

GENISTEIN GLYCINE MAX(KEDELAI)
DAN PERBAIKAN ATROFI VAGINA

PASCAMENOPAUSE

Sanksi Pelanggaran Pasal 113

Undang-Undang No. 28 Tahun 2014 Tentang Hak Cipta

1. Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp 100.000.000 (seratus juta rupiah).
2. Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).
3. Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/atau huruf g untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp 1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).
4. Setiap Orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan, dipidana dengan pidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp 4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah).

GENISTEIN GLYCINE MAX(KEDELAI)
DAN PERBAIKAN ATROFI VAGINA

PASCAMENOPAUSE

Pribakti Budinurdjaja
I Wayan Arsana Wiyasa
Ika Kustiyah Oktavianti
Djangan Sargowo



2020

**GENISTEIN GLYCINE MAX(KEDELAI) DAN PERBAIKAN
ATROFI VAGINA PASCAMENOPAUSE**

Penulis:

Pribakti Budinurdjaja
I Wayan Arsana Wiyasa
Ika Kustiyah Oktaviyanti
Djangan Sargowo

ISBN:

Perancang Sampul:

Tim UB Press

Penata Letak:

Tim UB Press

Pracetak dan Produksi:

Tim UB Press

Penerbit:

UB Press



Redaksi:

Jl. Veteran 10-11 Malang 65145 Indonesia
Gedung INBIS Lt.3
Telp: 0341-5081255, WA: 08113653899
e-mail: ubpress@gmail.com/ubpress@ub.ac.id
<http://www.ubpress.ub.ac.id>

Cetakan Pertama, Juni 2020
i-xiii + 137 hlm, 15.5 cm x 23.5 cm

Hak Cipta dilindungi Undang-undang
All Rights Reserved

Dilarang keras memfotokopi atau memperbanyak sebagian atau seluruh buku ini
tanpa seizin tertulis dari penerbit

PRAKATA

Puji syukur dihaturkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga buku ini dapat diselesaikan dengan judul "Genistein Glycine Max (Kedelai) dan Perbaikan Atrofi Vagina Pasca Menopause". Tujuan penulisan buku ini untuk memberikan wawasan kepada pembaca tentang manfaat Genistein Glycine Max (Kedelai) terhadap perbaikan atrofi vagina pada wanita pasca menopause. Seperti diketahui pada pasca menopause akan terjadi penurunan hormon estrogen yang mengakibatkan terjadinya atrofi dinding vagina yang ditandai dengan lapisan epitel tipis, kering, hot flushes, tidak elastis dan mudah iritasi. Genistein Glycine Max merupakan salah satu zat aktif dalam isoflavon kedelai yang mampu melakukan perbaikan atrofi vagina.

Topik-topik yang dikemas dalam buku ini memaparkan bagaimana Genistein Glycine Max yang berasal dari kedelai mampu melakukan perbaikan atrofi vagina pasca menopause dengan cara meningkatkan kadar estradiol dalam darah. Selanjutnya kenaikan estradiol (E2) ini dapat mempertebal lapisan epitel, meningkatkan jumlah sel otot polos vagina, mencegah degradasi kolagen dan elastin. Akhirnya, dalam kelemahan dan kekurangan penulisan pada buku ini, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun.

Banjarmasin & Malang, Juli 2020

Penulis

DAFTAR ISI

PRAKATA.....	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
BAB 2 ATROFI VAGINA PASCAMENOPAUSE.....	7
2.1 Atrofi Vagina.....	7
2.1.1 Anatomi Dinding Vagina.....	7
2.1.2 Prolaps Dinding Vagina	9
2.1.3 Mekanisme Prolaps Dinding Vagina.....	14
BAB 3 HUBUNGAN HORMON ESTROGEN DENGAN KOLAGEN, ELASTIN, DAN FIBROBLAS.....	19
3.1 Hormon Estrogen	19
BAB 4 GENISTEIN GLYCINE MAX (KEDELAI)	31
4.1 Kedelai (<i>Soybean</i>).....	31
4.2 Isoflavon Kedelai	32
BAB 5 EFEK GENISTEIN GLYCINE MAX (KEDELAI) DAN UJI ANALISIS JALUR (<i>PATCH ANALYSIS</i>).....	41
5.1 Ekspresi RE- β	42
5.2 Kadar Estradiol (E2)	48
5.3 Ekspresi Proliferasi Epitel	53
5.4 Ekspresi TGF- β	58
5.5 Kadar MMP-9.....	63
5.6 Ekspresi Fibulin-5	67
5.7 Ekspresi α -Actin.....	73
5.8 Ekspresi Hsp-70.....	78
5.9 Hasil Uji Analisis Jalur (<i>Patch Analysis</i>).....	84
5.9.1 Model Analisis Jalur.....	84

