# BRAWIJAYA

#### **KATA PENGANTAR**

Puji syukur senantiasa penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga kami dapat menyelesaikan tesis yang berjudul Pengaruh Pemberian Genistein Terhadap Ekspresi *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) dan kepadatan vaskular Pada Mencit Model Endometriosis. Pada kesempatan ini perkenankanlah kami dengan segala kerendahan hati dan segala rasa hormat menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

- Prof. Ir. Mohammad Bisri, MS selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang atas kesempatan yang diberikan kepada kami untuk mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis Obstetri dan Ginekologi di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Dr. dr. Wisnu Barlianto, Msi.Med, Sp.A-K,selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang atas kesempatan yang diberikan kepada kami untuk mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis Obstetri dan Ginekologi di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- 3. dr. Restu Kurnia Tjahjani, M.Kes selaku Direktur RSU Dr. Saiful Anwar Malang atas kesempatan yang diberikan kepada kami untuk mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis Obstetri dan Ginekologi di lingkungan RSU Dr. Syaiful Anwar Malang
- 4. **Prof. Dr. Soetomo Soewarto, Sp.OG(K)**, Guru Besar kami, atas segala motivasi, bimbingan dan nasehat selama kami menjalankan pendidikan.
- 5. **Dr. dr. Kusnarman Keman, Sp.OG(K)**, Kepala Laboratorium dan Kepala SMF Obstetri Ginekologi FK Universitas Brawijaya/RSU Dr. Saiful Anwar Malang atas segala nasehat, ilmu dan bimbingan selama pendidikan.

- 6. **Dr. dr. Sutrisno, Sp.OG(K)**selaku pembimbing I penulisan karya ilmiah inidan sebagai kepala IRNA III RSU Dr. Saiful Anwar Malang.Terima kasih atas segala dukungan, motivasi, bimbingan, nasehat, kepercayaan dan kemudahan yang telah dan selalu diberikan kepada kami dalam menghadapi dan menjalani pendidikan sampai saat ini.
- 7. **dr. Yahya Irwanto, Sp.OG(K)**, selaku pembimbing II penulisan karya ilmiah ini dan sebagai kepala IRNA III RSU Dr. Saiful Anwar Malang. Terima kasih atas segala kesempatan dan waktu yang diberikan, wawasan, saran dan koreksi serta bimbingannya selama proses pembuatan karya ilmiah ini.
- 8. **Dr. dr. Tatit Nurseta, SpOG(K)**, selaku Ketua Program Studi Program Pendidikan Dokter Spesialis I Obstetri dan Ginekologi FK Universitas Brawijaya Malang/RSU Dr. Saiful Anwar Malang dan selaku Pembimbing Akademik, atas segala bimbingan, nasihat dan saran selama pendidikan ini dansebagai dosen pembimbing akademik yang senantiasa memberikan bimbingan dan masukan selama proses pendidikan dalam Program Studi Program Pendidikan Dokter Spesialis I Obstetri dan Ginekologi FK Universitas Brawijaya Malang/RSU Dr. Saiful Anwar Malang.
- Seluruh supervisor/staf pengajar/guru-guru kami di lingkungan SMF/Lab
   Obstetri Ginekologi FK Universitas Brawijaya / RSUD Dr. Saiful Anwar
   Malang dan Rumah Sakit Jejaring, atas segala nasehat dan bimbingan yang telah diberikan selama kami mengikuti pendidikan ini.
- 10. Kepada suamiku Ibadurrokhman Ali, ST, MT dan anakku Abira Almaimanah Ibad yang selalu memberikan kasih sayang, kebaikan hati, dukungan, dan kesabaran selama ini. Terima kasih atas segala doa dan restu yg tidak pernah putus diberikan.

**SRAWIJAYA** 

- 11. Kedua orang tuaku tercinta, (Alm). Warhana Kassah dan Hj. Sopialena, Ph.D yang tanpa lelah memberikan kasih sayang, cinta, dukungan baik secara moril maupun materiil, membesarkan, menjaga dan mendampingi dalam suka dan duka kepada penulis. Terima kasih atas segala doa dan restu yang tidak pernah putus dan kasih sayang yang tidak dapat terukur atas pelajaran hidup yang sangat bermanfaat.
- 12. Kedua saudaraku tercinta, kakakku dr. Anggia Mayangsari Wardhana dan adikku dr. Anggia Rarasati Wardhanayang selalu memberikan dukungan dan mendoakan aku selama hidupku. Doaku untuk kalian selalu.
- 13. Teman–teman seperjuangan dalam pendidikan ini dr. Aditiya Fendi Uji Pamungkas dan dr. Edza Akelei Ryantifaterima kasihatas segala bantuan dan kerja sama selama menjalani PPDS.
- 14. Seluruh teman sejawat peserta PPDS I Obstetri Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, atas kerjasama, pengertian dan bantuannya serta dukungan semangat dalam menempuh dan menyelesaikan pendidikan ini.
- 15. TKP OBG mbak Rini, mbak Emma, mbak Widya, mbak Detri, mbak Vina, mbak Meti, mbak Esti atas semua bantuan, dukungan dan kerjasamanya selama kami menjalankan pendidikan ini.
- 16. Bidan-bidan, perawat dan seluruh staf IRNA III serta Poliklinik RSUD Dr. Saiful Anwar Malang yang telah bekerja sama selama pendidikan ini
- 17. Pihak lain yang tidak dapat kami sebutkan yang telah membantu baik secara moril maupun materi selama ini.

Kami menyampaikan permohonan maaf yang sebesar-besarnya atas semua kesalahan yang kami lakukan selama kami menempuh pendidikan ini.Kami berharap semua tulisan ini dapat bermanfaat dan dapat memberikan sumbangan pemikiran betapapun sesederhananya bagi ilmu pengetahuan dan masyarakat.

Malang, Juli 2019



#### PENGARUH GENISTEIN BERBAGAI DOSIS TERHADAP EKSPRESI PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA) DAN KEPADATAN VASKULAR PADA MENCIT MODEL ENDOMETRIOSIS

Anggia Prameswari Wardhana, Sutrisno, Yahya Irwanto

LAB/SMF Obstetri Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/ RSUD Saiful Anwar Malang, Divisi Fertilitas Endokrinologi

#### **ABSTRAK**

Latar Belakang: Kelangsungan hidup lesi endometriosis bergantung pada pembentukan pembuluh darah, perkembangan sel, dan suplai oksigen. Vaskularisasi jaringan endometriosis ektopik dapat dievaluasi dari kepadatan vaskularnya. *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) adalah salah satu petanda proliferasi sel yang mempengaruhi pertumbuhan lesi endometriosis. Genistein merupakan isoflavone yang berpotensi tinggi sebagai anti-angiogenik dan inhibitor proliferasi melalui ikatan dengan reseptor estrogen.

**Tujuan**: Mengetahui pengaruh pemberian genistein berbagai dosis terhadap ekspresi PCNA dan kepadatan vaskular pada peritoneum mencit model endometriois

**Metode**: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan Bahan Biologi Tersimpan (BBT) jaringan peritoneum mencit. Blok parafin dibagi menjadi 6 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (mencit sehat), kelompok kontrol positif (mencit model endometriosis tidak diberi perlakuan), dan 4 kelompok perlakuan genistein dosis 1,3 mg/hr, 1,95 mg/hr, 2,6 mg/hr dan 3,25 mg/hr. Ekspresi PCNA dilakukan pemeriksaan dengan teknik imunohistokimia dan hematoxilin eosin untuk kepadatan vaskular. Analisa preparat mempergunakan software OLIVIA dengan pembesaran 400 kali pada 10 lapangan pandang. Penghitungan preparat dilakukan secara manual dengan software cell count. Hasil pengamatan dianalisis dengan uji ANOVA dan uji Dunnet T3 5%.

**Hasil**: Berdasarkan analisis dengan ANOVA didapatkan perbedaan yang signifikan ekspresi PCNA dan kepadatan vaskular akibat pemberian genistein berbagai dosis dengan p-value sebesar 0.001 (p<0.05). Pada uji Dunnet T3 5% didapatkan peningkatan ekspresi dari PCNA pada kelompok pemberian genistein dengan dosis 1,3 mg/hr, 1,95 mg/hr, 2,6 mg/hr dan terjadi penurunan pada dosis 3,25 mg/hr. Pada kepadatan vaskular didapatkan penurunan secara signifikan dengan pemberian genistein berbagai dosis.

**Kesimpulan**: Pemberian genistein berbagai dosis secara signifikan meningkatkan ekspresi PCNA tetapi mampu menurunkan ekspresi PCNA pada dosis 3,25mg/hari dan secara signfikan menurunkan kepadatan vaskular.

Kata Kunci: Endometriosis, genistein, PCNA, kepadatan vaskular.

## EFFECT OF GENISTEIN ON PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA) EXPRESSION AND VASCULAR DENSITY IN PERITONEUM OF ENDOMETRIOSIS MICE MODEL

Anggia Prameswari Wardhana, Sutrisno, Yahya Irwanto

Obstetrics and Gynecology Department, Faculty of Medicine Brawijaya University / Saiful Anwar General Hospital Malang, Fertility and Endocrinology Division

#### **ABSTRACT**

**Background**: Survival of endometriosis lesions depends on the formation of blood vessels, cells proliferation, and oxygen supply. Vascularity of ectopic endometriosis tissues can be evaluated by its vascular densities. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) is one of the markers of cells proliferation that affects the growth of endometriotic lesions. Genistein is an isoflavone component that highly potential effect as an anti-angiogenic and inhibiting proliferation through the binding capacity to estrogen receptors.

**Objective:** To determine the effect of genisteinin varian doses administration to PCNA expression and vascular growth in peritoneum endometriosis mice model.

**Methods**: This research is an experimental study using the Stored Biological Materials of mice peritoneum tissue. The paraffin block was divided into six groups, which are the negative control group (healthy mice), positive control group (mice with endometriosis model without treatment), and four treatment groups with genistein doses of 1.3 mg/day, 1.95 mg/day, 2.6 mg / day and 3.25 mg /day. PCNA expressions were examined by immunohistochemical techniques and hematoxilin eosin for and vascular densities. Analysis of preparation uses OLIVIA software with magnification of 400 times in five-field of view. Preparation calculations are done manually with cell count software. Observations were analyzed with ANOVA test and Dunnet te T3 5% test.

**Results**: Based on analysis with ANOVA, there was a significant difference in PCNA expression and vascular densities because effect of genistein in various doses with a p-value of 0.001 (p<0.05). Based on Dunnet T3 5% test increase of PCNA expression by given genistein dose 1,3 mg/day, 1,95 mg/day, 2,6 mg/day an reduce in dose 3,25 mg/day. Vascular densities reduce significantly in all treatment groups.

**Conclusion**: Administration of genistein in various doses significantly increases PCNA expression, but reduces PCNA expression in dose of 3.25 mg/day and significantly reduce vascular densities.

**Keywords:** Endometriosis, genistein, PCNA, vascular density.



#### **DAFTAR ISI**

| HALAMAN JUDUL                                 |   |
|---|---|
| LEMBAR PENGESAHAN                             |   |
| KATA PENGANTAR                                |   |
| ABSTRAK                                       | ١ |
| DAFTAR ISI                                    |   |
| DAFTAR GAMBAR                                 | Х |
| DAFTAR TABEL                                  | Х |
| DAFTAR SINGKATAN                              | > |
| BAB I PENDAHULUAN                             |   |
| 1.1 Latar Belakang                            |   |
| 1.2 Rumusan Masalah                           |   |
| 1.3 Tujuan Penelitian                         |   |
| 1.3.1 Tujuan Umum                             |   |
| 1.3.2 Tujuan Khusus                           |   |
| 1.4 Manfaat Penelitian                        |   |
| 1.4.1 Manfaat Akademik                        |   |
| 1.4.2 Manfaat Praktis                         |   |
| 1.4.3 Manfaat Masyarakat                      |   |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA                       |   |
| 2.1. Endometriosis                            |   |
| 2.1.1 Definisi Endometriosis                  |   |
| 2.1.2 Histologi Endometrium dan Endometriosis |   |
| 2.1.3 Epidemiologi Endometriosis              |   |
| 2.1.4 Etiologi Endometriosis                  | 1 |
| 2.1.4.1 Teori Retrograde                      | 1 |
| 2.1.4.2 Teori Immunologi                      | 1 |
| 2.1.4.3 Teori Genetik                         | 1 |
| 2.1.4.4 Teori Hormonal                        | 1 |
| 2.1.4.5 Teori Metaplasia Coelomik             | 1 |
| 2.1.5 Patofisiologi Endometriosis             | 1 |
| 2.1.6 Diagnosis Endometriosis                 | 1 |
|   |   |

| 54<br>55<br>55<br>55<br>56<br>56 |
|----------------------------------|
| 55<br>55<br>56<br>56             |
| 55<br>56<br>56                   |
| 56<br>56                         |
| 56                               |
|                                  |
| 56                               |
|                                  |
| 57                               |
| 57                               |
| 57                               |
| 57                               |
| 57                               |
| 57                               |
| 58                               |
| 59                               |
| 60                               |
| 60                               |
| 61                               |
| 62                               |
|                                  |
| 63                               |
|                                  |
| 65                               |
|                                  |
| 67                               |
|                                  |
|                                  |
| 76                               |
|                                  |
| 81                               |
|                                  |

# BRAWIJAYA

#### BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN

| 7.1 Kesimpulan | 81   |
|----------------|------|
| 7.2 Saran      | 81   |
| DAFTAR PUSTAKA | xvii |
| LAMPIRAN       | xxiv |



#### **BABI**

#### **PENDAHULUAN**

#### 1.1 Latar Belakang

Endometriosis menjadi salah satu masalah reproduksi utama saat ini, yang ditandai dengan adanya pertumbuhan lesi endometriosis dari kelenjar dan stroma endometrium. Endometriosis umumnya mempengaruhi 10-15% wanita usia reproduksi dan umumnya terjadi pada 40-60% wanita dengan nyeri pelvis, dan 30-50% pada wanita infertil. (Giudice *et al.*, 2012). Penderita endometriosis di dunia berdasarkan data *World Statistic of Endometriosis* tahun 2014 sebanyak 176.000.000 penderita (Kaur, K *et al.*, 2016). Data penderita endometriosis di Indonesia antara lain di RS dr.Cipto Mangunkusumo Jakarta sejak 2006-2010, endometriosis dijumpai pada 10% dari perempuan reproduktif, di RSUD dr. Muwardi Surakarta angka kejadian endometriosis pada temuan bedah ginekologis tahun 2010 berkisar antara 13,6%, di RSUD dr Sutomo Surabaya angka kejadian endometriosis sebesar 23,8%. (Oepomo, 2010)

Endometriosis dan perjalanan etiopatogenesis penyakit ini telah banyak diteliti secara mendalam dan dijelaskan dalam beragam teori mulai dari teori klinik hingga biomolekuler(Prayitno, 1994; Speroff L, 2005; Taylor*et al*, 2010; Burney *et al.*, 2012). Berdasarkan teori implantasi Sampson (1927), lesi endometriosis peritoneum berkembangdari jaringan endometrium, yang mengalir secara retrograde melaluituba fallopii selama menstruasi (Sourial *et al.*, 2014). Selama beberapa tahun terakhir, banyak penelitian dapat menunjukkan bahwa teori tersebut dan kelangsungan hidup lesi ini sangat bergantung pada pembentukan pembuluh darah, perkembangan, dan suplai oksigen. (Groothuis *et al.*, 2005). Selanjutnya, ditentukan oleh keadaan hipoksia jugasebagai tahap

perkembangan jaringan endometrium ektopik.Oleh karena itu, endometriosis dikaitkan dengan peningkatan regulasifaktor angiogenik dalam serum dan cairan peritoneum daripasien dan menstimulasipembentukan pembuluh darah baru dalam lesi endometriosisdan peritoneum sekitarnya (Kuroda *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2013). Temuan ini menunjukkan bahwa vaskularisasi merupakan ciri utama dalampatogenesis endometriosis, yang merupakan target potensialuntuk pengembangan strategi diagnostik dan terapeutik masa depan.

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

Sebagian besar perawatan medis saat ini untuk tujuan endometriosis menurunkan aktivitas estrogen. Terapi yang endometriosis antara lain steroid kontrasepsi, progestogen, dan *Gonadotropin-Releasing Hormone* (GnRH) agonis misalnya *leuprolide acetat* (tapros, divalin), danazol, progestin selektif misalnya dienogest (visanne), dan terapi operatif, serta androgen dan agen antiinflamasi

non steroid. Pengobatan ini hanya dapat digunakan untuk waktu yang terbatas karenaefek sampingnya. Selain itu, tingkat kekambuhan tinggi setelah pengobatanadalah masalah yang paling signifikan. Oleh karena itu strategi pengobatan dari endometriosis sampai saat ini masih terus diteliti.

Agen anti-angiogenik dari kelompok zat yang berbeda saat ini dibahas sebagai terapi yang menjanjikan untuk terapi endometriosis di masa depan salah satunya adalah terapi menggunakan fitoestrogen genistein. Genistein masuk kedalam kelas isoflavon yang mempunyai fungsi sebagai penghambat proliferasi, anti tumor, anti kanker, mempengaruhi apoptosis sel, dan mampu berikatan baik dengan reseptor estrogen. Sumber genistein terbanyak adalah kedelai dan produk olahannya seperti tahu, tempe, tauco, kecap, juga ditemukan pada buah-buahan dan teh hijau (Tripathi, *et al.*, 2005; Winarsi, 2005; Prakash and Gupta, 2011). Ketika kadar estrogen tinggi seperti pada endometriosis, genistein akan berikatan dengan reseptor estrogen β yang menyebabkan ikatan estradiol terhambat sehingga mengakibatkan efek antiestrogenik dan mengaktifkan korepresor untuk menekan transkripsi gen. (Giudice, 2010; Fritz *and* Speroff, 2011).

Pada tingkat molekuler efek genistein pada sel meliputi inhibisi proliferasi, induksi diferensiasi, apoptosis, dan terhentinya sel pada siklus sel berhubungan dengan *transforming growth factor*(TGF) β1. Genistein menghambat pertumbuhan sel dengan memodulasi jalur signal *transforming growth factor* (TGF)β1. Peptida *growth factor* ini telah teridentifikasi sebagai faktor utama yang meregulasi proliferasi sel eukariotik dengan melemahkan aliran pasase yang melalui titik siklus sel (*cell cycle checkpoint*) sehingga hasil akhirnya dapat menghambat perkembangan sel endometriosis(Sourial *et al.*, 2014).

Patomekasnime endometrisosis yang melibatkan mekanisme proliferasi sel dan kepadatan vaskular telah diteliti sebelumnya. Berdasarkan penelitian

**SRAWIJAYA** 

Penelitian yang dilakukan oleh Sutrisno, *et al.* (2014) melaporkan terjadinya penurunan proliferasi sel yang signifikan pada sel kultur endometriosis pada 6 jam pasca pemberian terapi genistein dengan dosis 50 µmol/l pada dibandingkan dengan kelompok kontrol dan penelitian Sutrisno *et al* (2016) melaporkan pengaruh vaskularisasi berdasarkan ekspresi VEGF dan HIF-1 jaringan peritoneal kelompok endometriosis secara signifikan lebih tinggi dari kelompok kontrol dengan pemberian dosis genistein paling tinggi 1,3mg/hari (Sutrisno *et al*, 2016).

Berdasarkan penjelasan diatas, peneliti tertarik untuk mengetahui pengaruh pemberian genistein dalam menurunkan proliferasi dan menghambat pertumbuhan vaskularisasi sel endometriois. Oleh karena itu penulis tertatrik untuk mengetahui pengaruh pemberian genistein berbagai dosis terhadap ekspresi *Proliferating Cell Nuclear Antigen* dan kepadatan vaskular pada peritoneum mencit model endometriosis.

#### 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

"Adakahpengaruh pemberian genistein terhadap ekspresi*Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) dan kepadatan vaskular pada peritoneum mencit model endometriosis?".

#### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian genistein berbagai dosis terhadap ekspresi ekspresi *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA)dan kepadatan vaskular pada peritoneum mencit model endometriosis

## SRAWIJAYA

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

- Membuktikan pengaruh pemberian genistein berbagai dosis terhadapekspresi Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) pada peritoneum mencit model endometriosis
- 2. Membuktikan pengaruh pemberian genistein berbagai dosis terhadap kepadatan vaskular pada peritoneum mencit model endometriosis

#### 1.4. Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Manfaat Akademik

Diharapkan dapat menjadi literatur dalam bidang pendidikan atau sebagai studi pustaka untuk penelitian selanjutnya terkait mengenai pengaruh pemberian genistein berbagai terhadapekspresi *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) dan kepadatan vaskular pada peritoneum mencit model endometriosis

#### 1.4.2 Manfaat Praktis

Sebagai dasar ilmiah untuk mengkaji terapi yang efektifdalam pemberian genistein berbagai dosis terhadapekspresi*Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) dan kepadatan vaskular pada peritoneum mencit model endometriosissehingga bisa digunakan sebagai prioritas terapi non operatif dalam endometriosis.

#### 1.4.3 Manfaat Masyrakat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadikan genistein sebagai agen antiproliferatif dan menghambat pertumbuhan vaskular dalam penunjang terapi wanita dengan endometriosis dan masyarakat dapat memberdayakan tanaman yang mengandung genistein sebagai tanaman obat tradisional.

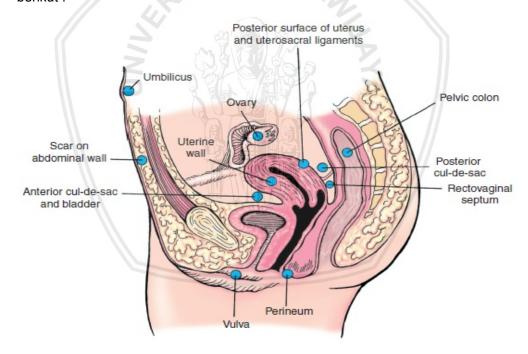
#### **BAB 2**

#### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### 2.1 Endometriosis

#### 2.1.1 Definisi Endometriosis

Endometriosis didefinisikan sebagai suatu penyakit inflamasi yang ditandai dengan adanya jaringan (sel-sel kelenjar dan stroma) mirip endometrium berada di daerah luar kavum uteri (Giudice, 2010). Pertumbuhan jaringan endometrium tersebut umumnya ditemukan di rongga pelvik, termasuk ovarium, tuba falopii, kandung kemih, perineum, vulva dan *recto sigmoid colon* (Venes, 2009; Barrier, 2010). Lokasi implantasi endometriosis terlihat pada Gambar 2.1 berikut:



Gambar 2.1 Lokasi Implantasi Endometriosis (Venes &Thomas, 2009)

Keterangan : Endometriosis dapat ditemukan di kavum pelvik, seperti pada ovarium, tuba falopii, peritoneum, ligamen uterosakral, atau sekat antara vagina dan rektum. Pada keadaan yang lebih jarang, endometriosis dapat ditemukan di dalam vagina, perineum, vulva.Bahkan bisa juga dijumpai pada luka bekas operasi *caesar*, bekas luka laparoskopi/ laparotomi, dan usus besar.

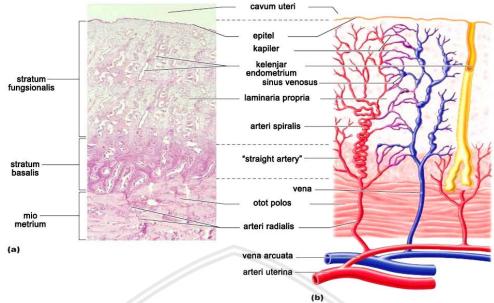
**SRAWIJAYA** 

Endometriosis paling sering ditemukan di ovarium berupa gumpalan atau tumpukan darah tua berwarna merah coklat hingga gelap yang sering disebut kista coklat (*endometrioma*).Gambaran lain dari jaringan endometriosis yaitu bercak kecil, datar, gelembung atau flek-flek berwarna bening, putih, coklat, merah, maupun hitam. Endometriosis dapat mengiritasi jaringan di sekitarnya dan dapat menyebabkan perlekatan (*adhesi*) akibat jaringan parut yang ditimbulkannya (Prabowo, 2009).

