes, selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Universitas Brawijaya Malang, yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., Msi selaku Ketua komisi pembimbing yang telah memberikan dukungan, bimbingan, arahan dan masukan serta kesabarannya selama proses penyusunan tesis ini.
5. dr. Sutrisno, SpOG (K) selaku Sekretaris Program Studi Magister Kebidanan dan anggota komisi pembimbing yang telah memberikan dukungan, bimbingan dan masukan selama proses penyusunan tesis ini.
6. Dr.dr.Siti Candra Windu, SpOG(K) selaku penguji I yang telah memberikan saran dan arahan sehingga tesis ini menjadi semakin sempurna.
7. Dr. drh. Widjiati, Msi selaku supervisor penelitian beserta Staf Laboratorium Hewan Coba Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya yang telah membantu hingga terlaksananya penelitian ini.
8. Satuman, S.Si, M.Kes selaku supervisor penelitian dan rekan-rekan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah membantu hingga terlaksananya penelitian ini.

9. Ketua STIKES Kendedes Malang beserta seluruh staf atas ijin dan dukungan yang diberikan untuk melanjutkan studi Magister Kebidanaan.
10. Para dosen pengajar Program Studi Magister Kebidanan yang telah mendidik, membimbing dan memberikan bekal keilmuan.
11. Keluargaku tercinta, Kedua orang tua, Suami dan anakku tersayang yang selalu memberikan motivasi dan doa untuk dapat menyelesaikan pendidikan dan tesis ini.
12. Teman-teman penelitian endometriosis yang selalu bersama dalam suka dan duka dalam menyelesaikan tesis ini.
13. Teman-teman Angkatan III Program Studi Magister Kebidanan Universitas Brawijaya yang selalu mendukung dan memberi semangat.

Penulis menyadari bahwa masih kekurangan dan keterbatasan dalam penyusunan tesis ini. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran yang membangun untuk kesempurnaan tesis ini, agar tesis ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Januari 2016

Penulis

Repository Universitas Brawijaya

RINGKASAN

Lilik Winarsih
Perbandingan pengaruh Pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap Ekspresi COX-2 dan PGE-2 pada Mencit Model Endometriosis. Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Komisi Pembimbing, Ketua : Dr.dra Sri Winarsih, Apt, Msi. Anggota : dr. Sutrisno, SpOG (K).

Endometriosis merupakan jaringan (sel-sel kelenjar dan stroma) abnormal yang menyerupai endometrium (*endometrium like tissue*) yang tumbuh disisi luar kavum uterus, dan memicu reaksi peradangan menahun, patofisiologi pasti endometriosis juga belum jelas. Pada endometriosis, makrofag mensekresikan sitokin proinflamasi, seperti IL-1β dan TNF-α yang menginduksi secara berlebihan kadar COX-2 pada sel stroma endometriosis dan selanjutnya COX-2 akan menyebabkan peningkatan konsentrasi PGE2 di cairan peritoneal yang mengaktifkan serabut nyeri. Salah satu indikasi penanganan endometriosis adalah dengan penurunan kadar estrogen yang dapat dilakukan dengan pengobatan menggunakan agonis-GnRH (Leuprolide Acetat), dan progestin selektif (Dienogest). Berbagai penelitian menunjukkan bahwa masing-masing obat tersebut setara dalam pengobatan endometriosis, sehingga pemilihan jenis obat yang digunakan harus mempertimbangkan preferensi pasien, efek samping dan ketersediaan obat tersebut dipasaran. Salah satu bentuk penatalaksanaan endometriosis yang berkhasiat dan efektif pemakaiannya serta relatif dapat dikomsumsi dalam jangka waktu lama adalah dengan menggunakan estrogen alami (Genistein). Genistein merupakan isoflavon alami yang ditemukan terutama pada tanaman polong khususnya pada kedelai sebagai produk dengan konsentrasi genistein yang tinggi. Genestein menghambat produksi oksida nitrat dan prostaglandin pada konsentrasi non-toksik, dengan menghambat induksi NO dan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2)

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui perbandingan pengaruh pemberian genistein, leuprolide acetat dan dienogest terhadap ekspresi COX-2 dan PGE-2 pada mencit model endometriosis. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah desain eksperimental dengan metode post-test control group design. Sampel yang digunakan adalah mencit betina yang dibuat model endometriosis, implantasi jaringan myometrium dan endometrium dari bahan operasi tumor jinak (Adenomyosis). Jumlah replikasi pada penelitian ini adalah 4 replikasi dengan 1 kelompok kontrol negatif, 1 kelompok kontrol positif dan 5 kelompok dengan perlakuan yaitu genistein 0,78mg/hari, genistein 1.04mg/hari, genistein 1,3mg/hari, leuprolide acetat 0,00967mg/5hari dan dienogest 0.0052mg/hari. Ekspresi COX-2 dn PGE-2 diukur dengan menggunakan Imunohistokimia (IHC). Data dianalisis secara statistik dengan menggunkan uji ANOVA dilanjutkan Uji Posthoc Test (uji tukey) dan Uji Korelasi.

Secara statistik ada perbedaan bermakna pada rata-rata ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2 antara kelompok control positif dan semua kelompok perlakuaan pemberian genistein, leuprolide acetat dan dienogest. Hal ini membuktikan bahwa ada pengaruh perlakuan pemberian genistein, leuprolide acetat dan dienogest terhadap ekspresi COX-2 dan PGE-2. Berdasarkan hasil yang diperoleh, terlihat bahwa pemberiaan genistein dosis 0,78mg/hari menunjukkan rata-rata ekspresi COX-2 yang paling rendah dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Sedangkan pemberian genistein dosis 1,3mg/hari menunjukkan rata-rata ekspresi PGE-2 terendah dibandingkan dengan perlakuan yang lain.

Berdasarkan hasil pengujian korelasi Pearson antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2 dan PGE-2, didapatkan koefisien korelasi sebesar -0.687 dan sebesar -0.797 dengan p-value sebesar 0.003 dan sebesar 0.000. menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2 dan PGE-2. dan adanya hubungan yang cukup kuat antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2 dan PGE-2. Koefisien korelasi yang negatif menunjukkan adanya hubungan yang negatif antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2 dan PGE-2. Meningkatnya dosis genistein yang diberikan, akan berdampak pada penurunan ekspresi COX-2 dan PGE-2 pada mencit model endometriosis.

Repository Universitas Brawijaya

SUMMARY

Lilik Winarsih

The Comparison of the Effectiveness of Genistein, Leuprolide Acetat,and Dienogest towards COX-2 and PGE-2 in Endometriosis Model of Mouse. Graduate Studies of Midwifery Department of Medical Faculty of Brawijaya University. Advisors, Head: Dr.dra Sri Winarsih, Apt, Msi. Member: dr. Sutrisno, SpOG (K).

Endometriosis is abnormal tissue (Glands cells and stroma) that is similar to endometrium (*endometrium like tissue*) which grows outside cavum uterus, and triggers annual inflammation reaction, the exact pathophysiology of endometriosis is not clear.In endometriosis, the macrophag secrets cytokin proinflammation, such as IL-1β and TNF-α that over-induce COX-2 in stroma endometriosis cells and COX-2 might cause the concentration of PGE2 in peritoneal fluid that activate inflammation nerves. One of indications of endometriosis care is by reducing the estrogen by givingagonic-GnRH (Leuprolide Acetate), andselective progestin (Dienogest).Several researches showed that each remedies is similar to endometriosis treatment, therefore the selection of the remedies should consider the patient condition, the contra indication, and the availability. The effective and appropriate endometriosis treatmentwhich can be used in long terms is by using natural estrogen (Genistein). Genistein is a natural isophlavon compound that can be found in beans, especially in soya bean. Genestein can hinder the production of oxide nitrate and prostaglandin on non-toxic concentration, by reducing the induction od NO and cycloocygenase-2 (COX-2).

The purpose of this study was to investigate the different effect of genistein, leuprolide acetate,and dienogest towards COX-2 and PGE-2 in endometriosis model of mouse. The method used was experimental study using posttest control group design. The samples of the study were female mice which were designed as endometriosis model, myometrium and endometrium tissue implantation from adenomyosis. The number of replication in this study were 4 replications with 1 control group negative, 1 control group positive, and 5 experimental groups using genistein 0,78mg/day, genistein 1.04mg/day, genistein 1,3mg/day, leuprolide acetat 0,00967mg/5days,and dienogest 0.0052mg/day. The COX-2 and PGE-2 were measuredusing Imunohistochemist (IHC). The data were analysed statistically using ANOVA test followed by Posthoc Test andCorrelation test.

Statistically, there were significant differences on the average result of COX-2 and PGE-2 between Control group positive and all experimental groups in terms of genistein, leuprolide acetate, and dienogest distribution. It shows that the distribution of genistein, leuprolide acetate,and dienogest affect the result of COX-2 and PGE-2. Based on the findings, it can be seen that the distribution of genistein dosage 0,78mg/dayshows the lowest average result of COX-2 compare to others. While the distribution of genistein dosage 1,3mg/day shows the lowest average result of PGE-2.

Based on the correlation test using Pearson test between the genistein dosage and the result of COX-2and PGE-2, it was obtained correlation coefficient -0.687 and -0.797, with p-value 0.003 and 0.000. it meant that there was a significant relation between the genistein dosage and the result of COX-2and PGE-2, and there was a significant relation between genistein dosage and the result of COX-2 and PGE-2. The negative correlation coefficient showed negative relation between genistein dosage and the result of COX-2 and PGE-2. The increasing genistein

dosage would impact to the reducing result of COX-2 and PGE-2on endometriosis model of mouse.

Repository Universitas Brawijaya

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN ii
LEMBAR PENGESAHAN iii
PERNYATAAN ORISINILITAS iv
HALAMAN PERUNTUKAN v
RINGKASAN vi
SUMMARY viii
KATA PENGANTAR x
DAFTAR ISI xii
DAFTAR TABEL xiv

DAFTAR GAMBAR xv
DAFTAR LAMPIRAN xvi
DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL. xvii
BAB 1 PENDAHULUAN 1
1.1 Latar belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 4
1.3 Tujuan penelitian 4
1.4 Manfaat Penelitian 5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA 6
2.1 Endometriosis 6
2.2 COX-2 17
2.3 PGE2 19
2.4 Fitoestrogen 23
2.5 Genistein 25
2.6 Dienogest. 31
2.6 Leuprolin Acetat. 33
BAB 3 KERANGKA KONSEP. 43
3.1 Kerangka Konsep. 43
3.2 Hipotesis. 46

Repository Universitas Brawijaya
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
REPOSITORY.UB.AC.ID

BAB 4 METODE PENELITIAN. 47
4.1 Desain Penelitian. 47
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian. 47
4.3 Sampel. 48
4.4 Variabel Penelitian. 49
4.5 Definisi Operasional. 50
4.6 Bahan dan Alat Penelitian. 53
4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data. 54
4.8 Analisa Data. 63
4.9 Kerangka Operasional Penelitian. 67
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA..... 68
5.1 Gambaran umum tikus percobaan, Ekspresi COX-2 dan PGE-2. 80
5.2 Pengujian asumsi yang melandasi ANOVA. 81
5.3 Hasil Uji Ekspresi COX-2 dan PGE-2. 86
5.4 Hasil Analisis Regresi Pengaruh Pemberian genistein berbagai dosis terhadap Ekspresi COX-2 dan PGE-2. 88
5.5. Hasil Analisis Korelasi Pearson. 89
BAB 6 PEMBAHASAN. 90
6.1 Pengaruh Pemberian Genistein berbagai dosis terhadap ekspresi COX-2 pada Mencit Model Endometriosis. 92
6.2 Pengaruh Pemberian Genistein berbagai dosis terhadap ekspresi PGE-2 pada Mencit Model Endometriosis. .....

6.3 Pengaruh Pemberian Genistein berbagai dosis, Leuprolide Acetat dan Dienogset terhadap ekspresi COX-2 pada Mencit Model Endometriosis. 94
6.4 Pengaruh Pemberian Genistein berbagai dosis, Leuprolide Acetat dan Dienogset terhadap ekspresi PGE-2 pada Mencit Model Endometriosis. 96
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN. 105
7.1 Kesimpulan. 105
7.2 Saran. 106 .....
DAFTAR PUSTAKA. 107
LAMPIRAN. 113

DAFTAR TABEL

Hal

Tabel 2.1Cara kerja dan jenis sediaan hormonal dan antihormonal pada penanganan endometriosis……. 16

Tabel 2.2 Perbandingan antara penanganan endometriosis secara Pembedahan dan medicinal…… 17

Tabel 2.3 Beberapa contoh obat Agonis GnRH…… 36

Tabel 5.1 Skala Semi kuantitatif IRS…… 76

Tabel 5.2 Uji Asumsi Normalitas…… 78

Tabel 5.3 Uji Homogenitas Ragam…… 78

Tabel 5.4 Pengujian Pengaruh Genistein terhadap Ekspresi COX-2 dengan ANOVA danTukey 5%…… 79

Tabel 5.5 Perbandingan Ekspresi COX-2 Kelompok K- dengan K+…… 80

Tabel 5.6 Perbandingan Multiple Comparison Ekspresi Cox-2…… 81

Tabel 5.7 Pengujian Pengaruh Genistein terhadap Ekspresi PGE-2 dengan ANOVA danTukey 5%…… 83

Tabel 5.8 Perbandingan Ekspresi PGE-2 Kelompok K- dengan K+…… 84

Tabel 5.9 Perbandingan Multiple Comparison Ekspresi Cox-2…… 85

Tabel 5.10 Hasil Analisis Regresi COX-2 dan PGE-2…… 87

DAFTAR GAMBAR

Hal

Gambar 2.1 Tissue Injury and Repair dalam kaitan peningkatan Reseptor Estrogen..... 10

Gambar 2.2 Proses produksi estrogen local pada endometriosis dan perannya terhadap proses inflamasi..... 11

Gambar 2.3 Peran Prostaglandin pada proses inflamasi..... 23

Gambar 2.4 Tanaman kedelai sumber dari Genistein..... 27

Gambar 2.5 Struktur Genistein dan 17β-Estradiol..... 28

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian..... 48

Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian..... 73

Gambar 5.1 Jaringan Peritoneum pada endometriosis 75

Gambar 5.2 Gambaran Perbandingan Ekspresi ER-α dan ER-β pada Mencit Model Endometriosis..... 75 76

Gambar 5.3 Lesi Kelompok control negatif dan kelompok control positif..... 76

Gambar 5.4 Jaringan peritoneum mencit model endometriosis yang telah diberikan perlakuan..... 78

Gambar 5.5 Gambaran Perbandingan Ekspresi COX-2 pada jaringan peritoneum..... 80

Gambar 5.6 Gambaran Perbandingan Ekspresi PGE-2 pada jaringan peritoneum 87

Gambar 5.7 Histogram Rata-rata Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE-2 88

Gambar 5.8 Scatter Plot Pengaruh Genistein terhadap Ekspresi COX-2 dan PGE-2 88

DAFTAR LAMPIRAN

Hal

Lampiran 1.Keterangan Kelaikan Etik..... 107

Lampiran 2. Izin Penelitian 108

Lampiran 3 Hasil Score Ekspresi COX-2 dan PGE2 109

Lampiran 4 Hasil Penelitian..... 112

Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian..... 125

DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL

SINGKATAN

17β-HSD type 1	: *17β-hidroksi steroid oksidone duktase type 1*
ASRM	: *American Society of Reproductive Medicine*
AA	: Arakidonat Acid
C3	: Complemen 3
COX-2	: *Cyclooxygenase-2*
CPP	: *Cronic Pelvic Pain*
DNA	: *Deoxy Ribonucleic Acide*
ERE	: *Estrogen Responsive Elemen*
GnRH	: *Gonadotropin Releasing Hormon*
IL	: *Interlukin*
IM	: Intra Muskuler
IP	: Intra Peritoneal
IUS	: *Intra Uterin System*
kg	: Kilogram
LNG	: Levonorgestrel
mg	: Milligram
ml	: Mililiter
MRI	: *Magnetik Resonance Imaging*
NF-kβ	: *Nuclear Factor kappa Beta*
NGF	: *Nerve Growth Factor*
NK	: *Natural Killer*

NET : *Nortestosteron*

NK Cell : Natural Killer Cell

NSAID : Non Steroid Anti Inflamasi Drugs

PES : *Prostaglandin Endoperoksidase Sintase*

PBS : *Phospat Buffer Sitrat*

PBSA : *Phospat Buffer Sitrat A*

PGE2 : Prostaglandin E2

PGHS : *Prostaglandin H Sintase*

PGI2 : *Prostasiklin*

RE : *Reseptor Estrogen*

RE-α : Reseptor Estrogen-alpha

RE-β : Reseptor Estrogen-Beta

RNA : *Ribonucleid Acid*

SERMs : *Selective Estrogen Reseptor Modulators*

SCID : *Severe Combined Immunodeficien*

StAR : *Steroidogenic Acute Regulatory Protein*

Th : T-helper

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TX2 : Tromboxan

USG : Utrasonografi

TA : Trans Abdominal

TV : Trans Vaginal

TR : Trans Rektal

VAS : Visual Analog Scale

VGEF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

SIMBOL

α	: alpha
β	: beta
:	: titik dua
;	: titik koma
.	: titik
,	: koma
-	: sampai
%	: persen
<	: lebih kecil dari
>	: lebih besar dari
≤	: lebih kecil dari atau sama dengan
≥	: lebih besar dari atau sama dengan
/	: garis miring atau per
x	: kali
=	: sama dengan
-	: negatif
+	: positif
±	: kurang lebih
°	: derajat
()	: tanda kurung
%	: persen

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 1
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Endometriosis merupakan suatu kelainan ginekologik yang sering diderita perempuan usia reproduksi. Angka kejadiannya diperkirakan mencapai 4% dari seluruh populasi perempuan usia subur, dan kejadian tersebut ditemukan pada 20-40% perempuan yang memiliki masalah infertilitas (Shen *et al.,*2011). Pada wanita usia reproduksi, endometriosis seringkali menyebabkan gangguan yang bersifat siklik atau terus menerus, seperti nyeri haid dan nyeri pelvic menahun. Pada endometriosis, makrofag mensekresikan sitokin proinflamasi, seperti IL-1β dan TNF-α yang menginduksi secara berlebihan kadar COX-2 pada sel stroma endometriosis dan selanjutnya COX-2 akan menyebabkan peningkatan konsentrasi PGE2 di cairan peritoneal yang mengaktifkan serabut nyeri (Wu, *et al.,*2010). TNF-α akan menstimulasi ekspresi prostaglandin synthase-2 yang akan meningkatkan produksi PGE2 dan PGF2α. Produksi prostaglandin E2 secara berlebihan pada inflamasi melalui rangkaian kerja berbagai enzim merupakan salah satu konsep penting dalam pathogenesis nyeri pada endometriosis (Bulun, 2009).

Penatalaksanaan endometriosis dapat dilakukan secara medis maupun pembedahan. Terapi medis tanpa pembedahan pada endometriosis biasanya dimaksudkan untuk mengatasi rasa nyeri dengan berbagai mekanisme termasuk meminimalkan inflamasi, menekan produksi hormon ovarium dan menghambat sintesis estradiol (Giudice, 2010). Bentuk terapi medis pada endometrosis termasuk dengan penggunaan analgesik seperti obat Non-Steroid Anti Inflamasi (NSAID) dan terapi hormon (Farrel and Gara, 2012). Kemajuan besar telah dicapai dalam

penanganan medis pada endometriosis meliputi agonis GnRH, antiagonis GnRH, antagonis progesteron dan beberapa progestin. Meskipun efektif pada banyak wanita, kendala biaya dan efek samping yang ditimbulkan serta penggunaan dalam jangka panjang harus diperhatikan secara ketat dalam indikasi pemakaiannya (Jacoeb and Hadisaputra, 2009). Efek samping yang sering dikeluhkan pada pengobatan endometriosis ini antara lain peningkatan berat badan, jerawat, nyeri kepala, dan penurunan kepadatan tulang, hal ini yang menyebabkan kejadian putus pengobatan (41%) pada penderita endometriosis.

Endometriosis merupakan penyakit yang sangat tergantung dengan estrogen, maka salah satu indikasi penanganannya adalah dengan penurunan kadar estrogen yang dapat dilakukan dengan cara pengobatan menggunakan agonis hormon pelepasan gonadotropin (agonis-GnRH) dan progestin selektif. Salah satu bentuk *agonis-GnRH* adalah Leuprolide Acetat, obat ini digunakan sebagai salah satu pilihan dalam penanganan nyeri pada endometriosis. Pada pemakaian *agonis-GnRH*, hasil utama yang dipertimbangkan adalah laju kekambuhan endometriosis, keamanan dan daya guna pengobatan jangka panjang (Jacoeb and Hadisaputra, , 2009). Sedangkan penggunaan progestin selektif seperti Dienogest memiliki kemampuan untuk menghambat enzim aromatase dan ekspresi COX-2 dan produksi PGE2 pada kultur sel endometriosis (Soares dkk, 2012). *Dienogest* mengurangi lesi endometriosis dengan menciptakan lingkungan progestogenik lokal dan menekan tingkat estrogen sistemik. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa masing-masing obat tersebut setara dalam pengobatan endometriosis, sehingga pemilihan jenis obat yang digunakan harus mempertimbangkan preferensi pasien, efek samping dan ketersediaan obat tersebut dipasaran.

Mengingat proses inflamasi memerankan perkembangan penyakit endometriosis maka obat anti inflamasi menjadi sangat penting. Oleh karena itu, dibutuhkan solusi pengobatan yang dapat secara efisien mengurangi lesi endometriosis dengan meminimalkan kejadian efek samping dan tidak mengganggu kesuburan wanita (Sutrisno *et al.,* 2014). Salah satu bentuk penatalaksanaan endometriosis yang berkhasiat dan efektif pemakaiannya serta relatif dapat dikomsumsi dalam jangka waktu lama adalah dengan menggunakan estrogen alami. Genistein merupakan isoflavon alami yang ditemukan terutama pada tanaman polong khususnya pada kedelai sebagai produk dengan konsentrasi genistein yang tinggi. Genestein menghambat produksi oksida nitrat dan prostaglandin pada konsentrasi non-toksik, dengan menghambat induksi NO dan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2) (Jeong, *et al.,* 2014).

Genistein merupakan *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs) karena dapat bersifat sebagai antiestrogenik pada jaringan reproduksi seperti pada kelenjar mammae, ovarium, endometrium dan prostat (Runge 2009). Ketika kadar estrogen tinggi seperti pada endometriosis, genistein akan berikatan dengan reseptor estrogen. Hal ini lah yang akan menyebabkan ikatan estradiol terhambat sehingga menyebabkan efek antiestrogenik. Genistein sebagai antiestrogenik yang afinitasnya lebih tinggi 20-30 kali lipat pada RE-β tidak mengadopsi konfirmasi agonis tetapi bersifat antagonis (Pilsakova, *et al.,* 2010).

Endometriosis hanya terjadi secara alami pada manusia, jaringan endometrium manusia telah berhasil ditransplantasikan pada tikus imunodefisiensi berat atau *Severe Combined Immunodeficient* (SCID) menggunakan teknik injeksi intraperitoneal secara blind, dengan angka keberhasilan 96,5%. Model ini dapat

digunakan untuk penelitian efek farmakologi dan modulasi hormonal pada endometriosis tanpa disertai perbedaan phylogenik (Awwad *et al*.,1999)

Berdasarkan uraian tersebut diatas maka dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE2 pada mencit model endometriosis.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana perbandingan efek Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE2 pada mencit model endometriosis?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membandingkan pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE2 pada mencit model endometriosis

1.3.2 Tujuan khusus

1. Menganalisis pengaruh pemberian Genistein berbagai dosis terhadap ekspresi COX-2 pada Mencit Model Endometriosis
2. Menganalisis pengaruh pemberian Genistein berbagai dosis terhadap ekspresi PGE2 pada Mencit Model Endometriosis
3. Menganalisis perbedaan pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap ekspresi COX-2 pada Mencit Model Endometriosis.
4. Menganalisis perbedaan pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap ekspresi PGE2 pada Mencit Model Endometriosis.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis/Akademis

Dapat digunakan sebagai informasi ilmiah dalam bidang pendidikan atau sebagai bahan dasar untuk penelitian lebih lanjut terkait medikamentosa untuk endometriosis.

1.4.2 Manfaat Klinis/Praktis

1. Dapat menjadikan pilihan pengobatan dan pencegahan non medis dengan menggunakan herbal pada endometriosis
2. Memberikan prospek yang lebih baik terhadap pengembangan budidaya tanaman obat tradisional di Indonesia.

1.4.3 Manfaat Masyarakat

1. Hasil penelitian ini dapat dijadikan sumber informasi dan atau rujukan dalam pilihan pengobatan endometriosis
2. Menghasilkan pengetahuan tentang perbandingan efek dari pengobatan endometriosis.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Endometriosis

2.1.1 Definisi

Merupakan jaringan (sel-sel kelenjar dan stroma) abnormal yang menyerupai endometrium (*endometrium like tissue*) yang tumbuh disisi luar kavum uterus, dan memicu reaksi peradangan menahun (Jocoeb and Hadisaputra, 2009).

Endometriosis secara klasik didefinisikan sebagai kehadiran kelenjar endometrium dan stroma ektopik, terutama pada panggul, peritoneum, ovarium dan septum rektovaginal. Mempengaruhi 6%-10% dari wanita usia reproduksi, dimana terdapat stigmata endometriosis termasuk dismenore, dispareunia, nyeri panggul kronis, perdarahan uterus yang tidak teratur dan atau infertilitas (Richard,*et al.,*2012).

Endometriosis merupakan penyakit jinak, namun memiliki karakteristik keganasan seperti pada kanker yaitu invasif, pertumbuhan sel yang tidak terkendali, kecenderungan metastasis, dan berulang kembali (Leyland, *et al.,* 2010). Kejadian endometriosis paling sering dijumpai didaerah pelvic, namun dapat juga melibatkan organ-organ disekitarnya antara lain ovarium, tuba falopi, kandung kemih, perineum, vulva dan juga recto sigmoid colon (Barrier, 2010).

2.1.2 Etiologi

Berbagai pendapat telah dikembangkan untuk menjelaskan etiologi endometriosis, tetapi hingga kini belum ada satupun teori tunggal yang dapat mengungkapkan penyakit ini secara tuntas. Beberapa teori yang banyak dianut adalah sebagai berikut :

1. Teori Menstruasi Retrograde

   Teori ini menyatakan bahwa darah mestruasi pada saat haid oleh sebab kontraksi rahim yang tidak normal masuk ke dalam kavum

peritoneum melalui tuba. Fragmen endometrium tersebut kemudian terimplantasi ke dalam mesotelium.

Dalam teori mestruasi retrograde dan implantasi sel endometrium menjelaskan bahwa refluks melalui tuba falopi ke dalam rongga perut dengan implantasi berikutnya ke peritoneum (Farrel and Garad, 2012).

2. Teori Hormonal

Hormon estrogen secara definitif memiliki peran aktif dalam perkembangan penyakit endometriosis. Meskipun sebagaian besar hormone estrogen pada wanita adalah produk yang langsung dari ovarium, sejumlah jaringan perifer dikenal untuk membuat hormone estrogen melalui aromatase androgen dan adrenal ovary (Hoffman *et al.,* 2012). Perkembangan dan pertumbuhan endometriosis tergantung pada hormone estrogen, penyimpangan sintesa dan metabolisme estrogen telah diimplikasikan dalam pathogenesis endometriosis. Estrogen yang diproduksi lokal dalam jaringan endometriosis khususnya estradiol mempunyai dua peranan penting dalam proliferasi sel endometrial dan stimulator sitokin proinflamasi (Bulun *et al.*,2005;Giudice,2010).

3. Teori Metaplasia Coelomik

Lesi endometriosis terbentuk akibat metaplasia dari sel-sel epitel coelom yang berasal dari Muller. Sel-sel ini berdiferensiasi menjadi sel-sel peritoneal, pleura dan sel-sel pada permukaan ovarium. Teori ini sampai kini masih dianut oleh para ahli patologi (Taylor *et al.,*2011*).*

4. Hubungan Genetik (*Genetik Link*)

Dalam perkembangan endometriosis akan muncul lebih banyak pada wanita dengan hubungan genetik dan saudara kembar,

hubungan genetik pada tingkat pertama relatif memiliki resiko lebih tinggi (7-10 kali lipat) dibandingkan dengan masyarakat umumnya. Hal ini kemungkinan beberapa keluarga membawa gen yang memungkinkan sel-sel abnormal untuk bertahan hidup dan tumbuh ektopik dalam rongga panggul (Farrel and Garad, 2012).

5. Faktor Imunologi

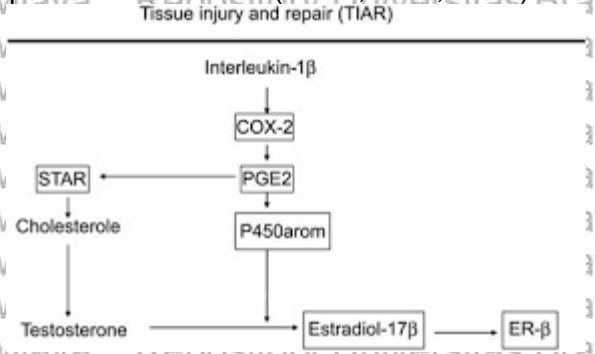
Sebuah penelitian menjelaskan bahwa endometriosis merupakan suatu penyakit yang hal ini terjadi dari suatu gangguan dalam respon kekebalan tubuh. Respon imun dan neuroendokrin yang tidak memadai secara signifikan dan ketidakseimbangan neuroendokrin dan sistem imun terlibat dalam patofisiologi endometriosis (Tariverdian *et al*., 2007).

Sel-sel kekebelan telah terbukti memaikan peran penting, seperti limfosit, Natural Killer Cell (NK Cell), makrofag, dan sel mast dalam lesi endometriosis (Osuga, 2011)

6. Faktor Endokrin

Pada endometriosis terdapat siklus umpan balik posistif estrogen dan pembentukkan prostaglandin. Pertumbuhan dan peradangan merupakan dua proses patologi dasar yang menimbulkan gejala utama endometriosis yaitu nyeri panggul kronis dan infertilitas. Estrogen meningkatkan pertumbuhan dan invasi jaringan endometriosis, sedangkan prostaglandin dan sitokin memediasi nyeri, peradangan dan infertilitas (Bulun, *et al.,* 2005). Estradiol diproduksi lokal dalam jaringan endometriosis baik pada masa ovulasi dan pasca menopause. prekursor androstenedion dari ovarium, adrenal, atau dikonversi menjadi estron dan direduksi menjadi estradiol dijaringan perifer dan implant endometriosis. Jaringan endometriosis

mensintesis androstenedion dari kolesterol melalui aktivitas StAR dan enzim steroidogenik lainnya. Estradiol langsung menginduksi cyclooxygenase-2 (COX-2), yang menimbulkan peningkatan konsentrasi prostaglandin E2 (PGE2). Interlukin 1-β (IL1-β), VEGF, dan PGE2 juga merupakan induser ampuh COX-2. PGE2 pada gilirannya merupakan stimulator StAR dan aromatase dalam sel stroma endometriosis. Hal ini menetapkan lingkaran umpan balik positif yang mendukung pembentukan estrogen terus menerus dan prostaglandin pada endometriosis (Bulun, *et al.,* 2005).



Gambar 2.1 : *Tissue Injury and Repair* dalam kaitan peningkatan reseptor estrogen (Bulun,et al., 2005)

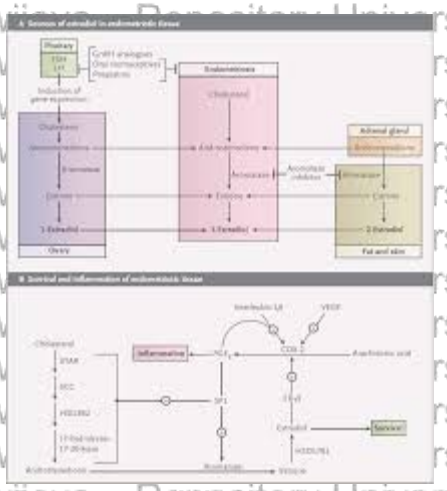
2.1.3 Prevalensi

Endometriosis sering ditemukan pada remaja dan usia reproduksi dari seluruh etnis dan kelompok masyarakat. Diantara 176 juta wanita diseluruh dunia, satu dari 10 wanita usia reproduksi (15-49 tahun) menderita endometriosis. Angka ini meliputi 50-70% dari wanita dengan keluhan nyeri panggul kronis dan 38% wanita tidak susbur (Farrell and Garad, 2012)

2.1.4 Patofisiologi

Terdapat beberapa respon yang terjadi diantaranya respon inflamasi, survival sel, proliferasi, migrasi, adhesi dan invasi, serta neoangiogenesis. Pada gambaran lesi endometriosis, pertumbuhan dan inflamasi memiliki kaitan satu dengan yang lainnya (Giudice, 2010; Soares*, et al.,* 2012). Pertumbuhan endometrium ektopik akan merangsang produksi makrofag berlebihan, produk sitokin proinflamsi dan faktor pertumbuhan dalam cairan peritoneal, sehingga menyebabkan pertumbuhan yang lebih lanjut (Soares, *et al.,* 2012).

Estradiol dependen dapat menstimulasi produksi PGE2 dari lesi endometriosis yang mengaktifkan serabut nyeri, memperkuat invasi neuronal lesi dengan menstimulasi produksi NGF (*Nerveus Growth Factor*) dan neutropin lainnya dan mendorong tumbuhnya nosiseptor yang berkontribusi terhadap nyeri inflamasi persisten serta menghambat apoptosis neuronal. Infertilitas merupakan hasil efek toksik proses inflamasi pada gamet dan embrio, fungsi fimbrie yang menurun serta lapisan endometrium yang resisten terhadap hormone progesterone dan karena endometrium kurang baik kondisinya untuk implantasi embrio. Bahan kimiawi yang mengganggu endokrin dapat menjadi penyebab terjadinya resistensi terhadap progesterone dan disfungsi system imun (Giudice, 2010)



Gambar 2.2 : Proses produksi estrogen lokal pada endometriosis dan perannya terhadap proses inflamasi (Giudice,2010).

2.1.5 Gejala Klinis

Nyeri merupakan ciri utama pada endometriosis dan tidak ada hubungan dengan berat penyakit, tetapi berhubungan dengan tempat jaringan endometrium dan dari gangguan saraf yang mempengaruhi aktivitas neuron disumsum tulang belakang dan otak. Sekitar 75% wanita akan dismenorea dan atau nyeri panggul kronis (CPP), dan rasa nyeri dapat bervariasi dari akut/parah dan melemah. Nyeri dapat terjadi pada berbagai waktu seperti segera, sebelum dan selama periode ovulasi, saat berhubungan seksual, buang air besar, buang angin, atau saat buang air kecil, dan mungkin lokasi nyeri berada diperut, punggung dan atau daerah panggul, paha atau kaki. Tidak ada hubungan antara lesi dan CCP (Farrel and Garad, 2012)

1. Nyeri saat mestruasi (disminorea)
   Disebabkan oleh peradangan akibat sekresi sitokin dalam rongga peritoneum, akibat perdarahan lokal pada sarang endometriosis dan adanya infiltrasi endometriosis ke dalam syaraf pada rongga panggul.
2. Nyeri pelvis

Dihubungkan dengan adanya adhesi dan ditemukannya jaringan parut pada pelvis. Penyebab pasti nyeri masih belum jelas, namun, adanya substansi sitokin dan prostaglandin yang dihasilkan oleh implant endometriotik ke cairan peritoneal merupakan salah satu penyebabnya (Giudice, 2010)

3. Dispareunia

Paling sering timbul terutama bila endometriosis sudah tumbuh disekitar cavum douglasi dan ligamentum sakrouterina. Sering kali juga terjadi perlengketan sehingga uterus dalam posisi retrofleksi.

4. Diskezia

Sakit pada saat buang air besar, keluhan ini timbul bila endometriosis sudah tumbuh dalam dinding rekto sigmoid dan terjadi hematokezia pada saat siklus haid.

5. Infertilitas

Infertilitas yang dialami oleh wanita dengan endometriosis disebabkan proses peradangan yang mempengaruhi ovulasi dan implantasi (Maybin *et al*., 2010). Perlengketan pada ruang pelvis karena endometriosis dapat mengganggu pelepasan oosit dari ovarium atau menghambat perjalanan ovum untuk bertemu dengan sperma (Luthan dkk., 2011)

2.1.6 Diagnosa

Metode utama untuk mendiagnosa endometriosis saat ini adalah dengan Laparaskopi yang sering juga disertai pengambilan biopsi untuk diagnosis histologis (Cureton, 2013)

Untuk menentukan diagnosis endometriosis, ada beberapa metode yang digunakan sebagai berikut :

1. Diagnosis Klinis

Pemeriksaan fisik pada endometriosis dimulai dengan melakukan inspeksi pada vagina menggunakan spekulum, yang dilanjutkan dengan

pemeriksaan bimanual dan palpasi rektovaginal.pemeriksaan bimanual dapat menilai ukuran, posisi dan mobilitas dari uterus dan pemeriksaan rektovaginal diperlukan untuk mempalpasi ligamentum sakro uterina dan septum rekto vaginal untuk mencari ada atau tidaknya nodul endometriosis. Pemeriksaan saat haid dapat meningkatkan peluang mendeteksi nodul endometriosis dan juga menilai nyeri (Djuwantono *et al.*,2012)

2. Diagnosis Pencintraan
   Pencitraan berguna untuk memeriksa penderita endometriosis. Ultrasonografi (USG) pelvik secara trans abdominal (USG-TA), trans vaginal (USG-TV) atau secara trans rektal (USG-TR), dan pencitraan resonansi magnetic atau *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) telah digunakan sebagai cara non-invasif untuk mengenali implant endometriosis yang besar dan endometrioma sebagai lesi mandiri, tetapi cara-cara ini tidak cukup menolong dalam penilaian luasnya endometriosis (Jacoeb and Hadisaputra, 2009). Dalam menegakkan diagnosis endometriosis ultrasonografi transvaginal lebih disukai daripada MRI karena biayanya lebih hemat (Giudice, 2010)
3. Diagnosis Laparoskopik
   Digunakan untuk memastikan diagnosis endometriosis. Biopsi endometrium dari tempat implantasi tertentu akan memperlihatkan gambaran patologi yang khas. Meskipun tidak diperlukan untuk melengkapi diagnosis, tindakan ini berguna untuk terapi berikutnya dan menentukan prognosis secara keseluruhan. Kadang pemastian diagnosis dan derajat penyakit dapat dilakukan selama laparoskopi misalnya untuk kehamilan ektopik yang rupture (Benson and Pernoll, 2009)

4. Diagnostik Laboratorik

Pemeriksaan ini dilakukan dengan menggunakan biomarker dalam menegakkan penyakit endometriosis yaitu dengan CA-125. Konsep yang mendasari penggunaan CA-125 adalah karena antigen permukaan sel yang dijumpai pada turunan epitel selomik dan muller. Jaringan selomik dan muller adalah endometrium, endoservik, tuba fallopi, peritoneum, pleura dan perikardium. Peningkatan CA-125 sesuai dengan stadium endometriosis (Djuwantono *et al.,* 2012). Bila didapati CA> 65 mIU/ml praoperatif menunjukkan derajat beratnya endometriosis (Anwar *et al*., 2011)

2.1.7 Manajemen Penatalaksanaan

Karena sifat endometriosis heterogen maka manajemen penyakit ini harus sangat individual dan ditujukan untuk mengurangi gejala-gejala dan menghentikan endometriosis, terapi medis mungkin termasuk penggunaan analgesik seperti obat non-steroid anti inflamasi (NSAID) dan terapi hormone (Farrel and Garad, 2012)

1. Terapi Medikamentosa

Pengobatan dengan medikamentosa bertujuan untuk mengurangi rasa sakit dan meningkatkan kemungkinan kehamilan (fertilitas). Sering kali tujuan terapi medikamentosa tidak untuk menghapus implant, tetapi hanya untuk menekan perkembangannya. Kemajuan besar telah dicapai dalam penanganan medicinal, meliputi agonis GnRH, antiagonis GnRH, penghambat aromatase, antagonis progesterone, modulator selektif steroid seks, antiangiogenesis dan imunoterapi dengan vaksin. Mengingat kendala biaya, klinisi harus menetapkan secara ketat indikasi pemakaiannya (Jacoeb, 2009).

Tabel 2.1 : Cara kerja dan jenis sediaan hormonal dan antihormonal pada penanganan endometriosis (Jocoeb and Hadisaputra, 2009).

Tujuan	Jenis Obat
- Menurunkan sekresi estrogen oleh ovarium	- Agonis GnRH, antagonis GnRH, kontrasepsi oral, danazo, medroksi-progesteron asetat (MPA), didrogesteron, nomogestrol.
- Menurunkan sekresi estrogen dari sumber ekstragonad dan menghambat proses intrakrin sel endometriosis	- Penghambat aromatase, anastrazol, letrozol
- Melawan khasiat estrogen terhadap susukan endometriosis	- Kontrasepsi oral, danazol, medroksi-progesteron asetat (MPA), didrogesteron, nomogestrel.

2. Terapi Bedah

Bertujuan untuk menangani efek endometriosis itu sendiri, seperti nyeri panggul, subfertilitas, dan kista. Pembedahan bertujuan menghilangkan gejala, meningkatkan kesuburan, menghilangkan bintik-bintik dan kista endometriosis, serta menahan laju kekambuhan (Luthan dkk., 2011)

Tindakan operasi dibagi menjadi dua, yaitu tindakan operasi konservatif dan operasi definitif (Leyland *et al*.,2010)

1. Terapi operasi konservatif
   a. Tindakan operasi laparaskopi atau laparatomi
   b. Tetap memberikan kesempatan untuk hamil
2. Terapi operasi definitif
   a. Pada kondisi berat dilakukan histerektomi, bilateral salpingo oopherektomi atau bahkan mengangkat omentum
   b. Tidak ada kemungkinan untuk hamil kembali.

Tabel 2.2 :Perbandingan antara penanganan endometriosis secara pembedahan dan medicinal (Jocoeb and Hadisaputra, 2009).

Cara Penanganan	Keuntungan	Kerugian
Pembedahan	• Menguntungkan untuk infertilitas • Hasil jangka-panjang lebih baik	• Invasif • Biaya lebih besar • Rawat inap

	• Diagnosis definitif • Pilihan untuk penanganan definitif	
Medisinal	• Mengurangi biaya awal • Penanganan empiric • Efektif untuk menghilangkan nyeri • Rawat jalan	• Ada pengaruh sampingan • Kemungkinan fertilitas rendah

2.2 Cyclooxygenase-2 (COX-2)

2.2.1 Definisi

Adalah enzim yang berperan dalam sintesis prostanoid dengan mengkonversi asam arakhidonat menjadi PGG2 (Prostaglandin G2). Produk akhir dari COX-2 inilah yang berkonstribusi terhadap berbagai faktor biologis dalam memicu pertumbuhan tumor. Cyclooxygenase-2 merupakan enzim dalam bentuk indusibel, dan tidak terdeteksi dalam semua jaringan normal, akan tetapi COX-2 terinduksi oleh berbagai macam inflamasi dan stimulasi mitogenik (Nilanjan Ghosh, 2010).

Pada endometrioma peningkatan ekspresi COX-2 banyak dipengaruhi oleh hormonal maupun sitokin pro inflamasi. Regulasi COX-2 juga meningkat pada beberapa kanker, kondisi premaligna dan berperan dalam proses transformasi kearah keganasan didalam ovarium, yang diperkirakan memberikan kontribusi terhadap proliferasi sel, survival dan angiogenesis (Nezhat, 2008). Aktivasi COX-2 dipercaya mengaktivasi kolagenase, proteolisis dan menurunkan sintesis komponen lapisan dasar membrane digranulosa dan sel epithelial permukaan ovarium melalui prostaglandin (Ceyhan *et al*, 2008)

2.2.2 Peran Cyclooxygenases dan Inflamasi

Peningkatan ekspresi COX-2 pada provokasi sel-sel inflamasi dan pada jaringan yang meradang, menggambarkan bahwa penghambat COX-1 berasal dari prostanoids. Pada studi kasus radang telinga menunjukkan

bahwa COX-1 dan COX-2 dapat menyebabkan respon inflamasi dan isoform yang bertanggung jawab untuk proses peradangan yang tergantung pada stimulasi inflamasi dan tingkat relatif setiap isoform dalam jaringan target (Mardini, 2001).

COX-2 akan menginduksi terjadinya angiogenesis melalui 3 produk dari metabolisme arakhidonik, disamping itu COX-2 juga berperan sebagai immunosuppressant yang menyebabkan penurunan aktivitas sitotoksik dari NK sel, COX-2 juga menghambat terjadinya apoptosis, serta meningkatkan aktivitas dari MMPs sehingga resiko tumorigenesis meningkat dan menyebabkan invasi serta metastasis tumor.

2.2.3 Mekanise Kerja

Interleukin-1β, T-helper (Th-1) diketahui dapat meningkatkan regulasi COX-2 dalam jaringan endometriosis ektopik. Pada endometriosis menunjukkan COX-2 mRNA lebih tinggi, yang kemungkinan mengakibatkan peningkatan terus menerus COX-2 dan produksi PGE-2. (Nezhat, 2008). IL-17A juga dilaporkan menginduksi ekspresi COX-2 pada jaringan endometriosis. IL-17A bersinergi dengan TNFα menginduksi sekresi IL-8. (Hirata., *et al,* 2007). Indikasi peningkatan aktivasi COX-2 oleh estradiol juga tampak. Hal ini ditunjukkan bahwa estradiol (E2), secara langsung maupun tak langsung, melalui sitokin menginduksi aktivasi COX-2 yang akan meningkatkan produksi PGE-2 (prostaglandin E2). Sementara PGE2 juga diketahui sebagai stimulator aromatase dan StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory Protein*) yang poten didalam sel endometriosis (Bulun, 2005, Ceyhan, 2008).

2.2.4 Ekspresi COX-2 pada endometriosis

Sintesis estrogen pada endometriosis dipengaruhi oleh enzim aromatase. Aktivitas aromatase sendiri dipengaruhi oleh kerja enzim

siklooksigenase-2 (COX-2). Dalam sebuah penelitian, ditemukan bahwa ekspresi enzim aromatase pada jaringan endometrium ektopik penderita endometriosis lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok control. Demikian juga ekspresi enzim aromatase pada implant endometriosis, terutama pada lesi berwarna merah. Mengingat enzim COX-2 merupakan enzim utama dalam sintesis prostaglandin, hal ini dipandang sebagai suatu mekanisme terbentuknya lingkaran proses timbulnya nyeri pada endometriosis.

2.3 Prostaglandin E (PGE2)

2.3.1 Definisi

Prostaglandin adalah komponen mirip hormon yang berfungsi sebagai mediator dari berbagai respon fisiologis seperti inflamasi, kontraksi otot, dilatasi pembuluh darah dan agregasi platelet. Prostaglandin terbentuk dari asam lemak tak jenuh yang disintesis oleh seluruh sel yang ada dalam tubuh (Fortier dkk, 2008). Prostaglandin menyebabkan respon inflamsi yang akan menimbulkan spasme otot uterus dan keluhan sistemik seperti mual, muntah, perut kembung dan sakit kepala. PGF2α merupakan hasil metabolisme dari asam arakhidonat oleh enzim siklooksigenase, menyebabkan vasokontriksi dan kontraksi dari miometrium, yang menyebabkan iskemik dan rasa nyeri.

Prostaglandin termasuk dalam kelompok eicosanoid, salah satu kelompok lipid yang termasuk dalam asam lemak tak jenuh melalui kerja enzim. Eicosanoid adalah kelompok molekul pemberi sinyal yang terlibat dalam sejumlah jalur regulasi dan kondisi patologis, seperti respon imun dan inflamasi, anafilaksis, vasodilatasi dan vasokontriksi, pembekuan darah, stimulasi ujung saraf perifer dan perkembangan penyakit auto imun. (Murakami, *et al*, 2002)

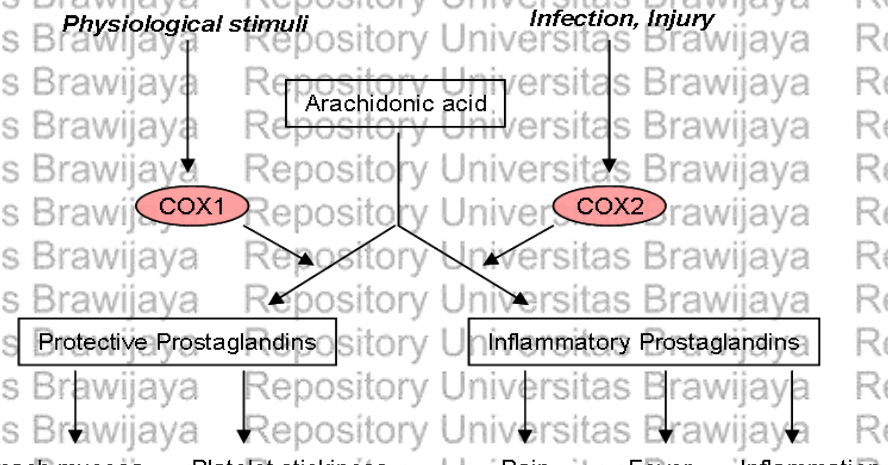
PGE2 adalah eicosanoid dengan berbagai fungsi fisiologi dan patologi yang banyak terlibat dalam perkembangan endometriosis. Dari bukti-bukti yang ada menunjukkan bahwa selama endometriosis PGE2 mengatur banyak proses patofisiologis termasuk proliferasi sel, pencegahan apoptosis, penekanan kekebalan dan angiogenesis. Pada studi terbaru menunjukkan bahwa angiogenesis memainkan peran penting dalam pertumbuhan dan kelangsungan hidup lesi endometriosis.(Akiko Numao*, et al,* 2010)

2.3.2 Sintesis Prostaglandin

Dimulai dengan adanya rangsangan baik secara fisik, kimiawi maupun termik seperti terbakar, endotoksin, hipertonik dan hipotonik infus, thrombus, katekolamin, bradikinin, angiotensin, dan hormon steroid dapat merusak membrane sel sehingga memicu pembentukkan asam arakhidonat dari fosfolipid yang terdapat pada membrane sel oleh enzim phospholipase (*cytosolic PLA2*). Asam arakidonat ini selanjutnya akan memasuki lintasan metabolisme siklooksigenase akan dikatalisir oleh enzim cyclooxygenase (COX) yang dikenal juga dengan prostaglandin H sintase (PGHS) atau *Prostaglandin Endoperoksidase Sintase* (PES) yang mempunyai dua aktivitas yaitu siklooksigenase dan peroksidase. Dimana siklooksigenase ini mempunyai dua isoenzim yang dikenal dengan COX-1 dan COX-2. COX-1 dapat merangsang pembentukkan prostasiklin sedangkan COX-2 merupakan respon dari inflamsi, growth faktors, sitokin dan juga endotoksin. Produk yang pertama sekali dihasilkan reaksi enzimatis ini adalah Prostaglandin G2 (PGG2) kemudian akan dimetabolisme menjadi prostaglandin H2 (PGH2), yang merupakan precursor terbentuknya senyawa prostanoid seperti Prostaglandin D (PGD2), Prostaglandin E (PGE2), Prostaglandin F (PGF2), Prostasiklin (PGI2) dan Tromboxan (TX2).

2.3.3 Prostaglandin E2 dan Inflamasi

Dalam kondisi fisiologis, PGE2 merupakan mediator penting dari banyak fungsi biologis, seperti regulasi respon imun, tekanan darah, intergritas gastrointestinal dan kesuburan. Regulasi dan degradasi sintesis PGE2 banyak dikaitkan dengan berbagai kondisi patologis (Legler, 2010). Dalam proses peradangan PGE2 terlibat pada semua proses yang mengarah ke tanda-tanda klasik dari peradangan seperti : kemerahan, pembengkakan dan nyeri. Kemerahan dan odeme merupakan hasil dari peningkatan aliran darah ke jaringan yang meradang melalui PGE2 dan dilatasi arteri serta peningkatan permeabilitas mikrovaskuler (Funk, 2001)



Gambar 2.3 : Peran Prostaglandin pada proses inflamasi (Funk,2011)

2.3.4 Ekspresi PGE2 pada endometriosis

Terdapat peningkatan ekspresi kadar prostaglandin, estradiol dan progesterone pada lesi endometriosis dibandingkan endometrium perempuan normal. Aktivitas enzim COX-2, aromatase dan produksi prostaglandin E2 (PGE2) lebih rendah pada endometrium normal dibandingkan endometrium penderita endometriosis. Pada endometrium penderita endometriosis, terdapat peningkatan aktivitas COX-2 dan aromatase, sehingga menghambat teraktifasinya enzim HSD17β2 (Hydroxysteroid Dehydrogenase 2). Kondisi ini menyebabkan kadar estradiol local semakin meningkat. Peningkatan kadar estrogen menyebabkan lesi endometriosis dapat terus tumbuh dan berkembang sedangkan pengeluaran prostaglandin dan sitokin merangsang inflamasi, aktivasi serta invasi serat saraf disekitar lesi yang berakibat timbul rasa nyeri yang hebat yang bersifat kronis.

Prostaglandin E2 dan F2α diketahui diproduksi secara berlebihan diuterus dan jaringan endometrium penderita endometriosis. Sifat vasokonstriktif dan kemampuan prostaglandin F2α untuk menimbulkan kontraksi berperan dalam timbulnya dismenore. Lebih jauh prostaglandin E2 mempunyai sifat dapat merangsang nyeri secara langsung. Dengan melihat karakteristik tersebut, dapat dipahami bahwa peningkatan kedua zat tersebut akan merangsang timbulnya nyeri pada endometriosis (Bulun, 2012).

Produksi prostaglandin E2 secara berlebihan pada inflamasi melalui rangkaian kerja berbagai enzim merupakan salah satu konsep penting dalam pathogenesis nyeri. Sel stroma lesi endometriosis menghasilkan prostaglandin E2 dalam jumlah banyak, yang selanjutnya menginduksi

sistesis estradiol lokal dan nyeri panggul. Ekspresi enzim COX-2 meningkat pada lesi endometriosis dibandingkan dengan ekspresi serupa pada sel stroma endometrium normal. Keterpaduan kedua enzim tersebut menyebabkan peningkatan sintesis prostaglandin E2 pada lesi endometriosis. (Bulun, 2009)

2.4 Fitoestrogen

2.4.1 Definisi

Fito = tanaman, estrogen = hormon wanita. Jadi fitoestrogen adalah senyawa kimia yang dapat bekerja seperti estrogen (karena mempunyai cincin fenol), yang diperoleh dari proses pencernaan kita (proses fermentasi serat tanaman oleh bakteri di usus besar) setelah makan tumbuhan tertentu (buah, sayur, biji-bijian) (Darmoutomo, 2009).

Ada 3 jenis utama fitoestrogen yaitu isoflavon, coumestan, dan lignan. Isoflavon merupakan nama umum, terdiri dari lebih dari 1000 jenis. Genistein dan daidzein adalah fitoestrogen yang lebih sering diteliti karena kandungan zat estrogenik (zat yang bekerja seperti estrogen)-nya paling besar. Genistein dan deidzein terdapat dalam kedelai, kacang polong, semanggi dan biji-bijian. Kandungan fitoestrogen tergantung cara memproses kedelainya. Kadar phytoestrogen dari prodak turunan biji kedelai (susu, tepung kedelai) lebih rendah dibandingkan kedelai murni (Darmoutomo, 2009). Phytoestrogen memiliki efek estrogenik dan anti estrogenik pada dosis tertentu, dengan beberapa manfaat yang berkaitan dengan penyakit termasuk kanker (mampu mencegah pertumbuhan dan perkembangan sel kanker (Sutrisno, 2010).

2.4.2 Mekanisme Phytoestrogen

Terdapat 2 mekanisme kerja dari fitoestrogen adalah melalui mekanisme genomik melalui aktivasi atau inaktivasi reseptor estrogen dan mekanisme non genomik tanpa melewati reseptor.

1. Mekanisme genomic
   Melalui mekanisme genomik fitoestrogen memiliki dua cara yaitu isoflavon langsung berikatan dengan reseptor estrogen (*direct genomic*) berupa transkripsi gen sehingga dapat menimbulkan efek seperti estrogen sedangkan mekanisme yang kedua yaitu melalui mekanisme secara tidak langsung *(indirect genomic)* dengan mempengaruhi kadar estrogen endogen dalam sirkulasi (*mekanisme kompetitif inhibitor*) (Sutrisno, 2010).
2. Mekanisme non genomik
   Mekanisme non genomik, *phytoestrogen* yaitu genistein bekerja sebagai tiroksin kinase inhibitor, inhibisi topoisomerase II atau bisa melalui reseptor membran yang diduga sebagai molekul estrogen (Sutrisno, 2010). Prinsip reaksi dasar ikatan dengan reseptor dan DNA adalah genistein mengadakan difusi melalui membran sel. Dalam sel target berikatan dengan reseptor protein. Interaksi hormon reseptor kompleks dengan sekuen spesifik dari DNA (ERE) Yang berlokasi didaerah promoter gen beraksi sebagai faktor transkripsi. Tekadang terjadi pengaktifan transkripsi dari gen, sintesis mRNA, transport mRNA ke ribosom, sintesis protein dalam sitoplasma menghasilkan aktivitas seluler yang spesifik, ekspresi gen dalam sel yang menghasilkan respon (Gruber *et al*., 2002: Sutrisno, 2010).

2.5 Genistein

2.5.1 Definisi

Genistein merupakan salah satu isoflavon yang sering dipelajari, umumnya dikenal dengan sebutan *phytoestrogen.* Genistein dapat bersifat

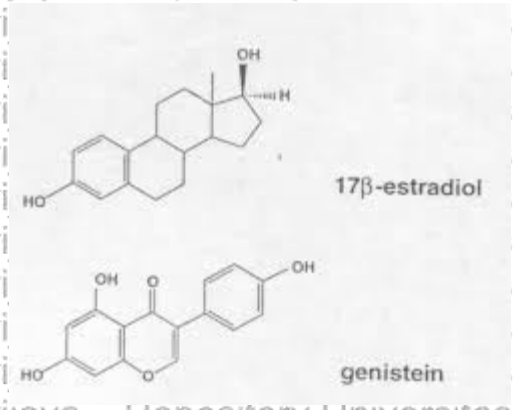
estrogenik maupun antiestrogenik dan berhubungan dengan masalah reproduksi (Eustache *et al*., 2009). Genistein bekerja sebagai *selective estrogen reseptor modulators* (SERMs), memiliki efek anti estrogenik pada jaringan reproduksi (kelenjar mammae, ovarium, endometrium dan prostat) dan efek estrogenik pada jaringan tertentu seperti tulang (Mucthaidi dkk., 2000 Soehartono dkk., 2000). Pada kedelai Genistein dijumpai sekitar 60% dari isoflavon, sedangkan 30% Daidzein, dan 10% Glycetein (Lee *et al.,* 2012).

Gambar 2.4 : Tanaman kedelai sumber dari Genistein (Wulan, 2010)

2.5.2 Struktur Genistein

Genistein adalah molekul kecil yang ditemukan dalam produk kedelai (Janet *et al*., 2010). Dalam tubuh genistein mempunyai struktur mirip estrogen, memiliki jalur mekanisme serupa dengan estrogen. Untuk menimbulkan respon biologis genistein berikatan dengan RE-α dan RE-β. *Genistein* mempunyai afinitas yang lebih besar terhadap RE-β dibandingan dengan RE-α. Sifat SERM pada *genistein* memberikan efek agonis dan antagonis, hal ini dipengaruhi pula oleh kadar estrogen endogen (Patisaul

and Jefferson, 2010., Matsukura *et al*., 2011.,). Genistein mampu meningkatkan kadar RE-β pada berbagai usia, baik dosis rendah atau tinggi (Handayani dkk., 2010).



Gambar 2.5 : Struktur Genistein dan 17β-estradiol (Pavese *et al.,* 2010)

Struktur, ikatan dan aktivas genistein menyerupai 17-β-estradiol. Kemiripan antara estrogen dan genistein terletak pada dua gugus –OH atau hidroksil (C4 dan C7), berjarak 11,0 – 11,5 A yang intinya menyerupai inti estrogen. Gugus hidroksil C7 diperlukan genistein untuk berikatan dengan reseptor estrogen. Selain itu, jarak antara C4 dan C7 disepakati sebagai struktur pokok suatu substrat agar mempunyai efek estrogenik yang memiliki aftinasi tertentu terhadap reseptor estrogen (Pavese, *et al.,* 2010).

2.5.3 Metabolisme Genistein

Genistein diidentifikasi memiliki kemiripan dengan struktur estrogen dan disebut sebagai *phytoestrogen.* Struktur dasar senyawa isoflavon adalah inti sel flavon, yang terdiri dari dua cincin benzene dihubungkan melalui cincin pyrane heterosiklik. Kesamaan struktur dengan 17β-estradiol, genistein telah terbukti bersaing dengan 17β-estradiol pada reseptor estrogen. (Kuiper.,1999) melaporkan bahwa afinitas pengikatan genistein untuk ER-α adalah 4%, dan untuk ER- β adalah -7%, dibandingkan dengan estradiol.

Interaksi dengan reseptor estrogen, genistein dapat mengikat lebih kuat sehingga mempengaruhi metabolisme estrogen, berperan secara potensial dalam pencegahan kanker yang berhubungan dengan hormone (BanerJee *et al*., 200). Setelah dikonsumsi, genistein bersama dengan isoflavon lain terkonjugasi dengan glikosida dan dimetabolisme oleh enzim usus. Genistein pada manusia dimetabolisme untuk *dihydrogenistein* dan 6'*-hydroksis-O-desmethylangolensin*. Genistein dan dimetabolismenya telah terdeteksi dalam plasma, cairan prostat, payudara dan aspirasi cairan kista, urin, dan feses.