5.9.2 Validasi Model	87
5.9.3 Interpretasi Hasil	88
5.9.4 Analisis Jalur Perblok.....	91
BAB 6 AGLIKON ISOFLAVON KEDELAI DAN DOSIS GENISTEIN GLYCINE MAX	95
6.1 Studi In Silico Aglikon Isoflavon Kedelai	95
6.1.1 Daidzein Memiliki Induksi Langsung Transkripsi Gen Hsp70	95
6.1.2 Genistein Diperkirakan Mendukung Aktivasi Persinyalan TGF- β 1.....	96
6.1.3 Daidzein dan Glycitein Menginduksi Aktivasi Transkripsional Gen Anti-Antiapoptosis Bcl-xl	97
6.2 Dosis Genistein Glycine Max (Kedelai).....	101
6.2.1 Ekspresi RE- β	102
6.2.2 Kadar MMP-9.....	102
6.2.3 Ekspresi Fibulin-5.....	104
6.2.4 Ekspresi α ACTIN	105
6.2.5 Ekspresi TGF- β	106
6.2.6 Proliferasi Epitel.....	107
6.2.7 Ekspresi Hsp 70	108
DAFTAR PUSTAKA	111
BIOGRAFI PENULIS.....	127

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Fotomiograf Dinding Vagina dengan Pewarnaan Trichome Masson).....	8
Gambar 2.2	Histologi Spesimen Biopsi Full-Thickness yang Diperoleh dari Cross-Section Dinding Vagina pada Wanita Dengan POP.	8
Gambar 2.3	Prolaps Dinding Anterior Vagina (A) dan Prolaps Dinding Posterior Vagina (B).....	10
Gambar 2.4	Patofisiologi Perubahan Organ pada Menopause Menyebabkan Penurunan Estradiol (E2) Menimbulkan Pengaruh Pada Sintesa Kolagen	11
Gambar 2.5	Pemeriksaan Histologis Vagina pada Pewarnaan HE	13
Gambar 2.6	Analisa Imunohistokimia Otot Polos pada Dinding Vagina (100x)	15
Gambar 2.7	Fraksi Sel Otot Polos pada Dinding Vagina.....	16
Gambar 2.8	Indeks Apoptosis Otot Polos pada Dinding Vagina Ditentukan dengan Pewarnaan He	16
Gambar 2.9	Apoptosis Sel Otot Polos Dinding Vagina pada Biopsi tanpa Prolaps (a) dan dengan Prolaps (b).....	17
Gambar 2.10	Matriks Ekstra Seluler (Mes) Dan Komponen Didalam Jaringan Ikat.....	18
Gambar 3.1	Estrogen dan Metabolisme Kolagen	25
Gambar 3.2	Matriks metalloproteinase (MMP) Menurunkan Kolagen dalam Jaringan Penyokong Dasar Panggul	25
Gambar 3.3	Peran Fibulin-5 dalam Pembentukan Serat Elastin.....	28
Gambar 4.1	Kedelai (<i>soybean</i>)	32
Gambar 4.2	Struktur Kimia Isoflavon Kedelai.....	33
Gambar 4.3	Struktur Kimia Estrogen dan Isoflavon Kedelai	34
Gambar 4.4	Formasi dan Biotransformasi Isoflavon Kedelai	34