Menurut Leyland *et al* (2010), endometriosis merupakan penyakit jinak, namun memiliki karakteristik keganasan seperti pada kanker yaitu invasif, pertumbuhan sel yang tidak terkendali, kecenderungan metastasis dan terulang kembali. Terdapat pola yang sama dalam hal invasi lokal, penyebaran dan responsif terhadap estrogen dalam menginduksi sinyal pertumbuhan pada kondisi endometriosis dan kanker ovarium. Endometriosis dianggap sebagai prekursor kanker dan faktor resiko terjadinya kanker ovarium (Baldi *et al*, 2008; Leyland *et al*, 2010).

#### 2.1.2 Histologi Endometrium dan Endometriosis

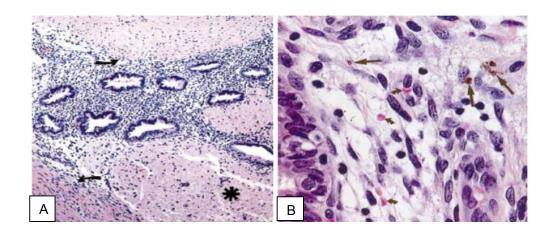
Menurut Eroschenko (2012) endometrium merupakan lapisan dalam uterus, yang memiliki tiga komponen yaitu epitel selapis *columnar*, *stroma*, dan kelenjar.Epitel melapisi lumen yang mengandung kelompok sel bersilia dan bersekretorik yang meluas ke bawah ke dalam jaringan ikat *lamina propria* membentuk kelenjar uterus tubular yang panjang.Kelenjar tersebut dipisahkan oleh stroma jaringan ikat endometrium (stroma mesenkim) yang berada diantara epitel permukaan dan miometrium.Lamina propria tersusun atas *glandulae uteri* (kelenjar uterus) dan jaringan pengikat kolagen ireguler yangbanyak mengandung serabut kolagen tipe III, *fibroblast* dan *groundsubstance*. Histologi endometrium ditunjukkan pada Gambar 2.2 berikut:



Gambar 2.2 Histologi Endometrium (Hoffman, 2011)

Keterangan: Endometrium yang melapisi uterus terbagi atas dua daerah, yaitu stratum fungsionalis dan stratum basalis.(a) Stratum fungsional melapisi rongga uterus dan divaskularisasi oleh arteri spiralis yang berkelok-kelok membentuk anyaman kapiler di permukaan endometrium.Stratum fungsional dipengaruhi oleh steroid dan akan dilepaskan dan meluruh pada saat menstruasi; dan (b) Stratum basalis berada dekat dengan miometrium dan divaskularisasi oleh arteri basalis dan arteri straight. Lapisan ini bersifat permanen dan membentuk stratum fungsional baru (regenerasi) ketika setelah menstruasi.

Pada lesi endometriosis terdapatepitel, stroma dan kelenjar endometrial yang histologinyasama dengan endometrium eutopik (Leyland *et al*, 2010). Pemeriksaan analisis mikroskopis menunjukkan endometriosis terdiri dari kelenjar endometrium, stroma, terkadang dijumpai serat otot halus dan seperti endometrium eutopik, endometrium ektopik juga merespon peredaran hormon (Woodward *et al*, 2001). Histologi endometriosis ditunjukkan pada Gambar 2.3 berikut:



Gambar 2.3 Tampilan Mikroskopik Implan Endometriosis (Woodwardet al,2001)

Keterangan : (a) Fotomicrograf kekuatan sedang (pembesaran asli, x4; pewarnaan hematoxylin-eosin) menunjukkan kelenjar dan stroma endometriosis (tengah). Jaringan endometriosis dikelilingi oleh fibrosis (panah) serta produk darah rusak dan debris inflamasi (\*). (b)Fotomicrograf kekuatan tinggi (pembesaran asli, x80; pewarnaan hematoxylin-eosin) menunjukkan partikel coklat gelap dari hemosiderin atau hemofuscin (panah lurus) dan sel-sel darah merah tersebar (panah melengkung). Lapisan kelenjar endometriosis sebagian terlihat pada sudut kiri bawah.

#### 2.1.3 Epidemiologi Endometriosis

Endometriosis menjadi salah satu masalah reproduksi utama saat ini oleh karena angka kejadian penyakit ini yang cukup tinggi (Guidice, 2010). Endometriosis mempengaruhi 6-10% wanita usia reproduksi dari segala etnis dan kelompok sosial (Taylor, 2014). Ditemukan 1 dari 10 wanita usia reproduktif (15-49 tahun) atau sekitar 176 juta wanita di seluruh dunia terinfeksi endometriosis. Kejadian endometriosis diantara semua operasi pelvik berkisar 5-15%, dan yang menarik perhatian ditemukan pada wanita yang belum menikah dan usia muda. Umumnya endometriosis akan menyebabkan keluhan dismenorea, *dispareunia*, disuria, nyeri kronik abdomen, nyeri pelvik dan nyeri waktu defekasi (Burney, 2012).

Dampak yang ditimbulkan adalah nyeri pelvik menahun, gangguan haid dan infertilitas (Leyland *et al.*, 2010; Farrell, 2012; Borrelli *et al.*, 2013).

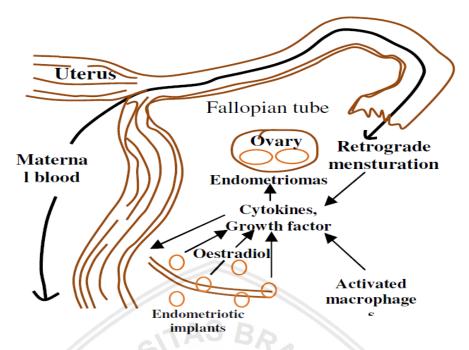
Diperkirakan sekitar 50-70% dari wanita dengan keluhan nyeri panggul kronis dan 38% wanita tidak subur atau sebanyak 90 juta wanita di seluruh dunia mengalami nyeri pelvik dan infertilitas. Endometriosis dapat meningkatkan kejadian resiko kanker ovarium dan infertil (Leyland *et al*, 2010). Lebih lanjut penyakit endometriosis ini merupakan salah satu indikasi yang paling umum untuk dilakukan operasi histerektomi sebelum usia 30 tahun di Amerika Serikat. Dampak dan progresivitas penyakit endometriosis akan berjalan terus sepanjang kehidupan seorang wanita.(Taylor, 2014).

#### 2.1.4 Etiologi Endometriosis

Kejadian endometriosis diduga disebabkan karena banyak faktor, komplek dan bervariasi antara masing-masing individu. Beberapa teori yang sampai saat ini masih dapat diterima yaitu:

#### 2.1.4.1 Teori Retrograde

Teori *retrograde* menstruasi, dikenal sebagai teori implantasi jaringan endometrium yang hidup dikemukan oleh John Sampson pada tahun 1927. Teori ini menjelaskan tentang sel-sel endometrium yang dilepaskan pada saat menstruasi bergerak mundur ke tuba falopii kemudian masuk ke dalam pelvik dan tumbuh di dalam rongga pelvik (Leyland *et al*, 2010). Terdapat atas tiga asumsi dalam teori *retrograde* yaitu : 1) Terdapat darah haid berbalik melewati tuba falopii, 2) Sel-sel endometrium yang mengalami *reflux* tersebut hidup dalam rongga peritoneum, 3) Sel-sel endometrium yang mengalami *reflux* tersebut dapat menempel ke peritoneum dengan melakukan invasi, implantasi dan proliferasi(Giudice, 2010).



Gambar 2.4 Skema Menstruasi Berbalik (Amberkar et al,2010)

Keterangan : Sel-sel endometrium yang dilepaskan pada saat menstruasi bergerak mundur melewati tuba falopii kemudian masuk ke dalam rongga pelvik, selsel endometrium tumbuh dan hidup di rongga peritoneum seperti di ovarium dengan melakukan invasi, implantasi dan proliferasi.Implantasi sel endometriosis mensekresi estradiol lokal dan sistemik.Sel-sel refluks yang tidak dihancurkan akan menyebabkan inflamasi melalui aktivasi makrofag.Makrofag memfasilitasi perkembangan endometrioma(endometriosis yang berada dalam ovarium) melalui growth factor dan menginduksiproduksi sitokin dalam jumlah abnormal.

#### 2.1.4.2 Teori Imunologi

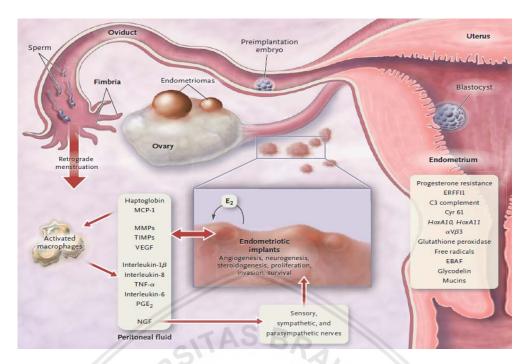
Kejadian endometriosis sering dikaitkan dengan sistem imun. Sistem imun yang berperan pada perkembangan penyakit endometriosis yaitu imunitas selular (sel-sel imun spesifik melawan penyakit) dan imunitas humoral(dibentuk antibodi untuk menyerang antigen). Pada penderita endometriosis memperlihatkan terjadinya gangguan sistem imun yang ditandai dengan berkurangnya sel T dan respon sel *natural killer* (Barrier, 2010). Penyakit ini juga memperlihatkan adanya peningkatan respon imun humoral dan aktivitas makrofag (Soares et al, 2012). Lesi endometriosis mensekresikan haptoglobulin yang mengakibatkan makrofag bukannya bertindak sebagai pembersih untuk menghilangkan sel

BRAWIJAYA

endometrium ektopik, tetapi menghambat fungsi pembersihnya (Borelli *et al*, 2013).

Teori imunologi menjelaskan bahwa perekatan sel-sel endometrium yang terlepas ke permukaan peritoneum dan invasi ke subperitonium melibatkan tampilan molekul perekatan membran ekstraselular (extracellular membrane adhesion molecules, ECAM) dan koreseptornya.Fragmen-fragmen endometrium dapat menumpuk di tempat-tempat tertentu di dalam rongga pelvis dan melekat pada permukaan peritorium.Cacat-cacat mikroskopik mengakibatkan sel-sel endometrium bersentuhan langsung dengan matriks submesotelium, sehingga sel-sel tersebut berproliferasi, menyebar, tumbuh dan terkadang menyerbu sampai ke lapisan subperitonium.Oleh karena tidak dapat mendegradasi jaringan endometriosis yang masuk kedalam peritoneum, penyakit endometriosis sering ditemukan pada wanita dengan imunitas selular yang rendah (Barrier, 2010).

Monosit dan makrofag dalam cairan peritoneal merupakan unsur penting sistem imun yang terdapat dalam cairan peritoneal. Makrofag merupakan tipe sel yang paling banyak ditemukan pada cairan peritoneal dan memegang peranan dalam patogenesis endometriosis.Makrofag peritoneal dan monosit endometriosis memberikan efek peningkatan produksi sitokin,faktor pertumbuhan, faktor angiogenik, molekul adhesi, enzim sitolitik, reactive oxygen radicals, serta subtansi lain yang menstimulasi proliferasi endometrium ektopik dan menurunkan apoptosis.Peningkatan produksi sitokin memediasi beberapa gejala endometriosis seperti nyeri dan infertilitas pada wanita usia reproduksi(tampak pada Gambar 2.5) (Dmowski, 2004; Taylor et al, 2009; Giudice, 2010).



### Gambar 2.5 Patofisiologi Nyeri dan Infertilitas pada Endometriosis (Giudice, 2010)

Keterangan : Sel dan jaringan endometrium yang mengalami retrograde akan berinvasi, implantasi dan proliferasi pada permukaan peritoneum dengan membentuk suplai darah dan menyerang daerah disekitarnya. Melalui infiltrasi saraf sensorik, simpatik dan parasimpatik akan menimbulkan respon inflamasi. Implantasi endometriosis mensekresikan estradiol (E2) dan prostaglandin E2 (PGE2), mengaktivasi makrofag oleh suatu substansi yang menarik makrofag MCP-1 (monosit chemotactic protein), neurotropik peptida NGF (factor growth nerveus), meningkatkan enzim yang berperan dalam tissue remodelling yaitu Matrix metalloproteinase (MMPs) dan tissue inhibitor MMPs (TIMPs) dan zat proangiogenic seperti vascular endotel growth factor (VEGF) dan interleukin-8 (IL-8). Lesi mensekresikan haptoglobin, yang menurunkan adhesi makrofag dan fungsi fagositosis. Lesi dan makrofaq yang melimpah di cairan peritoneal juga mengeluarkan sitokin proinflamasi yaitu interleukin-1β, interleukin-8, interleukin-6 dan TNF-α. Estradiol lokal dan sistemik yang dihasilkan kemudian merangsang produksi PGE2 yang dapat mengaktifkan serat nyeri, meningkatkan invasi lesi neuronal dengan menstimulasi produksi NGF dan neurotrofins lainnya dan mendorong tumbuhnya nosiseptor yang berkontribusi terhadap nyeri inflamasi persisten dan menghambat apoptosis neuronal. Endometrial bleeding activating factor (EBAF) mengalami kesalahan ekspresi dan dapat berkontribusi pada perdarahan uterus. Gen Hoxa10 dan HoxA11 dan integrin αVβ3 tidak dirangsang oleh progresteron, sehingga endometrium tidak ideal untuk proses implantasi. Bahan kimiawi yang mengganggu endokrin dapat menjadi penyebab terjadinya resistensi terhadap progesteron dan disfungsi sistem imun.

#### 2.1.4.3Teori Genetik

Munculnya penyakit endometriosis memiliki hubungan erat dengan riwayat keturunan atau keluarga yang menderita endometriosis. Wanita dengan riwayat endometriosis di keluarganya memiliki resiko 7-10 kali lebih tinggi dibandingkan wanita yang tidak mempunyai riwayat keturunan atau keluarga dengan endometriosis. Beberapa keluarga mungkin membawa gen yang menjadikan sel-sel abnormal untuk bertahan hidup dan tumbuh di ektopik rongga panggul. Namun, masih sedikit kemajuan yang telah dibuat dalam mengindentifikasi varian genetik yang berpengaruh dalamendometriosis (Farrell, 2012).

#### 2.1.4.4 Teori Hormonal

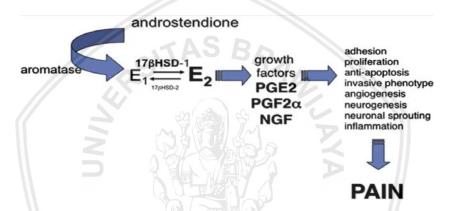
Hormon steroidmempengaruhi terjadinya proliferasi sel, motilitas sel, pembelahan dan pertahanan hidup jaringan endometriosis (Giudice, 2010).Hal ini juga didukung oleh bukti adanya reseptor estrogen dan progresteron pada epitel dan stroma endometriosis (Garai, 2006).Estradiol dalam jaringan endometriosis mempunyai peranan penting dalam proliferasi dan stimulator sitokin proinflamasi (Giudice, 2010).

Pada endometriosis terjadi peningkatan enzim-enzim pembentukan estradiol (E2) yaitu enzim *aromatase*, *sulfatase* dan 17β-*hydroxiysteroid dehydrogenase* (17β-HDS) serta penurunan efek progresteron melalui enzim 20α-*hydroxiysteroid dehydrogenase*. Pembentukan estradiol pada jaringan endometriosis dapat melalui 2 cara, yaitu jalur *aromatase* dengan mengkonversi *androstenedion* ovarium menjadi Estron (E1) dan melalui 17β-HDS tipe 1, E1 diubah menjadi E2 yang mempunyai efek estrogenik kuat. Jalur selanjutnya adalah melalui jalur *sulfatase*, dimana *sulfatase*akan mengubah estrogen sulfat

**SRAWIJAYA** 

menjadi E1, yang selanjutnya akan diaktifkan oleh 17β-HDS tipe 1 menjadi E2 (Nurtjahyo, 2011).

Menurut Nurtjahyo (2011) terjadi peningkatan RE- $\beta$  dibanding RE- $\alpha$ . Peningkatan enzim 20 $\alpha$ -hydroxiysteroid dehydrogenaseakan menghentikan kerja progresteron dengan mengubahnya menjadi bentuk kurang aktif, yang mempunyai afinitas rendah terhadap reseptor progresteron (Bulun, et al, 2009). Perubahan progresteron ini akan menyebabkan efek E2 lokal lebih dominan pada endometriosis. Biosintesis estradiol pada endometriosis ditunjukkan pada Gambar 2.6 berikut:



Gambar 2.6 Biosintesis Estradiol Lokal pada Endometriosis (Burney, 2012)

Keterangan : Biosintesis estradiol (E2) diproduksi oleh lesi endometrium ektopik (endometriosis) melalui peningkatan enzim aromatase mengubah androstendione menjadi estrone (E1) dan 17βhikdroksisteroid type-1 (17βHSD-1) mengubah E1 menjadi E2 sehingga terjadi peningkatan E2 secara lokal pada jaringan endometriosis. Produksi E2 yang berlebih akan meningkatkan metabolisme pada lesi endometriosis, E2 menginduksi growth factors, Prostaglandin E2 (PGE2), Prostaglandin F2α (PGF2α) dan Nerve Growth Factor (NGF)mengakibatkan terjadinya peningkatan proses adhesi, proliferasi, anti-apoptosis, invasi dan angiogenesis pada sel endometriosis yang dapat menimbulkan rasa nyeri.

#### 2.1.4.5 Teori Metaplasia Coelomik

Dalam teori metaplasia *coelomik*, lesi endometriosis berkembang ketika sel-sel *mesothelial coelom* dari peritoneum mengalami metaplasia (Leyland *et al*,2010). Teori ini menjelaskan bahwa peritoneum dapat bertransformasi menjadi

jaringan endometrium.Hal ini mungkin disebabkan karena adanya peradangan atau iritasi kimiawi dari aliran *reflux* darah menstruasi.Berdasarkan pengamatan Agarwal dan Subramanian (2010) bahwa epitel *coelomik* merupakan bakal dari sel endometrium dan peritoneal, sehingga memungkinkan transformasi jenis sel satu menjadi sel lainnya.Sel-sel tertentu yang bersifat *pluripoten*yang apabila dirangsang dapat berubah bentuk menjadi jenis sel yang berbeda.Perangai ini dapat menerangkan temuan endometriosis pada wanita tanpa siklus haid dan endometriosis pada pria.

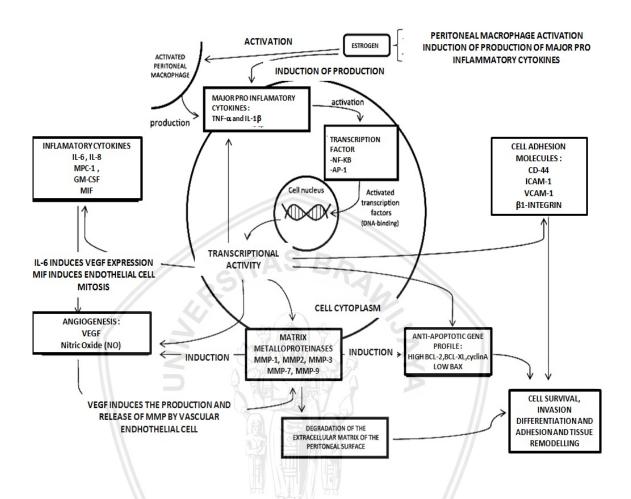
#### 2.1.5 Patofisiologi Endometriosis

Giudice (2010) dan Soares *et al* (2012) berpendapat bahwa patofisiologi endometriosis meliputi respon inflamasi, *survival* sel, proliferasi, migrasi, adhesi dan invasi, serta neoangiogenesis.Pertumbuhan dan perkembangan endometriosis tergantung pada estrogen. Penyimpangan sintesa dan metabolisme estogen merupakan patogenesa endometriosis. Estrogen yang diproduksi lokal dalam jaringan endometriosis, khususnya estradiol mempunyai peranan penting dalam proliferasi sel endometrial dan stimulator sitokin pro inflamasi (Bulun, 2009; Giudice, 2010).

Estradiol lokal dan sistemik dapat merangsang produksi PGE<sub>2</sub> dari lesi endometriosis yang dapat mengaktifkan serat nyeri, meningkatkan invasi lesi neuronal dengan menstimulasi produksi Nerveus Growth Factor(NGF) dan neutrophin lainnya dan mendorong tumbuhnya nosiseptor yang berkontribusi terhadap nyeri inflamasi persisten serta menghambat apoptosis neuronal.(Taylor et al, 2014). Infertilitas merupakan hasil dari efek toksik proses inflamasi pada gamet dan embrio, fungsi fimbriae yang menurun serta lapisan endometrium yang resisten terhadap hormon progesteron dan karena endometrium kurang

**SRAWIJAYA** 

baik kondisinya untuk implantasi embrio (Giudice, 2010).Patofisiologi endometriosis dijelaskan pada Gambar 2.7 berikut:



Gambar 2.7 Mekanisme Patofisiologi Endometriosis (Soares et al , 2012)

Keterangan : Gambaran jalur molekuler yang paling relevan pada sel epitel dan stroma endometrium ektopik yang terlibat dalam patofisiologi endometriosis.\*) Sitokin utama pro inflamasi diproduksi oleh makrofag peritoneal dan sel endometriosis.\*\*) Perubahan imunitas seluler peritoneal yang tampak pada endometriosis berhubungan dengan ekspresi sitokin inflamasi. Estrogen memberi pengaruh pada aktivasi dari makrofag di peritoneal dan menginduksi produksi sitokin pro inflamasi mayor yaitu *Tumor Necrosis Factor-α* (TNF-α) dan *Interleukin-1 Betha* (IL-1β) dilepaskan oleh makrofag peritoneal dan sel endometriosis yang selanjutnya mengaktivasi faktor transkripsi seperti *Nuclear Factor-kappa B* (NF-kB) dan *Activator Protein-1*(AP-1) dan yang lainnya. Faktor transkripsi yang telah aktif akan mengikat dan berinteraksi dengan rangkaian *Deoxy Ribonucleic Acide* (DNA) spesifik elemen respon estrogen sel endometriosis di dalam promotor gen reaktif, kemudian merangsang aktivitas transkripsi gen untuk menyandi produk-produk berikut ini yaitu: a) Sitokin lain seperti IL-6, IL-8,

RAWIJAYA

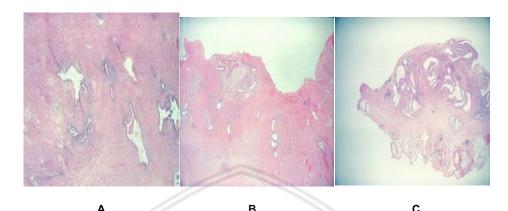
macrophage migration inhibitory factor (MIF), monocyte chemoattractant protein (MCP-1), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), b) Nitric oxide (NO) dan VEGF yang merupakan faktor pro angiogenik dominan pada endometriosis, c) Matrix metaloproteinases (MMPs) MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, dan MMP-9, yang terlibat dalam degradasi dan remodeling matriks ekstraseluler permukaan peritoneal, d) Merangsang peningkatkan profil gen antiapoptosis seperti B cell Lymphoma-2 (Bcl-2), BCL-XL (Extra Large), Cycin-A dan penurunan kadar Bcl-2 Associated X Protein (Bax) sebagai proapoptosis. Molekul adhesi yaitu CD-44, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) dan vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). Tingginya protein apoptosis pada kasus endometriosis menyebabkan sel memiliki kemampuan untuk melakukan invasi, adhesi dan diferensiasi, remodeling tissue dan sel survival sehingga terjadilah pembentukan jaringan endometriosis.

