

Laporan Penelitian

Perbandingan Ekspresi Reseptor Estrogen β dengan Penambahan Berbagai Dosis Genistein pada Sel Endotel HUVEC yang Mengalami Stres Oksidatif
(*Comparison of Estrogen β Receptor Expression and the Addition of Various Dose of Geistein to HUVEC Endothel Cell which Exposed to Oxidative Stress*)

Vera Handayani, Tatit Nurseta, Sutrisno

Departemen Obstetri dan Ginekologi
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/
Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar
Malang

Abstrak

Tujuan: Membandingkan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC antara penambahan berbagai dosis Genistein dengan 17β estradiol dosis fisiologis.

Metode: Suatu studi eksperimental yang dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dengan menggunakan kultur HUVEC yang dipapar dengan glukosa sebagai model endotel yang mengalami stres oksidatif. Endotel diambil dari umbilikus bayi perempuan baru lahir, dilakukan kultur hingga konfluen. Kultur tersebut dibagi 7 kelompok, yaitu (1) HUVEC tanpa perlakuan, (2) HUVEC + Glukosa 33 mM, (3) HUVEC + Glukosa 33 mM + 17β estradiol, (4) HUVEC + Glukosa 33 mM + Genistein 2,5 μ m, (5) HUVEC + Glukosa 33 mM + Genistein 5 μ m, (6) HUVEC + Glukosa 33 mM + Genistein 7,5 μ m, (7) HUVEC + Glukosa 33 mM + Genistein 10 μ m. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C lalu dilakukan pengecatan imunositokimia menggunakan antibodi primer reseptor estrogen β . Ekspresinya diamati pada menit ke-15, 30, 60, 120 dan 240. Data hasil pengamatan dianalisis dengan uji ANOVA dan uji korelasi.

Hasil: Perbandingan ekspresi reseptor estrogen β antara kelompok 1, berbeda signifikan dengan kelompok 2, 3, 6, 7, tetapi tidak berbeda signifikan dengan kelompok 4, 5. Perbandingan ekspresi reseptor estrogen β antara kelompok 2 berbeda signifikan dengan kelompok 4, 5, tetapi tidak berbeda signifikan dengan kelompok 3, 6, 7. Kelompok 3 berbeda signifikan dengan kelompok 4, 5, tetapi tidak berbeda signifikan dengan kelompok 6, 7. Kelompok 4 berbeda signifikan dengan kelompok 6, 7, tetapi tidak berbeda signifikan dengan kelompok 5. Kelompok 5 berbeda signifikan dengan kelompok 6, 7. Kelompok 6 tidak berbeda signifikan dengan kelompok 7. Peningkatan dosis Isoflavon Genistein pada menit ke-30, 60, dan 120 akan menurunkan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC ($p < 0,05$), sedangkan pada pengamatan menit ke-15 dan 240 menunjukkan tidak ada hubungan yang signifikan dengan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC ($p > 0,05$).

Kesimpulan: Terdapat perbedaan ekspresi ER β yang bermakna pada HUVEC yang diinduksi glukosa yang terpapar 17β estradiol dengan yang terpapar Genistein kecuali pada dosis Genistein 7,5 dan 10 μ m. Semakin rendah dosis Isoflavon Genistein pada menit ke-30, 60, dan 120, ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC cenderung lebih tinggi.

[Maj Obstet Ginekol Indones 2010; 34-1:24-30]

Kata kunci: reseptor estrogen β , HUVEC, genistein, estradiol

Abstract

Objective: To compare β estrogen receptor on HUVEC endothelial for each Genistein dose addition with β -estradiol physiologic dose.

Method: Experimental study performed in Physiology Laboratory, Medical Faculty of Brawijaya University Malang, HUVEC culture exposed by glucose as a dysfunction endothelial model. Endothel collected from female newborn umbilicus was cultured to make a confluent culture. The culture was divided into 7 groups: 1. HUVEC without treatment, 2. HUVEC + glucose 33 mM, 3. HUVEC + glucose 33 mM + 17β estradiol, 4. HUVEC + glucose 33 mM + Genistein 2.5 μ m. 5. HUVEC + Glucose 33 mM + Genistein 5 μ m, 6. HUVEC + Glucose 33 mM + Genistein 7.5 μ m, 7. HUVEC + Glucose 33 mM + Genistein 10 μ m. Culture then was incubated in 37°C and stained with immunohistochemistry, using primary antibody of β estrogen receptor. The expression was observed on the -15, 30, 60, 120 and 240th minute. The datas from observation result was analysed with ANOVA test and correlation test.

Result: Estrogen receptor comparison between group 1 was significantly different with group 2, 3, 6, 7 and not significantly different with groups 4, 5. Estrogen receptor between group 2 was significantly different with group 4, 5 but not significantly different with groups 3, 6, 7. Estrogen receptor comparison between group 3 was significantly different with group 4, 5 and not significantly different with groups 6, 7. Estrogen receptor comparison between group 4 was significantly different with group 6, 7 and not significantly different with groups 5. Estrogen receptor comparison between group 5 was significantly different with group 6, 7. Estrogen receptor comparison between group 6 was not significantly different with group 7. Isoflavon Genistein dose increase on 30, 60 dan 120 minutes will reduce β estrogen receptor expression on endothelial HUVEC and on 15 and 240 minutes shows that there was no significant correlation with β estrogen receptor expression on endothel HUVEC.