Gambar 4.5	Metabolisme Isoflavon Kedelai pada Manusia ...	35
Gambar 4.6	NF-kB pathway	38
Gambar 5.1.1	Histogram Rerata Ekspresi RE- β).....	46
Gambar 5.1.2	Perbedaan Ekspresi RE- β pada epitel vagina	47
Gambar 5.3.1	Histogram Rerata Proliferasi Epitel.....	56
Gambar 5.3.2	Perbedaan Proliferasi Epitel	57
Gambar 5.4.1	Histogram rerata ekspresi TGF- β	61
Gambar 5.4.2	Perbedaan Ekspresi TGF- β pada stroma	62
Gambar 5.5.1	Histogram Rerata Kadar MMP-9	66
Gambar 5.6.1	Histogram Rerata Ekspresi Fibulin 5	71
Gambar 5.6.2	Perbedaan Ekspresi Fibulin -5 pada stroma	72
Gambar 5.7.1	Histogram Rerata Ekspresi α -Actin.....	76
Gambar 5.7.2	Perbedaan Ekspresi α ACTIN Pada Otot Polos ...	78
Gambar 5.8.1	Histogram Rerata Ekspresi Hsp-70.....	82
Gambar 5.8.2	Perbedaan Ekspresi HSP-70 Pada Intraparabasis Vagina.....	84
Gambar 5.9.1	Diagram Jalur Pada Model Hubungan Antara Ekspresi Re-B (X1), Ekspresi Hsp-70 (Y1), Ketebalan Epitel (Y2), Actin (Y3), Ekspresi Tgf- B (Y4), Kadar Mmp 9 (Y5), Dan Ekspresi Fibulin-5 (Y6)	85
Gambar 5.9.2	Koefisien jalur pada model hubungan antara ekspresi RE- β (X1), ekspresi Hsp-70 (Y1), ketebalan epitel (Y2), Actin(Y3), ekspresi TGF- β (Y4), konsentrasi MMP 9 (Y5), dan ekspresi fibulin-5 (Y6)	87
Gambar 6.1.1.	Efek Senyawa Isoflavon Kedelai Terhadap Interaksi Hsf Pada Promotor Gen Hsp-70	96
Gambar 6.1.2	Interaksi Antara Isoflavon Kedelai dengan TGF β dan TGFR).....	97
Gambar 6.1.3	Efek Senyawa Isoflavon Kedelai Terhadap Interaksi Nfkb pada Promotor Gen Bcl-Xl	98

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1.1	Uji Normalitas Data Ekspresi RE- β	42
Tabel 5.1.2	Hasil Perbandingan Antarkelompok Kontrol	43
Tabel 5.1.3	Perbandingan Ekspresi RE- β	44
Tabel 5.2.1	Uji Normalitas Data Kadar Estradiol (E2).....	48
Tabel 5.2.2.	Perbandingan Antarkelompok Kontrol.....	49
Tabel 5.2.3	Perbandingan Kadar E2.....	50
Tabel 5.3.1	Uji Normalitas Data Proliferasi Epitel.....	53
Tabel 5.3.2	Hasil perbandingan Antarkelompok Kontrol	54
Tabel 5.3.3	Perbandingan Proliferasi Epitel	55
Tabel 5.4.1	Uji Normalitas Data Ekspresi TGF- β	58
Tabel 5.4.2	Hasil Perbandingan Antarkelompok Kontrol	59
Tabel 5.4.3	Perbandingan Ekspresi TGF- β	60
Tabel 5.5.1	Uji Normalitas Data Kadar MMP9.....	63
Tabel 5.5.2	Hasil Perbandingan Antarkelompok Kontrol	64
Tabel 5.5.3	Perbandingan Kadar MMP-9	65
Tabel 5.6.1	Uji Normalitas Data Ekspresi Fibulin 5	67
Tabel 5.6.2	Hasil Perbandingan Antarkelompok Kontrol	68
Tabel 5.6.3	Perbandingan Ekspresi Fibulin-5	69
Tabel 5.7.1	Uji Normalitas Data Ekspresi α -Actin	73
Tabel 5.7.2	Hasil Perbandingan Antarkelompok Kontrol	74
Tabel 5.7.3	Perbandingan Ekspresi α -Actin	75
Tabel 5.8.1	Uji Normalitas Data Ekspresi Hsp-70	79
Tabel 5.8.2	Hasil Perbandingan Antarkelompok Kontrol	79
Tabel 5.8.3	Perbandingan Ekspresi Hsp-70.....	80
Tabel 5.9.1	Koefisien Korelasi	86
Tabel 5.9.2	Pengaruh Langsung.....	89

PENDAHULUAN

Proyeksi jumlah penduduk Indonesia pada tahun 2010 mencapai 233.48 juta jiwa dengan jumlah perempuan menopause sekitar 20,17 juta jiwa. Perhitungan statistik memperkirakan pada tahun 2020 jumlah penduduk Indonesia mencapai 262,6 juta dengan jumlah perempuan menopause sekitar 48,2 juta sehingga diperkirakan jumlah perempuan menopause yang mengeluhkan gejala menopause (Biro Pusat Statistik, 2005).