#### 2.1.6 Diagnosis Endometriosis

Beberapa cara untuk menegakkan diagnosis adanya endometriosis yang telah dikembangkan diantaranya dengan pendekatan klinis, pencitraan, laparoskopik dan laboratorik. Penggunaan *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) lebih akurat dalam menunjang diagnosa Endometriosis dibandingkan dengan menggunakan *Ultrasonografi* (USG). Penegakan diagnosa dengan menggunakan *Ultrasonografi-Transvaginal* (USG-TV) menjadi pilihan efektif saat ini karena mudah dilakukan dan hemat dalam waktu dan biaya dibandingkan dengan pemeriksaan dengan menggunakan MRI. (Jadoon *et al*, 2012; Abdullah, 2012).

Penegakan diagnosis endometriosis dengan pemeriksaan laboratorium masih memerlukan pemeriksaangabungan antarapenanda biokimiawi, penilaian klinis dan pemeriksaan histopatologik (Guidice, 2010; Leylandet al, 2010). Pemeriksaan Patologi Anatomi (PA)endometriosis positif harus menunjukkan ciri khas yaitu adanya kelenjar endometrium dan stroma endometrium,perdarahan bekas dan baru berupa eritrosit, pigmen hemosiderin, adanya sel-sel makrofag yang berisi hemosiderin laden pada dinding kista, di sekitarnya tampak sel-sel radang dan jaringan ikat sebagai reaksi dari jaringan normal di sekitar jaringan

endometriosis(Prabowo, 2009).Gambar 2.8 dibawah ini memberikan gambaran tentang hasil pemeriksaan histopatologi lesi merah pada endometriosis:



Gambar 2.8

Keterangan : Berdasarkan gambar di atas: A. Wilayah merah polypoid endometriosis paling sering ketika dihubungkan dengan daerah bekas luka dan reaksi kemerahan, berhubungan dengan kelenjar dan stroma; B. Polip merah sebagian besar adalah kelenjar dan stroma; C. Endometriosis terlihat pada *cul-de-sac*.

#### 2.1.7 Penatalaksanaan Endometriosis

Sampai dengan saat ini belum ada cara pengobatan yang mampu menyelesaikan seluruh permasalahan endometriosis dalam bentuk meniadakan secara total penyakit ini.Penggunaan semua sediaan obat khususnya hormonal untuk endometriosis hanya mempunyai kemampuan menekan dan bukan menyembuhkan penyakit.Penatalaksanaan medis untuk endometriosisdilakukandengan memfokuskan pada perubahan hormonal siklus menstruasi dengan tujuan menciptakan kondisi pseudo-menopause (lingkungan hipoestrogenik) atau pseudo-pregnancy (lingkungan dengan dominan).Manipulasi hormonal seringkali digunakan sebagai terapi awal sebagaimana operasi untuk mencegah kekambuhan gejala endometriosis(Kulaket al, 2011, Edwards, et al, 2013).

Penatalaksanaan endometriosisdapat dilakukansecara medikamentosa(Tabel 2.1) dan tindakan operatif/ pembedahan(Leyland *et al,* 2010).

Tabel. 2.1 Terapi Medikamentosa Endometriosis (Giudice, 2010)

| Terapi  | Mekanisme kerja   | Efek Samping   |
|---|---|--|
| Obat Anti inflamasi non Steroid( <i>Diclofenac, ibuprofen</i> )                           | -   | Iritasi Lambung  |
| Progesterone seperti<br>dydrogesterone,medro<br>xyprogesteron acetate,<br>norethisterone) | Mekanisme kerja dengan atropi<br>dan desidualisasi dari jaringan<br>endometrium, menekan<br>gonadotropin menghambat<br>ovulasi, membuat <i>amenorrhea</i> | Mual, retensi cairan, nyeri payudara, menimbulkan perdarahan diantara dua siklus menstruasi, perubahan suasana hati, depresi dan vaginitis atrofica                        |
| Kontrasepsi oral (Pil<br>kombinasi estrogen-<br>progestin)                                | Melalui mekanisme kerja obat<br>dengan membuat anovulasi, atropi<br>dan desidualisasi pada jaringan<br>endometrium,                                       | Efek samping seperti nyeri payudara, pembengkakan pada perut, peningkatan nafsu makan, pembengkakan pergelangan kaki, mual, dan perdarahan diantara dua siklus menstruasi. |
| GnRH Agonis   | Menurunkan regulasi reseptor pituitary dan menghambat poros hipotalamus-pituitary-ovarium mendorong penekanan pada ovarium                                | Timbulnya <i>hot flushes</i> , vagina kering, pengeroposan tulang, dan perubahan suasana hati.   |
| Danazol   | Menimbulkan anovulasi dengan<br>menurunkan lonjakan pada<br>pertengahan siklus hormon <i>lutein</i> .   | Menimbulkan penambahan<br>berat badan, pertumbuhan<br>rambut, <i>hot flushes</i> , vagina<br>kering, kelainan fungsi hati.   |

#### 2.2. Proliferasi

Proliferasi sel adalah proses di mana sel-sel memperbanyak diri dengan tumbuh dan kemudian membagi diri mejadi dua bagian yang sama. Faktor pertumbuhan (*growth factor*) menggunakan berbagai jalur signal pertumbuhan untuk mengaktifkan sel-sel dan memasuki siklus sel. Growth factor harus melakukan 2 hal dalam mengaktifkan proliferasi sel, diantaranya yaitu mendorong sel untuk memasuki siklus sel dan mengontrol pertumbuhan sel

dengan meningkatkan masa sel melaui peningkatan makromolekul biosisntesis. (Hadi, 2011)

Meskipun endometriosis merupakan penyakit tumor jinak, namun karakteristik pada sel endometriosis memiliki kemiripan dengan keganasan seperti sifatnya invasive, memiliki kecendrungan untuk bermetastasis dan kambuh. Proliferasi sel pada endometriosis telah dipelajari oleh berbagai peneliti namun belum banyak diungkap mengenai mekanismenya secara pasti.(Cahyanti, et al, 2009)

Kenaikan sensitivitas endometrosis terhadap proliferasi sel dapat menjadi salah satu kemungkinan patogenesis penyakit ini. Sebuah penelitian menunjukkan adanya peningkatan signifikan proliferasi sel pada penderita endometriosis dibandingkan dengan bukan endometriosis.(Rudzitis et al, 2013)

Jaringan endometriossi mensekrrsiskan estradiol (E2) lokal yang bersifat estrogenik. Estradiol yang dihasilkan oleh jaringan endometriosis berikatan dengan RE-α dan RE-β, membentuk ikatan kompleks estrogen dan reseptor estrogen. Ikatan komplek estrogen dengan reseptor estrogen berikatan dengan bagian spesifik DNA yang disebut promotor gen pada ERE.(Harris et al, 2005) Proses transkripsi tidak hanya terjadi melalui ikatan komplek estrogen dan reseptor estrogen pada ERE tetapi juga melalui ikatan dengan protein-protein lain yaitu protein co-regulator, dalam hal ini protein co-regulator yang diaktifkan adalah co-activator sehingga terjdilah proses transkripsi, mRNA dan juga sintesis protein.(Soares*et al*, 2012)

Pada pemeriksan imunohistokimia dengan menggunakan proliferating cell nuclear antigen (PCNA) untuk menilai proliferasi sel endometrium wanita dengan endometriosis telah dilakukan, dan menemukan bahwa terdapat peningkatan jumlah proliferasi sel pada endometrium, stroma dan kelenjar, serta epitelium luminal dari wanita dengan endometriosis. (Soare *et al*, 2012)

#### 2.3. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), merupakan marker proliferasi sel saat siklus sel berada pada fase G1 awal dan fase S. Pemeriksaan telah banyak digunakan pada penelitian-penelitian dasar DNA telah digunakan sebagai alat prognostik pada patologi kasus bedah serta memiliki korelasi yang baik dengan ekspresi KI-67. (Rudzitis et al., 2013)

Proliferasi cell nuclar antigen merupakan sebuah protein tambahan DNA prolimerase delta dengan berat molekul 36.000 kD, yang merupakan enzim fase G1 dan puncaknya saat fase S. Penelitian menunjukkan bahwa PCNA jaringan. Pemeriksaan pengukuran replikasi sel dengan meggunakan imunohistokimia (IRC) telah menunjukkan bahwa PCNA terdapat pada sel normal dan mentransformasikan proliferasi.(Rudzitis *et al.* 2013)

Akhir-akhir ini, PCNA telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi replika sel. Fungsi PCNA sebagai faktor progesivitas terhadap polimerase dan merupakan faktor yang penting terhadap replikasi DNA. Beberapa penelitian pada binatang membandingkan deteksi PCNA dengan analisis kuantitative thynidibne dengan penanda tritium, hasilnya menunjukkan bahwa PCNA berperan sebagai marker endogenus terhadap proliferasi sel. Disampng memiliki peran dalam replikasi DNA, PCNA juga terlibat dalam perbaikan DNA yang rusak. Hal ini terbukti dengan adanya overekspresi PCNA dan DNA yang tidak disertai dengan proliferasi sel pada sel yang terpapar radiasi sehingga mengalami kerusakan DNA. PCNA juga terekspresi selama regresi jaringan, misalnya pada korpus luteum selama luteolisis struktural. Lebih jauh lagi, penelitian terkini menunjukkan bahwa PCNA dapat bertindak sebagai docking site yang berinterakasi dengan beebrapa protein yang terlibat dalam regulasi siklus sel dan perbaikan DNA (DNA repair). Dengan demikian, adanya interaksi antara PCNA dengan berbagai protein lain yang memilii berbagai aktivitas seluler

menunjukka bahwa PCNA memiliki peranan multifungsional dalam proses replikasi DNA.(Rudzitis *et al*, 2013)

Pemeriksaan imunohistokimia mampu mendeteksi antigen nuklear seperti PCNA yang akan terekspresi pada sel yang sedang berproliferasi selam asiklus sel, sehingga mudah mempelajari proliferasi sel. Jumlah sel yang mengekspresikan aktivitas imunoreaktif PCNA per 100 sel dapat dilakuakn menggunakan mikroskop cahaya standard yang dilakukan oleh 2 orang pemeriksa independen, kemudian dihitung jumlah total sel epitelial dalam 10 lapangan pandang yang representative. Gambaran pewarnaan nukleus dianggap sebagai hasil yang positif. (Rudzitis et al, 2013)

#### 2.4. Vaskularisasi pada Endometriosis

Endometriosis didefinisikan oleh adanya lesi endometriosisdi lokasi extrauterine, seperti peritoneum panggul, ovariumdan septum rektovaginal . Lesi berasal dari endometrium, yang terdiri dari endometriumkelenjar yang dikelilingi oleh stroma yang tervaskularisasi baik. (Rocha et al, 2013). Berbeda dengan jenis jaringan lain, endometriummengalami perubahan yang sangat dinamis selama siklus menstruasi, yangberhubungan dengan angiogenesis yang digerakkan oleh estrogen dalam fase proliferasi dan progesterone untuk pembentukan vaskular dalam fase sekresi. Dengan demikian, vaskularisasi endometriosislesi juga mendasari regulasi hormon pada menstruasi. Selanjutnya, ditentukan juga oleh keadaan hipoksia sebagai tahap perkembangan jaringan endometrium ektopik.Bergantung pada penampilan khas mereka selama laparoskopi, endometriosislesi diklasifikasikan sebagai lesi merah, hitam dan putih. Lesi merah menunjukkan kepadatan microvessel dan aktivitas mitosistertinggi).Selain itu, mereka mengandung fraksi jauh lebih tinggi dari microvessels yang belum matangbila dibandingkan dengan lesi hitam. Dengan

BRAWIJAYA

demikian, lesi merah tampaknya sangat aktif dan mengindikasikan untuk suatutahap awal penyakit . Ditahap ini jaringan endometrium ektopik dengan cepat membentuk sendirisuplai darah, yang merupakan prasyarat untuk kelangsungan hidup jangka panjang . Oleh karena itu, endometriosis dikaitkan dengan peningkatan regulasifaktor angiogenik dalam serum dan cairan peritoneum daripasien . Hal ini menstimulasipembentukan pembuluh darah baru dalam lesi endometriosisdan peritoneum sekitarnya. (Hoeben *et al*, 2004, Rudzitis *et al*, 2012)

Pembentukan pembuluh darah merupakan ciri utama dalam patogenesis endometriosis. Vaskularisasi lesi endometriosis bersifat kompleks dan melibatkan angiogenesis, vaskulogenesis dan inokulasi (Laschke *et al* , 2018)

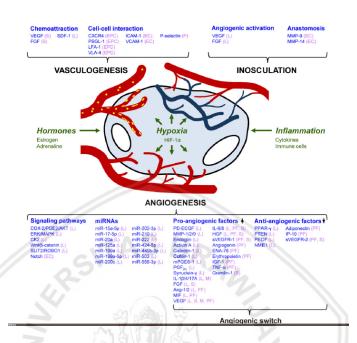
#### 1. Angiogenesis

Angiogenesis didefinisikan sebagai pembentukan pembuluh darah baru dari yang sudah ada sebelumnya. Hal ini diprakarsai oleh faktor pertumbuhan angiogenik, seperti faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF), yang mengaktifkan sel endotel yang tidak aktif dari microvessel untuk melepaskan matriks metalloproteinase (MMPs). Enzim proteolitik ini menurunkan membran basal pembuluh darah. Selain itu, sel-sel mural perivaskular dirangsang untuk melepaskan diri dari dinding pembuluh luar oleh angiopoietin (Ang) -2.(Laschke et al, 2018)

#### 2. Vaskulogenesis

Vaskulogenesis pada awalnya didefinisikan sebagai pembentukan pembuluh darah denovo oleh diferensiasi dan perakitan selprogenitorangioblastik selama embryogenesis. (Laschke et al, 2011).Sementara itu, diketahui bahwa vaskulogenesis juga terjadi pada orang dewasa. Jenis vaskulogenesispaska kelahiran didefinisikan sebagai penggabungan sel progenitor endotel yang

bersirkulasi (EPCs) dari sumsum tulang ke dalam endotheliummikrovaskular dari mikrovessel yang baru berkembang. (Laschke *et al*, 2018)



Gambar 2.9. Mode dasar vaskularisasi pada endometriosis (Laschke et al, 2018)

Keterangan : Angiogenesis (pembentukan pembuluh darah baru dari yang sudah ada sebelumnya), vaskulogenesis (penggabungan EPC yang bersirkulasi dari sumsum tulang ke endoteliummikrovaskular dari mikrovessel yang baru berkembang) dan inokulasi (interkoneksi darah individu pembuluh atau seluruh jaringan mikrovaskular satu sama lain), serta pemain molekuler dan mekanisme pensinyalan yang penting (tanda kurung ungu menunjukkan lokalisasi mereka: EC, sel endotel; EPC, sel progenitor endotel; L, lesi / sel endometrium; M, makrofag; P, platelet; PF, cairan peritoneal; S, serum) yang terlibat dalam regulasi pembentukan pembuluh darah. Hipoksia, hormon dan peradangan pada dasarnya merangsang ketiga jenis vaskularisasi. Biru muda, lesi endometriosis; biru tua, microvessels asli dari lesi; merah, microvessels dari jaringan inang sekitarnya; kuning = EPC)

#### 3. Inokulasi

Inokulasi didefinisikan sebagai interkoneksi pembuluh darah individu atau seluruh jaringan mikrovaskuler satu sama lain. Proses ini berkontribusi pada onset cepat perfusi darah pada jaringan cangkok, yang sudah mengandung microvessels yang terbentuk sebelumnya, seperti kulit yang ditransplantasi dan

tulang serta konstruksi jaringan bioartificialpravaskularisasi. Untuk tujuan ini, microvessels hasil cangkok 'membungkus sekitar microvessels dari jaringan host sekitarnya dan mengekspresikan tingkat MMP-14 dan MMP-9 yang tiinggi (Laschke et al., 2011). Hal ini menyebabkan reorganisasi membran basal dan perisit dan gangguan lokal dari endoteliumhost yang mendasari, menghasilkan aliran darah ke jaringan mikrovaskular yang terbentuk sebelumnya (Laschke et all, 2018)

# 2.5. Proliferasi sel dan Kepadatan Vaskularisasi Terhadap Mekanisme Endometriosis

Berbagai bukti menunjukkan bahwa sel endometrial yang berasal dari wanita yang menderita endometriosis dan tanpa endometriosis memiliki perbedaan yang mendasar. Sel endometrial dari wanita yang menderita endometriosis memiliki kemampuan proliferasi, implantasi dan bertahan hidup lebih tinggi pada lokasi ektopik. Gangguan sensitifitas jaringan endometrial terhadap apoptosisi spontan memberikan kontribusi pada terjadinya pertumbuhan dan implantasi abnormal endometrium pada daerah ektopik. Ketidakmampuan sel endometrial dalam mengirimkan sinyal kematian sel, berkaitan dengan menurunnya ekspresi faktor apoptosis (Bax) (Harada, et al., 2007; Tesone, et al., 2008; Watanabe, et al., 2009).

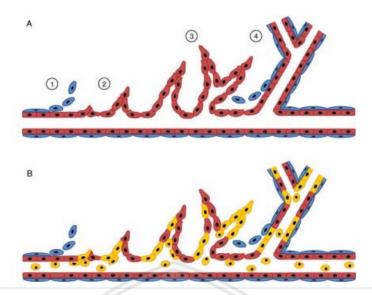
Mekanisme lain menyebutkan bahwa pada endometriosis yang berimplantasi terjadi pengeluaran hormon estradiol (Guidice, 2010). Studi terbaru terkait endometriosis memperlihatkan adanya abnormalitas pada ekspresi aromatase pada sel stromal dan defisiensi 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 pada sel glandular epitel. Aromatase merupakan enzim yang berperan pada biosintesis pada estrogen. Perubahan enzimatik ini diduga menyebabkan akumulasi dari estradiol lokal pada endometriosis dan mendukung hipotesis

bahwa estradiol lokal secara kuat mengakibatkan proliferasi pada sel endometriosis. Dimana estradiol akan meningkatkan atau merangsang kelangsungan hidup lesi endometriosis serta mengubah proses inflamasi dan respon imun. Hal ini menyebabkan terjadinya pelepasan sitokin-sitokin pro inflamasi yaitu TNF-α dan IL-8 makrofag. Peningkatan sitokin-sitokin tersebut sangat erat hubungannya dengan implantasi sel endometrial, pertumbuhan dan perkembangan menjadi endometriosis (Falcone, 2011; Soares, et al., 2012). Peningkatan sitokin proinflamasi berdampak pada aktifasi faktor transkripsi seperti NF-kB dan activator protein-1 (AP-1). NF-kB salah satu faktor transkripsi yang penting dapat meningkatkan proliferasi dan pertahanan sel serta dapat melindungi sel dari apoptosis. Hal ini berakibat terjadinya pengikatan DNA sel endometriosis dan merangsang terjadinya aktifasi transkripsi gen sehingga tersandinya beberapa produk -produk gen. Salah satu produk transkripsi gen dihasilkan adalah meningkatnya profil gen antiapoptosis seperti peningkatan Bcl-2, Bcl-XL, Cyclin A dan penurunan protein Bax yang berdampak pada ketahanan sel, invasi, diferensiasi sel, perlekatan dan pembentukkan jaringan (Soares, et al., 2012).

Peran mendasar dari angiogenesis dalam patogenesis endometriosis direfleksikan oleh pengamatan bahwa cairan peritoneum dari pasien endometriosis secara signifikan dapat meningkatkan proliferasi sel-sel endotel dan menginduksi reaksi vaskular yang kuat dalam model CAM. Hal ini disebabkan oleh fakta bahwa cairan peritoneum mengandung banyak konsentrasi faktor-faktor promosi angiogenesis yang meningkat, termasuk VEGF, reseptor VEGF terlarut (sVEGFR) -1, Ang-2, faktor pertumbuhan seperti insulin (IGF) -1, erythropoietin, faktor pertumbuhan hepatosit (HGF), MIF, tumor necrosisfactor (TNF) -α, IL-6, IL-8, angiogenin dan peptida neutrofilaktivasi epitel (ENA) -78. (Wang D *et al*, 2011;Rudzitis *et al*, 2012)

Pada fase pra-menstruasi terjadi peningkatan pada produksi dan pelepasan endotelin oleh sel endometrium. Endotelin merupakan vasokonstriktor kuat yang bekerja pada arteriol spiralis endometrium yang mengakibatkan penurunan tekanan oksigen pada jaringan endometrium. Keadaan ini akan menyebabkan sel-sel stroma endometrium meningkatkan produksi VEGF sebagai tanggapan terhadap hipoksia jaringan tersebut. (Bourlev *et al.*, 2006)

Ekspresi VEGF-A pada aliran darah menstruasi menunjukkan bahwa jaringan ini berpotensi menjadi faktor angiogenik pembuluh darah yang berkembang dan kelainan ini mungkin berperan sebagai penyebab berkembangnya endometriosis. Dari penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa VEGF-A terdapat dalam jumlah yang bermakna dalam epitel kelenjar eutopik pasien endometriosis selama fase sekresi akhir. Penelitian-penelitian yang lain juga menunjukkan bahwa ikatan dengan itegrin  $\alpha\nu\beta3$  dibutuhkan untuk kelangsungan hidup dan maturasi pembuluh darah yang baru terbentuk. Hal ini menunjukkan bahwa endometrium pada wanita dengan endometriosis terjadi peningkatan proliferasi dan peningkatan kemampuan untuk menempel dan bertahan hidup pada tempat diluar endometrium. (Groothuis *et al*, 2005)



Gambar 2.10. Mekanisme pembentukan pembuluh darah selama endometriosis. (Kraickova, 2016)

Keterangan: (A). Sprouting angiogenesis adalah proses beberapa tahap. Setelah aktivasi oleh faktor pertumbuhan pro-angiogenik, sel perivaskular (¼ biru), seperti pericytes dan sel otot polos, lepas dari dinding vaskular dan sel endotel (¼ merah) melepaskan protease, yang mendegradasi membran basal (1). Hal ini memungkinkan mereka untuk bermigrasi ke interstitium sekitarnya, menghasilkan pembentukan tunas kapiler dan benih (2). Benih selanjutnya memanjang melalui proliferasi sel endotel, bercabang dan interkoneksi satu sama lain (3). Hal ini menyebabkan perkembangan microvessel yang diperfusi darah, yang dindingnya distabilkan lagi oleh perekrutan sel perivascular dan produksi senyawa matriks ekstraseluler (4).

(B) Kemungkinan besar, vaskulogenesis pasca-natal dan angiogenesis yang tumbuh terjadi secara paralel pada lesi endometriosis. Vaskulogenesispascakelahiran ditandai dengan perekrutan EPC yang bersirkulasi (¼ oranye) dari sumsum tulang. Di situs hipoksia, mereka menempel, berkembang biak dan akhirnya dimasukkan ke dalam endotelium, di mana mereka berdiferensiasi menjadi sel-sel endotel dewasa

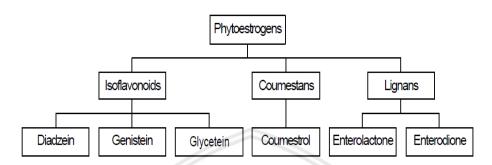
#### 2.6 Fitoestrogen

# 2.6.1 Definisi Fitoestrogen

Fitoestrogen berasal dari kata "phyto" artinya tanaman dan "estrogen" artinya hormon alami pada wanita yang mempengaruhi organ reproduksi. Fitoestrogen dapat diartikan sebagai senyawa alami dari tanaman yang mampu mempengaruhi aktivitas estrogenik tubuh. Pendapat lain mengatakan fitoestrogen merupakan suatu substrat dari tumbuhan non steroid yang secara

**BRAWIJAYA** 

struktural dan fungsional serupa dengan 17  $\beta$ -estradiol. Fitoestrogen diklasifikasikan menjadi tiga kelompok (Gambar 2.11) yaitu isoflavon, lignans dan coumestans. Kelompok isoflavon terdiri dari genistein, daidzein dan glicytin (Speroff, 2006).