2.5.4 Mekanisme Kerja Genistein

2.5.4.1 Interaksi Dengan Reseptor Estrogen

Genisten berinteraksi dengan berikatan pada reseptor estrogen untuk mengaktivasi *Estrogen Responsive Elemen* (ERE) sehingga mempengaruhi proses transkripsi (Di *et al.,* 2008). Reseptor estrogen terdiri dari RE-α dan RE-β yang ditemukan pada beberapa organ tubuh dan terkadang kadarnya berlebihan. Ekspresi RE-α dan RE-β pada endometrioma endometriosis lebih tinggi dibandingkan endometrioum eutopik dengan RE- β lebih dominan daripada RE-α (Xue, *et al.,* 2007).

Genistein yang berinteraksi dengan reseptor dan lebih selektif pada RE-β, merupakan natural SERMs (*Selective Estrogen Receptor Modulators*) yang memiliki efek estrogenik (bekerja seperti estrogen atau berlaku sebagai pengganti estrogen) pada tulang dan efek anti estrogenik (bekerja menekan fungsi estrogen) pada jaringan reproduksi (kelenjar mammae, ovarium, endometrium dan prostat) (Anggraini, dkk.,2008). SERMs dapat berfungsi sebagai antagonis murni bila bertindak melalui reseptor estrogen-β pada gen yang mengandung

elemen-elemen reaksi estrogen tetapi bisa berfungsi sebagai agonis parsial bila bertindak pada gen tersebut melalui reseptor estrogen-α (Hartmann and Ringgs,2003).

2.5.4.2 Interaksi Dengan Enzim

Genistein bekerja sebagai inhibitor berbagai enzim dalam intraseluler. Genistein menghambat aktivitas enzim yang memetabolisme estrogen yaitu inhibis aktivitas 5α-reduktase, yang mengkatalisis konversi testosterone menjadi 5α-dihidrotestosteron dan menginhibisi aromatase yang memediasi konversi testosterone menjadi estradiol (Pilsakova, *et al.,* 2010). Selain itu genistein menghambat 17β-hidroksisteroid oksidoreduktase type 1 (17β-HSD type 1) suatu enzim yang mengkonversi estron menjadi estradiol sehingga menurunkan produksi estrogen dari jaringan perifer, akibatnya total estrogen dalam sirkulasi menurun (Rice and Whitehead.,2006).

2.5.5 Target Molekul dan Efek Genistein

Genistein merupakan salah satu golongan isoflavon *aglikogen* (bebas) memiliki afinitas terhadap reseptor estrogen paling aktif dibandingkan dengan *dietzein*. Genistein dapat berfungsi sebagai *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs). Pada kondisi kadar estrogen tinggi seperti pada kanker dan endrometriosis, genistein akan bekerja sebagai anti estrogen (anti estrogenik), adanya kemiripan struktur dengan 17-β-estradiol, *genistein* mampu mengikat resptor estrogen (RE), dimana dalam tubuh manusia ditemukan reseptor estrogen dalam dua bentuk yaitu estrogen resptor α dan estrogen resptor β (RE- α dan RE- β) dengan ekspresi yang berbeda dalam jaringan (Darmoutomo, 2009).

Genistein sebagai SERMs dapat berfungsi sebagai antagonis murni bila bertindak melalui reseptor estrogen β pada gen yang mengandung

elemen-elemen reaksi estrogen tetapi bisa berfungsi sebagai agonis parsial bila bertindak pada gen tersebut melalui resptor estrogen α (Hartmann and Riggs, 2003). Kesamaan struktur dengan 17-β-estradiol, genistein mampu mengikat reseptor estrogen (RE) (Riecansky, 2010). Genistein yang memiliki afinitas yang lebih tinggi pada RE- β sekitar 20-30 kali lebih tinggi daripada RE- α dan sebanding dengan afinitas 17-β-estradiol, namun memiliki aktifitas lebih rendah dari 17- β-estradiol (Riecansky, 2010).

Genistein yang memiliki afinitas tinggi pada RE-β, menghambat tindakan RE-α dengan membentuk heterodiner sehingga menekan aktivasi gen dalam menstimulasi proliferasi sel (Rice *and* Whitehead, 2006). Pada beberapa jaringan RE-β menurunkan transkripsi gen yang diregulasi oleh RE-α, sehingga bersifat sebagai antagonis RE-α, namun bila tidak ada ER-α, maka Re-β dapat berfungsi sebagai reseptor estrogen. RE-β berfungsi sebagai supresol alami dari RE-α pada jaringan mammae (Gruber *et al*., 2002: Mendelson, 2009). Menurut Hartman and Rigs (2003) RE-α bertindak sebagai activator sedangkan RE-β yang memiliki sifat antiproliferasi dapat menghambat tindakan RE-α dengan membentuk heterodimer. Estrogen yang berikatan dengan RE-α dan RE-β dapat menyebabkan efek yang berlawanan dalam transkripsinya, seperti estradiol dapat menstimulasi transkripsi gen dengan RE yang spesifik, tetapi estradiol menginhibis transkripsi gen bila berikatan dengan RE-β dalam sistem yang sama (Gruber er al., 2002; Mendekshon,2009).

Pada dasarnya dalam proses transkripsi sintesis protein, komplek estrogen reseptor tidak hanya berikatan pada ERE saja namun juga dengan protein ko regulator yang terdiri atas ko-aktivator dan ko-reseptor. Untuk menginduksi proses transkripsi gen dari reseptor estrogen, dibutuhkan

protein ko-aktivator yang hasilnya adalah produksi messanger RNA (mRNA) untuk sintesis protein dengan respon seluler sesuai dengan karakteristik hormone sedangkan ko-reseptor akan bekerja sebaliknya yakni menghambat proses transkripsi gen (Gruber et al., 2002).

Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa genistein dalam kisaran 5 sampai 5 µM/L dapat menghambat pertumbuhan sel tumor leukemia, limfoma, kanker prostat, kanker payudara dan kanker paru-paru. Genestein menunjukan potensi estrogenik dalam ketidakadaan estrogen dan potensi anti estrogenik dikehadiran estrogen. Konsentrasi Genestein dalam kisaran 1-5 µM/L, tidak cukup untuk melindungi endometrium (Giu-hua and Shou-qing, 2008).

2.6 Dienogest

2.6.1 Definisi

Merupakan sediaan hormon yang digunakan untuk pengobatan gejala nyeri pada lesi endometrium (jaringan luar pada dinding rahim). Dienogest merupakan turunan nortetosteron tanpa androgenik melainkan suatu kegiatan antiandrogenik sekitar sepertiga dari cyproterone asetat. Dienogest mengikat progesterone reseptor dari rahim manusia dengan hanya 10% dari afinitas relative progesterone. Dienogest bekerja pada endometriosis dengan mengurangi produksi endogen estradiol dan menekan efek trofik estradiol pada kedua eutopik dan endometrium ektopik.

Dienogest merupakan progestin selektif yang mengkombinasikan 19-norprogestin dan turunan progesteron sehingga hanya memberikan efek lokal pada jaringan endometrium. Tidak seperti agen 19-norprogestin lainnya, dienogest memiliki efek androgenik yang rendah, bahkan memiliki efek anti androgenik yang menguntungkan sehingga hanya memberikan efek yang minimal terhadap perubahan kadar lemak dan karbohidrat.(Batzer.,2006).

Bentuk sediaan yang sering digunakan pada pengobatan endometriosis adalah Dienogest dengan merk dagang *Visanne,* yang mengandung hormon progestogen dienogest. Minum 1 tablet *Visanne* setiap hari dapat menyusutkan jaringan endometrium dan mengurangi keluhan yang berupa nyeri pada panggul dan nyeri akibat perdarahan bulanan.

2.6.2 Cara Kerja

Tidak seperti estrogen, progesteron memilik efek antimitotik terhadap sel endometrium, sehingga memiliki potensi dalam pengobatan endometriosis. Progestin turunan 19-nortestosteron seperti dienogest memiliki kemampuan untuk menghambat enzim aromatase dan ekspresi COX-2 dan produksi PGE2 pada kultur sel endometriosis. Biopsi percontoh jaringan endometrium dari wanita yang diobati dengan LNG IUS selama 6 bulan menunjukkan ekspresi reseptor estrogen yang berkurang, menurunnya indeks proliferasi sel dan peningkatan ekspresi Fas (Soares dkk,2012).

2.6.3 Struktur Kimia

Progestogen umumnya diklasifikasikan menurut struktur kimianya, kebanyakan memiliki kerangka yang terdiri dari 21 atom karbon (C-21 Progestogen). Derivate dari C-19 senyawa Nortestosteron (NET) juga diklasifikasikan sebagai progestogen yang termasuk didalamnya estranges dan gonanes. Dienogest adalah estrange, turunan dari NET, tapi bukan memiliki etinil C-17.

2.6.4 Efektifitas

Dienogest dengan dosis harian 2 mg telah dibuktikan bermakna dalam mengurangi nyeri pelvis dan nyeri haid yang terkait endometriosis. Dienogest juga setara dengan GnRH agonis dalam pengobatan nyeri endometriosis. Terdapat tiga penelitian yang menilai efek penggunaan LNG (Levonorgestrel) IUS (Intra Uteri Sistem) terhadap gejala terkait endometriosis. Penelitian pertama oleh Petta dkk membandingkan LNG IUS

dengan leuprolide asetat. Didapatkan penurunan bermakna skor VAS setelah 6 bulan pada kedua kelompok dan tidak ada perbedaan antar kelompok tersebut. Penelitian kedua oleh Gomes dkk menilai efek LNG IUS pada stadium ASRM yang menemukan penurunan yang bermakna skor nyeri pelvik setelah 6 bulan dan tidak ada perbedaan antara LNG IUS dengan leuprolide asetat. Fereira dkk pada 2010 juga mendapatkan penurunan skor nyeri dan tidak ada perbedaan antar LNG IUS dengan GnRH analog.(Eshre, 2013).

2.7 Agonis GnRH (Leuprolin Asetat)

2.7.1 Definisi

Suatu dekapeptida yang terdapat pada semua mamalia. Gonadotropin-releasing hormone disekresi oleh neuron-neuron dihipotalamus. Bahan ini mengalir melalui pleksus porta vena hipotalamus-hipofisis ke hipofisis anterior, tempat berikatan dengan reseptor yang berhubungan ke protein G dimebran plasma sel-sel gonadotrofi. Analog-analog sintetik GnRH mencakup goserelin, histrelin, leuprolid, nafarelin dan triptolin.

Tabel 2.3 : Beberapa contoh obat Agonis GnRH

No	Nama Generik	Dosis	Nama Dagang
1	Leuprolide Asetat/Leuproreline	3,75 mg	Lupron, Tapros, Endrolin
2	Gosereline Asetat	3,6 mg, 10,8 mg	Zuladex
3	Nafarelin Asetat		Synarel

2.7.2 Mekanisme Kerja

Mekanisme kerja dari leuprolin acetat adalah dengan menduduki reseptor gonadotropin dihipofisis dan menghambat sintesis dan sekresi FSH dan LH. Bereaksi lebih lama yaitu 3-8 jam sehingga reseptor GnRH terus

menerus diduduki oleh agonisnya. Menyebabkan penekanan fungsi hipofisis dengan pengaturan turun (*Down Regulation*) reseptor GnRH hipofisis sehingga merendahkan kadar FSH dan LH, folikulogenesis tidak terjadi dan menurunkan kadar estrogen.

Pajanan GnRH yang terus menerus ke hipofisis akan mengakibatkan *down-regulation* reseptor GnRH yang akan mengakibatkan berkurangnya sensitifitas kelenjar hipofisis. Kondisi ini akan mengakibatkan keadaan hipogonadotropin hipogonadisme yang akan mempengaruhi lesi endometriosis yang sudah ada. Amenore yang timbul akibat kondisi tersebut akan mencegah pembentukan lesi baru (Soares dkk, 2012).

GnRH juga akan meningkatkan apoptosis jaringan endometriosis. Selain itu GnRH bekerja langsung pada jaringan endometriosis. Hal ini dibuktikan dengan adanya reseptor GnRH pada endometrium ektopik. Kadar mRNA reseptor estrogen (ERα) menurun pada endometriosis setelah terapi jangka panjang. GnRH juga menurunkan VEGF yang merupakan faktor angiogenik yang berperan untuk mempertahankan pertumbuhan endometriosis. Interleukin 1A (IL-1A) merupakan faktor imunologi yang berperan melindungi sel dari apoptosis.(Betzar, 2006)

2.7.3 Efektifitas

Supresi ovarium yang diinduksi oleh pemberian terus-menerus agonis GnRH sangat menurunkan konsentrasi estrogen dan progesterone dan mencegah perubahan siklis. Pemberian non-pulsatil yang terus menerus GnRH atau analog GnRH menghambat pelepasan FSH dan LH oleh hipofisis baik pada wanita maupun pria, sehingga menjadi hipogonadisme. Durasi terapi dengan agonis GnRH yang dianjurkan dibatasi 6 bulan karena penekanan ovarium melebihi periode ini dapat menyebabkan penurunan kepadatan tulang. Analog GnRH dapat diberikan secara subkutis,

intramuskulus, melalui semprot hidung atau sebagai implant subkutis (Katzung, 2014).

Karena efek pemberian GnRH analog adalah efek hipoestrogenik, maka diperlukan pemberian estrogen sebagai terapi *add back*. Hal ini didasari bahwa kadar estrogen yang diperlukan untuk melindungi tulang, fungsi kognitif dan mengatasi gejala defisiensi estrogen lainnya lebih rendah dibandingkan kadar yang akan mengaktifasi jaringan endometriosis. Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa terapi add back ini tidak mengurangi efektifitas GnRH analog.(Esher, 2013) Pada pemberian GnRH analog dengan terapi add back estrogen dan progestogen selama 6 bulan, densitas mineral tulang lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian GnRH saja.

2.7.4 Toksisitas

Pemberian kontinu salah satu analog GnRH (leuprolid, nafarelin, goserelin) pada wanita menimbulkan gejala khas menopause, yang mencakup hot flushes, berkeringat dan nyeri kepala, depresi dan berkurangnya libido,nyeri menyeluruh, kekeringan vagina dan atrofi payudara juga dapat terjadi. Berkurangnya densitas tulang dan osteoporosis dapat terjadi pada pemakaian jangka panjang. Kontraindikasi pemberian analog GnRH meliputi kehamilan dan menyusui.

2.8 Pengaruh Pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE2

2.8.1 Pengaruh Genistein terhadap Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE2

Genistein sebagai salah satu strategi pengobatan terbaru, dimana genistei*n* merupakan unsur utama dari fitoestrogen golongan isoflavon (Amberkar *et al*., 2010). Isoflavon mempunyai efek anti inflamasi dengan mekanisme kerja melalui efek penghambatan jalur metabolism asam

arachidonat, pembentukan prostaglandin, pelepasan histamine, atau aktivitas radical scavenging suatu molekul.

Genistein dapat bekerja sebagai *selektive estrogen reseptor modulator* (SERMs) yang memiliki efek estrogenik (bekerja seperti estrogen atau berlaku sebagai pengganti estrogen) pada tulang dan efek anti estrogenik (bekerja menekan fungsi estrogen) pada jaringan reproduksi seperti kelenjar mammae, ovarium, endometrium dan prostat (Muchtadi *dkk*., 2008). Genistein dan estradiol bersaing untuk menempati Reseptor Estrogen (RE), namun genistein mempunyai afinitas terhadap RE-β lebih tinggi daripada RE-α. Genestein menghambat produksi oksida nitrat dan prostaglandin pada konsentrasi non-toksik, dengan menghambat induksi NO dan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2).

2.8.2 Pengaruh Leuprolide Acetat terhadap Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE2

Efek pemberian GnRH analog dalam hal ini pemberian Leuprolin Acetat adalah efek hipoestrogenik, Pajanan GnRH yang terus menerus ke hipofisis akan mengakibatkan *down-regulation reseptor Estrogen α (REα)* dan memicu penekanan reseptor progesterone serta peningkatan kadar siklooksigenase-2 (COX-2) yang berkontribusi terhadap resistensi progesterone dan reaksi inflamasi untuk mencegah resistensi progesterone dan proses inflamasi yang terkait nyeri pada endometriosis.

Selain itu GnRH bekerja langsung pada jaringan endometriosis. Hal ini dibuktikan dengan adanya reseptor GnRH pada endometrium ektopik. Kadar mRNA reseptor estrogen (ERα) menurun pada endometriosis setelah terapi jangka panjang. Amenore yang timbul akibat kondisi tersebut akan mencegah pembentukan lesi baru.

2.8.3 Pengaruh Dienogest terhadap Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE2.

Dienogest bekerja pada endometriosis dengan mengurangi endogen produksi estradiol dan menekan efek tropik estradiol pada kedua eutopik dan ektopik endometrium. Tidak seperti estrogen, progesteron memilik efek antimitotik terhadap sel endometrium, sehingga memiliki potensi dalam pengobatan endometriosis. Progestin dalam dienogest mampu menurunkan produksi hormone estrogen dalam tubuh sehingga pertumbuhan lesi endometrium bisa menurun. Progestin turunan 19-nortestosteron seperti pada dienogest memiliki kemampuan untuk menghambat enzim aromatase dan ekspresi COX-2 dan produksi PGE2 pada kultur sel endometriosis.

2.9 Mencit (Mus Musculus)

2.9.1 Definisi

Adalah anggota *Muridee* (tikus-tikusan) yang berukuran kecil. Mencit sangat mudah menyesuaikan diri dengan perubahan yang dibuat manusia, bahkan jumlahnya yang hidup liar dihutan barangkali lebih sedikit daripada yang tinggal diperkotaan. Mencit percobaan (laboratorium) dikembangkan dari mencit, melalui proses seleksi. Mencit merupakan hewan yang paling banyak digunakan sebagai hewan model laboratorium dengan kisaran penggunaan antara 40-80%. Mencit banyak digunakan sebagai hewan laboratorium (khususnya digunakan dalam penelitian biologi), karena memiliki keunggulan-kenggulan seperti siklus hidup relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi, mudah ditangani, serta sifat produksi dan karakteristik reproduksinya mirip hewan lain, seperti sapi, kambing, domba dan babi (Alim,2013)

2.9.2 Siklus Estrus

1. Proestrus

Pada fase ini mulai terlihat perubahan pada alat kelamin betina. Pada ovarium terlihat pertumbuhan folikel pada ukuran yang maksimal.

2. Estrus
Pada siklus ini siklus menunjukkan perilaku mau menerima hewan jantan dan merupakan fase birahi. Perubahan terjadi pada ovarium yaitu terjadinya pemasakan bagi folikel yang telah dimulai pertumbuhannya pada fase proestrus. Folikel pada fase ini telah siap diovulasikan. Pada tikus ovalasi terjadi pada pertengahan fase estrus. Keadaan ini terjadi selama 9-15 jam dan ditandai dengan berlari-lari yang sangat tinggi.

3. Metestrus
Terjadi segera setelah fase estrus berakhir. Dalam ovarium terjadi pembentukan korpus hemoragikum pada tempat folikel de Graff yang baru saja melepaskan ovum. Banyak leukosit muncul dalam lumen vagina dengan sel-sel superfisial.

4. Diestrus
Pada fase ini ditandai dengan tidak adanya kebuntingan, tidak ada aktifitas kelamin dan hewan menjadi tenang. Fase ini merupakan fase terlama diantara fase-fase estrus yang lain dalam siklus estrus.

2.9.3 Kandang Mencit

Kandang mencit bervariasi dalam hal desain, ukuran dan komposisinya. Kandang yang paling populer adalah kandang berbentuk kotak yang terbuat dari polycarbonate, poly-stainless steel lebih bagus karena halus, awet dan lebih mudah dibersihkan daripada kandang berbahan plastik. Luas kandang individual minimum 200 cm²/hewan sedangkan kandang kelompok 60 cm²/hewan (Kusumawati, 2004). Kandang mencit

diberi alas serbuk kayu yang bertujuan untuk kenyamanan dan penghangat dari udara dingin, menyerap kelembaban terutama untuk air kencing.

2.9.4 Cara Penanganan Mencit

Secara alamiah mencit cenderung menggigit bila mendapat perlakuan yang kasar. Oleh karena itu diperlukan penanganan yang khusus untuk mempermudah cara perlakuan. Pengambilan mencit diletakkan dikawat kassa dengan ekor sedikit ditarik. Cubit kulit bagian belakang kepala dan jepit ekornya (Syamsudin dan Darmono, 2011).

2.9.5 Kebutuhan Pakan (Nutrisi Standar)

Nutrisi standar yang dibutuhkan oleh mencit adalah protein 20-25%, lemak 5-12%, serat kasar 2,5%, dan karbohidrat 45-60%. (Kusumawati, 2004). Tingkat konsumsi pakan dipengaruhi oleh jenis kelamin, ukuran tubuh, tingkat produksi, temperatur lingkungan, kecepatan pertumbuhan, dan lain-lain. Air minum yang dibutuhkan seekor mencit berkisar antara 4-8 ml/hari, air minum harus tersedia dan bersih, karena mencit menyukai air yang baru. Seekor mencit mudah sekali kehilangan air, sebab evaporasi tubuhnya yang tinggi (Pradana, 2012)

2.9.6 Penandaan

Beberapa cara penandaan hewan laboratorium,dilakukan untuk mengetahui kelompok hewan yang diperlakukan berbeda dengan kelompok lain. Penandaan ini dapat dilakukan secara permanen untuk penelitian jangka panjang (kronis), sehingga tanda tersebut tidak mudah hilang. Yaitu : dengan *ear tang* (anting bernomor), tattoo pada ekor, melubangi daun telinga dan elektronik transponder.

Penandaan sederhana dapat dilakukan dengan cara pewarnaan pada masing-masing hewan, pada umumnya dipakai pewarna/tinta didaerah tertentu misalnya di ekor, kaki dan kepala, tetapi harus diperiksa setiap hari karena kemungkinan dapat tergosok dan hilang (Kusumawati, 2004).

2.9.7 Pemberian obat oral

Teknik ini paling sering dilakukan karena mudah, aman dan mudah. Kerugiannya dapat mempengaruhi bioviabilitasnya, misalnya obat dapat mengiritasi saluran cerna, sehingga perlu penanganan yang cermat pada hewan coba. Absorpsi obat dapat terjadi secara difusi pasif, olah sebab itu obat harus mudah larut dalam lemak. Absorpsi obat dalam usus halus lebih cepat, karena epitel usus halus permukaanya luas dan karena berbentuk vili yang berlipat. Sedangkan dalam lambung lebih lambat karena dindingnya tertutup lapisan mucus yang tebal (Syamsudin dan Darmono, 2011). Volume maksimal peroral yang dapat diberikan pada mencit seberat 20-30g adalah 1 ml (Kusumawati, 2004)

2.9.8 Euthanasia pada Mencit

Euthanasia pada hewan coba hendaknya mengikuti syarat sebagai berikut :

1. Tidak menimbulkan gejala yang tidak menyenangkan bagi hewan, misalnya menimbulkan ketakutan hingga hewan harus meronta-ronta terlebih dahulu
2. Aman untuk peneliti dan pembantu peneliti
3. Mudah dilakukan
4. Sesuai dengan umur, spsies, kesehatan, dan jumlah hewan
5. Tidak menimbulkan polusi
6. Irreversible
7. Tidak menimbulkan perubahan kimiawi pada jaringan
8. Tidak menimbulkan perubahan histopatologi yang kelak akan mempengaruhi hasil penelitian (Kusumawati, 2004).

Euthanasia pada mencit dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu dengan CO2, injeksi barbiturate over dosis 200 mg/kg interaperitoneal (IP) atau dengan dislokasi maupun dekapitasi (Syamsudin and Darmono, 2011).

2.9.9 Mencit model endometriosis

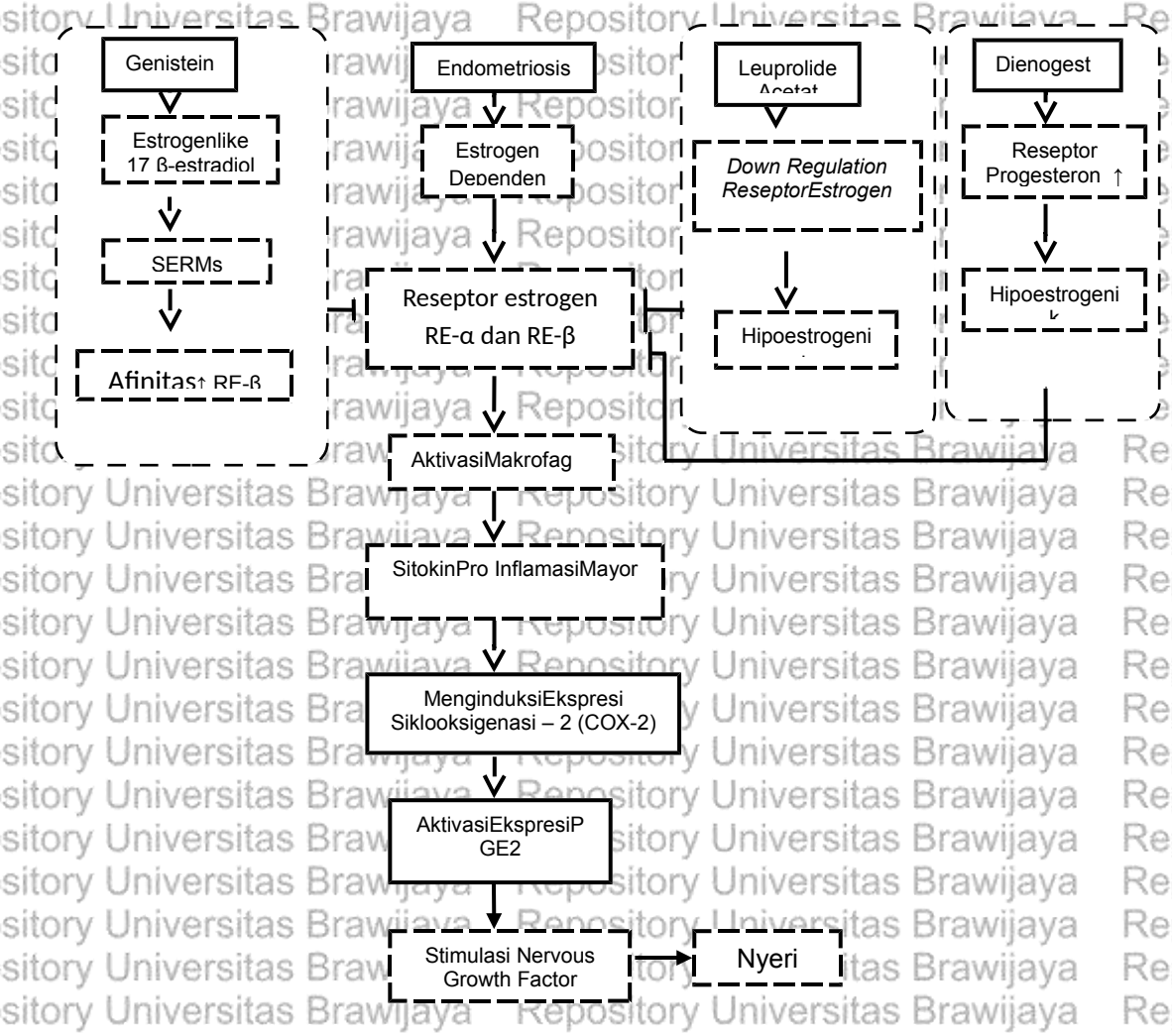
Endometriosis hanya terjadi secara alami pada manusia dan beberapa primata bukan manusia banyak digunakan untuk penelitian tentang

endometriosis., namun sangat tingginya biaya penanganan hewan ini membatasi penggunaan monyet untuk model penelitian ekperimental. Karena alasan tersebut, perkembangan penelitian yang menggunakan hewan kecil, khususnya *rodent* (hewan pengerat), sebagai model penelitian endometriosis dengan cara mentransplantasikan sebagian jaringan endometriosis pada lokasi ektopik (Grummer, 2006).

Jaringan endometrium manusia telah berhasil ditransplantasikan pada tikus imunodefisiensi berat atau *Severe Combined Immunodeficient* (SCID) menggunakan teknik injeksi intraperitoneal secara blind, dengan angka keberhasilan 96,5%. Pada analisa hibridasi in-situ, didapatkan adanya kemampuan implant endometrium untuk memproduksi complemen 3 (C3). Diekspresikannya C3 mRNA oleh implant endometrium menunjukkan bahwa implant endometrium ektopik secara imunologis responsive terhadap perubahan dalam lingkungan penjamu. Model ini dapat digunakan untuk penelitian efek farmakologi dan modulasi hormonal pada endometriosis tanpa disertai perbedaan phylogenik (Awwad *et al*.,1999)

BAB 3
KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 KerangkaKonsepPenelitian

Keterangan :

: Variabel yang diteliti

: Variabel yang tidakditeliti

: Menginduksi

: Menghambat

Faktor yang mempengaruhipemberiankolostrum
1. Pengetahuan
2. Umur
3. Bimbingannakes

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Endometriosis adalah suatu penyakit yang pertumbuhannya tergantung oleh hormon estrogen (estrogen dependen).Estrogen yang diproduksi local dalam jaringan endometriosis, khususnya estradiol mempunyai dua peranan penting dalam proliferasi sel endometrial dan stimulator sitokin pro inflamasi (Giudice, 2010). Estrogen (estradiol) juga mengaktivasi makrofag dan menginduksi produksi sitokin pro-inflamasi mayor dalam hal ini Interleukin-1β, diketahui dapat meningkatkan regulasi COX-2 dalam jaringan endometriosis ektopik, yang dapat mengakibatkan peningkatan terus menerus produksi PGE-2. Hal ini menunjukkan bahwa estradiol, secara langsung maupun tak langsung, melalui sitokin menginduksi aktivasi COX-2 yang akan meningkatkan produksi PGE-2 (prostaglandin E2) dan akan mengaktifkan serabut nyeri, memperkuat invasi neuronal lesi dengan menstimulasi produksi NGF (Nerveus Growth Factor) dan neutropin lainnya dan mendorong tumbuhnya nosiseptor yang berkontribusi terhadap nyeri inflamasi persisten serta menghambat apoptosis neuronal..

Genistein termasuk dalam kelas isoflavon yang memiliki bentuk serupa dengan*17-β estradiol* yang secara umum bekerja sebagai *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs) karena memiliki system kerja yang berbeda, pada kadar estrogen tinggi genistein akan bekerja sebagai anti estrogenic seperti pada kanker payudara dan endometriosis, sedangkan pada kadar estrogen yang rendah genistein akan bersifat estrogenik. Genestein memiliki aksi biologis sebagai antioksi dan, anti angiogenik, inhibitor proliferasi, metastase sel kanker, anti tumor, anti kanker, yang berperan dalam system imun dan mampu berikatan baik dengan Reseptor Estrogen (RE).Genistein dan estradiol bersaing untuk menempati Reseptor Estrogen (RE), namun genistein mempunyai afinitas terhadap RE-β lebih tinggi daripada RE-α. Genestein menghambat produksi oksida nitrat dan prostaglandin

pada konsentrasi non-toksik, dengan menghambat induksi NO dan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2).

Efek pemberian GnRH analog dalam hal ini pemberian Leuprolide Acetat adalah efek hipoestrogenik, Pajanan GnRH yang terus menerus ke hipofisis akan mengakibatkan *down-regulation reseptor Estrogen α (REα)* dan memicu penekanan reseptor progesterone serta peningkatan kadar siklooksigenase-2 (COX-2) yang berkontribusi terhadap resistensi progesterone dan reaksi inflamasi untuk mencegah resistensi progesterone dan proses inflamasi yang terkait nyeri pada endometriosis. Selain itu GnRH bekerja langsung pada jaringan endometriosis.Hal ini dibuktikan dengan adanya reseptor GnRH pada endometrium ektopik. Kadar mRNA reseptor estrogen (ERα) menurun pada endometriosis setelah terapi jangka panjang.Amenore yang timbul akibat kondisi tersebut akan mencegah pembentukan lesi baru.

Dienogest bekerja pada endometriosis dengan mengurangi endogen produksi estradiol dan menekan efek tropik estradiol pada kedua eutopik dan ektopik endometrium.Tidak seperti estrogen, progesterone memiliki efek antimitotik terhadap sel endometrium, sehingga memiliki potensi dalam pengobatan endometriosis. Progestin dalam dienogest mampu menurunkan produksi hormon estrogen dalam tubuh sehingga pertumbuhan lesi endometrium bisa menurun.Progestin turunan 19-nortestosteron seperti pada dienogest memiliki kemampuan untuk menghambat enzim aromatase dan ekspresi COX-2 dan produksi PGE2 pada kultur sel endometriosis.

3.2 HipotesisPenelitian

3.2.1 Pemberian Genistein menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit model endometriosis

3.2.2 PemberianGenistein menurunkan ekspresi PGE-2 pada mencit model endometriosis

3.2.3 Tidak ada perbedaan pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit model endometriosis

3.2.4 Tidak ada perbedaan pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest menurunkan ekspresi PGE-2 pada mencit model endometriosis

BAB 4
METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental*) dengan menggunakan rancangan percobaan dengan metode *Post test only Control Group Design,* yaitu peneliti mengukur pengaruh perlakuan pada kelompok eksperimen dengan membandingkan kelompok kontrol, tanpa terlebih dahulu melakukan pretest (Notoatmodjo, 2010).

Pada penelitian ini terdapat kelompok kontrol positif, yang mana mencit model endometriosis tidak diberi perlakuan, kelompok kontrol negatif, yang mana mencit sehat tidak diberi perlakuan dan kelompok perlakuan, yaitu mencit model endometriosis diberi perlakuan.

Dalam penelitian ini perlakukan/intervensi peneliti adalah pemberian genistein berbagai dosis (0,78, 1,04, dan 1,3 dengan satuan mg/hari) dan pemberian Leuprolide Acetat dengan dosis 0,00975 mg/5 hari serta Dienogest dengan dosis 0,0052 mg/hari, pada hewan coba Mencit (*Mus Muscullus*) dengan jenis kelamin betina. Sedangkan parameter yang diamati setelah perlakuan/intervensi dari penelitian ini adalah ekspresi *Cyclooxygenase-2* (COX-2) dan *Prostaglandin E2* (PGE2).

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian ini dilakukan selama 2 bulan, mulai bulan Desember 2015 sampai dengan Januari 2016, dengan rincian selama 1 minggu dilakukan adaptasi, 2 minggu untuk pembuatan mencit model endometriosis, 2 minggu perlakuan pemberian Genistein,

Leuprolide Acetat dan Dienogest serta 3 minggu untuk pemeriksaan imunohistokimia dan pembacaan data statistik.

4.3 Sampel

4.3.1 Asal Sampel

Penelitian ini menggunakan mencit (*Mus Musculus*) model endometriosis. Penggunaan mencit sebagai model penelitian, karena mencit merupakan hewan mamalia yang sering digunakan sebagai model untuk penelitian, sebelum diberlakukan pada manusia. Pemilihan sampel dilakukan secara acak sesuai dengan kriteria.

4.3.2 Besar Sampel

Perhitungan besarnya pengulangan atau replikasi hewan penelitian dilakukan berdasarkan rumus dari *Steel & Torrie (1995)*:

Rumus :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah p(n-1)≥15

Penelitian ini menetapkan 8 kelompok, jadi sampel yang diperlukan adalah :

7 (4-1)≥15

7-3≥15

4≥15

n≥3.75

Jumlah sampel secara keseluruhan adalah jumlah perlakuan dikalikan jumlah pengulangan.7 x 4 = 28 ekor mencit, dengan cadangan masing-masing perlakuan 1 ekor mencit jadi total sampel adalah : 28 + 7 =35 ekor mencit.

4.3.3 Cara Persiapan Sampel

Randomisasi :35 ekor mencit yang menjadi sampel penelitian kemudian dikelompokan secara random menjadi 7 kelompok yaitu :

Kelompok Kontrol (K+) :4 ekor mencit dan 1 ekor cadangan

Kelompok Kontrol (K-) :4 ekor mencit dan 1 ekor cadangan

Kelompok Perlakuan (G1) :4 ekor mencit dan 1 ekor cadangan

Kelompok Perlakuan (G2) :4 ekor mencit dan 1 ekor cadangan

Kelompok Perlakuan (G3) :4 ekor mencit dan 1 ekor cadangan

Kelompok Perlakuan (LA) :4 ekor mencit dan 1 ekor cadangan

Kelompok Perlakuan (D) : 4 ekor mencit dan 1 ekor cadangan

4.3.4 Cara Pemilihan Sampel

Pemilihan sampel mencit dengan memperhatikan kreteria inklusi dan eksklusi.

1. Kreteria inklusi : Mencit (*Mus Musculus*) betina yang sehat, dengan berat mencit 20-30 gram, bulu halus, mata bersinar, tidak pincang, tidak didapatkan adanya bekas luka.
2. Kreteria eksklusi : Mencit yang sakit dan cacat, didapatkan luka, gerakan tidak aktif, berat kurang dari 20-30 gram.
3. Kreteria putus uji : Mencit betina yang sakit atau mati sejak perlakuan 1 minggu dikandang.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah :

a. Genistein murni dengan dosis 0,78, 1,03, 1,4 dengan satuan mg/hari yang diberikan secara oral. (Yulianto,et al.,2015)
b. Leuprolide Acetat (Tapros)dengan dosis0,00975 dengan satuan mg/5 hari yang diberikan secara injeksi subkutan atau intramuskuler
c. Dienogest dengan dosis 0,0052 dengan satuan mg/hari yang diberikan secara oral.

4.4.2 Variabel Tergantung (Dependen)

a. Ekspresi Cyclooxygenase-2 (COX-2)
b. Ekspresi Prostaglandin E-2 (PGE2)

4.5 Definisi Operasional

1) Endometriosis adalah merupakan jaringan (sel-sel kelenjar dan stroma) abnormal yang menyerupai endometrium (*endometrium like tissue*) yang tumbuh disisi luar kavum uterus, dan memicu reaksi peradangan menahun.
2) Mencit Model Endometriosis adalah mencit yang dibuat endometriosis. Implantasi jaringan endometriosis sel epitel dan stroma yang diambil dari jaringan pasien yang telah didiagnosis endometriosis dengan hasil PA positif yaitu adanya dua atau lebih

gambaran histology yaitu epitel endometrium, stroma endometrium yang dimasukkan ke endometriosis mencit yang sudah dibuat immunodeficiency.

3) Genistein adalah Genistein (Bioword with brand name bio-x CAS No.446-72-0) yang berupa serbuk genistein asli yang dilarutkan dalam minyak wijen untuk mencapai dosis yang diinginkan.
4) LeuprolideAcetatadalahLeuprolideAcetat (Takeda Manufacture Jepang with brand name Tapros Depot single dose) yang berupa depot suspension 3.75 mg dengan komposisi Leuprolide Acetat, Polylactic Acid dan Manitol untuk satu vial dan dilengkapi air seteril 2 ml untuk melarutkan.
5) Dienogest adalahDienogest (Bayer Health Care with brand name Visanne) yang berupa tablet 2 mg, yang nantinya akan dibuat menjadi serbuk.
6) Ekspresi Cyclooxygenase-2 (COX-2) adalahekspresi COX-2 yang diukur dari jaringan endometriosis pada mencit model endometriosis kemudian dihitung menggunakan kurva standar. Cara pengukuran dengan menggunakan teknik Imunohistokimia.Ekspresi COX-2 pada setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut *Remmele And Stegner* (1986) yang sudah dimodifikasi. Indeks skala Remmele menggunakan *Immuno Reactive Score* (*IRS*), merupakan hasil perkalian antara prosentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif (Nowak, *et al.,* 2007). Data sampel merupakan nilai rata – rata IRS yang teramati pada 5 (lima) Lapangan Pandang (LP). Adapun skala semikuantitatif IRS adalah sebagai berikut :

Prosentase sel immunoreaktif :

- Skor 0 : tidak ada sel positif

- Skor 1 : sel positif kurang dari 10%
- Skor 2 : sel positif antara dari 11% - 50%
- Skor 3 : sel positif antara dari 51% - 80%
- Skor 4 : sel positif antara lebih dari 80%

(Nowak, *et al.,* 2007)

Skor instensitas warna :

- Skor 0 : tidak ada reaksi warna
- Skor 1 : intensitas warna rendah
- Skor 2 : intensitas warna sedang
- Skor 3 : intensitas warna kuat

Skala data yang digunakan adalah Ratio.

7) Ekspresi Prostaglandin E-2 (PGE-2)adalah ekspresi PGE-2 yang diukur dari jaringan endometriosis pada mencit model endometriosis dengan menggunakan teknik Imunohistokimia.Ekspresi PGE-2 pada setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut Remmele *And* Stegner (1986) yang sudah dimodifikasi. Indeks skala Remmele menggunakan *Immuno Reactive Score* (IRS), merupakan hasil perkalian antara prosentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif (Nowak, *et al.,* 2007). Data sampel merupakan nilai rata – rata IRS yang teramati pada 5 (lima) Lapangan Pandang (LP). Adapun skala semikuantitatif IRS adalah sebagai berikut :

Prosentase sel immunoreaktif :

- Skor 0 : tidak ada sel positif
- Skor 1 : sel positif kurang dari 10%
- Skor 2 : sel positif antara dari 11% - 50%
- Skor 3 : sel positif antara dari 51% - 80%
- Skor 4 : sel positif antara lebih dari 80%

Skor instensitas warna :

- Skor 0 : tidak ada reaksi warna
- Skor 1 : intensitas warna rendah
- Skor 2 : intensitas warna sedang
- Skor 3 : intensitas warna kuat

(Nowak, *et al.,* 2007)

Skala data yang digunakan adalah Ratio.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan

Untuk melihat ekspresi COX-2 dan PGE2 dengan menggunakan teknik imunohistokimia.Bahan-bahan yang dibutuhkan larutan PBS, aqubidest, Sodium Sitrat Buffer PH 6.0, dan TBS Tween, xylol (I dan II), ethanol absolute (I, II dan III), ethanol (70%, 80%, 90%, dan 96%).

4.6.2 Alat

Alat untuk memberikan genistein dan dienogest adalah dengan menggunakan sonde, sedangkan Leuprolide Acetat diberikan melalui injeksi subkutan atau intramuskuler.Pemeriksaan ekspresi COX-2 dan PGE2 dengan teknik Immunohistokimia. Adapun alat yang dibutuhkan adalah sebagai berikut :Slide dan chamber, Gelas reagen, Pipet (Mikropipet), Tissue dan timer, Waterbath, Mikroskop cahaya biasa merek, Immunostaining kit dan Mikrotom.

4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

4.7.1. Pembuatan mencit model endometriosis

Pembuatan mencit model endometriosis, mengadopsi pada penelitian yang dilakukan oleh Sutrisno (2014), yaitu :

1) Mencit betina dilakukan adaptasi selama 1 minggu, didalam kandang berisi serbuk kayu, diberi makan 2 kali sehari dengan pellet ayam, dan diberi minum secara *ad libitum*.
2) Pada hari pertama kelompok kontrol positif (K+) dan kelompok perlakuan (P) diberikan injeksi Siklosporin A, diinjeksikan

sebanyak 0.2 ml/mencit (setelah pengenceran) secara Intra Muskuler (IM) untuk membuat mencit menjadi Imunodefisiensi.

3) Setelah itu mencit disuntikan jaringan myometrium dan endometrium yang berasal dari uterus yang diambil dari pasien dengan Adenomyosis. Jaringan tersebut sebelumnya disimpan di dalam larutan PBS. Pembuatan supernatant dilakukan dengan cara jaringan uterus seluas 1 cm3 digerus dan disuspensi dengan larutan PBS sebanyak 10 ml dan disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm dalam suhu 4° C selama 10 menit. Supernatant ini yang akan diinjeksikan sebanyak 0.1 ml, kemudian disuntikkan secara pelan-pelan dicavum endometrium.
4) Selanjutnya dilakukan penyuntikan ethynil estradiol dengan dosis 0.2 µg/kgBB. Dosis tersebut dikonversikan ke dosis mencit menjadi 5 µg per mencit. Jadi setiap 30 cc mengandung 2000 Iu setara 2 mg ethynil estradiol, maka setiap mencit disuntikkan 0.1 cc secara intra muskuler. Penyuntikan etynil estradiol dilakukan pada hari ke-1 dan ke-5.
5) Kemudian mencit ditunggu sampai hari ke-14 dengan perawatan pemberian makan dan minum sesuai standart. Setelah hari ke-15, mencit tersebut sudah menjadi mencit model endometriosis (untuk mastikan dilakukan terminasi pada kontrol (+) 2 ekor dan dilihat secara visual lesi endometriosisnya) kemudian dipapar dengan Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest.
6) Mencit dipapar Genistein berbagai dosis, Leuprolide Acetat serta Dienogest selama 15 hari sampai hari ke 30. Kemudian baik mencit yang masuk ke dalam kontrol positif, negatif dan kelompok perlakuan diterminasi untuk diambil jaringan endometriosis.

4.7.2. Pemeliharaan Mencit Model Endometriosis

Selama perlakuan, mencit model endometriosis ditempatkan pada tempat khusus untuk memelihara tikus : bak plastic ukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, tutup kandang tikus dari kawat dengan ukuran 36,5 cm x 15,5 cm, botol air dan serbuk kayu.

Dasar kandang dilapisi dengan serbuk kayu setebal 0,5-1 cm dan diganti setiap dua hari sekali. Cahaya ruangan dikontrol persis 12 jam terang (06.00 sampai dengan pukul 18.00) dan 12 jam gelap (pukul 18.00 sampai dengan pukul 06.00), sedangkan temperatur dan kelembaban ruangan dibiarkan berada pada kisaran alamiah. Mencit model endometriosis diadaptasikan dalam kondisi lingkungan penelitian yang baru dengan diberi pakan standart yang mengandung protein 12% dan minum air secara *ad libitum*.Selanjutnya setelah diadaptasikan mencit dikelompokkan menjadi 7 kelompok sampel.

4.7.3. Pembagian Kelompok Sampel

Sampel penelitian ini menggunakan 7 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor mencit model endometriosis. Kelompok perlakuan dibagi sebagai berikut :

1) Kelompok kontrol (+): mencit model endometriosis diberi pakan standart dan tanpa perlakuan Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest.
2) Kelompok kontrol (-) : mencit betina sehat (tidak endometriosis) diberi pakan standart dan tanpa perlakuan
3) Kelompok 1 : mencit model endometriosis diberi pakan standart dan diberikan Genistein dengan dosis 0.78 mg/hari
4) Kelompok 2 : mencit model endometriosis diberi pakan standart dan diberikan Genistein dengan dosis 1.04 mg/hari
5) Kelompok 3 : mencit model endometriosis diberi pakan standart dan diberikan Genistein dengan dosis 1.3 mg/hari

6) Kelompok 4 : mencit model endometriosis diberi pakan standart dan diberikan LeuprolideAcetat dengan dosis0.00975mg.

7) Kelompok 6 : mencit model endometriosis diberi pakan standart dan diberikan Dienogest dengan dosis 0.0052mg.

4.7.4. Pembuatan Dosis

1) Genistein

Menentukan banyaknya genistein dan banyaknya pelarut (dalam hal ini adalah minyak wijen) dengan langkah-langkah sebagai berikut :

a. Serbuk genistein ditimbang sesuai dengan dosis yang diperlukan 0.78mg, 1.04 mg, dan 1.3 mg. ditimbang sesuai dosis mencit/hari/5 mencit.

b. Genistein yang sudah ditimbang dimasukkan kedalam evendorf :5 dosis mencit per masing-masing dosis.

c. Genistein diencerkan dengan menggunakan minyak wijen 100% sebanyak 0.2 ml/dosis. Jadi kalau dalam 1 evendorf terdapat 5 dosis, maka dibutuhkan minyak wijen sebanyak 1 ml.

2) LeuprolideAsetat

Menentukan banyaknya LeuprolideAcetat dan banyaknya pelarut (dalam hal ini adalah air steril) dengan langkah-langkah sebagai berikut :

a. Kemasan Leuprolide Acetat (Tapros) yang berisikan serbuk dengan berat 3,75 mg dengan larutan pengencer sebanyak 2 ml.

b. Dosis yang dibutuhkan untuk terapi mencit model endometriosis adalah 0.00975 mg per injeksi, sehingga jumlah larutan yang disuntikkan pada tikus model endometriosis adalah (0.00975/3.75)X2 = 0.0052 ml = 0.52 Unit.

3) Dienogest

Dipasaran sediaan Dienogest (Visanne) berbentuk tablet 2 mg kemudian dihaluskan. Dosis yang dibutuhkan untuk hewan coba adalah 0.0052 mg/hari.

Table 4.1 Perhitungan dosis Genistein, LeuprolideAcetat dan Dienogest pada masing-masing kelompok

Kelompok Hewan Coba	Dosis pada Manusia	Konversi Dosis	Dosis pada Mencit
P1	300 mg	0.0026	0.76 mg
P2	400 mg	0.0026	1.04 mg
P3	500 mg	0.0026	1.3 mg
P4	3.75 mg	0.0026	0.00975 mg
P5	3.75 mg	0.0026	0.00975 mg
P6	2 mg	0.0026	0.0052 mg

Penghitungan dosis genistein yang digunakan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh De Vere White (2004) pada penderita kanker prostat diberikan supplement genistein dengan dosis 450 mg/hari dan didapatkan peningkatan Prostat Spesific Antigen (PSA). Pada penelitian ini dosis yang digunakan adalah 300mg/hari, 400mg/hari dan 500mg/hari. Kemudian dosis tersebut dikonversikan dengan dosis yang diberikan pada mencit dengan konversi senilai 0.0026 (Syamsudin and Damono, 2011). Dosis pemberian Leuprolide Acetat untuk endometriosis pada manusia mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Schindler (2006) yakni 0.01 mg per hari atau 3.75 mg selama 3 bulan. Sedangkan

pemberian dosis Dienogest 2 mg/hari selama 15 hari pada wanita dengan endometriosis yang diberikan secara oral sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Hayashi, *et al.* (2012). Kedua dosis dikonversikan dengan dosis yang diberikan pada mencit dalam 3 kali siklus estrus atau 15 hari.

4.7.5. Pemberian Dosis

Genistein dan Dienogest diberikan secara oral melalui sonde atau pipet. Lama pemberian diberikan dalam waktu 15 hari dan diberikan sekali diluar pemberian pakan secara oral.Sedangkan LeuprolideAcetat diberikan secara subkutan atau intramuskuler setiap 5 hari sekali selama 15 hari (3 kali injeksi).

4.7.6. Pengambilan Bahan Pemeriksaan

Pengambilan bahan pemeriksaan dilakukan pada hari ke-30 masa perlakuan dengan langkah-langkah sebagai berikut :

1) Mencit dimatikan dengan cara dianestesi secara inhalasi dengan menggunakan eter
2) Kemudian diambil jaringan endometriosisnya
3) Setelah selesai mencit dikuburkan

4.7.7. Metode Pengukuran Ekspresi COX-2 dan PGE2

Pengukuran ekspresi COX-2 dan PGE-2 dilakukan dengan menggunakan teknik imunohistokimia, dengan langka-langkah sebagai berikut :

1) Fiksasi dan pencucian jaringan endometriosis

Segera setelah mencit percobaan diterminasi, kemudian dilakukan sekdi, kemudian jaringan endometriosisnya diambil dan dimasukkan ke dalam formalin 10% sekurang-kurangnya selama 24 jam.Kemudian jaringan endometriosis dipotong dengan ketebalan 0.5 cm.

2) Dehidrasi dan *clearing*

Jaringan endometriosis yang telah dicuci dengan air kran selama 30 menit lalu dimasukkan kedalam reagen dengan larutan alcohol 70%,

80%, 90%, 96%, Alkohol Absolute I,II,III,Xylol I dan II masing-masing selama 30 menit.

3) Infiltrasi dan pembuatan blok paraffin
Proses Infiltrasi dan Pembuatan Blok Parafin menggunakan alat Automatic Tissue Embedding Apparatus Tissue-Tek®

4) Pengirisan tipis
Pengirisan ini menggunakan mikrotom. Pemotongan dilakukan secara random yaitu tiap 10 kali pemotongan yang dilakukan seri, diambil satu dengan ketebalan 5-7 µm, kemudian dicelupkan air hangat dengan suhu 20°C-30°C sampai jaringan mengembang dengan baik, kemudian diletakkan pada object glass yang sebelumnya diojaringan dengan poly L-Lysine, lalu dikembangkan dengan hot plate.

5) Deparafinisasi
Tujuan dari Deparafinisasi adalah untuk mengkondisikan jaringan dari kondisi ada parafinnya ke kondisi air.Karena pada saat kita melakukan pengecatan kondisinya adalah air. Preparat endometriosis pada objek glass direndam dalam Xylol I,II,III, masing-masing 3 menit. Setelah itu direndam ke dalam alkohol absolute I & II, masing-masing 3 menit.Preparat yang telah direndam didalam alkohol absolute kemudian dimasukkan ke dalam larutan alcohol 96%, 90%, 80%, 70%masing-masing 3 menit.Setelah itu dibilas menggunakan air mengalir selama 5 menit.

6) Pewarnaan
Pewarnaan ini bertujuan untuk memudahkan melihat perubahan pada jaringan.Sediaan jaringan endometriosis diwarnai dengan metode immunohistokimia, sehingga dapat dilihat ekspresi Cyclooxygenase-2 (COX-2) dan ekspresi Prostaglandin E-2 (PGE2) pada jaringan

endometriosis. Adapun langkah-langkah pewarnaan adalah sebagai berikut :

a. Jaringan yang telah dikeringkan, dimasukkan ke dalam larutan hydrogen peroksida selama 5-10 menit, dan kemudian dicuci dengan PBS 2 kali masing-masing selama 4 menit.
b. Kemudian preparat direndam dengan trypsin (0,025%) selama 15 menit dalam incubator dengan suhu 37°C, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak dua kali selama 4 menit.
c. Preparat kemudian diteteskan Ultra V blok selama 5 menit, dan tidak boleh selama 10 menit kemudian dibilas.
d. Setelah itu kemudian diberikan antibody primer :Mouse anti-human COX-2 monoclonal antibody (Cayman Chemical Co.) dan Mouse anti-human PGE-2 monoclonal antibody selama 60 menit. Setelah itu dicuci dengan PBS sebanyak dua kali masing-masing selama 4 menit.
e. Preparat yang telah diberkan antibody, kemudian diteteskan Biotnylated link drop (yellow) selama 30 menit. Setelah itu dicuci dengan PBS sebanyak dua kali selama 4 menit.
f. Kemudian preparat diberikan streptavidin drops (yellow) selama 30 menit dan kemudian dicuci dengan PBS sebanyak dua kali selama 4 menit.
g. Setelah itu diberikan DAB (3.3 diamninobenzena) chromogen yang diencerkan dengan diluent 2% selama 6-10 menit. Kemudian dicuci dengan PBS sebanyak dua kali masing-masing selama 4 menit. Dan kemudian diberikan aquadest selama 4 menit.

7) Counterstain

a. Preparat yang telah dilakukan staining, kemudian dilakukan counterstain dengan menggunakan pewarna mayers selama 3-10

menit. Setelah itu dicuci dengan menggunakan air mengalir selama 5 menit.

b. Preparat kemudian direndam dengan amoniak air selama 3 menit. Setelah itu dilakukan perendaman ke dalam aquadest selama 3-5 menit.

8) Mounting

Jaringan yang telah diwarnai kemudian ditempatkan pada kaca obyek (obyek glass) yang ditutup dengan kaca penutup (cover glass) yang sebelumnya telah ditetesi dengan entellan.

9) Pemeriksaan dengan mikroskop

Jaringan diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali.Pada rata-rata 5 lapangan pandang.Seluruh pemeriksaan ini menggunakan mikroskop cahaya biasa merk Nikkon H600L, yang telah dilengkapi dengan digital kamera DS F12 300 megapixel dan soft ware pengolahan gambar Nikon Image System.

10) Pembuangan Hewan Coba

Setelah selesai diambil organ, mencit dimasukkan kedalam suatu alat khusus untuk dihancurkan, sehingga menghindari pencemaran lingkungan.

4.8 Analisis Data

Dalam penelitian ini teknik analisis yang digunakan melalui 4 tahapan perhitungan yaitu uji normalitas dan homogenitas data sampel prasyarat *Uji one way Anova*, dilanjutkan dengan uji lanjutan yaitu *post hoc test* dengan *uji Tukey*, untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan yang paling berpengaruh. Uji statistik dilakukan pada taraf kepercayaan 95% (α = 0.05). Kemudian dilakukan juga uji Korelasi dan Regresi Sederhana

4.8.1 Prasyarat Uji Parametik atau uji normalitas data

Untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah dianjurkan maka dipilih pendekatan uji statistik yang digunakan yaitu uji statistik parametrik.Sebelumnya harus dilakukan analisis terlebih dahulu dengan uji prasyarat parametrik, yaitu data sampel dari variable terukur diuji terlebih dahulu apakah data tersebar atau terdistribusi normal.Uji normalitas data dalam penelitian ini digunakan *uji Shapiro-Wilk*.Pada uji ini kreteria 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 signifikasi α= 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 signifikasi α=0.05, maka disimpulkan data tidak terdistribusi normal, sehingga uji parametrik tidak dapat digunakan (Santosa,2005).

Uji homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan uji Levene. Asumsi homogenitas ragam dikatakan terpenuhi jika p-value hasil perhitungan lebih besar daripada α=0.05. adapun variabel terukur yang diuji dengan prasyarat uji parametric adalah ekspresi *Cyclooxygenase-2 (COX-2)* dan *ekspresi Prostaglandin E-2 (PGE2).*

4.8.2 Uji One Way Anova

Digunakan untuk mengetahui pengaruh variabel dan membandingkan rerata variabel terukur antara kelompok sampel kontrol (tanpa pemberian obat) dengan perlakuan (pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest).Analisis ini dilakukan yaitu terhadap data ekspresi Cyclooxygenase-2 (COX-2) dan ekspresi Prostaglandin E-2 (PGE-2).

Tujuan teknik analisis ini digunakan adalah untuk mengetahui ada atau tidak ada pengaruh pemberian Genistein berbagai dosis, Leuprolide Acetat dan Dienogest pada mencit (*Mus Musculus*).Jika pada *uji Anova One Way* ini menghasilkan kesimpulan Ho ditolak atau kesimpulan ada perbedaan yang bermakna (signifikan).Maka analisis dilanjutkan dengan *Post Hoc Test Tukey.*

4.8.3 **Uji Post Hoc Test *(Uji Tukey)***

Uji Tukey ini digunakan jika analiss data dalam penelitian dilakukan dengan membandingkan kedua kelompok yang sampel memiliki jumlah yang sama. Uji ini juga dipergunakan untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan paling berpengaruh (Dahlan, 2012). Pada penelitian ini *uji tukey* digunakan untuk melihat dosis Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest yang manakah yang paling optimal.

4.8.4 Uji Korelasi

Adalah metode statistik yang digunakan untuk menentukan atau menguji ada atau tidak adanya keeratan hubungan dua variabel terukur yaitu korelasi antara dosis obat dengan parameter yang diukur, dapat juga digunakan untuk mengukur derajat hubungan linea, dimana semakin kuat atau tinggi derajat hubungan garis lurus antara kedua variabel atau lebih. Dalam penelitian ini digunakan uji Korelasi Pearson jika data terdistribusi normal, tetapi jika tidak maka digunakan uji Spearman's rho. Kreteria keputusan berdasarkan nilai Sig ataup-value, jika p-value >α=0.05 maka disimpulkan tidak ada korelasi yang bermakna antar dua variabel, dan jika p-value <α=0.05 maka disimpulkan ada korelasi yang bermakna antar dua variabel. Selanjutnya tingkat keeratan hubungan (Koefisien Korelasi/KK) dapt diartikan ke dalam tujuh tingkatan (Hasan, 2012) sebagai berikut :

- KK=0, tidak ada korelasi
- 0<KK≤0.20, korelasi sangat rendah/lemah tapi pasti
- 0.20<KK≤0.40, korelasi rendah/lemah tapi pasti
- 0.40<KK≤ 0.70, korelasi yang cukup berarti
- 0.70<KK≤0.90, korelasi yang tinggi; kuat
- 0.90<KK,1.00. korelasi sangat tinggi;kuat sekali,dapat diandalkan
- Kk=1, korelasi sempurna.

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian ini merupakan penelitian *in vivo* dengan menggunakan sampel penelitian mencit betina, yang dibuat menjadi mencit model endometriosis. Dalam penelitian ini terdapat 7 kelompok dengan total jumlah 35 ekor mencit termasuk 1 ekor mencit dimasing-masing sebagai cadangan. Dari 7 kelompok tersebut 6 kelompok merupakan mencit model endometriosis dan 1 kelompok adalah mencit betina sehat. Jumlah perhitungan sampel untuk masing-masing kelompok dilakukan yang akan dilakukan pemeriksaan yaitu sejumlah 4 ekor mencit. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga (FKH UNAIR) Surabaya yang dilaksanakan pada bulan Desember 2015 - Januari 2016.

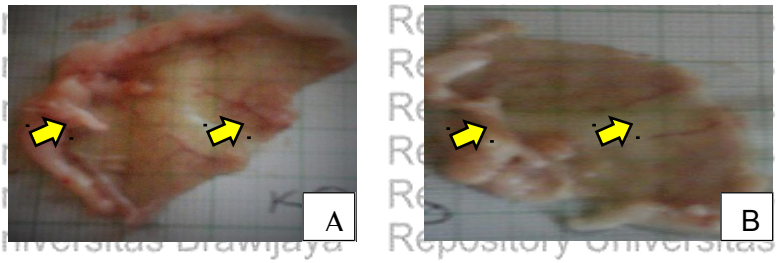
Gejala yang umum didapati pada penderita endometriosis timbulnya keluhan nyeri seperti dismenorea, nyeri pelvik dan dispareunia. Selain gejala tersebut juga didapti gejala tambahan seperti massa dalam pelvik, yang mana massa ini akan mengalami pembesaran seiring dengan berjalannya siklus haid. Oleh karena itu pada uterus wanita dengan endometriosis didapati pembesaran daripada uterus normal. Demikian juga pada mencit model endometriosis didapati pembesaran ukuran uterus dibandingkan dengan mencit kontrol negatif. Hal ini terlihat saat dilakukan terminasi dan dilihat secara visual bentuk dari uterus mencit model endometriosis mengalami pembesaran.