Menopause adalah saat berhentinya menstruasi seorang perempuan secara permanen akibat berkurang atau hilangnya aktivitas ovarium sebagai penghasil estrogen. Produksi estrogen yang berkurang mengakibatkan tidak terjadi haid lagi. Bila seorang perempuan tidak haid selama 12 bulan berturut-turut, maka telah dapat dikatakan bahwa perempuan tersebut telah mengalami menopause. Definisi pascamenopause adalah masa setelah menopause sampai senium dimulai setelah 12 bulan amenorea dengan kadar FSH (Folikel Stimulasi Hormon) (>35 mU/ml), LH (Lutein Hormon) sangat tinggi (>35 mIU/ml) dan kadar estradiol (E2) sangat rendah (<30 pg/ml). Rendahnya kadar estradiol mengakibatkan endometrium menjadi atrofi sehingga haid tidak terjadi dan menimbulkan gejala menopause seperti hot flushes, atrofi urogenital, inkontinensia, insomnia, masalah jantung dan osteoporosis (Baziad, 2003; Noorpramono 2005; Arsana IWA, 2012).

Menurut Swift *et al* (2005) wanita pascamenopause yang tidak mendapat terapi hormon memiliki angka kejadian prolaps vagina yang lebih tinggi dibanding yang memakai terapi hormon. Hasil yang sama ditemukan Moalli *et al* (2004) pada wanita pascamenopause yang tidak mendapat terapi hormon berisiko lebih besar untuk mengalami prolaps vagina. Wanita pascamenopause yang mendapat terapi hormon selama 5 tahun

atau lebih akan mengalami penurunan risiko untuk operasi prolaps sebesar 90%.

Sejak tahun 2000 International Menopause Society telah menyepakati terapi pengganti estrogen (estrogen replacement therapy/ERT) dapat mengurangi gejala-gejala menopause khususnya vulvovaginal atrofi (Clarkson *et al* 2000, Li T *et al*, 2016). Hanya saja karena penggunaan estrogen sintetik mahal dan penggunaan jangka panjang dapat menyebabkan timbulnya berbagai komplikasi maka beberapa dekade terakhir telah mulai dilakukan upaya untuk mencari senyawa alternatif menyerupai estrogen. Salah satu senyawa menyerupai estrogen adalah fitoestrogen yang mengandung bahan aktif isoflavon. Trowers *et al* (2018) melaporkan ada hubungan fitoestrogen dan disfungsi dasar panggul pada patofisiologis, pencegahan dan pengobatan prolaps vagina.

Fitoestrogen berasal dari tumbuhan yang memiliki aktivitas biologi dan struktur molekul yang menyerupai 17β estradiol. Fitoestrogen dapat secara langsung berkaitan dengan reseptor estrogen dan berkompetisi dengan hormon estrogen endogen. Unsur utama fitoestrogen adalah isoflavon dengan sumber utamanya adalah tanaman polong-polongan (leguminacea). Diantara jenis tanaman polong-polongan yang telah dianalisis, kedelai (*soybean*) menempati urutan pertama terbanyak mengandung isoflavon (Yuan *et al*, 2008). Kedelai juga merupakan antioksidan alami kuat karena mengandung aglikon isoflavon yang terdiri dari genistein, daidzein dan glycitein.

Genistein Glycine Max (*Soybean*) termasuk golongan isoflavon pada kelompok fitoestrogen paling banyak digunakan dalam penelitian karena mempunyai struktur dan fungsi mirip estrogen endogen dan bersifat selektif terhadap jaringan sehingga tidak berpengaruh pada sel payudara, uterus dan pembuluh darah. Hasil penelitian menunjukkan Genistein Glycine Max (*Soybean*) selain berikatan dengan reseptor estrogen di dalam tubuh juga dapat bertindak sebagai antioksidan dengan menghambat

produksi Reaktif Oksigen Spesifik (ROS) yang terlibat dalam pembentukan radikal bebas pada pascamenopause (Aquira and Barosa, 2014, Mazumder AR and Hongsprabahas, 2016).