Gambar 2.11. Klasifikasi Fitoestrogen (Rishi, 2002)

Keterangan: Berdasarkan gambar diatas klasifikasi fitoestogen terdiri dari 3 kelompok yaitu isoflavon, coumestans dan lignans.lsoflavon terdiri dari diadzein, genistein dan *glycetein*.Golongan *coumestan* yaitu *coumestrol*.Lignans terdiri dari *enterolactone* dan *enterodione*.

Fitoestrogen mendapat perhatian khusus dalam penelitian saat ini, dikarenakan fitoestrogen berpotensi memiliki efek estrogenik dan antiestrogenik (antagonis dengan estrogen) ketika berikatan dengan reseptor estrogen, tergantung pada target jaringan dan konsentrasi estrogen lokal (Pilsakova *et al*, 2010).Fitoestrogen dapat meniru kerja estogen tetapi juga dapat memblok kerja estrogen. Aktivitas biologi dan struktur molekul menyerupai *17-β estradiol* sehingga dapat berikatan langsung dengan reseptor estrogen dan berkompetisi dengan estrogen endogen, oleh karenanya fitoestrogen dapat memberikan efek estrogenik dan anti estrogenik (Wiyasa *et al*, 2008).

# 2.6.2 Mekanisme Kerja Fitoestrogen

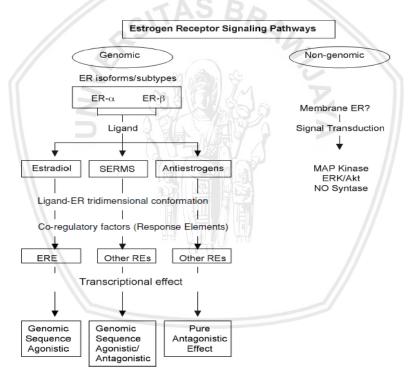
Keuntungan yang diberikan oleh fitoestrogen terhadap tubuh manusia seperti penghambatan sel-sel kanker, sel tumor, penyakit jantung serta yang lainnya.Terdapat dua mekanisme kerja fitoestrogen, yaitu melalui mekanisme

SRAWIJAY/

genomik melalui aktivasi atau inaktivasi reseptor estrogen dan mekanisme non genomik tanpa melalui reseptor. (Handayani, 2010)

# 2.6.2.1 Mekanisme genomik yaitu aktivasi/ inaktivasi Receptor Estrogen (Receptor-dependent)

Mekanisme genomik merupakan mekanisme yang berikatan dengan aktivasi atau inaktivasi reseptor estrogen. Mekanisme ini biasanya membutuhkan waktu yang lebih lama yakni lebih dari 30 hari atau sampai beberapa hari. Hal ini sesuai dengan teori mekanisme kerja estrogen yaitu dikatakan hampir 2/3 kerja hormon estrogen melewati jalur reseptornya secara genomik (Handayani *et al*, 2010).



Gambar 2.12 Mekanisme fitoestrogen (Diez-Perez, 2006)

Keterangan : Jalur signaling estrogen secara genomik dan non genomik. Interaksi subtipe RE/isoform dengan ligan yang berbeda menginduksi karakteristik informasi tridimensional dan kompleks reseptor, interaksi dengan elemen respon beragam bertindak sebagai co-factor regulasi transkripsi menghasilkan efek yang berbeda dalam menginduksi agonistik murni, antagonis murni atau campuran agonistik antagonis. Jalur signal nongenomik merupakan tindakan cepat melalui membran ER mengatur respon MAP kinase

Menurut Sutrisno *et al*(2010), mekanisme genomik terbagi menjadi dua yaitu: 1)Isoflavon langsung berikatan dengan RE (*direct genomic*), menimbulkan efek seperti efek estrogen endogen berupa transkripsi gen Isoflavon secara tidak langsung (*indirect genomic*), yaitu dengan mempengaruhi kadar estrogen endogen dalam sirkulasi (mekanisme kompetitif inhibitor) sehingga dapat meningkatkan sintesa, kedua mekanisme tersebut terlihat pada gambar 2.12.

#### 2.6.2.2 Mekanisme Non Genomik

Melalui mekanisme non genomik, fitoestrogen bekerja sebagai *tirosin kinase inhibitor*, inhibisi *topoisomerase* II atau bisa melalui reseptor membran yang diduga sebagai molekul estrogen. Mekanisme kerjanya membutuhkan waktu 20 menit. Menurut Handayani *et al* (2010) dan Sutrisno *et al* (2010) prinsip reaksi dasar ikatan dengan reseptor dan DNA diantaranya adalah:

- 1. Mengadakan difusi melalui membran sel
- 2. Dalam sel target berikatan dengan reseptor protein
- Interaksi hormon reseptor kompleks dengan sekuen spesifik dari DNA ERE yang berlokasi di daerah promotor dari gen. H-R kompleks berisi sebagai faktor transkripsi. Terkadang terjadi pengaktifan transkripsi dari gen
- 4. Sintesis mRNA;
- 5. Transport mRNA ke ribosom
- 6. Sintesis protein dalam sitoplasma menghasilkan aktivitas seluler yang spesifik, ekspresi gen dalam sel menghasilkan respon.

#### 2.6.3 Isoflavon

#### 2.6.3.1 Definisi Isoflavon

Isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak disintesis oleh tanaman. Kelompok golongan isoflavon merupakan senyawa yang banyak

dimanfaatkan karena kandungan fitoestrogen yang cukup tinggi. Diet isoflavon memiliki pengaruh yang signifikan terhadap kesehatan manusia. Efek menguntungkan adalah termasuk mengurangi risiko kanker, menurunkan gejala menopause, mengurangi osteoporosis (Chandrasekharan, 2013).

Tanaman kedelai golongan *Leguminoceae*mengandung senyawa isoflavon yang cukup tinggi dibandingkan dengan jenis tanaman yang lainnya. Kandungan isoflavon dalam kedelai sebesar 1,2 - 4,2 mg/gram protein kedelai (Pilsakova *et al*, 2010). Selain pada tanaman kedelai, senyawa isoflavon dapat ditemukan dalam produk olahannya, seperti tahu, tempe, tauco, dan kecap, juga ditemukan pada buah-buahan dan teh hijau (Prakash danGupta, 2011).

Senyawa isoflavon dapat mengalami transformasi selama proses pengolahan, baik melalui proses fermentasi maupun non-fermentasi. Melalui proses hidrolisa diperoleh senyawa isoflavon bebas yang disebut aglikon. Senyawa aglikon tersebut adalah genistein, *glycetein* dan daidzein (Prakash dan Gupta, 2011). Pada tumbuhan, isoflavon ditemukan sebagai *glucoconjugates* yang secara biologis inaktif, kemudian dihidrolisis menjadi bentuk aktif-aglikon oleh aksi bakteri khusus. Pada manusia, isoflavon daidzein dan genistein dianggap sebagai isoflavon dengan bentuk biologis yang paling penting dan aktif (Pilsakova *et al.*, 2010).

### 2.6.3.2 Struktur Isoflavon

Isoflavon memiliki struktur yang mirip dengan E2 endogen dan mampu berikatan dengan RE.Berkaitan dengan aktivitas estrogenitasnya yang banyak ditelitiadalah genistein (4,5,7-trihidroksiisoflavon) dan daidzein (4,7-dihidrosiisoflavon) (Gambar 2.12) (Banerjeeet al, 2008; Pilsakova et al, 2010). Genistein mempunyai afinitas terhadap RE-β lebih besar daripada daidzein. Equol yang merupakan metabolit daidzein mempunyai afinitas terhadap RE-βlebih

**SRAWIJAYA** 

besar daripada daidzein (Banerjee *et al*, 2008).Struktur estrogen dan isoflavon terlihat pada Gambar 2.12 berikut:

Gambar 2.13. Struktur Kimia Isoflavon dan *17β-Estradiol* (Pilsakova et al, 2010)

Keterangan : Struktur kimia isoflavon adalah Daidzein dan Genistein dibandingkan dengan  $17\beta$ -Estradiol. Aktivitas yang mirip ini dapat terjadi karena fitoestrogen memiliki 2 gugus –OH atau hidroksil yang berjarak 11,0-11,5 A yang pada intinya sama persis dengan inti estrogen sendiri .

# 2.6.4 Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone)

#### 2.6.4.1 Definisi Genistein

Genistein merupakan salah satu golongan isoflavon aglikogen (bebas) yang banyak ditemukan pada tanaman kedelaiumumnya dikenal dengan sebutan fitoestrogen (Riggset al, 2003).Genistein ditemukan dalam konsentrasi tinggi pada tanaman kedelai dan produknya, bekerja pada enzim *tirosin kinase*, pengaruh apoptosis, proliferasi sel-sel, angiogenesis dan kemudian dapat mempengaruhi jaringan adipose.Efek genistein terbukti sebagai penghambat tirosin kinase kuat yaitu enzim yang berperan pada kaskade pembentukan trombin serta gangguan yang ditimbulkannya (PrakashdanGupta, 2011).

Saat ini sedang banyak dilakukan penelitian mengenai genistein, hal ini disebabkan karena genistein memiliki afinitas terhadap reseptor estrogen paling aktif dibandingkan dengan daidzein.Genistein merupakan salah satu komponen yang dijadikan pilihan untuk melawan berbagai penyakit kanker.Efek anti kanker genistein terbukti dapat menekan pertumbuhan kanker prostat dan kanker payudara Genistein memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan tumor

primer, meregulasi proses metastasis, termasuk adhesi sel, migrasi dan invasi(Rahman *et al*, 2012).



Gambar 2.14 Tanaman Kedelai Sumber Genistein(Rahman *et al*, 2012)
Keterangan : Genistein merupakan golongan isoflafon yang terdapat dalam kedelai dan lebih dikenal dengan sebutan fitoestrogen.

#### 2.6.4.2 Struktur Genistein

Struktur, ikatan dan aktivitas genistein menyerupai *17β-estradiol*. 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 suatu substrat agar mempunyai efek estrogenik yang memiliki afinitas tertentu terhadap RE(Polkowski*et al,* 2000).

Genistein memiliki afinitas terhadap RE yang paling aktif, sedangkan daidzein lebih lemah. Hormon estrogen mempunyai afinitas pada kedua jenis reseptor, namun genistein selektif pada RE- $\beta$  dibandingkan dengan RE- $\alpha$ , sedang daidzein lebih rendah lagi. Genistein memiliki afinitas 87% terhadap RE- $\beta$  dan 4% RE- $\alpha$  (Banerjee*et al,* 2008). Pendapat lain menyebutkan bahwa afinitas genistein pada RE- $\beta$  20-30 kali lebih tinggi daripada RE- $\alpha$  dan sebanding dengan afinitas  $17\beta$ -estradiol, namun memiliki aktifitas lebih rendah dari  $17\beta$ -estradiol (Pilsakova*et al,* 2010).

3-phenylchromen-4-one core

Gambar 2.15 Struktur Genistein dan 17β-estradiol(Pavese et al,2010)

Keterangan : Struktur Genistein (Kiri) dan 17β-estradiol (kanan).Keduanya memiliki gugus hidroksil terminal disisi berlawanan dari molekul dan stuktur cincin aromatik serupa. StrukturGenisteinyangditandai dengan3-phenylchromen-4-one core(warna merah) dansubstitusifenolik padaC4', C5, dan posisiC7.Posisi Fenol C4'dan C7genisteinsangatmirip dengangugus hidroksilestradiol(warna hijau), sehingga genisteindapat mengikatRE.

#### 2.6.5 Metabolisme Genistein

# 2.6..5.1 Farmakokinetik (Absorbsi, Distribusi, Metabolisme dan Eksresi) Genistein

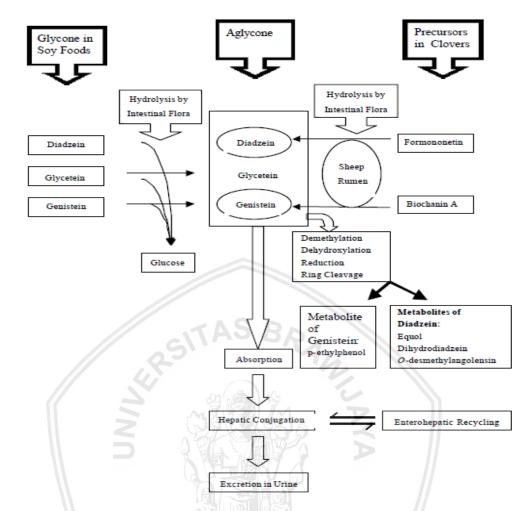
Metabolisme isoflavon sangat bervariasi antara individu sehingga sulit untuk menentukan dosis ideal, beberapa ahli merekomendasikan konsumsi 30 mg hingga 100 mg/hari (Utari, 2011). Isoflavon yang telah dikonsumsi melalui oral akan dihidrolisis oleh mikroflora usus halus  $\beta$ -glucosidaseyang menghasilkan unsur bioaktif aglikon yaitu daidzein dan genistein. Kedua substansi ini muncul melalui hidrolisis bentuk inaktif glucoconjugates dan metabolisme dari biochanin A dan formononetin(Pilsakova et al, 2010). Menurut Sutrisno et al (2010) mayoritas isoflavon tanaman dalam bentuk glikosida dan berikatan dengan molekul gula. Untuk dapat memiliki efek biologik, glukosida dalam usus tersebut harus dipecah menjadi aglikon bebas gula oleh bakteri. Setelah dipecah, sepertiga diabsorpsi sebagai isoflavon bebas dalam bentuk inaktif dan sisanya akan difermentasi oleh bakteri dalam usus besar menjadi metabolitnya genistein

**SRAWIJAYA** 

berupa *p-etilenol* dan pada daidzein berupa *equol, O-desmethylangolensin* (O-DMA) lalu di absorbsi.

Utari (2011) melaporkan bahwa absorpsi aglikon maupun glukosida kini masih kontroversi karena belum adanya kesamaan hasil mana yang lebih efektif untuk diabsorbsi, oleh karena banyaknya faktor yang berpengaruh pada tingkat intestinal dan tingginya variasi individu. Menurut Sutrisno *et al* (2010) absorbsi aglikon terjadi terutama di usus halus dan usus besar. Didalam usus halus aglikon akan diabsorpsi dalam jumlah yang kecil dan selebihnya akan diabsorpsi dalam usus besar.Berdasarkan studi *in vivo* yang dilakukan pada tikus, absorpsi genistein dalam bentuk *unconjugated* lebih cepat daripada dalam bentuk glikosida (Gruber, 2002). Dapat disimpulkan bahwa isoflavon dalam bentuk aglikon (kedelai yang sudah difermentasi) lebih mudah diserap daripada dalam bentuk glikosida (kedelai yang tidak diproses). Diduga bahwa fermentasi meningkatkan biotransformasi isoflavon dari kadar *equol*. Metabolisme dihambat oleh adanya antibiotika yang mempengaruhi flora usus (Winarsi, 2005; Sutrisno *et al*, 2010).

Selanjutnya hasil metabolit aglikon isoflavon diserap melalui membran gastrointestinal masuk ke darah dan dibawa menuju *liver*.Metabolisme terakhir terjadi di *liver* untuk menghasilkan beberapa bentuk *conjugated*(Pilsakova *et al*, 2010, Sutrisno *et al*, 2010). Di hati, degradasi isoflavon terkonjugasi dengan asam *glukoronat* kemudian di eksresi dari tubuh melalui urine dan empedu.Dalam waktu 24 jam daidzein dan genistein di eliminasi dari tubuh (Pilsacova *et al*, 2010).



Gambar 2.16 Absorpsi, Metabolisme dan Eksresi Isoflavon (Rishi, 2002)

Keterangan : Isoflavon bukan merupakan estrogen aktif karenanya dihidrolisis oleh mikroflora usus halus β-glucosidase menjadi unsur bioaktif aglikon yaitu daidzein dan genistein. Kedua substansi ini muncul melalui hidrolisis bentuk inaktif glucoconjugates dan metabolisme dari biochanin A dan formononetin. Genistein dalam bentuk inaktif tersebut kemudian akan difermentasi oleh bakteri dalam usus besar menjadi metabolitnya genistein berupa p-etilenoldan pada daidzein berupa equol, O-desmethylangolensin (O-DMA) lalu di absorpsi. Hasil metabolit dibawa menuju liver untuk menghasilkan beberapa conjugated dan kemudian di eksresi melalui urine.

Isoflavon fitoestrogen dapat terdeteksi pada sejumlah cairan tubuh, seperti *urine*, plasma, *faeces*, cairan prostat, semen, cairan empedu, saliva, Air Susu Ibu (ASI), aspirat *mammae* dan cairan kista (Sutrisno *et al*, 2010; Chandrasekharan dan Aglin, 2013). Isoflavon utama dan metabolitnya yang terdeteksi dalam darah, *urine* manusia dan hewan adalah daidzein, genistein dan

equol. Konjugat dan sejumlah metabolit kemudian dieksresikan melalui saluran urine dan empedu. Dalam jumlah kecil isoflavon, sulfat, glukoroid dan metabolit yang tidak diabsorpsi (1-25%) akan dieksresi melalui faeces (Sutrisno et al, 2010).

# 2.6.5.2 Farmakodinamik (Efek Biokimiawi dan Mekanisme Kerja) Genistein

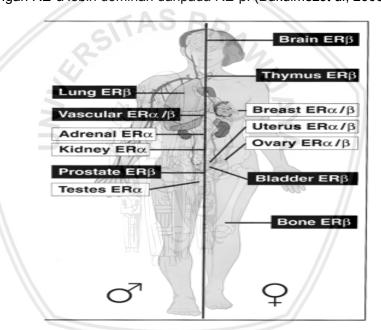
Menurut Pilsakova *et al* (2010) efek isoflavon pada tingkat seluler tergantung pada jaringan target, status reseptor jaringan, dan kadar estrogen endogen karenaisoflavondanestradiolbersaing mengikat reseptor estrogen. Dalamkeadaanestrogenendogen tinggi (misalnya perempuan dalam fasefolikuler dari siklus menstruasi), estrogen isoflavon bersifat antiestrogenik berkompetisi dan menghambat aktifitas estrogen sepenuhnya dengan berikatan pada reseptor estrogen. Sedangkan pada tingkat rendahestrogenendogen (wanita menopause, setelahovariektomi, dll), akan berlaku sebagai pengganti estrogen yang lemah (estrogenik) sehingga aktivitasestrogenisoflavondapat meningkat (proestrogenik). Dalam kadar yang tinggi (100 nmol/l pada genistein), efek isoflavon dapat mendekati kadar fisiologis estradiol endogen.(Pilsakova *et al*, 2010)

Menurut Sutrisno et al(2010) efek fitoestrogen tergantung pada dosisnya. Fitoestrogen memiliki efek estrogenik pada dosis rendah, tetapi dapat menghambat estrogen endogen (antiestrogenik) pada dosis yang tinggi. Kadar estrogen endogen juga mempengaruhi aktifitas yang ditimbulkan oleh fitoestrogen. Pada pre menopause dengan kadar estrogen endogen masih tinggi maka fitoestrogen berperan sebagai anti estrogenik. Sedangkan pada pasca menopause saat kadar estrogen endogen sangat rendah, fitoestrogen dapat memberikan efek estrogen.

Mekanisme kerja genistein dapat berinteraksi dengan reseptor estrogen (RE) dan berinteraksi dengan enzim. Secara lengkap dijelaskan sebagai berikut :

#### a. Interaksi dengan Reseptor Estrogen

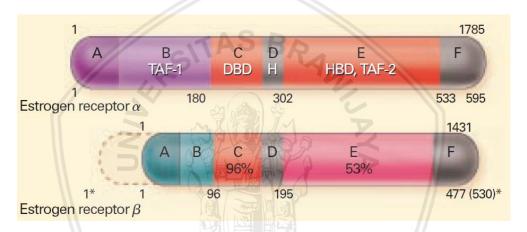
Reseptor estrogen terdiri dari RE- $\alpha$  dan RE- $\beta$  yang ditemukan pada beberapa organ tubuh dan terkadang ekspresinya berlebihan.Reseptor estrogen- $\beta$  lebih banyak terdapat pada ginjal, mukosa intestinal, *parenchyma* paru, sumsum tulang, tulang, otak, dan kelenjar prostat.Reseptor estrogen- $\alpha$  lebih banyak pada endometrium, sel kanker payudara, dan stroma ovarium (Gruber*et al*, 2002).Pada uterus, RE  $\alpha$  merupakan reseptor dominan dan merupakan mediator dari efek estrogen untuk menstimulasi proliferasi.Ekspresi RE- $\alpha$  dan RE- $\beta$  pada endometrioma endometriosis lebih tinggi dibandingkan endometrium eutopik dengan RE- $\alpha$  lebih dominan daripada RE- $\beta$ . (Bukulmez*et al*, 2008).



Gambar 2.17 Distribusi RE-α dan RE-β dalam Tubuh (Setchell danCassidy, 1999)

Keterangan : Berdasarkan gambar diatas distribusi RE-α dan RE-β pada organ tubuh pria dan wanita berbeda. Pada pria RE-α berada pada *vascular*, adrenal, *kidney*, dan testis sedangkan pada wanita terdapat pada payudara, uterus dan ovarium. RE-β pada pria terdapat di *vascular* dan *prostate*, wanita terdapat di timus, payudara, uterus, ovarium, kandung kemih dan tulang.

Genistein dapat langsung berikatan dengan RE disebabkan karena struktur genistein yang sama dengan 17β-estradiol. Genisteinberikatan dengan reseptor didalam sel agar dapat mengeluarkan respon atau efek. Reseptor berfungsi dalam membantu transmisi pesan dari hormon menuju transkripsi dari inti gen (Sperrof, 2006). Ikatan genistein dan reseptor estrogen membentuk komplek estrogen-reseptor estrogen komplek dan mengaktivasi estrogen responsive elemen (ERE) sehingga mempengaruhi proses transkripsi(Gruber et al, 2002).Gambar 2.18 dibawah ini menjelaskan tentang perbandingan dan fungsi reseptor estrogen.



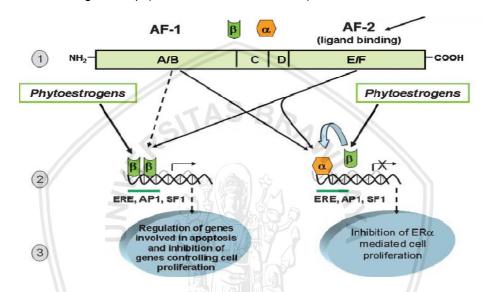
Gambar 2.18 Perbandingan RE-α dan RE-β(Chang et al, 2008)

Keterangan: Reseptor estrogen terbagi dalam beberapa domain tertentu. Domain amino ABberisi ligand independent transcriptional activation function (TAF-1), mempunyai sifat bervariasi dalam urutan dan panjang asam aminodan merupakan tempat berinteraksinya protein dengan kofaktor serta urutan transkripsi protein, pada domain ini memiliki homologi antara RE-α dan RE-β kurang 18%.Domain *C: DNA Biding Domain* (DBD) pada RE-α dan RE-β bersifat homolog, sehingga dapat mengikat ERE dengan spesifitas dan afinitas yang sama. Domain D berfungsi sebagai engsel. Domain E, bertanggung jawab untuk dimerisasi dan mengandung transcription activation function (TAF-2). Domain F sangat variabel dimana tempat berinteraksi dengan molekul lain seperti SERM, region ini mengatur transkripsi gen oleh estrogen dan antiestrogen, yang memiliki peran dalam mengubah kemampuan transkripsi bahan-bahan antiestrogen. F region mempengaruhi aktivitas dari TAF-1 dan TAF-2.