5.1. Gambaran Umum Mencit Endometriosis, Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE-2

5.1.1. Gambaran Umum Mencit Model Endometriosis

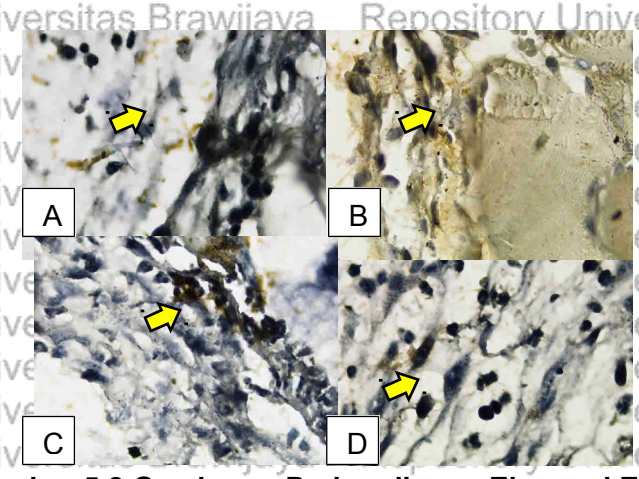
Tujuan dalam penelitian adalah untuk menganalisa pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap penurunan ekspresi COX-2

dan PGE-2 pada mencit model endometriosis. Pembuatan mencit model endometriosis dilakukan selama 14 hari, Pada hari ke 15, mencit sudah menjadi model endometriosis. Pembuktian mencit model endometriosis dibuktikan melalui visual lesi endometriosis dan pemeriksaan *imunohistokimia* (IHC) terhadap ekspresi RE-α dan ekspresi RE-β, yang dapat dilihat pada gambar dihalaman selanjutnya :



Gambar 5.1 Jaringan peritoneum pada mencit model endometriosis

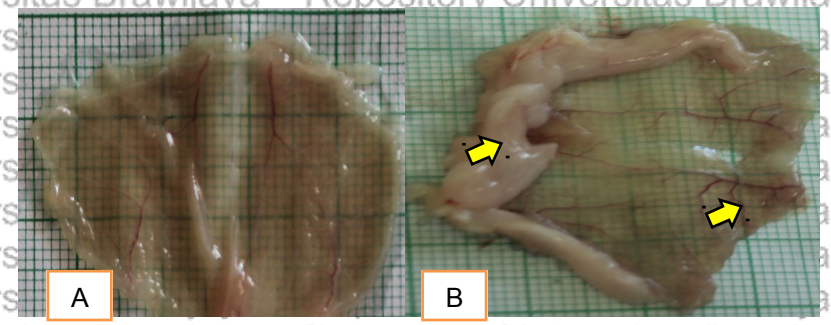
Keterangan :(A)Evaluasi visual jaringan peritoneum pada mencit model endometriosis, tampak adanya lesi endometriosis pada panah dan hepervaskularisasi pembuluh darah. (B) Evaluasi visual jaringan peritoneum pada mencit model endometriosis, tampak pada panah adanya lesi endometriosis dan hipervaskularisasi pembuluh darah.



Gambar 5.2 Gambaran Perbandingan Ekspresi ER-α dan ER-β pada Mencit Model Endometriosis.

Keterangan : (A) Menunjukkan adanya Ekspresi ER-α yang kuat pada jaringan peritoneum mencit model endometriosis dan (B) Ekspresi ER-β yang kuat pada jaringan peritoneum mencit model endometriosis. Sedangkan (C) menunjukkan adanya Ekspresi ER-α yang kuat pada jaringan peritoneum mencit model endometriosis dan (D) Ekspresi ER-β yang kuat pada jaringan peritoneum mencit model endometriosis.

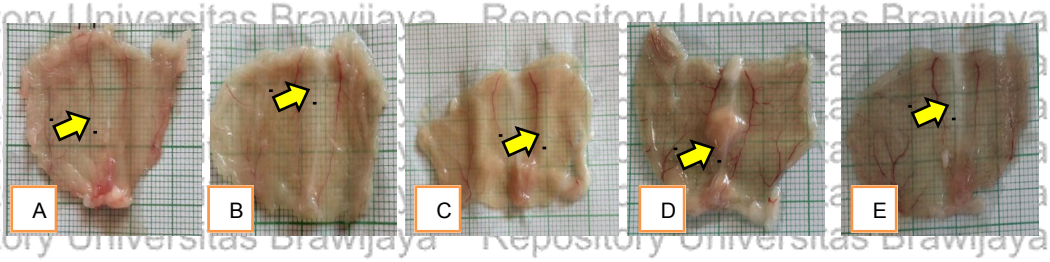
Mencit model yang telah menjadi endometriosis pada hari ke-15 mulai dilakukan papar pada kelompok perlakuan dengan berbagai dosis Genistein yaitu G1 (dosis 0.78mg/hari), G2 (1.04mg/hari), G3 (1.30mg/hari), Leuprolide Acetat (LA) (dosis 0.00975mg/5 hari) dan Dienogest (D) (0.0052mg/hari). Dan pada hari ke-30 dilakukan terminasi pada semua mencit model endometriosis termasuk pada kelompok kontrol negative (K-), kelompok kontrol positif (K+) dan kelompok yang telah dipapar dengan genistein berbagai dosis, leuprolide acetat dan dienogest kemudian diambil lesi pada jaringan peritoneum mencit, yang dapat dilihat pada gambar 5.3 dibawah ini :



Gambar 5.3 Lesi kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif

Keterangan : (A) Kelompok kontrol negative atau mencit yang sehat, sedangkan (B) Kelompok kontrol positif atau mencit model endometriosis tanpa perlakuan dimana tanda panah menunjukkan adanya nodul lesi endometriosis dan terlihat adanya hipervaskularisasi.

Hasil pembedahan jaringan peritoneum mencit model endometriosis yang telah dipapar dengan Genistein berbagai dosis, Leuprolide Acetat dan Dienogest yang dapat dilihat pada Gambar 5.4 dibawah ini :



Gambar 5.4 Jaringan peritoneum mencit model endometriosis yang telah diberikan perlakuan

Keterangan : (A) Genistein 1 dosis 0,78 mg/hari (B) Genistein 2 dosis1,04 mg/hari (C) Genistein 3 dosis 1,3 mg/hari (D) Leuprolide Acetat dosis 0.00975mg/5hari (E) Dienogest dosis 0.0052mg/hari

Selanjutnya dilakukan pemeriksaan ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2 menggunakan teknik immunohistokimia. Ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2 pada setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut *Remmele and Stegner* (1986) yang sudah dimodifikasi, dimana indeks skala remmele menggunakan IRS (*Immune Reactive Score*), merupakan hasil perkalian antara skor prosentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif (Nowak *et al.,*2007). Data setiap sampel merupakan nilai rata-rata IRS yang teramati pada 5 (lima) Lapangan Pandang (LP) berbeda pada pembesaran 400 kali. Pembacaan hasil immunohistokimia dilakukan oleh ahli Patologi Anatomi. Cara perhitungan IRS dapat dilihat pada tabel 5.1, sebagai berikut :

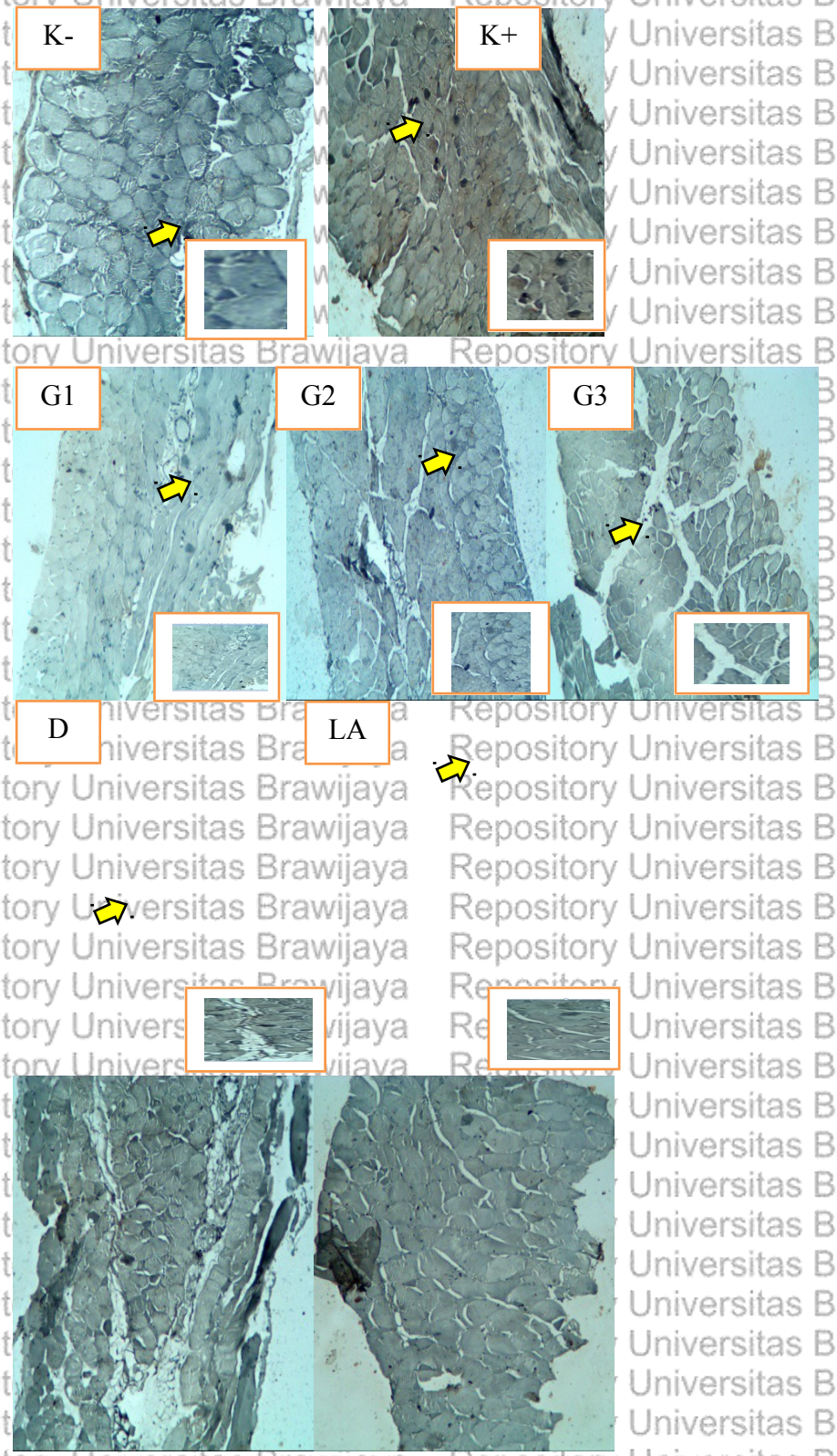
Tabel 5.1. Skala Semikuantitatif IRS (*Nowak et al.,* 2007)

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 lemah
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
Skor4: Sel positif antara dari lebih dari 80%	

Keterangan : Skala semikuantitatif IRS merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel positif (A) dengan Skor Intesitas reaksi warna (B), jadi IRS = (A x B)

5.1.3. Gambaran Ekspresi COX-2 Pada Pemeriksaan Immunohistokimia

Hasil dari pemeriksaan immunohistokimia didapatkan gambaran ekspresi COX-2 pada kelompok kontrol negatif (K-) terlihat tidak adanya sel positif dan tidak terlihat reaksi warna, dan pada kontrol positif (K+) terlihat warna coklat pada jaringan peritoneum yang menunjukkan bahwa ekspresi COX-2 nampak cukup kuat. Sedangkan pada kelompok perlakuan didapatkan ekspresi COX-2 pada setiap perlakuan mengalami penurunan, kecuali pada kelompok leuprolide acetat (LA) nampak lebih kuat diantara kelompok yang lain, sedangkan pada kelompok perlakuan genistein dosis 0.78mg/hari (G1) terlihat paling lemah dibandingkan kelompok yang lain seperti terlihat pada gambar 5.5 dibawah ini:



Gambar 5.3. Gambaran perbandingan ekspresi COX-2 pada Jaringan Peritonium

Keterangan : Perbandingan ekspresi Cox-2 menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol positif (K+) memiliki intensitas warna kecoklatan paling jelas hal ini

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

menunjukkan ekspresi COX-2 K+ sangat kuat dibandingkan kelompok lainnya. sebaliknya pada kelompok G1 tingkat reaksi warna terlihat paling lemah mendekati tingkat reaksi warna pada K-, namun nilai rerata *immuno reactive score* (IRS) diantara kelompok perlakuan relatif sama.

Hasil IRS pada pemeriksaan ekspresi COX-2 pada jaringan peritoneum mencit dapat dilihat pada tabel 5.2 sebagai berikut :

Tabel 5.2 IRS Ekspresi COX-2 pada Jaringan peritoneum

Kelompok	IRS (mean ± SD)
K-	2.3 ± 0.53
K+	3.6 ± 0.82
G1	2.2 ± 0.37
G2	2.65 ± 0.34
G3	2.25 ± 0.30
LA	3.15 ± 0.62
D	2.65 ± 0.41

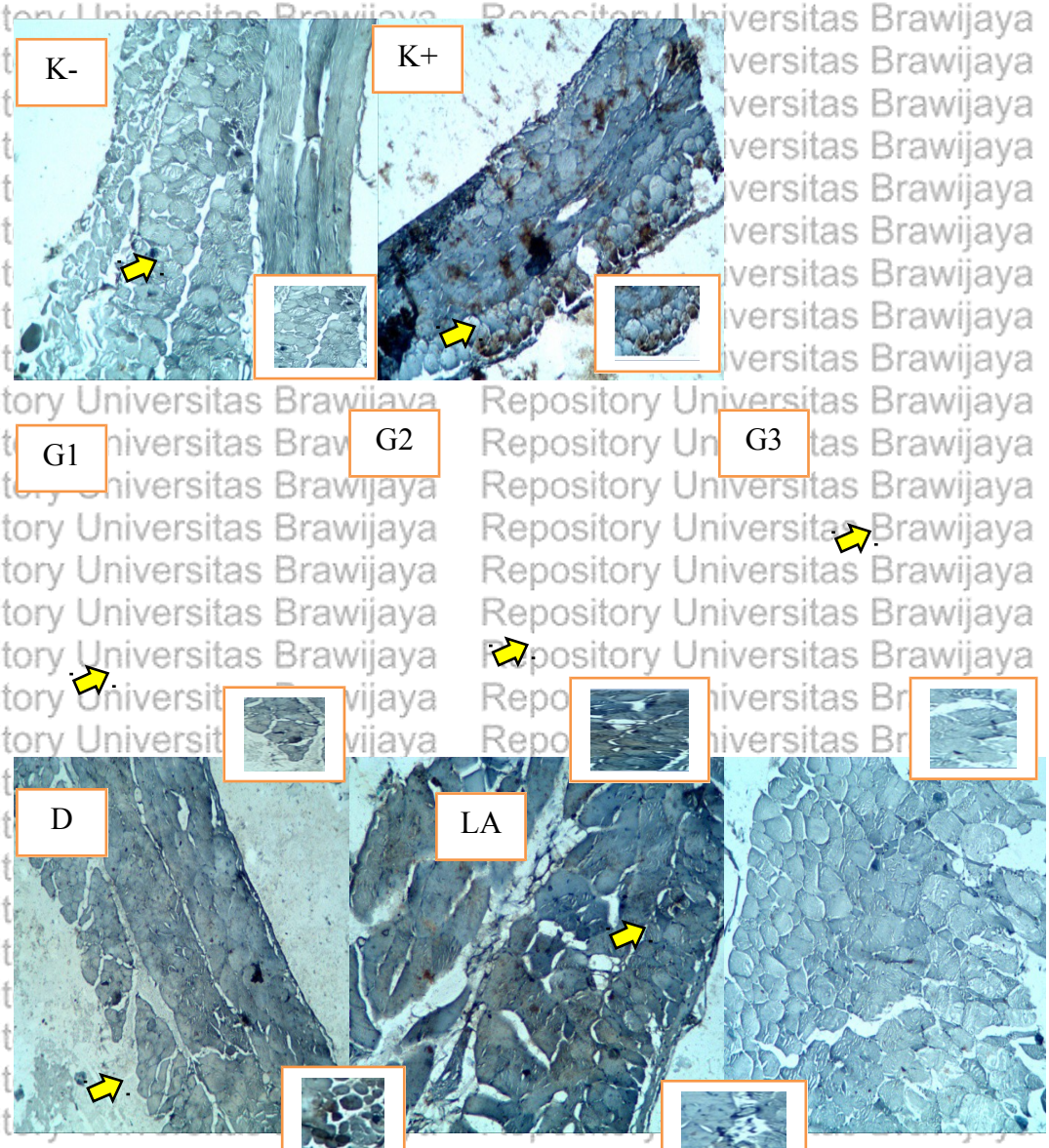
Keterangan : Rerata IRS pada kelompok K+ lebih tinggi daripada K-, sedangkan pada masing-masing perlakuan mengalami penurunan

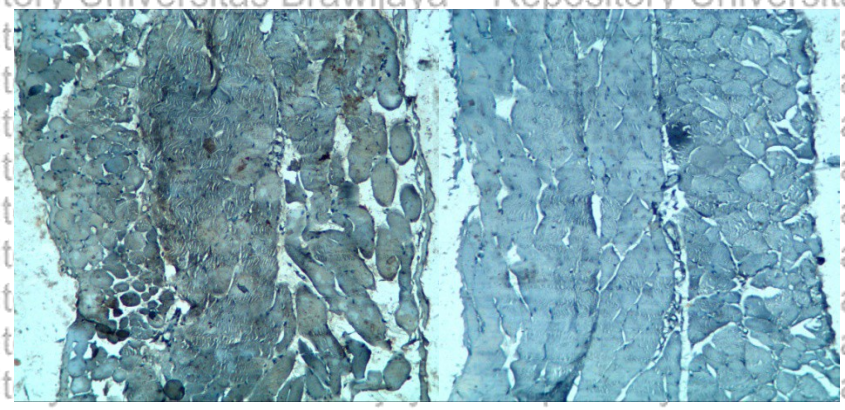
K- : Mencit sehat tanpa paparan
K+ : Mencit model endometriosis tanpa paparan
G1 : Mencit model endometriosis dipapar genistein dosis 0,78mg/hari
G2 : Mencit model endometriosis dipapar genistein dosis 1,04mg/hari
G3 : Mencit model endometriosis dipapar genistein dosis 1,30mg/hari
LA : Mencit model endometriosis dipapar leuprolide acetat dosis 0.00976mg/5hari
D : Mencit model endometriosis dipapar dionogest dosis 0.0052mg/hari

5.1.3. Gambaran Ekspresi PGE-2 Pada Pemeriksaan Immunohistokimia

Hasil pemeriksaan immunohistokimia didapatkan gambaran ekspresi PGE-2 pada kelompok kontrol negatif (K-) terlihat tidak adanya sel positif dan tidak terlihat reaksi warna, sedangkan pada kontrol positif (K+) terlihat warna coklat pada jaringan peritoneum yang menunjukkan bahwa ekspresi PGE-2 nampak cukup kuat. Dan pada kelompok perlakuan didapatkan ekspresi PGE-2 pada setiap perlakuan mengalami penurunan, kecuali pada kelompok leuprolide acetat (LA) nampak lebih kuat diantara kelompok yang lain, sedangkan pada

kelompok perlakuan genistein dosis 1.30mg/hari (G3) terlihat paling lemah dibandingkan kelompok yang lain seperti terlihat pada gambar seperti yang terlihat pada gambar 5.4 dibawah ini:





Gambar 5.4. Gambaran Perbandingan Ekspresi PGE-2 pada peritoneum

Keterangan : Perbandingan ekspresi PGE-2 menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol positif (K+) memiliki intensitas warna kecoklatan paling jelas hal ini menunjukkan ekspresi PGE-2 K+ sangat kuat dibandingkan kelompok lainnya. sebaliknya pada kelompok G3 tingkat reaksi warna terlihat paling lemah, namun nilai rerata *immuno reactive score* (IRS) diantara kelompok perlakuan relatif sama.

Hasil IRS pada pemeriksaan ekspresi PGE-2 pada jaringan peritoneum mencit dapat dilihat pada tabel 5.3 sebagai berikut :

Tabel 5.3. IRS Ekspresi PGE-2 pada jaringan peritoneum

Kelompok	IRS (mean ± SD)
K-	1.75 ± 0.50
K+	3.9 ± 0.96
G1	2.2 ± 0.43
G2	2.4 ± 0.43
G3	1.9 ± 0.26
LA	2.85 ± 0.66
D	2.1 ± 0.26

Keterangan : Rerata IRS pada kelompok K+ lebih tinggi daripada K-, sedangkan pada masing-masing perlakuan mengalami penurunan

5.2. Pengujian Asumsi yang Melandasi ANOVA

Pengujian Ekspresi COX-2 dan PGE-2 dengan menggunakan 7 level kelompok yang terbagi atas K-, K+,3 level dosis Genistein, 1 level dosis

Leuprolide Acetat, dan 1 level dosis Dienogest dilakukan dengan menggunakan ANOVA. Namun, sebelum dilakukan pengujian ekspresi COX-2 dan PGE-2 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 α = 0,05. Dengan menggunakan bantuan software SPSS didapatkan hasil pengujian asumsi normalitas sebagai berikut :

Tabel 5.4. Uji Asumsi Normalitas

Variabel	Koefisien	P-value	Keterangan
COX-2	0.927	0.052	Normal
PGE2	0.968	0.528	Normal

Berdasarkan pada tabel 5.4 di atas, ekspresi COX-2 dan PGE-2 didapatkan p-value lebih besar daripada α = 0,05 (p>0,05). Sehingga, dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa asumsi normalitas ekspresi COX-2 dan PGE-2 telah terpenuhi.

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

Tabel 5.5. Uji Homogenitas Ragam

Variabel	Koefisien	p-value	Keterangan
COX-2	1.031	0.433	Homogen
PGE2	1.250	0.322	Homogen

Berdasarkan tabel 5.5. di atas, variabel ekspresi COX-2 dan PGE-2 didapatkan p-value lebih besar daripada α = 0,05 (p>0,05). Sehingga, dari

pengujian ini dapat disimpulkan bahwa asumsi homogenitas ragam kedua variabel tersebut telah terpenuhi. Oleh karena itu, proses pengujian secara statistik dilakukan dengan ANOVA.

5.3. Hasil Uji Ekspresi COX-2 dan PGE-2

Setelah kedua asumsi yang melandasi ANOVA telah terpenuhi, selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, dan Dienogest terhadap ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2.

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA pada ekspresi COX-2, didapatkan p-value sebesar 0,007, lebih kecil daripada α = 0,05 (p<0,05). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, dan Dienogest terhadap ekspresi COX-2. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi COX-2 akibat pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, dan Dienogest.

Hasil uji Tukey 5 %, menunjukkan bahwa kelompok K+ memiliki rata-rata ekspresi COX-2 yang paling tinggi. Penurunan ekspresi COX-2 secara signifikan ditunjukkan oleh pemberian genistein dosis 0.78 mg/hari (G1) dan 1.3 mg/hari (G3). Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata ± sd kelompok pemberian genistein (G1 dan G3) memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif, dapat dilihat dalam tabel dibawah ini :

Tabel 5.6 Pengujian Pengaruh GenisteinTerhadap Ekspresi COX-2 dengan ANOVA dan Tukey 5%

Perlakuan	Rata-Rata ± SD		p-value
K-	2.3 ± 0.53	a	0.007
K+	3.6 ± 0.82	b	
G1	2.2 ± 0.37	a	
G2	2.65 ± 0.34	ab	

G3	2.25 ± 0.30	a
LA	3.15 ± 0.62	ab
D	2.65 ± 0.41	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).

K- : Mencit sehat tanpa paparan
K+ : Mencit model endometriosis tanpa paparan
G1 : Mencit model endometriosis yang dipapar genistein dosis 0,78mg/hari
G2 : Mencit model endometriosis yang dipapar genistein dosis 1,04mg/hari
G3 : Mencit model endometriosis yang dipapar genistein dosis 1,30mg/hari
LA :Mencit model endometriosis yang dipapar leuprolide acetat dosis 0,00975mg/hari
D : Mencit model endometriosis yang dipapar dionogest dosis 0,0052mg/hari

Hasil analisis dengan menggunakan ANOVA pada ekspresi PGE-2 , didapatkan p-value sebesar 0,000, lebih kecil daripada α = 0,05 (p<0,05). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, dan Dienogest terhadap ekspresi PGE-2. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi PGE-2 akibat pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, dan Dienogest.

Pada hasil uji Tukey 5 % pada ekspresi PGE-2, ditunjukkan bahwa kelompok K+ memiliki rata-rata ekspresi PGE-2 yang paling tinggi. Penurunan ekspresi PGE-2 secara signifikan ditunjukkan oleh pemberian genistein semua dosis (G1, G2, dan G3) dan Dienogest. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata ± sd kelompok pemberian genistein (G1, G2, dan G3) dan Dienogest memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif, seperti pada tabel dibawah ini :

Tabel 5.7. Pengujian Pengaruh GenisteinTerhadap Ekspresi PGE-2 dengan ANOVA danTukey 5%

Perlakuan	Rata-Rata ± SD		p-Value
K-	1.75 ± 0.50	a	0.000
K+	3.9 ± 0.96	b	
G1	2.2 ± 0.43	a	
G2	2.4 ± 0.43	a	
G3	1.9 ± 0.26	a	

LA	2.85 ± 0.66	ab
D	2.1 ± 0.26	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).

K- : Mencit sehat tanpa paparan
K+ : Mencit model endometriosis tanpa paparan
G1 : Mencit model endometriosis yang dipapar genistein dosis 0,78mg/hari
G2 : Mencit model endometriosis yang dipapar genistein dosis 1,04mg/hari
G3 : Mencit model endometriosis yang dipapar genistein dosis 1,30mg/hari
LA :Mencit model endometriosis yang dipapar leuprolide acetat dosis 0,00975mg/hari
D : Mencit model endometriosis yang dipapar dionogest dosis 0,0052mg/hari

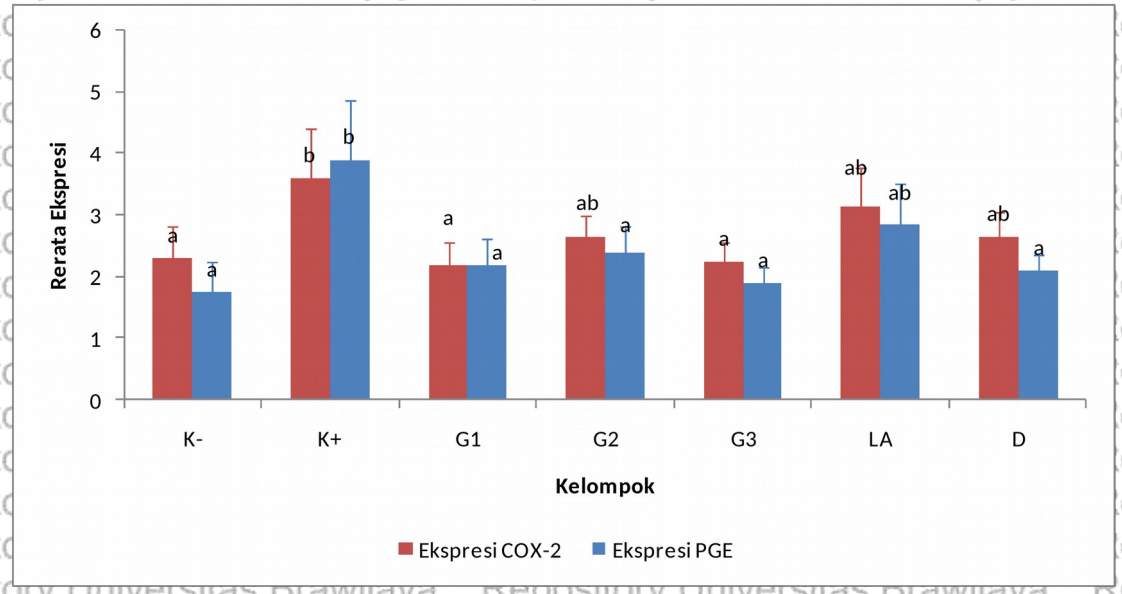
Perbandingan ekspresi COX-2 antara kelompok K- dengan K+ didapatkan p-value sebesar 0,025. P-value kurang dari 0,05 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi COX-2 antara kelompok mencit yang sehat dengan mencit endometriosis. Selisih rata-rata (mean difference) bernilai negative menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi COX-2 kelompok K+ lebih tinggi dari pada kelompok K-. Hal ini mengindikasikan adanya peningkatan ekspresi COX-2 yang signifikan pada mencit model endometriosis. Sedangkan perbandingan ekspresi PGE-2 antara kelompok K- dengan K+ didapatkan p-value sebesar 0,000. P-value kurang dari 0,05 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi PGE-2 antara kelompok mencit yang sehat dengan mencit endometriosis.Selisih rata-rata (mean difference) bernilai negative menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi PGE-2 kelompok K+ lebih tinggi dari pada kelompok K-. Hal ini mengindikasikan adanya peningkatan ekspresi PGE-2 yang signifikan pada mencit model endometriosis.

Perbandingan kelompok K- dengan semua kelompok perlakuan pada ekspresi COX-2, ditunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan memiliki p-value lebih dari 0.05 (p>0.05). Hal ini mengandung pengertian tidak terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi COX-2 antara kelompok K- dengan kelompok perlakuan. Artinya, pemberian Genistein pada berbagai dosis,

Leuprolide Acetat, dan Dienogest mampu menurunkan ekspresi COX-2 mendekati mencit sehat. Pada perbandingan K+ dengan kelompok perlakuan, pada kelompok perlakuan G1 dan G3, didapatkan p-value kurang dari 0,05. Hasil pengujian ini menunjukkan adanya penurunan ekspresi COX-2 secara signifikan terjadi akibat pemberian genistein dosis 0.78 mg/hari (G1) dan1.3 mg/hari (G3). Perbandingan rata-rata ekspresi COX-2 antar kelompok perlakuan, didapatkan p-value lebih dari 0,05 yang mengandung pengertian bahwa rata-rata ekspresi COX-2 kelompok pada semua kelompok perlakuan tidak berbeda signifikan.

Sedangkan perbandingan ekspresi PGE-2 pada kelompok K- dengan semua kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan memiliki p-value lebih dari 0.05 (p>0.05). Hal ini mengandung pengertian tidak terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi PGE2 antara kelompok K- dengan kelompok perlakuan. Artinya, pemberian genistein pada berbagai dosis, Leuprolide Acetat, dan Dienogest mampu menurunkan ekspresi PGE2 mendekati mencit sehat. Pada perbandingan K+ dengan kelompok perlakuan, pada kelompok perlakuan G1, G2, G3, dan D, didapatkan p-value kurang dari 0,05. Hasil pengujian ini menunjukkan adanya penurunan ekspresi PGE-2 secara signifikan terjadi akibat pemberian Genistein dosis 0.78 mg/hari (G1), 1.04 mg/hari (G2), 1.3 mg/hari (G3), dan Dienogest (D). Sedangkan perbandingan rata-rata ekspresi PGE-2 antara kelompok perlakuan, didapatkan p-value lebih dari 0,05 yang mengandung pengertian bahwa rata-rata ekspresi PGE-2 pada semua kelompok perlakuan tidak berbeda signifikan.

Perbedaan rata-rata ekspresi COX-2 dan PGE-2 kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :



Gambar 5.5. Histogram Rata-Rata Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE-2

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).

K- : Mencit sehat tanpa paparan
K+ : Mencit model endometriosis tanpa paparan
G1 : Mencit model endometriosis dipapar genistein dosis 0,78mg/hari
G2 : Mencit model endometriosis dipapar genistein dosis 1,04mg/hari
G3 : Mencit model endometriosis dipapar genistein dosis 1,30mg/hari
LA : Mencit model endometriosis dipapar leuprolide acetat dosis 0.00976mg/5hari
D : Mencit model endometriosis dipapar dionogest dosis 0.0052mg/hari

Pada Gambar 5.5. ditunjukkan histogram rata-rata ekspresi COX-2 dan PGE-2 pada semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimana pada rata-rata ekspresi COX-2 paling tinggi didapatkan pada kelompok K+. dan rata-rata ekspresi COX-2 menurun pada kelompok perlakuan, baik pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, maupun Dienogest, dengan rata-rata ekspresi COX-2 paling rendah didapatkan pada kelompok perlakuan pemberian Genistein dosis 0.78 mg/hari (G1). Sedangkan rata-rata ekspresi PGE-2 semua kelompok baik kontrol dan perlakuan didapati rata-rata ekspresi PGE-2 menurun pada kelompok perlakuan baik pada pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, maupun Dienogest,

dengan rata-rata ekspresi PGE-2 paling rendah didapatkan pada kelompok perlakuan pemberian Genistein dosis 1.30mg/hari (G3).

5.4. Hasil Analisis Regresi Pengaruh Genistein berbagai Dosis terhadap Ekspresi COX-2 dan PGE2

Untuk mengetahui pengaruh pemberian genistein terhadap ekspresi COX-2 dan PGE-2 dilakukan pengujian dengan menggunakan analisis analisis regresi. Berdasarkan hasil analisis, didapatkan hasil analisis regresi sebagai berikut :

Tabel 5.8 Hasil Analisis Regresi COX-2 dan PGE-2

Variabel Terikat	Persamaan Regresi	p-value	Korelasi dan p-value	R-Square
COX-2	Y1 = 3.457 - 1.003 X	0.003	r = -0.687 p = 0.003	47.17%
PGE2	Y2 = 3.779 - 1.511 X	0.000	r = -0.797 p = 0,000	63.55%

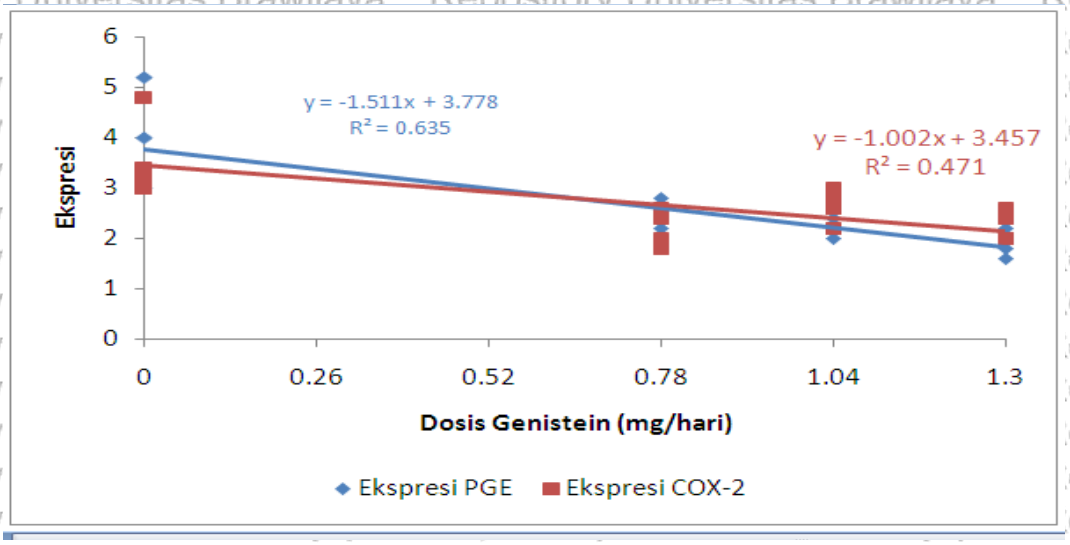
Dimana :

Y1 : Ekspresi COX-2

Y2 : Ekspresi PGE-2

X : Dosis Genistein

Berikut scatter plot hubungan antara pemberian genistein terhadap ekspresi COX-2 dan PGE-2:



Gambar 5.6.Scatter Plot Pengaruh Genistein terhadap Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE-2

Berdasarkan hasil analisis regresi ekspresi COX-2 dan PGE-2, didapatkan koefisien regresi sebesar -1,003 dengan p-value sebesar 0,003. Koefisien determinasi (R-square) sebesar 47,17% menunjukkan bahwa keragaman data yang dijelaskan oleh pengaruh pemberian genistein terhadap penurunan ekspresi COX-2 sebesar 47.17%. Sisanya sebesar 52.83% dijelaskan oleh faktor lain yang tidak diteliti dan error. Koefisien regresi bernilai negatif (-1.003) mengandung pengertian bahwa pemberian genistein berpengaruh negatif terhadap ekspresi COX-2. Semakin tinggi dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis, maka berdampak pada penurunan ekspresi COX-2.

Hasil analisis regresi ekspresi PGE-2, didapatkan koefisien regresi sebesar -1,511 dengan p-value sebesar 0,000. Koefisien determinasi (R-square) sebesar 63.55% menunjukkan bahwa keragaman data yang dijelaskan oleh pengaruh pemberian genistein terhadap penurunan ekspresi PGE-2 sebesar 63.55%. Sisanya sebesar 36.45% dijelaskan oleh faktor lain yang tidak diteliti dan error. Koefisien regresi bernilai negatif (-1.511) mengandung pengertian bahwa pemberian genistein berpengaruh negatif terhadap ekspresi PGE-2. Semakin tinggi dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis, maka akan berdampak pada penurunan ekspresi PGE-2.

5.5. Pengujian Hubungan Antara Dosis Genistein dengan Ekspresi COX-2 dan PGE-2

Untuk mengetahui hubungan antara dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis dengan ekspresi COX-2 dan PGE-2 dapat dilakukan

pengujian dengan menggunakan analisis Korelasi Pearson. Berdasarkan hasil analisis yang dilakukan, didapatkan hasil analisis korelasi sebagai berikut :

Tabel 5.9. Uji Hubungan Antara Dosis Genistein dengan Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE-2

Hubungan Variabel	Koefisien Korelasi	p-value	Keterangan
Dosis Genistein dengan Ekspresi COX-2	-0.687	0.003	Signifikan
Dosis Genistein dengan Ekspresi PGE-2	-0.797	0.000	Signifikan

Hasil pengujian korelasi Pearson antara dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis dengan ekspresi COX-2 dan PGE-2, didapatkan koefisien korelasi sebesar -0.687 dengan p-value sebesar 0.003 pada ekspresi COX-2 dan -0.797 dengan p-value sebesar 0.000 pada ekspresi PGE-2, dimana P-value kurang dari 0.05 ($p<0.05$) menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2. Koefisien korelasi sebesar-0.687 dan -0.797 menunjukkan adanya hubungan yang cukup kuat antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2. Koefisien korelasi yang negatif menunjukkan adanya hubungan yang negatif antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2 dan PGE-2. Meningkatnya dosis genistein yang diberikan, akan berdampak pada penurunan ekspresi COX-2 dan PGE-2.

BAB 6
PEMBAHASAN

Endometriosis merupakan jaringan (sel-sel kelenjar dan stroma) abnormal yang menyerupai endometrium (*endometrium like tissue*) yang tumbuh disisi luar kavum uterus, dan memicu reaksi peradangan menahun. Pertumbuhan dan peradangan merupakan dua proses patologi dasar yang menimbulkan gejala utama endometriosis yaitu nyeri panggul kronis dan infertilitas. Gejala tambahan seperti massa dalam pelvik, yang mana massa ini akan mengalami pembesaran seiring dengan berjalannya siklus haid. COX-2 merupakan enzim dalam bentuk indusibel, dan tidak terdeteksi dalam semua jaringan normal, akan tetapi COX-2 terinduksi oleh berbagai macam inflamasi dan stimulasi mitogenik. Sedangkan PGE-2 merupakan eicosanoid dengan berbagai fungsi fisiologi dan patologi yang banyak terlibat dalam perkembangan endometriosis. Dari bukti-bukti yang ada menunjukkan bahwa selama endometriosis, PGE-2 mengatur banyak proses patofisiologis termasuk proliferasi sel, pencegahan apoptosis, penekanan kekebalan dan angiogenesis. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2 pada mencit model endometriosis.

Penelitian ini merupakan penelitian *in vivo* yaitu menggunakan hewan coba mencit model endometriosis, dimana mencit diberikan bahan myometrium dan endometrium yang diambil dari bahan uterus operasi tumor jinak (Adenomyosis) secara intraperitoneal. Berdasarkan penelitian Awwad dkk (1999) menunjukkan bahwa hasil dari pembuatan mencit model endometriosis dengan angka keberhasilan 96,5%. Evaluasi mencit model endometriosis dilakukan dengan cara

visual dengan melihat lesi endometriosis di jaringan peritoneum dimana nampak adanya hipervaskularisasi pembuluh darah dan pertumbuhan jaringan diluar kavum uteri. Evaluasi serupa juga dilakukan pada mencit model endometriosis kontrol positif dan kontrol negatif pada ekspresi COX-2 dan PGE-2. Hasil dari rata-rata ekspresi COX-2 didapatkan peningkatan rata-rata hasil pada kontrol positif 3.6±0.82 dibandingkan rata -rata kontrol negatif 2.3±0.53. Begitu juga hasil rata-rata ekspresi PGE-2 mengalami peningkatan pada kontrol positif 3.9±0.96 dibandingkan kontrol negatif 1.75±0.05.

6.1. Pengaruh Pemberian Genistein Berbagai Dosis Terhadap Ekspresi COX-2 Pada Mencit Model Endometriosis

Berdasarkan perbandingan ekspresi COX-2 antara kelompok K- dengan K+ didapatkan p-value sebesar 0,025. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi COX-2 antara kelompok mencit yang sehat dengan mencit model endometriosis. Selisih rata-rata (mean difference) bernilai negatif menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi COX-2 kelompok K+ lebih tinggi dari pada kelompok K-. Hal ini mengindikasikan adanya peningkatan ekspresi COX-2 yang signifikan pada mencit model endometriosis.

Pada endometrioma peningkatan ekspresi COX-2 banyak dipengaruhi oleh hormonal maupun sitokin pro inflamasi. Regulasi COX-2 juga meningkat pada beberapa kanker, kondisi premaligna dan berperan dalam proses transformasi kearah keganasan didalam ovarium, yang diperkirakan memberikan kontribusi terhadap proliferasi sel, survival dan angiogenesis (Nezhat, 2008). Pada endometriosis menunjukkan COX-2 mRNA lebih tinggi, yang kemungkinan mengakibatkan peningkatan terus menerus COX-2 dan produksi PGE-2. Pada jaringan endometriosis mensintesis androstenedion dari kolesterol melalui aktivitas

StAR dan enzim steroidogenik lainnya. Estradiol langsung menginduksi cyclooxygenase-2 (COX-2), yang menimbulkan peningkatan konsentrasi prostaglandin E2 (PGE2). Interlukin 1-β (IL1-β), VEGF, dan PGE2 juga merupakan induser ampuh COX-2. Ekspresi enzim COX-2 meningkat pada lesi endometriosis dibandingkan dengan ekspresi serupa pada sel stroma endometrium normal (Bulun,2012).

Berdasarkan hasil pengujian pengaruh pemberian genistein berbagai dosis terhadap ekspresi COX-2 menyatakan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pada pemberian genistein berbagai dosis terhadap penurunan ekspresi COX-2. Dan didapatkan data bahwa kelompok K+ memiliki rata-rata ekspresi COX-2 yang paling tinggi, kemudian secara bertahap mengalami penurunan setelah diberikan paparan dengan genistein. Penurunan ekspresi COX-2 yang paling rendah terdapat pada kelompok G1 yang mendapatkan genistein dosis 0,78mg/hari, Dimana penurunan ekspresi COX-2 dalam lesi endometriosis mencit model endometriosis seiring meningkatnya pemberian dosis genistein dan tercapai paling optimum pada dosis 0,78mg/hari.

Seperti diketahui Genistein memiliki peranan dalam mengurangi produksi inflamasi prostanoid, aktivitas COX-2 dan mengubah sinyal sel. Peranan genistein tersebut terjadi dalam proses *down regulation* dari ekspresi COX-2 dan NFkB untuk mengurangi ekspresi PGE-2. Genistein memberikan efek penekanan pada produksi asam yang diturunkan oleh prostanoid arakidonat terutama pada PGE-2 (Siregar *et al*.,2015).

Hasil penelitian Hua Lu.,*et al* (2008) menunjukkan bahwa genistein menghambat ekspresi hemolisa yang diinduksi iNOS dan COX - 2 mRNA di dalam astrosit . Selanjutnya senyawa tersebut menghambat tingkat hemolisa yang dirangsang oleh NF-κB. Efek inhibisi genistein akan dimediasi oleh ekspresi

hemolisa yang diinduksi iNOS dan COX - 2 di bawah aktivasi NF - κB pada tingkat transkripsi.

Penelitian menyebutkan bahwa isoflavon kedelai dalam genistein terbukti efektif menekan produksi sitokin yang berimplikasi anti-inflamasi dan berpotensi kemopreventif. Salah satu enzim proinflamasi yang penting dalam mengkatalisis pembentukan prostaglandin dari asam arakidonat, dan berperan penting dalam proses peradangan.

Berdasarkan hasil pengujian Korelasi Pearson antara dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis dengan ekspresi COX-2, didapatkan hubungan yang signifikan dan cukup kuat antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2. Sehingga dengan meningkatnya dosis genistein yang diberikan, akan berdampak pada penurunan ekspresi COX-2. Sedangkan berdasarkan hasil analisis regresi ekspresi COX-2, menunjukkan bahwa keragaman data yang dijelaskan oleh pengaruh pemberian genistein terhadap penurunan ekspresi COX-2 sebesar 47.17%. Sisanya sebesar 52.83% dijelaskan oleh faktor lain yang tidak diteliti dan error. Koefisien regresi bernilai negatif (-1.003) mengandung pengertian bahwa pemberian genistein berpengaruh negatif terhadap ekspresi COX-2. Semakin tinggi dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis, maka berdampak pada penurunan ekspresi COX-2.

Hasil analisa regresi tersebut mendukung penelitian yang dilakukan oleh Sutrisno *et al* (2014) bahwa pemberian genistein pada sel kultur endometriosis selain dipengaruhi oleh faktor sitokin pro-inflamasi juga dipengaruhi oleh receptor estrogen, faktor angionenik, sel proliferasi, dan apoptosis.

Gruber *et al.,* 2012 dalam penelitiannya menyebutkan bahwa pemberian genistein konsentrasi rendah menunjukkan aktivitas estrogenik kecil tetapi pada

konsentrasi yang lebih tinggi akan memberikan efek RE antagonis. Ikatan genistein dan reseptor estrogen membentuk komplek estrogen reseptor estrogen komplek dan mengaktivasi ERE sehingga mempengaruhi proses transkrip. Genistein memodulasi beberapa jalur tranduksi sinyal seluler yang berhubungan dengan proliferasi sel, apoptosis, angiogenesis, invasi, metastasis, stress oksidatif melalui peningkatan RE-β (Lee *et al.,* 2012).

Pada struktur kimia genistein memiliki kemiripan dengan 17β-estradiol sehingga mampu berikatan dengan RE. Dalam penelitian ini menggunakan mencit model endometriosis, dimana tingkat kadar estrogen pada jaringan endometriosis sangat tinggi. Endometriosis erat kaitannya dengan keberadaan RE-α yang berhubungan dengan efek estrogen terhadap proliferasi sel sedangkan RE-β bersifat antiproliferasi. Genistein mempunyai afinitas 20-30 kali lebih tinggi terhadap RE-β (87%) dibandingkan RE-α (4%). Afinitas akan lebih meningkat apabila genistein diberikan dalam dosis tinggi.

Pemberian Genistein dosis 0,78mg/hari, 1,04mg/hari dan 1,3mg/hari mampu menurunkan ekspresi COX-2, namun bila dilihat dari grafik histogram didapatkan bahwa penurunan ekspresi COX-2 mengalami fluktuasi, dimana terjadi penurunan pada dosis 0,78mg/hari, kemudian mengalami kenaikan pada dosis 1,04mg/hari dan mengalami penurunan lagi pada dosis 1,3mg/hari. Sebagai *selective estrogen reseptor modulator* (SERMs) genistein memiliki efek estrogenik (bekerja seperti estrogen atau berlaku sebagai pengganti estrogen) pada tulang dan efek anti estrogenik (bekerja menekan fungsi estrogen) pada jaringan reproduksi seperti kelenjar mammae, ovarium, endometrium dan prostat. Pada efek estrogenik genistein bekerja bergantung pada dosis, lama pemberian dan organ target (Anggraini, et al., 2008). Carol dkk (2013) menyebutkan bahwa genistein merupakan

natural SERMs yang mana mekanisme kerja dan pengaruhnya tergantung pada berbagai faktor antar lain pada cara pemberian, *bioavability* dan metabolisme, waktu dan tingkat paparan, keadaan estrogen endogen, serta berbagai efek non-hormonal. Selain itu perbedaan kondisi tubuh, metabolisme, pola genetis dan imunologi antar spesies juga mempengaruhi respon jaringan meskipun menggunakan metode yang sama.

Genistein dan estradiol bersaing untuk menempati Reseptor Estrogen (RE), namun genistein mempunyai afinitas terhadap RE-β lebih tinggi daripada RE-α. Sehingga genistein mampu menghambat produksi oksida nitrat dan prostaglandin pada konsentrasi non-toksik, dengan menghambat induksi NO dan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2) (Muchtadi *dkk*., 2008).Genistein sebagai salah satu strategi pengobatan terbaru, dimana genistei*n* merupakan unsur utama dari fitoestrogen golongan isoflavon (Amberkar *et al*., 2010). Isoflavon mempunyai efek anti inflamasi dengan mekanisme kerja melalui efek penghambatan jalur metabolisme asam arachidonat, pembentukan prostaglandin, pelepasan histamine, atau aktivitas radical scavenging suatu molekul.

Genistein merupakan anggota isoflavon yang banyak ditemukan pada tanaman kedelai dan produk olahannya seperti tahu, tempe, tauco, kecap juga ditemukan pada buah-buahan dan the hijau (Pavese *et al,* 2010). Isoflavon hadir dalam jumlah yang relative besar dihampir semua produk yang mengandung protein kedelai dengan pengecualian konsentrasi kedelai protein dan isolate yang telah mengalami esktraksi alkohol selama pemrosesan. Kandungan isoflavon (daidzein dan genistein) dari beberapa makanan yang disajikan (per 100 mg) diantaranya kacang kedelai (daidzein 46.46 mg dan genistein 73.76 mg), tahu (daidzein 17.83 mg dan genistein 28.00 mg), tempe (daidzein 17.83 mg dan genistein 24.85 mg), dan teh hijau 9 daidzein 0.01 mg dan genistein 0.04 mg).

Salah satu golongan isoflavon ini mempunyai struktur kimia dan jalur mekanisme yang mirip dengan estrogen didalam tubuh (Handayani dkk, 2010). Genistein memiliki struktur serupa dengan 17-βestradiol struktur, ikatan dan aktivitas genistein menyerupai 17-βestradiol, kemiripan antara estrogen dan genistein terletak pada dua gugus hydroksida (-OH) atau hidroksil (C4 dan C7), berjarak 11.0-11.5 A yang intinya menyerupai inti estrogen. Gugus hidroksil C7 diperlukan genistein untuk berikatan dengan reseptor estrogen. Jarak antara C4 dan C7 disepakati sebagai struktur pokok satu substrat agar mempunyai efek estrogenic yang memiliki afinitas tertentu terhadap RE (Sha and lin 2008.,Pavese *et al.,*2010).

6.2. Pengaruh Pemberian Genistein terhadap Ekspresi PGE-2 pada Mencit Model Endometriosis

Berdasarkan pada perbandingan ekspresi PGE-2 antara kelompok K- dengan K+ didapatkan p-value sebesar 0,000. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi PGE-2 antara kelompok mencit yang sehat dengan mencit endometriosis.Selisih rata-rata (mean difference) bernilai negatif menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi PGE-2 kelompok K+ lebih tinggi dari pada kelompok K-. Hal ini mengindikasikan adanya peningkatan ekspresi PGE-2 yang signifikan pada mencit model endometriosis.

Prostaglandin E2 dan F2α diketahui diproduksi secara berlebihan diuterus dan jaringan endometrium penderita endometriosis. Sel stroma lesi endometriosis menghasilkan prostaglandin E2 dalam jumlah banyak, yang selanjutnya menginduksi sistesis estradiol lokal dan nyeri panggul. Ekspresi enzim COX-2 meningkat pada lesi endometriosis dibandingkan dengan ekspresi serupa pada sel stroma endometrium normal. Keterpaduan kedua enzim tersebut menyebabkan peningkatan sintesis prostaglandin E2 pada lesi endometriosis. (Bulun, 2009).

Peningkatan produksi prostaglandin E2 100 kali lipat lebih tinggi pada endometriosis karena peningkatan aktivitas ekspresi enzim siklooksigenase-2 (COX-2) yang diinduksi oleh IL-1β, TNF-α, MIF dan agen proinflamasi. Enzim siklooksigenase-2 adalah enzim pertama yang terlibat dalam mengkonversi arakidonat acid (AA) menjadi prostaglandin. Pertumbuhan endometriosis melibatkan peran PGE2. PGE2 adalah serbaguna eikosanoid yang memiliki banyak fungsi fisiologis dan patologis penyakit. PGE2 terlibat memainkan peran penting dalam pengembangan endometriosis. PGE2 memainkan peran dalam mengatur patofisiologi yang proses termasuk penekanan kekebalan, antiapoptosis, angiogenesis dan proliferasi sel selama pengembangan endometriosis.

Hasil pengujian menunjukkan adanya penurunan ekspresi PGE2 secara signifikan terjadi akibat pemberian Genistein dosis 0.78 mg/hari (G1), 1.04 mg/hari (G2) dan 1.3 mg/hari (G3). Dimana rata-rata ekspresi PGE-2 menunjukkan bahwa kelompok Genistein (G2) memiliki rata-rata ekspresi PGE-2 yang paling tinggi dan penurunan rata-rata ekspresi PGE-2 yang paling rendah terdapat pada kelompok Genistein (G3). Sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada ekspresi PGE-2 yang diakibatkan oleh pemberian Genistein dalam berbagai dosis.

Berdasarkan hasil pengujian korelasi Pearson antara dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis dengan ekspresi PGE-2, menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan dan kuat antara dosis genistein dengan ekspresi PGE-2. Sehingga dapat disimpulkan bahwa meningkatnya dosis genistein yang diberikan, akan berdampak pada penurunan ekspresi PGE2. Dan pada hasil analisis regresi ekspresi PGE-2, menunjukkan bahwa keragaman data yang dijelaskan oleh pengaruh pemberian genistein terhadap penurunan ekspresi PGE-2

sebesar 63.55%. Sisanya sebesar 36.45% dijelaskan oleh faktor lain yang tidak diteliti dan error. Sehingga dapat disimpulkan bahwa makin tinggi dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis, maka akan berdampak pada penurunan ekspresi PGE-2.

Sesuai dengan penelitian dari Siregar.,*et al* 2014, menjelaskan bahwa genistein dapat menekan produksi PGE-2 melalui enzim COX-2. Selain itu, genistein juga berpotensi mengganggu sinyal transduksi sehingga dapat mencegah produksi PGE-2 dan COX-2. Abdul *et al*., 2012 menyebutkan bahwa isoflavon dalam kedelai mencermin anti inflamasi dan anti tumor yang diinduksi oleh tetradeconoylpharbol 13 acetat (TPA) yang dapat melemahkan ekspresi dari COX-2 pada tikus. Yulianto, *et al.*, 2015 dalam penelitian menyebutkan bahwa pada dosis 1,3 mg/hari genistein secara optimum dapat menekan kadar Reseptor A Interleukin 8 pada mencit model endometriosis, yang mana Reseptor A Interleukin 8 mempunyai peran dalam proses pengembangan dan pertumbuhan sel endometriosis.

Genistein sebagai salah satu strategi pengobatan terbaru, dimana genistei*n* merupakan unsur utama dari fitoestrogen golongan isoflavon (Amberkar *et al*., 2010). Isoflavon mempunyai efek anti inflamasi dengan mekanisme kerja melalui efek penghambatan jalur metabolisme asam arachidonat, pembentukan prostaglandin, pelepasan histamine, atau aktivitas radical scavenging suatu molekul.

Dalam penelitian yang dilakukan Kuiper, *et al.* (1998) mengemukakan bahwa fitoestrogen mempunyai afinitas yang lebih tinggi terhadap ER-β, afinitas ini akan lebih ditingkatkan bila konsentrasi fitoestrogennya dalam jumlah tinggi, artinya mekanisme ikatan dengan ER-β akan lebih baik bila jumlah fitoestrogennya tinggi dalam darah. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil pada penelitian ini yang menemukan bahwa pada pemberian genistein dosis 1,3mg/hari merupakan dosis yang optimal dalam menurunkan PGE-2.

6.3. Pengaruh Pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest Terhadap Ekspresi COX-2 pada Mencit Model Endometriosis

Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian genistein berbagai dosis, leuprolide acetat, dan dienogest berpengaruh secara signifikan dalam menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit model endometriosis. Dimana rata-rata ekspresi COX-2 paling tinggi didapatkan pada kelompok K+, kemudian rata-rata ekspresi COX-2 mengalami penurunan pada semua kelompok perlakuan, baik pemberian genistein, Leuprolide Acetat, maupun Dienogest, dengan rata-rata ekspresi COX-2 paling rendah didapatkan pada kelompok perlakuan pemberian Genistein dosis 0.78 mg/hari (G1). Sedangkan pada perbandingan antara K+ dengan Leuprolide Acetat dan Dienogest menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna.

Wilson *et al*., 2007 mengemukakan bahwa pada pemberian agonis GnRH untuk terapi endometriosis memiliki efek hipoestrogenik, Pajanan GnRH yang terus menerus ke hipofisis akan mengakibatkan *down-regulation reseptor Estrogen α (REα)* dan memicu penekanan reseptor progesterone serta peningkatan kadar siklooksigenase-2 (COX-2) yang berkontribusi terhadap resistensi progesterone dan reaksi inflamasi untuk mencegah resistensi progesterone dan proses inflamasi yang terkait nyeri pada endometriosis. Selain itu GnRH bekerja langsung pada jaringan endometriosis. Hal ini dibuktikan dengan adanya reseptor GnRH pada endometrium ektopik. Kadar mRNA reseptor estrogen (ERα) menurun pada endometriosis setelah terapi jangka panjang. Amenore yang timbul akibat kondisi tersebut akan mencegah pembentukan lesi baru.

Soares *et al.,* 2012 dalam penelitiannya mengatakan bahwa pajanan GnRH yang terus menerus ke hipofisis akan mengakibatkan *down-regulation* reseptor

GnRH yang akan mengakibatkan berkurangnya sensitifitas kelenjar hipofisis. Kondisi ini akan mengakibatkan keadaan hipogonadotropin hipogonadisme yang akan mempengaruhi lesi endometriosis yang sudah ada. Amenore yang timbul akibat kondisi tersebut akan mencegah pembentukan lesi baru.

GnRH juga akan meningkatkan apoptosis jaringan endometriosis. Selain itu GnRH bekerja langsung pada jaringan endometriosis. Hal ini dibuktikan dengan adanya reseptor GnRH pada endometrium ektopik. Kadar mRNA reseptor estrogen (ERα) menurun pada endometriosis setelah terapi jangka panjang. GnRH juga menurunkan VEGF yang merupakan faktor angiogenik yang berperan untuk mempertahankan pertumbuhan endometriosis. Interleukin 1A (IL-1A) merupakan faktor imunologi yang berperan melindungi sel dari apoptosis.(Betzar, 2006). Pada endometriosis, makrofag mensekresikan sitokin proinflamasi, seperti IL-1β dan TNF-α yang menginduksi secara berlebihan kadar COX-2 pada sel stroma endometriosis dan selanjutnya COX-2 akan menyebabkan peningkatan konsentrasi PGE2 di cairan peritoneal yang mengaktifkan serabut nyeri (Wu, *et al.*,2009).

Dienogest merupakan progestine selektif yang mengkombinasikan 19-norprogestin dan turunan progesterone sehingga hanya memberikan efek local pada jaringan endometrium. Tidak seperti agen 19-norprogestin lainnya, dienogest memiliki efek androgenik yang rendah, bahkaan memiliki efek antiandrogenik yang menguntungkan sehingga memberikan efek yang minimal terhadap kadar lemak dan karbohidrat. Pemberian dienogest dengan dosis harian 2 mg telah dibuktikan bermakna dalam mengurangi nyeri pelvic dan nyeri haid yang terkait endometriosis. Dienogest juga setara dengan GnRH agonis dalam pengobatan nyeri endometriosis.

Pemberian dienogest pada terapi endometriosis yang mana mekanisme kerja obat tersebut dengan cara menghambat pertumbuhan lesi endometrium yang disebabkan karena pada dienogest menunjukkan sifat antipoliferatif,

antiinflamasi,serta antiangiogenesis yang menyebabkan reseptor progesteron meningkat. Adanya peningkatan progesteron akan menyebabkan terjadinya hipoesterogenik yang berdampak dalam menghambat pertumbuhan endometriosis dan menekan nyeri. Dienogest juga memiliki kemampuan untuk menghambat enzim aromatase dan ekspresi COX-2 dan produksi PGE2 pada kultur sel endometriosis.

6.4. Pengaruh Pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest Terhadap Ekspresi PGE-2 pada Mencit Model Endometriosis.

Pada perbandingan K+ dengan kelompok perlakuan, didapatkan hasil kelompok G1, G2, G3, LA dan D, didapatkan p-value kurang dari 0,05. Hasil pengujian ini menunjukkan adanya penurunan ekspresi PGE2 secara signifikan terjadi akibat pemberian Genistein dosis 0.78 mg/hari (G1), 1.04 mg/hari (G2), 1.3 mg/hari (G3), Leuprolide Acetat dosis 0.00975 mg/5hari dan Dienogest 0.0052mg/hari, dimana dengan rata-rata ekspresi PGE-2 paling rendah didapatkan pada kelompok perlakuan pemberian Genistein dosis 1.30mg/hari (G3). Sedangkan pada perbandingan K+ dengan Leuprolide Acetat didapatkan tidak ada perbedaan bermakna.