Conclusion: There was significant expression distinction of ER β in glucose induced HUVEC exposed by 17β estradiol compared with those exposed by Genistein but not in Genistein dose 7.5 and 10 μ m. The lower of Isoflavon Genistein dose in the -30, 60 dan 120 minute will cause expression of β estrogen receptor in HUVEC endothelial cell that tends to be higher.

[Indones J Obstet Gynecol 2010; 34-1:24-30]

Keywords: β estrogen receptor, HUVEC, genistein, estradiol.

Korespondensi: Vera Handayani, Departemen Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar, Malang, Jln. J.A. Suprpto no 2, Malang, Telp: 08191345700. Email: vedobgyn@yahoo.com

PENDAHULUAN

Keadaan menopause menyebabkan perubahan pada metabolisme hormon di antaranya hormon estrogen yang terjadi karena berhentinya aktivitas folikel ova-

rium. Hal ini menyebabkan timbulnya efek jangka panjang seperti penyakit kardiovaskular, penyakit alzheimer's, dan osteoporosis. Semua efek menopause di atas menyebabkan produktivitas dan kualitas hidup seorang wanita menurun.^{1,2}

Di antara penyulit-penyulit itu terdapat penyulit jangka panjang yaitu penyakit kardiovaskular dengan angka kematian hampir 3 kali lebih besar daripada kanker payudara. Sebagian besar dari penyakit kardiovaskular adalah aterosklerosis dengan faktor risiko yang sama seperti pada pria. Dari data tahun 1998 didapatkan angka kematian wanita usia lebih dari 50 tahun akibat penyakit jantung koroner adalah 100/100000 dan jumlahnya meningkat 8 kali lipat pada usia 70 tahun. Sementara itu, angka kematian akibat stroke pada umur lebih dari 50 tahun sebesar 50/100000 meningkat 4 kali lipat pada usia 70 tahun. Oleh karena itu, perlu dipikirkan penanganan efek samping berkurangnya estrogen dalam darah, seperti pemberian terapi hormon pengganti yang bertujuan mengembalikan fungsi estrogen dalam tubuh untuk mencegah atau meminimalkan gejala-gejala tersebut di atas.^{1,2}

Efektivitas pemberian hormon estrogen dalam mencegah penyakit kardiovaskular telah menjadi pertanyaan seiring dengan munculnya efek negatif dari intervensi estrogen/progestin. Pada penelitian terbaru WHI tahun 2002 hasil yang didapat adalah data meningkatnya risiko kanker payudara invasif selama observasi penelitian. Oleh karena itu, demi keselamatan sampel penelitian, direkomendasikan untuk menghentikan percobaan. Risiko stroke, tromboemboli vena, dan infark miokardium juga meningkat pada wanita yang menerima terapi sulih hormon pada penelitian ini.^{1,3,4}

Studi epidemiologi menunjukkan bahwa tingkat mortalitas dan morbiditas dari penyakit jantung koroner (PJK) di negara - negara benua Asia lebih rendah daripada negara-negara Barat. Bukti terbaru dari penelitian Lissin dkk tahun 2004 menunjukkan bahwa kemungkinan kedelai, yang mengandung isoflavon (salah satu bentuk biokimia dari Fitoestrogen), merupakan salah satu komponen diet orang Asia yang mampu menurunkan angka PJK. Warga di benua Asia rata-rata mengonsumsi Isoflavon 30-40 mg/hari, sedangkan di negara Barat konsumsi Isoflavon rata-rata kurang dari 1 mg/hari. Senyawa isoflavon dapat berupa Diadzein, Glisitein dan Genistein, di mana yang terbanyak ditemukan pada kedelai adalah Genistein, yang telah diteliti memberi banyak keuntungan pada keadaan menopause.^{5,6,7}

Di dalam tubuh Genistein, yang mempunyai struktur mirip estrogen, memiliki jalur mekanisme serupa dengan estrogen. Untuk menimbulkan respons biologis Genistein berikatan dengan reseptor estrogen alfa dan β . Genistein mempunyai afinitas yang lebih besar terhadap reseptor estrogen β dibandingkan reseptor estrogen α . Er β adalah reseptor estrogen yang lazim terdapat pada sistem kardiovaskular. Genistein melalui reseptor estrogen mempengaruhi bioavailabilitas endotel membentuk *nitric oxide* yang menyebabkan relaksasi sel otot polos pembuluh darah.^{6,7}

Sel endotel berperan baik dalam proses fisiologis maupun patofisiologis termasuk hemostasis, inflamasi, dan angiogenesis. Pada beberapa penelitian tentang peran endotel ini digunakan *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) yang merupakan suatu media di mana sel-sel ditanam dalam cairan fenol untuk menumbuhkan sel endotel dalam kondisi bebas kuman (steril). Media ini menyediakan pengunaan yang luas dalam model *in vitro* untuk mem-