Efek estrogenik berhubungan keberadaan RE-α dengan terhadap proliferasi dan sebaliknya RE-β menekan aktifitas pertumbuhan (Chang *et al*,

SRAWIJAYA

2008).Reseptor estrogen- $\beta$  yang memiliki sifat antiproliferasi dapat menghambat tindakan RE- $\alpha$  sebagai aktivator yang memediasi proliferasi sel dengan membentuk heterodimer (Riggs&Hartmann, 2003) . Pengikatan estrogen yang sama pada RE- $\alpha$  dan RE- $\beta$  dapat menimbulkan efek yang berlawanan dalam transkripsinya. Estradiol dapat menstimulasi transkripsi gen dengan RE- $\alpha$  dan ERE, tetapi pada sistem yang sama estradiol menginhibisi transkripsi gen bila berikatan dengan RE- $\beta$  (RicedanWhitehead, 2006).



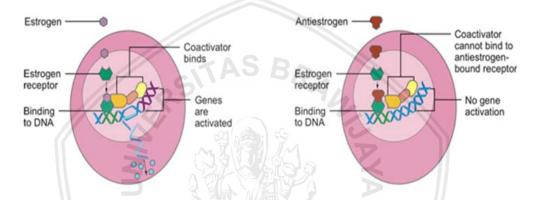
Gambar 2.19 Pembentukan Heterodimer RE-B(RicedanWhitehead, 2006)

Keterangan : Sesuai dengan gambar diatas Genistein yang selektif berikatan terhadap RE-β, dimer yang mampu berikatan dengan AP-1 dan aktifasi/inhibisi gen yang mengatur pertumbuhan tumor. Berikatan dengan RE-β dapat mencetuskan heterodimerisasi dengan RE-α dan kemudian menutup kemampuan gen untuk merangsang proliferasi sel. (1) Activation Function-1 (AF-1) dapat menarik koregulator untuk transkripsi gen pada ikatan ligan independen dengan domain reseptor E/F. AF-1 memiliki aktivitas lebih terhadap RE-β iika dibandingan dengan RE-α. Kemampuan AF-2 untuk menarik ko-regulator dependen dengan ikatan ligan dan aktifasi antara REα dan RE-β setara.(2) Homodimer RE-β memiliki aktivitas transkripsional vang besar pada respon elemen DNA (misal Aktivator Protein-1/ AP-1) dibandingkan dengan estrogen respon elemen (ERE).Dimerisasi RE-β dengan RE-α bertujuan untuk menutup kemampuan RE-α. (3) Berbagai jenis fitoestrogen termasuk genistein yang selektif berikatan terhadap REβ, dimer yang mampu berikatan dengan AP-1 dan aktivasi/ inhibisi gen yang mengatur pertumbuhan tumor. Berikatan dengan RE-β dapat mencetuskan heterodimerisasi dengan RE-α dan kemudian menutup kemampuan gen untuk merangsang proliferasi sel.

Genisteinumumnya bekerja sebagai Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) yang memiliki efek estrogenik dan efek anti estrogenik

RAWIJAYA

pada jaringan reproduksi (kelenjar *mammae*, ovarium, endometrium dan prostat) dapat berikatan dengan RE- $\alpha$ dan RE- $\beta$ . *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs)adalah senyawa yang secara kimiawi tidak memiliki struktur steroid estrogen namun memiliki struktur tersier yang memungkinkan dapat mengikat diri pada RE- $\alpha$  dan RE- $\beta$ .SERMs dapat berfungsi sebagai antagonis murni bila bertindak melalui RE- $\beta$  pada gen yang mengandung elemen-elemen reaksi estrogen tetapi bisa berfungsi sebagai agonis parsial bila bertindak pada gen tersebut melalui RE- $\alpha$  (Riggset al, 2003).



Gambar 2.20 Mekanisme Genistein sebagai SERMs(Pilsakova, 2010)
Keterangan: Berdasarkan gambar diatas ketika *genistein* berperan agonis estrogen maka molekul yang diterima oleh reseptor estrogen mengadakan ikatan koaktivator sehingga terjadi aktivasi gen, sedangkan antagonis estrogen molekul yang diterima tidak dapat mengadakan ikatan koaktivator sehingga aktivitas gen tidak terjadi.

Pada dasarnya dalam proses transkripsi sintesis protein, komplek estrogen-reseptor tidak hanya berikatan pada ERE saja namun juga dengan protein koregulator yang terdiri atas koaktivator dan korepresor. Prosesmenginduksi transkripsi gen dari reseptor estrogen, dibutuhkan protein koaktivator yang hasilnya adalah produksi mRNAuntuk sintesis protein dengan respon seluler sesuai dengan karakteristik hormon sedangkan korepresor akan bekerja sebaliknya yakni menghambat proses transkripsi gen (Gruber et al, 2002).

BRAWIJAYA

Perbedaan afinitas pengikatan genistein pada ER-α dan ER-β dikarenakan adanya perbedaan sekuen *amino acid* domain E/F pada RE-α berbeda dengan region F RE-β sehingga genistein cenderung memiliki afinitas yang tinggi pada RE-β, namun walaupun genistein memiliki afinitas yang hampir sama dengan *17-β estradiol*, induksi transformasi struktural dari RE-β tidak cukup untuk memfasilitasi pengikatan *co-activator* dalam proses transkripsi gen (Morito *et al*, 2001). Reseptor estrogen dalam meregulasi transkripsi gen-gen juga berinteraksi dengan faktor NFkB. Genistein merupakan inhibitor aktifasi NFkB (*nuclear factor-κB*) dan STAT-1 (*signal transducer and activator of transcription 1*)sehingga mengakibatkan terhambatnya proses transkripsi dalam sintesis protein. (Maharani et al, 2012)

Genistein sebagai anti estrogenik yang afinitasnya lebih tinggi 20-30 kali lipat pada RE-β tidak mengadopsi konfirmasi agonis tetapi bersifat antagonis (Pilsakova *et al*, 2010).Sifat antagonis reseptor estrogen merupakan hasil rekrutmen korepresor. Anti estrogen bekerja dengan menduduki reseptor sehingga menutup akses koaktifator dan reseptor estrogen yang berinteraksi dengan protein korepresor akan menekan transkripsi setelah komplek estrogenreseptor mengikat pada promotor DNA. Mekanisme ini menghambat estrogenuntuk mengaktifkangen dalam menstimulasi produksiprotein spesifik untuk pertumbuhansel(Gruber*et al*, 2002).

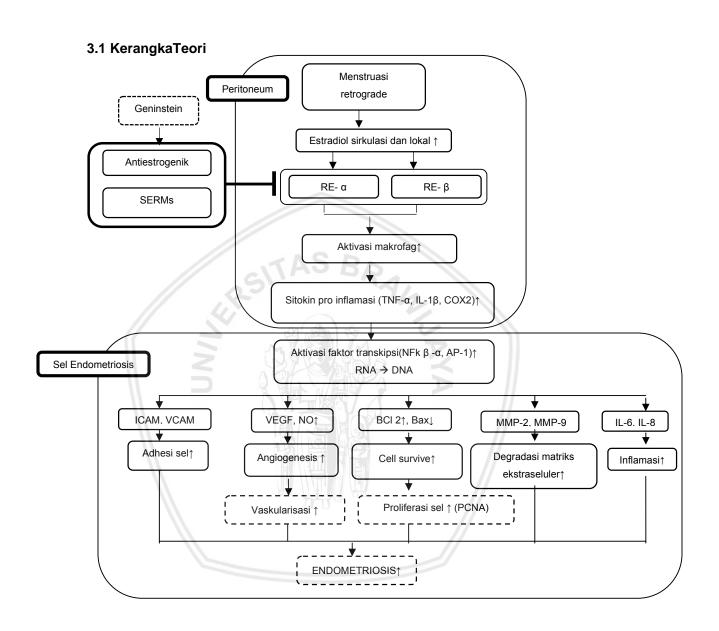
# b. Interaksi dengan Enzim

Genistein bekerja sebagai inhibitor berbagai enzim dalam intraseluler.Genistein menghambat aktivitas enzim yang memetabolisme estrogen vaitu inhibisi aktivitas *5α-reduktase*. yang mengkatalisis konversitestosteron menjadi*5α-dihidrotestosteron* dan menginhibisi aromatase yang memediasi konversi testosteron menjadiestradiol (Pilsakovaet al, 2010). Selain itu genistein menghambat  $17\beta$ -hidroksisteroid oksidoreduktase type 1 (17b-HSD type 1) suatu enzim yang mengkonversi estron menjadi estradiol sehingga menurunkan produksi estrogen dari jaringan perifer, akibatnya total estrogen dalam sirkulasi menurun (Rice&Whitehead, 2006). Genistein juga meningkatkan sintesa Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) sehingga makin banyak estrogen yang terikat dengan globulin dan makin sedikit estrogen yang bebas (Pilsakova, et al, 2010; Pavese et al, 2010).

Secara *indirect*, genistein dapat menghambat enzim sitokrom P450 *Cytocrome Protein* 1A1(CYP1A1) yang berfungsi memetabolisme 17β-estradiol. Jika enzim tersebut dihambat maka kadar estradiol yang beredar di sirkulasi akan meningkat sehingga aktivitas RE juga meningkat. Isoflavon pueraria (*daidzein*) dapat meningkatkan kadar estrogen hingga mencapai kadar normal pada tikus yang dilakukan ooforektomi melalui peningkatan *Gonadotropin Releasing Hormon*(GnRH). Genisteinmenghambat enzim 17β-hidroksisteroid oksidoreduktase tipe-1 (HSOR-1) sehingga menurunkan produksi estrogen dari jaringan perifer, akibatnya total estrogen dalam sirkulasi turun (Banerjeeet al, 2008).

Genistein menghambat enzim tirosin kinase yang merupakan kritikal komponen jalur diferensiasi dan pertumbuhan sel. Genistein juga merupakan inhibitor topoisomerase II suatu enzim aktif untuk replikasi DNA dan menghambat phosphatidylinositol suatu molekul penting untuk jalur transduksi sinyal survival dan proliferasi sel (Polkowski, 2000; Banerjeeet al, 2008).

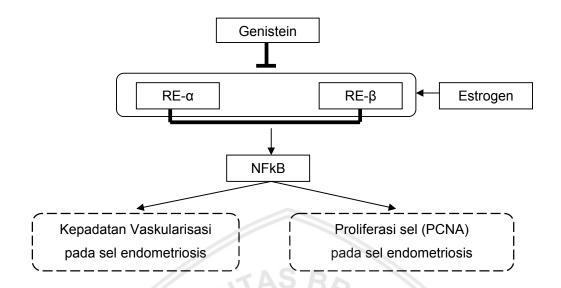
BAB 3
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN



Gambar 3.1 KerangkaTeoriPengaruhpemberiangenesteinterhadap penurunanekspresiPCNA dan kepadatan vaskular pada endometriosis



# 3.2. Kerangka Konsep



# Gambar 3.2 Kerangka Konsep

Hormon estrogen (estradiol) adalah pemicu inflamasi yang poten sehingga memicu aktifitas makrofag peritoneal untuk hipereaktif memicu reaksi Inflamasi. Reakfi inflamasi yang telah terinisiasi ini akan dilanjutkan dengan meningkatnya sintesa sitokin proinflamasi yang poten seperti IL-1β dan TNF-α dan selanjutnya akan memicu kaskade reaksi melalui berbagai mediator proinflamasi yang poten antara lain NF-kB dan AP-1 (Soares et al., 2012). NF-kB akan berinteraksi dengan bagian promoter di DNA sel endometriosis dan akan menjadi faktor transkripsi untuk sintesa berbagai protein. NF-kB adalah mediator yang poten untuk memicu kaskade reaksi inflamasi dan transkripsi gen yang hasil akhirnya berupa meningkatnya molekul adesi (CD-44, ICAM, VCAM), kecenderungan apoptosis (BCL-2,BCL-XL) yang rendah, meningkatnya enzim MMP-9), meningkatnya matrix metaloproteinase(MMP-2, proses angiogenesis(VEGF, NO)dan sitokin proinflamasi lainnya, dan hasil akhirnya akan memperberat progresifitas endometriosis.

Hormon estrogen memegang peranan yang sangat penting sebagai faktor pertumbuhan (growth factor) yang memiliki peran membuat suasana menjadi estrogenik dengan RE-α dominan dan membuat pertumbuhan sel endometriosis lebih mudah. Suasana yang estrogenik akan memicu enzim-enzim proinflamasi COX-2, PGE2, SF1 dan akhirnya aktifitas aromatase meningkat dan kadar estradiol lokal (di dalam lesi endometriosis) akan meningkat dan memicu memburuknya perkembangan endometriosis. Suasana endometriosis dengan estradiol yang tinggi abnormal akan menyebabkan folikulogenesis dalam ovarium tidak normal sehingga produksi progesteron lebih rendah dan berantai menyebabkan produksi HSD-17β2 berkurang dan akibatnya konversi dari estradiol (poten) ke estron (kurang poten) menjadi turun dan hasil akhirnya estradiol tetap tinggi dan membuat suasana makin estrogenik. Bila RE-β dominan akan menginhibisi peran RE-α sehingga terjadi hambatan kaskade sintesa estradiol. Pada akhirnya rasio RE-α danRE-β berperan penting ke arah mana hormon estrogen berperan. Bila RE-α dominan maka akan berperilaku sebagai stimulator, bila RE-β dominan maka berperilaku sebagai inhibitor. Induksi angiogenesis secara bersamaan oleh ER-α dan VEGF, akan berfungsi sebagai suplemen dalam mengatasi kekurangan oksigen dan nutrisi pada sel-sel yang berproliferasi. Endometriosis dikaitkan dengan peningkatan regulasifaktor angiogenik dalam serum dan cairan peritoneum daripasien . Hal ini menstimulasipembentukan pembuluh darah baru dalam lesi endometriosisdan peritoneum sekitarnya

Genistein adalah molekul yang yang mempunyai afinitas yang kuat terhadap RE-β, sehingga genistein mengubah rasio RE-α dan RE-β. Adanya proses kompetitif inhibitor melalui interaksi dengan RE-β, mengakibatkan efek antiestrogenik dengan menurunkan aktivasi makrofag peritoneal sehingga menurunkan aktivitas VEGF dan apoptosis sehingga tejadinya penurunan daya

3RAWIJAY/

hidup dan vaskularisasi sel, invasi, diferensiasi, adhesi, remodeling dan proliferasi jaringan sehingga dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan endometriosis. Melalui interaksinya dengan RE-β, genistein merupakan inhibitor aktifasi NFkB (*nuclear factor KB*) dan selanjutnya akan menghambat proses transkripsi molekul yang memicu proliferasi sel (PCNA)dan menjadikan proliferasi sel endometriosis menurun. Genistein juga bisa berfungsi langsung sebagai penghambat NFkB dengan hasil akhir yang serupa dengan interaksinya pada RE-β. Penurunan proliferasi sel dan vaskularisasi akan menghambat progresifitas endometriosis

# 3.2. Hipotesis Penelitian

- 1. Pemberian genistein dapat menurunkan ekspresi PCNA pada mencit model endometriosis.
- Pemberian genistein dapat menurunkan kepadatan vaskular pada mencit model endometriosis

#### **BAB 4**

#### **METODE PENELITIAN**

#### 4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorik (*true experimental design*) yang di desain mengikuti rancangan *post test only control group design*, yaitu peneliti mengukur pengaruh perlakuan pada kelompok eksperimen dengan membandingkan kelompok kontrol, tanpa terlebih dahulu melakukan pretest (Notoadmodjo, 2010). Penelitian ini merupakan rangkaian dari penelitian yang dilakukan oleh Sutrisno (2017) dengan menggunakan mencit sehat tidak diberi perlakuan sebagai kontrol negatif dan mencit model endometriosis tidak diberi perlakuan sebagai kontrol positif serta kelompok perlakuan yaitu mencit model endometriosis diberi perlakuan. Perlakuan yang diberikan yaitu pemberian geninstein berbagai dosis dengan besarnya dosis yang digunakan berdasarkan pertimbangan hasil penelitian sebelumnya (Sutrisno *et al.*, 2014, Amelia *et al.*, 2016, Maharani *et al.*, 2016). Dosis dikonversi dengan dosis yang diberikan pada mencit senilai 0,0026 (Syamsudin *and* Damono, 2011).

Penelitian ini menggunakan Bahan Biologi Tersimpan (BBT) jaringan peritoneum mencit yang sudah dibuat blok parafin dari hewan coba mencit pada penelitian Sutrisno (2017), blok parafin dibagi menjadi 6 kelompok sama seperti kelompok hewan coba mencit yang terdiri dari kelompok kontrol negatif (mencit sehat), kelompok kontrol positif (mencit model endometriosis tidak diberi perlakuan), kelompok perlakuan I dengan pemberian genistein dosis 1,3 mg/hr, kelompok perlakuan II

diberikan genistein 1,95 mg/hr, kelompok perlakuan III diberikan genistein 2,6 mg/hr dan kelompok perlakuan IV diberikan genistein 3,25 mg/hr. Masing-masing kelompok tersebut kemudian dilihat ekspresi PCNA dan kepadatan vaskular baik kelompok sebelum pemberian terapi maupun sesudah pemberian genistein. Penelitian eksperimental ini dilakukan untuk mengetahui ekspresi PCNA dan kepadatan vaskular pada mencit (*Mus Musculus*) model endometriosis setelah diberikan perlakuan dengan beberapa dosis genistein.

# 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilakukan selama 2 bulan, mulai bulan Agustus sampai September 2018.

# 4.3 Sampel dan Replikasi

#### 4.3.1 Besar Sampel

Pada penelitian ini menggunakan sampel penelitian berupa blok parafin yang berisi jaringan peritoneum sejumlah 31 blok parafin dengan rincian sebagai berikut :

**Tabel 4.1 Kelompok Sampel Penelitian** 

| Kelompok        | Kelompok Perlakuan pada BBT jaringan peritoneum |          |
|-----------------|---|----------|
|                 | masing masing blok parafin                      | Preparat |
| Kontrol negatif | Mencit sehat                                    | 1        |
| (KN)            |   |          |
| Kontrol positif | Mencit endometriosis tanpa perlakuan            | 6        |
| (KP)            |   |          |
| Perlakuan 1     | Diberikan genistein dosis 1,3 mg/hari           | 6        |
| (P1)            |   |          |
| Perlakuan 2     | Diberikan genistein dosis 1,95 mg/hari          | 6        |
| (P2)            |   |          |
| Perlakuan 3     | Diberikan genistein dosis 2,6 mg/hari           | 6        |
| (P3)            | -ASD-   |          |
| Perlakuan 4     | Diberikan genistein dosis 3,25 mg/hari          | 6        |
| (P4)            |   |          |

Replikasi hewan penelitian ditentukan berdasarkan rumus dari Steel and Torrie dalam Hanafiah (2011).

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

# Keterangan:

t = Jumlah kelompok (6 kelompok)

r = Jumlah replikasi (banyaknya ulangan) pada tiap kelompok perlakuan

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

$$4r - 4 \ge 15$$

r <u>></u> 19/ 4

r <u>></u>4,75

Berdasarkan rumus replikasi diatas, maka ditemukan jumlah replikasi = 5, untuk menghindari penurunan besar sampel akibat kerusakan sebesar 20%, maka

replikasi diperbanyak menjadi 6 blok parafin, sehingga jumlah keseluruhan terdiri dari 30 blok parafin mencit model endometriosis dan 1 blok parafin mencit sehat.

# 4.3.2 Kriteria Sampel

- 1) Kriteria Inklusi
  - a. Blok parafin jaringan peritoneum dan dalam kondisi baik
- 2) Kriteria Ekslusi
  - a. Blok parafin yang rusak yang tidak memungkinkan lagi digunakan pada saat proses perlakuan

# 4.4 Variabel Penelitian

# 4.4.1 Variabel Bebas (Independent Variable)

Genistein

# 4.4.2 Variabel Terikat (Dependent Variabel)

PCNA, kepadatan vaskular

# 4.5 Definisi Operasional

**Tabel 4.2 Definisi Operasional** 

| Variabel  | Definisi   | Cara Pengukuran/Metode   | Alat Ukur | Data  |
|-----------|--|--|-----------|-------|
| Genistein | Genistein (diproduksi oleh Tokyo Chemical Industry, Jepang, nomor batch OW86I- QF) kelompok perlakuan I: 1,3 mg/hr kelompok perlakuan II: 1,95 mg/hr kelompok perlakuan III: 2,6 mg/hr kelompok perlakuan IV: 3,25 mg/hr | Diberikan pada mencit<br>secara per oral (sonde)<br>dalam berbagai dosis<br>(menggunakan acuan dosis<br>manusia yang<br>dikonversikan ke mencit) | Miligram  | Rasio |

| Ekspresi<br>PCNA      | Ekspresi PCNA pada lesi endometriosis yang diukur menggunakan teknik imunohistokimia antibodi monoclonal mouse anti- PCNA (Santa Cruz, diencerkan 1: 100) | Pemeriksaan ini menggunakan mikroskop cahaya merek Nikkon H600L, yang dilengkapi dengan kamera DSF12 300 megapixel dan software pengolahan gambar Nikkon image system. Preparat di scan kemudian dimasukkan dalam software OLIVIA sesuai dengan pembesaran 400kali pada 5 lapangan pandang. Penghitungan preparat dilakukan secara manual dengan bantuan software cell count. | Mikroskop<br>cahaya | Numerik |
|-----------------------|---|---|---------------------|---------|
| Kepadatan<br>Vaskular | Kepadatan<br>vaskularisasi<br>pada lesi<br>endometriosis<br>yang diukur<br>menggunakan<br>teknik<br>pengecatan HE<br>(Dacon)                              | Pemeriksaan ini menggunakan mikroskop cahaya merek Nikkon H600L, yang dilengkapi dengan kamera DSF12 300 megapixel dan software pengolahan gambar Nikkon image system. Preparat di scan kemudian dimasukkan dalam software OLIVIA sesuai dengan pembesaran 400kali pada 5 lapangan pandang. Pembacaan preparat dilakukan secara manual dengan bantuan software cell count.    | Mikroskop<br>cahaya | Numerik |

# 4.6. Pembuatan Preparat Histopatologi

# 4.6.1. Proses Pembuatan Preparat HE

# 4.6.1.1. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah hematoxilin eosin (HE), slide jaringan lesi endometriosis di peritoneum model mencit endometriosis yang sudah melalui persiapan preparat histopatologi, cover glass, box slide, xilol (I dan II), ethanol absolut, alkohol 96%, alkohol 80%, parafin, tissue casset,  $H_2O_2$ ,

methanol, larutan deckloaking, phospat buffer salin, akuades, amonia lithium karbonat

Alat yang digunakan pisau mikrotom, mikroskop cahaya, waterbath, inkubator, pap pen, decloaking chamber, mikropipet, pinset, bunsen, teko alumunium, basket jaringan, wadah kaca bertutup rapat, automatik tissue tex prosesor, alarm.