Hayashi, *et al.* 2012 dalam penelitiannya menyebutkan bahwa pada pasien endometriosis yang memperoleh dienogest terjadi peningkatan yang signifikan ekspresi reseptor progesteron bila dibandingkan pasien yang tidak memperoleh pengobatan. sedangkan pada pasien endometriosis yang memperoleh leuprolide asetat juga mengalami peningkatan yang signifikan reseptor progesteron dibandingkan pasien yang tidak memperoleh pengobatan. Pada penelitian ini juga membuktikan bahwa dienogest mampu menurunkan ekspresi eR-β dan hal ini tidak terjadi pada pemberian leuprolide asetat yang belum mampu menurunkan eR-β secara signifikan.

Sesuai dengan penelitian Kauroko *et al.,*2012 menyebutkan bahwa pemberian dienogest menunjukkan hasil signifikan secara statistik dalam menghambat ekspresi gen, protein aromatase, COX-2 serta produksi PGE-2 di ESCs. Hal ini disebabkan karena efek dari dienogest dapat menghentikan lingkaran setan dengan menekan pertumbuhan jaringan dengan menghambat produksi E2 dan mengurangi nyeri panggul yang terkait endometriosis dengan menghambat produksi PGE-2. Dienogest memberikan efek penghambatan langsung pada ESCs dangan menghalangi siklus umpan balik positif estrogen dan pembentukan PGE-2 melalui penghambatan aromatase, ekspresi COX-2 dan aktivitas DNA yang mengikat NF-KB.

Thomas *et al.,* 2012 mengemukakan bahwa khasiat dienogest adalah setara dengan leuprolide acetat (GnRH analog) yang merupakan obat standart yang efektif untuk endometriosis yang berhubungan dengan keluhan nyeri. Leuprolide asetat merupakan terapi standar untuk penyakit endometriosis. Pemberian leuprolide asetat menyebabkan terjadinya *down regulation receptor* yang menghambat produksi estrogen atau menyebabkan penurunan produksi estrogen. leuprolide asetat juga memberikan penekanan efektif terhadap gejala nyeri panggul yang berhubungan dengan endometriosis serta mempengaruhi lesi endometriosis yang sudah ada. Pada pemberian agonis Gn-RH secara kontinyu maka agonis Gn-RH tersebut akan menduduki reseptor di hipofisis anterior, dengan mengurangi sensitifitas hipofisis terhadap rangsangan agonis Gn-RH, sehingga terjadi penurunan sekresi LH dan FSH. Akibatnya produksi estrogen dan progesteron pun oleh ovarium akan berkurang (*receptor down-regulation*), yang akan berakibat adanya penurunan hormon estrogen dan akan menyebabkan penekanan pada pertumbuhan sel.

Berdasarkan fakta dan kajian pustaka yang telah diuraikan diatas, bahwa genistein berbagai dosis, leprolide acetat dan dienogest telah terbukti menurunkan ekspresi COX-2 dan PGE-2 pada kasus endometriosis. Hal ini ditunjukkan dan terbukti secara ilmiah dan diuji secara statistik mendapatkan nilai yang bermakna.

6.5. Keterbatasan Penelitian

Dalam penelitian ini untuk membuktikan bahwa mencit model sudah menjadi endometriosis dengan mengambil 2 mencit secara random pada hari ke 15 dan dilakukan pemeriksaan lesi endometriosis secara visual dan menggunakan parameter ER α dan ER β, karena keterbatasan waktu dan biaya.

BAB 7
KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

1. Pemberian genistein menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit model endometriosis. Pada penelitian ini dosis optimal yang dapat menurunkan ekspresi COX-2 paling rendah adalah dosis 0.78mg/hari
2. Pemberian genistein menurunkan ekspresi PGE-2 pada mencit model endometriosis. Pada penelitian ini dosis optimal yang dapat menurunkan ekspresi PGE-2 paling rendah adalah dosis 1.30mg/hari
3. Tidak terdapat perbedaan signifikan antara pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, dan Dienogest dalam menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit model endometriosis
4. Tidak terdapat perbedaan signifikan antara pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, dan Dienogest dalam menurunkan ekspresi PGE-2 pada mencit model endometriosis

7.2. Saran

1. Diperlukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh geneistein terhadap ekspresi COX-2 dan PGE-2 pada dosis lebih daari 1.30mg/hari. Mengingat cara kerja genistein sebagai *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs) beda dosis, beda lama pemberian, beda organ memberikan respon (efek) berbeda.
2. Dapat dilanjutkan uji klinis sehingga diharapkan genistein dapat digunakan sebagai terapi alternatif atau pengobatan bagi wanita yang mengalami endometriosis.

DAFTAR PUSTAKA

Abdul Quaiyoom Khan, Rehan Khan, Muneeb U. Rehman, Abdul Lateef, Mir Tahir, Farrah Ali, Sarwat Sultana.2012. *Soy isoflavones (daidzein & genistein) inhibit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced cutaneous inflammation via modulation of COX-2 and NFK_B in Swiss albino mice. Department of Medical Elementology and Toxicology* New Delhi. 266-275

Anggraini , W., Rahardjo, T., Ichramsyah A., Muchtadi, D. 2008. Pengaruh Isoflavon Kedelai terhadap Deplesi Estrogen pada Tikus Betina. Sprague Dawley. 23 (2): 73-78

Anwar, M.,Baziad, A., dan Prabowo, P. 2011. Endometriosis. Ilmu Kandungan. Ed 3 Cetakan 1. PT Bina Pustaka Sarwono Prawirodihardjo. Jakarta. 239-250

Awwad. JT., Sayegh, RA., Tao, XJ., Hasan, T., Awward, ST., Isaacson, K. 1999. *The SCID mouse : an Experimental Model for endometriosis. Human Reproduction* Vol. 14(12) : 3107-3111

Amberkar MV., Meena K., Mor V., Semwal A, Adiga S., 2010. *PPAR-gamma : a Dagger In Endometriosis. Australian Medical Journal AMJ 3,* 12: 841-820.

Barrier,B.,2010.*imunology of endometriosis*, *Clinical Obstetrics and Gynecology.* 53(2) : 397-402.

Banerjee S., Li Y., Wang, Z., Sarkar, F.H. 2009. *MultiTargetted Therapy of Cancer by Genistein. Cancer Lett.* 269 (2) : 226-242.

Batzer FR. 2006. *GnRH Analog: Options for Endometriosis-Associated Pain Treatment. Journal of Minimally Invasive Gynecology* 13(6):539-45.

Benson, R.C., and Pernoll, M.L.2009. Buku Saku Obstetri & Ginekologi. Edisi 9. Jakarta. EGC

Bulun, S.E., Monsavais, d., Pavano, ME., Dyson, M.,Xue, Q., Attar E., Tokunaga H., Su, Ej., *Role of Estrogen Receptor β In Endometriosis. Semin Reprod Med.* 2012:30 (1):39-45

Bulun, S.E., Lin, Z., Imir, G., Amin, S., Demura, M., Yilmaz, B, Martin, R., Utsunomiya, H., Thung, S., Gurates, B., Tamura, M., Langoi, D., and Deb, S. 2005. *Regulation of Aromatase Expression In Estrogen Responsive Breast and Uterine Disease : From Bench to Treatment. Pharmacol Rev. 57 (3)* : 359-383

Bustaman N,2008. Fitoestrogen dan kesehatan tulang. Bina Widya 19 (3) : 146-150

Carrol, V.M., St. Denis, J.D., Biegasiewosc, K F., Priefer, R. 2013 Isoflavones Chemistry, Analysis, Function and Effect. In V. R Preedy (Ed). *Royal Society of Chemistry publishing. Cambrige United Kindom*. 61-83.

Cureton, Brittany Lauren, 2013. *A Critical Review of Endometriosis Pathology. Theses and Dissertations. Paper 489. Universitas of South Carolina.*

Chuang Pei-Chin., 2010. *Inhibition of CD36-Dependent Phagocytosis bya Prostaglandin E2 Contributes to the Development of Endometriosis.The American Journal of Pathology*. Vol. 176, No. 2

Dahlan, MS., 2012. Statistik Untuk Kedokteran dan Kesehatan. Jakarta : Salemba Medika.

Daniel Escorsim Machado, M.Sc.,a Pl_ınio Tostes Berardo, M.D., Ph.D.,a Richardt Gama Landgraf, Ph.D.,2010. *A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. Journal Fertility and Sterility.* Vol. 93, No. 8.

Djuwantono, T., Bayuaji, H., dan Permadi, W, 2012. Step By Step Penanganan Kelainan Endrokinologi Reproduksi dan Fertilitas dalam Praktek Sehari-hari. Sagung Seto. Jakarta : 253-282

Draper, N.R and Smith, H.1998. *Applied Regression Analysis, Three Edition.* John Wiley and sons, Inc.New York

Eshre, Management of Women with Endometriosis. 2013

Eustache F., Mondon F., Canivenc-Lavier MC., Lesaffre C., Fulla Y., Berges R., Cravedi JP., Vaiman D., Auger J., Cahn WH., 2009. *Chronic Dietary Exposure to a Low Dose Mixture of Genistein and Vinclozolin Modifies the Reproductive Axis, Tesis Transcriptome, and Fertility. Environ Health Perspect* 117 : 1272-1279.

Farrell, E., and Garad, R. 2012. *Endometriosis. Australian Nursing Journal.* 20(5): 37-39

Giudice, L., 2010. *Endometriosis.* Nengl J Med. 362 (25) : 2389-2398

Gui-Hua Shou-Qing Lin, 2008. *Genistein Inhibits Proliferation Of Human Endometrial Endothelial Cell In Vitro. Chin Med Sci J*: Vol.23, No. 1:49-53.

Gruber, C.J., Tschugguel, W., Scneeberger, C., and Huber, J.C. 2002. *Mechanisms of Disease : Production and Actions of Estrogens. N Engl J Med.* 346 (5) : 340-352

Grummer, R. 2006. *Animal Models in Endometriosis Research. Human Reproduction Update*. 12 (5) : 641-649

Handayani V., Tatit N., Sutrisno, 2010. Perbandingan Ekspresi Reseptor Estrogen β dengan Penambahan Berbagai Dosis Genistein pada Sel Endotel HUVEC yang mengalami Stres Oksidatif. *Majalah Obstetri Ginekologi Indonesia.* 34 (1) : 24-30

Hartmann L and Riggs B., 2003. Selective Estrogen-Receptor Modulators Mechanism of Action and Application to Clinical Practice. *The New England Journal of Medicine.* 348:618-29

Hayashi, A., Tanabe, A., Kawabe, S., Hayashi, M., Yuguchi, H., Yamashita, Y., Okuda, K., Ohmichi, M., 2012. Dienogest increases the progesterone receptor isoform B/A ratio in patients with ovarian endometriosis. *Journal of Ovarian Research* 5:31

Hermawati, 2009., Perbaikan Kinerja Reproduksi Akibat Pemberian Isoflavon dari tanaman Kedelai, Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA Universitas Pendidikan Indonesia Bandung. Pp : 2-4

Hoffman, B.L., Schorge, J.O., Schaffer, J.I., Halvorson, L.M., Bradshaw, K.D., and Cunningham, F.G. 2012. *William Gynecology. Second Ed. The McGraw-Hill Companies*, Inc. Cina

Hidayat, AA., 2011.Metode Penelitian KebidananTeknik Analisa Data. Jakarta : Salemba Medika.

Hua Lu, Ji Xin Shi, Dong Mei Zhang, Han Dong Wang, Chun Hua Hang, Hui Lin Chen, Hong Xia Yin.,2008. Inhibition of hemolysate-induced iNOS and COX-2 expression by genistein through suppression of NF-κB activation in primary astrocytes. *Journal of the Neurological Sciences* 278 : 91–95

Jamhur Makhmud., 2011. Studi Perbedaan Ekspresi COX-2 antar Endometrioma dan Karsinoma Ovarii. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Jacoeb, T. Z., Hadisaputra, W., 2009. Penanganan Endometriosis Panduan Klinis dan Algoritme. Edisipertama CV Sagung Seto: 88-90

Janet M., Pavese & Rebecca L., Farmer & Raymond C., Bergan, 2010. Inhibition of Cancer Cell Invasion and Metastasis by Genistein. Cancer Metastasis Rev 29 : 465-482.

Jo Kitawaki, Izumi Kusuki, Kaoruko Yamanaka, Izumi Suganuma. 2011. *Maintenance therapy with dienogest following gonadotropin-releasing hormone agonist treatment for endometriosis-associated pelvic pain.* European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. Hal 212- 216.

Kaoruko, Y, M D., aBing Xu, M.D., Ph.d., 2012. Dienogest inhibits aromatase and cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic stromal cells in spheroid culture. *American Society for Reproductive Medicine*. Vo. 97 No.2

Katzung, B. G. 2002. Farmakologi Dasar dan Klinik, edisi II. Jakarta, Salemba Medika. Halaman 671, 677-678

Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsoon, B., Carton, J.C. Safe, S.H., 1998. Interaction of strogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 139 :4525-4263

Kusumawati, D. 2004. Bersahabat Dengan Hewan Coba. Yogyakarta : Gama Press

Lee,Y., Hee,S.K., Song Y., 2012. *Genistein as a Potential anticancer Agent Against Ovarium Cancer. Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2 (2) : 96-104

Leyland, N., R., Laberge, P., Sing., 2010. *Endometriosis Diagnosis and Management. Journal of obstetrics and Gynecology Canada* (JOGC). 32 (7)

Luthan. D., Adenin. I., Halim. B., 2011. Endometriosis. Dalam Ilmu Kandungan. Jakarta : PT. Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo. Pp : 239-242

Maybin, J.A., Critchley, H.O.D., and Jabbour, H.N. 2010. *Inflamatory Pathway in Endometrial Disorders. Molecular and Cellular Endrocrinology*. 335 : 42-51

Matsukura, H., Aisaki, K., Igarashi, K., Matsushima, Y., Kanno, J., Muramatsu, M., Sudo, K., *and* Sato, N. 2011. *Genistein Promotes DNA Demethylation of The Steroidogenic Factor 1 (SF-1) Promoter In Endometrial Stromal Cells. Biochemical and Biophysical Research Communication*. 412 : 366-372.

Mendelsohn, M.E., and Karas, R.H. 1999. *The Protective Effects of Estrogen on the Cardiovaskular System. Massachusertts Medical Socisty. England* 340 (23)

Muchtadi, D., Anggraini, W., Rahardjo, T., Ichramsyah, A., 2008. *Pengaruh Isoflavon Kedelai terhadap Deplesi Estrogen pada Tikus Betina. Sprague Dawley.* 23 (2).

Murakami M, Nakatani Y, TaniokaT, Kudo I. *Prostaglandin E Synthase Prostaglandin Other Lipid Mediat* 2002;68-69:383-99.

Notoatmodjo, S., 2010. Metodologi Penelitian Kesehatan. Jakarta : Rineka Cipta

Nowak, M., Janusz., Madej., Dziegiel., P., 2007. Intensity of COX-2 expression in cells of tissue fibrosarcomas in dogs as related to grade of Tumour Malignancy. *Bull vet Inst Pulawy*, 51 : 275-279

Na Young Kim, UiNam Ryoo, Dong-Yun Lee, Min Jae Kim, Byung-Koo Yoon, DooSeok Choi. 2010. *The Efficacy And Tolerability Of Short-term Low-dose Estrogen-only Add-back Therapy During Post-operative GnRH Agonist Treatment For Endometriosis. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. Hal. 85-89

Osuga. Y., Koga., Hirota., Yoshino., and Taketani. 2011. *Lymphocytes in Endometriosis. Am J Reprod Immunol* 65 (1) : 1-10.

Öztürk, H.B., Vural, B., Çal×ükan, E., Solakoùlu, S., 2010. Effect of Gnrh Analogues and Octreotide Treatment on Apoptosis and the Cell Proliferation of Endometrium Adenocarcinoma Cell Lines. *J Turkish-German Gynecol Assoc*. **11**: 131-6.

Patisaul, H.B., and Jefferson, W. 2010. *The Pros and Cons of Phytoestrogen Frontiers in Neuroendocrinology*. 31 : 400-419.

Paven, Mary Ellen, M.D., M.S.C.I., and Serdar E. Bulun, M.D. *Aromatase Inhibitors For The Treatment of endometriosis. American Society for Reproductive Medicine* : vol 98

Pavese, J.m., Rebecca L.F., 2010. *Inhibition of Cancer Cell Invasion and Metastasis by Genistein. Cancer Metastasis.* 29 : 465-482.

Rahman, S., Islam, R., Swaraz, A.M., Ansari, A., Parvez, A.K., *and* Paul, D.K.2012. *An Insight On Genistein As Potential Pharmacological And Therapeuticagent*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* :S1924-S1937.

Rice, S. and Whitehead, S. A. 2006. *Phytoestrogens and Breast Cancer Promoters or Protectors. Endocrine-Related Cancer*. 13 : 995-1015.

Riecansky., Jagla F., Pilsakova L., 2010. *The Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens. Physioal. Res. Institute of Clinical, Biological and Differential Psychology, Faculty of Psychology, University of Vienna, Austria*, 59 :651-664

Runge, M.S., 2009. *Endometriosis*. Edisi Kedua Netter Internal Medicine. *Elsevier Inc.*118.

Santoso, Singging. 2005. *Menguasai Statistik di Era Informasi dengan SPSS 12.* Jakarta : PT Elex Media Komputindo.

Siregar.,Effie Masyitha.,Arsana Wiyasa, I Wayan., Dwijayasa, Pande Made. 2015. The Effect Ofgenistein in Various Doses At the Content of Cyclooxygenase 2 (Cox-2) Inzalirperitoneal of Endometriosis Mice Model. *Journal of Dental and Medical Sciences. Vol : 14 hal : 59-65*

Soares, S.R., Varea, A.M., Hidalgo-Moro, J.J., and Pellicer, A. 2012. *Pharmacologic Therapies in Endometriosis : A Systematic Review. Fertility and Sterility*. 98 (3) : 529-555.

Soehartono., Wiyasa I., Norahmawati E. 2008. *Pengaruh Isoflavon Genistein Dan Daidzein Ekstrak Tokbi (Pueraria Labata) Strain Kangean Terhadap Jumlah Osteoblas dan Osteoklas Rattus Novergius Wistar Hipoestrogenik*. UNAIR. Surabaya. Majalah Obstetri dan Ginekologi. Volume 148.

Sutrisno., Mariyani., Herawati, I., Rinata, E., Jehanara., Yueniwati, Y., Nurdiana., Noorhamdani., Santoso, S. 2014. *The Effects Of Genistein As Antiinflammatory And Antiangiogenesis In Primary Endometriosis Cell Culture. Asian Pacific Journal of Reproduction.* 3 (4). Hal 1-6.

Shen KJ., Wang Q.,2011. *High Prevalence Of Endometrial Polyps In Endometriosis Associated Infertility Fertile Steril*;95(8):2722-

Steel, Robert G.D dan Torrie, James H. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometric* (Terjemahan Bambang Sumantri). Jakarta : PT Gramedia Pustaka Utama.

Syamsudin and Darmono. 2011. Buku ajar Farmakologi Eksperimental Universitas Indonesia . Jakarta

Tariverdian, N., Theoharides, t.c., Siedentopf, F., Gutierrez, G., Jeschke, U., Rabinovich, G.A., Blois, S.M., Arek, P.C., 2007. *Neuroendocrine-Immune Disequilibrium and Endometriosis : An Interdisciplinary Approach. Semin Immunopathol.* 29: 193-210

Taylor, HS., Osteen K., Brunner, K., Lockwood, C., Krikun, G., Sokalska, A., Dulebo, A., 2011. *Novel Therapies Targeting Endometriosis. Department of Obstetrics and Gynecology New Haven.*18 : 814

Taylor, R., and Lebovic, I. 2010 *Endometriosis*. Chapter 26 : 565-585

Thomas Strowitzki , Joachim Marr, Christoph Gerlinger, Thomas Faustmann, Christian Seitz., 2012. *Detailed Analysis Of A Randomized, Multicenter, Comparative Trial Of Dienogest Versus Leuprolide Acetate In Endometriosis. International Journal of Gynecology and Obstetrics* :228-233

Wilson, C.A., Meethal, V.S, Bowen L.R, Atwood S..2007. Leuprolide Acetat ; A Drug of Diverse Clinical Applications expert Opin. Investig Drugs. 16 (11) :1-13

Wu, H.M., Cheng, J.C., Wang, H.S., Huang, H.Y., MacCalman, C.D., Leung, P.C., 2009. Gonadotropin-Releasing Hormone Type II Induces Apoptosis of Human Endometrial Cancer Cells by Activating GADD45 Alpha. *Cancer Res.* **69**: 4202-8.

Yamanaka Kaoruko M.D, Bing Xu, M.D., Ph.D. Izumi Suganuma, M.D.,a Izumi Kusuki, M.D., Ph.D.,a Shizuka Mita, M.S.,b Yutaka Shimizu, Ph.D.,b Kiyoshi Mizuguchi, Ph.D.,b and Jo Kitawaki, M.D., Ph.D. 2011. *Dienogest Inhibits Aromatase And Cyclooxygenase-2 Expression And Prostaglandin E2 Production In Human Endometriotic Stromal Cells In Spheroid Culture. Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University of Medicine*.Vol 97 No.2

Yulianto, R., Sutrisno, Dwijayasa, P.M., Arsana, W., Tatit, N.,2015. The effect Of Giving In Various Doses In Level Receptor A Interleukin 8 (Cxcr1) In Peritoneal Lesions of Mice Model endometriosis, *Journal of Dental and Medical Sciences.* 14(2) : 94-100.

Zheng Li, Hong yuan Zhang, Ying jun Zhu, Yuan jing Hu, Peng peng Qu. 2014. *A Randomized Study Comparing The Side Effects And Hormonal Status Of Triptorelin And Leuprorelin Following Conservative Laparoscopic Surgery For Ovarian Endometriosis In Chinese Women. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. Hal.164-168

Xiangyan Ruan, H. Seeger, A.O. Mueck, 2012.*The Pharmacology Of Dienogest. Journal Maturitas.* Hal : 337-344

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 605 / EC / KEPK / 12 / 2015

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL	:	**Pengaruh Pemberian Ginestein, Leuprolide Asetat, Dienogest Terhadap Perubahan Perubahan Ekspresi dan Kadar Protein Mediator Inflamasi pada Lesi serta Zalir Peritoneal Mencit Model Endometriosis.**
PENELITI	:	**dr. Sutrisno, Sp.OG(K)** **dr. Robert One Daniesha Mahendra** **Lilik Winarsih, S.ST** **Chandra Sulistyorini, S.ST** **Eviyani Margaretha Manungkalit, S.Keb.,Bd** **Hardianti Aprina, S.ST** **Happy Martalena Simanungkalit, S.ST** **Asti Andriyani, S.ST**
UNIT / LEMBAGA	:	**Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya Malang**
TEMPAT PENELITIAN	:	**Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang**

DINYATAKAN LAIK ETIK.

29 DEC 2015

Malang,
Ketua,
Komisi Etik Penelitian Kesehatan

Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS (K), M.Hum
NIP. 19460516 197111 1 001

Catatan :
Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan
Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)

Repository Universitas Brawijaya

Lampiran 3

Hasil Skor Ekspresi PGE-2 dan COX-2

A. Data Hasil Skoring Ekspresi PGE2

Kelompok		Indeks Skala Remmele					Rerata	Ket
		Lapang Pandang 1	Lapang Pandang 2	Lapang Pandang 3	Lapang Pandang 4	Lapang Pandang 5		
Kontrol -	1	2	2	2	0	2	1,6	
	2	2	0	2	2	3	1,8	
	3	0	0	2	2	9	2,4	
	4	3	2	0	1	0	1,2	
						Rerata	1.75	
Kontrol +	1	3	2	4	2	4	3	
	2	9	4	3	4	6	5,2	
	3	2	6	2	6	4	4	
	4	4	6	2	3	2	3,4	
						Rerata	3,9	
Perlakuan 1	1	1	2	2	4	1	2	
	2	2	4	2	3	3	2,8	
	3	3	2	3	2	1	2,2	
	4	4	3	0	2	0	1,8	
						Rerata	2,2	
Perlakuan 2	1	4	0	3	2	2	2,2	
	3	0	4	2	5	4	3	
	5	0	3	3	3	3	2,4	
	6	3	0	2	2	3	2	
						Rerata	2,4	
Perlakuan 3	1	3	6	0	0	2	2,2	
	4	1	2	3	1	2	1,8	
	5	3	2	2	0	1	1,6	
	6	0	2	0	3	5	2	
						Rerata	1,9	
Perlakuan 4	1	2	4	2	1	5	2,8	
	2	3	3	5	2	2	3	
	4	6	4	2	3	3	3,6	
	6	1	1	3	3	2	2	
						Rerata	2,85	

Repository Universitas Brawijaya

Perlakuan 6	1	3	3	3	1	2	2,4
	2	1	2	3	3	0	1,8
	3	2	1	4	2	2	2,2
	6	2	2	2	3	1	2
						Rerata	2,1

B. Data Hasil Skoring Ekspresi Cox-2

Kelompok		Indeks Skala Remmele						
		Lapang Pandang 1	Lapang Pandang 2	Lapang Pandang 3	Lapang Pandang 4	Lapang Pandang 5	Rerata	Ket
Kontrol -	1	1	4	2	3	3	2	
	2	2	2	5	3	0	2,4	
	4	4	2	6	3	0	3	
	6	1	3	0	2	3	1,8	
						Rerata	2,3	
Kontrol +	2	2	4	3	4	3	3,2	
	3	6	6	4	6	2	4,8	
	4	3	3	1	4	6	3,4	
	5	5	1	3	2	4	3	
						Rerata	3,6	
Perlakuan 1	1	5	2	2	3	0	2,4	
	2	0	2	1	2	4	1,8	
	3	2	2	3	2	4	2,6	
	4	2	1	2	2	3	2	
						Rerata	2,2	
Perlakuan 2	1	2	2	3	4	2	2,6	
	3	3	3	3	3	3	3	
	5	2	2	4	2	4	2,8	
	6	4	2	2	0	3	2,2	
						Rerata	2,65	
Perlakuan 3	1	2	1	2	4	4	2,6	
	4	2	2	3	0	3	2	
	5	0	4	2	1	3	2	
	6	3	1	4	3	1	2,4	
						Rerata	1,8	

Repository Universitas Brawijaya

	1	4	1	2	3	3	**2,6**	
	2	4	2	4	2	4	**3,2**	
Perlakuan 4	**4**	5	6	3	4	2	**4**	
	6	6	4	2	1	1	**2,8**	
						Rerata	**3,15**	
	1	2	0	1	3	9	**3**	
	2	6	3	0	0	3	**2,4**	
Perlakuan 6	**3**	2	0	4	2	3	**2,2**	
	6	5	6	3	1	0	**3**	
						Rerata	**2,65**	

Lampiran 4

Hasil Penelitian

Lampiran 1. Uji Asumsi Normalitas

Explore

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Residual for COX_2	28	100.0%	0	.0%	28	100.0%
Residual for PGE	28	100.0%	0	.0%	28	100.0%

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for COX_2	.171	28	.035	.927	28	.052
Residual for PGE	.133	28	.200*	.968	28	.528

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 2. UjiAsumsiHomogenitasRagam

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

Dependent Variable: COX_2

F	df1	df2	Sig.
1.031	6	21	.433

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Perlakuan

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

Dependent Variable: PGE

F	df1	df2	Sig.
1.250	6	21	.322

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Perlakuan

Repository Universitas Brawijaya

Lampiran 3. ANOVA danUjiTukeyEkspresi COX-2

Means

Case Processing Summary

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
COX_2 * Perlakuan	28	100.0%	0	.0%	28	100.0%

Report

COX_2

Perlakuan	Mean	N	Std. Deviation
K-	2.3000	4	.52915
K+	3.6000	4	.81650
G1	2.2000	4	.36515
G2	2.6500	4	.34157
G3	2.2500	4	.30000
LA	3.1500	4	.61914
D	2.6500	4	.41231
Total	2.6857	28	.66762

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Perlakuan	1.00	K-	4
	2.00	K+	4
	3.00	G1	4
	4.00	G2	4
	5.00	G3	4
	6.00	LA	4
	7.00	D	4

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

Dependent Variable: COX_2

F	df1	df2	Sig.
1.031	6	21	.433

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: COX_2

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6.514[a]	6	1.086	4.130	.007
Intercept	201.966	1	201.966	768.348	.000
Perlakuan	6.514	6	1.086	4.130	.007
Error	5.520	21	.263		
Total	214.000	28			
Corrected Total	12.034	27			

a. R Squared = .541 (Adjusted R Squared = .410)

Post Hoc Tests

Perlakuan

Repository Universitas Brawijaya

Multiple Comparisons

Dependent Variable: COX_2

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	-1.3000*	.36253	.025	-2.4785	-.1215
	G1	.1000	.36253	1.000	-1.0785	1.2785
	G2	-.3500	.36253	.956	-1.5285	.8285
	G3	.0500	.36253	1.000	-1.1285	1.2285
	LA	-.8500	.36253	.270	-2.0285	.3285
	D	-.3500	.36253	.956	-1.5285	.8285
K+	K-	1.3000*	.36253	.025	.1215	2.4785
	G1	1.4000*	.36253	.013	.2215	2.5785
	G2	.9500	.36253	.170	-.2285	2.1285
	G3	1.3500*	.36253	.018	.1715	2.5285
	LA	.4500	.36253	.870	-.7285	1.6285
	D	.9500	.36253	.170	-.2285	2.1285
G1	K-	-.1000	.36253	1.000	-1.2785	1.0785
	K+	-1.4000*	.36253	.013	-2.5785	-.2215
	G2	-.4500	.36253	.870	-1.6285	.7285
	G3	-.0500	.36253	1.000	-1.2285	1.1285
	LA	-.9500	.36253	.170	-2.1285	.2285
	D	-.4500	.36253	.870	-1.6285	.7285
G2	K-	.3500	.36253	.956	-.8285	1.5285
	K+	-.9500	.36253	.170	-2.1285	.2285
	G1	.4500	.36253	.870	-.7285	1.6285
	G3	.4000	.36253	.920	-.7785	1.5785
	LA	-.5000	.36253	.806	-1.6785	.6785
	D	.0000	.36253	1.000	-1.1785	1.1785
G3	K-	-.0500	.36253	1.000	-1.2285	1.1285
	K+	-1.3500*	.36253	.018	-2.5285	-.1715
	G1	.0500	.36253	1.000	-1.1285	1.2285
	G2	-.4000	.36253	.920	-1.5785	.7785
	LA	-.9000	.36253	.215	-2.0785	.2785
	D	-.4000	.36253	.920	-1.5785	.7785
LA	K-	.8500	.36253	.270	-.3285	2.0285
	K+	-.4500	.36253	.870	-1.6285	.7285
	G1	.9500	.36253	.170	-.2285	2.1285
	G2	.5000	.36253	.806	-.6785	1.6785
	G3	.9000	.36253	.215	-.2785	2.0785
	D	.5000	.36253	.806	-.6785	1.6785
D	K-	.3500	.36253	.956	-.8285	1.5285
	K+	-.9500	.36253	.170	-2.1285	.2285
	G1	.4500	.36253	.870	-.7285	1.6285
	G2	.0000	.36253	1.000	-1.1785	1.1785
	G3	.4000	.36253	.920	-.7785	1.5785
	LA	-.5000	.36253	.806	-1.6785	.6785

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

COX_2

Tukey HSD[a,b]

Perlakuan	N	Subset 1	Subset 2
G1	4	2.2000	
G3	4	2.2500	
K-	4	2.3000	
G2	4	2.6500	2.6500
D	4	2.6500	2.6500
LA	4	3.1500	3.1500
K+	4		3.6000
Sig.		.170	.170

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .263.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

b. Alpha = .05.

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran4. ANOVA danUjiTukeyEkspresiPGE

Means

Case Processing Summary

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PGE * Perlakuan	28	100.0%	0	.0%	28	100.0%

Report

PGE

Perlakuan	Mean	N	Std. Deviation
K-	1.7500	4	.50000
K+	3.9000	4	.95917
G1	2.2000	4	.43205
G2	2.4000	4	.43205
G3	1.9000	4	.25820
LA	2.8500	4	.66081
D	2.1000	4	.25820
Total	2.4429	28	.84565

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Perlakuan	1.00	K-	4
	2.00	K+	4
	3.00	G1	4
	4.00	G2	4
	5.00	G3	4
	6.00	LA	4
	7.00	D	4

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

Dependent Variable: PGE

F	df1	df2	Sig.
1.250	6	21	.322

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: PGE

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12.969[a]	6	2.161	7.159	.000
Intercept	167.091	1	167.091	553.457	.000
Perlakuan	12.969	6	2.161	7.159	.000
Error	6.340	21	.302		
Total	186.400	28			
Corrected Total	19.309	27			

a. R Squared = .672 (Adjusted R Squared = .578)

Post Hoc Tests

Perlakuan

Repository Universitas Brawijaya

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PGE

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	-2.1500*	.38853	.000	-3.4130	-.8870
	G1	-.4500	.38853	.902	-1.7130	.8130
	G2	-.6500	.38853	.640	-1.9130	.6130
	G3	-.1500	.38853	1.000	-1.4130	1.1130
	LA	-1.1000	.38853	.115	-2.3630	.1630
	D	-.3500	.38853	.968	-1.6130	.9130
K+	K-	2.1500*	.38853	.000	.8870	3.4130
	G1	1.7000*	.38853	.004	.4370	2.9630
	G2	1.5000*	.38853	.013	.2370	2.7630
	G3	2.0000*	.38853	.001	.7370	3.2630
	LA	1.0500	.38853	.146	-.2130	2.3130
	D	1.8000*	.38853	.002	.5370	3.0630
G1	K-	.4500	.38853	.902	-.8130	1.7130
	K+	-1.7000*	.38853	.004	-2.9630	-.4370
	G2	-.2000	.38853	.998	-1.4630	1.0630
	G3	.3000	.38853	.985	-.9630	1.5630
	LA	-.6500	.38853	.640	-1.9130	.6130
	D	.1000	.38853	1.000	-1.1630	1.3630
G2	K-	.6500	.38853	.640	-.6130	1.9130
	K+	-1.5000*	.38853	.013	-2.7630	-.2370
	G1	.2000	.38853	.998	-1.0630	1.4630
	G3	.5000	.38853	.850	-.7630	1.7630
	LA	-.4500	.38853	.902	-1.7130	.8130
	D	.3000	.38853	.985	-.9630	1.5630
G3	K-	.1500	.38853	1.000	-1.1130	1.4130
	K+	-2.0000*	.38853	.001	-3.2630	-.7370
	G1	-.3000	.38853	.985	-1.5630	.9630
	G2	-.5000	.38853	.850	-1.7630	.7630
	LA	-.9500	.38853	.229	-2.2130	.3130
	D	-.2000	.38853	.998	-1.4630	1.0630
LA	K-	1.1000	.38853	.115	-.1630	2.3630
	K+	-1.0500	.38853	.146	-2.3130	.2130
	G1	.6500	.38853	.640	-.6130	1.9130
	G2	.4500	.38853	.902	-.8130	1.7130
	G3	.9500	.38853	.229	-.3130	2.2130
	D	.7500	.38853	.484	-.5130	2.0130
D	K-	.3500	.38853	.968	-.9130	1.6130
	K+	-1.8000*	.38853	.002	-3.0630	-.5370
	G1	-.1000	.38853	1.000	-1.3630	1.1630
	G2	-.3000	.38853	.985	-1.5630	.9630
	G3	.2000	.38853	.998	-1.0630	1.4630
	LA	-.7500	.38853	.484	-2.0130	.5130

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

PGE

Tukey HSD[a,b]

Perlakuan	N	Subset 1	Subset 2
K-	4	1.7500	
G3	4	1.9000	
D	4	2.1000	
G1	4	2.2000	
G2	4	2.4000	
LA	4	2.8500	2.8500
K+	4		3.9000
Sig.		.115	.146

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .302.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

b. Alpha = .05.

Lampiran5. AnalisisKorelasi

Correlations

Correlations

		COX_2	PGE	Dosis
COX_2	Pearson Correlation	1	.897**	-.687**
	Sig. (2-tailed)		.000	.003
	N	16	16	16
PGE	Pearson Correlation	.897**	1	-.797**
	Sig. (2-tailed)	.000		.000
	N	16	16	16
Dosis	Pearson Correlation	-.687**	-.797**	1
	Sig. (2-tailed)	.003	.000	
	N	16	16	16

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran6.AnalisisRegresiEkspresi COX-2

Regression

Variables Entered/Removed[b]

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Dosis[a]	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: COX_2

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.687[a]	.472	.434	.55185

a. Predictors: (Constant), Dosis

ANOVA[b]

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	3.806	1	3.806	12.499	.003[a]
	Residual	4.264	14	.305		
	Total	8.070	15			

a. Predictors: (Constant), Dosis

b. Dependent Variable: COX_2

Coefficients[a]

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	3.457	.261		13.260	.000
	Dosis	-1.003	.284	-.687	-3.535	.003

a. Dependent Variable: COX_2

Repository Universitas Brawijaya

Lampiran7. AnalisisRegresiEkspresi PGE

Regression

Variables Entered/Removed[b]

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Dosis[a]	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: PGE

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.797[a]	.636	.609	.59505

a. Predictors: (Constant), Dosis

ANOVA[b]

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	8.643	1	8.643	24.409	.000[a]
	Residual	4.957	14	.354		
	Total	13.600	15			

a. Predictors: (Constant), Dosis

b. Dependent Variable: PGE

Coefficients[a]

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	3.779	.281		13.440	.000
	Dosis	-1.511	.306	-.797	-4.941	.000

a. Dependent Variable: PGE

Lampiran 5

Pendokumentaian Penelitian

Genistein

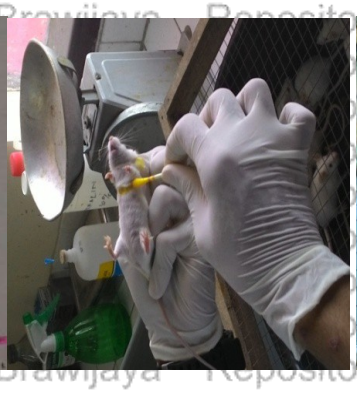
Leuprolide Acetat

Dienogest

Siklosporin A

Ethinil Estradiol

Tempat penandaan mencit



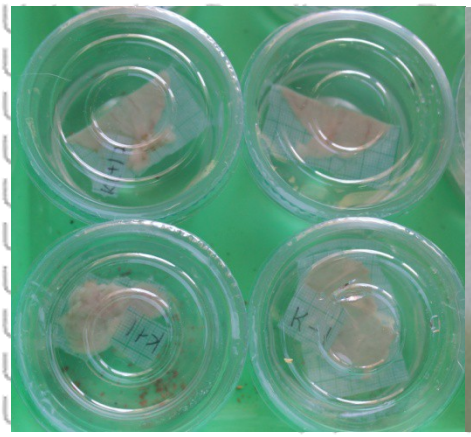
Proses penandaan

Mencit dalam kandang

Jaringan Adenomyosis

Proses penyuntikan

Pembedahan mencit model endometriosis



Hasil lesi endometriosis

Parafin blok

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Perbandingan Pengaruh Pemberian Genistein, Leuprolide Asetat, dan Dienogest terhadap Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE-2 pada Mencit Model Endometriosis

Lilik Winarsih[1], Sri Winarsih[2], Sutrisno[3]

[1]Progran Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
[2] Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
[3] Divisi Fertilitas Endokrinologi Reproduksi Departemen Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang / Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang

ABSTRAK

Tujuan : Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Asetat dan Dienogest terhadap ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2 pada mencit model endometriosis.

Metode : Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *post test only control group design* yang dilakukan di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian dilakukan secara *In vivo* menggunakan mencit betina sebagai sampel penelitian yang berjumlah 35 ekor. Sampel dibagi menjadi 7 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, Genistein dosis 0,78 mg/hari, Genistein dosis 1.04 mg/hari, Genistein dosis 1.3 mg/hari, leuprolide asetat dosis 0.00975 mg /5hari, dan dienogest dosis 0,0052mg/hari. Pemeriksaan ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2 menggunakan Imunohistokimia pada jaringan peritoneum. Data dianalisis dengan Uji *One Way Anova*, *Tukey 5%*, dan Korelasi *Pearson*.

Hasil : Hasil analisis ANOVA, didapatkan *p-value* <0,05 yang berarti terdapat pengaruh yang signifikan pemberian genistein, leuprolide asetat, dan dienogest terhadap penurunan ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2 Hasil analisis Tukey *5%*, menyatakan tidak ada perbedaan yang bermakna (p>0,05) pemberian Genistein, Leuprolide Asetat, dan Dienogest terhadap penurunan ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2. Terdapat hubungan yang signifikan (p<0,05) antara dosis Genistein dengan ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2.

Kesimpulan : Tidak ada perbedaan pemberian Genistein, Leuprolide Asetat, dan Dienogest dalam menurunkan ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2 pada mencit model endometriosis. Terdapat hubungan yang cukup kuat antara dosis Genistein dengan ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2. Adapun hasil analisis Regresi menunjukkan bahwa keragaman data yang dijelaskan oleh pengaruh pemberian genistein terhadap penurunan ekspresi COX-2 sebesar 47.17%. dan PGE-2 sebesar 63.55% . Sisanya sebesar 52.83% dan 36.45% dijelaskan oleh faktor lain yang tidak diteliti dan error.

Kata Kunci : endometriosis, genistein, leurolide asetat, dienogest, COX-2, PGE-2

PENDAHULUAN

Endometriosis merupakan suatu kelainan ginekologik yang sering diderita perempuan usia reproduksi. Angka kejadiannya diperkirakan mencapai 4% dari seluruh populasi perempuan usia subur, dan kejadian tersebut ditemukan pada 20-40% perempuan yang memiliki masalah infertilitas [19].Pada wanita usia reproduksi, endometriosis seringkali menyebabkan gangguan yang bersifat siklik atau terus menerus, seperti nyeri haid dan nyeri pelvic menahun. Pada endometriosis, makrofag mensekresikan sitokin proinflamasi, seperti IL-1β dan TNF-α yang menginduksi secara berlebihan kadar COX-2 pada sel stroma endometriosis dan selanjutnya COX-2 akan menyebabkan peningkatan konsentrasi PGE2 di cairan peritoneal yang mengaktifkan serabut nyeri [23]. TNF-α akan menstimulasi ekspresi prostaglandin synthase-2 yang akan meningkatkan produksi PGE2 dan PGF2α. Produksi prostaglandin E2 secara berlebihan pada inflamasi melalui rangkaian kerja

berbagai enzim merupakan salah satu konsep penting dalam pathogenesis nyeri pada endometriosis.[11,12,19].

Penatalaksanaan endometriosis dapat dilakukan secara medis maupun pembedahan. Terapi medis tanpa pembedahan pada endometriosis biasanya dimaksudkan untuk mengatasi rasa nyeri dengan berbagai mekanisme termasuk meminimalkan inflamasi, menekan produksi hormon ovarium dan menghambat sintesis estradiol[19]. Kemajuan besar telah dicapai dalam penanganan medis pada endometriosis meliputi agonis GnRH, antiagonis GnRH, antagonis progesteron dan beberapa progestin. Meskipun efektif pada banyak wanita, kendala biaya dan efek samping yang ditimbulkan serta penggunaan dalam jangka panjang harus diperhatikan secara ketat dalam indikasi pemakaiannya [13].

Endometriosis merupakan penyakit yang sangat tergantung dengan estrogen, maka salah satu indikasi penanganannya adalah dengan penurunan kadar estrogen yang dapat dilakukan dengan cara pengobatan menggunakan agonis hormon pelepasan gonadotropin (agonis-GnRH) dan progestin selektif. Salah satu bentuk agonis-GnRH adalah Leuprolide Acetat, obat ini digunakan sebagai salah satu pilihan dalam penanganan nyeri pada endometriosis. Pada pemakaian agonis-GnRH, hasil utama yang dipertimbangkan adalah laju kekambuhan endometriosis, keamanan dan daya guna pengobatan jangka panjang[6]. Sedangkan penggunaan progestin selektif seperti Dienogest memiliki kemampuan untuk menghambat enzim aromatase dan ekspresi COX-2 dan produksi PGE2 pada kultur sel endometriosis [1], Dienogest mengurangi lesi endometriosis dengan menciptakan lingkungan progestogenik lokal dan menekan tingkat estrogen sistemik. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa masing-masing obat tersebut setara dalam pengobatan endometriosis, sehingga pemilihan jenis obat yang digunakan harus mempertimbangkan preferensi pasien, efek samping dan ketersediaan obat tersebut dipasaran.

Salah satu bentuk penatalaksanaan endometriosis yang berkhasiat dan efektif pemakaiannya serta relatif dapat dikomsumsi dalam jangka waktu lama adalah dengan menggunakan estrogen alami. Genistein merupakan isoflavon alami yang ditemukan terutama pada tanaman polong khususnya pada kedelai sebagai produk dengan konsentrasi genistein yang tinggi. Genestein menghambat produksi oksida nitrat dan prostaglandin pada konsentrasi non-toksik, dengan menghambat induksi NO dan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2)[25]. Genistein merupakan *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs) karena dapat bersifat sebagai antiestrogenik pada jaringan

reproduksi seperti pada kelenjar mammae, ovarium, endometrium dan prostat. Ketika kadar estrogen tinggi seperti pada endometriosis, genistein akan berikatan dengan reseptor estrogen. Hal ini lah yang akan menyebabkan ikatan estradiol terhambat sehingga menyebabkan efek antiestrogenik. Genistein sebagai antiestrogenik yang afinitasnya lebih tinggi 20-30 kali lipat pada RE-β tidak mengadopsi konfirmasi agonis tetapi bersifat antagonis[27,28],

Dari latar belakang diatas maka penulis ingin melakukan penelitian dengan judul "Perbandingan Pengaruh Pemberian Genistein, Leuprolide Asetat dan Dienogest terhadap Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE-2 pada Mencit Model Endometriosis".

BAHAN DAN METODE

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimen murni (*true experimental*) dengan menggunakan rancangan percobaan dengan metode *Post test only Control Group Design*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya pada bulan Desember 2015 – Januari 2016. Sampel penelitian ini adalah mencit betina. Sampel dibagi menjadi 7 kelompok terdiri dari 1 kelompok kontrol negatif, 1 kelompok kontrol positif dan 5 Kelompok perlakuan yaitu Kelompok mencit model endometriosis yang diberikan terapi genistein berbagai dosis (0,78ml, 1.04ml dan 1.3ml), Leuprolide Asetat (0,00975ml), dan Dienogest (0,0052ml)

Mencit dirandomisasi sesuai dengan jumlah kelompok kemudian diadaptasikan selama 1 minggu. Setelah itu mencit dibuat menjadi model endometriosis dalam waktu 14 hari dengan cara memberikan injeksi *Siklosporin A,* mengimplantasikan jaringan endometriosis secara intraperitoneal dan injeksi *ethynil estradiol*. Pembuktian mencit model endometriosis dibuktikan melalui visual lesi endometriosis dan pemeriksaan imunohistokimia terhadap ekspresi RE-α dan ekspresi RE-β.

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Jaringan *Adenomyosis*, *Phosphat Buffer Sitrat A* (PBSA), Phosphat Buffer Sitrat (PBS) Ph 7,4, *Siclosporin A, Ethinyl Estradiol,* Genistein, Minyak Wijen 100%, Leuprolide Acetat (Tapros), Dienogest (Visanne), Aquadest, Aqua for Injection, *Sodium Sitrat Buffer* Ph 6.0, TBS *Tween,* xylol (I dan II), *ethanol absolute* (I, II, dan III), ethanol (70%, 80%, 90%, dan 96%), *Mouse COX-2 Monoclonal Antibody,* dan *Mouse PGE-2 Monoclonal Antibody*, formalin 10%, Alkohol Absolute (I, II, dan III), air, air hangat, *Poly L-Lysine,* hydrogen peroksida, trypsin (0,025%), *Ultra V block*, *Biotnylated link drops (yellow), streptavidin drops* (*yellow*) *Diamninobenzena* (DBA), *diluent* 2%, pewarna mayers, amoniak air, *entellan*, bahan sampel.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, terdiri dari: Sarung tangan, Masker, Sonde, Spuit (1 cc dan 3 cc), *Slide* dan *chamber*, Gelas Reagen, Pipet (mikropipet), *timer*, *Waterbath*, Mikroskop cahaya biasa, Imunohistostaning kit, Seperangkat alat bedah, *Sentrifuge, Coolbox,*

Icegel, alat penggerus, timbangan analitik, tabung kimia, *Automatic Tissue Embedding Apparatus Tissue – Tek,* mikrotom, *object glass, cover glass hot plate*, inkubator.

Pembuatan Mencit Model Endometriosis

Prosedural pembuatan mencit model endometriosis adalah sebagai berikut pada hari pertama setelah adaptasi, mencit betina kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan diinjeksikan *Siklosporin A* sebanyak 0,2cc/mencit per i.m. Kemudian mencit diimplantasikan jaringan endometriosis yang berasal dari pasien dengan *Adenomyosis* dengan cara menginjeksikan jaringan ke kavum peritoneum sebanyak 0,1cc secara intraperitoneal. Setelah itu, mencit diinjeksikan *Ethinyl Estradiol* secara i.m sebanyak 0,1cc. Pada hari kelima dilakukan penyuntikan *Ethinyl Estradiol* kembali secara i.m sebanyak 0,1cc pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan[25,26,27,28,29].

Pemberian Genistein, Leuprolide Asetat, Dienogest

Pada hari ke-15, mencit sudah menjadi model endometriosis[25,26,27,28,29] dan selanjutnya dilakukan pemberian Genistein berbagai dosis (0.78 mg , 1.04mg dan 1.3mg), Leuprolide Asetat (0.00975mg), dan Dienogest (0,0052mg) pada masing-masing kelompok perlakuan. Pemberian genistein dan dienogest diberikan dengan sonde satu kali setiap hari di luar pemberian makanan dan minuman. Sedangkan Leuprolide Asetat diberikan dengan cara injeksi per i.m setiap 5 hari sekali. Genistein, Leuprolide Asetat, dan Dienogest diberikan selama 15 hari.

Pemeriksaan Imunohistokimia Ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2

Setelah proses perlakuan selesai dilakukan terminasi pada semua kelompok. Segera setelah terminasi dilakukan prosedur pemeriksaan Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE-2 dengan tehnik imunohistokimia yaitu Fiksasi dan pencucian jaringan peritoneum, Dehidrasi dan *clearing*, Infiltrasi dan pebuatan blok parafin, pengirisan tipis, deparafinasi, pewarnaan, *Counterstain*, *mounting,* dan pemeriksaan Mikroskop.

Pemeriksaan menggunakan mikroskop cahaya (merk *Nikkon Eclipse C.I*). Untuk pembacaan hasil IHC akan diukur dengan menggunakan *software optilab viewer* dengan pembesaran 400 kali pada rata-rata 5 lapangan pandang. Mikroskop ini dilengkapi dengan digital kamera *Optilab +12 Megapixel* dan *software* pengolahan gambar *Optilab Viewer.*

Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE-2 pada setiap sampel dinilai secara kuantitatif menurut *Remmele and Stegner* (1986) yang sudah dimodifikasi, dimana indeks skala *Remmele* menggunakan *Immuno Reactive Score* (IRS).

Tabel 5.2 IRS Ekspresi COX-2 dan PGE-2 pada Jaringan peritoneum

Kelompok	IRS COX-2 (mean ± SD)	IRS PGE-2 (mean ± SD)
K-	2.3 ± 0.53	1.75 ± 0.50
K+	3.6 ± 0.82	3.9 ± 0.96
G1	2.2 ± 0.37	2.2 ± 0.43
G2	2.65 ± 0.34	2.4 ± 0.43
G3	2.25 ± 0.30	1.9 ± 0.26
LA	3.15 ± 0.62	2.85 ± 0.66
D	2.65 ± 0.41	2.1 ± 0.26

Keterangan : Rerata IRS pada kelompok K+ lebih tinggi daripada K-, sedangkan pada masing-masing perlakuan mengalami penurunan

HASIL

Data analisis dilakukan dengan menggunakan uji *One Way Anova* dilanjutkan dengan Uji *Post Hoc Test* dengan uji *Tukey 5%,* kemudian uji Korelasi *Pearson*. Proses penghitungan dilakukan dengan piranti lunak *SPSS* versi 23.0 *for window.*

Hasil analisis ANOVA untuk ekspresi COX-2, didapatkan *p-value* sebesar 0,007 (p<0,05) yang berarti terdapat pengaruh yang signifikan pemberian genistein, leuprolide, dan dienogest terhadap penurunan ekspresi COX-2.

Hasil uji Tukey 5% pada Gambar 1, kelompok K+ memiliki rata-rata ekspresi COX-2 yang paling tinggi. Penurunan ekspresi COX-2 secara signifikan ditunjukkan oleh pemberian genistein dosis 0.78 mg/hari (G1) dan 1.3 mg/hari (G3). Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata ± sd kelompok pemberian genistein (G1 dan G3) memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif.

Perbandingan kelompok K- dengan semua kelompok perlakuan pada ekspresi COX-2, ditunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan memiliki p-value lebih dari 0.05 (p>0.05). Hal ini mengandung pengertian tidak terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi COX-2 antara kelompok K- dengan kelompok perlakuan. Artinya, pemberian Genistein pada berbagai dosis, Leuprolide Acetat, dan Dienogest mampu menurunkan ekspresi COX-2 mendekati mencit sehat.

Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan ANOVA pada ekspresi PGE-2 , didapatkan p-value sebesar 0,000, lebih kecil daripada α = 0,05 (p<0,05). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, dan Dienogest terhadap ekspresi PGE-2.

Hasil uji Tukey 5 % pada ekspresi PGE-2, ditunjukkan bahwa kelompok K+ memiliki rata-rata ekspresi PGE-2 yang paling tinggi. Penurunan ekspresi PGE-2 secara signifikan ditunjukkan oleh pemberian genistein semua dosis (G1, G2, dan G3) dan Dienogest. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata ± sd kelompok pemberian genistein (G1, G2, dan G3) dan Dienogest memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif.

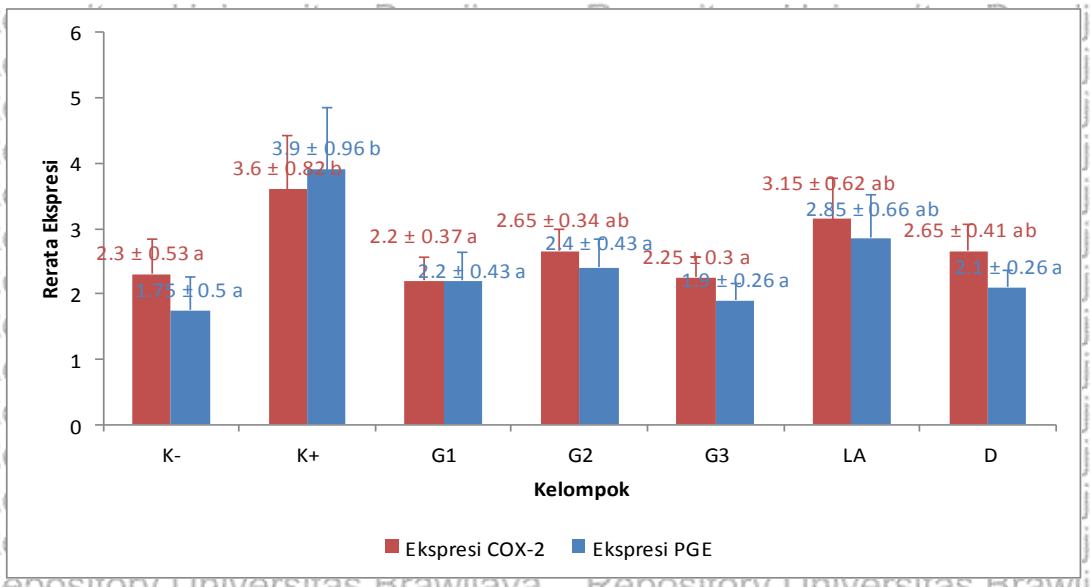
Perbandingan ekspresi PGE-2 pada kelompok K- dengan semua kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan memiliki p-value lebih dari 0.05 (p>0.05). Hal ini mengandung pengertian tidak terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi PGE2 antara kelompok K- dengan kelompok perlakuan. Artinya, pemberian genistein pada berbagai dosis, Leuprolide Acetat, dan Dienogest mampu menurunkan ekspresi PGE2 mendekati mencit sehat.

Berdasarkan hasil pengujian korelasi Pearson antara dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis dengan ekspresi COX-2, didapatkan koefisien korelasi sebesar -0.687 dengan p-value sebesar 0.003. P-value kurang dari 0.05 (p<0.05) menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2. Koefisien korelasi sebesar-0.687 menunjukkan adanya hubungan yang cukup kuat antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2. Koefisien korelasi yang negatif menunjukkan adanya hubungan yang negatif antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2. Meningkatnya dosis genistein yang diberikan, akan berdampak pada penurunan ekspresi COX-2.

Tabel 2 Uji Hubungan Antara Ekspresi COX-2 dengan Ekspresi PGE-2

Hubungan Variabel	Koefisien Korelasi	p-value	Keterangan
Dosis Genistein dengan Ekspresi COX-2	-0.584	0.017	Signifikan
Dosis Genistein dengan Ekspresi PGE-2	-0.719	0.002	Signifikan

Berdasarkan hasil pengujian Korelasi Pearson antara dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis dengan ekspresi PGE-2, didapatkan koefisien korelasi sebesar -0.797 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 (p<0.05) menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi PGE-2. Koefisien korelasi sebesar -0.797 menunjukkan adanya hubungan yang kuat antara dosis genistein dengan ekspresi PGE-2 . Koefisien korelasi yang negatif menunjukkan adanya hubungan yang negatif antara dosis genistein dengan ekspresi PGE-2. Meningkatnya dosis genistein yang diberikan, akan berdampak pada penurunan ekspresi PGE-2.



Gambar 1 Histogram Rata-Rata Ekspresi COX-2 dan PGE-2 Hasil Uji *ANOVA* dan *Tukey 5%*

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).(K-) Kontrol Negatif (K+) Kontrol Positif (G1) Genistein dosis 0,78mg/hari (G2) Genistein dosis 1.04 mg/hari (G3) Genistein dosis 1.3 mg/hari, (LA) Leuprolide Asetat dosis 0,00975 mg /5hari (D) Dienogest dosis 0,0052mg/hari.

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini didapatkan rerata ekspresi COX-2 pada kelompok kontrol negatif (2.3 ± 0.53) lebih rendah daripada rerata ekspresi COX-2 pada kelompok positif (3.6 ± 0.82) dan rerata ekspresi PGE-2 pada kelompok kontrol negatif (1.75 ± 0.50) lebih rendah dari kontrol positif (3.9 ± 0.96). Pada endometriosis menunjukkan COX-2 mRNA lebih tinggi, yang kemungkinan mengakibatkan peningkatan terus menerus COX-2 dan produksi PGE-2[33]. Prostaglandin E2 dan F2α diketahui diproduksi secara berlebihan diuterus dan jaringan endometrium penderita endometriosis. Sel stroma lesi endometriosis menghasilkan prostaglandin E2 dalam jumlah banyak, yang selanjutnya menginduksi sistesis estradiol lokal dan nyeri panggul. Ekspresi enzim COX-2 meningkat pada lesi endometriosis dibandingkan dengan ekspresi serupa pada sel stroma endometrium normal. Keterpaduan kedua enzim tersebut menyebabkan peningkatan sintesis prostaglandin E2 pada lesi endometriosis.

Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian Genistein berbagai dosis menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit model endometriosis. Seperti diketahui Genistein memiliki peranan dalam mengurangi produksi inflamasi prostanoid, aktivitas COX-2 dan mengubah sinyal sel. Peranan genistein tersebut terjadi dalam proses *down regulation* dari ekspresi COX-2 dan NFkB untuk mengurangi ekspresi PGE-2 (Siregar *et al*.,2015).[2] Genistein memberikan efek penekanan pada produksi asam yang diturunkan oleh prostanoid arakidonat terutama pada PGE-2. Hasil penelitian Hua Lu.,*et al* (2008) menunjukkan bahwa genistein menghambat ekspresi hemolisa yang diinduksi iNOS dan COX - 2 mRNA di dalam astrosit . Selanjutnya senyawa tersebut menghambat tingkat hemolisa yang

dirangsang oleh NF-κB. Efek inhibisi genistein akan dimediasi oleh ekspresi hemolisa yang diinduksi iNOS dan COX - 2 di bawah aktivasi NF - κB pada tingkat transkripsi.

Dari hasil penelitian menyebutkan bahwa isoflavon kedelai dalam genistein terbukti efektif menekan produksi sitokin yang berimplikasi anti-inflamai dan berpotensi kemopreventif. Salah satu enzim proinflamasi yang penting dalam mengkatalisis pembentukan prostaglandin dari asam arakidonat, dan berperan penting dalam proses peradangan.

Berdasarkan hasil pengujian Korelasi Pearson antara dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis dengan ekspresi COX-2, didapatkan koefisien korelasi sebesar -0.687 dengan p-value sebesar 0.003. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2. Koefisien korelasi sebesar -0.687 menunjukkan adanya hubungan yang cukup kuat antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2. Koefisien korelasi yang negatif menunjukkan adanya hubungan yang negatif antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2. Meningkatnya dosis genistein yang diberikan, akan berdampak pada penurunan ekspresi COX-2.