Genistein glycine max (*soybean*) akan diikat oleh reseptor estrogen β (RE β) di permukaan sel parabasal vagina karena peran dari RE. Ikatan antara Genistein Glycine Max (*Soybean*) dengan reseptornya menyebabkan terjadi hantaran sinyal intraseluler yang dimulai aktivasi dari enzim fosfolipase-C (FL-C). Enzim FL-C akan mengubah fosfatidyl inositol di fosfat (PI-2p) menjadi fosfatidil inositol tri fosfat (PI-3p). Ikatan antara PI-3p dengan reseptornya dipermukaan endoplasmik retikulum (ER) ini mengakibatkan calcium gate open sehingga ion kalsium akan dilepas ke daerah sitosolik dan mengakibatkan terjadi peningkatan ion kalsium intraseluler. Selanjutnya ion kalsium tersebut akan berikatan dengan kalsineurin di dalam sitosolik membentuk kalsineurin kompleks.

Keberadaan kalsineurin kompleks ini akan menghambat aktivitas dari Inhibitor kappa beta ($Ik\beta$) sehingga nuclear factor kappa beta (NF- $k\beta$) mengalami translokasi ke inti sel yang akan memicu proses transkripsi. Peningkatan kemampuan transkripsi karena rangsangan genistein glycine max (*soybean*) ini akan menginduksi terjadinya proliferasi sel epitel vagina dan menghambat terjadinya apoptosis sel otot polos vagina (Clarkson *et al* 2000; Alexande *et al*, 2002; Shakir and Derek, 2004, Tackas *et al* 2011).

Pada kondisi pascamenopause banyak sel yang mengalami atrofi sehingga terjadi penurunan kualitas sel pada dinding vagina. Hal ini akibat hambatan maturasi epitel dan degradasi kolagen dan penurunan sintesis elastin sehingga elastisitas vagina menurun. Pada pascamenopause banyak radikal bebas membuat sel parabasal vagina akan mengalami disfungsi mitokondria sehingga dihasilkan ROS yang akan memicu kerusakan protein intraseluler (Velde, 2000). Bila radikal bebas atau oksidan dihasilkan oleh tubuh berlebihan, maka bahan tersebut akan dinetralisasi oleh

antioksidan. Bila terjadi ketidakseimbangan antara aktifitas oksidan dengan aktifitas antioksidan dengan rasio oksidan lebih besar daripada antioksidan menimbulkan stres oksidatif. Kondisi ini akan memicu kerusakan protein intraseluler dan untuk menghambat kerusakan protein intraseluler tersebut, maka sel akan mensintesis heat shock protein (Hsp) sehingga menjadikan sel tidak rusak (Velde,2000; Sudiana,2008).

Pada kondisi pascamenopause banyak sel yang mengalami kerusakan sehingga terjadi penurunan kualitas sel pada dinding vagina. Hal ini akibat hambatan maturasi epitel dan degradasi kolagen dan penurunan sintesis elastin sehingga elastisitas vagina menurun. Sel parabasalis vagina dapat dilindungi dari kerusakan dengan tubuh mengekspresikan stres protein yaitu heat shock protein-70 (Hsp-70) (Rosdiana& Nenden, 2008). Hsp 70 banyak terdapat di dalam nukleus, mitokondria, retikulum endoplasma dan sitoplasma sel. Induksi Hsp 70 sebagian besar terjadi karena berkelimpahan jumlah rantai polipeptida yang belum terlipat. Kelas Hsp 70 mempunyai tingkat konversi yang tinggi didalam proses evolusinya. Semua anggota dari kelas Hsp 70 mempunyai dua domain yang berbeda, yaitu domain ATP ase yang terletak di dekat ujung N - terminal dan bagian C terminal yang terdapat domain yang mengikat peptida (Rodriques Dennen, 2011).