# 4.6.1.2. Proses Pemotongan Jaringan Berupa Makros

- Jaringan atau spesimen penelitian harus sudah terfiksasi dengan formalin 10 % atau dengan bafer formalin 10 % minimal selama 7 jam sebelum dilakukan proses pengerjaan berikutnya
- 2. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan lokasi yang akan di teliti
- 3. Jaringan di potong kurang lebih ketebalan 2-3 mili meter ( grosss )
- 4. Di masukan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti
- Jaringan kemudian diproses dengan alat Automatik Tissue Tex
   Prosesor atau dengan cara manual
- 6. Standar di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB menggunakan Automatik Tissue Tex Prosesor selama 90 Menit
- 7. Alarm bunyi tanda selesai

# 4.6.1.3. Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan

- 1. Jaringan di angkat dari mesin Tissue Tex Prosesor
- 2. Jaringan di blok / dicetak dengan parafin sesuai kode jaringan
- 3. Jaringan di potong dengan alat mikrotom ketebalan 3-5 mikron

# 4.6.1.4 Proses Deparafinisasi

Setelah di sayat atau di potong dengan ketebalan 3-5 mikron , di taruh dalam oven selama 30 Menit dengan suhu panas 70-80 derajat ,

**SRAWIJAYA** 

kemudian di masukan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing 20 menit, setelah itu di masukan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (Hidrasi), dan yang terakhir dimasukan air mengalir selama 15 menit

# 4.6.1.5 Proses Pewarnaan HE

| Cat utama Harris Hematosilin selama | 10-15 menit                 |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| 2. Cuci dengan air mengalir selama  | 15 menit                    |
| 3. Alkohol asam 1%                  | 2-5 celup                   |
| 4. Amonia lithium karbonat          | 3-5celup (bila kurang biru) |
| 5 Fosin                             | 10-15 menit                 |

# 4.6.1.6 Alkohol Bertingkat

| •// | Alkohol 70%     | 3 menit |
|-----|-----------------|---------|
| (   | Alkohol 80%     | 3 menit |
|     | Alkohol 96%     | 3 menit |
| 4// | Alkohol Absolut | 3 menit |

# 4.6.1.7 Penjernihan (Clearing)

| - | Xylol I  | 15 menit |
|---|----------|----------|
| - | Xylol II | 15 menit |

# **4.6.1.8** *Mounting*

Slide / objek glass ditutup dengan cover glass dan biarkan slide kering pada suhu ruangan, setelah slide kering siap untuk diamati.

#### 4.6.2. Pemeriksaan Imunohistokimia

# 4.6.2.1. Alat dan Bahan :

Alat-alat yang digunakan untuk pemeriksaan imunohistokimia adalah mikrotom, gelas objek, gelas penutup, autoklaf, nampan stainless stell, mikroskop Olympus BX 51 dengan pembesaran 400x, visualisasi

BRAWIJAYA

immunohistokimia (Envision kit), mesin pemotong jaringan (microtome), silanized slide.

Bahan yang digunakan untuk pemeriksaan imunohistokimia adalah blok lilin parafin, xylol I, xylol II, xylol III, ethanol, alkohol absolut 90%, 80%, endogen peroksida, phosphate buffered saline, kromogen 3,3'-diaminobenzidine, H202 0,5% dalam methanol, Phosphat Buffer Saline (PBS), antibodi PCNA, Thermo Fisher (MA5-15886), Envision, Choromogen Diamino Benzidine (DAB), Lathium Carbonat jenuh, Tris EBTA, agua destillata.

#### 4.6.2.2. Prosedur Pewarnaan Imunohistokimia

- Setelah dilakukan penyimpanan preparat dalam inkubator semalam dan dilakukan pengeringan dan pemanasan diatas hot plate selama 1 jam sebelum proses pewarnaan.
- Deparafinisasi (proses penghilangan parafin menggunakan xilol)
   dengan Xilol I; II; III masing masing 3 menit.
- Masukkan dalam Ethanol, Alkohol 90%; Alkohol 80% masing masing 2-3 menit.
- 4. Cuci dengan air mengalir 2 3 menit.
- 5. Masukkan dalam  $H_2O_2$  dalam methanol 0,5% (100 ml methanol + 1,6 ml  $H_2O_2$ ) selama 20 menit.
- 6. Cuci dengan air mengalir 2 3 menit.
- 7. Antigen Retrieval Rendam dalam larutan *DIVA*, panaskan dalam *Decloaking Chamber*.
- 8. Dinginkan dalam suhu ruangan 20 sampai dengan 30 menit.
- 9. Rendam dalam PBS 2 3 menit.

- Letakkan slide dalam moisture chamber dan beri pembatas pada sekeliling sediaan dengan PAP pen. Teteskan Background Snipper 10-15 menit.
- 11. Teteskan antibodi primer, inkubasi 60 menit
- 12. Cuci dengan PBS 3 5 menit.
- 13. Teteskan antibodi sekunder (*Universal Link*), inkubasi 10 menit.
- 14. Cuci dengan PBS 3 5 menit.
- 15. Teteskan Trekavadin HRP Label, inkubasi 10 menit.
- 16. Cuci dengan PBS 3 5 menit
- Teteskan DAB inkubasi 2 4 menit (1ml Betazoid Dab Substrate
   Buffer tambah 1 2 tetes DAB Chromogen).
- 18. Cuci dengan air mengalir 5 7 menit.
- 19. Counterstain dengan mayers haematoxilin 2 sampai 3 menit.
- 20. Rendam dalam Lithium Carbonat jenuh 2 3 menit.
- 21. Cuci dengan air mengalir 5 7 menit.
- 22. Dehidrasi dengan alkohol 80%; 90%; Alkohol absolut sampai dengan xylol I; II; III masing masing 3 menit.
- 23. Mounting dengan *entellan* lalu dilanjutkan dengan pengamatan langsung melalui mikroskop

# 4.7. Pengolahan dan Analisa Data

Dalam penelitian ini teknik analisis data yang digunakan melalui beberapa tahap perhitungan, yaitu uji normalitas dengan homogenitas data sampel sebagai prasyarat uji *Anova One Way*, dilanjutkan dengan uji lanjutan yaitu uji Dunnet T3 5%, untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan yang paling berpengaruh dan kemudian dilanjutkan penghitungan menggunakan piranti lunak (*soft-ware*) *SPSS for Windows* 19.0.

# 4.7.1. Uji Prasyarat Parametrik atau Uji Normalitas Data

Untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan maka dipilih pendekatan uji statistik yang digunakan yaitu uji statistika parametrik. Sebelum dilakukan analisis data dengan menggunakan uji pada statistika parametrik, maka data akan dianalisis terlebih dahulu dengan uji prasyarat parametrik, yaitu data sampel dari variabel terukur diuji terlebih dahulu apakah data tersebar atau terdistribusi normal. Uji normalitas data dalam penelitian ini digunakan uji *Shapiro-Wilk*. Pada uji ini kriteria keputusan dengan melihat nilai probabilitas kesalahan empirik pada nilai Sig atau dikenal dengan *p-value*. Jika nilai Sig atau *p-value* menunjukkan nilai yang lebih kecil dari taraf signifkan α= 0,05, maka disimpulkan data tidak terdistribusi normal, sehingga uji parametrik tidak dapat dilakukan (Santoso, 2005).

Uji homogentas ragam dilakukan dengan menggunakan Uji Levene. Asumsi homogen ragam dikatakan terpenuhi jika p-value hasil perhitungan lebih besar dari pada  $\alpha$ = 0,05. Adapun variabel terukur yang diuji dengan uji prasyarat parametrik adalah data ekspresi PCNA dan kepadatan vaskular.

#### 4.7.2. Uji Anova One Way

Pengujian dengan *Anova One Way* (uji F) digunakan untuk membandingkan rerata variabel terukur antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan (pemberian genistein berbagai dosis). Analisis ini dilakukan yaitu terhadap data semikuantitatif ekspresi PCNA dan kepadatan vaskular. Tujuan teknik analisis ini digunakan adalah untuk mengetahui ada atau tidak ada pengaruh pemberian genistein berbagai dosis terhadap indeks proliferasi dan apoptosis pada lesi endometriotik peritoneal mencit model endometriosis. Jika pada uji *Anova* 

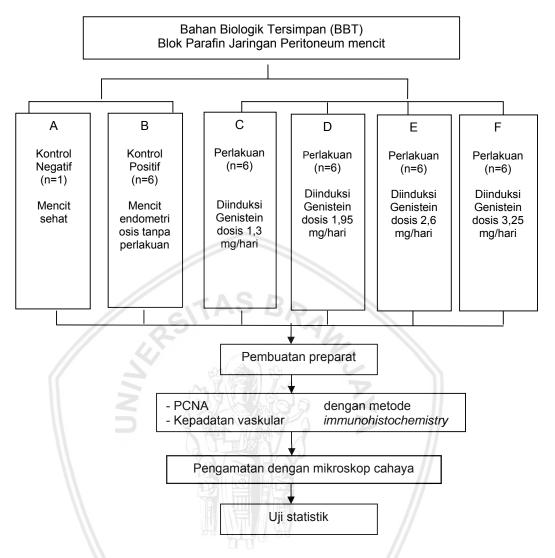
One Way ini menghasilkan kesimpulan  $H_{\circ}$  ditolak atau kesimpulan ada perbedaan yang bermakna (signifikan), maka analisis dilanjutkan dengan uji Dunnet T3 5%.

# 4.7.3. Uji Dunnet T3 5%

Uji Dunnet T3 5% ini digunakan jika analsis data dalam penelitian dilakukan dengan membandingkan dua kelompok sampel yang memiliki jumlah yang sama. Uji ini juga dipergunakan untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan paling berpengaruh ( Dahlan, 2012). Pada penelitian uji Dunnet T3 5% digunakan untuk melihat terapi manakah yang paling optimal.



# 4.8 Alur Penelitian



# Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian

Keterangan: A: Kelompok kontrol negatif

B: Kelompok Kontrol positif

C: Kelompok *Perlakuan 1*, dosis genistein 1,3 mg/hari D: Kelompok *Perlakuan 2*, dosis genistein 1,95 mg/hari E: Kelompok *Perlakuan 3*, dosis genistein 2,6 mg/hari F: Kelompok *Perlakuan 4*, dosis genistein 3,25 mg/hari

#### **BAB V**

#### **HASIL PENELITIAN**

#### 5.1. Pengujian Asumsi yang Melandasi ANOVA

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

Tabel5.1. Uji Asumsi Normalitas

| Variabel          | Koefisien | p-value | Keterangan   |
|-------------------|-----------|---------|--------------|
| Ekspresi PCNA     | 0.919     | 0.002   | Tidak Normal |
| KepadatanVaskular | 0.864     | 0.000   | Tidak Normal |

Berdasarkan pada tabel 5.1 di atas, padavariabelKepadatanVaskulardanEkspresiPCNAdidapatkan p-valuekurang dari  $\alpha$  = 0,05 (p<0,05). Hal ini menunjukkan bahwa asumsi normalitas pada keduavariabel tersebuttidak terpenuhi.Olehkarenaitudiperlukan proses transformasi data.

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

Tabel5.2. Uji Asumi HomogenitasRagam

| Variabel          | Koefisien | p-value | Keterangan   |
|-------------------|-----------|---------|--------------|
| Ekspresi PCNA     | 28.488    | 0.000   | TidakHomogen |
| KepadatanVaskular | 14.997    | 0.000   | TidakHomogen |

Berdasarkanpadahasilpengujianasumsihomogenitasragampadatabel di atas, ditunjukkan bahwa padavariabelEkspresiPCNA danKepadatanVaskulardidapatkan p-value kurangdari 0.05 (p < 0.05). Olehkarenaitu,

asumsihomogenitasragampadakeduavariabeltersebuttidakterpenuhi.

Olehkarenaitudiperlukan proses transformasi data.

Salah satutransformasi data yang dapatditerapkanadalahdengantransformasiLogaritma Natural Ln (Y) danakarkuadrat $\sqrt{Y}$ .Padavariabelekspresi **PCNA** dilakukan proses transformasiLogaritma Natural (Y) Ln sedangkanpadavariabelKepadatanVaskulardilakukan proses transformasiakarkuadrat $\sqrt{Y}$ . Berikuthasilpengujianasumsinormalitasdanhomogenitasragampada yang

Berikuthasilpengujianasumsinormalitasdanhomogenitasragampada data yang telahditransformasi :

Tabel5.3. Uji AsumsiNormalitasdanHomogenitas RagamVariabelyang

TelahDitransformasi

| <u>UjiAsumsiNormalitas</u> |           | ) 00    |            |
|----------------------------|-----------|---------|------------|
| Variabel                   | Koefisien | p-value | Keterangan |
| Ekspresi PCNA              | 0.957     | 0.066   | Normal     |
| KepadatanVaskular          | 0.961     | 0.096   | Normal     |

UjiAsumsiHomogenitasRagamVariabelKoefisienp-valueKeteranganEkspresi PCNA18.3360.000TidakHomogenKepadatanVaskular7.7240.000TidakHomogen

Berdasarkan tabel 5.3 di atas, hasilujiasumsinormalitaspadasemuavariabelpenelitian yang telahditransformasi, didapatkan p-value lebihdari 0.05 (p>0.05) yang

menunjukkanbahwaasumsinormalitaspadasemuavariabelsudahterpenuhidengan melakukantransformasi data. Padahasilujiasumsihomogenitasragam,didapatkan p-value kurangdari 0.05 (p<0.05) yang menunjukkanbahwaasumsihomogenitasragambelumterpenuhimeskipunsudahdil akukantransformasi data. Olehkarenaitu, proses pengujiansecarastatistikdilakukandenganmenggunakan ANOVA dandilanjutkandenganujiDunnet T3 5%.

### 5.2. Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Ekspresi PCNA dengan Uji ANOVA

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

Tabel5.4. PengujianPengaruhGenisteinTerhadapEkspresi
PCNAdenganUjiANOVAdanUjiDunnet T3 5%

| Perlaku     | ıan           | Mean ± SD                  | p-value |      |
|-------------|---------------|----------------------------|---------|------|
| K+          |               | 119.8 ± 19.19 <sup>a</sup> |         |      |
| P1          |               | 151.3 ± 21.42 <sup>b</sup> |         |      |
| P2          |               | 367 ± 173.17°              | 0.000   |      |
| P3          |               | 490.1 ± 66.20 °            |         |      |
| P4          |               | 155.7 ± 31.38 ab           |         |      |
| Keterangan: | Padarata-rata | ±sdjikamemu                | athuruf | yang |

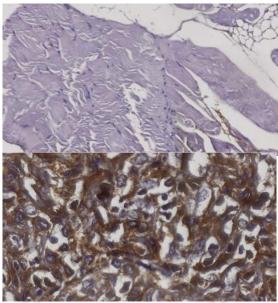
eterangan: Padarata-rata ±sdjikamemuathuruf yang berbedaberartiadaperbedaan yangbermakna (*p*<0.05) danjikamemuathuruf yang samaberartitidakadaperbedaan yang bermakna (*p*>0.05).

65

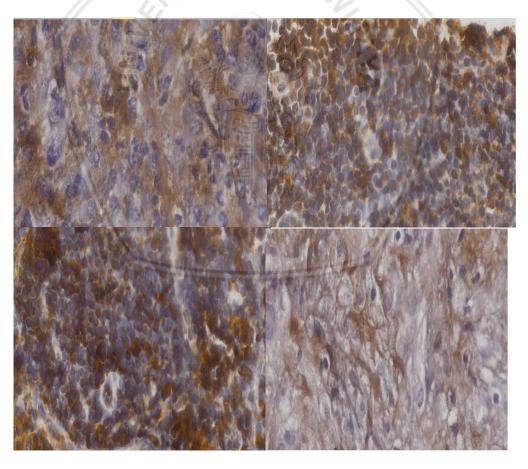
Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada  $\alpha$  = 0,05 (p<0,05). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian genisteinterhadap ekspresi PCNA. Atau dengan kata lain, terdapat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

Berdasarkan pada hasil uji Dunnet T35 % pada Tabel 5.4 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa peningkatanekspresi PCNA secara signifikan ditunjukkan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3.Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata ± sd kelompok perlakuan P1, P2 dan P3lebih tinggi dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif. Sementara P4 mengalami penurunan ekspresi PCNA dimana terdapat perbedaan yang bermakna dengan P2 dan P3 tetapi pada kelompok kontrol dan P1 tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Pada pewarnaan lesi endometrium yang didapatkan dari masing-masing kelompok, didapatkan gambaran ekspresi PCNA yang paling kuat terjadi pada kelompk 3 diikuti dengan kelompok perlakuan 2 dan 1. Hasil pewarnaan lesi endometriosis yang terbentuk dari masing-masing kelompok yang representatif dapat dilihat dari gambar dibawah ini.



Gambar 5.1. Histopatologi Ekspresi PCNA Pada Peritoneum Mencit Sehat (K (-))dan Mencit Model Endometriosis (K (+))
Keterangan : Panah merah menunjukkan ekspresi PCNA pada peritoneum mencit model endometriosis



# **SRAWIJAYA**

### Gambar 5.2. Histopatologi Ekspresi PCNA Pada Peritoneum Mencit Model Endometriosis

Keterangan : Tampak dari salah satu contoh lapangan pandang bahwa ekspresi PCNA paling kuat pada kelompok perlakuan 3 diikuti kelompok perlakuan 2 dan 1 tetapi terjadi penurunan pada perlakuan 4 (pewarnaan immunohistokimia, pembesaran 400x mikroskop Nikon H600L, cameara DS f12300 megapixel)

### 5.3. Pengujian Pengaruh Genistein Terhadap Kepadatan Vaskular dengan Uji ANOVA

Sebagaimana telah dijelaskan dalam hasil pengujian asumsi normalitas dan asumsi homogenitas ragam, variabel kepadatan vaskular telah terpenuhi asumsi normalitas namun tidak terpenuhi asumsihomogenitasragam. Selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh pemberian genistein terhadap Kepadatan Vaskular secara parametrik dengan menggunakan uji ANOVAdandilanjutkandenganujiDunnet T3 5%. Berikuthasil pengujianpengaruh pemberian Genistein dengan beberapa level dosis terhadap KepadatanVaskulardengan menggunakan D uji ANOVA dandilanjutkandenganujiDunnet T3 5%.

Tabel5.5.

PengujianPengaruhGenisteinTerhadapKepadatanVaskulardenganUjiANOV

AdanUjiDunnet T3 5%

| Perlakua    | n Mear        | t ± SD            | p-value     |      |
|-------------|---------------|-------------------|-------------|------|
| K+          | 12.2 ±        | 8.84 <sup>c</sup> |             |      |
| P1          | 6.1 ±         | 3.87 b            |             |      |
| P2          | 2.9 ±         | 1.60 ab           | 0.000       |      |
| P3          | 2.0 ±         | 1.56 a            |             |      |
| P4          | 0.2 ±         | 0.42 a            |             |      |
| Keterangan: | Padarata-rata | ±sdjikam          | nemuathuruf | yang |

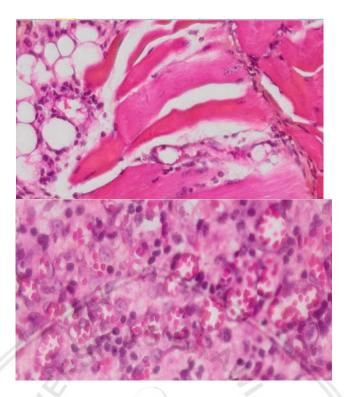
berbedaberartiadaperbedaan yangbermakna (p<0.05) danjikamemuathuruf yang samaberartitidakadaperbedaan yang bermakna (p>0.05).

BRAWIJAYA

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

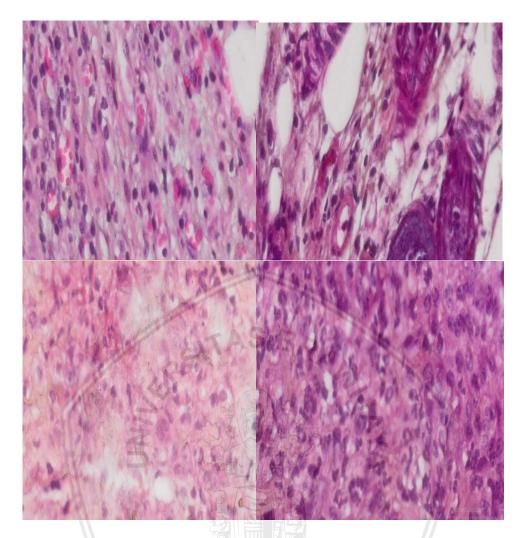
Berdasarkan pada hasil uji Dunnet T3 5 % pada Tabel 5.6 di atas, perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa penurunankepadatan vaskular secara signifikan ditunjukkan pada semuakelompok perlakuan.Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata ± sd semuakelompok perlakuan lebih rendah dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian genistein berpengaruh pada semua perlakuan. Sementara dosis yang paling dapat menurunkan pada P3 walaupun P2 memberikan hasil yang sama dengan P3 namun P2 juga sama dengan P1 dan terdapat perbedaan yang bermakna antara P1 dan P3 sehingga dapat disimpulkan patokan dosis terbaik adalah pada P3 dimana P4 tidak berbeda secara signifikan dengan P3.

Pada pewarnaan lesi endometrium yang didapatkan dari masing-masing kelompok, didapatkan gambaran kepadatan vaskular yang paling kuat terjadi pada kelompk 1 diikuti dengan kelompok perlakuan 2,3 dan 4. Hasil pewarnaan lesi endometriosis yang terbentuk dari masing-masing kelompok yang representatif dapat dilihat dari gambar dibawah ini.



Gambar 5.3. Histopatologi Kepadatan VaskularPada Peritoneum Mencit Sehat ((K(-))dan Mencit Model Endometriosis (K(+))
Keterangan : Panah merah menunjukkan vaskularisasi pada peritoneum mencit model

endometriosis



Gambar 5.4. Histopatologi Ekspresi Kepadatan Vaskular Mencit Model Endometriosis

Keterangan : Tampak dari salah satu lapangan pandang bahwakepadatan vaskular semakin menurun dari dari kelompok perlakuan 1 semakin menurun hingga kelompok 4. ( pewarnaan immunohistokimia, pembesaran 400x mikroskop Nikon H600L, cameara DS f12300 megapixel)

#### **BAB VI**

#### **PEMBAHASAN**

## 6.1. Pengaruh Pemberian Genistein Terhadap Ekspresi PCNA Pada Mencit Model Endometriosis

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada  $\alpha$  = 0,05 (p<0,05). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan antarapemberian genisteindengandosisbertingkat terhadap ekspresi PCNA.

Hasil dari penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Cotroneo & Lamartiniere (2001), penelitian ini menilai hubungan antara pemberian genistein pada hewan coba, diantaranya memberi perlakuan pada tikus ovariektomi yang dihubungkan dengan pertumbuhan implant endometriois dengan memberikan berbagai dosis genistein (5,0  $\mu$ g/g BB dan 16,6  $\mu$ g/g BB) melalui injeksi intramuscular selama 3 minggu yang ternyata pada dosis genistein 5,0  $\mu$ g/g BB menghambat pertumbuhan implant endometriosis, sedangkan pada dosis 16,6  $\mu$ g/g BB menyebabkan adanya pertumbuhan implant endometriosis.

Dalam penelitiaan sebelumya ditemukan bahwa genistein adalah inhibitor kuat dari proteintyrosine kinase dan topoisomerase II, enzim yang penting untuk proliferasi sel. Genistein juga merupakan inhibitor angiogenesis dan beberapa enzim metabolisme steroid, seperti aromatase dan 5α-reductase. Struktur genistein menyerupai estradiol, dan memiliki esterogenik dan efek antiestrogenik, tergantung dari konsentrasi estrogen endogen yang beredar dan estrogen reseptor (ER), oleh karena itu pada penelitian ini didapatkan ekspresi PCNA yang menibgkat dengan semakin tinggiya dosis genistein dapat dipengaruhi oleh

sifat esterogenik dari genistein pada dosis tersebut dengan dipengaruhi oleh estrogen endogen.