Sedangkan berdasarkan hasil analisis regresi ekspresi COX-2, didapatkan koefisien regresi sebesar -1,003 dengan p-value sebesar 0,003. Koefisien determinasi (R-square) sebesar 47,17% menunjukkan bahwa keragaman data yang dijelaskan oleh pengaruh pemberian genistein terhadap penurunan ekspresi COX-2 sebesar 47.17%. Sisanya sebesar 52.83% dijelaskan oleh faktor lain yang tidak diteliti dan error. Koefisien regresi bernilai negatif (-1.003) mengandung pengertian bahwa pemberian genistein berpengaruh negatif terhadap ekspresi COX-2. Semakin tinggi dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis, maka berdampak pada penurunan ekspresi COX-2.

Hasil analisa regresi tersebut mendukung penelitian yang dilakukan oleh Sutrisno *et al* (2014) bahwa pemberian genistein pada sel kultur endometriosis selain dipengaruhi oleh faktor sitokin pro-inflamasi juga dipengaruhi oleh receptor estrogen, faktor angionenik, sel proliferasi, dan apoptosis.

Gruber *et al.,* 2012 dalam penelitiannya menyebutkan bahwa pemberian genistein konsentrasi rendah menunjukkan aktivitas estrogenik kecil tetapi pada konsentrasi yang lebih tinggi akan memberikan efek RE antagonis. Ikatan genistein dan reseptor estrogen membentuk komplek estrogen reseptor estrogen komplek dan mengaktivasi ERE sehingga mempengaruhi proses transkrip. Genistein memodulasi beberapa jalur tranduksi sinyal seluler yang berhubungan dengan proliferasi sel, apoptosis, angiogenesis, invasi, metastasis, stress oksidatif melalui peningkatan RE-β (Lee *et al.,* 2012).

Sebagai *selective estrogen reseptor modulator* (SERMs) genistein memiliki efek estrogenik (bekerja seperti estrogen atau berlaku sebagai pengganti estrogen) pada tulang dan efek anti estrogenik (bekerja menekan fungsi estrogen) pada jaringan reproduksi seperti kelenjar mammae, ovarium, endometrium dan prostat (Muchtadi *dkk*., 2008). Genistein dan estradiol bersaing untuk menempati Reseptor Estrogen (RE),

namun genistein mempunyai afinitas terhadap RE-β lebih tinggi daripada RE-α. Sehingga genistein mampu menghambat produksi oksida nitrat dan prostaglandin pada konsentrasi non-toksik, dengan menghambat induksi NO dan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2).

Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian genistein berbagai dosis menurunkan ekspresi PGE-2 pada mencit model endometriosis. Dimana nilai rata-rata ± sd kelompok pemberian genistein (G1, G2 dan G3) memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif. Sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada ekspresi PGE-2 yang diakibatkan oleh pemberian Genistein dalam berbagai dosis.

Berdasarkan hasil pengujian korelasi Pearson antara dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis dengan ekspresi PGE-2, didapatkan koefisien korelasi sebesar -0.797 dengan p-value sebesar 0.000. P-value kurang dari 0.05 ($p<0.05$) menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi PGE-2. Koefisien korelasi sebesar -0.797 menunjukkan adanya hubungan yang kuat antara dosis genistein dengan ekspresi PGE-2 . Koefisien korelasi yang negative menunjukkan adanya hubungan yang negatif antara dosis genistein dengan ekspresi PGE-2. Meningkatnya dosis genistein yang diberikan, akan berdampak pada penurunan ekspresi PGE2.

Sedangkan berdasarkan hasil analisis regresi ekspresi PGE-2, didapatkan koefisien regresi sebesar -1,511 dengan p-value sebesar 0,000. Koefisien determinasi (R-square) sebesar 63.55% menunjukkan bahwa keragaman data yang dijelaskan oleh pengaruh pemberian genistein terhadap penurunan ekspresi PGE-2 sebesar 63.55%. Sisanya sebesar 36.45% dijelaskan oleh faktor lain yang tidak diteliti dan error. Koefisien regresi bernilai negatif (-1.511) mengandung pengertian bahwa pemberian genistein berpengaruh negatif terhadap ekspresi PGE-2. Semakin tinggi dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis, maka akan berdampak pada penurunan ekspresi PGE-2.

Sesuai dengan penelitian dari Siregar.,*et al* 2014, menjelaskan bahwa genistein dapat menekan produksi PGE-2 dengan cara melalui enzim COX-2. Selain itu, genistein juga berpotensi mengganggu sinyal transduksi sehingga dapat mencegah produksi PGE-2 dan COX-2

Genistein sebagai salah satu strategi pengobatan terbaru, dimana genistei*n* merupakan unsur utama dari fitoestrogen golongan isoflavon (Amberkar *et al*., 2010). Isoflavon mempunyai efek anti inflamasi dengan mekanisme kerja melalui efek penghambatan jalur metabolism asam arachidonat, pembentukan prostaglandin, pelepasan histamine, atau aktivitas radical scavenging suatu molekul.

Dalam penelitian yang dilakukan Kuiper, *et al.* (1998) mengemukakan bahwa fitoestrogen mempunyai afinitas yang lebih tinggi terhadap ER-β, afinitas ini akan lebih ditingkatkan bila konsentrasi fitoestrogennya dalam jumlah tinggi, artinya mekanisme ikatan dengan ER-β akan lebih baik bila jumlah fitoestrogennya tinggi dalam darah. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil pada penelitian ini yang menemukan bahwa pada pemberian genistein dosis 1,3mg/hari

merupakan dosis yang optimal dalam menurunkan PGE-2.

Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian genistein berbagai dosis, leuprolide acetat, dan dienogest berpengaruh secara signifikan dalam menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit model endometriosis. Dimana rata-rata ekspresi COX-2 paling tinggi didapatkan pada kelompok K+, kemudian rata-rata ekspresi COX-2 mengalami penurunan pada semua kelompok perlakuan, baik pemberian genistein, Leuprolide Acetat, maupun Dienogest, dengan rata-rata ekspresi COX-2 paling rendah didapatkan pada kelompok perlakuan pemberian Genistein dosis 0.78 mg/hari (G1).

Pada pemberian agonis GnRH untuk terapi endometriosis memiliki efek hipoestrogenik, Pajanan GnRH yang terus menerus ke hipofisis akan mengakibatkan *down-regulation reseptor Estrogen α (REα)* dan memicu penekanan reseptor progesterone serta peningkatan kadar siklooksigenase-2 (COX-2) yang berkontribusi terhadap resistensi progesterone dan reaksi inflamasi untuk mencegah resistensi progesterone dan proses inflamasi yang terkait nyeri pada endometriosis.

Sedangkan Pemberian dienogest pada terapi endometriosis yang mana mekanisme kerja obat tersebut dengan cara menghambat pertumbuhan lesi endometrium yang disebabkan karena pada dienogest menunjukkan sifat antipoliferatif, antiinflamasi,serta antiangiogenesis yang menyebabkan reseptor progesteron meningkat. Adanya peningkatan progesteron akan menyebabkan terjadinya hipoesterogenik yang berdampak dalam menghambat pertumbuhan endometriosis dan menekan nyeri. Dienogest juga memiliki kemampuan untuk menghambat enzim aromatase dan ekspresi COX-2 dan produksi PGE2 pada kultur sel endometriosis

Penelitian ini membuktikan bahwa tidak ada perbedaan pengaruh pemberian Genistein dengan Leuprolide Asetat dan Dienogest dalam menurunkan ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE-2 pada mencit model endometriosis.

Pada hasil pengujian menunjukkan adanya penurunan ekspresi PGE2 secara signifikan terjadi akibat pemberian Genistein dosis 0.78 mg/hari (G1), 1.04 mg/hari (G2), 1.3 mg/hari (G3), Leuprolide Acetat dosis 0.00975 mg/5hari dan Dienogest 0.0052mg/hari, dimana dengan rata-rata ekspresi PGE-2 paling rendah didapatkan pada kelompok perlakuan pemberian Genistein dosis 1.30mg/hari (G3).

Pada endometriosis Dienogest bekerja dengan mengurangi endogen produksi estradiol dan menekan efek tropik estradiol pada kedua eutopik dan ektopik endometrium. Tidak seperti estrogen, progesteron memilik efek antimitotik terhadap sel endometrium, sehingga memiliki potensi dalam pengobatan endometriosis. Progestin dalam dienogest mampu menurunkan produksi hormone estrogen dalam tubuh sehingga pertumbuhan lesi endometrium bisa menurun. Progestin turunan 19-nortestosteron seperti pada dienogest memiliki kemampuan untuk menghambat enzim aromatase dan ekspresi COX-2 dan produksi PGE-2 pada kultur sel endometriosis.

Sesuai dengan penelitian Kauroko *et al.*,2012 menyebutkan bahwa pemberian

dienogest menunjukkan hasil signifikan secara statistik dalam menghambat ekspresi gen, protein aromatase, COX-2 serta produksi PGE-2 di ESCs. Hal ini disebabkan karena efek dari dienogest dapat menghentikan lingkaran setan dengan menekan pertumbuhan jaringan dengan menghambat produksi E2 dan mengurangi nyeri panggul yang terkait endometriosis dengan menghambat produksi PGE-2. Dienogest memberikan efek penghambatan langsung pada ESCs (endometriotic stromal cells inspheroid culture)dangan menghalangi siklus umpan balik positif estrogen dan pembentukan PGE-2 melalui penghambatan aromatase, ekspresi COX-2 dan aktivitas DNA yang mengikat NF-KB. Kaoruko,*et al.,*2012

Abdul *et al*., 2012 menyebutkan bahwa isoflavon dalam kedelai mencermin anti inflamasi dan anti tumor yang diinduksi oleh tetradeconoylpharbol 13 acetat (TPA) yang dapat melemahkan ekspresi dari COX-2 pada tikus. Sedangkan Khasiat dienogest adalah setara dengan leuprolide acetat (GnRH analog) yang merupakan obat standart yang efektif untuk endometriosis yang berhubungan dengan keluhan nyeri (Thomas *et al.,* 2012).

Leuprolide asetat merupakan terapi standar untuk penyakit endometriosis. Pemberian leuprolide asetat menyebabkan terjadinya *down regulation receptor* yang menghambat produksi estrogen atau menyebabkan penurunan produksi estrogen. leuprolide asetat juga memberikan penekanan efektif terhadap gejala nyeri panggul yang berhubungan dengan endometriosis serta mempengaruhi lesi endometriosis yang sudah ada. Pada pemberian agonis Gn-RH secara kontinyu maka agonis Gn-RH tersebut akan menduduki reseptor di hipofisis anterior, dengan mengurangi sensitifitas hipofisis terhadap rangsangan agonis Gn-RH, sehingga terjadi penurunan sekresi LH dan FSH. Akibatnya produksi estrogen dan progesteron pun oleh ovarium akan berkurang (*receptor down-regulation*). Yang akan berakibat adanya penurunan hormon estrogen dan akan menyebabkan penekanan pada pertumbuhan sel.

Sintesis estrogen pada endometriosis dipengaruhi oleh enzim aromatase. Aktivitas aromatase sendiri dipengaruhi oleh kerja enzim siklooksigenase-2 (COX-2). Dalam sebuah penelitian, ditemukan bahwa ekspresi enzim aromatase pada jaringan endometrium ektopik penderita endometriosis lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok control. Demikian juga ekspresi enzim aromatase pada implant endometriosis, terutama pada lesi berwarna merah. Mengingat enzim COX-2 merupakan enzim utama dalam sintesis prostaglandin, hal ini dipandang sebagai suatu mekanisme terbentuknya lingkaran proses timbulnya nyeri pada endometriosis.

KESIMPULAN

Pemberian Genistein terbukti menurunkan ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2 pada mencit model endometriosis dan tidak ada perbedaan pemberian Genistein, Leuprolide Asetat, dan Dienogest dalam menurunkan ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2 pada mencit model endometriosis. Terdapat hubungan yang cukup kuat antara dosis Genistein dengan ekspresi COX-2 dan hubungan yang kuat antara dosis Genistein dengan ekspresi PGE-2.

DAFTAR PUSTAKA

1. Abdul Quaiyoom Khan, Rehan Khan, Muneeb U. Rehman, Abdul Lateef, Mir Tahir Farrah Ali, Sarwat Sultana.2012. *Soy isoflavones (daidzein & genistein) inhibit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) induced cutaneous inflammation via modulation of COX-2 and NFK_B in Swiss albino mice. Department of Medical Elementology and Toxicology* New Delhi. 266-275
2. Awwad. JT., Sayegh, RA., Tao, XJ., Hasan, T., Awward, ST., Isaacson, K. 1999. *The SCID mouse : an Experimental Model for endometriosis. Human Reproduction* Vol. 14(12) : 3107-3111
3. Batzer FR. 2006. *GnRH Analog: Options for Endometriosis-Associated Pain Treatment. Journal of Minimally Invasive Gynecology* 13(6):539-45.
4. Bulun, S.E., Lin, Z., Imir, G., Amin, S., Demura, M., Yilmaz, B, Martin, R., Utsunomiya, H., Thung, S., Gurates, B., Tamura, M., Langoi, D., and Deb, S. 2005. *Regulation of Aromatase Expression In Estrogen Responsive Breast and Uterine Disease : From Bench to Treatment. Pharmacol Rev. 57 (3)* : 359-383
5. Bulun, S.E., Monsavais, d., Pavano, ME., Dyson, M.,Xue, Q., Attar E., Tokunaga H., Su, Ej., *Role of Estrogen Receptor β In Endometriosis. Semin Reprod Med.* 2012:30 (1):39-45
6. Bustaman N,2008. Fitoestrogen dan kesehatan tulang. Bina Widya 19 (3) : 146-150
7. Brown J, dan Farquhar C. 2014. Endometriosis: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database Syst Rev*. 10(3):CD009590.
8. Davis, Joanne., Kucuk, Omer dan Fazlul Sarkar. 1999. Genistein Inhibits NF-kB Activation in Prostate Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*. 35(2):167-74.
9. Faloppa, Carlos Chaves., Baiocchi, Glauco., Cunha, Isabela Wemek., Guerreiro, Jose Humberto., Cynthia Aparecia dkk. 2014. NF-κB and COX-2 Expression in Nonmalignant Endometrial Lesions and Cancer. *Am J Clin Pathol*. 141(2):196-203.
10. Giudice, Linda C. 2010. Endometriosis. *Nengl J Med*. 362 : 2389-2398.
11. Giudice, L.C., 2010. Clinical Practice Endometriosis.The New England Journal of Medicine.362 (35) : 2389-2398
12. Gonzalez Ramos R, Defrere S, dan Devoto L. 2012. Nuclear factor-kappaB: a main regulator of inflammation and cell survival in endometriosis pathophysiology. *Fertil Steril.* 98(3):520-528.
13. Halim, Annisaa Maharani., Bahar, Burhanuddin., dan Rahayu. 2013. Hubungan Konsumsi Fitoestrogen dengan siklus Menstruasi pada Siswi di SMA Negri 1 Tinggi Moncong Kabupaten Gowa. Universutas Hasanudin ; Sulawesi.
14. Harada T, Taniguchi F. 2010. Dienogest: A new therapeutic agent for the treatment of endometriosis. *Womens Health (Lond Engl*). 6(1):27–35.
15. Kuiper GG, Lemmen JG., Carlsson B., Corton JC., Safe SH, van der Saag PT., van der Burg B.,dan Gustafsson JA. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology.* 139(10):4252-63.
16. Lee JY, Kim HS, Song YS. 2012. Genistein as a potential anticancer agent againts ovarian cancer. *Journal of Traditional and Complementary Medicine.* 2(2) : 96-104.
17. Leyland N, Casper R, Laberge P, Singh SS; SOGC. 2010. Endometriosis: diagnosis and management. *J Obstet Gynaecol Can*. 32(7 Suppl 2):S1-32.
18. Gruber,C.J.,Tschugguel, W., Scneeberger, C., and Huber, J.C. 2002. *Mechanisms of Disease : Production and Actions of Estrogens. N Engl J Med.* 346 (5) : 340-352
19. Hayashi, A., Tanabe, A., Kawabe, S., Hayashi, M., Yuguchi, H., Yamashita, Y., Okuda, K., Ohmichi, M., 2012. Dienogest increases the progesterone receptor isoform B/A ratio in patients with ovarian endometriosis. Journal of Ovarian Research 5:31
20. Kaoruko, Y, M D., aBing Xu, M.D., Ph.d., 2012. Dienogest inhibits aromatase and cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic stromal cells in spheroid culture. *American Society for Reproductive Medicine*. Vo. 97 No.2
21. Leyland, N., R., Laberge, P., Sing., 2010. *Endometriosis Diagnosis and Management. Journal of obstetrics and Gynecology Canada* (JOGC). 32 (7)
22. Muhammad, Harry Freitag dan Prima Oktaviani. 2010. *Bebas Kanker tanpa Daging*. Jogja Great ; Yogyakarta.

Repository Universitas Brawijaya

23. Muchtadi, D., Anggraini, W., Rahardjo, T., Ichramsyah, A., 2008. *Pengaruh Isoflavon Kedelai terhadap Deplesi Estrogen pada Tikus Betina. Sprague Dawley.* 23 (2).
24. Nowak M, Madej JA, Dziegeil P. 2007 Intensity of Cox 2 expression in Cell of Soft Tissue Fibrosarcomas in Dog As Related to Grade of Tumor malignation. *Bull Vet inst Pulawy.* 51; 275-279.
25. Rajah TT, Du N, Drews N and Cohn R. 2009. Genistein in the Presence of 17β-Estradiol Inhibits Proliferation of Erβ Breast Cancer Cells. *Pharmacology*. 84:68-73.
26. Rapa Yulianto, Sutrisno, Dwijayasa Pande Made, Wiyasa Arsana, Nurseta Tatit. 2015. The Effect Of GivingGenistein In Various Doses In LevelReceptor A Interleukin 8 (Cxcr1) In Peritoneal Lesions Of Mice-Model Endometriosis. *IOSR Journal of Dental and Medical*. 14*(2); 94-100*.
27. Siregar.,Effie Masyitha.,Arsana Wiyasa, I Wayan., Dwijayasa, Pande Made. 2015. The Effect Ofgenistein in Various Doses At the Content of Cyclooxygenase 2 (Cox-2) Inzalirperitoneal of Endometriosis Mice Model. *Journal of Dental and Medical Sciences. Vol : 14 hal : 59-65*
28. Sutrisno S. 2014. *The effect of several implants on peritoneal endometriosis: a study to design mice model of endometriosis Research Report*. Malang ; Department of Obstetric and Ginaecology, Saiful Anwar General Hospital, Faculty of Medicine, Brawijaya University.
29. Sutrisno, Soehartono, dan Arsana. 2010. Efek Genistein terhadap Ekspresi eNOS, BCL2 dan Apoptosis pada Kultur Jaringan Sel Endotel Umbilikus (HUVRCs) yang mengalami Stres Oksidatif. Laboratorium Obstetri dan Ginekologi FK UNAIR ; Suarabaya.
30. Sutrisno., Mastragung, D., Khairiah, R., Tridiyawati, F., Ni Nyomas, SAD., Hidayati, DYN., dkk. 2014. The Effects of Genistein on Estrogen Receptor Expression, Cell Poliferation, and Apoptosis in Endometriosis Cell Culture. *J Exp Integr Med* 4 (3).
31. Sutrisno, RR Catur Leny Wulandari Dwi Wahyu Wulan Sulistyowati Ratna Feti Wulandari Endang Sri Wahyuni Yuyun Yueniwati Sanarto Santoso 2015. Effect of genistein on proinflammatory cytokines and estrogen receptor–β in mice model of endometriosis. *Elsevier.* 4(2); 96-99.
32. Thomas Strowitzki , Joachim Marr, Christoph Gerlinger, Thomas Faustmann, Christian Seitz., 2012. *Detailed Analysis Of A Randomized, Multicenter, Comparative Trial Of Dienogest Versus Leuprolide Acetate In Endometriosis. International Journal of Gynecology and Obstetrics* :228-233
.

PERBANDINGAN PENGARUH PEMBERIAN GENISTEIN, LEUPROLIDE ACETAT DAN DIENOGEST TERHADAP EKSPRESI COX-2 DAN PGE2 PADA MENCIT MODEL ENDOMETRIOSIS

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister

OLEH :
LILIK WINARSIH
136070400111010

PROGRAM STUDI MAGISTER KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
2016

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

TESIS

PERBANDINGAN PENGARUH PEMBERIAN GENISTEIN, LEUPROLIDE ACETAT DAN DIENOGEST TERHADAP EKSPRESI COX-2 DAN PGE2 PADA MENCIT MODEL ENDOMETRIOSIS

Oleh :
LILIK WINARSIH
136070400111010

Dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal: 05 Februari 2016
Dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PEMBIMBING

Dr. Dra. Sri Winarsih, APT. MSi	**dr. Sutrisno, SpOG (K)**
NIP 195408231981032001	**NIP 196802031998031005**
Ketua	**Anggota**

Malang, 11 FEB 2016
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,

Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes
NIP 195804141987012001

Repository Universitas Brawijaya

TESIS

PERBANDINGAN PENGARUH PEMBERIAN GENISTEIN, LEUPROLIDE ACETAT DAN DIENOGEST TERHADAP EKSPRESI COX-2 DAN PGE2 PADA MENCIT MODEL ENDOMETRIOSIS

Oleh :
LILIK WINARSIH
136070400111010

Dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal: 05 Februari 2016
Dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PENGUJI

Dr. Dra. Sri Winarsih, APT. MSi
NIP 195408231981032001
Ketua

dr. Sutrisno,SpOG (K)
NIP 196802031998031005
Anggota Penguji

Dr. dr. Siti Candra Windu, SpOG (K)
NIP 196710232003122001
Anggota Penguji

Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes
NIP 195804141987012001
Anggota Penguji

REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Repository Universitas Brawijaya

PERNYATAAN
ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis di kutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia tesis ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.
(UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 Ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 05 Februari 2016

Mahasiswa,

Nama : Lilik Winarsih
NIM : 136070400111010
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran UB

UNIVERSITAS BRAWIJAYA REPOSITORY.UB.AC.ID
Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository
Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository
Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository

Repository Universitas Brawijaya

RINGKASAN

Lilik Winarsih
Perbandingan pengaruh Pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap Ekspresi COX-2 dan PGE-2 pada Mencit Model Endometriosis. Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Komisi Pembimbing, Ketua : Dr.dra Sri Winarsih, Apt, Msi. Anggota : dr. Sutrisno, SpOG (K).

Endometriosis merupakan jaringan (sel-sel kelenjar dan stroma) abnormal yang menyerupai endometrium (*endometrium like tissue*) yang tumbuh disisi luar kavum uterus, dan memicu reaksi peradangan menahun, patofisiologi pasti endometriosis juga belum jelas. Pada endometriosis, makrofag mensekresikan sitokin proinflamasi, seperti IL-1β dan TNF-α yang menginduksi secara berlebihan kadar COX-2 pada sel stroma endometriosis dan selanjutnya COX-2 akan menyebabkan peningkatan konsentrasi PGE2 di cairan peritoneal yang mengaktifkan serabut nyeri. Salah satu indikasi penanganan endometriosis adalah dengan penurunan kadar estrogen yang dapat dilakukan dengan pengobatan menggunakan agonis-GnRH (Leuprolide Acetat), dan progestin selektif (Dienogest). Berbagai penelitian menunjukkan bahwa masing-masing obat tersebut setara dalam pengobatan endometriosis, sehingga pemilihan jenis obat yang digunakan harus mempertimbangkan preferensi pasien, efek samping dan ketersediaan obat tersebut dipasaran. Salah satu bentuk penatalaksanaan endometriosis yang berkhasiat dan efektif pemakaiannya serta relatif dapat dikomsumsi dalam jangka waktu lama adalah dengan menggunakan estrogen alami (Genistein). Genistein merupakan isoflavon alami yang ditemukan terutama pada tanaman polong khususnya pada kedelai sebagai produk dengan konsentrasi genistein yang tinggi. Genestein menghambat produksi oksida nitrat dan prostaglandin pada konsentrasi non-toksik, dengan menghambat induksi NO dan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2)

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui perbandingan pengaruh pemberian genistein, leuprolide acetat dan dienogest terhadap ekspresi COX-2 dan PGE-2 pada mencit model endometriosis. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah desain eksperimental dengan metode post-test control group design. Sampel yang digunakan adalah mencit betina yang dibuat model endometriosis, implantasi jaringan myometrium dan endometrium dari bahan operasi tumor jinak (Adenomyosis). Jumlah replikasi pada penelitian ini adalah 4 replikasi dengan 1 kelompok kontrol negatif, 1 kelompok kontrol positif dan 5 kelompok dengan perlakuan yaitu genistein 0,78mg/hari, genistein 1.04mg/hari, genistein 1,3mg/hari, leuprolide acetat 0,00967mg/5hari dan dienogest 0.0052mg/hari. Ekspresi COX-2 dn PGE-2 diukur dengan menggunakan Imunohistokimia (IHC). Data dianalisis secara statistik dengan menggunkan uji ANOVA dilanjutkan Uji Posthoc Test (uji tukey) dan Uji Korelasi.

Secara statistik ada perbedaan bermakna pada rata-rata ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2 antara kelompok control positif dan semua kelompok perlakuaan pemberian genistein, leuprolide acetat dan dienogest. Hal ini membuktikan bahwa ada pengaruh perlakuan pemberian genistein, leuprolide acetat dan dienogest terhadap ekspresi COX-2 dan PGE-2. Berdasarkan hasil yang diperoleh, terlihat bahwa pemberiaan genistein dosis 0,78mg/hari menunjukkan rata-rata ekspresi COX-2 yang paling rendah dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Sedangkan pemberian genistein dosis 1,3mg/hari menunjukkan rata-rata ekspresi PGE-2 terendah dibandingkan dengan perlakuan yang lain.

Berdasarkan hasil pengujian korelasi Pearson antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2 dan PGE-2, didapatkan koefisien korelasi sebesar -0.687 dan sebesar -0.797 dengan p-value sebesar 0.003 dan sebesar 0.000. menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2 dan PGE-2, dan adanya hubungan yang cukup kuat antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2 dan PGE-2. Koefisien korelasi yang negatif menunjukkan adanya hubungan yang negatif antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2 dan PGE-2. Meningkatnya dosis genistein yang diberikan, akan berdampak pada penurunan ekspresi COX-2 dan PGE-2 pada mencit model endometriosis.

Repository Universitas Brawijaya

SUMMARY

Lilik Winarsih

The Comparison of the Effectiveness of Genistein, Leuprolide Acetat,and Dienogest towards COX-2 and PGE-2 in Endometriosis Model of Mouse. Graduate Studies of Midwifery Department of Medical Faculty of Brawijaya University. Advisors, Head: Dr.dra Sri Winarsih, Apt, Msi. Member: dr. Sutrisno, SpOG (K).

Endometriosis is abnormal tissue (Glands cells and stroma) that is similar to endometrium (*endometrium like tissue*) which grows outside cavum uterus, and triggers annual inflammation reaction, the exact pathophysiology of endometriosis is not clear.In endometriosis, the macrophag secrets cytokin proinflammation, such as IL-1β and TNF-α that over-induce COX-2 in stroma endometriosis cells and COX-2 might cause the concentration of PGE2 in peritoneal fluid that activate inflammation nerves. One of indications of endometriosis care is by reducing the estrogen by givingagonic-GnRH (Leuprolide Acetate), andselective progestin (Dienogest).Several researches showed that each remedies is similar to endometriosis treatment, therefore the selection of the remedies should consider the patient condition, the contra indication, and the availability. The effective and appropriate endometriosis treatmentwhich can be used in long terms is by using natural estrogen (Genistein). Genistein is a natural isophlavon compound that can be found in beans, especially in soya bean. Genestein can hinder the production of oxide nitrate and prostaglandin on non-toxic concentration, by reducing the induction od NO and cycloocygenase-2 (COX-2).

The purpose of this study was to investigate the different effect of genistein, leuprolide acetate,and dienogest towards COX-2 and PGE-2 in endometriosis model of mouse. The method used was experimental study using posttest control group design. The samples of the study were female mice which were designed as endometriosis model, myometrium and endometrium tissue implantation from adenomyosis. The number of replication in this study were 4 replications with 1 control group negative, 1 control group positive, and 5 experimental groups using genistein 0,78mg/day, genistein 1.04mg/day, genistein 1,3mg/day, leuprolide acetat 0,00967mg/5days,and dienogest 0.0052mg/day. The COX-2 and PGE-2 were measuredusing Imunohistochemist (IHC). The data were analysed statistically using ANOVA test followed by Posthoc Test andCorrelation test.

Statistically, there were significant differences on the average result of COX-2 and PGE-2 between Control group positive and all experimental groups in terms of genistein, leuprolide acetate, and dienogest distribution. It shows that the distribution of genistein, leuprolide acetate,and dienogest affect the result of COX-2 and PGE-2. Based on the findings, it can be seen that the distribution of genistein dosage 0,78mg/dayshows the lowest average result of COX-2 compare to others. While the distribution of genistein dosage 1,3mg/day shows the lowest average result of PGE-2.

Based on the correlation test using Pearson test between the genistein dosage and the result of COX-2and PGE-2, it was obtained correlation coefficient -0.687 and -0.797, with p-value 0.003 and 0.000. it meant that there was a significant relation between the genistein dosage and the result of COX-2and PGE-2, and there was a significant relation between genistein dosage and the result of COX-2 and PGE-2. The negative correlation coefficient showed negative relation between genistein dosage and the result of COX-2 and PGE-2. The increasing genistein dosage would impact to the reducing result of COX-2 and PGE-2on endometriosis model of mouse.

Repository Universitas Brawijaya

KATA PENGANTAR

Dengan mengucap puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa, atas limpahan rahmat dan berkatnya penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul : **Perbandingan Pengaruh Pemberian Genistein, Leuprolide Asetat, dan Dienogest terhadap Ekspresi COX-2 dan PGE-2 pada mencit model endometriosis**.

Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi kajian tentang endometriosis, genistein, leuprolide asetat, dienogest, COX-2 dan PGE-2 Dengan selesainya tesis ini penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Muhammad Bisri, MS selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang, beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan Program Studi Magister Kebidanan Universitas Brawijaya Malang.
2. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Penguji II, atas izin yang dierikan selama penulis menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Nurdiana, M.Kes, selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Universitas Brawijaya Malang, yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., Msi selaku Ketua komisi pembimbing yang telah memberikan dukungan, bimbingan, arahan dan masukan serta kesabarannya selama proses penyusunan tesis ini.
5. dr. Sutrisno, SpOG (K) selaku Sekretaris Program Studi Magister Kebidanan dan anggota komisi pembimbing yang telah memberikan dukungan, bimbingan dan masukan selama proses penyusunan tesis ini.
6. Dr.dr.Siti Candra Windu, SpOG(K) selaku penguji I yang telah memberikan saran dan arahan sehingga tesis ini menjadi semakin sempurna.

7. Dr. drh. Widjiati, Msi selaku supervisor penelitian beserta Staf Laboratorium Hewan Coba Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya yang telah membantu hingga terlaksananya penelitian ini.
8. Satuman, S.Si, M.Kes selaku supervisor penelitian dan rekan-rekan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah membantu hingga terlaksananya penelitian ini.
9. Ketua STIKES Kendedes Malang beserta seluruh staf atas ijin dan dukungan yang diberikan untuk melanjutkan studi Magister Kebidanaan.
10. Para dosen pengajar Program Studi Magister Kebidanan yang telah mendidik, membimbing dan memberikan bekal keilmuan.
11. Keluargaku tercinta, Kedua orang tua, Suami dan anakku tersayang yang selalu memberikan motivasi dan doa untuk dapat menyelesaikan pendidikan dan tesis ini.
12. Teman-teman penelitian endometriosis yang selalu bersama dalam suka dan duka dalam menyelesaikan tesis ini.
13. Teman-teman Angkatan III Program Studi Magister Kebidanan Universitas Brawijaya yang selalu mendukung dan memberi semangat.

Penulis menyadari bahwa masih kekurangan dan keterbatasan dalam penyusunan tesis ini. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran yang membangun untuk kesempurnaan tesis ini, agar tesis ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Januari 2016

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN ii

LEMBAR PENGESAHAN iii

PERNYATAAN ORISINILITAS. iv

HALAMAN PERUNTUKAN. v

RINGKASAN vi

SUMMARY. viii

KATA PENGANTAR. x

DAFTAR ISI xii

DAFTAR TABEL xiv

DAFTAR GAMBAR xv

DAFTAR LAMPIRAN. xvi

DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL. xvii

BAB 1 PENDAHULUAN 1

1.1 Latar belakang 1

1.2 Rumusan Masalah 4

1.3 Tujuan penelitian 4

1.4 Manfaat Penelitian 5

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA..... 6
2.1 Endometriosis..... 6
2.2 COX-2 17
2.3 PGE2..... 19
2.4 Fitoestrogen 23
2.5 Genistein 25
2.6 Dienogest. 31
2.6 Leuprolin Acetat. 33
BAB 3 KERANGKA KONSEP..... 43
3.1 Kerangka Konsep..... 43
3.2 Hipotesis. 46
BAB 4 METODE PENELITIAN..... 47
4.1 Desain Penelitian..... 47
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian..... 47
4.3 Sampel. 48
4.4 Variabel Penelitian..... 49
4.5 Definisi Operasional. 50
4.6 Bahan dan Alat Penelitian. 53
4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data. 54
4.8 Analisa Data..... 63
4.9 Kerangka Operasional Penelitian. 67
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA.....

5.1 Gambaran umum tikus percobaan, Ekspresi COX-2 dan PGE-2. 68
5.2 Pengujian asumsi yang melandasi ANOVA. 80
5.3 Hasil Uji Ekspresi COX-2 dan PGE-2. 81
5.4 Hasil Analisis Regresi Pengaruh Pemberian genistein berbagai dosis terhadap Ekspresi COX-2 dan PGE-2. 86
5.5. Hasil Analisis Korelasi Pearson. 88
BAB 6 PEMBAHASAN. 89
6.1 Pengaruh Pemberian Genistein berbagai dosis terhadap ekspresi COX-2 pada Mencit Model Endometriosis. 90
6.2 Pengaruh Pemberian Genistein berbagai dosis terhadap ekspresi PGE-2 pada Mencit Model Endometriosis. 92
6.3 Pengaruh Pemberian Genistein berbagai dosis, Leuprolide Acetat dan Dienogset terhadap ekspresi COX-2 pada Mencit Model Endometriosis. 94
6.4 Pengaruh Pemberian Genistein berbagai dosis, Leuprolide Acetat dan Dienogset terhadap ekspresi PGE-2 pada Mencit Model Endometriosis. 96
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN. 105
7.1 Kesimpulan. 105
7.2 Saran. 106
DAFTAR PUSTAKA. 107
LAMPIRAN. 113

Repository Universitas Brawijaya

DAFTAR TABEL

Hal

Tabel 2.1Cara kerja dan jenis sediaan hormonal dan antihormonal pada penanganan endometriosis……. 16

Tabel 2.2 Perbandingan antara penanganan endometriosis secara Pembedahan dan medicinal…….. 17

Tabel 2.3 Beberapa contoh obat Agonis GnRH…… 36

Tabel 5.1 Skala Semi kuantitatif IRS…… 76

Tabel 5.2 Uji Asumsi Normalitas…… 78

Tabel 5.3 Uji Homogenitas Ragam…… 78

Tabel 5.4 Pengujian Pengaruh Genistein terhadap Ekspresi COX-2 dengan ANOVA danTukey 5%..... 79

Tabel 5.5 Perbandingan Ekspresi COX-2 Kelompok K- dengan K+…… 80

Tabel 5.6 Perbandingan Multiple Comparison Ekspresi Cox-2…… 81

Tabel 5.7 Pengujian Pengaruh Genistein terhadap Ekspresi PGE-2 dengan ANOVA danTukey 5%..... 83

Tabel 5.8 Perbandingan Ekspresi PGE-2 Kelompok K- dengan K+…… 84

85

87

Tabel 5.9 Perbandingan Multiple Comparison Ekspresi Cox-2……
Tabel 5.10 Hasil Analisis Regresi COX-2 dan PGE-2……

DAFTAR GAMBAR

Hal

Gambar 2.1 Tissue Injury and Repair dalam kaitan peningkatan Reseptor Estrogen..... 10

Gambar 2.2 Proses produksi estrogen local pada endometriosis dan perannya terhadap proses inflamasi..... 11

Gambar 2.3 Peran Prostaglandin pada proses inflamasi..... 23

Gambar 2.4 Tanaman kedelai sumber dari Genistein..... 27

Gambar 2.5 Struktur Genistein dan 17β-Estradiol..... 28

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian..... 48

Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian..... 73

Gambar 5.1 Jaringan Peritoneum pada endometriosis 75

Gambar 5.2 Gambaran Perbandingan Ekspresi ER-α dan ER-β pada Mencit Model Endometriosis..... 75

Gambar 5.3 Lesi Kelompok control negatif dan kelompok control positif..... 76

Gambar 5.4 Jaringan peritoneum mencit model endometriosis yang telah diberikan perlakuan..... 78

Gambar 5.5 Gambaran Perbandingan Ekspresi COX-2 pada jaringan 80

87

peritoneum..... 88

Gambar 5.6 Gambaran Perbandingan Ekspresi PGE-2 pada jaringan peritoneum.....

Gambar 5.7 Histogram Rata-rata Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE-2.....

Gambar 5.8 Scatter Plot Pengaruh Genistein terhadap Ekspresi COX-2 dan PGE-2.....

Repository Universitas Brawijaya

DAFTAR LAMPIRAN

Hal

Lampiran 1.Keterangan Kelaikan Etik 107

Lampiran 2. Izin Penelitian 108

Lampiran 3 Hasil Score Ekspresi COX-2 dan PGE2 109

Lampiran 4 Hasil Penelitian..... 112

Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian..... 125

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL

SINGKATAN

17β-HSD type 1	: *17β-hidroksi steroid oksidone duktase type 1*
ASRM	: *American Society of Reproductive Medicine*
AA	: Arakidonat Acid
C3	: Complemen 3
COX-2	: *Cyclooxygenase-2*
CPP	: *Cronic Pelvic Pain*
DNA	: *Deoxy Ribonucleic Acide*
ERE	: *Estrogen Responsive Elemen*
GnRH	: *Gonadotropin Releasing Hormon*
IL	: *Interlukin*
IM	: Intra Muskuler
IP	: Intra Peritoneal
IUS	: *Intra Uterin System*
kg	: Kilogram
LNG	: Levonorgestrel
mg	: Milligram
ml	: Mililiter
MRI	: *Magnetik Resonance Imaging*
NF-kβ	: *Nuclear Factor kappa Beta*
NGF	: *Nerve Growth Factor*
NK	: *Natural Killer*

NET : *Nortestosteron*

NK Cell : Natural Killer Cell

NSAID : Non Steroid Anti Inflamasi Drugs

PES : *Prostaglandin Endoperoksidase Sintase*

PBS : *Phospat Buffer Sitrat*

PBSA : *Phospat Buffer Sitrat A*

PGE2 : Prostaglandin E2

PGHS : *Prostaglandin H Sintase*

PGI2 : *Prostasiklin*

RE : *Reseptor Estrogen*

RE-α : Reseptor Estrogen-alpha

RE-β : Reseptor Estrogen-Beta

RNA : *Ribonucleid Acid*

SERMs : *Selective Estrogen Reseptor Modulators*

SCID : *Severe Combined Immunodeficien*

StAR : *Steroidogenic Acute Regulatory Protein*

Th : T-helper

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TX2 : Tromboxan

USG : Utrasonografi

TA : Trans Abdominal

TV : Trans Vaginal

TR : Trans Rektal

VAS : Visual Analog Scale

VGEF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

SIMBOL

α	: alpha
β	: beta
:	: titik dua
;	: titik koma
.	: titik
,	: koma
-	: sampai
%	: persen
<	: lebih kecil dari
>	: lebih besar dari
≤	: lebih kecil dari atau sama dengan
≥	: lebih besar dari atau sama dengan
/	: garis miring atau per
x	: kali
=	: sama dengan
-	: negatif
+	: positif
±	: kurang lebih
°	: derajat
()	: tanda kurung
%	: persen

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 1
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Endometriosis merupakan suatu kelainan ginekologik yang sering diderita perempuan usia reproduksi. Angka kejadiannya diperkirakan mencapai 4% dari seluruh populasi perempuan usia subur, dan kejadian tersebut ditemukan pada 20-40% perempuan yang memiliki masalah infertilitas (Shen *et al.,*2011). Pada wanita usia reproduksi, endometriosis seringkali menyebabkan gangguan yang bersifat siklik atau terus menerus, seperti nyeri haid dan nyeri pelvic menahun. Pada endometriosis, makrofag mensekresikan sitokin proinflamasi, seperti IL-1β dan TNF-α yang menginduksi secara berlebihan kadar COX-2 pada sel stroma endometriosis dan selanjutnya COX-2 akan menyebabkan peningkatan konsentrasi PGE2 di cairan peritoneal yang mengaktifkan serabut nyeri (Wu, *et al.,*2010). TNF-α akan menstimulasi ekspresi prostaglandin synthase-2 yang akan meningkatkan produksi PGE2 dan PGF2α. Produksi prostaglandin E2 secara berlebihan pada inflamasi melalui rangkaian kerja berbagai enzim merupakan salah satu konsep penting dalam pathogenesis nyeri pada endometriosis (Bulun, 2009).

Penatalaksanaan endometriosis dapat dilakukan secara medis maupun pembedahan. Terapi medis tanpa pembedahan pada endometriosis biasanya dimaksudkan untuk mengatasi rasa nyeri dengan berbagai mekanisme termasuk meminimalkan inflamasi, menekan produksi hormon ovarium dan menghambat sintesis estradiol (Giudice, 2010). Bentuk terapi medis pada endometrosis termasuk dengan penggunaan analgesik seperti obat Non-Steroid Anti Inflamasi (NSAID) dan terapi hormon (Farrel and Gara, 2012). Kemajuan besar telah dicapai dalam

penanganan medis pada endometriosis meliputi agonis GnRH, antiagonis GnRH, antagonis progesteron dan beberapa progestin. Meskipun efektif pada banyak wanita, kendala biaya dan efek samping yang ditimbulkan serta penggunaan dalam jangka panjang harus diperhatikan secara ketat dalam indikasi pemakaiannya (Jacoeb and Hadisaputra, 2009). Efek samping yang sering dikeluhkan pada pengobatan endometriosis ini antara lain peningkatan berat badan, jerawat, nyeri kepala, dan penurunan kepadatan tulang, hal ini yang menyebabkan kejadian putus pengobatan (41%) pada penderita endometriosis.

Endometriosis merupakan penyakit yang sangat tergantung dengan estrogen, maka salah satu indikasi penanganannya adalah dengan penurunan kadar estrogen yang dapat dilakukan dengan cara pengobatan menggunakan agonis hormon pelepasan gonadotropin (agonis-GnRH) dan progestin selektif. Salah satu bentuk *agonis-GnRH* adalah Leuprolide Acetat, obat ini digunakan sebagai salah satu pilihan dalam penanganan nyeri pada endometriosis. Pada pemakaian *agonis-GnRH*, hasil utama yang dipertimbangkan adalah laju kekambuhan endometriosis, keamanan dan daya guna pengobatan jangka panjang (Jacoeb and Hadisaputra, ,2009). Sedangkan penggunaan progestin selektif seperti Dienogest memiliki kemampuan untuk menghambat enzim aromatase dan ekspresi COX-2 dan produksi PGE2 pada kultur sel endometriosis (Soares dkk, 2012). *Dienogest* mengurangi lesi endometriosis dengan menciptakan lingkungan progestogenik lokal dan menekan tingkat estrogen sistemik. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa masing-masing obat tersebut setara dalam pengobatan endometriosis, sehingga pemilihan jenis obat yang digunakan harus mempertimbangkan preferensi pasien, efek samping dan ketersediaan obat tersebut dipasaran.

Mengingat proses inflamasi memerankan perkembangan penyakit endometriosis maka obat anti inflamasi menjadi sangat penting. Oleh karena itu, dibutuhkan solusi pengobatan yang dapat secara efisien mengurangi lesi endometriosis dengan meminimalkan kejadian efek samping dan tidak mengganggu kesuburan wanita (Sutrisno *et al.,* 2014). Salah satu bentuk penatalaksanaan endometriosis yang berkhasiat dan efektif pemakaiannya serta relatif dapat dikomsumsi dalam jangka waktu lama adalah dengan menggunakan estrogen alami. Genistein merupakan isoflavon alami yang ditemukan terutama pada tanaman polong khususnya pada kedelai sebagai produk dengan konsentrasi genistein yang tinggi. Genestein menghambat produksi oksida nitrat dan prostaglandin pada konsentrasi non-toksik, dengan menghambat induksi NO dan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2) (Jeong, *et al.,* 2014).

Genistein merupakan *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs) karena dapat bersifat sebagai antiestrogenik pada jaringan reproduksi seperti pada kelenjar mammae, ovarium, endometrium dan prostat (Runge 2009). Ketika kadar estrogen tinggi seperti pada endometriosis, genistein akan berikatan dengan reseptor estrogen. Hal ini lah yang akan menyebabkan ikatan estradiol terhambat sehingga menyebabkan efek antiestrogenik. Genistein sebagai antiestrogenik yang afinitasnya lebih tinggi 20-30 kali lipat pada RE-β tidak mengadopsi konfirmasi agonis tetapi bersifat antagonis (Pilsakova, *et al.,* 2010).

Endometriosis hanya terjadi secara alami pada manusia, jaringan endometrium manusia telah berhasil ditransplantasikan pada tikus imunodefisiensi berat atau *Severe Combined Immunodeficient* (SCID) menggunakan teknik injeksi intraperitoneal secara blind, dengan angka keberhasilan 96,5%. Model ini dapat

digunakan untuk penelitian efek farmakologi dan modulasi hormonal pada endometriosis tanpa disertai perbedaan phylogenik (Awwad *et al*.,1999)

Berdasarkan uraian tersebut diatas maka dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE2 pada mencit model endometriosis.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana perbandingan efek Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE2 pada mencit model endometriosis?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membandingkan pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE2 pada mencit model endometriosis

1.3.2 Tujuan khusus

1. Menganalisis pengaruh pemberian Genistein berbagai dosis terhadap ekspresi COX-2 pada Mencit Model Endometriosis
2. Menganalisis pengaruh pemberian Genistein berbagai dosis terhadap ekspresi PGE2 pada Mencit Model Endometriosis
3. Menganalisis perbedaan pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap ekspresi COX-2 pada Mencit Model Endometriosis.
4. Menganalisis perbedaan pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap ekspresi PGE2 pada Mencit Model Endometriosis.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis/Akademis

Dapat digunakan sebagai informasi ilmiah dalam bidang pendidikan atau sebagai bahan dasar untuk penelitian lebih lanjut terkait medikamentosa untuk endometriosis.

1.4.2 Manfaat Klinis/Praktis

1. Dapat menjadikan pilihan pengobatan dan pencegahan non medis dengan menggunakan herbal pada endometriosis
2. Memberikan prospek yang lebih baik terhadap pengembangan budidaya tanaman obat tradisional di Indonesia.

1.4.3 Manfaat Masyarakat

1. Hasil penelitian ini dapat dijadikan sumber informasi dan atau rujukan dalam pilihan pengobatan endometriosis
2. Menghasilkan pengetahuan tentang perbandingan efek dari pengobatan endometriosis.

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Endometriosis

2.1.1 Definisi

Merupakan jaringan (sel-sel kelenjar dan stroma) abnormal yang menyerupai endometrium (*endometrium like tissue*) yang tumbuh disisi luar kavum uterus, dan memicu reaksi peradangan menahun (Jocoeb and Hadisaputra, 2009).

Endometriosis secara klasik didefinisikan sebagai kehadiran kelenjar endometrium dan stroma ektopik, terutama pada panggul, peritoneum, ovarium dan septum rektovaginal. Mempengaruhi 6%-10% dari wanita usia reproduksi, dimana terdapat stigmata endometriosis termasuk dismenore, dispareunia, nyeri panggul kronis, perdarahan uterus yang tidak teratur dan atau infertilitas (Richard,*et al.,*2012).

Endometriosis merupakan penyakit jinak, namun memiliki karakteristik keganasan seperti pada kanker yaitu invasif, pertumbuhan sel yang tidak terkendali, kecenderungan metastasis, dan berulang kembali (Leyland, *et al.,* 2010). Kejadian endometriosis paling sering dijumpai didaerah pelvic, namun dapat juga melibatkan organ-organ disekitarnya antara lain ovarium, tuba falopi, kandung kemih, perineum, vulva dan juga recto sigmoid colon (Barrier, 2010).

2.1.2 Etiologi

Berbagai pendapat telah dikembangkan untuk menjelaskan etiologi endometriosis, tetapi hingga kini belum ada satupun teori tunggal yang dapat

mengungkapkan penyakit ini secara tuntas. Beberapa teori yang banyak dianut adalah sebagai berikut :

1. Teori Menstruasi Retrograde

Teori ini menyatakan bahwa darah mestruasi pada saat haid oleh sebab kontraksi rahim yang tidak normal masuk ke dalam kavum peritoneum melalui tuba. Fragmen endometrium tersebut kemudian terimplantasi ke dalam mesotelium.

Dalam teori mestruasi retrograde dan implantasi sel endometrium menjelaskan bahwa refluks melalui tuba falopi ke dalam rongga perut dengan implantasi berikutnya ke peritoneum (Farrel and Garad, 2012).

2. Teori Hormonal

Hormon estrogen secara definitif memiliki peran aktif dalam perkembangan penyakit endometriosis. Meskipun sebagaian besar hormone estrogen pada wanita adalah produk yang langsung dari ovarium, sejumlah jaringan perifer dikenal untuk membuat hormone estrogen melalui aromatase androgen dan adrenal ovary (Hoffman *et al.,* 2012). Perkembangan dan pertumbuhan endometriosis tergantung pada hormone estrogen, penyimpangan sintesa dan metabolisme estrogen telah diimplikasikan dalam pathogenesis endometriosis. Estrogen yang diproduksi lokal dalam jaringan endometriosis khususnya estradiol mempunyai dua peranan penting dalam proliferasi sel endometrial dan stimulator sitokin proinflamasi (Bulun *et al.*,2005;Giudice,2010).

3. Teori Metaplasia Coelomik

Lesi endometriosis terbentuk akibat metaplasia dari sel-sel epitel coelom yang berasal dari Muller. Sel-sel ini berdiferensiasi menjadi sel-sel peritoneal, pleura dan sel-sel pada permukaan ovarium. Teori ini sampai kini masih dianut oleh para ahli patologi (Taylor *et al.*,2011).

4. Hubungan Genetik (*Genetik Link*)

Dalam perkembangan endometriosis akan muncul lebih banyak pada wanita dengan hubungan genetik dan saudara kembar, hubungan genetik pada tingkat pertama relatif memiliki resiko lebih tinggi (7-10 kali lipat) dibandingkan dengan masyarakat umumnya. Hal ini kemungkinan beberapa keluarga membawa gen yang memungkinkan sel-sel abnormal untuk bertahan hidup dan tumbuh ektopik dalam rongga panggul (Farrel and Garad, 2012).

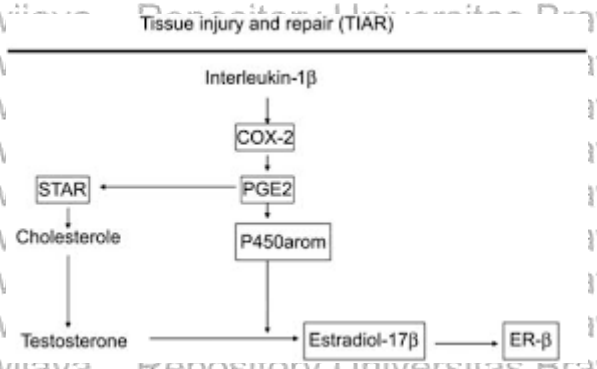
5. Faktor Imunologi

Sebuah penelitian menjelaskan bahwa endometriosis merupakan suatu penyakit yang hal ini terjadi dari suatu gangguan dalam respon kekebalan tubuh. Respon imun dan neuroendokrin yang tidak memadai secara signifikan dan ketidakseimbangan neuroendokrin dan sistem imun terlibat dalam patofisiologi endometriosis (Tariverdian *et al*., 2007).

Sel-sel kekebelan telah terbukti memaikan peran penting, seperti limfosit, Natural Killer Cell (NK Cell), makrofag, dan sel mast dalam lesi endometriosis (Osuga, 2011)

6. Faktor Endokrin

Pada endometriosis terdapat siklus umpan balik posistif estrogen dan pembentukkan prostaglandin. Pertumbuhan dan peradangan merupakan dua proses patologi dasar yang menimbulkan gejala utama endometriosis yaitu nyeri panggul kronis dan infertilitas. Estrogen meningkatkan pertumbuhan dan invasi jaringan endometriosis, sedangkan prostaglandin dan sitokin memediasi nyeri, peradangan dan infertilitas (Bulun, *et al.,* 2005). Estradiol diproduksi lokal dalam jaringan endometriosis baik pada masa ovulasi dan pasca menopause. prekursor androstenedion dari ovarium, adrenal, atau dikonversi menjadi estron dan direduksi menjadi estradiol dijaringan perifer dan implant endometriosis. Jaringan endometriosis mensintesis androstenedion dari kolesterol melalui aktivitas StAR dan enzim steroidogenik lainnya. Estradiol langsung menginduksi cyclooxygenase-2 (COX-2), yang menimbulkan peningkatan konsentrasi prostaglandin E2 (PGE2). Interlukin 1-β (IL1-β), VEGF, dan PGE2 juga merupakan induser ampuh COX-2. PGE2 pada gilirannya merupakan stimulator StAR dan aromatase dalam sel stroma endometriosis. Hal ini menetapkan lingkaran umpan balik positif yang mendukung pembentukan estrogen terus menerus dan prostaglandin pada endometriosis (Bulun, *et al.,* 2005).



Gambar 2.1 : *Tissue Injury and Repair* dalam kaitan peningkatan reseptor estrogen (Bulun,et al., 2005)

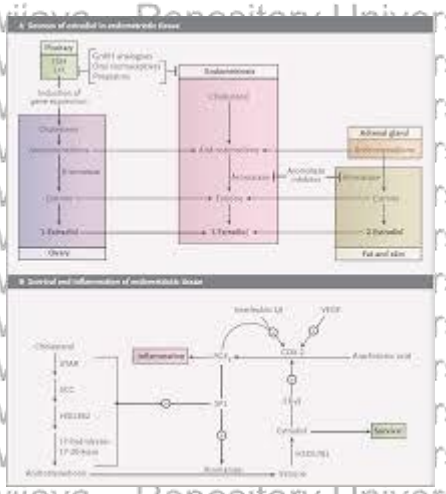
2.1.3 Prevalensi

Endometriosis sering ditemukan pada remaja dan usia reproduksi dari seluruh etnis dan kelompok masyarakat. Diantara 176 juta wanita diseluruh dunia, satu dari 10 wanita usia reproduksi (15-49 tahun) menderita endometriosis. Angka ini meliputi 50-70% dari wanita dengan keluhan nyeri panggul kronis dan 38% wanita tidak susbur (Farrell and Garad, 2012)

2.1.4 Patofisiologi

Terdapat beberapa respon yang terjadi diantaranya respon inflamasi, survival sel, proliferasi, migrasi, adhesi dan invasi, serta neoangiogenesis. Pada gambaran lesi endometriosis, pertumbuhan dan inflamasi memiliki kaitan satu dengan yang lainnya (Giudice, 2010; Soares, *et al.*, 2012). Pertumbuhan endometrium ektopik akan merangsang produksi makrofag berlebihan, produk sitokin proinflamsi dan faktor pertumbuhan dalam cairan peritoneal, sehingga menyebabkan pertumbuhan yang lebih lanjut (Soares, *et al.*, 2012).

Estradiol dependen dapat menstimulasi produksi PGE2 dari lesi endometriosis yang mengaktifkan serabut nyeri, memperkuat invasi neuronal lesi dengan menstimulasi produksi NGF (*Nerveus Growth Factor*) dan neutropin lainnya dan mendorong tumbuhnya nosiseptor yang berkontribusi terhadap nyeri inflamasi persisten serta menghambat apoptosis neuronal. Infertilitas merupakan hasil efek toksik proses inflamasi pada gamet dan embrio, fungsi fimbrie yang menurun serta lapisan endometrium yang resisten terhadap hormone progesterone dan karena endometrium kurang baik kondisinya untuk implantasi embrio. Bahan kimiawi yang mengganggu endokrin dapat menjadi penyebab terjadinya resistensi terhadap progesterone dan disfungsi system imun (Giudice, 2010)



Gambar 2.2 : Proses produksi estrogen lokal pada endometriosis dan perannya terhadap proses inflamasi (Giudice,2010).

2.1.5 Gejala Klinis

Nyeri merupakan ciri utama pada endometriosis dan tidak ada hubungan dengan berat penyakit, tetapi berhubungan dengan tempat jaringan endometrium dan dari gangguan saraf yang mempengaruhi

aktivitas neuron disumsum tulang belakang dan otak. Sekitar 75% wanita akan dismenorea dan atau nyeri panggul kronis (CPP), dan rasa nyeri dapat bervariasi dari akut/parah dan melemah. Nyeri dapat terjadi pada berbagai waktu seperti segera, sebelum dan selama periode ovulasi, saat berhubungan seksual, buang air besar, buang angin, atau saat buang air kecil, dan mungkin lokasi nyeri berada diperut, punggung dan atau daerah panggul, paha atau kaki. Tidak ada hubungan antara lesi dan CCP (Farrel and Garad, 2012)

1. Nyeri saat mestruasi (disminorea)

Disebabkan oleh peradangan akibat sekresi sitokin dalam rongga peritoneum, akibat perdarahan lokal pada sarang endometriosis dan adanya infiltrasi endometriosis ke dalam syaraf pada rongga panggul.

2. Nyeri pelvis

Dihubungkan dengan adanya adhesi dan ditemukannya jaringan parut pada pelvis. Penyebab pasti nyeri masih belum jelas, namun, adanya substansi sitokin dan prostaglandin yang dihasilkan oleh implant endometriotik ke cairan peritoneal merupakan salah satu penyebabnya (Giudice, 2010)

3. Dispareunia

Paling sering timbul terutama bila endometriosis sudah tumbuh disekitar cavum douglasi dan ligamentum sakrouterina. Sering kali juga terjadi perlengketan sehingga uterus dalam posisi retrofleksi.

4. Diskezia

Sakit pada saat buang air besar, keluhan ini timbul bila endometriosis sudah tumbuh dalam dinding rekto sigmoid dan terjadi hematokezia pada saat siklus haid.

5. Infertilitas

Infertilitas yang dialami oleh wanita dengan endometriosis disebabkan proses peradangan yang mempengaruhi ovulasi dan implantasi (Maybin *et al.*, 2010). Perlengketan pada ruang pelvis karena endometriosis dapat mengganggu pelepasan oosit dari ovarium atau menghambat perjalanan ovum untuk bertemu dengan sperma (Luthan dkk., 2011)

2.1.6 Diagnosa

Metode utama untuk mendiagnosa endometriosis saat ini adalah dengan Laparaskopi yang sering juga disertai pengambilan biopsi untuk diagnosis histologis (Cureton, 2013)

Untuk menentukan diagnosis endometriosis, ada beberapa metode yang digunakan sebagai berikut :

1. Diagnosis Klinis

Pemeriksaan fisik pada endometriosis dimulai dengan melakukan inspeksi pada vagina menggunakan spekulum, yang dilanjutkan dengan pemeriksaan bimanual dan palpasi rektovaginal.pemeriksaan bimanual dapat menilai ukuran, posisi dan mobilitas dari uterus dan pemeriksaan rektovaginal diperlukan untuk mempalpasi ligamentum sakro uterina dan septum rekto vaginal untuk mencari ada atau tidaknya nodul endometriosis. Pemeriksaan saat haid dapat meningkatkan peluang

mendeteksi nodul endometriosis dan juga menilai nyeri (Djuwantono *et al.*,2012)

2. Diagnosis Pencintraan

Pencitraan berguna untuk memeriksa penderita endometriosis. Ultrasonografi (USG) pelvik secara trans abdominal (USG-TA), trans vaginal (USG-TV) atau secara trans rektal (USG-TR), dan pencitraan resonansi magnetic atau *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) telah digunakan sebagai cara non-invasif untuk mengenali implant endometriosis yang besar dan endometrioma sebagai lesi mandiri, tetapi cara-cara ini tidak cukup menolong dalam penilaian luasnya endometriosis (Jacoeb and Hadisaputra, 2009). Dalam menegakkan diagnosis endometriosis ultrasonografi transvaginal lebih disukai daripada MRI karena biayanya lebih hemat (Giudice, 2010)

3. Diagnosis Laparoskopik

Digunakan untuk memastikan diagnosis endometriosis. Biopsi endometrium dari tempat implantasi tertentu akan memperlihatkan gambaran patologi yang khas. Meskipun tidak diperlukan untuk melengkapi diagnosis, tindakan ini berguna untuk terapi berikutnya dan menentukan prognosis secara keseluruhan. Kadang pemastian diagnosis dan derajat penyakit dapat dilakukan selama laparoskopi misalnya untuk kehamilan ektopik yang rupture (Benson and Pernoll, 2009)

4. Diagnostik Laboratorik

Pemeriksaan ini dilakukan dengan menggunakan biomarker dalam menegakkan penyakit endometriosis yaitu dengan CA-125. Konsep

yang mendasari penggunaan CA-125 adalah karena antigen permukaan sel yang dijumpai pada turunan epitel selomik dan muller. Jaringan selomik dan muller adalah endometrium, endoservik, tuba fallopi, peritoneum, pleura dan perikardium. Peningkatan CA-125 sesuai dengan stadium endometriosis (Djuwantono *et al.,* 2012). Bila didapati CA> 65 mIU/ml praoperatif menunjukkan derajat beratnya endometriosis (Anwar *et al*., 2011)

2.1.7 Manajemen Penatalaksanaan

Karena sifat endometriosis heterogen maka manajemen penyakit ini harus sangat individual dan ditujukan untuk mengurangi gejala-gejala dan menghentikan endometriosis, terapi medis mungkin termasuk penggunaan analgesik seperti obat non-steroid anti inflamasi (NSAID) dan terapi hormone (Farrel and Garad, 2012)

1. Terapi Medikamentosa

Pengobatan dengan medikamentosa bertujuan untuk mengurangi rasa sakit dan meningkatkan kemungkinan kehamilan (fertilitas). Sering kali tujuan terapi medikamentosa tidak untuk menghapus implant, tetapi hanya untuk menekan perkembangannya. Kemajuan besar telah dicapai dalam penanganan medicinal, meliputi agonis GnRH, antiagonis GnRH, penghambat aromatase, antagonis progesterone, modulator selektif steroid seks, antiangiogenesis dan imunoterapi dengan vaksin. Mengingat kendala biaya, klinisi harus menetapkan secara ketat indikasi pemakaiannya (Jacoeb, 2009).