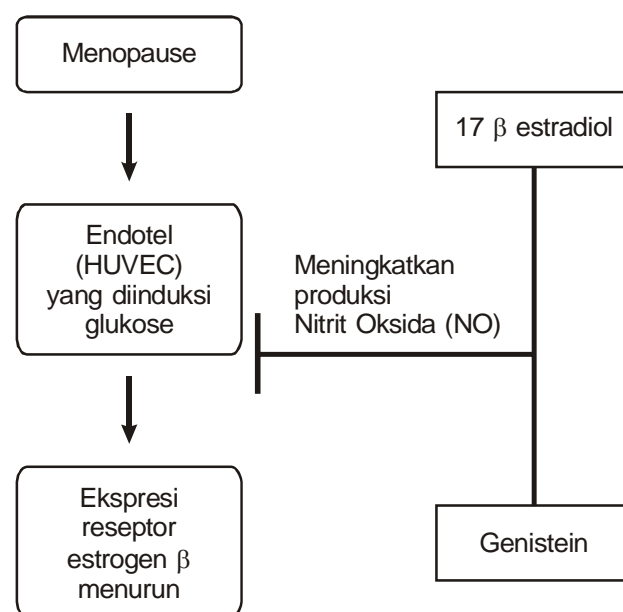
pelajari efek hormon jadi seks sintetis ataupun alami pada sel endotel.^{8,9}

METODE

Penelitian ini dilaksanakan secara eksperimental antara kelompok kontrol dan kelompok intervensi. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2009. Penelitian ini menggunakan endotel yang berasal dari umbilikus bayi perempuan yang baru lahir dengan operasi sesar, ibu sehat tidak menderita sakit apa pun dengan HB \geq 10, dengan kehamilan normal. Banyaknya sampel yang diperlukan 1 umbilikus yang direplikasi menjadi 140 *slide* yang menggambarkan ekspresi reseptor estrogen β .

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel kultur HUVEC baik yang mendapat perlakuan ataupun yang tidak mendapat perlakuan, kultur HUVEC yang mendapat pemberian 17 β estradiol 10nm, dan kultur HUVEC yang mendapat pemberian genistein murni dengan dosis 2,5 μ m, 5 μ m, 7,5 μ m, 10 μ m di mana pada masing-masing sumur dilakukan pengulangan sampai dengan 4 kali, dilakukan pengamatan pada menit ke-15, menit ke 30, menit ke 60, menit ke 120, dan menit ke 240. Kemudian dilakukan pengecatan dengan antibodi primer reseptor estrogen β . Dilakukan penghitungan dari 100 sel endotel, berapa jumlah sel endotel yang mengekspresikan reseptor estrogen β .

Pada penelitian ini variabel independen adalah dosis Genistein, dosis estrogen, waktu penelitian, sedangkan variabel dependen adalah ekspresi reseptor estrogen β sel endotel HUVEC.



Gambar 1. Kerangka konseptual

Hasil penelitian ditabulasi dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik serta dilakukan analisis secara statistik menggunakan program SPSS for window 13,

dihitung menggunakan uji ANOVA satu arah, uji Tukey, serta uji korelasi dan regresi. Probabilitas dianggap bermakna secara statistik apabila didapatkan nilai $p < 0,05$ dengan selang kepercayaan 95%.

Penilaian dan gradasi positif pulasan dinilai secara semikuantitatif dengan mikroskop cahaya 10x LPB (40x10), kemudian endotel yang mengekspresikan reseptor estrogen β yang ditandai dengan visualisasi warna coklat dihitung tiap 100 sel endotel.

HASIL

Penelitian ini menggunakan kultur endotel HUVEC setelah melalui tahapan-tahapan kultur endotel. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan ekspresi reseptor estrogen β pada kultur sel endotel HUVEC yang dipapar dengan 17 β estradiol dan berbagai dosis Genistein mulai dari dosis 2,5 μm , 5 μm , 7,5 μm , 10 μm . Pemeriksaan ekspresi reseptor estrogen β dilakukan dengan menggunakan antibodi reseptor estrogen β setelah melekat pada *attachment site* dan saling bersentuhan atau berhubungan antarsel. Jarak antara sel yang teratur dan semakin rapat, permukaan sel rata ditandai dengan penampakan inti, membran plasma, sitoplasma serta matriks ekstraseluler, dengan ukuran sel yang lebih besar. Setelah itu, dilakukan pewarnaan dengan antibodi reseptor estrogen β yang memberi warna coklat pada sitoplasma ataupun inti sel.

Warna coklat merupakan visualisasi dari kromogen dab (diaminobenzidine). Kompleks antibodi-antigen reseptor estrogen β akan dikenali oleh antibodi yang berlabel biotin. Biotin pada antibodi sekunder berikatan dengan *strep avidin harse rads perixidasr* (sahrp) yang akan memvisualisasikan warna coklat. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x, dihitung dari 100 sel endotel berapa sel yang mengekspresikan reseptor estrogen β dan berapa sel yang tidak mengekspresikan reseptor estrogen β . Efek akibat perbedaan pemberian berbagai dosis Isoflavon Genistein dan 17 β estradiol HUVEC dilakukan dengan analisis ragam satu arah (*one-way ANOVA*).

Terdapat perbedaan ekspresi reseptor estrogen β antara setiap waktu pengamatan pada kelompok I, kelompok III, kelompok IV, kelompok VI dan kelompok VII. Sementara itu, pada perlakuan dengan kelompok II dan kelompok V tidak menunjukkan adanya perbedaan ekspresi reseptor β antara setiap waktu pengamatan.