Hasil dari penelitian ini berbeda dengan penelitian in vitro jaringan endometriosis yang dilakukan oleh Sutrisno, et al (2014) penelitian ini menggunakan KI-67 salah satu marker dari proliferasi kadar KI-67 signifikan menurun dalam 48 jam dengan pemberian genistein 5-50 μM dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan dosis optimum 40 μM pada 48 jam. (Sutrisno, et al, 2014)

Terdapatnya penurunan proliferasi sel pada pemberian dosis genistein dikarenakan genistein bekerja sebagai SERMs, yaitu bersifat antiestrogenik pada kadar estrogen tinggi. Struktur genistein memiliki kemiripan dengan struktur 17βestradiol di dalam tubuh, hal ini menyebabkan genistein mampu mengikat ER. Genistein memiliki afinitas ER-β sekitar 20-30 kali lebih tinggi daripada ER-α namun memiliki aktifitas lebih rendah dari 17β-estradiol. Tingginya afinitas ER-β dapat menekan aktifitas dari ER-α berikatan estrogen endogen dengan membentuk heterodimer. Melalui mekanisme tersebut genistein dapat bersaing menempati ER sebagai ER antagonis. Dalam kondisi antiestrogenik maka ikatan dengan protein co-regulator yang diaktifkan adalah co-repressor, sehingga proses transkripsi terhambat begitu juga dengan mRNA dan sintesis protein yang mengakibatkan peningkatan sitokin inflamasi mayor (IL6, IL8), faktor angiogenesis (HIF-1α, VEGF-A), Matrix metalloproteinase (MMP-2 dan MMP-9), gen anti apoptosis (Bcl2) dan, peningkatan protein apoptosis (Caspase 3) dan sel molekul adhesi menjadi terhambat serta protein pro apoptosis (Bax) meningkat, dan akibatnya pertumbuhan serta perkembangan endometriosis juga terhambat. (Soares, 2012)

Berdasarkan hasil uji Dunnet T3 5 %, terdapatpengaruh yang signifikanpemberiangenisteinterhadappeningkatanekspresi PCNA

antarakelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuanyaitukelompok P1, P2 dan P3 (p<0.05).Pengujianstatistikmembuktikanbahwa peningkatan ekspresi PCNA secara signifikan terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dosis 1,30 mg/hari (P1), 1,95 mg/hari (P2), 2,6 mg/hari dan (P3). Hasilanalisisstatistikmenunjukkantidakterdapatperbedaan yang signifikanterhadappengaruhpemberiangenisteinterhadapekspresi PCNA antarakelompokkontrolpositif (K+) dengankelompok P4 (p>0.05). Perbandingan antar kelompok perlakuanmenunjukkan bahwa pada perbandingan antara P1 dengan P4 dan P2 dengan P3 didapatkan p-value lebih dari 0,05 (p>0.05). Ratarata ekspresi PCNA pada kelompok pemberian genistein 1,30 mg/hari (P1) dan 3,25 mg/hari (P4) tidak berbeda signifikan, demikian juga dengan kelompok pemberian genistein 1,95 mg/hari (P2) dan 2,6 mg/hari (P3) tidak berbeda signifikan. Pada pemberian geninstein P4(3,25 mg/hari) didapatkan nilai PCNA yang paling menurun dan terdapat perbedaaan yang signifikan dibandingkan dengan P1, P2 dan P3.

Progresivitas implant endometriosis dipengaruhi oleh hormon estrogen (estrogen dependent). Dimana kehadiran dan pertumbuhan sel endometriosis dimulai pada saat terjadinya menstruasi retrograde, sel-sel endometrium yang luruh bersamaan dengan darah menstruasi dan metabolit akan berbalik arah (refluks) melewati tuba fallopi kemudian masuk ke dalam rongga peritoneal menyebabkan sel dan jaringan endometrium melekat pada permukaan peritoneal. Jaringan endometriosis tersebut mensekresikan estrogen lokal yang bersifat estrogenik melibatkan P450 aromatase sehingga terjadi penurunan 17β-hidroksisteroid dehidrogenase (17β-HSD) type-2. Enzim aromatase mengubah estrogen lemah (estron) menjadi estrogen kuat (estradiol). Seperti halnya endometrium normal, implantasi dari jaringan endometriosis ini juga mempunyai

reseptor steroid yaitu RE-α dan RE-β sehingga estrogen yang dihasilkan didalam tubuh akan berikatan dengan reseptornya tersebut (Bulun, 2009; Borras, 2006).

Penelitian dengan pemberian genistein juga dilakukan olehCotroneo *et al,* (2001) pada penelitian ini diberikan dosis genistein 250 mg/kg BB diet per oral selama 3 minggu menunjukkan tidak mendukung pertumbuhan implant endometriosis. Pemberian dosis genistein 1000 mg/kg BB diet per oral selama 3 minggu pada tikus ovariektomi yang dihubungkan dengan pertumbuhan implant endometriosis dan ternyata memberikan pengaruh negatif terhadap pertumbuhan implant endometriosis pada tikus ovariektomi (Cotroneo *et al,* 2001).

Hal ini juga didukung oleh Yavuz *et al.* (2007) mempelajari tentang pemberian genistein pada wistar albino betina (berat tikus antara 250-300 gr) yang dibuat endometriosis yang diberi dosis 500 mg/kg per oral selama 21 hari didapatkan hasil bahwa secara signifikan dapat menghambat implantasi endometriosis.Penelitian ini menunjukkan bahwa, pada tikus dewasa normal, genistein menyebabkan sekitar 31,8% regresi implan endometriotik. (Yavuz *et al*, 2007)

Berdasarkan hasil pada penelitian ini maka hipotesis telah terbukti, yaitu pada kelompok P4 ternyata dengan dosis 3,25 mg/hari setara dengan 1250 mg geninstein pada manusia ternyata mampu bersifat antiestrogen sehingga menekan proliferasi sel endometriosis.

Geninstein sebagai agen antiproliferasi juga didukung berdasarkan penelitian Malloy K *et al.* Pada penelitian ini membuktikan bahwa geintein menghambat pertumbuhan sel kanker dan mengnduksi perhentian siklus sel pada G2. Mekanisme anti-proliferasi yang disebabkan oleh genistein pada penelitian Malloy K *et al*, 2018 dianggap terkait dengan beberapa target molekuler dalam sel kanker endometrium yang diteliti, termasuk penghambatan protein kinase tirosin (EGFR / VEGFR / Her2) dan modulasi ERα / β. Apoptosis

dan penghentian siklus sel yang disebabkan oleh genistein dalam sel kanker mungkin merupakan hasil dari penargetan jalur pensinyalan ini. Hasil nya menunjukkan bahwa efek anti-proliferatif yang diberikan oleh genistein dapat dikaitkan dengan induksi penangkapan siklus sel G2 / M dan apoptosis pada sel ECC-1 dan RL-95-2. Penelitian ini juga menemukan bahwa genistein secara signifikan meningkatkan ekspresi annexin V dan membelah aktivitas caspase-3 dalam sel RL-95-2 tetapi tidak pada sel ECC-1. Hasil ini menunjukkan bahwa genistein menginduksi penangkapan siklus sel G2 sebagai mekanisme utama dalam penghambatan proliferasi.(Malloy K *et al.*2018)

## 6.2. Pengaruh Pemberian Genistein Terhadap Kepadatan Vaskular Pada Mencit Model Endometriosis

Hasil analisis pengaruh pemberian genistein berbagai dosis terhadap kepadatan vaskuler dengan menggunakan uji ANOVA menunjukkan p-value sebesar 0.000(p<0,05). Pengujian ini menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan antara pemberian genistein terhadap kepadatan vaskular pada mencit model endometriosis.

Genistein merupakan inhibitor proliferasi sel endotel mikrovaskular dan angiogenesis poten yang diharapkan mampu menjadi agen antiangiogenik yang potensial menjadi terapi endometriosis. Genistein adalah isoflavon yang dapat berperan sebagai modulator selektif estrogen yang berperan sebagai antagonis murni melalui jalur reseptor estrogen alfa dan dapat bertindak sebagai partial agonis ketika bertindak melalui jalur reseptor estrogen beta. Genistein juga diketahui dapat mensupresi angiogenesis melalui *down*-regulasi VEGF dan *hypoxia inducible factor-1a.* (Yuliawati, *et al* 2017).

Beberapa penelitian invivo dan in vitro menunjukkan ekspresi VEGF-A meningkat pada endometriosis. Studi Boils, *et al* (2013) menunjukkan kadar VEGF-A yang berbeda pada berbagai jenis kultur sel endometriosis. Penelitian juga dilakukan Machado (2010) pada tikus model endometriosis membuktikan bahwa tingginya aktivasi angiogenesis menunjukkan adanya korelasi antara tingkat kepadatan pembuluh darah pada lesi endometriosis.

Hasil uji Dunnet T3 5 % antara kelompok kontrol positif (K+) dan kelompok perlakuan menunjukkan penurunan kepadatan vaskular signifikan pada semua kelompok meliputi P1, P2, P3, maupun P4 (p<0.05). Penurunan kepadatan vaskular terjadi pada kelompok pemberian genistein semua level dosis. Kepadatanvaskularpadakelompokkontrolpositif (K+) didapatkan paling tinggiyaitudibandingkandengansemuakelompokperlakuan, yaitu 12,2 ± 8,84 sel/LPB. Rata-rata kepadatan vaskular pada kelompok perlakuan pemberian genistein dosis 3,25 mg/hari yaitu 0,2 ± 0,42 sel/LPB menunjukkan kepadatan paling rendah dibandingkan dengan semua perlakuan. Penelitian ini menunjukkan penurunan kepadatan vaskular berhubungan dengan pemberian genistein apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol, namun tidak antara masingmasing kelompok level dosis. Rata-rata kepadatan vaskular pada kelompok pemberian genistein 1,30 mg/hari (P1) tidak berbeda signifikan dengan kelompok pemberian genistein 1,95 mg/hari (P2). Demikian juga rata-rata kepadatan vaskular pada kelompok pemberian genistein 1,95 mg/hari (P2) tidak berbeda signifikan dengan kelompok pemberian genistein 2,60 mg/hari (P3) dan 3,25 mg/hari.

Pemberian genistein dengan dosis bertingkat menunjukkan perannya dalam menurunkan ekspresi estrogen receptor- $\alpha$ . Hal ini ditunjang oleh skor docking genistein yang tinggi menunjukkan tingginya afinitas terhadap ER- $\alpha$ .

Peningkatan ekspresi ER-α mengindikasikan adanya reaksi inflamasi yang ikut berperan pada pembentukan lesi endometriosis. Faktor angiogenik diketahui meningkat pada kondisi endometriosis menyebabkan proliferasi vaskular yang tidak terkendali (Sutrisno *et al.*, 2018). Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian genistein dosis bertingkat berhubungan dengan penurunan kepadatan vaskular pada lesi endometriosis (*p*< 0,05). Rata-rata kepadatan vaskular menurun secara signifikan pada semua kelompok perlakuan pemberian genistein. Kepadatan vaskular meningkat pada lesi endometriosis awal menyebabkan endometriosis lesi merah, peningkatan kepadatan vascular ini diketahui dipengaruhi oleh adanya peningkatan angiogenesis akibat aktivitas VEGF. Berdasarkan telaah literatur, penurunan kepadatan vascular pada penelitian ini dapat disebabkan oleh karena efek genistein yang dapat mempengaruhi down-regulasi VEGF (Yuliawati, *et al*,2017). Diperlukan penelitian lanjutan untuk membuktikan jalur penghambatan genistein terhadap kepadatan vaskuler melalui jalur VEGF.

Secara in vitro, kultur HEECs dapat digunakan sebagai model terhadap lesi endometriosis. Genistein diketahui dapat menghambat proliferasi HEECs dan epitel kelenjar endometrium secara in vitro. Peningkatan dosis genistein dengan kombinasi atau tanpa 17β-Estradiol terbukti dapat menghambat proliferasi HEECs. Efek genistein terhadap proliferasi sel endotel dan angiogenesis tergantung dosis dan inhibisinya meningkat sesuai dengan peningkatan dosis hingga puncaknya pada konsentrasi 200 μmo/L. Genistein pada dosis rendah diketahui memiliki potensi estrogen-like yang mendukung proliferasi yaitu pada dosis 1-50 μmol/L. Genistein merupakan inhibitor tyrokinase spesifik yang memiliki kapasitas menghambat angiogenesis sel endotel yang berkembang dari beberapa organ in vitro. Potensi genistein lainnya yaitu mensupresi pertumbuhan

dan metastasis tumor in vivo. Studi in vivo menunjukkan bahwa genistein dapat menghambat pertumbuhan sel tumor pada leukemia, limfoma, kanker prostat, kanker payudara dan kanker paru. Genistein menunjukkan potensi estrogenic dan dapat berpotensi pada pencegahan penyakit jantung coroner. Efek in vitro genistein pada endometrium manusia memiliki efek anti-estrogen pada stroma dan sel kelenjar. Genistein menunjukkan potensi inhibisi pada angiogenesis dan juga proliferasi epitel kelenjar pada endomentrium. Melihat potensi tersebut, genistein dapat dijadikan salah satu alternative preparat progestin sintetis yang poten. Genistein memiliki potensi untuk menghambat proliferasi dan hyperplasia endometrium sehingga dapat digunakan untuk terapi endometriosis dan kanker endometrium (Sha and Lin, 2008). Baik studi in vivo maupun in vitro terhadap genistein menunjukkan bahwa genistein memiliki potensi yang tinggi sebagai agen terapi pada endometriosis.

Keterbatasan dari penelitian ini diantaranya adalah penggunaan blok parafin mempunyai masa kadaluarsa. Kualitas dari blok parafin dapat menurun seiring bertambahnya waktu hingga 5 tahun dengan penyimpanan sesuai standard., biasanya preparat dapat mengalami kerusakan dan akan sulit dilakukan pembacaan dibawah mikroskop.

Hasil perhitungan kepadatan vaskular yang bervariasi dan hasil statistik yang tidak sesuai dengan hipotesa dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain jenis antibodi yang digunakan, subyektifitas pemeriksa dalam mengintrepretasikan dan menghitung pembuluh darah kapiler dan ekspresi PCNA yang tergambar dari inti sel. Suatu alat khusus yang banyak dipakai dalam penelitian tentang kepadatan mikrovaskular adalah Chalkley graticule, *image processing technique*, dan *imaging ananlysis software*. Pada penelitian ini juga belum meneliti mengenai efek samping terhadap dosis yang diberikan.

#### **BAB VI**

#### **PEMBAHASAN**

## 6.1. Pengaruh Pemberian Genistein Terhadap Ekspresi PCNA Pada Mencit Model Endometriosis

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada  $\alpha$  = 0,05 (p<0,05). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan antarapemberian genisteindengandosisbertingkat terhadap ekspresi PCNA.

Hasil dari penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Cotroneo & Lamartiniere (2001), penelitian ini menilai hubungan antara pemberian genistein pada hewan coba, diantaranya memberi perlakuan pada tikus ovariektomi yang dihubungkan dengan pertumbuhan implant endometriois dengan memberikan berbagai dosis genistein (5,0  $\mu$ g/g BB dan 16,6  $\mu$ g/g BB) melalui injeksi intramuscular selama 3 minggu yang ternyata pada dosis genistein 5,0  $\mu$ g/g BB menghambat pertumbuhan implant endometriosis, sedangkan pada dosis 16,6  $\mu$ g/g BB menyebabkan adanya pertumbuhan implant endometriosis.

Dalam penelitiaan sebelumya ditemukan bahwa genistein adalah inhibitor kuat dari proteintyrosine kinase dan topoisomerase II, enzim yang penting untuk proliferasi sel. Genistein juga merupakan inhibitor angiogenesis dan beberapa enzim metabolisme steroid, seperti aromatase dan 5α-reductase. Struktur genistein menyerupai estradiol, dan memiliki esterogenik dan efek antiestrogenik, tergantung dari konsentrasi estrogen endogen yang beredar dan estrogen reseptor (ER), oleh karena itu pada penelitian ini didapatkan ekspresi PCNA yang menibgkat dengan semakin tinggiya dosis genistein dapat dipengaruhi oleh

BRAWIJAYA

sifat esterogenik dari genistein pada dosis tersebut dengan dipengaruhi oleh estrogen endogen.

Hasil dari penelitian ini berbeda dengan penelitian in vitro jaringan endometriosis yang dilakukan oleh Sutrisno, et al (2014) penelitian ini menggunakan KI-67 salah satu marker dari proliferasi kadar KI-67 signifikan menurun dalam 48 jam dengan pemberian genistein 5-50 μM dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan dosis optimum 40 μM pada 48 jam. (Sutrisno, et al, 2014)

Terdapatnya penurunan proliferasi sel pada pemberian dosis genistein dikarenakan genistein bekerja sebagai SERMs, yaitu bersifat antiestrogenik pada kadar estrogen tinggi. Struktur genistein memiliki kemiripan dengan struktur 17βestradiol di dalam tubuh, hal ini menyebabkan genistein mampu mengikat ER. Genistein memiliki afinitas ER-β sekitar 20-30 kali lebih tinggi daripada ER-α namun memiliki aktifitas lebih rendah dari 17β-estradiol. Tingginya afinitas ER-β dapat menekan aktifitas dari ER-α berikatan estrogen endogen dengan membentuk heterodimer. Melalui mekanisme tersebut genistein dapat bersaing menempati ER sebagai ER antagonis. Dalam kondisi antiestrogenik maka ikatan dengan protein co-regulator yang diaktifkan adalah co-repressor, sehingga proses transkripsi terhambat begitu juga dengan mRNA dan sintesis protein yang mengakibatkan peningkatan sitokin inflamasi mayor (IL6, IL8), faktor angiogenesis (HIF-1α, VEGF-A), Matrix metalloproteinase (MMP-2 dan MMP-9), gen anti apoptosis (Bcl2) dan, peningkatan protein apoptosis (Caspase 3) dan sel molekul adhesi menjadi terhambat serta protein pro apoptosis (Bax) meningkat, dan akibatnya pertumbuhan serta perkembangan endometriosis juga terhambat. (Soares, 2012)

Berdasarkan hasil uji Dunnet T3 5 %, terdapatpengaruh yang signifikanpemberiangenisteinterhadappeningkatanekspresi PCNA

antarakelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuanyaitukelompok P1, P2 dan P3 (p<0.05).Pengujianstatistikmembuktikanbahwa peningkatan ekspresi PCNA secara signifikan terjadi pada kelompok pemberian genistein dengan dosis 1,30 mg/hari (P1), 1,95 mg/hari (P2), 2,6 mg/hari dan (P3). Hasilanalisisstatistikmenunjukkantidakterdapatperbedaan yang signifikanterhadappengaruhpemberiangenisteinterhadapekspresi PCNA antarakelompokkontrolpositif (K+) dengankelompok P4 (p>0.05). Perbandingan antar kelompok perlakuanmenunjukkan bahwa pada perbandingan antara P1 dengan P4 dan P2 dengan P3 didapatkan p-value lebih dari 0,05 (p>0.05). Ratarata ekspresi PCNA pada kelompok pemberian genistein 1,30 mg/hari (P1) dan 3,25 mg/hari (P4) tidak berbeda signifikan, demikian juga dengan kelompok pemberian genistein 1,95 mg/hari (P2) dan 2,6 mg/hari (P3) tidak berbeda signifikan. Pada pemberian geninstein P4(3,25 mg/hari) didapatkan nilai PCNA yang paling menurun dan terdapat perbedaaan yang signifikan dibandingkan dengan P1, P2 dan P3.

Progresivitas implant endometriosis dipengaruhi oleh hormon estrogen (estrogen dependent). Dimana kehadiran dan pertumbuhan sel endometriosis dimulai pada saat terjadinya menstruasi retrograde, sel-sel endometrium yang luruh bersamaan dengan darah menstruasi dan metabolit akan berbalik arah (refluks) melewati tuba fallopi kemudian masuk ke dalam rongga peritoneal menyebabkan sel dan jaringan endometrium melekat pada permukaan peritoneal. Jaringan endometriosis tersebut mensekresikan estrogen lokal yang bersifat estrogenik melibatkan P450 aromatase sehingga terjadi penurunan 17β-hidroksisteroid dehidrogenase (17β-HSD) type-2. Enzim aromatase mengubah estrogen lemah (estron) menjadi estrogen kuat (estradiol). Seperti halnya endometrium normal, implantasi dari jaringan endometriosis ini juga mempunyai

reseptor steroid yaitu RE-α dan RE-β sehingga estrogen yang dihasilkan didalam tubuh akan berikatan dengan reseptornya tersebut (Bulun, 2009; Borras, 2006).

Penelitian dengan pemberian genistein juga dilakukan olehCotroneo *et al,* (2001) pada penelitian ini diberikan dosis genistein 250 mg/kg BB diet per oral selama 3 minggu menunjukkan tidak mendukung pertumbuhan implant endometriosis. Pemberian dosis genistein 1000 mg/kg BB diet per oral selama 3 minggu pada tikus ovariektomi yang dihubungkan dengan pertumbuhan implant endometriosis dan ternyata memberikan pengaruh negatif terhadap pertumbuhan implant endometriosis pada tikus ovariektomi (Cotroneo *et al,* 2001).

Hal ini juga didukung oleh Yavuz *et al.* (2007) mempelajari tentang pemberian genistein pada wistar albino betina (berat tikus antara 250-300 gr) yang dibuat endometriosis yang diberi dosis 500 mg/kg per oral selama 21 hari didapatkan hasil bahwa secara signifikan dapat menghambat implantasi endometriosis.Penelitian ini menunjukkan bahwa, pada tikus dewasa normal, genistein menyebabkan sekitar 31,8% regresi implan endometriotik. (Yavuz *et al*, 2007)

Berdasarkan hasil pada penelitian ini maka hipotesis telah terbukti, yaitu pada kelompok P4 ternyata dengan dosis 3,25 mg/hari setara dengan 1250 mg geninstein pada manusia ternyata mampu bersifat antiestrogen sehingga menekan proliferasi sel endometriosis.

Geninstein sebagai agen antiproliferasi juga didukung berdasarkan penelitian Malloy K *et al.* Pada penelitian ini membuktikan bahwa geintein menghambat pertumbuhan sel kanker dan mengnduksi perhentian siklus sel pada G2. Mekanisme anti-proliferasi yang disebabkan oleh genistein pada penelitian Malloy K *et al*, 2018 dianggap terkait dengan beberapa target molekuler dalam sel kanker endometrium yang diteliti, termasuk penghambatan protein kinase tirosin (EGFR / VEGFR / Her2) dan modulasi ERα / β. Apoptosis

dan penghentian siklus sel yang disebabkan oleh genistein dalam sel kanker mungkin merupakan hasil dari penargetan jalur pensinyalan ini. Hasil nya menunjukkan bahwa efek anti-proliferatif yang diberikan oleh genistein dapat dikaitkan dengan induksi penangkapan siklus sel G2 / M dan apoptosis pada sel ECC-1 dan RL-95-2. Penelitian ini juga menemukan bahwa genistein secara signifikan meningkatkan ekspresi annexin V dan membelah aktivitas caspase-3 dalam sel RL-95-2 tetapi tidak pada sel ECC-1. Hasil ini menunjukkan bahwa genistein menginduksi penangkapan siklus sel G2 sebagai mekanisme utama dalam penghambatan proliferasi.(Malloy K *et al.*2018)

## 6.2. Pengaruh Pemberian Genistein Terhadap Kepadatan Vaskular Pada Mencit Model Endometriosis

Hasil analisis pengaruh pemberian genistein berbagai dosis terhadap kepadatan vaskuler dengan menggunakan uji ANOVA menunjukkan p-value sebesar 0.000(p<0,05). Pengujian ini menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan antara pemberian genistein terhadap kepadatan vaskular pada mencit model endometriosis.