Tabel 2.1 : Cara kerja dan jenis sediaan hormonal dan antihormonal pada penanganan endometriosis (Jocoeb and Hadisaputra, 2009).

Tujuan	Jenis Obat
- Menurunkan sekresi estrogen oleh ovarium	- Agonis GnRH, antagonis GnRH, kontrasepsi oral, danazo, medroksi-progesteron asetat (MPA), didrogesteron, nomogestrol.
- Menurunkan sekresi estrogen dari sumber ekstragonad dan menghambat proses intrakrin sel endometriosis	- Penghambat aromatase, anastrazol, letrozol
- Melawan khasiat estrogen terhadap susukan endometriosis	- Kontrasepsi oral, danazol, medroksi-progesteron asetat (MPA), didrogesteron, nomogestrel.

2. Terapi Bedah

Bertujuan untuk menangani efek endometriosis itu sendiri, seperti nyeri panggul, subfertilitas, dan kista. Pembedahan bertujuan menghilangkan gejala, meningkatkan kesuburan, menghilangkan bintik-bintik dan kista endometriosis, serta menahan laju kekambuhan (Luthan dkk., 2011) Tindakan operasi dibagi menjadi dua, yaitu tindakan operasi konservatif dan operasi definitif (Leyland *et al.*,2010)

1. Terapi operasi konservatif
   a. Tindakan operasi laparaskopi atau laparatomi
   b. Tetap memberikan kesempatan untuk hamil
2. Terapi operasi definitif
   a. Pada kondisi berat dilakukan histerektomi, bilateral salpingo oopherektomi atau bahkan mengangkat omentum
   b. Tidak ada kemungkinan untuk hamil kembali.

Tabel 2.2 :Perbandingan antara penanganan endometriosis secara pembedahan dan medicinal (Jocoeb and Hadisaputra, 2009).

Cara Penanganan	Keuntungan	Kerugian
Pembedahan	• Menguntungkan untuk infertilitas • Hasil jangka-panjang lebih baik • Diagnosis definitif • Pilihan untuk penanganan definitif	• Invasif • Biaya lebih besar • Rawat inap
Medisinal	• Mengurangi biaya awal • Penanganan empiric • Efektif untuk menghilangkan nyeri • Rawat jalan	• Ada pengaruh sampingan • Kemungkinan fertilitas rendah

2.2 Cyclooxygenase-2 (COX-2)

2.2.1 Definisi

Adalah enzim yang berperan dalam sintesis prostanoid dengan mengkonversi asam arakhidonat menjadi PGG2 (Prostaglandin G2). Produk akhir dari COX-2 inilah yang berkonstribusi terhadap berbagai faktor biologis dalam memicu pertumbuhan tumor. Cyclooxygenase-2 merupakan enzim dalam bentuk indusibel, dan tidak terdeteksi dalam semua jaringan normal, akan tetapi COX-2 terinduksi oleh berbagai macam inflamasi dan stimulasi mitogenik (Nilanjan Ghosh, 2010).

Pada endometrioma peningkatan ekspresi COX-2 banyak dipengaruhi oleh hormonal maupun sitokin pro inflamasi. Regulasi COX-2 juga meningkat pada beberapa kanker, kondisi premaligna dan berperan dalam proses transformasi kearah keganasan didalam ovarium, yang diperkirakan memberikan kontribusi terhadap proliferasi sel, survival dan

angiogenesis (Nezhat, 2008). Aktivasi COX-2 dipercaya mengaktivasi kolagenase, proteolisis dan menurunkan sintesis komponen lapisan dasar membrane digranulosa dan sel epithelial permukaan ovarium melalui prostaglandin (Ceyhan *et al*, 2008)

2.2.2 Peran Cyclooxygenases dan Inflamasi

Peningkatan ekspresi COX-2 pada provokasi sel-sel inflamasi dan pada jaringan yang meradang, menggambarkan bahwa penghambat COX-1 berasal dari prostanoids. Pada studi kasus radang telinga menunjukkan bahwa COX-1 dan COX-2 dapat menyebabkan respon inflamasi dan isoform yang bertanggung jawab untuk proses peradangan yang tergantung pada stimulasi inflamasi dan tingkat relatif setiap isoform dalam jaringan target (Mardini, 2001).

COX-2 akan menginduksi terjadinya angiogenesis melalui 3 produk dari metabolisme arakhidonik, disamping itu COX-2 juga berperan sebagai immunosuppressant yang menyebabkan penurunan aktivitas sitotoksik dari NK sel, COX-2 juga menghambat terjadinya apoptosis, serta meningkatkan aktivitas dari MMPs sehingga resiko tumorigenesis meningkat dan menyebabkan invasi serta metastasis tumor.

2.2.3 Mekanise Kerja

Interleukin-1β, T-helper (Th-1) diketahui dapat meningkatkan regulasi COX-2 dalam jaringan endometriosis ektopik. Pada endometriosis menunjukkan COX-2 mRNA lebih tinggi, yang kemungkinan mengakibatkan peningkatan terus menerus COX-2 dan produksi PGE-2. (Nezhat, 2008). IL-17A juga dilaporkan menginduksi ekspresi COX-2 pada jaringan endometriosis. IL-17A bersinergi dengan TNFα menginduksi sekresi IL-8.

(Hirata., *et al,* 2007). Indikasi peningkatan aktivasi COX-2 oleh estradiol juga tampak. Hal ini ditunjukkan bahwa estradiol (E2), secara langsung maupun tak langsung, melalui sitokin menginduksi aktivasi COX-2 yang akan meningkatkan produksi PGE-2 (prostaglandin E2). Sementara PGE2 juga diketahui sebagai stimulator aromatase dan StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory Protein*) yang poten didalam sel endometriosis (Bulun, 2005, Ceyhan, 2008).

2.2.4 Ekspresi COX-2 pada endometriosis

Sintesis estrogen pada endometriosis dipengaruhi oleh enzim aromatase. Aktivitas aromatase sendiri dipengaruhi oleh kerja enzim siklooksigenase-2 (COX-2). Dalam sebuah penelitian, ditemukan bahwa ekspresi enzim aromatase pada jaringan endometrium ektopik penderita endometriosis lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok control. Demikian juga ekspresi enzim aromatase pada implant endometriosis, terutama pada lesi berwarna merah. Mengingat enzim COX-2 merupakan enzim utama dalam sintesis prostaglandin, hal ini dipandang sebagai suatu mekanisme terbentuknya lingkaran proses timbulnya nyeri pada endometriosis.

2.3 Prostaglandin E (PGE2)

2.3.1 Definisi

Prostaglandin adalah komponen mirip hormon yang berfungsi sebagai mediator dari berbagai respon fisiologis seperti inflamasi, kontraksi otot, dilatasi pembuluh darah dan agregasi platelet. Prostaglandin terbentuk dari asam lemak tak jenuh yang disintesis oleh seluruh sel yang ada dalam tubuh (Fortier dkk, 2008). Prostaglandin menyebabkan respon inflamsi yang

akan menimbulkan spasme otot uterus dan keluhan sistemik seperti mual, muntah, perut kembung dan sakit kepala. PGF2α merupakan hasil metabolisme dari asam arakhidonat oleh enzim siklooksigenase, menyebabkan vasokontriksi dan kontraksi dari miometrium, yang menyebabkan iskemik dan rasa nyeri.

Prostaglandin termasuk dalam kelompok eicosanoid, salah satu kelompok lipid yang termasuk dalam asam lemak tak jenuh melalui kerja enzim. Eicosanoid adalah kelompok molekul pemberi sinyal yang terlibat dalam sejumlah jalur regulasi dan kondisi patologis, seperti respon imun dan inflamasi, anafilaksis, vasodilatasi dan vasokontriksi, pembekuan darah, stimulasi ujung saraf perifer dan perkembangan penyakit auto imun. (Murakami, *et al*, 2002)

PGE2 adalah eicosanoid dengan berbagai fungsi fisiologi dan patologi yang banyak terlibat dalam perkembangan endometriosis. Dari bukti-bukti yang ada menunjukkan bahwa selama endometriosis PGE2 mengatur banyak proses patofisiologis termasuk proliferasi sel, pencegahan apoptosis, penekanan kekebalan dan angiogenesis. Pada studi terbaru menunjukkan bahwa angiogenesis memainkan peran penting dalam pertumbuhan dan kelangsungan hidup lesi endometriosis.(Akiko Numao*, et al,* 2010)

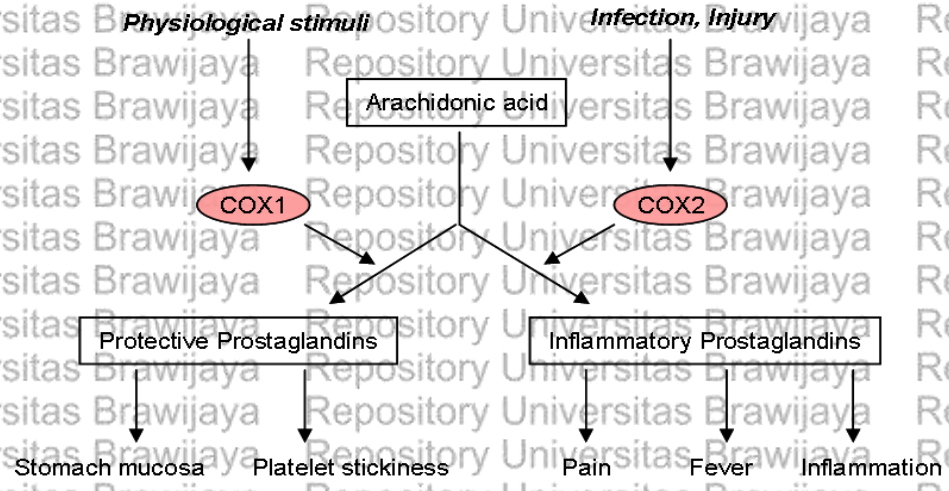
2.3.2 Sintesis Prostaglandin

Dimulai dengan adanya rangsangan baik secara fisik, kimiawi maupun termik seperti terbakar, endotoksin, hipertonik dan hipotonik infus, thrombus, katekolamin, bradikinin, angiotensin, dan hormon steroid dapat merusak membrane sel sehingga memicu pembentukkan asam arakhidonat dari fosfolipid yang terdapat pada membrane sel oleh enzim phospholipase

(*cytosolic PLA2*). Asam arakidonat ini selanjutnya akan memasuki lintasan metabolisme siklooksigenase akan dikatalisir oleh enzim cyclooxygenase (COX) yang dikenal juga dengan prostaglandin H sintase (PGHS) atau *Prostaglandin Endoperoksidase Sintase* (PES) yang mempunyai dua aktivitas yaitu siklooksigenase dan peroksidase. Dimana siklooksigenase ini mempunyai dua isoenzim yang dikenal dengan COX-1 dan COX-2. COX-1 dapat merangsang pembentukkan prostasiklin sedangkan COX-2 merupakan respon dari inflamsi, growth faktors, sitokin dan juga endotoksin. Produk yang pertama sekali dihasilkan reaksi enzimatis ini adalah Prostaglandin G2 (PGG2) kemudian akan dimetabolisme menjadi prostaglandin H2 (PGH2), yang merupakan precursor terbentuknya senyawa prostanoid seperti Prostaglandin D (PGD2), Prostaglandin E (PGE2). Prostaglandin F (PGF2), Prostasiklin (PGI2) dan Tromboxan (TX2).

2.3.3 Prostaglandin E2 dan Inflamasi

Dalam kondisi fisiologis, PGE2 merupakan mediator penting dari banyak fungsi biologis, seperti regulasi respon imun, tekanan darah, intergritas gastrointestinal dan kesuburan. Regulasi dan degradasi sintesis PGE2 banyak dikaitkan dengan berbagai kondisi patologis (Legler, 2010). Dalam proses peradangan PGE2 terlibat pada semua proses yang mengarah ke tanda-tanda klasik dari peradangan seperti : kemerahan, pembengkakan dan nyeri. Kemerahan dan odeme merupakan hasil dari peningkatan aliran darah ke jaringan yang meradang melalui PGE2 dan dilatasi arteri serta peningkatan permeabilitas mikrovaskuler (Funk, 2001)



Gambar 2.3 : Peran Prostaglandin pada proses inflamasi (Funk,2011)

2.3.4 Ekspresi PGE2 pada endometriosis

Terdapat peningkatan ekspresi kadar prostaglandin, estradiol dan progesterone pada lesi endometriosis dibandingkan endometrium perempuan normal. Aktivitas enzim COX-2, aromatase dan produksi prostaglandin E2 (PGE2) lebih rendah pada endometrium normal dibandingkan endometrium penderita endometriosis. Pada endometrium penderita endometriosis, terdapat peningkatan aktivitas COX-2 dan aromatase, sehingga menghambat teraktifasinya enzim HSD17β2 (Hydroxysteroid Dehydrogenase 2). Kondisi ini menyebabkan kadar estradiol local semakin meningkat. Peningkatan kadar estrogen menyebabkan lesi endometriosis dapat terus tumbuh dan berkembang sedangkan pengeluaran prostaglandin dan sitokin merangsang inflamasi, aktivasi serta invasi serat saraf disekitar lesi yang berakibat timbul rasa nyeri yang hebat yang bersifat kronis.

Prostaglandin E2 dan F2α diketahui diproduksi secara berlebihan diuterus dan jaringan endometrium penderita endometriosis. Sifat vasokonstriktif dan kemampuan prostaglandin F2α untuk menimbulkan kontraksi berperan dalam timbulnya dismenore. Lebih jauh prostaglandin E2 mempunyai sifat dapat merangsang nyeri secara langsung. Dengan melihat karakteristik tersebut, dapat dipahami bahwa peningkatan kedua zat tersebut akan merangsang timbulnya nyeri pada endometriosis (Bulun, 2012).

Produksi prostaglandin E2 secara berlebihan pada inflamasi melalui rangkaian kerja berbagai enzim merupakan salah satu konsep penting dalam pathogenesis nyeri. Sel stroma lesi endometriosis menghasilkan prostaglandin E2 dalam jumlah banyak, yang selanjutnya menginduksi sistesis estradiol lokal dan nyeri panggul. Ekspresi enzim COX-2 meningkat pada lesi endometriosis dibandingkan dengan ekspresi serupa pada sel stroma endometrium normal. Keterpaduan kedua enzim tersebut menyebabkan peningkatan sintesis prostaglandin E2 pada lesi endometriosis. (Bulun, 2009)

2.4 Fitoestrogen

2.4.1 Definisi

Fito = tanaman, estrogen = hormon wanita. Jadi fitoestrogen adalah senyawa kimia yang dapat bekerja seperti estrogen (karena mempunyai cincin fenol), yang diperoleh dari proses pencernaan kita (proses fermentasi serat tanaman oleh bakteri di usus besar) setelah makan tumbuhan tertentu (buah, sayur, biji-bijian) (Darmoutomo, 2009).

Ada 3 jenis utama fitoestrogen yaitu isoflavon, coumestan, dan lignan. Isoflavon merupakan nama umum, terdiri dari lebih dari 1000 jenis. Genistein dan daidzein adalah fitoestrogen yang lebih sering diteliti karena kandungan zat estrogenik (zat yang bekerja seperti estrogen)-nya paling besar. Genistein dan deidzein terdapat dalam kedelai, kacang polong, semanggi dan biji-bijian. Kandungan fitoestrogen tergantung cara memproses kedelainya. Kadar phytoestrogen dari prodak turunan biji kedelai (susu, tepung kedelai) lebih rendah dibandingkan kedelai murni (Darmoutomo, 2009). Phytoestrogen memiliki efek estrogenik dan anti estrogenik pada dosis tertentu, dengan beberapa manfaat yang berkaitan dengan penyakit termasuk kanker (mampu mencegah pertumbuhan dan perkembangan sel kanker (Sutrisno, 2010).

2.4.2 Mekanisme Phytoestrogen

Terdapat 2 mekanisme kerja dari fitoestrogen adalah melalui mekanisme genomik melalui aktivasi atau inaktivasi reseptor estrogen dan mekanisme non genomik tanpa melewati reseptor.

1. Mekanisme genomic

   Melalui mekanisme genomik fitoestrogen memiliki dua cara yaitu isoflavon langsung berikatan dengan reseptor estrogen (*direct genomic*) berupa transkripsi gen sehingga dapat menimbulkan efek seperti estrogen sedangkan mekanisme yang kedua yaitu melalui mekanisme secara tidak langsung *(indirect genomic)* dengan mempengaruhi kadar estrogen endogen dalam sirkulasi (*mekanisme kompetitif inhibitor*) (Sutrisno, 2010).

2. Mekanisme non genomik

Mekanisme non genomik, *phytoestrogen* yaitu genistein bekerja sebagai tiroksin kinase inhibitor, inhibisi topoisomerase II atau bisa melalui reseptor membran yang diduga sebagai molekul estrogen (Sutrisno, 2010). Prinsip reaksi dasar ikatan dengan reseptor dan DNA adalah genistein mengadakan difusi melalui membran sel. Dalam sel target berikatan dengan reseptor protein. Interaksi hormon reseptor kompleks dengan sekuen spesifik dari DNA (ERE) Yang berlokasi didaerah promoter gen beraksi sebagai faktor transkripsi. Tekadang terjadi pengaktifan transkripsi dari gen, sintesis mRNA, transport mRNA ke ribosom, sintesis protein dalam sitoplasma menghasilkan aktivitas seluler yang spesifik, ekspresi gen dalam sel yang menghasilkan respon (Gruber *et al.,* 2002: Sutrisno, 2010).

2.5 Genistein

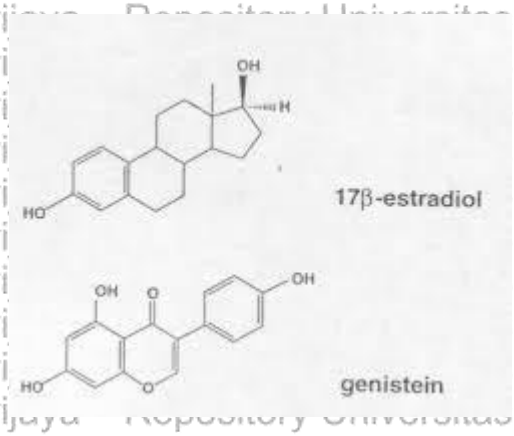
2.5.1 Definisi

Genistein merupakan salah satu isoflavon yang sering dipelajari, umumnya dikenal dengan sebutan *phytoestrogen.* Genistein dapat bersifat estrogenik maupun antiestrogenik dan berhubungan dengan masalah reproduksi (Eustache *et al*., 2009). Genistein bekerja sebagai *selective estrogen reseptor modulators* (SERMs), memiliki efek anti estrogenik pada jaringan reproduksi (kelenjar mammae, ovarium, endometrium dan prostat) dan efek estrogenik pada jaringan tertentu seperti tulang (Mucthaidi dkk., 2000 Soehartono dkk., 2000). Pada kedelai Genistein dijumpai sekitar 60% dari isoflavon, sedangkan 30% Daidzein, dan 10% Glycetein (Lee *et al.,* 2012).

Gambar 2.4 : Tanaman kedelai sumber dari Genistein (Wulan, 2010)

2.5.2 Struktur Genistein

Genistein adalah molekul kecil yang ditemukan dalam produk kedelai (Janet *et al*., 2010). Dalam tubuh genistein mempunyai struktur mirip estrogen, memiliki jalur mekanisme serupa dengan estrogen. Untuk menimbulkan respon biologis genistein berikatan dengan RE-α dan RE-β. *Genistein* mempunyai afinitas yang lebih besar terhadap RE-β dibandingan dengan RE-α. Sifat SERM pada *genistein* memberikan efek agonis dan antagonis, hal ini dipengaruhi pula oleh kadar estrogen endogen (Patisaul and Jefferson, 2010., Matsukura *et al*., 2011.,). Genistein mampu meningkatkan kadar RE-β pada berbagai usia, baik dosis rendah atau tinggi (Handayani dkk., 2010).



Gambar 2.5 : Struktur Genistein dan 17β-estradiol (Pavese *et al.*, 2010)

Struktur, ikatan dan aktivas genistein menyerupai 17-β-estradiol. Kemiripan antara estrogen dan genistein terletak pada dua gugus –OH atau hidroksil (C4 dan C7), berjarak 11,0 – 11,5 A yang intinya menyerupai inti estrogen. Gugus hidroksil C7 diperlukan genistein untuk berikatan dengan reseptor estrogen. Selain itu, jarak antara C4 dan C7 disepakati sebagai struktur pokok suatu substrat agar mempunyai efek estrogenik yang memiliki aftinasi tertentu terhadap reseptor estrogen (Pavese, *et al*., 2010).

2.5.3 Metabolisme Genistein

Genistein diidentifikasi memiliki kemiripan dengan struktur estrogen dan disebut sebagai *phytoestrogen.* Struktur dasar senyawa isoflavon adalah inti sel flavon, yang terdiri dari dua cincin benzene dihubungkan melalui cincin pyrane heterosiklik. Kesamaan struktur dengan 17β-estradiol, genistein telah terbukti bersaing dengan 17β-estradiol pada reseptor estrogen. (Kuiper.,1999) melaporkan bahwa afinitas pengikatan genistein untuk ER-α adalah 4%, dan untuk ER- β adalah -7%, dibandingkan dengan estradiol. Interaksi dengan reseptor estrogen, genistein dapat mengikat lebih kuat sehingga mempengaruhi metabolisme estrogen, berperan secara potensial

dalam pencegahan kanker yang berhubungan dengan hormone (BanerJee *et al*., 200). Setelah dikonsumsi, genistein bersama dengan isoflavon lain terkonjugasi dengan glikosida dan dimetabolisme oleh enzim usus. Genistein pada manusia dimetabolisme untuk *dihydrogenistein* dan 6'*-hydroksis-O-desmethylangolensin*. Genistein dan dimetabolismenya telah terdeteksi dalam plasma, cairan prostat, payudara dan aspirasi cairan kista, urin, dan feses.

2.5.4 Mekanisme Kerja Genistein

2.5.4.1 Interaksi Dengan Reseptor Estrogen

Genisten berinteraksi dengan berikatan pada reseptor estrogen untuk mengaktivasi *Estrogen Responsive Elemen* (ERE) sehingga mempengaruhi proses transkripsi (Di *et al.,* 2008). Reseptor estrogen terdiri dari RE-α dan RE-β yang ditemukan pada beberapa organ tubuh dan terkadang kadarnya berlebihan. Ekspresi RE-α dan RE-β pada endometrioma endometriosis lebih tinggi dibandingkan endometrioum eutopik dengan RE- β lebih dominan daripada RE-α (Xue*, et al.,* 2007). Genistein yang berinteraksi dengan reseptor dan lebih selektif pada RE-β, merupakan natural SERMs (*Selective Estrogen Receptor Modulators*) yang memiliki efek estrogenik (bekerja seperti estrogen atau berlaku sebagai pengganti estrogen) pada tulang dan efek anti estrogenik (bekerja menekan fungsi estrogen) pada jaringan reproduksi (kelenjar mammae, ovarium, endometrium dan prostat) (Anggraini, dkk.,2008). SERMs dapat berfungsi sebagai antagonis murni bila bertindak melalui reseptor estrogen-β pada gen yang mengandung elemen-elemen reaksi estrogen tetapi bisa berfungsi sebagai agonis

parsial bila bertindak pada gen tersebut melalui reseptor estrogen-α (Hartmann and Ringgs,2003).

2.5.4.2 Interaksi Dengan Enzim

Genistein bekerja sebagai inhibitor berbagai enzim dalam intraseluler. Genistein menghambat aktivitas enzim yang memetabolisme estrogen yaitu inhibis aktivitas 5α-reduktase, yang mengkatalisis konversi testosterone menjadi 5α-dihidrotestosteron dan menginhibisi aromatase yang memediasi konversi testosterone menjadi estradiol (Pilsakova, *et al.,* 2010). Selain itu genistein menghambat 17β-hidroksisteroid oksidoreduktase type 1 (17β-HSD type 1) suatu enzim yang mengkonversi estron menjadi estradiol sehingga menurunkan produksi estrogen dari jaringan perifer, akibatnya total estrogen dalam sirkulasi menurun (Rice and Whitehead.,2006).

2.5.5 Target Molekul dan Efek Genistein

Genistein merupakan salah satu golongan isoflavon *aglikogen* (bebas) memiliki afinitas terhadap reseptor estrogen paling aktif dibandingkan dengan *dietzein*. Genistein dapat berfungsi sebagai *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs). Pada kondisi kadar estrogen tinggi seperti pada kanker dan endrometriosis, genistein akan bekerja sebagai anti estrogen (anti estrogenik), adanya kemiripan struktur dengan 17-β-estradiol, *genistein* mampu mengikat resptor estrogen (RE), dimana dalam tubuh manusia ditemukan reseptor estrogen dalam dua bentuk yaitu estrogen resptor α dan estrogen resptor β (RE- α dan RE- β) dengan ekspresi yang berbeda dalam jaringan (Darmoutomo, 2009).

Genistein sebagai SERMs dapat berfungsi sebagai antagonis murni bila bertindak melalui reseptor estrogen β pada gen yang mengandung elemen-elemen reaksi estrogen tetapi bisa berfungsi sebagai agonis parsial bila bertindak pada gen tersebut melalui resptor estrogen α (Hartmann and Riggs, 2003). Kesamaan struktur dengan 17-β-estradiol, genistein mampu mengikat reseptor estrogen (RE) (Riecansky, 2010). Genistein yang memiliki afinitas yang lebih tinggi pada RE- β sekitar 20-30 kali lebih tinggi daripada RE- α dan sebanding dengan afinitas 17-β-estradiol, namun memiliki aktifitas lebih rendah dari 17- β-estradiol (Riecansky, 2010).

Genistein yang memiliki afinitas tinggi pada RE-β, menghambat tindakan RE-α dengan membentuk heterodiner sehingga menekan aktivasi gen dalam menstimulasi proliferasi sel (Rice *and* Whitehead, 2006). Pada beberapa jaringan RE-β menurunkan transkripsi gen yang diregulasi oleh RE-α, sehingga bersifat sebagai antagonis RE-α, namun bila tidak ada ER-α, maka Re-β dapat berfungsi sebagai reseptor estrogen. RE-β berfungsi sebagai supresol alami dari RE-α pada jaringan mammae (Gruber *et al*., 2002: Mendelson, 2009). Menurut Hartman and Rigs (2003) RE-α bertindak sebagai activator sedangkan RE-β yang memiliki sifat antiproliferasi dapat menghambat tindakan RE-α dengan membentuk heterodimer. Estrogen yang berikatan dengan RE-α dan RE-β dapat menyebabkan efek yang berlawanan dalam transkripsinya, seperti estradiol dapat menstimulasi transkripsi gen dengan RE yang spesifik, tetapi estradiol menginhibis transkripsi gen bila berikatan dengan RE-β dalam sistem yang sama (Gruber er al., 2002; Mendekshon,2009).

Pada dasarnya dalam proses transkripsi sintesis protein, komplek estrogen reseptor tidak hanya berikatan pada ERE saja namun juga dengan protein ko regulator yang terdiri atas ko-aktivator dan ko-reseptor. Untuk menginduksi proses transkripsi gen dari reseptor estrogen, dibutuhkan protein ko-aktivator yang hasilnya adalah produksi messanger RNA (mRNA) untuk sintesis protein dengan respon seluler sesuai dengan karakteristik hormone sedangkan ko-reseptor akan bekerja sebaliknya yakni menghambat proses transkripsi gen (Gruber et al., 2002).

Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa genistein dalam kisaran 5 sampai 5 µM/L dapat menghambat pertumbuhan sel tumor leukemia, limfoma, kanker prostat, kanker payudara dan kanker paru-paru. Genestein menunjukan potensi estrogenik dalam ketidakadaan estrogen dan potensi anti estrogenik dikehadiran estrogen. Konsentrasi Genestein dalam kisaran 1-5 µM/L, tidak cukup untuk melindungi endometrium (Giu-hua and Shou-qing, 2008).

2.6 Dienogest

2.6.1 Definisi

Merupakan sediaan hormon yang digunakan untuk pengobatan gejala nyeri pada lesi endometrium (jaringan luar pada dinding rahim). Dienogest merupakan turunan nortetosteron tanpa androgenik melainkan suatu kegiatan antiandrogenik sekitar sepertiga dari cyproterone asetat. Dienogest mengikat progesterone reseptor dari rahim manusia dengan hanya 10% dari afinitas relative progesterone. Dienogest bekerja pada endometriosis dengan mengurangi produksi endogen estradiol dan menekan efek trofik estradiol pada kedua eutopik dan endometrium ektopik.

Dienogest merupakan progestin selektif yang mengkombinasikan 19-norprogestin dan turunan progesteron sehingga hanya memberikan efek lokal pada jaringan endometrium. Tidak seperti agen 19-norprogestin lainnya, dienogest memiliki efek androgenik yang rendah, bahkan memiliki efek anti androgenik yang menguntungkan sehingga hanya memberikan efek yang minimal terhadap perubahan kadar lemak dan karbohidrat.(Batzer.,2006).

Bentuk sediaan yang sering digunakan pada pengobatan endometriosis adalah Dienogest dengan merk dagang *Visanne,* yang mengandung hormon progestogen dienogest. Minum 1 tablet *Visanne* setiap hari dapat menyusutkan jaringan endometrium dan mengurangi keluhan yang berupa nyeri pada panggul dan nyeri akibat perdarahan bulanan.

2.6.2 Cara Kerja

Tidak seperti estrogen, progesteron memilik efek antimitotik terhadap sel endometrium, sehingga memiliki potensi dalam pengobatan endometriosis. Progestin turunan 19-nortestosteron seperti dienogest memiliki kemampuan untuk menghambat enzim aromatase dan ekspresi COX-2 dan produksi PGE2 pada kultur sel endometriosis. Biopsi percontoh jaringan endometrium dari wanita yang diobati dengan LNG IUS selama 6 bulan menunjukkan ekspresi reseptor estrogen yang berkurang, menurunnya indeks proliferasi sel dan peningkatan ekspresi Fas (Soares dkk,2012).

2.6.3 Struktur Kimia

Progestogen umumnya diklasifikasikan menurut struktur kimianya, kebanyakan memiliki kerangka yang terdiri dari 21 atom karbon (C-21 Progestogen). Derivate dari C-19 senyawa Nortestosteron (NET) juga diklasifikasikan sebagai progestogen yang termasuk didalamnya estranges

dan gonanes. Dienogest adalah estrange, turunan dari NET, tapi bukan memiliki etinil C-17.

2.6.4 Efektifitas

Dienogest dengan dosis harian 2 mg telah dibuktikan bermakna dalam mengurangi nyeri pelvis dan nyeri haid yang terkait endometriosis. Dienogest juga setara dengan GnRH agonis dalam pengobatan nyeri endometriosis. Terdapat tiga penelitian yang menilai efek penggunaan LNG (Levonorgestrel) IUS (Intra Uteri Sistem) terhadap gejala terkait endometriosis. Penelitian pertama oleh Petta dkk membandingkan LNG IUS dengan leuprolide asetat. Didapatkan penurunan bermakna skor VAS setelah 6 bulan pada kedua kelompok dan tidak ada perbedaan antar kelompok tersebut. Penelitian kedua oleh Gomes dkk menilai efek LNG IUS pada stadium ASRM yang menemukan penurunan yang bermakna skor nyeri pelvik setelah 6 bulan dan tidak ada perbedaan antara LNG IUS dengan leuprolide asetat. Fereira dkk pada 2010 juga mendapatkan penurunan skor nyeri dan tidak ada perbedaan antar LNG IUS dengan GnRH analog.(Eshre, 2013).

2.7 Agonis GnRH (Leuprolin Asetat)

2.7.1 Definisi

Suatu dekapeptida yang terdapat pada semua mamalia. Gonadotropin-releasing hormone disekresi oleh neuron-neuron dihipotalamus. Bahan ini mengalir melalui pleksus porta vena hipotalamus-hipofisis ke hipofisis anterior, tempat berikatan dengan reseptor yang berhubungan ke protein G dimebran plasma sel-sel gonadotrofi. Analog-

analog sintetik GnRH mencakup goserelin, histrelin, leuprolid, nafarelin dan triptolin.

Tabel 2.3 : Beberapa contoh obat Agonis GnRH

No	Nama Generik	Dosis	Nama Dagang
1	Leuprolide Asetat/Leuproreline	3,75 mg	Lupron, Tapros, Endrolin
2	Gosereline Asetat	3,6 mg, 10,8 mg	Zuladex
3	Nafarelin Asetat		Synarel

2.7.2 Mekanisme Kerja

Mekanisme kerja dari leuprolin acetat adalah dengan menduduki reseptor gonadotropin dihipofisis dan menghambat sintesis dan sekresi FSH dan LH. Bereaksi lebih lama yaitu 3-8 jam sehingga reseptor GnRH terus menerus diduduki oleh agonisnya. Menyebabkan penekanan fungsi hipofisis dengan pengaturan turun (*Down Regulation*) reseptor GnRH hipofisis sehingga merendahkan kadar FSH dan LH, folikulogenesis tidak terjadi dan menurunkan kadar estrogen.

Pajanan GnRH yang terus menerus ke hipofisis akan mengakibatkan *down-regulation* reseptor GnRH yang akan mengakibatkan berkurangnya sensitifitas kelenjar hipofisis. Kondisi ini akan mengakibatkan keadaan hipogonadotropin hipogonadisme yang akan mempengaruhi lesi endometriosis yang sudah ada. Amenore yang timbul akibat kondisi tersebut akan mencegah pembentukan lesi baru (Soares dkk, 2012).

GnRH juga akan meningkatkan apoptosis jaringan endometriosis. Selain itu GnRH bekerja langsung pada jaringan endometriosis. Hal ini

dibuktikan dengan adanya reseptor GnRH pada endometrium ektopik. Kadar mRNA reseptor estrogen (ERα) menurun pada endometriosis setelah terapi jangka panjang. GnRH juga menurunkan VEGF yang merupakan faktor angiogenik yang berperan untuk mempertahankan pertumbuhan endometriosis. Interleukin 1A (IL-1A) merupakan faktor imunologi yang berperan melindungi sel dari apoptosis.(Betzar, 2006)

2.7.3 Efektifitas

Supresi ovarium yang diinduksi oleh pemberian terus-menerus agonis GnRH sangat menurunkan konsentrasi estrogen dan progesterone dan mencegah perubahan siklis. Pemberian non-pulsatil yang terus menerus GnRH atau analog GnRH menghambat pelepasan FSH dan LH oleh hipofisis baik pada wanita maupun pria, sehingga menjadi hipogonadisme. Durasi terapi dengan agonis GnRH yang dianjurkan dibatasi 6 bulan karena penekanan ovarium melebihi periode ini dapat menyebabkan penurunan kepadatan tulang. Analog GnRH dapat diberikan secara subkutis, intramuskulus, melalui semprot hidung atau sebagai implant subkutis (Katzung, 2014).

Karena efek pemberian GnRH analog adalah efek hipoestrogenik, maka diperlukan pemberian estrogen sebagai terapi *add back*. Hal ini didasari bahwa kadar estrogen yang diperlukan untuk melindungi tulang, fungsi kognitif dan mengatasi gejala defisiensi estrogen lainnya lebih rendah dibandingkan kadar yang akan mengaktifasi jaringan endometriosis. Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa terapi add back ini tidak mengurangi efektifitas GnRH analog.(Esher, 2013) Pada pemberian GnRH analog dengan terapi add back estrogen dan progestogen selama 6 bulan,

densitas mineral tulang lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian GnRH saja.

2.7.4 Toksisitas

Pemberian kontinu salah satu analog GnRH (leuprolid, nafarelin, goserelin) pada wanita menimbulkan gejala khas menopause, yang mencakup hot flushes, berkeringat dan nyeri kepala, depresi dan berkurangnya libido,nyeri menyeluruh, kekeringan vagina dan atrofi payudara juga dapat terjadi. Berkurangnya densitas tulang dan osteoporosis dapat terjadi pada pemakaian jangka panjang. Kontraindikasi pemberian analog GnRH meliputi kehamilan dan menyusui.

2.8 Pengaruh Pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE2

2.8.1 Pengaruh Genistein terhadap Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE2

Genistein sebagai salah satu strategi pengobatan terbaru, dimana genistei*n* merupakan unsur utama dari fitoestrogen golongan isoflavon (Amberkar *et al*., 2010). Isoflavon mempunyai efek anti inflamasi dengan mekanisme kerja melalui efek penghambatan jalur metabolism asam arachidonat, pembentukan prostaglandin, pelepasan histamine, atau aktivitas radical scavenging suatu molekul.

Genistein dapat bekerja sebagai *selektive estrogen reseptor modulator* (SERMs) yang memiliki efek estrogenik (bekerja seperti estrogen atau berlaku sebagai pengganti estrogen) pada tulang dan efek anti estrogenik (bekerja menekan fungsi estrogen) pada jaringan reproduksi seperti kelenjar mammae, ovarium, endometrium dan prostat (Muchtadi *dkk*.,

2008). Genistein dan estradiol bersaing untuk menempati Reseptor Estrogen (RE), namun genistein mempunyai afinitas terhadap RE-β lebih tinggi daripada RE-α. Genestein menghambat produksi oksida nitrat dan prostaglandin pada konsentrasi non-toksik, dengan menghambat induksi NO dan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2).

2.8.2 Pengaruh Leuprolide Acetat terhadap Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE2

Efek pemberian GnRH analog dalam hal ini pemberian Leuprolin Acetat adalah efek hipoestrogenik, Pajanan GnRH yang terus menerus ke hipofisis akan mengakibatkan *down-regulation reseptor Estrogen α (REα)* dan memicu penekanan reseptor progesterone serta peningkatan kadar siklooksigenase-2 (COX-2) yang berkontribusi terhadap resistensi progesterone dan reaksi inflamasi untuk mencegah resistensi progesterone dan proses inflamasi yang terkait nyeri pada endometriosis.

Selain itu GnRH bekerja langsung pada jaringan endometriosis. Hal ini dibuktikan dengan adanya reseptor GnRH pada endometrium ektopik. Kadar mRNA reseptor estrogen (ERα) menurun pada endometriosis setelah terapi jangka panjang. Amenore yang timbul akibat kondisi tersebut akan mencegah pembentukan lesi baru.

2.8.3 Pengaruh Dienogest terhadap Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE2.

Dienogest bekerja pada endometriosis dengan mengurangi endogen produksi estradiol dan menekan efek tropik estradiol pada kedua eutopik dan ektopik endometrium. Tidak seperti estrogen, progesteron memilik efek antimitotik terhadap sel endometrium, sehingga memiliki potensi dalam

pengobatan endometriosis. Progestin dalam dienogest mampu menurunkan produksi hormone estrogen dalam tubuh sehingga pertumbuhan lesi endometrium bisa menurun. Progestin turunan 19-nortestosteron seperti pada dienogest memiliki kemampuan untuk menghambat enzim aromatase dan ekspresi COX-2 dan produksi PGE2 pada kultur sel endometriosis.

2.9 Mencit (Mus Musculus)

2.9.1 Definisi

Adalah anggota *Muridee* (tikus-tikusan) yang berukuran kecil. Mencit sangat mudah menyesuaikan diri dengan perubahan yang dibuat manusia, bahkan jumlahnya yang hidup liar dihutan barangkali lebih sedikit daripada yang tinggal diperkotaan. Mencit percobaan (laboratorium) dikembangkan dari mencit, melalui proses seleksi. Mencit merupakan hewan yang paling banyak digunakan sebagai hewan model laboratorium dengan kisaran penggunaan antara 40-80%. Mencit banyak digunakan sebagai hewan laboratorium (khususnya digunakan dalam penelitian biologi), karena memiliki keunggulan-kenggulan seperti siklus hidup relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi, mudah ditangani, serta sifat produksi dan karakteristik reproduksinya mirip hewan lain, seperti sapi, kambing, domba dan babi (Alim,2013)

2.9.2 Siklus Estrus

1. Proestrus

   Pada fase ini mulai terlihat perubahan pada alat kelamin betina. Pada ovarium terlihat pertumbuhan folikel pada ukuran yang maksimal.

2. Estrus

Pada siklus ini siklus menunjukkan perilaku mau menerima hewan jantan dan merupakan fase birahi. Perubahan terjadi pada ovarium yaitu terjadinya pemasakan bagi folikel yang telah dimulai pertumbuhannya pada fase proestrus. Folikel pada fase ini telah siap diovulasikan. Pada tikus ovalasi terjadi pada pertengahan fase estrus. Keadaan ini terjadi selama 9-15 jam dan ditandai dengan berlari-lari yang sangat tinggi.

3. Metestrus

Terjadi segera setelah fase estrus berakhir. Dalam ovarium terjadi pembentukan korpus hemoragikum pada tempat folikel de Graff yang baru saja melepaskan ovum. Banyak leukosit muncul dalam lumen vagina dengan sel-sel superfisial.

4. Diestrus

Pada fase ini ditandai dengan tidak adanya kebuntingan, tidak ada aktifitas kelamin dan hewan menjadi tenang. Fase ini merupakan fase terlama diantara fase-fase estrus yang lain dalam siklus estrus.

2.9.3 Kandang Mencit

Kandang mencit bervariasi dalam hal desain, ukuran dan komposisinya. Kandang yang paling populer adalah kandang berbentuk kotak yang terbuat dari polycarbonate, poly-stainless steel lebih bagus karena halus, awet dan lebih mudah dibersihkan daripada kandang berbahan plastik. Luas kandang individual minimum 200 cm^2/hewan sedangkan kandang kelompok 60 cm^2/hewan (Kusumawati, 2004). Kandang mencit

diberi alas serbuk kayu yang bertujuan untuk kenyamanan dan penghangat dari udara dingin, menyerap kelembaban terutama untuk air kencing.

2.9.4 Cara Penanganan Mencit

Secara alamiah mencit cenderung menggigit bila mendapat perlakuan yang kasar. Oleh karena itu diperlukan penanganan yang khusus untuk mempermudah cara perlakuan. Pengambilan mencit diletakkan dikawat kassa dengan ekor sedikit ditarik. Cubit kulit bagian belakang kepala dan jepit ekornya (Syamsudin dan Darmono, 2011).

2.9.5 Kebutuhan Pakan (Nutrisi Standar)

Nutrisi standar yang dibutuhkan oleh mencit adalah protein 20-25%, lemak 5-12%, serat kasar 2,5%, dan karbohidrat 45-60%. (Kusumawati, 2004). Tingkat konsumsi pakan dipengaruhi oleh jenis kelamin, ukuran tubuh, tingkat produksi, temperatur lingkungan, kecepatan pertumbuhan, dan lain-lain. Air minum yang dibutuhkan seekor mencit berkisar antara 4-8 ml/hari, air minum harus tersedia dan bersih, karena mencit menyukai air yang baru. Seekor mencit mudah sekali kehilangan air, sebab evaporasi tubuhnya yang tinggi (Pradana, 2012)

2.9.6 Penandaan

Beberapa cara penandaan hewan laboratorium,dilakukan untuk mengetahui kelompok hewan yang diperlakukan berbeda dengan kelompok lain. Penandaan ini dapat dilakukan secara permanen untuk penelitian jangka panjang (kronis), sehingga tanda tersebut tidak mudah hilang. Yaitu : dengan *ear tang* (anting bernomor), tattoo pada ekor, melubangi daun telinga dan elektronik transponder.

Penandaan sederhana dapat dilakukan dengan cara pewarnaan pada masing-masing hewan, pada umumnya dipakai pewarna/tinta didaerah tertentu misalnya di ekor, kaki dan kepala, tetapi harus diperiksa setiap hari karena kemungkinan dapat tergosok dan hilang (Kusumawati, 2004).

2.9.7 Pemberian obat oral

Teknik ini paling sering dilakukan karena mudah, aman dan mudah. Kerugiannya dapat mempengaruhi bioviabilitasnya, misalnya obat dapat mengiritasi saluran cerna, sehingga perlu penanganan yang cermat pada hewan coba. Absorpsi obat dapat terjadi secara difusi pasif, olah sebab itu obat harus mudah larut dalam lemak. Absorpsi obat dalam usus halus lebih cepat, karena epitel usus halus permukaanya luas dan karena berbentuk vili yang berlipat. Sedangkan dalam lambung lebih lambat karena dindingnya tertutup lapisan mucus yang tebal (Syamsudin dan Darmono, 2011). Volume maksimal peroral yang dapat diberikan pada mencit seberat 20-30g adalah 1 ml (Kusumawati, 2004)

2.9.8 Euthanasia pada Mencit

Euthanasia pada hewan coba hendaknya mengikuti syarat sebagai berikut :

1. Tidak menimbulkan gejala yang tidak menyenangkan bagi hewan, misalnya menimbulkan ketakutan hingga hewan harus meronta-ronta terlebih dahulu
2. Aman untuk peneliti dan pembantu peneliti
3. Mudah dilakukan
4. Sesuai dengan umur, spsies, kesehatan, dan jumlah hewan
5. Tidak menimbulkan polusi

6. Irreversible
7. Tidak menimbulkan perubahan kimiawi pada jaringan
8. Tidak menimbulkan perubahan histopatologi yang kelak akan mempengaruhi hasil penelitian (Kusumawati, 2004).

Euthanasia pada mencit dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu dengan CO2, injeksi barbiturate over dosis 200 mg/kg interaperitoneal (IP) atau dengan dislokasi maupun dekapitasi (Syamsudin and Darmono, 2011).

2.9.9 Mencit model endometriosis

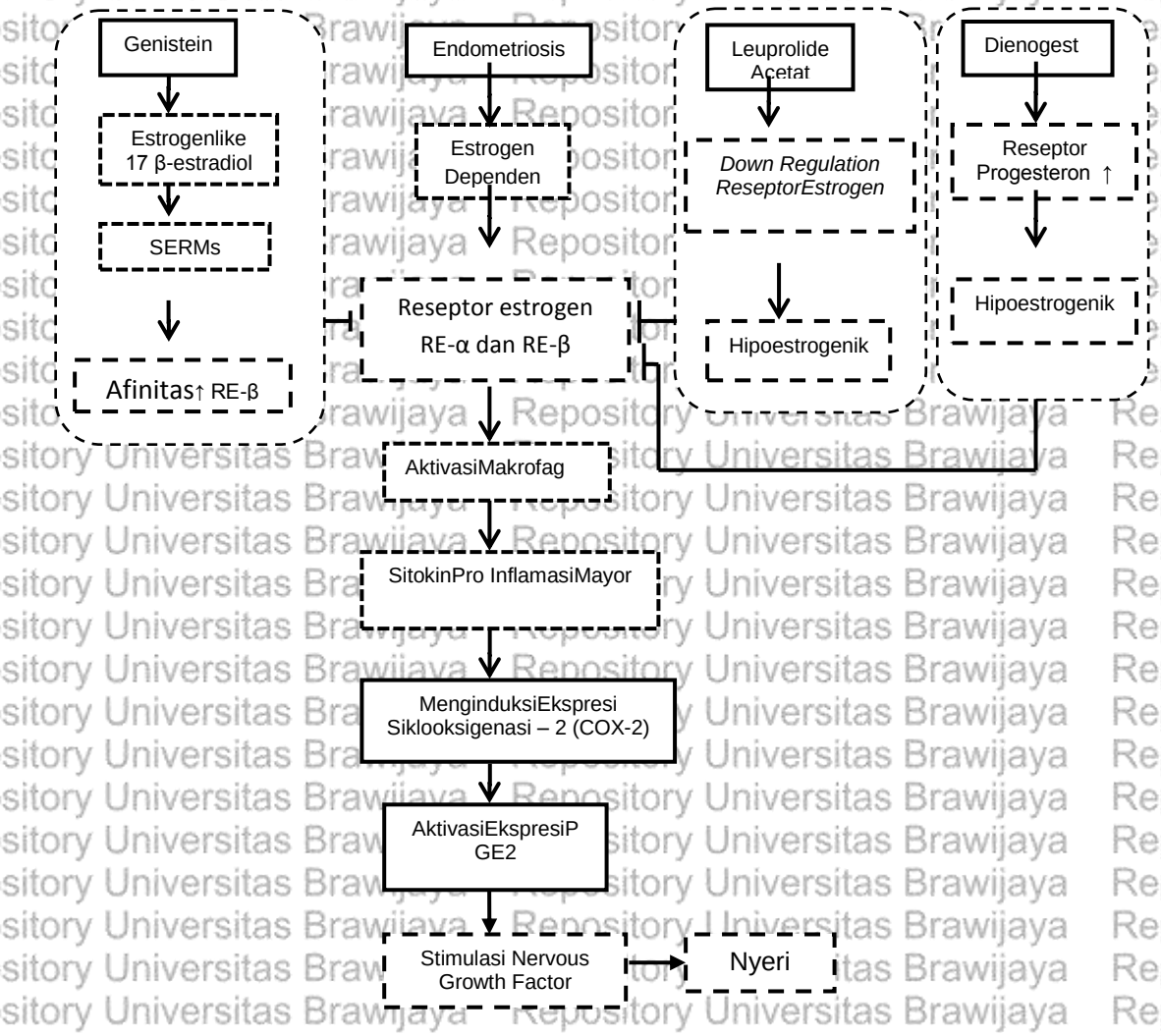
Endometriosis hanya terjadi secara alami pada manusia dan beberapa primata bukan manusia banyak digunakan untuk penelitian tentang endometriosis., namun sangat tingginya biaya penanganan hewan ini membatasi penggunaan monyet untuk model penelitian ekperimental. Karena alasan tersebut, perkembangan penelitian yang menggunakan hewan kecil, khususnya *rodent* (hewan pengerat), sebagai model penelitian endometriosis dengan cara mentransplantasikan sebagian jaringan endometriosis pada lokasi ektopik (Grummer, 2006).

Jaringan endometrium manusia telah berhasil ditransplantasikan pada tikus imunodefisiensi berat atau *Severe Combined Immunodeficient* (SCID) menggunakan teknik injeksi intraperitoneal secara blind, dengan angka keberhasilan 96,5%. Pada analisa hibridasi in-situ, didapatkan adanya kemampuan implant endometrium untuk memproduksi complemen 3 (C3). Diekspresikannya C3 mRNA oleh implant endometrium menunjukkan bahwa implant endometrium ektopik secara imunologis responsive terhadap perubahan dalam lingkungan penjamu. Model ini dapat digunakan untuk

penelitian efek farmakologi dan modulasi hormonal pada endometriosis tanpa disertai perbedaan phylogenik (Awwad *et al*., 1999)

BAB 3
KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 KerangkaKonsepPenelitian

Keterangan :

: Variabel yang diteliti

: Variabel yang tidakditeliti

: Menginduksi

: Menghambat

Endometriosis adalah suatu penyakit yang pertumbuhannya tergantung oleh hormon estrogen (estrogen dependen).Estrogen yang diproduksi local dalam jaringan endometriosis, khususnya estradiol mempunyai dua peranan penting dalam proliferasi sel endometrial dan stimulator sitokin pro inflamasi (Giudice, 2010). Estrogen (estradiol) juga mengaktivasi makrofag dan menginduksi produksi sitokin pro-inflamasi mayor dalam hal ini Interleukin-1β, diketahui dapat meningkatkan regulasi COX-2 dalam jaringan endometriosis ektopik, yang dapat mengakibatkan peningkatan terus menerus produksi PGE-2. Hal ini menunjukkan bahwa estradiol, secara langsung maupun tak langsung, melalui sitokin menginduksi aktivasi COX-2 yang akan meningkatkan produksi PGE-2 (prostaglandin E2) dan akan mengaktifkan serabut nyeri, memperkuat invasi neuronal lesi dengan menstimulasi produksi NGF (Nerveus Growth Factor) dan neutropin lainnya dan mendorong tumbuhnya nosiseptor yang berkontribusi terhadap nyeri inflamasi persisten serta menghambat apoptosis neuronal..

Genistein termasuk dalam kelas isoflavon yang memiliki bentuk serupa dengan*17-β estradiol* yang secara umum bekerja sebagai *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs) karena memiliki system kerja yang berbeda, pada kadar estrogen tinggi genistein akan bekerja sebagai anti estrogenic seperti pada kanker payudara dan endometriosis, sedangkan pada kadar estrogen yang rendah genistein akan bersifat estrogenik. Genestein memiliki aksi biologis sebagai antioksi dan, anti angiogenik, inhibitor proliferasi, metastase sel kanker, anti tumor, anti kanker, yang berperan dalam system imun dan mampu berikatan baik dengan Reseptor Estrogen (RE).Genistein dan estradiol bersaing untuk menempati Reseptor Estrogen (RE), namun genistein mempunyai afinitas terhadap RE-β lebih tinggi daripada RE-α. Genestein menghambat produksi oksida nitrat dan prostaglandin

pada konsentrasi non-toksik, dengan menghambat induksi NO dan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2).

Efek pemberian GnRH analog dalam hal ini pemberian Leuprolide Acetat adalah efek hipoestrogenik, Pajanan GnRH yang terus menerus ke hipofisis akan mengakibatkan *down-regulation reseptor Estrogen α (REα)* dan memicu penekanan reseptor progesterone serta peningkatan kadar siklooksigenase-2 (COX-2) yang berkontribusi terhadap resistensi progesterone dan reaksi inflamasi untuk mencegah resistensi progesterone dan proses inflamasi yang terkait nyeri pada endometriosis. Selain itu GnRH bekerja langsung pada jaringan endometriosis.Hal ini dibuktikan dengan adanya reseptor GnRH pada endometrium ektopik. Kadar mRNA reseptor estrogen (ERα) menurun pada endometriosis setelah terapi jangka panjang.Amenore yang timbul akibat kondisi tersebut akan mencegah pembentukan lesi baru.

Dienogest bekerja pada endometriosis dengan mengurangi endogen produksi estradiol dan menekan efek tropik estradiol pada kedua eutopik dan ektopik endometrium.Tidak seperti estrogen, progesterone memiliki efek antimitotik terhadap sel endometrium, sehingga memiliki potensi dalam pengobatan endometriosis. Progestin dalam dienogest mampu menurunkan produksi hormon estrogen dalam tubuh sehingga pertumbuhan lesi endometrium bisa menurun.Progestin turunan 19-nortestosteron seperti pada dienogest memiliki kemampuan untuk menghambat enzim aromatase dan ekspresi COX-2 dan produksi PGE2 pada kultur sel endometriosis.

3.2 HipotesisPenelitian

3.2.1 Pemberian Genistein menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit model endometriosis

3.2.2 PemberianGenistein menurunkan ekspresi PGE-2 pada mencit model endometriosis

3.2.3 Tidak ada perbedaan pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit model endometriosis

3.2.4 Tidak ada perbedaan pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest menurunkan ekspresi PGE-2 pada mencit model endometriosis

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 4
METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental*) dengan menggunakan rancangan percobaan dengan metode *Post test only Control Group Design*, yaitu peneliti mengukur pengaruh perlakuan pada kelompok eksperimen dengan membandingkan kelompok kontrol, tanpa terlebih dahulu melakukan pretest (Notoatmodjo, 2010).

Pada penelitian ini terdapat kelompok kontrol positif, yang mana mencit model endometriosis tidak diberi perlakuan, kelompok kontrol negatif, yang mana mencit sehat tidak diberi perlakuan dan kelompok perlakuan, yaitu mencit model endometriosis diberi perlakuan.

Dalam penelitian ini perlakukan/intervensi peneliti adalah pemberian genistein berbagai dosis (0,78, 1,04, dan 1,3 dengan satuan mg/hari) dan pemberian Leuprolide Acetat dengan dosis 0,00975 mg/5 hari serta Dienogest dengan dosis 0,0052 mg/hari, pada hewan coba Mencit (*Mus Muscullus*) dengan jenis kelamin betina. Sedangkan parameter yang diamati setelah perlakuan/intervensi dari penelitian ini adalah ekspresi *Cyclooxygenase-2* (COX-2) dan *Prostaglandin E2* (PGE2).

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian ini dilakukan selama 2 bulan, mulai bulan Desember 2015 sampai dengan Januari 2016, dengan rincian selama 1 minggu dilakukan adaptasi, 2 minggu untuk pembuatan

mencit model endometriosis, 2 minggu perlakuan pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest serta 3 minggu untuk pemeriksaan imunohistokimia dan pembacaan data statistik.

4.3 Sampel

4.3.1 Asal Sampel

Penelitian ini menggunakan mencit (*Mus Musculus*) model endometriosis. Penggunaan mencit sebagai model penelitian, karena mencit merupakan hewan mamalia yang sering digunakan sebagai model untuk penelitian, sebelum diberlakukan pada manusia. Pemilihan sampel dilakukan secara acak sesuai dengan kriteria.

4.3.2 Besar Sampel

Perhitungan besarnya pengulangan atau replikasi hewan penelitian dilakukan berdasarkan rumus dari *Steel & Torrie (1995)*:

Rumus : $p(n-1) \geq 15$

p = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

Penelitian ini menetapkan 8 kelompok, jadi sampel yang diperlukan adalah :

$7 (4-1) \geq 15$

$7-3 \geq 15$

$4 \geq 15$

$n \geq 3.75$

Jumlah sampel secara keseluruhan adalah jumlah perlakuan dikalikan jumlah pengulangan.7 x 4 = 28 ekor mencit, dengan cadangan

masing-masing perlakuan 1 ekor mencit jadi total sampel adalah : 28 + 7 =35 ekor mencit.

4.3.3 Cara Persiapan Sampel

Randomisasi :35 ekor mencit yang menjadi sampel penelitian kemudian dikelompokan secara random menjadi 7 kelompok yaitu :

Kelompok Kontrol (K+) :4 ekor mencit dan 1 ekor cadangan

Kelompok Kontrol (K-) :4 ekor mencit dan 1 ekor cadangan

Kelompok Perlakuan (G1) :4 ekor mencit dan 1 ekor cadangan

Kelompok Perlakuan (G2) :4 ekor mencit dan 1 ekor cadangan

Kelompok Perlakuan (G3) :4 ekor mencit dan 1 ekor cadangan

Kelompok Perlakuan (LA) :4 ekor mencit dan 1 ekor cadangan

Kelompok Perlakuan (D) : 4 ekor mencit dan 1 ekor cadangan

4.3.4 Cara Pemilihan Sampel

Pemilihan sampel mencit dengan memperhatikan kreteria inklusi dan eksklusi.

1. Kreteria inklusi : Mencit (*Mus Musculus*) betina yang sehat, dengan berat mencit 20-30 gram, bulu halus, mata bersinar, tidak pincang, tidak didapatkan adanya bekas luka.
2. Kreteria eksklusi : Mencit yang sakit dan cacat, didapatkan luka, gerakan tidak aktif, berat kurang dari 20-30 gram.
3. Kreteria putus uji : Mencit betina yang sakit atau mati sejak perlakuan 1 minggu dikandang.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah :

a. Genistein murni dengan dosis 0,78, 1,03, 1,4 dengan satuan mg/hari yang diberikan secara oral. (Yulianto,et al.,2015)
b. Leuprolide Acetat (Tapros)dengan dosis0,00975 dengan satuan mg/5 hari yang diberikan secara injeksi subkutan atau intramuskuler
c. Dienogest dengan dosis 0,0052 dengan satuan mg/hari yang diberikan secara oral.

4.4.2 Variabel Tergantung (Dependen)

a. Ekspresi Cyclooxygenase-2 (COX-2)
b. Ekspresi Prostaglandin E-2 (PGE2)

4.5 Definisi Operasional

1) Endometriosis adalah merupakan jaringan (sel-sel kelenjar dan stroma) abnormal yang menyerupai endometrium (*endometrium like tissue*) yang tumbuh disisi luar kavum uterus, dan memicu reaksi peradangan menahun.
2) Mencit Model Endometriosis adalah mencit yang dibuat endometriosis. Implantasi jaringan endometriosis sel epitel dan stroma yang diambil dari jaringan pasien yang telah didiagnosis endometriosis dengan hasil PA positif yaitu adanya dua atau lebih gambaran histology yaitu epitel endometrium, stroma endometrium yang dimasukkan ke endometriosis mencit yang sudah dibuat immunodeficiency.

3) Genistein adalah Genistein (Bioword with brand name bio-x CAS No.446-72-0) yang berupa serbuk genistein asli yang dilarutkan dalam minyak wijen untuk mencapai dosis yang diinginkan.

4) LeuprolideAcetatadalahLeuprolideAcetat (Takeda Manufacture Jepang with brand name Tapros Depot single dose) yang berupa depot suspension 3.75 mg dengan komposisi Leuprolide Acetat, Polylactic Acid dan Manitol untuk satu vial dan dilengkapi air seteril 2 ml untuk melarutkan.

5) Dienogest adalahDienogest (Bayer Health Care with brand name Visanne) yang berupa tablet 2 mg, yang nantinya akan dibuat menjadi serbuk.