Hasil analisis ragam pada Tabel 1, menunjukkan nilai signifikansi untuk penambahan Isoflavon Genistein pada setiap waktu pengamatan masing-masing sebesar 0,000 dan lebih kecil dari β 0,05 ($p < 0,05$), sehingga *Ho* ditolak. Dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan efek pada setiap dosis penambahan Isoflavon Genistein dengan 17 β estradiol (kondisi fisiologi) pada tiap waktu pengamatan terhadap ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC.

Untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh penambahan Isoflavon Genistein dengan 17 β estradiol (kondisi fisiologi) dalam berbagai dosis pada tiap waktu pengamatan terhadap ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC tersebut, dapat dilihat dari hasil uji Tukey (*Tukey's Test*) sebagai berikut :

Perbandingan ekspresi reseptor estrogen β pada menit ke-15 antara sel endotel HUVEC pada kelompok I, kelompok IV, V, VII berbeda signifikan dengan kelompok II, III, VI ($p < 0,05$), tetapi antara kelompok I, IV, VII dan kelompok V tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$). Untuk perbandingan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC pada kelompok II, III, VI berbeda signifikan dengan kelompok I, IV, V, VII ($p < 0,05$), tetapi antara kelompok II, III dan VI tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$).

Perbandingan ekspresi reseptor estrogen β pada menit ke-30 antara sel endotel HUVEC pada kelompok I, IV, V berbeda signifikan dengan kelompok II, III, VI ($p < 0,05$), tetapi antara kelompok I dengan IV, V tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$). Untuk perbandingan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC pada kelompok II, III, VI berbeda signifikan dengan kelompok I, IV, V ($p < 0,05$), tetapi antara kelompok II, III, dan VI tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$).

Perbandingan ekspresi reseptor estrogen β pada menit ke-60 antara sel endotel HUVEC pada kelom-

Tabel 1. Hasil Uji perbedaan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC pada setiap penambahan Isoflavon Genistein dengan 17 β estradiol (kondisi fisiologi) dengan variasi dosis pada setiap waktu pengamatan

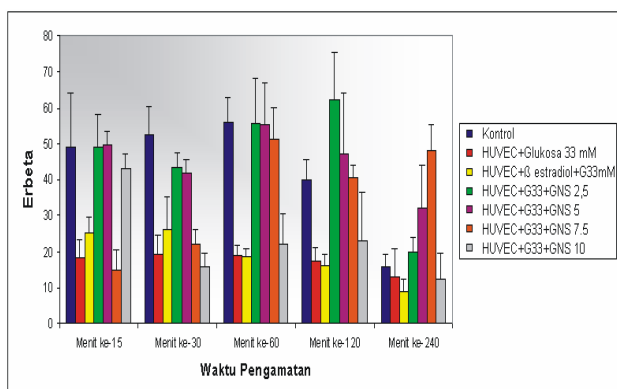
Waktu pengamatan	Rerata ekspresi ER β berdasarkan tiap perlakuan							Nilai F dan p value hasil uji ANOVA
	Kontrol	HUVEC+ Glukosa 33 mM	HUVEC+ β estradiol+ G 33 mM	HUVEC+ G 33+ GNS 2,5	HUVEC+ G 33+ GNS 5	HUVEC+ G 33+ GNS 7,5	HUVEC+ G 33+ GNS 10	
15 menit	49 \pm 15,0 ^b	18,25 \pm 5,4 ^a	25 \pm 4,8 ^a	49 \pm 9,2 ^b	49,5 \pm 4,1 ^b	15 \pm 5,5 ^a	43 \pm 4,3 ^b	F=15,756 dan p=0,000
30 menit	52,5 \pm 7,9 ^b	19,25 \pm 5,3 ^a	26 \pm 9,4 ^a	43,25 \pm 4,4 ^b	42 \pm 3,5 ^b	22 \pm 4,1 ^a	16 \pm 3,4 ^a	F=23,449 dan p=0,000
60 menit	55,75 \pm 7,0 ^b	9 \pm 2,9 ^a	18,5 \pm 2,4 ^a	55,5 \pm 12,7 ^b	55,25 \pm 11,5 ^b	51,25 \pm 9,0 ^b	22 \pm 8,3 ^a	F=19,046 dan p=0,000
120 menit	40 \pm 5,7 ^{bc}	17,5 \pm 3,7 ^{ab}	16,25 \pm 3,0 ^a	62 \pm 13,4 ^c	47,25 \pm 17,0 ^c	40,5 \pm 3,3 ^{bc}	23 \pm 13,2 ^{ab}	F=11,390 dan p=0,000
240 menit	16 \pm 3,3 ^{ab}	12,75 \pm 8,0 ^a	9 \pm 3,4 ^a	20 \pm 3,7 ^{ab}	32 \pm 11,8 ^b	48,25 \pm 7,0 ^c	12,25 \pm 7,3 ^a	F=16,083 dan p=0,000

Keterangan: Adanya perbedaan dinotasikan dengan huruf. Adanya perbedaan huruf antarklasifikasi pada masing-masing dosis, berarti ada perbedaan ekspresi reseptor estrogen β pada dosis tersebut dengan dosis yang lain

pok I, V, VII berbeda signifikan dengan kelompok II, III, VII ($p < 0,05$), tetapi antara kelompok I, IV, VII dan kelompok V tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$). Untuk perbandingan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC pada kelompok III, VII dan II berbeda signifikan dengan kelompok I, IV, VI, dan V ($p < 0,05$), tetapi antara kelompok III, VII dan kelompok II tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$).