Genistein Glycine Max (*Soybean*) sebagai antioksidan berperan meregulasi oksidan atau radikal bebas didalam sel parabasal vagina berupa penurunan Hsp 70. Kondisi Hsp70 yang teregulasi tersebut akan berfungsi sebagai chaperon menginduksi faktor transkripsi untuk meningkatkan sintesis protein khususnya seperti: CDK (Cyclin Dependent Protein Kinase) dan cyclin yang menginduksi proliferasi epitel dan menghambat apoptosis sel otot polos dinding vagina. Induksi ROS mengakibatkan banyak sel parabasalis vagina yang tidak adaptif akan mengalami kerusakan sel, selanjutnya sel yang rusak tersebut akan difagositosis oleh makrofag (histiosit) dengan melepaskan sitokin, antara lain Transforming Growth Factor β (TGF- β) (Ellerbroek *et al.*, 2001).

Untuk efek hormon estrogen terhadap metabolisme kolagen ditemukan ada hubungan sintesa kolagen dengan peningkatan ekspresi MMP-9 baik yang proaktif maupun yang aktif. Dilaporkan oleh Novida A (2013) terjadi peningkatan ekspresi kadar MMP-9 pada dinding vagina tikus Wistar postpartum. Ekspresi MMP-9 pada jaringan ikat dinding vagina sangat berperan penting pada elastisitas karena MMP-9 mengatur regulasi kolagen tipe I dan III dan elastin pada dinding vagina. Kolagen tipe 1 bersifat lebih kuat dan meningkatkan tensile strength untuk support dasar panggul sedangkan kolagen tipe III pada vagina sangat penting untuk akomodasi fetus saat persalinan. Jaringan ikat dinding vagina terdiri dari kolagen tipe I dan tipe III dalam proporsi seimbang. Bila proporsi ini berubah dimana kolagen III jumlahnya meningkat dibanding tipe I maka akan menyebabkan prolaps dinding vagina (Moalli *et al*, 2005).

Karam *et al*, (2007) juga melaporkan terjadi penurunan sintesa serat elastin yang ditandai dengan terjadinya penurunan ekspresi fibulin-5 pada dinding vagina yang mengalami prolaps. Fibulin-5 adalah molekul penting yang berperan dalam homeostasis matriks ekstra seluler (MES) elastin pada jaringan ikat. Mekanisme kerja fibulin-5 dengan cara memfasilitasi pembentukan serat elastin dan menghambat katabolismenya dengan pembentukan mikrofibril (Kiety *et al*,2002; Drewes *et al* 2009). Ada hubungan MMP-9 dan Fibulin-5 dimana bila terjadi defisiensi fibulin-5 akan meningkatkan aktivitas MMP-9 dan elastogenesis terganggu sehingga mengakibatkan terjadinya prolaps dinding vagina (Budhata *et al* 2011). Genistein Glycine Max (*soybean*) dapat menginduksi fibroblas untuk mensintesis kolagen tipe -1 dan serat elastin melalui TGF- β Reseptor (Lee, 2006).