6) Ekspresi Cyclooxygenase-2 (COX-2) adalahekspresi COX-2 yang diukur dari jaringan endometriosis pada mencit model endometriosis kemudian dihitung menggunakan kurva standar. Cara pengukuran dengan menggunakan teknik Imunohistokimia.Ekspresi COX-2 pada setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut *Remmele And Stegner* (1986) yang sudah dimodifikasi. Indeks skala Remmele menggunakan *Immuno Reactive Score* (*IRS*), merupakan hasil perkalian antara prosentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif (Nowak, *et al.,* 2007). Data sampel merupakan nilai rata – rata IRS yang teramati pada 5 (lima) Lapangan Pandang (LP). Adapun skala semikuantitatif IRS adalah sebagai berikut :

Prosentase sel immunoreaktif :

- Skor 0 : tidak ada sel positif

- Skor 1 : sel positif kurang dari 10%
- Skor 2 : sel positif antara dari 11% - 50%
- Skor 3 : sel positif antara dari 51% - 80%
- Skor 4 : sel positif antara lebih dari 80%

(Nowak, *et al.,* 2007)

Skor instensitas warna :

- Skor 0 : tidak ada reaksi warna
- Skor 1 : intensitas warna rendah
- Skor 2 : intensitas warna sedang
- Skor 3 : intensitas warna kuat

Skala data yang digunakan adalah Ratio.

7) Ekspresi Prostaglandin E-2 (PGE-2)adalah ekspresi PGE-2 yang diukur dari jaringan endometriosis pada mencit model endometriosis dengan menggunakan teknik Imunohistokimia.Ekspresi PGE-2 pada setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut Remmele *And* Stegner (1986) yang sudah dimodifikasi. Indeks skala Remmele menggunakan *Immuno Reactive Score* (IRS), merupakan hasil perkalian antara prosentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif (Nowak, *et al.,* 2007). Data sampel merupakan nilai rata – rata IRS yang teramati pada 5 (lima) Lapangan Pandang (LP). Adapun skala semikuantitatif IRS adalah sebagai berikut :

Prosentase sel immunoreaktif :

- Skor 0 : tidak ada sel positif

- Skor 1 : sel positif kurang dari 10%
- Skor 2 : sel positif antara dari 11% - 50%
- Skor 3 : sel positif antara dari 51% - 80%
- Skor 4 : sel positif antara lebih dari 80%

Skor instensitas warna :

- Skor 0 : tidak ada reaksi warna
- Skor 1 : intensitas warna rendah
- Skor 2 : intensitas warna sedang
- Skor 3 : intensitas warna kuat

(Nowak, *et al.*, 2007)

Skala data yang digunakan adalah Ratio.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan

Untuk melihat ekspresi COX-2 dan PGE2 dengan menggunakan teknik imunohistokimia.Bahan-bahan yang dibutuhkan larutan PBS, aqubidest, Sodium Sitrat Buffer PH 6.0, dan TBS Tween, xylol (I dan II), ethanol absolute (I, II dan III), ethanol (70%, 80%, 90%, dan 96%).

4.6.2 Alat

Alat untuk memberikan genistein dan dienogest adalah dengan menggunakan sonde, sedangkan Leuprolide Acetat diberikan melalui injeksi subkutan atau intramuskuler.Pemeriksaan ekspresi COX-2 dan PGE2 dengan teknik Immunohistokimia. Adapun alat yang dibutuhkan adalah sebagai berikut :Slide dan chamber, Gelas reagen,

Pipet (Mikropipet), Tissue dan timer, Waterbath, Mikroskop cahaya biasa merek, Immunostaining kit dan Mikrotom.

4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

4.7.1. Pembuatan mencit model endometriosis

Pembuatan mencit model endometriosis, mengadopsi pada penelitian yang dilakukan oleh Sutrisno (2014), yaitu :

1) Mencit betina dilakukan adaptasi selama 1 minggu, didalam kandang berisi serbuk kayu, diberi makan 2 kali sehari dengan pellet ayam, dan diberi minum secara *ad libitum*.
2) Pada hari pertama kelompok kontrol positif (K+) dan kelompok perlakuan (P) diberikan injeksi Siklosporin A, diinjeksikan sebanyak 0.2 ml/mencit (setelah pengenceran) secara Intra Muskuler (IM) untuk membuat mencit menjadi Imunodefisiensi.
3) Setelah itu mencit disuntikan jaringan myometrium dan endometrium yang berasal dari uterus yang diambil dari pasien dengan Adenomyosis. Jaringan tersebut sebelumnya disimpan di dalam larutan PBS. Pembuatan supernatant dilakukan dengan cara jaringan uterus seluas 1 cm3 digerus dan disuspensi dengan larutan PBS sebanyak 10 ml dan disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm dalam suhu 4° C selama 10 menit. Supernatant ini yang akan diinjeksikan sebanyak 0.1 ml, kemudian disuntikkan secara pelan-pelan dicavum endometrium.
4) Selanjutnya dilakukan penyuntikan ethynil estradiol dengan dosis 0.2 µg/kgBB. Dosis tersebut dikonversikan ke dosis mencit menjadi 5 µg per mencit. Jadi setiap 30 cc mengandung 2000 Iu

setara 2 mg ethynil estradiol, maka setiap mencit disuntikkan 0.1 cc secara intra muskuler. Penyuntikan etynil estradiol dilakukan pada hari ke-1 dan ke-5.

5) Kemudian mencit ditunggu sampai hari ke-14 dengan perawatan pemberian makan dan minum sesuai standart. Setelah hari ke-15, mencit tersebut sudah menjadi mencit model endometriosis (untuk mastikan dilakukan terminasi pada kontrol (+) 2 ekor dan dilihat secara visual lesi endometriosisnya) kemudian dipapar dengan Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest.

6) Mencit dipapar Genistein berbagai dosis, Leuprolide Acetat serta Dienogest selama 15 hari sampai hari ke 30. Kemudian baik mencit yang masuk ke dalam kontrol positif, negatif dan kelompok perlakuan diterminasi untuk diambil jaringan endometriosis.

4.7.2. Pemeliharaan Mencit Model Endometriosis

Selama perlakuan, mencit model endometriosis ditempatkan pada tempat khusus untuk memelihara tikus : bak plastic ukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, tutup kandang tikus dari kawat dengan ukuran 36,5 cm x 15,5 cm, botol air dan serbuk kayu.

Dasar kandang dilapisi dengan serbuk kayu setebal 0,5-1 cm dan diganti setiap dua hari sekali. Cahaya ruangan dikontrol persis 12 jam terang (06.00 sampai dengan pukul 18.00) dan 12 jam gelap (pukul 18.00 sampai dengan pukul 06.00), sedangkan temperatur dan kelembaban ruangan dibiarkan berada pada kisaran alamiah. Mencit model endometriosis diadaptasikan dalam kondisi lingkungan penelitian yang baru dengan diberi pakan standart yang mengandung protein 12%

dan minum air secara *ad libitum*.Selanjutnya setelah diadaptasikan mencit dikelompokkan menjadi 7 kelompok sampel.

4.7.3. Pembagian Kelompok Sampel

Sampel penelitian ini menggunakan 7 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor mencit model endometriosis. Kelompok perlakuan dibagi sebagai berikut :

1) Kelompok kontrol (+) : mencit model endometriosis diberi pakan standart dan tanpa perlakuan Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest.
2) Kelompok kontrol (-) : mencit betina sehat (tidak endometriosis) diberi pakan standart dan tanpa perlakuan
3) Kelompok 1 : mencit model endometriosis diberi pakan standart dan diberikan Genistein dengan dosis 0.78 mg/hari
4) Kelompok 2 : mencit model endometriosis diberi pakan standart dan diberikan Genistein dengan dosis 1.04 mg/hari
5) Kelompok 3 : mencit model endometriosis diberi pakan standart dan diberikan Genistein dengan dosis 1.3 mg/hari
6) Kelompok 4 : mencit model endometriosis diberi pakan standart dan diberikan LeuprolideAcetat dengan dosis0.00975mg.
7) Kelompok 6 : mencit model endometriosis diberi pakan standart dan diberikan Dienogest dengan dosis 0.0052mg.

4.7.4. Pembuatan Dosis

1) Genistein

Menentukan banyaknya genistein dan banyaknya pelarut (dalam hal ini adalah minyak wijen) dengan langkah-langkah sebagai berikut :

a. Serbuk genistein ditimbang sesuai dengan dosis yang diperlukan 0.78mg, 1.04 mg, dan 1.3 mg. ditimbang sesuai dosis mencit/hari/5 mencit.

b. Genistein yang sudah ditimbang dimasukkan kedalam evendorf :5 dosis mencit per masing-masing dosis.

c. Genistein diencerkan dengan menggunakan minyak wijen 100% sebanyak 0.2 ml/dosis. Jadi kalau dalam 1 evendorf terdapat 5 dosis, maka dibutuhkan minyak wijen sebanyak 1 ml.

2) LeuprolideAsetat

Menentukan banyaknya LeuprolideAcetat dan banyaknya pelarut (dalam hal ini adalah air steril) dengan langkah-langkah sebagai berikut :

a. Kemasan Leuprolide Acetat (Tapros) yang berisikan serbuk dengan berat 3,75 mg dengan larutan pengencer sebanyak 2 ml.

b. Dosis yang dibutuhkan untuk terapi mencit model endometriosis adalah 0,00975 mg per injeksi, sehingga jumlah larutan yang disuntikkan pada tikus model

endometriosis adalah (0.00975/3.75)X2 = 0.0052 ml = 0.52 Unit.

3) Dienogest

Dipasaran sediaan Dienogest (Visanne) berbentuk tablet 2 mg kemudian dihaluskan. Dosis yang dibutuhkan untuk hewan coba adalah 0.0052 mg/hari.

Table 4.1 Perhitungan dosis Genistein, LeuprolideAcetat dan Dienogest pada masing-masing kelompok

Kelompok Hewan Coba	Dosis pada Manusia	Konversi Dosis	Dosis pada Mencit
P1	300 mg	0.0026	0.76 mg
P2	400 mg	0.0026	1.04 mg
P3	500 mg	0.0026	1.3 mg
P4	3.75 mg	0.0026	0.00975 mg
P5	3.75 mg	0.0026	0.00975 mg
P6	2 mg	0.0026	0.0052 mg

Penghitungan dosis genistein yang digunakan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh De Vere White (2004) pada penderita kanker prostat diberikan supplement genistein dengan dosis 450 mg/hari dan didapatkan peningkatan Prostat Spesific Antigen (PSA). Pada penelitian ini dosis yang digunakan adalah 300mg/hari, 400mg/hari dan 500mg/hari. Kemudian dosis tersebut dikonversikan dengan dosis yang diberikan pada mencit dengan konversi senilai 0.0026 (Syamsudin and Damono, 2011). Dosis pemberian Leuprolide Acetat untuk endometriosis pada manusia mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Schindler (2006)

yakni 0.01 mg per hari atau 3.75 mg selama 3 bulan. Sedangkan pemberian dosis Dienogest 2 mg/hari selama 15 hari pada wanita dengan endometriosis yang diberikan secara oral sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Hayashi, *et al.* (2012). Kedua dosis dikonversikan dengan dosis yang diberikan pada mencit dalam 3 kali siklus estrus atau 15 hari.

4.7.5. Pemberian Dosis

Genistein dan Dienogest diberikan secara oral melalui sonde atau pipet. Lama pemberian diberikan dalam waktu 15 hari dan diberikan sekali diluar pemberian pakan secara oral.Sedangkan LeuprolideAcetat diberikan secara subkutan atau intramuskuler setiap 5 hari sekali selama 15 hari (3 kali injeksi).

4.7.6. Pengambilan Bahan Pemeriksaan

Pengambilan bahan pemeriksaan dilakukan pada hari ke-30 masa perlakuan dengan langkah-langkah sebagai berikut :

1) Mencit dimatikan dengan cara dianestesi secara inhalasi dengan menggunakan eter
2) Kemudian diambil jaringan endometriosisnya
3) Setelah selesai mencit dikuburkan

4.7.7. Metode Pengukuran Ekspresi COX-2 dan PGE2

Pengukuran ekspresi COX-2 dan PGE-2 dilakukan dengan menggunakan teknik imunohistokimia, dengan langka-langkah sebagai berikut :

1) Fiksasi dan pencucian jaringan endometriosis

Segera setelah mencit percobaan diterminasi, kemudian dilakukan sekdi, kemudian jaringan endometriosisnya diambil dan dimasukkan ke dalam formalin 10% sekurang-kurangnya selama 24 jam.Kemudian jaringan endometriosis dipotong dengan ketebalan 0.5 cm.

2) Dehidrasi dan *clearing*

Jaringan endometriosis yang telah dicuci dengan air kran selama 30 menit lalu dimasukkan kedalam reagen dengan larutan alcohol 70%, 80%, 90%, 96%, Alkohol Absolute I,II,III,Xylol I dan II masing-masing selama 30 menit.

3) Infiltrasi dan pembuatan blok paraffin

Proses Infiltrasi dan Pembuatan Blok Parafin menggunakan alat Automatic Tissue Embedding Apparatus Tissue-Tek®

4) Pengirisan tipis

Pengirisan ini menggunakan mikrotom. Pemotongan dilakukan secara random yaitu tiap 10 kali pemotongan yang dilakukan seri, diambil satu dengan ketebalan 5-7 µm, kemudian dicelupkan air hangat dengan suhu 20°C-30°C sampai jaringan mengembang dengan baik, kemudian diletakkan pada object glass yang sebelumnya diojaringan dengan poly L-Lysine, lalu dikembangkan dengan hot plate.

5) Deparafinisasi

Tujuan dari Deparafinisasi adalah untuk mengkondisikan jaringan dari kondisi ada parafinnya ke kondisi air.Karena pada saat kita

melakukan pengecatan kondisinya adalah air. Preparat endometriosis pada objek glass direndam dalam Xylol I,II,III, masing-masing 3 menit. Setelah itu direndam ke dalam alkohol absolute I & II, masing-masing 3 menit.Preparat yang telah direndam didalam alkohol absolute kemudian dimasukkan ke dalam larutan alcohol 96%, 90%, 80%, 70%masing-masing 3 menit.Setelah itu dibilas menggunakan air mengalir selama 5 menit.

6) Pewarnaan

Pewarnaan ini bertujuan untuk memudahkan melihat perubahan pada jaringan.Sediaan jaringan endometriosis diwarnai dengan metode immunohistokimia, sehingga dapat dilihat ekspresi Cyclooxygenase-2 (COX-2) dan ekspresi Prostaglandin E-2 (PGE2) pada jaringan endometriosis. Adapun langkah-langkah pewarnaan adalah sebagai berikut :

a. Jaringan yang telah dikeringkan, dimasukkan ke dalam larutan hydrogen peroksida selama 5-10 menit, dan kemudian dicuci dengan PBS 2 kali masing-masing selama 4 menit.
b. Kemudian preparat direndam dengan trypsin (0,025%) selama 15 menit dalam incubator dengan suhu 37°C, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak dua kali selama 4 menit.
c. Preparat kemudian diteteskan Ultra V blok selama 5 menit, dan tidak boleh selama 10 menit kemudian dibilas.
d. Setelah itu kemudian diberikan antibody primer :Mouse anti-human COX-2 monoclonal antibody (Cayman Chemical Co.) dan Mouse anti-human PGE-2 monoclonal antibody selama 60 menit. Setelah

itu dicuci dengan PBS sebanyak dua kali masing-masing selama 4 menit.

e. Preparat yang telah diberkan antibody, kemudian diteteskan Biotnylated link drop (yellow) selama 30 menit. Setelah itu dicuci dengan PBS sebanyak dua kali selama 4 menit.

f. Kemudian preparat diberikan streptavidin drops (yellow) selama 30 menit dan kemudian dicuci dengan PBS sebanyak dua kali selama 4 menit.

g. Setelah itu diberikan DAB (3.3 diamninobenzena) chromogen yang diencerkan dengan diluent 2% selama 6-10 menit. Kemudian dicuci dengan PBS sebanyak dua kali masing-masing selama 4 menit. Dan kemudian diberikan aquadest selama 4 menit.

7) Counterstain

a. Preparat yang telah dilakukan staining, kemudian dilakukan counterstain dengan menggunakan pewarna mayers selama 3-10 menit. Setelah itu dicuci dengan menggunakan air mengalir selama 5 menit.

b. Preparat kemudian direndam dengan amoniak air selama 3 menit. Setelah itu dilakukan perendaman ke dalam aquadest selama 3-5 menit.

8) Mounting

Jaringan yang telah diwarnai kemudian ditempatkan pada kaca obyek (obyek glass) yang ditutup dengan kaca penutup (cover glass) yang sebelumnya telah ditetesi dengan entellan.

9) Pemeriksaan dengan mikroskop

Jaringan diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali.Pada rata-rata 5 lapangan pandang.Seluruh pemeriksaan ini menggunakan mikroskop cahaya biasa merk Nikkon H600L, yang telah dilengkapi dengan digital kamera DS F12 300 megapixel dan soft ware pengolahan gambar Nikon Image System.

10) Pembuangan Hewan Coba

Setelah selesai diambil organ, mencit dimasukkan kedalam suatu alat khusus untuk dihancurkan, sehingga menghindari pencemaran lingkungan.

4.8 Analisis Data

Dalam penelitian ini teknik analisis yang digunakan melalui 4 tahapan perhitungan yaitu uji normalitas dan homogenitas data sampel prasyarat *Uji one way Anova*, dilanjutkan dengan uji lanjutan yaitu *post hoc test* dengan *uji Tukey*, untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan yang paling berpengaruh. Uji statistik dilakukan pada taraf kepercayaan 95% (α = 0.05). Kemudian dilakukan juga uji Korelasi dan Regresi Sederhana

4.8.1 Prasyarat Uji Parametik atau uji normalitas data

Untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah dianjurkan maka dipilih pendekatan uji statistik yang digunakan yaitu uji statistik parametrik.Sebelumnya harus dilakukan analisis terlebih dahulu dengan uji prasyarat parametrik, yaitu data sampel dari variable terukur diuji terlebih dahulu apakah data tersebar atau terdistribusi normal.Uji

normalitas data dalam penelitian ini digunakan *uji Shapiro-Wilk*.Pada uji ini kreteria 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 signifikasi α= 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 signifikasi α=0.05, maka disimpulkan data tidak terdistribusi normal, sehingga uji parametrik tidak dapat digunakan (Santosa,2005).

Uji homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan uji Levene. Asumsi homogenitas ragam dikatakan terpenuhi jika p-value hasil perhitungan lebih besar daripada α=0.05. adapun variabel terukur yang diuji dengan prasyarat uji parametric adalah ekspresi *Cyclooxygenase-2 (COX-2)* dan *ekspresi Prostaglandin E-2 (PGE2).*

4.8.2 Uji One Way Anova

Digunakan untuk mengetahui pengaruh variabel dan membandingkan rerata variabel terukur antara kelompok sampel kontrol (tanpa pemberian obat) dengan perlakuan (pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest).Analisis ini dilakukan yaitu terhadap data ekspresi Cyclooxygenase-2 (COX-2) dan ekspresi Prostaglandin E-2 (PGE-2).

Tujuan teknik analisis ini digunakan adalah untuk mengetahui ada atau tidak ada pengaruh pemberian Genistein berbagai dosis, Leuprolide Acetat dan Dienogest pada mencit (*Mus Musculus*).Jika pada *uji Anova One Way* ini menghasilkan kesimpulan Ho ditolak atau kesimpulan ada

perbedaan yang bermakna (signifikan).Maka analisis dilanjutkan dengan *Post Hoc Test Tukey.*

4.8.3 Uji Post Hoc Test *(Uji Tukey)*

Uji Tukey ini digunakan jika analiss data dalam penelitian dilakukan dengan membandingkan kedua kelompok yang sampel memiliki jumlah yang sama. Uji ini juga dipergunakan untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan paling berpengaruh (Dahlan, 2012). Pada penelitian ini *uji tukey* digunakan untuk melihat dosis Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest yang manakah yang paling optimal.

4.8.4 Uji Korelasi

Adalah metode statistik yang digunakan untuk menentukan atau menguji ada atau tidak adanya keeratan hubungan dua variabel terukur yaitu korelasi antara dosis obat dengan parameter yang diukur, dapat juga digunakan untuk mengukur derajat hubungan linea, dimana semakin kuat atau tinggi derajat hubungan garis lurus antara kedua variabel atau lebih. Dalam penelitian ini digunakan uji Korelasi Pearson jika data terdistribusi normal, tetapi jika tidak maka digunakan uji Spearman's rho. Kreteria keputusan berdasarkan nilai Sig ataup-value, jika p-value >α=0.05 maka disimpulkan tidak ada korelasi yang bermakna antar dua variabel, dan jika p-value <α=0.05 maka disimpulkan ada korelasi yang bermakna antar dua variabel. Selanjutnya tingkat keeratan hubungan (Koefisien Korelasi/KK) dapt diartikan ke dalam tujuh tingkatan (Hasan, 2012) sebagai berikut :

- KK=0, tidak ada korelasi
- 0<KK≤0.20, korelasi sangat rendah/lemah tapi pasti

- 0.20<KK≤0.40, korelasi rendah/lemah tapi pasti
- 0.40<KK≤ 0.70, korelasi yang cukup berarti
- 0.70<KK≤0.90, korelasi yang tinggi; kuat
- 0.90<KK,1.00. korelasi sangat tinggi;kuat sekali,dapat diandalkan
- Kk=1, korelasi sempurna.

Repository Universitas Brawijaya
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
REPOSITORY.UB.AC.ID

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian ini merupakan penelitian *in vivo* dengan menggunakan sampel penelitian mencit betina, yang dibuat menjadi mencit model endometriosis. Dalam penelitian ini terdapat 7 kelompok dengan total jumlah 35 ekor mencit termasuk 1 ekor mencit dimasing-masing sebagai cadangan. Dari 7 kelompok tersebut 6 kelompok merupakan mencit model endometriosis dan 1 kelompok adalah mencit betina sehat. Jumlah perhitungan sampel untuk masing-masing kelompok dilakukan yang akan dilakukan pemeriksaan yaitu sejumlah 4 ekor mencit. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga (FKH UNAIR) Surabaya yang dilaksanakan pada bulan Desember 2015 - Januari 2016.

Gejala yang umum didapati pada penderita endometriosis timbulnya keluhan nyeri seperti dismenorea, nyeri pelvik dan dispareunia. Selain gejala tersebut juga didapti gejala tambahan seperti massa dalam pelvik, yang mana massa ini akan mengalami pembesaran seiring dengan berjalannya siklus haid. Oleh karena itu pada uterus wanita dengan endometriosis didapati pembesaran daripada uterus normal. Demikian juga pada mencit model endometriosis didapati pembesaran ukuran uterus dibandingkan dengan mencit kontrol negatif. Hal ini terlihat saat dilakukan terminasi dan dilihat secara visual bentuk dari uterus mencit model endometriosis mengalami pembesaran.

5.1. Gambaran Umum Mencit Endometriosis, Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE-2

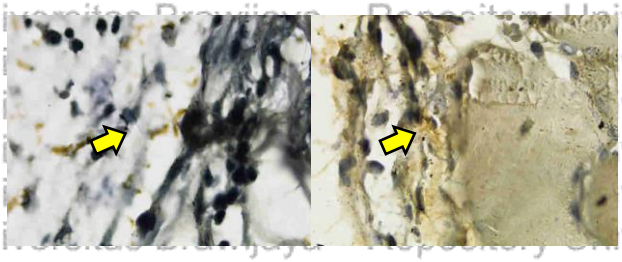
5.1.1. Gambaran Umum Mencit Model Endometriosis

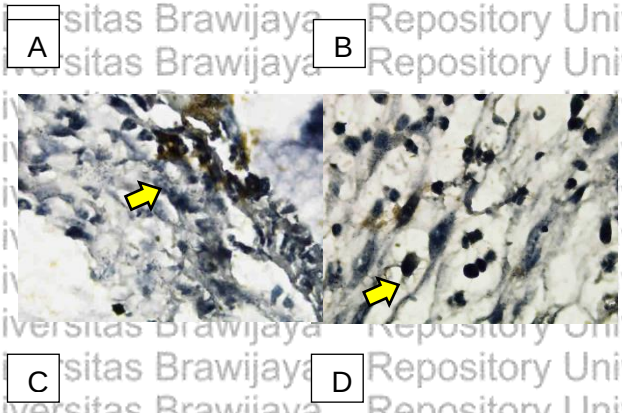
Tujuan dalam penelitian adalah untuk menganalisa pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap penurunan ekspresi COX-2 dan PGE-2 pada mencit model endometriosis. Pembuatan mencit model endometriosis dilakukan selama 14 hari, Pada hari ke 15, mencit sudah menjadi model endometriosis. Pembuktian mencit model endometriosis dibuktikan melalui visual lesi endometriosis dan pemeriksaan *imunohistokimia* (IHC) terhadap ekspresi RE-α dan ekspresi RE-β, yang dapat dilihat pada gambar dihalaman selanjutnya :

A B

Gambar 5.1 Jaringan peritoneum pada mencit model endometriosis

Keterangan :(A)Evaluasi visual jaringan peritoneum pada mencit model endometriosis, tampak adanya lesi endometriosis pada panah dan hepervaskularisasi pembuluh darah. (B) Evaluasi visual jaringan peritoneum pada mencit model endometriosis, tampak pada panah adanya lesi endometriosis dan hipervaskularisasi pembuluh darah.

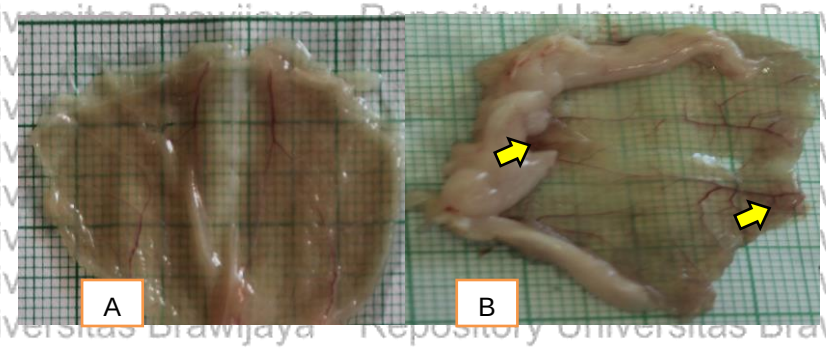




Gambar 5.2 Gambaran Perbandingan Ekspresi ER-α dan ER-β pada Mencit Model Endometriosis.

Keterangan : (A) Menunjukkan adanya Ekspresi ER-α yang kuat pada jaringan peritoneum mencit model endometriosis dan (B) Ekspresi ER-β yang kuat pada jaringan peritoneum mencit model endometriosis. Sedangkan (C) menunjukkan adanya Ekspresi ER-α yang kuat pada jaringan peritoneum mencit model endometriosis dan (D) Ekspresi ER-β yang kuat pada jaringan peritoneum mencit model endometriosis.

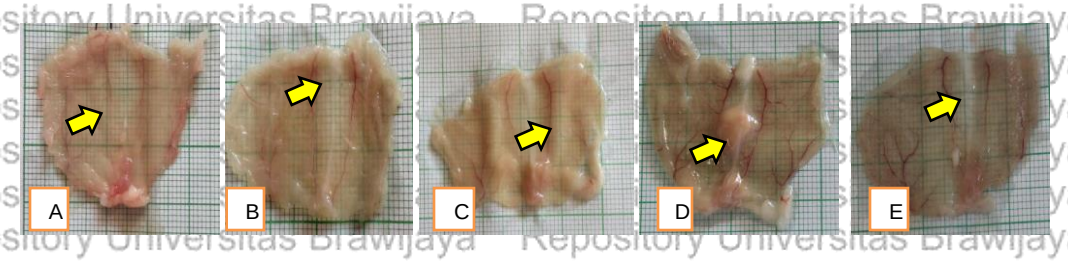
Mencit model yang telah menjadi endometriosis pada hari ke-15 mulai dilakukan papar pada kelompok perlakuan dengan berbagai dosis Genistein yaitu G1 (dosis 0.78mg/hari), G2 (1.04mg/hari), G3 (1.30mg/hari), Leuprolide Acetat (LA) (dosis 0.00975mg/5 hari) dan Dienogest (D) (0.0052mg/hari). Dan pada hari ke-30 dilakukan terminasi pada semua mencit model endometriosis termasuk pada kelompok kontrol negative (K-), kelompok kontrol positif (K+) dan kelompok yang telah dipapar dengan genistein berbagai dosis, leuprolide acetat dan dienogest kemudian diambil lesi pada jaringan peritoneum mencit, yang dapat dilihat pada gambar 5.3 dibawah ini :



Gambar 5.3 Lesi kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif

Keterangan : (A) Kelompok kontrol negative atau mencit yang sehat, sedangkan (B) Kelompok kontrol positif atau mencit model endometriosis tanpa perlakuan dimana tanda panah menunjukkan adanya nodul lesi endometriosis dan terlihat adanya hipervaskularisasi.

Hasil pembedahan jaringan peritoneum mencit model endometriosis yang telah dipapar dengan Genistein berbagai dosis, Leuprolide Acetat dan Dienogest yang dapat dilihat pada Gambar 5.4 dibawah ini :



Gambar 5.4 Jaringan peritoneum mencit model endometriosis yang telah diberikan perlakuan

Keterangan : (A) Genistein 1 dosis 0,78 mg/hari (B) Genistein 2 dosis1,04 mg/hari (C) Genistein 3 dosis 1,3 mg/hari (D) Leuprolide Acetat dosis 0.00975mg/5hari (E) Dienogest dosis 0.0052mg/hari

Selanjutnya dilakukan pemeriksaan ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2 menggunakan teknik immunohistokimia. Ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2 pada setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut *Remmele and Stegner* (1986) yang sudah dimodifikasi, dimana indeks skala remmele menggunakan IRS (*Immune Reactive Score*), merupakan hasil perkalian antara skor prosentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif (Nowak *et al.,*2007). Data setiap sampel merupakan nilai rata-rata IRS yang teramati pada 5 (lima) Lapangan Pandang (LP) berbeda pada pembesaran 400 kali. Pembacaan hasil immunohistokimia dilakukan oleh ahli Patologi Anatomi. Cara perhitungan IRS dapat dilihat pada tabel 5.1, sebagai berikut :

Tabel 5.1. Skala Semikuantitatif IRS (*Nowak et al.,* 2007)

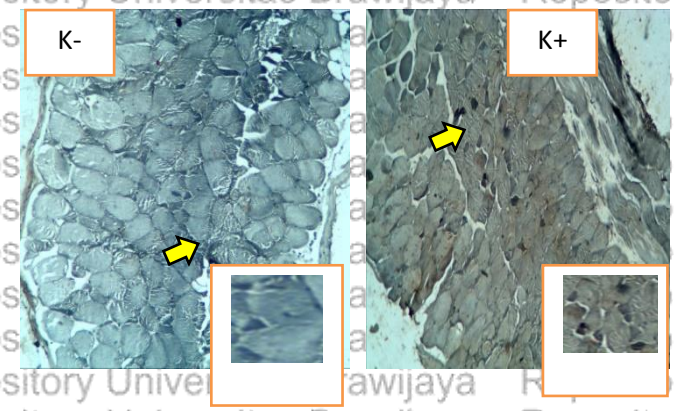
A	B
Skor 0 : tidak ada sel positif	Skor 0 : tidak ada reaksi warna
Skor 1 : Sel positif kurang dari 10%	Skor 1 : Intensitas warna lemah
Skor 2 : Sel positif antara dari 11% - 50%	Skor 2 : Intensitas warna sedang
Skor 3 : Sel positif antara dari 51% - 80%	Skor 3 : Intensitas warna kuat
Skor4: Sel positif antara dari lebih dari 80%	

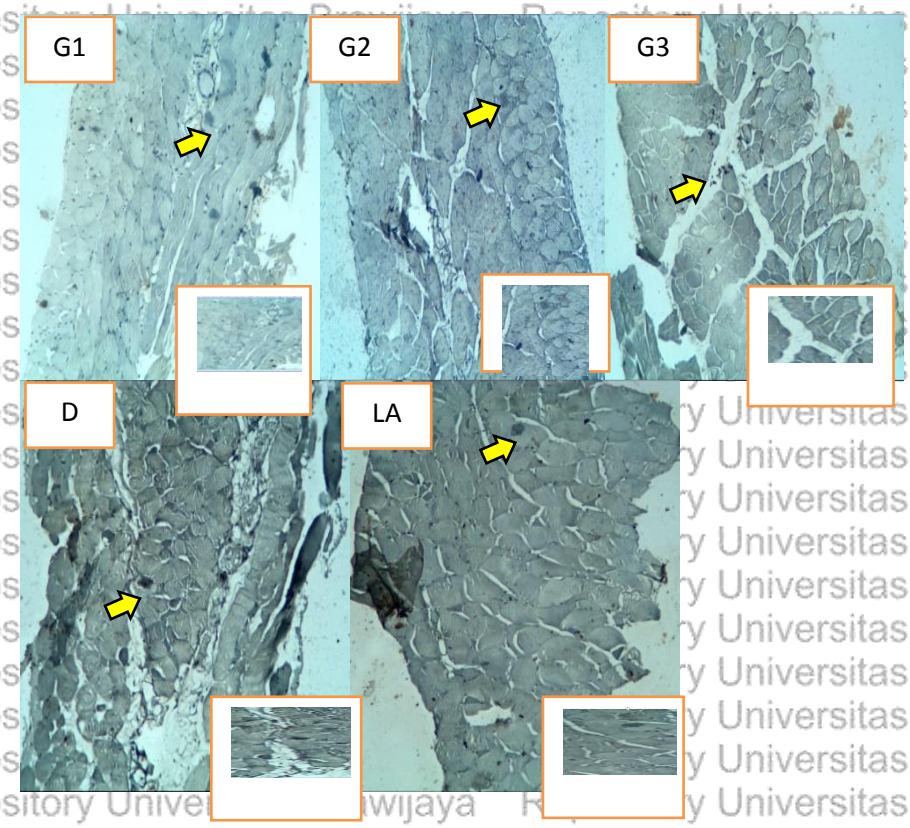
Keterangan : Skala semikuantitatif IRS merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel positif (A) dengan Skor Intesitas reaksi warna (B),
jadi IRS = (A x B)

5.1.3. Gambaran Ekspresi COX-2 Pada Pemeriksaan Immunohistokimia

Hasil dari pemeriksaan immunohistokimia didapatkan gambaran ekspresi COX-2 pada kelompok kontrol negatif (K-) terlihat tidak adanya sel positif dan tidak terlihat reaksi warna, dan pada kontrol positif (K+) terlihat warna coklat pada jaringan peritoneum yang menunjukkan bahwa ekspresi COX-2 nampak cukup kuat.

Sedangkan pada kelompok perlakuan didapatkan ekspresi COX-2 pada setiap perlakuan mengalami penurunan, kecuali pada kelompok leuprolide acetat (LA) nampak lebih kuat diantara kelompok yang lain, sedangkan pada kelompok perlakuan genistein dosis 0.78mg/hari (G1) terlihat paling lemah dibandingkan kelompok yang lain seperti terlihat pada gambar 5.5 dibawah ini:





Gambar 5.3. Gambaran perbandingan ekspresi COX-2 pada Jaringan Peritonium

Keterangan : Perbandingan ekspresi Cox-2 menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol positif (K+) memiliki intensitas warna kecoklatan paling jelas hal ini menunjukkan ekspresi COX-2 K+ sangat kuat dibandingkan kelompok lainnya. sebaliknya pada kelompok G1 tingkat reaksi warna terlihat paling lemah mendekati tingkat reaksi warna pada K-, namun nilai rerata *immuno reactive score* (IRS) diantara kelompok perlakuan relatif sama.

Hasil IRS pada pemeriksaan ekspresi COX-2 pada jaringan peritoneum mencit dapat dilihat pada tabel 5.2 sebagai berikut :

Tabel 5.2 IRS Ekspresi COX-2 pada Jaringan peritoneum

Kelompok	IRS (mean ± SD)
K-	2.3 ± 0.53
K+	3.6 ± 0.82
G1	2.2 ± 0.37
G2	2.65 ± 0.34
G3	2.25 ± 0.30
LA	3.15 ± 0.62
D	2.65 ± 0.41

Keterangan : Rerata IRS pada kelompok K+ lebih tinggi daripada K-, sedangkan pada masing-masing perlakuan mengalami penurunan

K- : Mencit sehat tanpa paparan

K+ : Mencit model endometriosis tanpa paparan

G1 : Mencit model endometriosis dipapar genistein dosis 0,78mg/hari

G2 : Mencit model endometriosis dipapar genistein dosis 1,04mg/hari

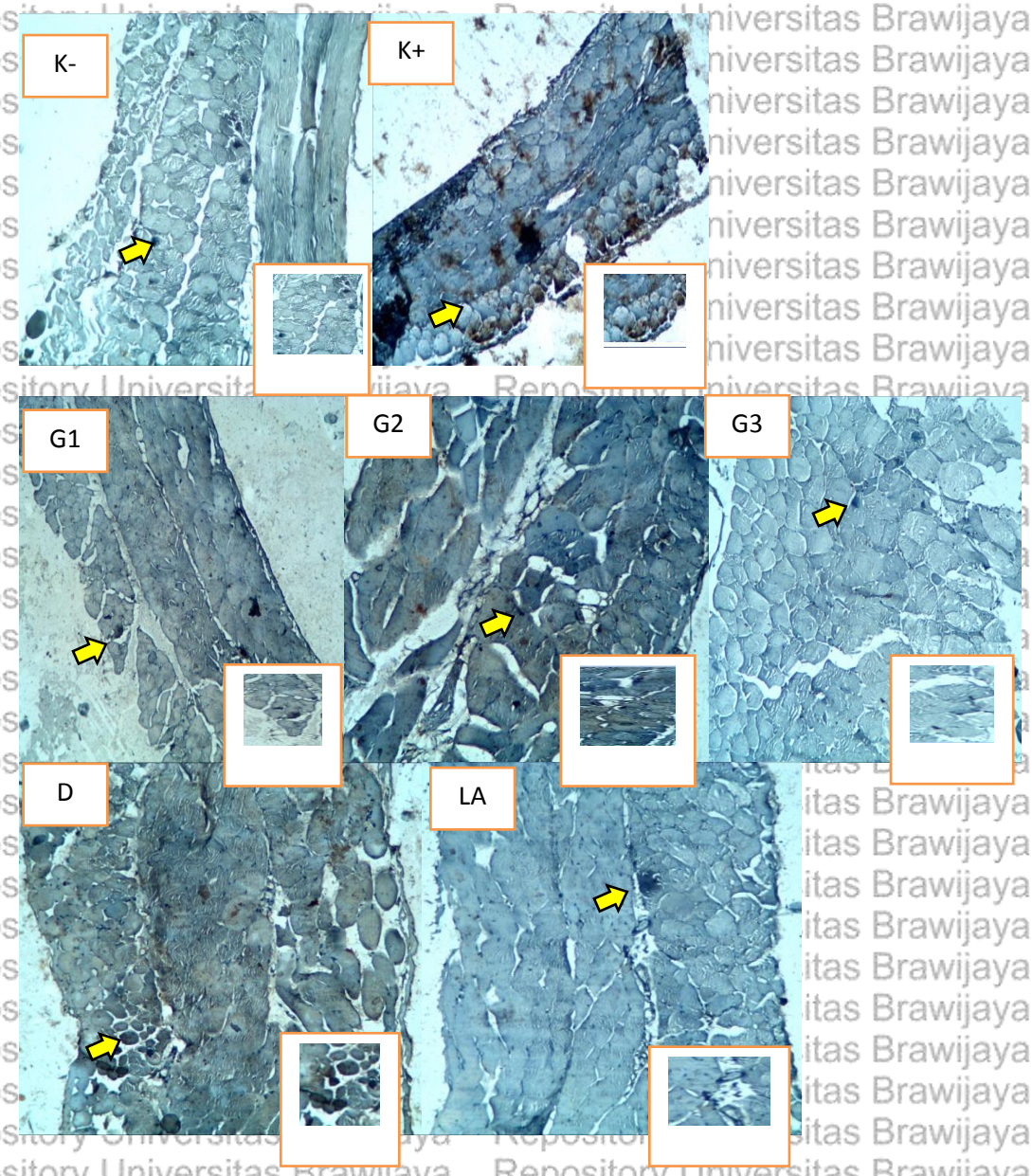
G3 : Mencit model endometriosis dipapar genistein dosis 1,30mg/hari

LA : Mencit model endometriosis dipapar leuprolide acetat dosis 0.00976mg/5hari

D : Mencit model endometriosis dipapar dionogest dosis 0.0052mg/hari

5.1.3. Gambaran Ekspresi PGE-2 Pada Pemeriksaan Immunohistokimia

Hasil pemeriksaan immunohistokimia didapatkan gambaran ekspresi PGE-2 pada kelompok kontrol negatif (K-) terlihat tidak adanya sel positif dan tidak terlihat reaksi warna, sedangkan pada kontrol positif (K+) terlihat warna coklat pada jaringan peritoneum yang menunjukkan bahwa ekspresi PGE-2 nampak cukup kuat. Dan pada kelompok perlakuan didapatkan ekspresi PGE-2 pada setiap perlakuan mengalami penurunan, kecuali pada kelompok leuprolide acetat (LA) nampak lebih kuat diantara kelompok yang lain, sedangkan pada kelompok perlakuan genistein dosis 1.30mg/hari (G3) terlihat paling lemah dibandingkan kelompok yang lain seperti terlihat pada gambar seperti yang terlihat pada gambar 5.4 dibawah ini:



Gambar 5.4. Gambaran Perbandingan Ekspresi PGE-2 pada peritoneum

Keterangan : Perbandingan ekspresi PGE-2 menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol positif (K+) memiliki intensitas warna kecoklatan paling jelas hal ini menunjukkan ekspresi PGE-2 K+ sangat kuat dibandingkan kelompok lainnya. sebaliknya pada kelompok G3 tingkat reaksi warna terlihat paling lemah, namun nilai rerata *immuno reactive score* (IRS) diantara kelompok perlakuan relatif sama.

Repository Universitas Brawijaya
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
REPOSITORY.UB.AC.ID

Hasil IRS pada pemeriksaan ekspresi PGE-2 pada jaringan peritoneum mencit dapat dilihat pada tabel 5.3 sebagai berikut :

Tabel 5.3. IRS Ekspresi PGE-2 pada jaringan peritoneum

Kelompok	IRS (mean ± SD)
K-	1.75 ± 0.50
K+	3.9 ± 0.96
G1	2.2 ± 0.43
G2	2.4 ± 0.43
G3	1.9 ± 0.26
LA	2.85 ± 0.66
D	2.1 ± 0.26

Keterangan : Rerata IRS pada kelompok K+ lebih tinggi daripada K-, sedangkan pada masing-masing perlakuan mengalami penurunan

5.2. Pengujian Asumsi yang Melandasi ANOVA

Pengujian Ekspresi COX-2 dan PGE-2 dengan menggunakan 7 level kelompok yang terbagi atas K-, K+,3 level dosis Genistein, 1 level dosis Leuprolide Acetat, dan 1 level dosis Dienogest dilakukan dengan menggunakan ANOVA. Namun, sebelum dilakukan pengujian ekspresi COX-2 dan PGE-2 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 α = 0,05. Dengan menggunakan bantuan software SPSS didapatkan hasil pengujian asumsi normalitas sebagai berikut :

Tabel 5.4. Uji Asumsi Normalitas

Variabel	Koefisien	P-value	Keterangan
COX-2	0.927	0.052	Normal
PGE2	0.968	0.528	Normal

Berdasarkan pada tabel 5.4 di atas, ekspresi COX-2 dan PGE-2 didapatkan p-value lebih besar daripada α = 0,05 (p>0,05). Sehingga, dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa asumsi normalitas ekspresi COX-2 dan PGE-2 telah terpenuhi.

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

Tabel 5.5. Uji Homogenitas Ragam

Variabel	Koefisien	p-value	Keterangan

COX-2	1.031	0.433	Homogen
PGE2	1.250	0.322	Homogen

Berdasarkan tabel 5.5. di atas, variabel ekspresi COX-2 dan PGE-2 didapatkan p-value lebih besar daripada α = 0,05 (p>0,05). Sehingga, dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa asumsi homogenitas ragam kedua variabel tersebut telah terpenuhi. Oleh karena itu, proses pengujian secara statistik dilakukan dengan ANOVA.

5.3. Hasil Uji Ekspresi COX-2 dan PGE-2

Setelah kedua asumsi yang melandasi ANOVA telah terpenuhi, selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, dan Dienogest terhadap ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2.

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA pada ekspresi COX-2, didapatkan p-value sebesar 0,007, lebih kecil daripada α = 0,05 (p<0,05). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, dan Dienogest terhadap ekspresi COX-2. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi COX-2 akibat pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, dan Dienogest.

Hasil uji Tukey 5 %, menunjukkan bahwa kelompok K+ memiliki rata-rata ekspresi COX-2 yang paling tinggi. Penurunan ekspresi COX-2 secara signifikan ditunjukkan oleh pemberian genistein dosis 0.78 mg/hari (G1) dan 1.3 mg/hari (G3). Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata ± sd kelompok pemberian genistein (G1 dan

G3) memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif, dapat dilihat dalam tabel dibawah ini :

Tabel 5.6 Pengujian Pengaruh GenisteinTerhadap Ekspresi COX-2 dengan ANOVA dan Tukey 5%

Perlakuan	Rata-Rata ± SD		p-value
K-	2.3 ± 0.53	a	
K+	3.6 ± 0.82	b	
G1	2.2 ± 0.37	a	
G2	2.65 ± 0.34	ab	0.007
G3	2.25 ± 0.30	a	
LA	3.15 ± 0.62	ab	
D	2.65 ± 0.41	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).

K- : Mencit sehat tanpa paparan

K+ : Mencit model endometriosis tanpa paparan

G1 : Mencit model endometriosis yang dipapar genistein dosis 0,78mg/hari

G2 : Mencit model endometriosis yang dipapar genistein dosis 1,04mg/hari

G3 : Mencit model endometriosis yang dipapar genistein dosis 1,30mg/hari

LA :Mencit model endometriosis yang dipapar leuprolide acetat dosis 0,00975mg/hari

D : Mencit model endometriosis yang dipapar dionogest dosis 0,0052mg/hari

Hasil analisis dengan menggunakan ANOVA pada ekspresi PGE-2 , didapatkan p-value sebesar 0,000, lebih kecil daripada α = 0,05 (p<0,05). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, dan Dienogest terhadap ekspresi PGE-2. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi PGE-2 akibat pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, dan Dienogest.

Pada hasil uji Tukey 5 % pada ekspresi PGE-2, ditunjukkan bahwa kelompok K+ memiliki rata-rata ekspresi PGE-2 yang paling tinggi. Penurunan ekspresi PGE-2 secara signifikan ditunjukkan oleh pemberian genistein semua dosis (G1, G2, dan G3) dan Dienogest. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata ± sd kelompok pemberian genistein (G1, G2, dan G3) dan Dienogest memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif, seperti pada tabel dibawah ini :

Tabel 5.7. Pengujian Pengaruh GenisteinTerhadap Ekspresi PGE-2 dengan ANOVA danTukey 5%

Perlakuan	Rata-Rata ± SD		p-Value
K-	1.75 ± 0.50	a	
K+	3.9 ± 0.96	b	
G1	2.2 ± 0.43	a	
G2	2.4 ± 0.43	a	0.000
G3	1.9 ± 0.26	a	
LA	2.85 ± 0.66	ab	
D	2.1 ± 0.26	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).

K- : Mencit sehat tanpa paparan

K+ : Mencit model endometriosis tanpa paparan

G1 : Mencit model endometriosis yang dipapar genistein dosis 0,78mg/hari

G2 : Mencit model endometriosis yang dipapar genistein dosis 1,04mg/hari

G3 : Mencit model endometriosis yang dipapar genistein dosis 1,30mg/hari

LA :Mencit model endometriosis yang dipapar leuprolide acetat dosis 0,00975mg/hari

D : Mencit model endometriosis yang dipapar dionogest dosis 0,0052mg/hari

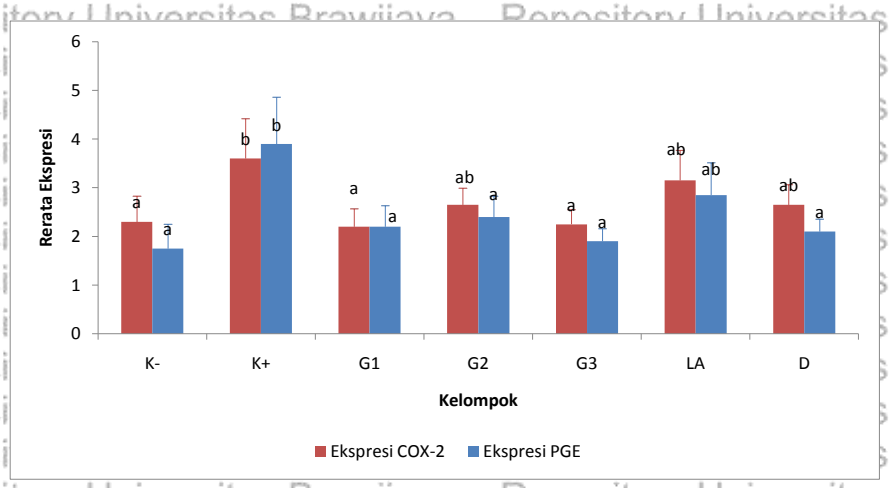
Perbandingan ekspresi COX-2 antara kelompok K- dengan K+ didapatkan p-value sebesar 0,025. P-value kurang dari 0,05 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi COX-2 antara kelompok mencit yang sehat dengan mencit endometriosis. Selisih rata-rata (mean difference) bernilai negative menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi COX-2 kelompok K+ lebih tinggi dari pada kelompok K-. Hal ini mengindikasikan adanya peningkatan ekspresi COX-2 yang signifikan pada mencit model endometriosis. Sedangkan perbandingan ekspresi PGE-2 antara kelompok K- dengan K+ didapatkan p-value sebesar 0,000. P-value kurang dari 0,05 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi PGE-2 antara kelompok mencit yang sehat dengan mencit endometriosis.Selisih rata-rata (mean difference) bernilai negative menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi PGE-2 kelompok K+ lebih tinggi dari pada kelompok K-. Hal ini mengindikasikan adanya peningkatan ekspresi PGE-2 yang signifikan pada mencit model endometriosis.

Perbandingan kelompok K- dengan semua kelompok perlakuan pada ekspresi COX-2, ditunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan memiliki p-value lebih dari 0.05 (p>0.05). Hal ini mengandung pengertian tidak terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi COX-2 antara kelompok K- dengan kelompok perlakuan. Artinya, pemberian Genistein pada berbagai dosis, Leuprolide Acetat, dan Dienogest mampu menurunkan ekspresi COX-2 mendekati mencit sehat. Pada perbandingan K+ dengan kelompok perlakuan, pada kelompok perlakuan G1 dan G3, didapatkan p-value kurang dari 0,05. Hasil pengujian ini menunjukkan adanya penurunan ekspresi COX-2 secara signifikan terjadi akibat pemberian genistein dosis 0.78 mg/hari (G1) dan1.3 mg/hari (G3). Perbandingan rata-rata ekspresi COX-2 antar kelompok perlakuan, didapatkan p-value lebih dari 0,05 yang mengandung pengertian bahwa rata-rata ekspresi COX-2 kelompok pada semua kelompok perlakuan tidak berbeda signifikan.

Sedangkan perbandingan ekspresi PGE-2 pada kelompok K- dengan semua kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan memiliki p-value lebih dari 0.05 (p>0.05). Hal ini mengandung pengertian tidak terdapat perbedaan signifikan rata-rata ekspresi PGE2 antara kelompok K- dengan kelompok perlakuan. Artinya, pemberian genistein pada berbagai dosis, Leuprolide Acetat, dan Dienogest mampu menurunkan ekspresi PGE2 mendekati mencit sehat. Pada perbandingan K+ dengan kelompok perlakuan, pada kelompok perlakuan G1, G2, G3, dan D, didapatkan p-value kurang dari 0,05. Hasil pengujian ini menunjukkan adanya penurunan ekspresi PGE-2 secara signifikan terjadi akibat pemberian Genistein dosis 0.78 mg/hari (G1), 1.04 mg/hari (G2), 1.3 mg/hari (G3), dan Dienogest (D). Sedangkan perbandingan rata-rata ekspresi PGE-2 antara kelompok

perlakuan, didapatkan p-value lebih dari 0,05 yang mengandung pengertian bahwa rata-rata ekspresi PGE-2 pada semua kelompok perlakuan tidak berbeda signifikan.

Perbedaan rata-rata ekspresi COX-2 dan PGE-2 kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :



Gambar 5.5. Histogram Rata-Rata Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE-2

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).

K- : Mencit sehat tanpa paparan

K+ : Mencit model endometriosis tanpa paparan

G1 : Mencit model endometriosis dipapar genistein dosis 0,78mg/hari

G2 : Mencit model endometriosis dipapar genistein dosis 1,04mg/hari

G3 : Mencit model endometriosis dipapar genistein dosis 1,30mg/hari

LA : Mencit model endometriosis dipapar leuprolide acetat dosis

0.00976mg/5hari

D : Mencit model endometriosis dipapar dionogest dosis 0.0052mg/hari

Pada Gambar 5.5. ditunjukkan histogram rata-rata ekspresi COX-2 dan PGE-2 pada semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimana pada rata-rata ekspresi COX-2 paling tinggi didapatkan pada kelompok K+. dan rata-rata ekspresi COX-2 menurun pada kelompok perlakuan, baik pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, maupun Dienogest, dengan rata-rata ekspresi COX-2 paling rendah didapatkan pada kelompok perlakuan pemberian Genistein dosis 0.78 mg/hari (G1). Sedangkan rata-rata ekspresi PGE-2 semua kelompok baik kontrol dan perlakuan didapati rata-rata ekspresi PGE-2 menurun pada kelompok perlakuan baik pada pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, maupun Dienogest, dengan rata-rata ekspresi PGE-2 paling rendah didapatkan pada kelompok perlakuan pemberian Genistein dosis 1.30mg/hari (G3).

5.4. Hasil Analisis Regresi Pengaruh Genistein berbagai Dosis terhadap Ekspresi COX-2 dan PGE2

Untuk mengetahui pengaruh pemberian genistein terhadap ekspresi COX-2 dan PGE-2 dilakukan pengujian dengan menggunakan analisis analisis regresi. Berdasarkan hasil analisis, didapatkan hasil analisis regresi sebagai berikut :

Tabel 5.8 Hasil Analisis Regresi COX-2 dan PGE-2

Variabel Terikat	Persamaan Regresi	p-value	Korelasi dan p-value	R-Square
COX-2	Y1 = 3.457 - 1.003 X	0.003	r = -0.687 p = 0.003	47.17%

PGE2	Y2 = 3.779 - 1.511 X	0.000	r = -0.797 p = 0,000	63.55%

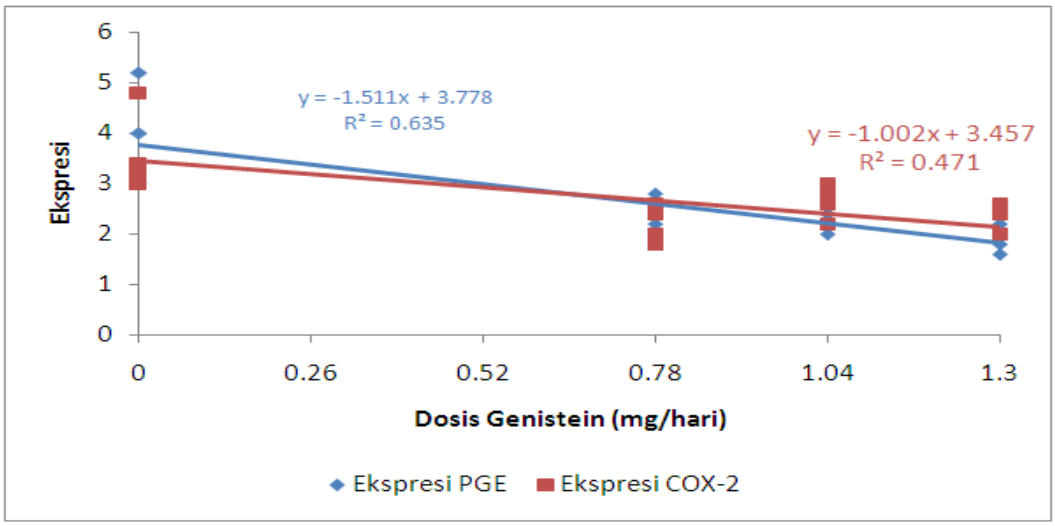
Dimana :

Y1 : Ekspresi COX-2

Y2 : Ekspresi PGE-2

X : Dosis Genistein

Berikut scatter plot hubungan antara pemberian genistein terhadap ekspresi COX-2 dan PGE-2:



Gambar 5.6.Scatter Plot Pengaruh Genistein terhadap Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE-2

Berdasarkan hasil analisis regresi ekspresi COX-2 dan PGE-2, didapatkan koefisien regresi sebesar -1,003 dengan p-value sebesar 0,003. Koefisien determinasi (R-square) sebesar 47,17% menunjukkan bahwa keragaman data

yang dijelaskan oleh pengaruh pemberian genistein terhadap penurunan ekspresi COX-2 sebesar 47.17%. Sisanya sebesar 52.83% dijelaskan oleh faktor lain yang tidak diteliti dan error. Koefisien regresi bernilai negatif (-1.003) mengandung pengertian bahwa pemberian genistein berpengaruh negatif terhadap ekspresi COX-2. Semakin tinggi dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis, maka berdampak pada penurunan ekspresi COX-2.

Hasil analisis regresi ekspresi PGE-2, didapatkan koefisien regresi sebesar -1,511 dengan p-value sebesar 0,000. Koefisien determinasi (R-square) sebesar 63.55% menunjukkan bahwa keragaman data yang dijelaskan oleh pengaruh pemberian genistein terhadap penurunan ekspresi PGE-2 sebesar 63.55%. Sisanya sebesar 36.45% dijelaskan oleh faktor lain yang tidak diteliti dan error. Koefisien regresi bernilai negatif (-1.511) mengandung pengertian bahwa pemberian genistein berpengaruh negatif terhadap ekspresi PGE-2. Semakin tinggi dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis, maka akan berdampak pada penurunan ekspresi PGE-2.

5.5. Pengujian Hubungan Antara Dosis Genistein dengan Ekspresi COX-2 dan PGE-2

Untuk mengetahui hubungan antara dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis dengan ekspresi COX-2 dan PGE-2 dapat dilakukan pengujian dengan menggunakan analisis Korelasi Pearson. Berdasarkan hasil analisis yang dilakukan, didapatkan hasil analisis korelasi sebagai berikut :

Tabel 5.9. Uji Hubungan Antara Dosis Genistein dengan Ekspresi COX-2 dan Ekspresi PGE-2

Hubungan Variabel	Koefisien Korelasi	p-value	Keterangan
Dosis Genistein dengan Ekspresi COX-2	-0.687	0.003	Signifikan
Dosis Genistein dengan Ekspresi PGE-2	-0.797	0.000	Signifikan

Hasil pengujian korelasi Pearson antara dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis dengan ekspresi COX-2 dan PGE-2, didapatkan koefisien korelasi sebesar -0.687 dengan p-value sebesar 0.003 pada ekspresi COX-2 dan -0.797 dengan p-value sebesar 0.000 pada ekspresi PGE-2, dimana P-value kurang dari 0.05 ($p<0.05$) menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2. Koefisien korelasi sebesar-0.687 dan -0.797 menunjukkan adanya hubungan yang cukup kuat antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2. Koefisien korelasi yang negatif menunjukkan adanya hubungan yang negatif antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2 dan PGE-2. Meningkatnya dosis genistein yang diberikan, akan berdampak pada penurunan ekspresi COX-2 dan PGE-2.

BAB 6
PEMBAHASAN

Endometriosis merupakan jaringan (sel-sel kelenjar dan stroma) abnormal yang menyerupai endometrium (*endometrium like tissue*) yang tumbuh disisi luar kavum uterus, dan memicu reaksi peradangan menahun. Pertumbuhan dan peradangan merupakan dua proses patologi dasar yang menimbulkan gejala utama endometriosis yaitu nyeri panggul kronis dan infertilitas. Gejala tambahan seperti massa dalam pelvik, yang mana massa ini akan mengalami pembesaran seiring dengan berjalannya siklus haid. COX-2 merupakan enzim dalam bentuk indusibel, dan tidak terdeteksi dalam semua jaringan normal, akan tetapi COX-2 terinduksi oleh berbagai macam inflamasi dan stimulasi mitogenik. Sedangkan PGE-2 merupakan eicosanoid dengan berbagai fungsi fisiologi dan patologi yang banyak terlibat dalam perkembangan endometriosis. Dari bukti-bukti yang ada menunjukkan bahwa selama endometriosis, PGE-2 mengatur banyak proses patofisiologis termasuk proliferasi sel, pencegahan apoptosis, penekanan kekebalan dan angiogenesis. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan pengaruh pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest terhadap ekspresi COX-2 dan ekspresi PGE-2 pada mencit model endometriosis.

Penelitian ini merupakan penelitian *in vivo* yaitu menggunakan hewan coba mencit model endometriosis, dimana mencit diberikan bahan myometrium dan endometrium yang diambil dari bahan uterus operasi tumor jinak (Adenomyosis) secara intraperitoneal. Berdasarkan penelitian Awwad dkk (1999) menunjukkan bahwa hasil dari pembuatan mencit model endometriosis dengan angka keberhasilan 96,5%. Evaluasi mencit model endometriosis dilakukan dengan cara

visual dengan melihat lesi endometriosis di jaringan peritoneum dimana nampak adanya hipervaskularisasi pembuluh darah dan pertumbuhan jaringan diluar kavum uteri. Evaluasi serupa juga dilakukan pada mencit model endometriosis kontrol positif dan kontrol negatif pada ekspresi COX-2 dan PGE-2. Hasil dari rata-rata ekspresi COX-2 didapatkan peningkatan rata-rata hasil pada kontrol positif 3.6±0.82 dibandingkan rata -rata kontrol negatif 2.3±0.53. Begitu juga hasil rata-rata ekspresi PGE-2 mengalami peningkatan pada kontrol positif 3.9±0.96 dibandingkan kontrol negatif 1.75±0.05.