Perbandingan ekspresi reseptor estrogen β pada menit ke-120 antara sel endotel HUVEC pada kelompok III berbeda signifikan dengan kelompok I, kelompok V, VI dan IV ($p < 0,05$), tetapi tidak berbeda signifikan dengan kelompok II dan VII ($p > 0,05$). Untuk perbandingan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC pada kelompok II dan VII berbeda signifikan dengan kelompok IV dan V ($p < 0,05$), tetapi tidak berbeda signifikan dengan perlakuan kelompok I, VII ($p > 0,05$). Untuk perbandingan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC pada kelompok I dan kelompok VI berbeda signifikan dengan kelompok III ($p < 0,05$), tetapi tidak berbeda signifikan dengan kelompok I, II, IV, VI, VII dan kelompok V ($p > 0,05$). Untuk perbandingan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC pada kelompok IV, V berbeda signifikan dengan kelompok III ($p < 0,05$), tetapi tidak berbeda signifikan dengan kelompok I, kelompok VI, VII dan II ($p > 0,05$).

Perbandingan ekspresi reseptor estrogen β pada menit ke-240 antara sel endotel HUVEC pada kelompok II, III, VII berbeda signifikan dengan kelompok V dan VI ($p < 0,05$), tetapi tidak berbeda signifikan dengan kelompok IV dan kelompok I ($p > 0,05$). Untuk perbandingan ekspresi reseptor estrogen β pada kelompok I dan IV berbeda signifikan dengan kelompok VI ($p < 0,05$), tetapi tidak berbeda signifikan dengan kelompok II, V, VII dan kelompok ($p > 0,05$). Untuk perbandingan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC pada kelompok V berbeda signifikan dengan kelompok III, VI, VII dan kelompok II ($p < 0,05$), tetapi tidak berbeda signifikan dengan kelompok I dan kelompok IV ($p > 0,05$). Kemudian untuk perbandingan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC pada kelompok VI berbeda signifikan dengan kelompok I, III, IV, VII dan kelompok V ($p < 0,05$).



Gambar 2. Plot Respons (*main effect*) pengaruh penambahan Isoflavon Genistein dengan 17 β estradiol (kondisi fisiologi) dalam berbagai dosis dan waktu pengamatan terhadap ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC.

Plot respons dari pengaruh penambahan Isoflavon Genistein dengan 17 β estradiol (kondisi fisiologi) dalam berbagai dosis dan waktu pengamatan terhadap ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC, dapat ditunjukkan pada Gambar 2.

17 β estradiol (kondisi fisiologi) dalam berbagai dosis dan waktu pengamatan terhadap ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC, di mana semakin tinggi dosis Isoflavon Genistein yang diberikan maka ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC akan semakin rendah.

Untuk mengetahui besarnya hubungan antara penambahan Isoflavon Genistein dengan 17 β estradiol (kondisi fisiologi) dalam berbagai dosis pada setiap waktu pengamatan terhadap ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC, maka digunakan uji korelasi. Adapun hasil uji regresi dan persamaan regresi berdasarkan penambahan Isoflavon Genistein dengan 17 β estradiol (kondisi fisiologi) dalam berbagai dosis pada setiap waktu pengamatan adalah sebagai berikut.

Tabel 2. Uji Korelasi variasi dosis Isoflavon Genistein terhadap ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC.

Waktu pengamatan	Persamaan regresi linier	P	R	R-square
15 menit	Y= 52,25-2,1 X	0,137	-0,388	15,1%
30 menit	Y= 56,25-4,07X	0,000	-0,913	83,3%
60 menit	Y=72,125-4,18X	0,003	-0,701	49,1%
120 menit	Y=74,125-4,95X	0,000	-0,774	60 %
240 menit	Y=29,875-0,28X	0,850	-0,051	0,3%

Keterangan: Y = ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC
X = dosis Isoflavon Genistein

Berdasarkan hasil analisis pada Tabel 2 di atas dapat diketahui bahwa hanya dosis Isoflavon Genistein pada menit ke-30 ($r = -0,913$, $p = 0,000$), menit ke-60 ($r = -0,701$, $p = 0,003$), dan menit ke-120 ($r = -0,774$, $p = 0,000$) yang mempunyai hubungan (korelasi) yang signifikan ($p < 0,05$, Ho ditolak) dengan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC, dengan arah korelasi yang negatif (karena koefisien korelasi bernilai negatif). Artinya peningkatan dosis Isoflavon Genistein pada menit ke-30, 60 dan 120 akan menurunkan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC. Demikian pula sebaliknya, semakin rendah dosis Isoflavon Genistein pada menit ke-30, 60, dan 120 justru akan menyebabkan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC cenderung lebih tinggi. Sementara itu, pada pengamatan menit ke-15 dan 240 menunjukkan tidak ada hubungan yang signifikan dengan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC ($p > 0,05$).