Genistein merupakan inhibitor proliferasi sel endotel mikrovaskular dan angiogenesis poten yang diharapkan mampu menjadi agen antiangiogenik yang potensial menjadi terapi endometriosis. Genistein adalah isoflavon yang dapat berperan sebagai modulator selektif estrogen yang berperan sebagai antagonis murni melalui jalur reseptor estrogen alfa dan dapat bertindak sebagai partial agonis ketika bertindak melalui jalur reseptor estrogen beta. Genistein juga diketahui dapat mensupresi angiogenesis melalui *down*-regulasi VEGF dan *hypoxia inducible factor-1a.* (Yuliawati, *et al* 2017).

Beberapa penelitian invivo dan in vitro menunjukkan ekspresi VEGF-A meningkat pada endometriosis. Studi Boils, *et al* (2013) menunjukkan kadar VEGF-A yang berbeda pada berbagai jenis kultur sel endometriosis. Penelitian juga dilakukan Machado (2010) pada tikus model endometriosis membuktikan bahwa tingginya aktivasi angiogenesis menunjukkan adanya korelasi antara tingkat kepadatan pembuluh darah pada lesi endometriosis.

Hasil uji Dunnet T3 5 % antara kelompok kontrol positif (K+) dan kelompok perlakuan menunjukkan penurunan kepadatan vaskular signifikan pada semua kelompok meliputi P1, P2, P3, maupun P4 (p<0.05). Penurunan kepadatan vaskular terjadi pada kelompok pemberian genistein semua level dosis. Kepadatanvaskularpadakelompokkontrolpositif (K+) didapatkan paling tinggiyaitudibandingkandengansemuakelompokperlakuan, yaitu 12,2 ± 8,84 sel/LPB. Rata-rata kepadatan vaskular pada kelompok perlakuan pemberian genistein dosis 3,25 mg/hari yaitu 0,2 ± 0,42 sel/LPB menunjukkan kepadatan paling rendah dibandingkan dengan semua perlakuan. Penelitian ini menunjukkan penurunan kepadatan vaskular berhubungan dengan pemberian genistein apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol, namun tidak antara masingmasing kelompok level dosis. Rata-rata kepadatan vaskular pada kelompok pemberian genistein 1,30 mg/hari (P1) tidak berbeda signifikan dengan kelompok pemberian genistein 1,95 mg/hari (P2). Demikian juga rata-rata kepadatan vaskular pada kelompok pemberian genistein 1,95 mg/hari (P2) tidak berbeda signifikan dengan kelompok pemberian genistein 2,60 mg/hari (P3) dan 3,25 mg/hari.

Pemberian genistein dengan dosis bertingkat menunjukkan perannya dalam menurunkan ekspresi estrogen receptor- $\alpha$ . Hal ini ditunjang oleh skor docking genistein yang tinggi menunjukkan tingginya afinitas terhadap ER- $\alpha$ .

Peningkatan ekspresi ER-α mengindikasikan adanya reaksi inflamasi yang ikut berperan pada pembentukan lesi endometriosis. Faktor angiogenik diketahui meningkat pada kondisi endometriosis menyebabkan proliferasi vaskular yang tidak terkendali (Sutrisno *et al.*, 2018). Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian genistein dosis bertingkat berhubungan dengan penurunan kepadatan vaskular pada lesi endometriosis (*p*< 0,05). Rata-rata kepadatan vaskular menurun secara signifikan pada semua kelompok perlakuan pemberian genistein. Kepadatan vaskular meningkat pada lesi endometriosis awal menyebabkan endometriosis lesi merah, peningkatan kepadatan vascular ini diketahui dipengaruhi oleh adanya peningkatan angiogenesis akibat aktivitas VEGF. Berdasarkan telaah literatur, penurunan kepadatan vascular pada penelitian ini dapat disebabkan oleh karena efek genistein yang dapat mempengaruhi down-regulasi VEGF (Yuliawati, *et al*,2017). Diperlukan penelitian lanjutan untuk membuktikan jalur penghambatan genistein terhadap kepadatan vaskuler melalui jalur VEGF.

Secara in vitro, kultur HEECs dapat digunakan sebagai model terhadap lesi endometriosis. Genistein diketahui dapat menghambat proliferasi HEECs dan epitel kelenjar endometrium secara in vitro. Peningkatan dosis genistein dengan kombinasi atau tanpa 17β-Estradiol terbukti dapat menghambat proliferasi HEECs. Efek genistein terhadap proliferasi sel endotel dan angiogenesis tergantung dosis dan inhibisinya meningkat sesuai dengan peningkatan dosis hingga puncaknya pada konsentrasi 200 μmo/L. Genistein pada dosis rendah diketahui memiliki potensi estrogen-like yang mendukung proliferasi yaitu pada dosis 1-50 μmol/L. Genistein merupakan inhibitor tyrokinase spesifik yang memiliki kapasitas menghambat angiogenesis sel endotel yang berkembang dari beberapa organ in vitro. Potensi genistein lainnya yaitu mensupresi pertumbuhan

dan metastasis tumor in vivo. Studi in vivo menunjukkan bahwa genistein dapat menghambat pertumbuhan sel tumor pada leukemia, limfoma, kanker prostat, kanker payudara dan kanker paru. Genistein menunjukkan potensi estrogenic dan dapat berpotensi pada pencegahan penyakit jantung coroner. Efek in vitro genistein pada endometrium manusia memiliki efek anti-estrogen pada stroma dan sel kelenjar. Genistein menunjukkan potensi inhibisi pada angiogenesis dan juga proliferasi epitel kelenjar pada endomentrium. Melihat potensi tersebut, genistein dapat dijadikan salah satu alternative preparat progestin sintetis yang poten. Genistein memiliki potensi untuk menghambat proliferasi dan hyperplasia endometrium sehingga dapat digunakan untuk terapi endometriosis dan kanker endometrium (Sha and Lin, 2008). Baik studi in vivo maupun in vitro terhadap genistein menunjukkan bahwa genistein memiliki potensi yang tinggi sebagai agen terapi pada endometriosis.

Keterbatasan dari penelitian ini diantaranya adalah penggunaan blok parafin mempunyai masa kadaluarsa. Kualitas dari blok parafin dapat menurun seiring bertambahnya waktu hingga 5 tahun dengan penyimpanan sesuai standard., biasanya preparat dapat mengalami kerusakan dan akan sulit dilakukan pembacaan dibawah mikroskop.

Hasil perhitungan kepadatan vaskular yang bervariasi dan hasil statistik yang tidak sesuai dengan hipotesa dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain jenis antibodi yang digunakan, subyektifitas pemeriksa dalam mengintrepretasikan dan menghitung pembuluh darah kapiler dan ekspresi PCNA yang tergambar dari inti sel. Suatu alat khusus yang banyak dipakai dalam penelitian tentang kepadatan mikrovaskular adalah Chalkley graticule, *image processing technique*, dan *imaging ananlysis software*. Pada penelitian ini juga belum meneliti mengenai efek samping terhadap dosis yang diberikan.

# BRAWIJAY

#### **BAB VII**

#### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### 7.1. KESIMPULAN

- Pemberian genistein pada dosis 1,30 mg/hari, 1,95 mg/hari, 2,60 mg/hari berpengaruh secara signifikan meningkatkan ekspresi PCNA pada mencit model endometriosis tetapi pada dosis 3,25 mg/hari menurunkan ekspresi PCNA.
- Pemberian genistein pada dosis 1,30 mg/hari, 1,95 mg/hari, 2,60 mg/hari dan 3,25 mg/hari berpengaruh secara signifikan menurunkan kepadatan vaskular pada mencit model endometriosis.

#### **7.2. SARAN**

Diperlukan studi lanjutan untuk menilai pengaruh pemberian genistein dengan dosis yang lebih tinggi dan efek samping terhadap berbagai faktor yang memiliki pengaruh terhadap lesi endometriosis terutama melalui berbagai jalur signal yang berpengaruh terhadap proliferasi sel.

#### **DAFTAR PUSTAKA**

- Abdullah, Djuwantono, Bayuaji,, dan Permadi . 2012. Step by Step Penanganan Kelainan Endokrinologi Reproduksi dan Fertilitas dalam Praktik Seharihari. Departemen Obstetri dan Ginekologi Universitas Padjajaran Bandung. Sagung Seto: Bandung.
- Agarwal dan Subramanian. 2010. Endometriosis Morfology, Clinical Presentation and Molecular *Pathology.Jurnal of Laboratory Psysician.*2 (1): 1-9
- Amberkar , Kumari, Mor, Semwal , dan Adiga. 2010. PPAR–gamma: a dagger in endometriosis. *Australian Medical Journal* .12 (3) : 814-820.
- Amelia SWN., Yueniwati Y., Sutrisno S. 2016. The expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is affected by Hypoxia indicuble factor-1a in peritoneal mice endometriosis treated with genistein. *Midle East Fertility Society Journal*, 21: 180-183.
- Banerjee, Li Yuang, Wang dan Sarkar . 2008. Multi-target Therapy of Cancer by Genistein. *Cancer Letters*. 269 (2): 226-242
- Barrier. 2010. Immunology Of Endometriosis. *Clinical Obstetrics And Gynecology*.53 (2): 397-402.
- Borras, C., Gambini, J., Gomez-Cabrera, MC., Sastre, J., Pallardo, FV., Mann, GE., Vina, J., 2006. Genistein A Soy Isoflavone Up Regulated Expression of Antioxidant Genes: Involvement of Estrogen Receptor, ERK ½, and NFκB. *The FASEB Journal*. 20:67-8
- Borrelli, Carvalho, Kallas, Mechsner, Baracat dan Abrao. 2013. Chemokines in the pathogenesis of endometriosis and infertility. *Journal of Reproductive Immunology*.98: 1-9
- Bourley, Volkov, Pavlovitch, Lets, Larsson, Olovson. 2006. The Relationship Between Microvessel Density, Proliferative Activity and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor-A amd Its Receptors in Eutopic Endometrium and Endometriotics Lesions. *Reproduction*. 132: 501-509
- Bulun. 2009. Mechanisms of disease endometriosis. *The New England Journal of Medicine*. 360: 268-279
- Burney dan Giudice . 2012. Article in Press: Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and Sterility:* 1-9.
- Cahyanti, Kristanto, Adiyono. 2009. Bcl-2 dan Indeks Apoptosis pada Hiperplasia Endometrium Non-Atipik Simpleks dan Kompleks. *Majalah Obstetri Ginekologi Indonesia*. 33 (1): 48-55.
- Chandrasekharan dan Aglin. 2013. Pharmacokinetics of Dietary Isoflavones. *Journal Steroids Hormon Sci*: 1-8.

- Chang, Charn, Park, Helferich, Komm, Katzenellenbogen, dan Katzenellenbogen. 2008. Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  as Determinants of Gene Expression: Influence of Ligand, Dose, and Chromatin Binding. *Molecular Endocrinology Journal*. 22 (5): 1032-1043.
- Cotroneo, M.S., and Lamartiniere, C.A., 2001. Pharmacologic, but Not Dietary, Genistein Supports Endometriosis in a Rat Model. *Toxycological Sciences*.61: 68-75
- Diez-Perez. 2006. Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). *Arq Bras Endocrinology Metabolism*. 50 (4): 720-734.
- Dmowski dan Braun. 2004. Immunology of Endomeriosis. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology. 18 (2): 245-263.
- Donnez, Smoes, Gillerot, Casana-Roux, Nissole. 1998. Vascular endothelial growth factor in endometriosis. *Human reproduction*; 13(6) 1686-90.
- Edwards, AK. Nakamura DS., Virani, S, Wessels JM, Tayade, C., ,2013. Animal models for anti-angiogenic therapy in endometriosis. *Journal of Reproductive Immunology* 97: 85–94.
- Eroschenko. 2012. Atlas Histologi Difiore dengan Korelasi Fungsional.EGC: Jakarta.
- Falcone, F. dan Lebovic, I. 2011. Clinical Management of Endometriosis. *Obstetri Gynecology*. 118 (3): 691–705.
- Farrell dan Garad. 2012. Endometriosis. Clinical Update. *Australian Nursing Journal*. 20 (5): 37 39.
- Fritz dan Speroff. 2011. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Eighth Edition: Lippincott Williams and Wilkins: Baltimore: 24-34.
- Giudice .2010. Clinical Practice Endometriosis. *The New England Journal of Medicine*. 362 (35): 2389-2398
- Groothuis, P.G. Nap, A.W., Winterhager2, E. 2005. Vascular development in endometriosis. *Spinger Angiogenesis* 8: 147—156.
- Gruber , Tschugguel , Schneeberger dan Huber. 2002. Production and Action of Estrogen. *The New England Journal of Medicine*. 346 (5) : 340-352.
- Hadi R.S. 2011. Mekanisme Apoptosis Pada Regresi Sel Luteal. *Majalah Kesehatan Pharma Medika*. 3 (1): 246-254.
- Hamalainen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., Moilanen, E., 2007. Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercitin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF-kB Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF-kB Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression an NO Production in Activated Macrophages. *Mediators of inflammation*.10: 1-10

- Hanafiah dan Sukamto. 2011. Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi Edisi Revisi. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Handayani, dan 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.
- Harada , Taniguchi , Izawa , Ohama , Takenaka , Tagashira , Ikeda , Watanabe , Iwabe , Terakawa. 2007. Apoptosis and endometriosis. *Frontiers in Bioscience. Human Reproduction Update*. 12 (1): 3140-3151.
- Harris , Bruner-Tran , Zhang. 2005. A Selective estrogen receptor-β agonis causes lesion regression in an experimentally induced model of endometriosis. *Human Reproduction*. 20: 936-41.
- Hoffman . 2014. Williams Obstetrics 24th Edition Study Guide. McGraw-Hill Companies Inc.
- Hoeben , Landuyt , Highhley , Wildiers , Van Oosterom , De Bruijn . 2004. Vascular endhotelial growth factor and angiogenesis. *Journal of Pharmacology*; 56(4): 549-80.
- Jadoon, Swanton dan McVeigh. 2012. Endometriosis: Diagnosis And Recommended Management. *Drug Review Endometriosis*: 35-42.
- Kaur, KK., Allahbadia, G. 2016. An Update on Pathophysiology and Medical Management of Endometriosis. Advances In Reproductive Science, 4, 53-73.
- Kayisli UA, Aksu CA, Berkkanoglu M, Arici A. Estrogenicity of isoflavones on human endometrial stromal and glandular cells. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:5539–44.
- Klatt dan Edward. 2006. Robbins and Catran Atlas of Pathology Edward C. Klatt 7 ed.Saunders Elseviers: Philadephia.
- Kralickova , M., Vetvicka , V. 2016. Role of angiogenesis in endometriosis. *Pathology Discovery*: Volume 4, Article 1.
- Kulak, Fisher, Komm,, Taylor. 2011. Treatment with bazedoxifene, a selective estrogen receptor modulator, causes regression of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology*.152 (8): 3226-3232.
- Laschke, M.W., Giebels, C., Nickels, R.M., Scheuer, C. 2011. Endothelial Progenitor Cells Contribute to the Vascularization of Endometriotic Lesions. *The American Journal of Pathology*, Vol. 178, No. 1.
- Laschke, M,W. Giebels, C. Menger, M.D. 2011. Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. *Human Reproduction Update*, Vol.17, No.5 pp. 628–636.

- Laschke, M,W. Menger, M.D. 2018. Basic mechanisms of vascularization in endometriosis and their clinical implications .*Human Reproduction Update*, Vol.24, No.2 pp. 207–224.
- Leyland, Casper, Laberge dan Singh. 2010. Endometriosis Diagnosis and Management. *Journal of Obstretics and Gynaecology Canada* (*JOGC*).32(7): S1-S32.
- Lu LJ, Anderson KE, Grady JJ, Nagamani M. Effects of an isoflavonefree soy diet on ovarian hormones in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3045–52.
- Maharani M, Wahyuni ES., Sutrisno. 2012. Effect of Genistein on Endometriosis Lesion, Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Level of Endometriosis: In silico and In vivo Study. *Journal of Clinical and Molecular Endocrinology* 2572-5432.
- Malloy,K., Wang, J., Clark, L., Fang, Z.,.Novasoy and genistein inhibit endometrial cancer cell proliferation through disruption of the AKT/mTOR and MAPK signaling pathways. *Am J Transl* Res 2018;10(3):784-795
- Morito, K., Hirose, T., Kinjo, J., Hirakawa, T., Okawa, M., Nohara, T., Ogawa, S., Inoue, S., Muramatsu, M., Masamune, Y., 2001.Interaction of Phytoestrogens with Estrogen Receptors α & β. *Biol. Pharm. Bull.*24 (4): 351-356
- Notoadmodjo, S. 2010. Metode Penelitian Kesehatan. Rineka Cipta, Indonesia.
- Nurtjahyo, A. 2011. *Kelainan Haid Pada Endometriosis dalam Kupas Tuntas Kelainan Haid.* Editor: Astarto, N.M., Djuwantono, T., Permadi, W., Madjid, T.H., Bayuaji, H., Ritonga, M.A. Departemen Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran. p: 151-158.
- Oepomo, TD. 2010. Kandungan TNF-α dalam Zakir Peritoneal dan dalam Serum Penderita Endometriosis. *Biodiversitas Volume* 7, No 3. Hal 206-2011.
- Pavese, J.M Farmer, R.L dan Bergan R. 2010. Inhibition of Cancer cell Invasion and Metastasis by Genistein. *Cancer Metastasis* . 29: 465-482
- Pilsakova, L., Riecansky, I., dan Jagla F. 2010. The Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens. *Physiological Research*. University of Vienna, Austria. 59: 651-664.
- Polkowski and Mazurek, A.P. 2000. Biological Properties of Genistein. A Review in Vitro and In Vivo Data. *Drug Research*. 57 (2): 135-155
- Prabowo. 2009. Endometriosis. *Ilmu Kandungan.* Edisi 2 Cetakan 7. PT Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo: Jakarta. p. 314-327
- Prakash dan Gupta C. 2011. Role of phytoestrogens as nutraceuticals in human health. *Pharmacology online*. 1 : 510-523

- Rahman, S., Islam, R., Swaraz, AM., Ansari, A., Parvez, A.K, Paul, D.K. 2012. An insight on genistein as potensial pharmacological and therapeutic agent. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012: S1924-S1937.
- Rice dan Whitehead, S.A. 2006. Phytoestrogens and Breast Cancer-Promoters or Protectors. *Endocrine-Related Cancer*.13: 995-1015.
- Riggs, B.L dan Hartman, L.C. 2003. Selective Estrogen-Receptor Modulators Mechanism of Action and Application to Clinical Practice. *The New England Journal Of Medicine*. 348: 618-629.
- Rishi, R.K. 2002. Phytoestrogen in Health and Illness. *Indian Journal of Pharmacology*. 34: 311-320.
- Rocha, Al., Reis, FM., Taylor, RN. 2013. Angiogenesis and Endometriosis. Hindawi Publishing Corporation Obstetrics and Gynecology International Volume 2013, 8 pages
- Rudzitis J., Ko" rbel, C., Scheuer C, Menger MD, Laschke, M.W. 2012. Xanthohumol inhibits growth and vascularization of developing endometriotic lesions. *Human Reproduction*, Vol.27, No.6 pp. 1735–1744.
- Rudzitis J, Menger,MD Laschke MW. 2013. Resveratrol is a potent inhibitor of vascularization and cell proliferation in experimental endometriosis. *Human Reproduction*, Vol.28, No.5 pp. 1339–1347.
- Setchell and Cassidy, A. 1999. Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. *Journal of Nutrition*.129: 758-767.
- Sha, G. H. and Lin, S. Q. (2008) 'Genistein inhibits proliferation of human endometrial endothelial cell in vitro', *Chinese Medical Sciences Journal*. Chinese Academy Medical Sciences, 23(1), pp. 49–53. doi: 10.1016/S1001-9294(09)60010-9.
- Soares, S.R., Varea, A.M., Mora, J.J., Pellicer, A. 2012. Pharmacologic Therapies in Endometriosis: A Systematic Review. *Fertility and Sterility*. 98 (3): 529-555.
- Sourial,S., Tempest,N.dan Hapangama, D.K. 2014. Review Article: Theories on the Pathogenesis of Endometriosis. *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Reproductive Medicine*:1-10.
- Staar S, Richter DU, Makovitzky J, Briese V, Bergemann C. Stimulation of endometrial glandular cells with genistein and daidzein and their effects on ERa- and ERb-mRNA and protein expression. *Anticancer Res* 2005;25:1713–8
- Sutrisno, S., Mastryagung, D., Khairiyah, R., Tridiyawati, F., Dewi, N., Hidayati, D., Noorhamdani, N., Santoso, S. 2014. The effects of genistein on estrogen receptor expression, cell proliferation and apoptosis in

- endometriosis cell culture. *Journal of Experimentasl and Integrative Medicine*.4 (3): 1-6.
- Sutrisno, Soehartono dan Arsana Wiyasa. 2010, Efek Genistein terhadap Ekspresi eNOS, BCL2 dan Apoptosis pada kultur sel endotel umbilikus (HUVECs) yang mengalami stres oksidatif. Laboratorium Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya
- Sutrisno, S. Genistein modulates the estrogen receptor and suppresses angiogenesis and inflammation in the murine model of peritoneal endometriosis', *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. Elsevier Ltd, 8(2), pp. 278–281. doi: 10.1016/j.jtcme.2017.
- Syamsudin dan Darmono. 2011. *Buku Ajar Farmakologi Eksperimental.* Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Taylor, R., dan Lebovic, D.I. 2014. Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology : Physiology, Pathofphisiology and Clinical Management : Endometriosis. p. 565-585.
- Tesone, M., Bilotas, M., Barañao, R.I., Meresman, G., 2008. The Role of Gnrh Analogues in Endometriosis-Associated Apoptosis and Angiogenesis. *Gynecol Obstet Invest.* **66** (1): 10-18.
- Utari, D.M. 2011. Efek Intervensi Tempe Terhadap Profil Lipid, Superperoksida Dismutase, LDL Teroksidasi dan Malondialdehyde Pada Wanita Menopause. IPB: Bogor.
- Venes, D., dan Thomas, C.L. 2009. Possible Sites of Endometriosis . *The Wall Street Journal*. 21:768-772.
- Wang D, Liu Y, Han J, Zai D, Ji M. 2011. Puerarin Suppresses Invasion and Vascularization of Endometriosis Tissue Stimulated by 17b-Estradiol. *PloS ONE* 6(9).
- Watanabe, A., Taniguchi, F., Izawa, M., Suou, K., Uegaki, T., Takai, E., Terakawa, N., Harada, T. 2009. The Role of Survivin In The Resistance of Endometriotic Stromal Cells to Drug-Induced Apoptosis. *Human Reproduction*. 24 (12): 3172-3179.
- Winarsi, H. 2005. *Isoflavon. Berbagai Sumber, Sifat dan Manfaatnya Pada Penyakit Degeneratif.* Gadjah Mada University Press: Yogyakarta
- Wiyasa, I.W.A., Norahmawati, E., Soehartono. 2008. Pengaruh Isoflavon Genistein dan Daidzein Ekstrak Tokbi (Pueraria Lobata) strain Kangean Terhadap Jumlah Osteoblas dan Osteoklas Rattus Novergivus Wistar Hipoestrogenik. Universitas Airlangga – Surabaya. *Majalah Obstetri dan Ginekologi*. 32 (3): 148-152
- Yavuz, E., Oktem, M., Esinler, I., Toru, S. Genistein causes regression of endometriotic implants in the rat model. Fertility and Sterility Vol. 88, No. Suppl 2, October 2007

RAWIJAYA

Yuliawati, D., Mintaroem, K. and Sutrisno, S. nhibitory effect of genistein on MMP-2 and MMP-9 expression through suppressing NF-kB activity in peritoneum of murine model of endometriosis', *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 7(6), p. 261. 2018.doi: 10.4103/2305-0500.246344.