6.1. Pengaruh Pemberian Genistein Berbagai Dosis Terhadap Ekspresi COX-2 Pada Mencit Model Endometriosis

Berdasarkan perbandingan ekspresi COX-2 antara kelompok K- dengan K+ didapatkan p-value sebesar 0,025. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi COX-2 antara kelompok mencit yang sehat dengan mencit model endometriosis. Selisih rata-rata (mean difference) bernilai negatif menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi COX-2 kelompok K+ lebih tinggi dari pada kelompok K-. Hal ini mengindikasikan adanya peningkatan ekspresi COX-2 yang signifikan pada mencit model endometriosis.

Pada endometrioma peningkatan ekspresi COX-2 banyak dipengaruhi oleh hormonal maupun sitokin pro inflamasi. Regulasi COX-2 juga meningkat pada beberapa kanker, kondisi premaligna dan berperan dalam proses transformasi kearah keganasan didalam ovarium, yang diperkirakan memberikan kontribusi terhadap proliferasi sel, survival dan angiogenesis (Nezhat, 2008). Pada endometriosis menunjukkan COX-2 mRNA lebih tinggi, yang kemungkinan mengakibatkan peningkatan terus menerus COX-2 dan produksi PGE-2. Pada jaringan endometriosis mensintesis androstenedion dari kolesterol melalui aktivitas

StAR dan enzim steroidogenik lainnya. Estradiol langsung menginduksi cyclooxygenase-2 (COX-2), yang menimbulkan peningkatan konsentrasi prostaglandin E2 (PGE2). Interlukin 1-β (IL1-β), VEGF, dan PGE2 juga merupakan induser ampuh COX-2. Ekspresi enzim COX-2 meningkat pada lesi endometriosis dibandingkan dengan ekspresi serupa pada sel stroma endometrium normal (Bulun,2012).

Berdasarkan hasil pengujian pengaruh pemberian genistein berbagai dosis terhadap ekspresi COX-2 menyatakan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pada pemberian genistein berbagai dosis terhadap penurunan ekspresi COX-2. Dan didapatkan data bahwa kelompok K+ memiliki rata-rata ekspresi COX-2 yang paling tinggi, kemudian secara bertahap mengalami penurunan setelah diberikan paparan dengan genistein. Penurunan ekspresi COX-2 yang paling rendah terdapat pada kelompok G1 yang mendapatkan genistein dosis 0,78mg/hari, Dimana penurunan ekspresi COX-2 dalam lesi endometriosis mencit model endometriosis seiring meningkatnya pemberian dosis genistein dan tercapai paling optimum pada dosis 0,78mg/hari.

Seperti diketahui Genistein memiliki peranan dalam mengurangi produksi inflamasi prostanoid, aktivitas COX-2 dan mengubah sinyal sel. Peranan genistein tersebut terjadi dalam proses *down regulation* dari ekspresi COX-2 dan NFkB untuk mengurangi ekspresi PGE-2. Genistein memberikan efek penekanan pada produksi asam yang diturunkan oleh prostanoid arakidonat terutama pada PGE-2 (Siregar *et al*.,2015).

Hasil penelitian Hua Lu.,*et al* (2008) menunjukkan bahwa genistein menghambat ekspresi hemolisa yang diinduksi iNOS dan COX - 2 mRNA di dalam astrosit . Selanjutnya senyawa tersebut menghambat tingkat hemolisa yang

dirangsang oleh NF-κB. Efek inhibisi genistein akan dimediasi oleh ekspresi hemolisa yang diinduksi iNOS dan COX - 2 di bawah aktivasi NF - κB pada tingkat transkripsi.

Penelitian menyebutkan bahwa isoflavon kedelai dalam genistein terbukti efektif menekan produksi sitokin yang berimplikasi anti-inflamasi dan berpotensi kemopreventif. Salah satu enzim proinflamasi yang penting dalam mengkatalisis pembentukan prostaglandin dari asam arakidonat, dan berperan penting dalam proses peradangan.

Berdasarkan hasil pengujian Korelasi Pearson antara dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis dengan ekspresi COX-2, didapatkan hubungan yang signifikan dan cukup kuat antara dosis genistein dengan ekspresi COX-2. Sehingga dengan meningkatnya dosis genistein yang diberikan, akan berdampak pada penurunan ekspresi COX-2. Sedangkan berdasarkan hasil analisis regresi ekspresi COX-2, menunjukkan bahwa keragaman data yang dijelaskan oleh pengaruh pemberian genistein terhadap penurunan ekspresi COX-2 sebesar 47.17%. Sisanya sebesar 52.83% dijelaskan oleh faktor lain yang tidak diteliti dan error. Koefisien regresi bernilai negatif (-1.003) mengandung pengertian bahwa pemberian genistein berpengaruh negatif terhadap ekspresi COX-2. Semakin tinggi dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis, maka berdampak pada penurunan ekspresi COX-2.

Hasil analisa regresi tersebut mendukung penelitian yang dilakukan oleh Sutrisno *et al* (2014) bahwa pemberian genistein pada sel kultur endometriosis selain dipengaruhi oleh faktor sitokin pro-inflamasi juga dipengaruhi oleh receptor estrogen, faktor angionenik, sel proliferasi, dan apoptosis.

Gruber *et al.,* 2012 dalam penelitiannya menyebutkan bahwa pemberian genistein konsentrasi rendah menunjukkan aktivitas estrogenik kecil tetapi pada konsentrasi yang lebih tinggi akan memberikan efek RE antagonis. Ikatan genistein dan reseptor estrogen membentuk komplek estrogen reseptor estrogen komplek dan mengaktivasi ERE sehingga mempengaruhi proses transkrip. Genistein memodulasi beberapa jalur tranduksi sinyal seluler yang berhubungan dengan proliferasi sel, apoptosis, angiogenesis, invasi, metastasis, stress oksidatif melalui peningkatan RE-β (Lee *et al.,* 2012).

Pada struktur kimia genistein memiliki kemiripan dengan 17β-estradiol sehingga mampu berikatan dengan RE. Dalam penelitian ini menggunakan mencit model endometriosis, dimana tingkat kadar estrogen pada jaringan endometriosis sangat tinggi. Endometriosis erat kaitannya dengan keberadaan RE-α yang berhubungan dengan efek estrogen terhadap proliferasi sel sedangkan RE-β bersifat antiproliferasi. Genistein mempunyai afinitas 20-30 kali lebih tinggi terhadap RE-β (87%) dibandingkan RE-α (4%). Afinitas akan lebih meningkat apabila genistein diberikan dalam dosis tinggi.

Pemberian Genistein dosis 0,78mg/hari, 1,04mg/hari dan 1,3mg/hari mampu menurunkan ekspresi COX-2, namun bila dilihat dari grafik histogram didapatkan bahwa penurunan ekspresi COX-2 mengalami fluktuasi, dimana terjadi penurunan pada dosis 0,78mg/hari, kemudian mengalami kenaikan pada dosis 1,04mg/hari dan mengalami penurunan lagi pada dosis 1,3mg/hari. Sebagai *selective estrogen reseptor modulator* (SERMs) genistein memiliki efek estrogenik (bekerja seperti estrogen atau berlaku sebagai pengganti estrogen) pada tulang dan efek anti estrogenik (bekerja menekan fungsi estrogen) pada jaringan reproduksi seperti kelenjar mammae, ovarium, endometrium dan prostat. Pada efek estrogenik

genistein bekerja bergantung pada dosis, lama pemberian dan organ target (Anggraini, et al., 2008). Carol dkk (2013) menyebutkan bahwa genistein merupakan natural SERMs yang mana mekanisme kerja dan pengaruhnya tergantung pada berbagai faktor antar lain pada cara pemberian, *bioavability* dan metabolisme, waktu dan tingkat paparan, keadaan estrogen endogen, serta berbagai efek non-hormonal. Selain itu perbedaan kondisi tubuh, metabolisme, pola genetis dan imunologi antar spesies juga mempengaruhi respon jaringan meskipun menggunakan metode yang sama.

Genistein dan estradiol bersaing untuk menempati Reseptor Estrogen (RE), namun genistein mempunyai afinitas terhadap RE-β lebih tinggi daripada RE-α. Sehingga genistein mampu menghambat produksi oksida nitrat dan prostaglandin pada konsentrasi non-toksik, dengan menghambat induksi NO dan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2) (Muchtadi *dkk*., 2008).Genistein sebagai salah satu strategi pengobatan terbaru, dimana genistei*n* merupakan unsur utama dari fitoestrogen golongan isoflavon (Amberkar *et al*., 2010). Isoflavon mempunyai efek anti inflamasi dengan mekanisme kerja melalui efek penghambatan jalur metabolisme asam arachidonat, pembentukan prostaglandin, pelepasan histamine, atau aktivitas radical scavenging suatu molekul.

Genistein merupakan anggota isoflavon yang banyak ditemukan pada tanaman kedelai dan produk olahannya seperti tahu, tempe, tauco, kecap juga ditemukan pada buah-buahan dan the hijau (Pavese *et al,* 2010). Isoflavon hadir dalam jumlah yang relative besar dihampir semua produk yang mengandung protein kedelai dengan pengecualian konsentrasi kedelai protein dan isolate yang telah mengalami esktraksi alkohol selama pemrosesan. Kandungan isoflavon (daidzein dan genistein) dari beberapa makanan yang disajikan (per 100 mg) diantaranya kacang kedelai

(daidzein 46.46 mg dan genistein 73.76 mg), tahu (daidzein 17.83 mg dan genistein 28.00 mg), tempe (daidzein 17.83 mg dan genistein 24.85 mg), dan teh hijau 9 daidzein 0.01 mg dan genistein 0.04 mg).

Salah satu golongan isoflavon ini mempunyai struktur kimia dan jalur mekanisme yang mirip dengan estrogen didalam tubuh (Handayani dkk, 2010). Genistein memiliki struktur serupa dengan 17-βestradiol struktur, ikatan dan aktivitas genistein menyerupai 17-βestradiol, kemiripan antara estrogen dan genistein terletak pada dua gugus hydroksida (-OH) atau hidroksil (C4 dan C7), berjarak 11.0-11.5 A yang intinya menyerupai inti estrogen. Gugus hidroksil C7 diperlukan genistein untuk berikatan dengan reseptor estrogen. Jarak antara C4 dan C7 disepakati sebagai struktur pokok satu substrat agar mempunyai efek estrogenic yang memiliki afinitas tertentu terhadap RE (Sha and lin 2008.,Pavese *et al.,*2010).

6.2. Pengaruh Pemberian Genistein terhadap Ekspresi PGE-2 pada Mencit Model Endometriosis

Berdasarkan pada perbandingan ekspresi PGE-2 antara kelompok K- dengan K+ didapatkan p-value sebesar 0,000. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi PGE-2 antara kelompok mencit yang sehat dengan mencit endometriosis.Selisih rata-rata (mean difference) bernilai negatif menunjukkan bahwa rata-rata ekspresi PGE-2 kelompok K+ lebih tinggi dari pada kelompok K-. Hal ini mengindikasikan adanya peningkatan ekspresi PGE-2 yang signifikan pada mencit model endometriosis.

Prostaglandin E2 dan F2α diketahui diproduksi secara berlebihan diuterus dan jaringan endometrium penderita endometriosis. Sel stroma lesi endometriosis menghasilkan prostaglandin E2 dalam jumlah banyak, yang selanjutnya

menginduksi sistesis estradiol lokal dan nyeri panggul. Ekspresi enzim COX-2 meningkat pada lesi endometriosis dibandingkan dengan ekspresi serupa pada sel stroma endometrium normal. Keterpaduan kedua enzim tersebut menyebabkan peningkatan sintesis prostaglandin E2 pada lesi endometriosis. (Bulun, 2009).

Peningkatan produksi prostaglandin E2 100 kali lipat lebih tinggi pada endometriosis karena peningkatan aktivitas ekspresi enzim siklooksigenase-2 (COX-2) yang diinduksi oleh IL-1β, TNF-α, MIF dan agen proinflamasi. Enzim siklooksigenase-2 adalah enzim pertama yang terlibat dalam mengkonversi arakidonat acid (AA) menjadi prostaglandin. Pertumbuhan endometriosis melibatkan peran PGE2. PGE2 adalah serbaguna eikosanoid yang memiliki banyak fungsi fisiologis dan patologis penyakit. PGE2 terlibat memainkan peran penting dalam pengembangan endometriosis. PGE2 memainkan peran dalam mengatur patofisiologi yang proses termasuk penekanan kekebalan, antiapoptosis, angiogenesis dan proliferasi sel selama pengembangan endometriosis.

Hasil pengujian menunjukkan adanya penurunan ekspresi PGE2 secara signifikan terjadi akibat pemberian Genistein dosis 0.78 mg/hari (G1), 1.04 mg/hari (G2) dan 1.3 mg/hari (G3). Dimana rata-rata ekspresi PGE-2 menunjukkan bahwa kelompok Genistein (G2) memiliki rata-rata ekspresi PGE-2 yang paling tinggi dan penurunan rata-rata ekspresi PGE-2 yang paling rendah terdapat pada kelompok Genistein (G3). Sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada ekspresi PGE-2 yang diakibatkan oleh pemberian Genistein dalam berbagai dosis.

Berdasarkan hasil pengujian korelasi Pearson antara dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis dengan ekspresi PGE-2, menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan dan kuat antara dosis genistein dengan

ekspresi PGE-2. Sehingga dapat disimpulkan bahwa meningkatnya dosis genistein yang diberikan, akan berdampak pada penurunan ekspresi PGE2. Dan pada hasil analisis regresi ekspresi PGE-2, menunjukkan bahwa keragaman data yang dijelaskan oleh pengaruh pemberian genistein terhadap penurunan ekspresi PGE-2 sebesar 63.55%. Sisanya sebesar 36.45% dijelaskan oleh faktor lain yang tidak diteliti dan error. Sehingga dapat disimpulkan bahwa makin tinggi dosis genistein yang diberikan pada mencit model endometriosis, maka akan berdampak pada penurunan ekspresi PGE-2.

Sesuai dengan penelitian dari Siregar.,*et al* 2014, menjelaskan bahwa genistein dapat menekan produksi PGE-2 melalui enzim COX-2. Selain itu, genistein juga berpotensi mengganggu sinyal transduksi sehingga dapat mencegah produksi PGE-2 dan COX-2. Abdul *et al*., 2012 menyebutkan bahwa isoflavon dalam kedelai mencermin anti inflamasi dan anti tumor yang diinduksi oleh tetradeconoylpharbol 13 acetat (TPA) yang dapat melemahkan ekspresi dari COX-2 pada tikus. Yulianto, *et al.,* 2015 dalam penelitian menyebutkan bahwa pada dosis 1,3 mg/hari genistein secara optimum dapat menekan kadar Reseptor A Interleukin 8 pada mencit model endometriosis, yang mana Reseptor A Interleukin 8 mempunyai peran dalam proses pengembangan dan pertumbuhan sel endometriosis.

Genistein sebagai salah satu strategi pengobatan terbaru, dimana genistei*n* merupakan unsur utama dari fitoestrogen golongan isoflavon (Amberkar *et al*., 2010). Isoflavon mempunyai efek anti inflamasi dengan mekanisme kerja melalui efek penghambatan jalur metabolisme asam arachidonat, pembentukan prostaglandin, pelepasan histamine, atau aktivitas radical scavenging suatu molekul.

Dalam penelitian yang dilakukan Kuiper, *et al.* (1998) mengemukakan bahwa fitoestrogen mempunyai afinitas yang lebih tinggi terhadap ER-β, afinitas ini akan

lebih ditingkatkan bila konsentrasi fitoestrogennya dalam jumlah tinggi, artinya mekanisme ikatan dengan ER-β akan lebih baik bila jumlah fitoestrogennya tinggi dalam darah. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil pada penelitian ini yang menemukan bahwa pada pemberian genistein dosis 1,3mg/hari merupakan dosis yang optimal dalam menurunkan PGE-2.

6.3. Pengaruh Pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest Terhadap Ekspresi COX-2 pada Mencit Model Endometriosis

Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian genistein berbagai dosis, leuprolide acetat, dan dienogest berpengaruh secara signifikan dalam menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit model endometriosis. Dimana rata-rata ekspresi COX-2 paling tinggi didapatkan pada kelompok K+, kemudian rata-rata ekspresi COX-2 mengalami penurunan pada semua kelompok perlakuan, baik pemberian genistein, Leuprolide Acetat, maupun Dienogest, dengan rata-rata ekspresi COX-2 paling rendah didapatkan pada kelompok perlakuan pemberian Genistein dosis 0.78 mg/hari (G1). Sedangkan pada perbandingan antara K+ dengan Leuprolide Acetat dan Dienogest menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna.

Wilson *et al*., 2007 mengemukakan bahwa pada pemberian agonis GnRH untuk terapi endometriosis memiliki efek hipoestrogenik, Pajanan GnRH yang terus menerus ke hipofisis akan mengakibatkan *down-regulation reseptor Estrogen α (REα)* dan memicu penekanan reseptor progesterone serta peningkatan kadar siklooksigenase-2 (COX-2) yang berkontribusi terhadap resistensi progesterone dan reaksi inflamasi untuk mencegah resistensi progesterone dan proses inflamasi yang terkait nyeri pada endometriosis. Selain itu GnRH bekerja langsung pada jaringan

endometriosis. Hal ini dibuktikan dengan adanya reseptor GnRH pada endometrium ektopik. Kadar mRNA reseptor estrogen (ERα) menurun pada endometriosis setelah terapi jangka panjang. Amenore yang timbul akibat kondisi tersebut akan mencegah pembentukan lesi baru.

Soares *et al.,* 2012 dalam penelitiannya mengatakan bahwa pajanan GnRH yang terus menerus ke hipofisis akan mengakibatkan *down-regulation* reseptor GnRH yang akan mengakibatkan berkurangnya sensitifitas kelenjar hipofisis. Kondisi ini akan mengakibatkan keadaan hipogonadotropin hipogonadisme yang akan mempengaruhi lesi endometriosis yang sudah ada. Amenore yang timbul akibat kondisi tersebut akan mencegah pembentukan lesi baru.

GnRH juga akan meningkatkan apoptosis jaringan endometriosis. Selain itu GnRH bekerja langsung pada jaringan endometriosis. Hal ini dibuktikan dengan adanya reseptor GnRH pada endometrium ektopik. Kadar mRNA reseptor estrogen (ERα) menurun pada endometriosis setelah terapi jangka panjang. GnRH juga menurunkan VEGF yang merupakan faktor angiogenik yang berperan untuk mempertahankan pertumbuhan endometriosis. Interleukin 1A (IL-1A) merupakan faktor imunologi yang berperan melindungi sel dari apoptosis.(Betzar, 2006). Pada endometriosis, makrofag mensekresikan sitokin proinflamasi, seperti IL-1β dan TNF-α yang menginduksi secara berlebihan kadar COX-2 pada sel stroma endometriosis dan selanjutnya COX-2 akan menyebabkan peningkatan konsentrasi PGE2 di cairan peritoneal yang mengaktifkan serabut nyeri (Wu, *et al.,*2009).

Dienogest merupakan progestine selektif yang mengkombinasikan 19-norprogestin dan turunan progesterone sehingga hanya memberikan efek local pada jaringan endometrium. Tidak seperti agen 19-norprogestin lainnya, dienogest memiliki efek androgenik yang rendah, bahkaan memiliki efek antiandrogenik yang

menguntungkan sehingga memberikan efek yang minimal terhadap kadar lemak dan karbohidrat. Pemberian dienogest dengan dosis harian 2 mg telah dibuktikan bermakna dalam mengurangi nyeri pelvic dan nyeri haid yang terkait endometriosis. Dienogest juga setara dengan GnRH agonis dalam pengobatan nyeri endometriosis.

Pemberian dienogest pada terapi endometriosis yang mana mekanisme kerja obat tersebut dengan cara menghambat pertumbuhan lesi endometrium yang disebabkan karena pada dienogest menunjukkan sifat antipoliferatif, antiinflamasi,serta antiangiogenesis yang menyebabkan reseptor progesteron meningkat. Adanya peningkatan progesteron akan menyebabkan terjadinya hipoesterogenik yang berdampak dalam menghambat pertumbuhan endometriosis dan menekan nyeri. Dienogest juga memiliki kemampuan untuk menghambat enzim aromatase dan ekspresi COX-2 dan produksi PGE2 pada kultur sel endometriosis.

6.4. Pengaruh Pemberian Genistein, Leuprolide Acetat dan Dienogest Terhadap Ekspresi PGE-2 pada Mencit Model Endometriosis.

Pada perbandingan K+ dengan kelompok perlakuan, didapatkan hasil kelompok G1, G2, G3, LA dan D, didapatkan p-value kurang dari 0,05. Hasil pengujian ini menunjukkan adanya penurunan ekspresi PGE2 secara signifikan terjadi akibat pemberian Genistein dosis 0.78 mg/hari (G1), 1.04 mg/hari (G2), 1.3 mg/hari (G3), Leuprolide Acetat dosis 0.00975 mg/5hari dan Dienogest 0.0052mg/hari, dimana dengan rata-rata ekspresi PGE-2 paling rendah didapatkan pada kelompok perlakuan pemberian Genistein dosis 1.30mg/hari (G3). Sedangkan pada perbandingan K+ dengan Leuprolide Acetat didapatkan tidak ada perbedaan bermakna.

Hayashi, *et al.* 2012 dalam penelitiannya menyebutkan bahwa pada pasien endometriosis yang memperoleh dienogest terjadi peningkatan yang signifikan ekspresi reseptor progesteron bila dibandingkan pasien yang tidak memperoleh pengobatan. sedangkan pada pasien endometriosis yang memperoleh leuprolide asetat juga mengalami peningkatan yang signifikan reseptor progesteron dibandingkan pasien yang tidak memperoleh pengobatan. Pada penelitian ini juga membuktikan bahwa dienogest mampu menurunkan ekspresi eR-β dan hal ini tidak terjadi pada pemberian leuprolide asetat yang belum mampu menurunkan eR-β secara signifikan.

Sesuai dengan penelitian Kauroko *et al.,*2012 menyebutkan bahwa pemberian dienogest menunjukkan hasil signifikan secara statistik dalam menghambat ekspresi gen, protein aromatase, COX-2 serta produksi PGE-2 di ESCs. Hal ini disebabkan karena efek dari dienogest dapat menghentikan lingkaran setan dengan menekan pertumbuhan jaringan dengan menghambat produksi E2 dan mengurangi nyeri panggul yang terkait endometriosis dengan menghambat produksi PGE-2. Dienogest memberikan efek penghambatan langsung pada ESCs dangan menghalangi siklus umpan balik positif estrogen dan pembentukan PGE-2 melalui penghambatan aromatase, ekspresi COX-2 dan aktivitas DNA yang mengikat NF-KB.

Thomas *et al.,* 2012 mengemukakan bahwa khasiat dienogest adalah setara dengan leuprolide acetat (GnRH analog) yang merupakan obat standart yang efektif untuk endometriosis yang berhubungan dengan keluhan nyeri. Leuprolide asetat merupakan terapi standar untuk penyakit endometriosis. Pemberian leuprolide asetat menyebabkan terjadinya *down regulation receptor* yang menghambat produksi estrogen atau menyebabkan penurunan produksi estrogen. leuprolide

asetat juga memberikan penekanan efektif terhadap gejala nyeri panggul yang berhubungan dengan endometriosis serta mempengaruhi lesi endometriosis yang sudah ada. Pada pemberian agonis Gn-RH secara kontinyu maka agonis Gn-RH tersebut akan menduduki reseptor di hipofisis anterior, dengan mengurangi sensitifitas hipofisis terhadap rangsangan agonis Gn-RH, sehingga terjadi penurunan sekresi LH dan FSH. Akibatnya produksi estrogen dan progesteron pun oleh ovarium akan berkurang (*receptor down-regulation*), yang akan berakibat adanya penurunan hormon estrogen dan akan menyebabkan penekanan pada pertumbuhan sel.

Berdasarkan fakta dan kajian pustaka yang telah diuraikan diatas, bahwa genistein berbagai dosis, leprolide acetat dan dienogest telah terbukti menurunkan ekspresi COX-2 dan PGE-2 pada kasus endometriosis. Hal ini ditunjukkan dan terbukti secara ilmiah dan diuji secara statistik mendapatkan nilai yang bermakna.

6.5. Keterbatasan Penelitian

Dalam penelitian ini untuk membuktikan bahwa mencit model sudah menjadi endometriosis dengan mengambil 2 mencit secara random pada hari ke 15 dan dilakukan pemeriksaan lesi endometriosis secara visual dan menggunakan parameter ER α dan ER β, karena keterbatasan waktu dan biaya.

BAB 7
KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

1. Pemberian genistein menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit model endometriosis. Pada penelitian ini dosis optimal yang dapat menurunkan ekspresi COX-2 paling rendah adalah dosis 0.78mg/hari
2. Pemberian genistein menurunkan ekspresi PGE-2 pada mencit model endometriosis. Pada penelitian ini dosis optimal yang dapat menurunkan ekspresi PGE-2 paling rendah adalah dosis 1.30mg/hari
3. Tidak terdapat perbedaan signifikan antara pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, dan Dienogest dalam menurunkan ekspresi COX-2 pada mencit model endometriosis
4. Tidak terdapat perbedaan signifikan antara pemberian Genistein, Leuprolide Acetat, dan Dienogest dalam menurunkan ekspresi PGE-2 pada mencit model endometriosis

7.2. Saran

1. Diperlukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh geneistein terhadap ekspresi COX-2 dan PGE-2 pada dosis lebih daari 1.30mg/hari. Mengingat cara kerja genistein sebagai *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs) beda dosis, beda lama pemberian, beda organ memberikan respon (efek) berbeda.
2. Dapat dilanjutkan uji klinis sehingga diharapkan genistein dapat digunakan sebagai terapi alternatif atau pengobatan bagi wanita yang mengalami endometriosis.

DAFTAR PUSTAKA

Abdul Quaiyoom Khan, Rehan Khan, Muneeb U. Rehman, Abdul Lateef, Mir Tahir, Farrah Ali, Sarwat Sultana.2012. *Soy isoflavones (daidzein & genistein) inhibit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced cutaneous inflammation via modulation of COX-2 and NFK_B in Swiss albino mice. Department of Medical Elementology and Toxicology* New Delhi. 266-275

Anggraini , W., Rahardjo, T., Ichramsyah A., Muchtadi, D. 2008. Pengaruh Isoflavon Kedelai terhadap Deplesi Estrogen pada Tikus Betina. Sprague Dawley. 23 (2): 73-78

Anwar, M.,Baziad, A., dan Prabowo, P. 2011. Endometriosis. Ilmu Kandungan. Ed 3 Cetakan 1. PT Bina Pustaka Sarwono Prawirodihardjo. Jakarta. 239-250

Awwad. JT., Sayegh, RA., Tao, XJ., Hasan, T., Awward, ST., Isaacson, K. 1999. *The SCID mouse : an Experimental Model for endometriosis. Human Reproduction* Vol. 14(12) : 3107-3111

Amberkar MV., Meena K., Mor V., Semwal A, Adiga S., 2010. *PPAR-gamma : a Dagger In Endometriosis. Australian Medical Journal AMJ 3*, 12: 841-820.

Barrier,B.,2010.*imunology of endometriosis*, *Clinical Obstetrics and Gynecology.* 53(2) : 397-402.

Banerjee S., Li Y., Wang, Z., Sarkar, F.H. 2009. *MultiTargetted Therapy of Cancer by Genistein. Cancer Lett.* 269 (2) : 226-242.

Batzer FR. 2006. *GnRH Analog: Options for Endometriosis-Associated Pain Treatment. Journal of Minimally Invasive Gynecology* 13(6):539-45.

Benson, R.C., and Pernoll, M.L.2009. Buku Saku Obstetri & Ginekologi. Edisi 9. Jakarta. EGC

Bulun, S.E., Monsavais, d., Pavano, ME., Dyson, M.,Xue, Q., Attar E., Tokunaga H., Su, Ej., *Role of Estrogen Receptor β In Endometriosis. Semin Reprod Med.* 2012:30 (1):39-45

Bulun, S.E., Lin, Z., Imir, G., Amin, S., Demura, M., Yilmaz, B, Martin, R., Utsunomiya, H., Thung, S., Gurates, B., Tamura, M., Langoi, D., and Deb, S. 2005. *Regulation of Aromatase Expression In Estrogen Responsive Breast and Uterine Disease : From Bench to Treatment. Pharmacol Rev. 57 (3)* : 359-383

Bustaman N,2008. Fitoestrogen dan kesehatan tulang. Bina Widya 19 (3) : 146-150

Carrol, V.M., St. Denis, J.D., Biegasiewosc, K F., Priefer, R. 2013 Isoflavones Chemistry, Analysis, Function and Effect. In V. R Preedy (Ed). *Royal Society of Chemistry publishing. Cambrige United Kindom*. 61-83.

Cureton, Brittany Lauren, 2013. *A Critical Review of Endometriosis Pathology. Theses and Dissertations. Paper 489. Universitas of South Carolina.*

Chuang Pei-Chin., 2010. *Inhibition of CD36-Dependent Phagocytosis bya Prostaglandin E2 Contributes to the Development of Endometriosis*.*The American Journal of Pathology*. Vol. 176, No. 2

Dahlan, MS., 2012. Statistik Untuk Kedokteran dan Kesehatan. Jakarta : Salemba Medika.

Daniel Escorsim Machado, M.Sc.,a Pl_ınio Tostes Berardo, M.D., Ph.D.,a Richardt Gama Landgraf, Ph.D.,2010. *A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. Journal Fertility and Sterility.* Vol. 93, No. 8.

Djuwantono, T., Bayuaji, H., dan Permadi, W, 2012. Step By Step Penanganan Kelainan Endrokinologi Reproduksi dan Fertilitas dalam Praktek Sehari-hari. Sagung Seto. Jakarta : 253-282

Draper, N.R and Smith, H.1998. *Applied Regression Analysis, Three Edition.* John Wiley and sons, Inc.New York

Eshre, Management of Women with Endometriosis. 2013

Eustache F., Mondon F., Canivenc-Lavier MC., Lesaffre C., Fulla Y., Berges R., Cravedi JP., Vaiman D., Auger J., Cahn WH., 2009. *Chronic Dietary Exposure to a Low Dose Mixture of Genistein and Vinclozolin Modifies the Reproductive Axis, Tesis Transcriptome, and Fertility. Environ Health Perspect* 117 : 1272-1279.

Farrell, E., and Garad, R. 2012. *Endometriosis. Australian Nursing Journal.* 20(5): 37-39

Giudice, L., 2010. *Endometriosis.* Nengl J Med. 362 (25) : 2389-2398

Gui-Hua Shou-Qing Lin, 2008. *Genistein Inhibits Proliferation Of Human Endometrial Endothelial Cell In Vitro. Chin Med Sci J*: Vol.23, No. 1:49-53.

Gruber, C.J., Tschugguel, W., Scneeberger, C., and Huber, J.C. 2002. *Mechanisms of Disease : Production and Actions of Estrogens. N Engl J Med.* 346 (5) : 340-352

Grummer, R. 2006. *Animal Models in Endometriosis Research. Human Reproduction Update*. 12 (5) : 641-649

Handayani V., Tatit N., Sutrisno, 2010. Perbandingan Ekspresi Reseptor Estrogen β dengan Penambahan Berbagai Dosis Genistein pada Sel Endotel HUVEC yang mengalami Stres Oksidatif. *Majalah Obstetri Ginekologi Indonesia.* 34 (1) : 24-30

Hartmann L and Riggs B., 2003. Selective Estrogen-Receptor Modulators Mechanism of Action and Application to Clinical Practice. *The New England Journal of Medicine.* 348:618-29

Hayashi, A., Tanabe, A., Kawabe, S., Hayashi, M., Yuguchi, H., Yamashita, Y., Okuda, K., Ohmichi, M., 2012. Dienogest increases the progesterone receptor isoform B/A ratio in patients with ovarian endometriosis. *Journal of Ovarian Research* 5:31

Hermawati, 2009., Perbaikan Kinerja Reproduksi Akibat Pemberian Isoflavon dari tanaman Kedelai, Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA Universitas Pendidikan Indonesia Bandung. Pp : 2-4

Hoffman, B.L., Schorge, J.O., Schaffer, J.I., Halvorson, L.M., Bradshaw, K.D., and Cunningham, F.G. 2012. *William Gynecology. Second Ed. The McGraw-Hill Companies*, Inc. Cina

Hidayat, AA., 2011.Metode Penelitian KebidananTeknik Analisa Data. Jakarta : Salemba Medika.

Hua Lu, Ji Xin Shi, Dong Mei Zhang, Han Dong Wang, Chun Hua Hang, Hui Lin Chen, Hong Xia Yin.,2008. Inhibition of hemolysate-induced iNOS and COX-2 expression by genistein through suppression of NF-κB activation in primary astrocytes. *Journal of the Neurological Sciences* 278 : 91–95

Jamhur Makhmud., 2011. Studi Perbedaan Ekspresi COX-2 antar Endometrioma dan Karsinoma Ovarii. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Jacoeb, T. Z., Hadisaputra, W., 2009. Penanganan Endometriosis Panduan Klinis dan Algoritme. Edisipertama CV Sagung Seto: 88-90

Janet M., Pavese & Rebecca L., Farmer & Raymond C., Bergan, 2010. Inhibition of Cancer Cell Invasion and Metastasis by Genistein. Cancer Metastasis Rev 29 : 465-482.

Jo Kitawaki, Izumi Kusuki, Kaoruko Yamanaka, Izumi Suganuma. 2011. *Maintenance therapy with dienogest following gonadotropin-releasing hormone agonist treatment for endometriosis-associated pelvic pain.* European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. Hal 212- 216.

Kaoruko, Y, M D., aBing Xu, M.D., Ph.d., 2012. Dienogest inhibits aromatase and cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic stromal cells in spheroid culture. *American Society for Reproductive Medicine*. Vo. 97 No.2

Katzung, B. G. 2002. Farmakologi Dasar dan Klinik, edisi II. Jakarta, Salemba Medika. Halaman 671, 677-678

Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsoon, B., Carton, J.C. Safe, S.H., 1998. Interaction of strogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 139 :4525-4263

Kusumawati, D. 2004. Bersahabat Dengan Hewan Coba. Yogyakarta : Gama Press

Lee,Y., Hee,S.K., Song Y., 2012. *Genistein as a Potential anticancer Agent Against Ovarium Cancer. Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2 (2) : 96-104

Leyland, N., R., Laberge, P., Sing., 2010. *Endometriosis Diagnosis and Management. Journal of obstetrics and Gynecology Canada* (JOGC). 32 (7)

Luthan. D., Adenin. I., Halim. B., 2011. Endometriosis. Dalam Ilmu Kandungan. Jakarta : PT. Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo. Pp : 239-242

Maybin, J.A., Critchley, H.O.D., and Jabbour, H.N. 2010. *Inflamatory Pathway in Endometrial Disorders. Molecular and Cellular Endrocrinology*. 335 : 42-51

Matsukura, H., Aisaki, K., Igarashi, K., Matsushima, Y., Kanno, J., Muramatsu, M., Sudo, K., *and* Sato, N. 2011. *Genistein Promotes DNA Demethylation of The Steroidogenic Factor 1 (SF-1) Promoter In Endometrial Stromal Cells. Biochemical and Biophysical Research Communication*. 412 : 366-372.

Mendelsohn, M.E., and Karas, R.H. 1999. *The Protective Effects of Estrogen on the Cardiovaskular System. Massachusertts Medical Socisty. England* 340 (23)

Muchtadi, D., Anggraini, W., Rahardjo, T., Ichramsyah, A., 2008. *Pengaruh Isoflavon Kedelai terhadap Deplesi Estrogen pada Tikus Betina. Sprague Dawley.* 23 (2).

Murakami M, Nakatani Y, TaniokaT, Kudo I. *Prostaglandin E Synthase Prostaglandin Other Lipid Mediat* 2002;68-69:383-99.

Notoatmodjo, S., 2010. Metodologi Penelitian Kesehatan. Jakarta : Rineka Cipta

Nowak, M., Janusz., Madej., Dziegiel., P., 2007. Intensity of COX-2 expression in cells of tissue fibrosarcomas in dogs as related to grade of Tumour Malignancy. *Bull vet Inst Pulawy*, 51 : 275-279

Na Young Kim, UiNam Ryoo, Dong-Yun Lee, Min Jae Kim, Byung-Koo Yoon, DooSeok Choi. 2010. *The Efficacy And Tolerability Of Short-term Low-dose Estrogen-only Add-back Therapy During Post-operative GnRH Agonist Treatment For Endometriosis. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. Hal. 85-89

Osuga. Y., Koga., Hirota., Yoshino., and Taketani. 2011. *Lymphocytes in Endometriosis. Am J Reprod Immunol* 65 (1) : 1-10.

Öztürk, H.B., Vural, B., Çal×ükan, E., Solakoùlu, S., 2010. Effect of Gnrh Analogues and Octreotide Treatment on Apoptosis and the Cell Proliferation of Endometrium Adenocarcinoma Cell Lines. *J Turkish-German Gynecol Assoc*. **11**: 131-6.

Patisaul, H.B., and Jefferson, W. 2010. *The Pros and Cons of Phytoestrogen Frontiers in Neuroendocrinology*. 31 : 400-419.

Paven, Mary Ellen, M.D., M.S.C.I., and Serdar E. Bulun, M.D. *Aromatase Inhibitors For The Treatment of endometriosis. American Society for Reproductive Medicine* : vol 98

Pavese, J.m., Rebecca L.F., 2010. *Inhibition of Cancer Cell Invasion and Metastasis by Genistein. Cancer Metastasis.* 29 : 465-482.

Rahman, S., Islam, R., Swaraz, A.M., Ansari, A., Parvez, A.K., *and* Paul, D.K.2012. *An Insight On Genistein As Potential Pharmacological And Therapeuticagent*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* :S1924-S1937.

Rice, S. and Whitehead, S. A. 2006. *Phytoestrogens and Breast Cancer Promoters or Protectors. Endocrine-Related Cancer*. 13 : 995-1015.

Riecansky., Jagla F., Pilsakova L., 2010. *The Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens. Physioal. Res. Institute of Clinical, Biological and Differential Psychology, Faculty of Psychology, University of Vienna, Austria*, 59 :651-664

Runge, M.S., 2009. *Endometriosis*. Edisi Kedua Netter Internal Medicine. *Elsevier Inc*.118.

Santoso, Singging. 2005. *Menguasai Statistik di Era Informasi dengan SPSS 12.* Jakarta : PT Elex Media Komputindo.

Siregar.,Effie Masyitha.,Arsana Wiyasa, I Wayan., Dwijayasa, Pande Made. 2015. The Effect Ofgenistein in Various Doses At the Content of Cyclooxygenase 2 (Cox-2) Inzalirperitoneal of Endometriosis Mice Model. *Journal of Dental and Medical Sciences. Vol : 14 hal : 59-65*

Soares, S.R., Varea, A.M., Hidalgo-Moro, J.J., and Pellicer, A. 2012. *Pharmacologic Therapies in Endometriosis : A Systematic Review. Fertility and Sterility*. 98 (3) : 529-555.

Soehartono., Wiyasa I., Norahmawati E. 2008. *Pengaruh Isoflavon Genistein Dan Daidzein Ekstrak Tokbi (Pueraria Labata) Strain Kangean Terhadap Jumlah Osteoblas dan Osteoklas Rattus Novergius Wistar Hipoestrogenik.* UNAIR. Surabaya. Majalah Obstetri dan Ginekologi. Volume 148.

Sutrisno., Mariyani., Herawati, I., Rinata, E., Jehanara., Yueniwati, Y., Nurdiana., Noorhamdani., Santoso, S. 2014. *The Effects Of Genistein As Antiinflammatory And Antiangiogenesis In Primary Endometriosis Cell Culture. Asian Pacific Journal of Reproduction.* 3 (4). Hal 1-6.

Shen KJ., Wang Q.,2011. *High Prevalence Of Endometrial Polyps In Endometriosis Associated Infertility Fertile Steril*;95(8):2722-

Steel, Robert G.D dan Torrie, James H. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometric* (Terjemahan Bambang Sumantri). Jakarta : PT Gramedia Pustaka Utama.

Syamsudin and Darmono. 2011. Buku ajar Farmakologi Eksperimental Universitas Indonesia . Jakarta

Tariverdian, N., Theoharides, t.c., Siedentopf, F., Gutierrez, G., Jeschke, U., Rabinovich, G.A., Blois, S.M., Arek, P.C., 2007. *Neuroendocrine-Immune Disequilibrium and Endometriosis : An Interdisciplinary Approach. Semin Immunopathol.* 29: 193-210

Taylor, HS., Osteen K., Brunner, K., Lockwood, C., Krikun, G., Sokalska, A., Dulebo, A., 2011. *Novel Therapies Targeting Endometriosis. Department of Obstetrics and Gynecology New Haven.*18 : 814

Taylor, R., and Lebovic, I. 2010 *Endometriosis.* Chapter 26 : 565-585

Thomas Strowitzki , Joachim Marr, Christoph Gerlinger, Thomas Faustmann, Christian Seitz., 2012. *Detailed Analysis Of A Randomized, Multicenter, Comparative Trial Of Dienogest Versus Leuprolide Acetate In Endometriosis. International Journal of Gynecology and Obstetrics* :228-233

Wilson, C.A., Meethal, V.S, Bowen L.R, Atwood S..2007. Leuprolide Acetat ; A Drug of Diverse Clinical Applications expert Opin. Investig Drugs. 16 (11) :1-13

Wu, H.M., Cheng, J.C., Wang, H.S., Huang, H.Y., MacCalman, C.D., Leung, P.C., 2009. Gonadotropin-Releasing Hormone Type II Induces Apoptosis of Human Endometrial Cancer Cells by Activating GADD45 Alpha. *Cancer Res*. **69**: 4202-8.

Yamanaka Kaoruko M.D, Bing Xu, M.D., Ph.D. Izumi Suganuma, M.D.,a Izumi Kusuki, M.D., Ph.D.,a Shizuka Mita, M.S.,b Yutaka Shimizu, Ph.D.,b Kiyoshi Mizuguchi, Ph.D.,b and Jo Kitawaki, M.D., Ph.D. 2011. *Dienogest Inhibits Aromatase And Cyclooxygenase-2 Expression And Prostaglandin E2 Production In Human Endometriotic Stromal Cells In Spheroid Culture. Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University of Medicine*.Vol 97 No.2

Yulianto, R., Sutrisno, Dwijayasa, P.M., Arsana, W., Tatit, N.,2015. The effect Of Giving In Various Doses In Level Receptor A Interleukin 8 (Cxcr1) In Peritoneal Lesions of Mice Model endometriosis, *Journal of Dental and Medical Sciences.* 14(2) : 94-100.

Zheng Li, Hong yuan Zhang, Ying jun Zhu, Yuan jing Hu, Peng peng Qu. 2014. *A Randomized Study Comparing The Side Effects And Hormonal Status Of Triptorelin And Leuprorelin Following Conservative Laparoscopic Surgery For Ovarian Endometriosis In Chinese Women. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. Hal.164-168

Xiangyan Ruan, H. Seeger, A.O. Mueck, 2012.*The Pharmacology Of Dienogest. Journal Maturitas.* Hal : 337-344

Repository Universitas Brawijaya

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIK
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kepfk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 605 / EC / KEPK / 12 / 2015

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BR
SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG D
DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL	:	**Pengaruh Pemberian Ginestein, Leuprolide Dienogest Terhadap Perubahan Perubahan Ekspr Kadar Protein Mediator Inflamasi pada Lesi ser Peritoneal Mencit Model Endometriosis.**
PENELITI	:	**dr. Sutrisno, Sp.OG(K)** **dr. Robert One Daniesha Mahendra** **Lilik Winarsih, S.ST** **Chandra Sulistyorini, S.ST** **Eviyani Margaretha Manungkalit, S.Keb.,Bd** **Hardianti Aprina, S.ST** **Happy Martalena Simanungkalit, S.ST** **Asti Andriyani, S.ST**
UNIT / LEMBAGA	:	**Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya Malang**
TEMPAT PENELITIAN	:	**Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Uni Brawijaya Malang**

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang, 29 DEC 2015
Ketua,
Komisi Etik Penelitian Kesehatan

Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS (K), M
NIP. 19460516 197111 1 001

Catatan :
Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan
Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-F
Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penel
Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)

Repository Universitas Brawijaya

UNIVERSITAS AIRLANGG
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWA
Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5992785, 5993016 Fax (031
Website: http://www.fkh.unair.ac.id ; e-mail: info@fkh.unair.ac.id

Surat - Keterangan

Nomor: 521/UN3.1.6/LL/2016

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga menerangkan bahwa yang tersebut di bawah ini :

Nama	1. Eviyani Margaretha M	: 136070400111005
	2. Lilik Winarsih	: 136070400111010
	3. Hardianti Aprina	: 136070400111011
	4. Chandra Sulistyowati	: 136070400111023
	5. Happy Marthalena S	: 136070400111026
	6. Asti Andriyani	: 136070400111036

Alamat : Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Bahwa yang bersangkutan telah melaksanakan penelitian di Fakultas Kedoktera Universitas Airlangga sejak tanggal, 28 Agustus 2015 dengan judul Pengaruh Pemberian Leuprolide Acetate dan Dienogest Terhadap Ekspresi TGF B, NFkB, COX-2, PGE2, VE BCL2, Bax, Era, ER B, TNFa, IL6 Pada Mencit Model Endometriosis.

Surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya

Demikian atas perhatian dan kerjasamanya, kami sampaikan terima kasih.

Surabaya, 28 Januari 2016

a.n. Dekan
Kepala Bagian Tata Usaha

Dra. Hj. Kusmawati
NIP. 195812211981032002

Repository Universitas Brawijaya

Lampiran 3

Hasil Skor Ekspresi PGE-2 dan COX-2

A. Data Hasil Skoring Ekspresi PGE2

Kelompok		Indeks Skala Remmele					Rerata	Ket
		Lapang Pandang 1	Lapang Pandang 2	Lapang Pandang 3	Lapang Pandang 4	Lapang Pandang 5		
Kontrol -	1	**2**	**2**	**2**	**0**	**2**	1,6	
	2	**2**	**0**	**2**	**2**	**3**	1,8	
	3	**0**	**0**	**2**	**2**	**9**	2,4	
	4	**3**	**2**	**0**	**1**	**0**	1,2	
						Rerata	1,75	
Kontrol +	1	**3**	**2**	**4**	**2**	**4**	3	
	2	**9**	**4**	**3**	**4**	**6**	5,2	
	3	**2**	**6**	**2**	**6**	**4**	4	
	4	**4**	**6**	**2**	**3**	**2**	3,4	
						Rerata	3,9	
Perlakuan 1	1	**1**	**2**	**2**	**4**	**1**	2	
	2	**2**	**4**	**2**	**3**	**3**	2,8	
	3	**3**	**2**	**3**	**2**	**1**	2,2	

Repository Universitas Brawijaya

	4	4	3	0	2	0	1,8
						Rerata	2,2
	1	4	0	3	2	2	2,2
	3	0	4	2	5	4	3
Perlakuan 2	5	0	3	3	3	3	2,4
	6	3	0	2	2	3	2
						Rerata	2,4
	1	3	6	0	0	2	2,2
	4	1	2	3	1	2	1,8
Perlakuan 3	5	3	2	2	0	1	1,6
	6	0	2	0	3	5	2
						Rerata	1,9
	1	2	4	2	1	5	2,8
	2	3	3	5	2	2	3
Perlakuan 4	4	6	4	2	3	3	3,6
	6	1	1	3	3	2	2
						Rerata	2,85
Perlakuan 6	1	3	3	3	1	2	2,4
	2	1	2	3	3	0	1,8

	3	2	1	4	2	2	2,2
	6	2	2	2	3	1	2
						Rerata	2,1

B. Data Hasil Skoring Ekspresi Cox-2

Kelompok		Indeks Skala Remmele					Rerata	Ket
		Lapang Pandang 1	Lapang Pandang 2	Lapang Pandang 3	Lapang Pandang 4	Lapang Pandang 5		
Kontrol -	1	1	4	2	3	3	2	
	2	2	2	5	3	0	2,4	
	4	4	2	6	3	0	3	
	6	1	3	0	2	3	1,8	
						Rerata	2,3	
Kontrol +	2	2	4	3	4	3	3,2	
	3	6	6	4	6	2	4,8	
	4	3	3	1	4	6	3,4	
	5	5	1	3	2	4	3	
						Rerata	3,6	
Perlakuan	1	5	2	2	3	0	2,4	

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Repository Universitas Brawijaya

1	2	0	2	1	2	4	1,8	
	3	2	2	3	2	4	2,6	
	4	2	1	2	2	3	2	
						Rerata	2,2	
Perlakuan 2	1	2	2	3	4	2	2,6	
	3	3	3	3	3	3	3	
	5	2	2	4	2	4	2,8	
	6	4	2	2	0	3	2,2	
						Rerata	2,65	
Perlakuan 3	1	2	1	2	4	4	2,6	
	4	2	2	3	0	3	2	
	5	0	4	2	1	3	2	
	6	3	1	4	3	1	2,4	
						Rerata	1,8	
Perlakuan 4	1	4	1	2	3	3	2,6	
	2	4	2	4	2	4	3,2	
	4	5	6	3	4	2	4	
	6	6	4	2	1	1	2,8	
						Rerata	3,15	

Repository Universitas Brawijaya

Perlakuan 6	1	**2**	**0**	**1**	**3**	**9**	3
	2	**6**	**3**	**0**	**0**	**3**	2,4
	3	**2**	**0**	**4**	**2**	**3**	2,2
	6	**5**	**6**	**3**	**1**	**0**	3
						Rerata	2,65

UNIVERSITAS BRAWIJAYA
REPOSITORY.UB.AC.ID

Repository Universitas Brawijaya

Lampiran 4

Hasil Penelitian

Lampiran 1. Uji Asumsi Normalitas

Explore

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Residual for COX_2	28	100.0%	0	.0%	28	100.0%
Residual for PGE	28	100.0%	0	.0%	28	100.0%

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for COX_2	.171	28	.035	.927	28	.052
Residual for PGE	.133	28	.200*	.968	28	.528

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 2. UjiAsumsiHomogenitasRagam

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

Dependent Variable: COX_2

F	df1	df2	Sig.
1.031	6	21	.433

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Perlakuan

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

Dependent Variable: PGE

F	df1	df2	Sig.
1.250	6	21	.322

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Perlakuan

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Repository Universitas Brawijaya

Lampiran 3. ANOVA danUjiTukeyEkspresi COX-2

Means

Case Processing Summary

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
COX_2 * Perlakuan	28	100.0%	0	.0%	28	100.0%

Report

COX_2

Perlakuan	Mean	N	Std. Deviation
K-	2.3000	4	.52915
K+	3.6000	4	.81650
G1	2.2000	4	.36515
G2	2.6500	4	.34157
G3	2.2500	4	.30000
LA	3.1500	4	.61914
D	2.6500	4	.41231
Total	2.6857	28	.66762

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Perlakuan	1.00	K-	4
	2.00	K+	4
	3.00	G1	4
	4.00	G2	4
	5.00	G3	4
	6.00	LA	4
	7.00	D	4

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

Dependent Variable: COX_2

F	df1	df2	Sig.
1.031	6	21	.433

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: COX_2

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6.514[a]	6	1.086	4.130	.007
Intercept	201.966	1	201.966	768.348	.000
Perlakuan	6.514	6	1.086	4.130	.007
Error	5.520	21	.263		
Total	214.000	28			
Corrected Total	12.034	27			

a. R Squared = .541 (Adjusted R Squared = .410)

Post Hoc Tests

Perlakuan

Repository Universitas Brawijaya

Multiple Comparisons

Dependent Variable: COX 2

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	-1.3000*	.36253	.025	-2.4785	-.1215
	G1	.1000	.36253	1.000	-1.0785	1.2785
	G2	-.3500	.36253	.956	-1.5285	.8285
	G3	.0500	.36253	1.000	-1.1285	1.2285
	LA	-.8500	.36253	.270	-2.0285	.3285
	D	-.3500	.36253	.956	-1.5285	.8285
K+	K-	1.3000*	.36253	.025	.1215	2.4785
	G1	1.4000*	.36253	.013	.2215	2.5785
	G2	.9500	.36253	.170	-.2285	2.1285
	G3	1.3500*	.36253	.018	.1715	2.5285
	LA	.4500	.36253	.870	-.7285	1.6285
	D	.9500	.36253	.170	-.2285	2.1285
G1	K-	-.1000	.36253	1.000	-1.2785	1.0785
	K+	-1.4000*	.36253	.013	-2.5785	-.2215
	G2	-.4500	.36253	.870	-1.6285	.7285
	G3	-.0500	.36253	1.000	-1.2285	1.1285
	LA	-.9500	.36253	.170	-2.1285	.2285
	D	-.4500	.36253	.870	-1.6285	.7285
G2	K-	.3500	.36253	.956	-.8285	1.5285
	K+	-.9500	.36253	.170	-2.1285	.2285
	G1	.4500	.36253	.870	-.7285	1.6285
	G3	.4000	.36253	.920	-.7785	1.5785
	LA	-.5000	.36253	.806	-1.6785	.6785
	D	.0000	.36253	1.000	-1.1785	1.1785
G3	K-	-.0500	.36253	1.000	-1.2285	1.1285
	K+	-1.3500*	.36253	.018	-2.5285	-.1715
	G1	.0500	.36253	1.000	-1.1285	1.2285
	G2	-.4000	.36253	.920	-1.5785	.7785
	LA	-.9000	.36253	.215	-2.0785	.2785
	D	-.4000	.36253	.920	-1.5785	.7785
LA	K-	.8500	.36253	.270	-.3285	2.0285
	K+	-.4500	.36253	.870	-1.6285	.7285
	G1	.9500	.36253	.170	-.2285	2.1285
	G2	.5000	.36253	.806	-.6785	1.6785
	G3	.9000	.36253	.215	-.2785	2.0785
	D	.5000	.36253	.806	-.6785	1.6785
D	K-	.3500	.36253	.956	-.8285	1.5285
	K+	-.9500	.36253	.170	-2.1285	.2285
	G1	.4500	.36253	.870	-.7285	1.6285
	G2	.0000	.36253	1.000	-1.1785	1.1785
	G3	.4000	.36253	.920	-.7785	1.5785
	LA	-.5000	.36253	.806	-1.6785	.6785

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

COX_2

Tukey HSD[a,b]

Perlakuan	N	Subset 1	Subset 2
G1	4	2.2000	
G3	4	2.2500	
K-	4	2.3000	
G2	4	2.6500	2.6500
D	4	2.6500	2.6500
LA	4	3.1500	3.1500
K+	4		3.6000
Sig.		.170	.170

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .263.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

b. Alpha = .05.

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Repository Universitas Brawijaya

Lampiran4. ANOVA danUjiTukeyEkspresiPGE

Means

Case Processing Summary

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PGE * Perlakuan	28	100.0%	0	.0%	28	100.0%

Report

PGE

Perlakuan	Mean	N	Std. Deviation
K-	1.7500	4	.50000
K+	3.9000	4	.95917
G1	2.2000	4	.43205
G2	2.4000	4	.43205
G3	1.9000	4	.25820
LA	2.8500	4	.66081
D	2.1000	4	.25820
Total	2.4429	28	.84565

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Perlakuan	1.00	K-	4
	2.00	K+	4
	3.00	G1	4
	4.00	G2	4
	5.00	G3	4
	6.00	LA	4
	7.00	D	4

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

Dependent Variable: PGE

F	df1	df2	Sig.
1.250	6	21	.322

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: PGE

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12.969[a]	6	2.161	7.159	.000
Intercept	167.091	1	167.091	553.457	.000
Perlakuan	12.969	6	2.161	7.159	.000
Error	6.340	21	.302		
Total	186.400	28			
Corrected Total	19.309	27			

a. R Squared = .672 (Adjusted R Squared = .578)

Post Hoc Tests

Perlakuan

Repository Universitas Brawijaya

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PGE

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	-2.1500*	.38853	.000	-3.4130	-.8870
	G1	-.4500	.38853	.902	-1.7130	.8130
	G2	-.6500	.38853	.640	-1.9130	.6130
	G3	-.1500	.38853	1.000	-1.4130	1.1130
	LA	-1.1000	.38853	.115	-2.3630	.1630
	D	-.3500	.38853	.968	-1.6130	.9130
K+	K-	2.1500*	.38853	.000	.8870	3.4130
	G1	1.7000*	.38853	.004	.4370	2.9630
	G2	1.5000*	.38853	.013	.2370	2.7630
	G3	2.0000*	.38853	.001	.7370	3.2630
	LA	1.0500	.38853	.146	-.2130	2.3130
	D	1.8000*	.38853	.002	.5370	3.0630
G1	K-	.4500	.38853	.902	-.8130	1.7130
	K+	-1.7000*	.38853	.004	-2.9630	-.4370
	G2	-.2000	.38853	.998	-1.4630	1.0630
	G3	.3000	.38853	.985	-.9630	1.5630
	LA	-.6500	.38853	.640	-1.9130	.6130
	D	.1000	.38853	1.000	-1.1630	1.3630
G2	K-	.6500	.38853	.640	-.6130	1.9130
	K+	-1.5000*	.38853	.013	-2.7630	-.2370
	G1	.2000	.38853	.998	-1.0630	1.4630
	G3	.5000	.38853	.850	-.7630	1.7630
	LA	-.4500	.38853	.902	-1.7130	.8130
	D	.3000	.38853	.985	-.9630	1.5630
G3	K-	.1500	.38853	1.000	-1.1130	1.4130
	K+	-2.0000*	.38853	.001	-3.2630	-.7370
	G1	-.3000	.38853	.985	-1.5630	.9630
	G2	-.5000	.38853	.850	-1.7630	.7630
	LA	-.9500	.38853	.229	-2.2130	.3130
	D	-.2000	.38853	.998	-1.4630	1.0630
LA	K-	1.1000	.38853	.115	-.1630	2.3630
	K+	-1.0500	.38853	.146	-2.3130	.2130
	G1	.6500	.38853	.640	-.6130	1.9130
	G2	.4500	.38853	.902	-.8130	1.7130
	G3	.9500	.38853	.229	-.3130	2.2130
	D	.7500	.38853	.484	-.5130	2.0130
D	K-	.3500	.38853	.968	-.9130	1.6130
	K+	-1.8000*	.38853	.002	-3.0630	-.5370
	G1	-.1000	.38853	1.000	-1.3630	1.1630
	G2	-.3000	.38853	.985	-1.5630	.9630
	G3	.2000	.38853	.998	-1.0630	1.4630
	LA	-.7500	.38853	.484	-2.0130	.5130

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

PGE

Tukey HSD[a,b]

Perlakuan	N	Subset 1	Subset 2
K-	4	1.7500	
G3	4	1.9000	
D	4	2.1000	
G1	4	2.2000	
G2	4	2.4000	
LA	4	2.8500	2.8500
K+	4		3.9000
Sig.		.115	.146

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .302.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

b. Alpha = .05.

Repository Universitas Brawijaya
REPOSITORY.UB.AC.ID
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Repository Universitas Brawijaya

Lampiran5. AnalisisKorelasi

Correlations

Correlations

		COX_2	PGE	Dosis
COX_2	Pearson Correlation	1	.897**	-.687**
	Sig. (2-tailed)		.000	.003
	N	16	16	16
PGE	Pearson Correlation	.897**	1	-.797**
	Sig. (2-tailed)	.000		.000
	N	16	16	16
Dosis	Pearson Correlation	-.687**	-.797**	1
	Sig. (2-tailed)	.003	.000	
	N	16	16	16

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Repository Universitas Brawijaya

Lampiran6.AnalisisRegresiEkspresi COX-2

Regression

Variables Entered/Removed[b]

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Dosis[a]	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: COX_2

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.687[a]	.472	.434	.55185

a. Predictors: (Constant), Dosis

ANOVA[b]

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	3.806	1	3.806	12.499	.003[a]
	Residual	4.264	14	.305		
	Total	8.070	15			

a. Predictors: (Constant), Dosis

b. Dependent Variable: COX_2

Coefficients[a]

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	3.457	.261		13.260	.000
	Dosis	-1.003	.284	-.687	-3.535	.003

a. Dependent Variable: COX_2

Repository Universitas Brawijaya

Lampiran7. AnalisisRegresiEkspresi PGE

Regression

Variables Entered/Removed[b]

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Dosis[a]	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: PGE

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.797[a]	.636	.609	.59505

a. Predictors: (Constant), Dosis

ANOVA[b]

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	8.643	1	8.643	24.409	.000[a]
	Residual	4.957	14	.354		
	Total	13.600	15			

a. Predictors: (Constant), Dosis

b. Dependent Variable: PGE

Coefficients[a]

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	3.779	.281		13.440	.000
	Dosis	-1.511	.306	-.797	-4.941	.000

a. Dependent Variable: PGE

Repository Universitas Brawijaya

Lampiran 5

Pendokumentaian Penelitian

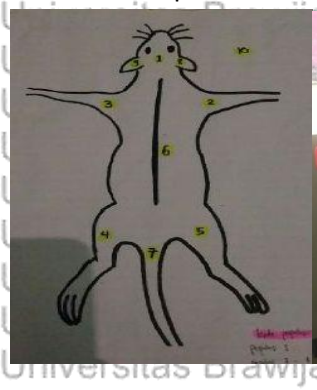
Genistein

Leuprolide Acetat

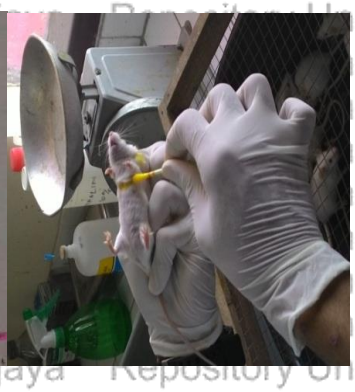
Dienogest

Siklosporin A

Ethinil Estradiol



Tempat penandaan mencit



Proses penandaan

Mencit dalam kandang

Repository Universitas Brawijaya

Jaringan Adenomyosis

Proses penyuntikan

Pembedahan mencit model endometriosis

Hasil lesi endometriosis

Parafin blok