Seberapa besar pengaruh variasi dosis Isoflavon Genistein pada setiap waktu pengamatan terhadap ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC, dapat diketahui dengan menggunakan analisis bentuk hubungan (regresi), karena dari uji korelasi belum bisa menjelaskan hal tersebut.

Hasil pengujian dengan menggunakan analisis regresi linier menunjukkan bahwa pada menit 30, 60 dan 120 terdapat pengaruh yang signifikan ($p < 0,05$,

Ho ditolak) dari dosis Isoflavon Genistein terhadap ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC. Sementara itu, pada pengamatan menit ke-15 dan 240 tidak menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan dengan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC ($p > 0,05$).

Hasil uji regresi juga menunjukkan nilai koefisien determinasi ($R \text{ Square} = r^2$) yang menyatakan besarnya pengaruh dari dosis Isoflavon Genistein pada setiap waktu pengamatan terhadap ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC, dalam bentuk persentase, dan persentase sisanya ($1 - R \text{ Square}$) ditentukan oleh faktor lain. Jadi dapat dikatakan bahwa dosis Isoflavon Genistein yang paling berpengaruh terhadap ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC terjadi pada menit ke-30 dengan besar pengaruh mencapai 83,3% ($r \text{ square}$ paling besar di antara waktu pengamatan yang lain). Oleh karena itu, 16,7% keragaman ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC pada menit ke 30 tersebut yang dipengaruhi oleh faktor lain selain dari dosis Isoflavon Genistein, misalnya faktor sediaan yang kurang baik dan pengamat yang berpengalaman. Sementara itu, pada menit ke-15, 60 sd 240 menunjukkan pengaruh yang bervariasi terhadap ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC.

DISKUSI

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, yang membandingkan berbagai dosis Genistein dan estradiol dosis fisiologis dan waktu pengamatan pada ekspresi reseptor estrogen β sel endotel HUVEC yang dibuat mengalami stres oksidatif dengan penambahan glukosa 33 mM. Dilakukan pada kultur sel endotel vena tali pusat (HUVEC) diperoleh dari vena umbilikus tali pusat bayi manusia yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kemudian dibagi dalam tujuh kelompok perlakuan dan dilakukan replikasi sebanyak 4 kali kemudian diwarnai dengan antibodi reseptor estrogen β dan dilakukan penghitungan jumlah sel yang mengekspresikan reseptor estrogen β .

Reaksi yang spesifik jaringan terhadap estrogen disebabkan adanya reseptor protein intraselular. Reseptor estrogen secara primer mengakibatkan transkripsi gen, tetapi juga meregulasi kejadian pascatranskripsi dan efek non-genomik. Reseptor estrogen meregulasi transkripsi gen melewati mekanisme yang multipel, yang tidak semuanya berinteraksi langsung dengan DNA.¹

Estrogen meningkatkan respons jaringan target pada estrogen dan hormon steroid lainnya lewat pengaruh konsentrasi reseptor dengan cara meningkatkan konsentrasi reseptor estrogen yang juga akan meningkatkan konsentrasi reseptor progesteron dan androgen. Pembentukan reseptor estrogen melibatkan degradasi yang cepat dari reseptor yang tidak berikatan dengan estrogen dan degradasi yang lebih lambat dari reseptor yang berikatan dengan estrogen setelah transkripsi gen. Adanya estrogen merupakan faktor penting untuk respons yang berkelanjutan.¹

Isoflavon yang banyak diteliti berkaitan dengan aktivitas estrogenitasnya adalah Genistein (4,5,7-trihidroksi isoflavon) yang merupakan suatu senyawa nonsteroid yang mempunyai aktivitas estrogenik atau

dimetabolisme menjadi senyawa dengan aktivitas estrogen. Untuk memproduksi komponen aktifnya (*aglycones*) Genistein memerlukan peran bakteri usus. Variasi individu dalam mikroflora saluran gastrointestinal, dan kemampuan absorpsi, mempengaruhi bioavailabilitas Genistein.¹

Genistein memiliki aktivitas estrogenik atau anti-estrogenik tergantung pada jaringan target. Variasi dalam aktivitasnya juga disebabkan fakta bahwa Genistein memiliki afinitas yang lebih besar pada reseptor estrogen β dibandingkan reseptor estrogen α , meskipun afinitas pada reseptor estrogen β hanya 35% dari estradiol.^{1,10}

Penelitian ini lebih ditekankan pada pengaruh Genistein dengan berbagai dosis pemberian mulai dari dosis kecil (2,5 μM), sedang (5 μM) tinggi (7,5 μM), dan sangat tinggi (10 μM) terhadap ekspresi reseptor estrogen β pada kultur HUVEC yang selnya mengalami stres oksidatif. Dari Gambar 2 dapat dijelaskan bahwa pemberian dosis Genistein 2,5 μM akan meningkatkan ekspresi reseptor estrogen β sebesar 62%, dosis 5 μM akan meningkatkan ekspresi reseptor estrogen β 61%, dosis 7,5 μM akan meningkatkan ekspresi reseptor estrogen β sebesar 51%, sedangkan dosis 10 μM sebesar 25%, pada pemberian 17 β estradiol ekspresi reseptor estrogen meningkat sebesar 8,4% dibandingkan dengan HUVEC+Glukosa 33 mM.

Dari data di atas terlihat bahwa dosis Genistein yang memberi peningkatan ekspresi reseptor estrogen β tertinggi terdapat pada kelompok dengan pemberian Genistein dosis 2,5 μM (sekitar 7,3 kali lebih tinggi daripada 17 β estradiol), yang tidak berbeda jauh dengan Genistein dengan dosis 5 μM . Hasil analisis dengan ANOVA menunjukkan adanya peningkatan ekspresi reseptor estrogen β yang bermakna dengan penambahan Genistein pada HUVEC yang mengalami stres oksidatif ($p \text{ value} < 0,05$). Pengaruh yang bermakna dari Genistein ditunjukkan hasil analisis pada Tabel 2, mempunyai hubungan korelasi yang signifikan ($p < 0,05$) dengan ekspresi reseptor estrogen β pada kultur sel endotel HUVEC. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Cvorovic et al, 2006 yang menyatakan bahwa dengan ekstrak herbal/Genistein memberi efek represi pada gen inflamasi yang merupakan mekanisme penting pada penyakit jantung koroner lebih tinggi 20 kali lipat lewat ekspresi reseptor estrogen β daripada lewat reseptor estrogen α .¹¹

Berdasarkan hasil analisis pada Tabel 2 di atas dapat diketahui bahwa hanya dosis Isoflavon Genistein pada menit ke-30 ($r = -0,913$, $p = 0,000$), menit ke-60 ($r = -0,701$, $p = 0,003$), dan menit ke-120 ($r = -0,774$, $p = 0,000$) yang mempunyai hubungan (korelasi) yang signifikan ($p < 0,05$, Ho ditolak) dengan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC, dengan arah korelasi yang negatif. Artinya peningkatan dosis Isoflavon Genistein pada menit ke-30, 60, dan 120 akan menurunkan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC. Demikian pula sebaliknya, semakin rendah dosis Isoflavon Genistein pada menit ke-30, 60, dan 120 justru akan menyebabkan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC cenderung lebih tinggi. Sementara itu, pada pengamatan menit ke-15 dan 240 menunjukkan tidak ada hubungan yang signifikan dengan ekspresi reseptor

estrogen β pada sel endotel HUVEC ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa kerja Genistein pada sel endotel tidak hanya bergantung pada reseptor estrogen β . Ada mekanisme lain di mana Genistein bekerja pada sel endotel seperti lewat jalur tirosin kinase. Ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Hongwei Si, Dongmin Liu, 2007 yang menyatakan bahwa dari penelitian menggunakan HAEC dan HUVEC, efek Genistein pada endotel tidak hanya dimediasi oleh aktivasi sinyal estrogen (dalam hal ini reseptor estrogen) atau inhibisi Tirosin Kinase.¹²

Hasil pengujian dengan menggunakan analisis regresi linier menunjukkan bahwa pada menit 30, 60, dan 120 terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) dari dosis Isoflavon Genistein terhadap ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC. Sementara itu, pada pengamatan menit ke-15 dan 240 tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC ($p > 0,05$). Dapat dikatakan bahwa Isoflavon Genistein yang paling tinggi meningkatkan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC terjadi pada menit ke-30 dengan besar perbedaan mencapai 83,3% (*r square* paling besar di antara waktu pengamatan yang lain). Oleh karena itu, 16,7% keragaman ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC pada menit ke-30 tersebut dipengaruhi oleh faktor lain selain dari dosis Isoflavon Genistein, karena sel endotel meskipun berasal dari induk yang sama, tetapi merupakan hasil kultur baru. Kultur pada 15 menit telah dipanen dahulu, kemudian dibuat kultur yang baru untuk 30, 60, 120, dan 240 menit sehingga faktor-faktor seperti suhu, kelembaban, dan perlakuan turut berperan. Sementara itu, pada menit ke-15, 60 sampai dengan 240 menunjukkan pengaruh yang bervariasi terhadap ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC. Ini menunjukkan bahwa pengaruh Genistein pada ekspresi reseptor estrogen β tidak hanya tergantung pada reaksi genomik ataupun non genomik.

Mekanisme kerja Genistein dapat melalui jalur genomik dan non genomik. Mekanisme kerja non genomik membutuhkan waktu kurang dari 20 menit, dan mekanisme genomik biasanya membutuhkan waktu yang lebih lama (lebih 30 menit sampai beberapa hari) (Dongmin, 2005). Pada penelitian ini ekspresi reseptor estrogen β sudah timbul pada waktu paparan 15 menit, 30 menit, 60 menit, 120 menit sampai dengan 240 menit. Akan tetapi, jalur genomik (ditunjukkan dengan ekspresi maksimal pada menit ke 30) memberikan ekspresi tertinggi di mana jalur genomik merupakan jalur utama untuk mekanisme kerja hormon estrogen. Hal ini sesuai dengan teori mekanisme kerja estrogen yang menyatakan bahwa hampir 2/3 kerja hormon estrogen melewati jalur reseptornya secara genomik.^{1,13}

Dari penelitian WHI yang menghentikan penelitian terapi sulih hormon karena efek samping estrogen yang membahayakan, maka penelitian ini diharapkan dapat menjadi landasan awal penelitian lebih lanjut untuk penggunaan preparat Genistein sebagai pengganti estrogen. Dari penelitian ini tampak bahwa Genistein memberikan ekspresi reseptor estrogen β yang lebih tinggi daripada 17β estradiol, sehingga diharapkan Genistein akan menggantikan fungsi estrogen pada endotel pembuluh darah yang akan memicu

ekspresi gen dengan hasil efek vaskuler yang luas. Efek itu termasuk pengaturan tonus vasomotor dan respons terhadap jejas yang memberi perlindungan terhadap pembentukan aterosklerosis dan penyakit iskemik. Efek positif Genistein ini sangat mungkin menjadi solusi terhadap meningkatnya insiden penyakit kardiovaskular dan aterosklerosis lain pada perempuan menopause.

Kelemahan penelitian ini adalah bahwa kultur HUVEC yang diinduksi glukosa tidak sama persis dengan kondisi endotel menopause, dan pemaparan Genistein yang berbarengan dengan pemaparan glukosa menunjukkan penelitian ini bertujuan lebih ke arah profilaksis sebelum terjadinya menopause secara klinis. Sementara itu, kesulitan teknis yang terjadi adalah sulitnya mendapatkan bahan reagen yaitu Genistein murni dan bahan untuk pengecatan, yang harus dipesan di Jepang dan Amerika sehingga diperlukan waktu yang lama yakni sekitar 4 bulan. Selain itu, kendala teknis berupa seringnya aliran listrik terputus yang menyebabkan perlu berulang kali membuat kultur baru, yang memakan waktu 3,5 bulan. Selain itu, waktu pengambilan umbilikus sampai dilakukan kultur tidak boleh lebih dari 3 jam, sedangkan tidak selalu umbilikus tersedia dan memenuhi kriteria penelitian pada waktu dilakukan seksio sesarea elektif.

KESIMPULAN

Perbandingan ekspresi reseptor estrogen β pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian dosis Genistein dan 17β estradiol akan meningkatkan ekspresi reseptor estrogen β dibandingkan dengan perlakuan HUVEC+Glukosa 33 mM.

SARAN

Dalam penelitian ini dibuktikan bahwa Genistein menyebabkan peningkatan ekspresi reseptor estrogen β pada sel endotel HUVEC yang telah diinduksi glukosa. Peningkatan ini terjadi pada dosis dan waktu tertentu. Diharapkan dari penelitian ini dapat dilakukan penelitian secara klinis dalam pemakaian terapi sulih hormon yang lebih aman daripada estrogen. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai dosis dan durasi pemakaian yang tepat dan aman mengenai Isoflavon Genistein ini.

RUJUKAN

1. Speroff, Gordon. Handbook for Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility seventh edition: Hormones Biosynthesis, Metabolism, and Mechanism of Action. Williams and Wilkins. Baltimore 2005; 24-34
2. American Nurses Foundation. An overview and short-term benefits of hormone replacement therapy. ANA continuing education menopause health educators. The New England Journal of Medicine 2008; 356(8): 1234-41
3. Kaufman G, Castleman L, Zacur HA. Menopause and hormone replacement therapy. In: The Johns Hopkins manual of gynecology and obstetry. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia 2000; 200:305-7
4. Mosca L, Collin P, David M. Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: A statement for health care professionals from the American Heart Association. AHA journal 2001; 104:499-503

5. Ling M, Ho FM, Yang RS. High glucosa induces human endothelial cell apoptosis through a phosphoinositide 3-kinase-regulated cyclooxygenase-2 pathway. *AHA journal* 2005; 25:239-45
6. Wendi L, Rimbach G, William MC. Isoflavons and endothelial function. *Nutrition Research review* 2005; 18:130-44
7. Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptor α and β . *Biol Pharm Bull* 2001; 24:351-6
8. Toth B, Saadat G, Geller A. Human umbilical vascular endothelial cells express estrogen receptor β and progesterone receptor A but not ER α and PR-B. *Journal of histochem Cell Biol* 2008; 130: 399-405
9. Teresa Caulin-Glaser. 17 β -Estradiol Regulation of Human Endothelial Cell Basal Nitric Oxide Release, Independent of Cytosolic Ca²⁺ Mobilization. *Circulation Research*. American Heart Association 1997; H:885-92
10. De Klein MJ. Dietary intake of phytoestrogens is associated with a favourable metabolic cardiovascular risk profile in post menopausal US woman. The Framingham study. *J Nutr* 2002; 132(2): 276-82
11. Cvoro A, Sreenivasan P, Jones J, et al. Selective activation of Estrogen receptor β transcriptional pathway by an herbal extract. *Endocrinology society, California*, 2006. 10.1210/2006-0803
12. Hongwei S, Dongmin L. Phytochemical Genistein in the regulation of vascular function new insight. *Current medicinal chemistry* 2007; 14(24): 258
13. Matthews J, Gustafson JA. Estrogen signaling: A subtle balance between ER α and ER β . *Review from Department of Biosciences at Novum, Karolinska Institutet, Sweden* 2003; 3: 281-91