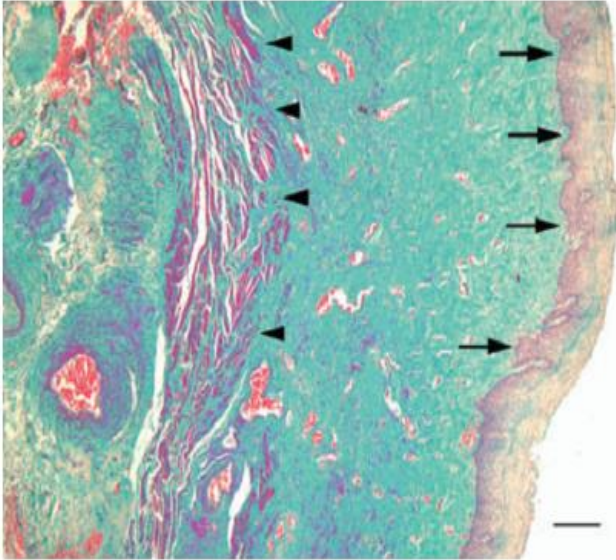
ATROFI VAGINA PASCAMENOPAUSE

2.1 Atrofi Vagina

2.1.1 Anatomi Dinding Vagina

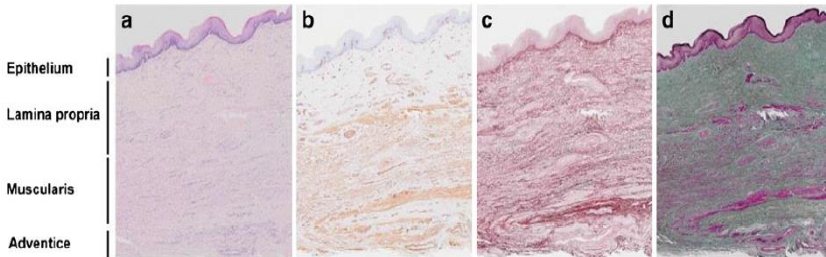
Vagina adalah organ utama yang menyokong organ panggul (uterus, uretra, kandung kemih dan rektum) agar tetap pada posisinya. Vagina merupakan organ dinamis yang dapat menahan kekuatan dan peregangan mekanik selama persalinan karena dinding vagina kaya akan serat elastin. Peran utama dari serat elastin adalah memberikan elastisitas disamping melindungi integritas struktural terhadap regangan pada dinding vagina.

Dinding vagina terdiri dari empat lapisan yang terdiri lapisan epitel, lapisan subepitel atau lamina propria, lapisan muskularis dan lapisan adventitia. Lapisan epitel vagina merupakan epitel stratified squamos nonkeratinized superfisial. Lapisan subepitel atau lamina propria adalah lapisan jaringan ikat padat yang terutama terdiri dari kolagen dan elastin yang dibentuk oleh fibroblas. Lamina propria berlubang karena dilewati arteriol dan venula kecil. Lapisan muskularis tersusun oleh sel otot polos sirkular inner dan longitudinal outer yang dikelilingi oleh jaringan ikat. Lapisan adventitia adalah lapisan jaringan ikat longgar yang memisahkan lapisan muskularis vagina dari jaringan paravagina. Lamina propria dan muskularis adalah dua lapisan penting yang memberi kekuatan untuk dinding vagina.



Sumber: Dikutip dari Lara LAS *et al*, 2009

Gambar 2.1 Fotomiograf dinding vagina dengan pewarnaan trichome masson. Tanda panah kekanan menunjukkan lapisan epitel dan tanda panah kekiri menunjukkan tunica muscularis dinding anterior vagina.



Sumber: Dikutip dari Landshere *et al*, 2010

Gambar 2.2 Histologi Spesimen Biopsi Full-Thickness yang Diperoleh dari Cross-Section Dinding Vagina pada Wanita dengan POP. Dinding vagina terdiri dari empat lapisan: epitel, lamina propria, muskularis, dan adventisia (a) Pewarnaan Hematoxylin-Eosin, (b) pewarnaan untuk sel otot polos α -aktin, (c) pewarnaan orcein untuk mendeteksi serat elastin, (d) pewarnaan trichrome Masson.

Hasil pewarnaan imunohistokimia dinding vagina pada penderita prolaps menunjukkan terdapat penurunan fraksi sel otot polos, disorganisasi bundel otot polos dan menurunnya pewarnaan α actin pada tunica muskularis. Dilaporkan juga didapatkan indeks apoptosis secara signifikan lebih tinggi pada wanita yang mengalami prolaps dinding vagina. Fraksi sel otot polos pada lapisan muskularis terjadi penurunan jumlah sel otot polos pada dinding vagina secara signifikan yang disebabkan karena meningkatnya kecepatan apoptosis (Takacs *et al*, 2008).

Pada pemeriksaan morfometri didapatkan lapisan muskularis dinding vagina berubah secara signifikan dimana terjadi penipisan pada sebagian area otot polos di lapisan muskularis dan bundel otot polos yang tidak teratur. Pengukuran jarak antara epitel permukaan dan titik terdekat dari muskularis juga telah digunakan untuk menganalisis perubahan jaringan vagina dengan atau tanpa prolaps. Jarak rata-rata dari serat otot polos dari epitel permukaan kelompok prolaps secara signifikan lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol (Boreham *et al* 2002, Ina *et al*, 2010)

2.1.2 Prolaps Dinding Vagina

Prolaps dinding vagina bisa terjadi pada dinding anterior dan posterior vagina. Prolaps dinding anterior vagina (sistokel) adalah turunya kandung kemih akibat melemahnya jaringan ikat dinding vagina dan fascia puboservikalis. Prolaps dinding posterior vagina (rektokel) adalah melemahnya dinding rektum akibat melemahnya jaringan ikat dinding vagina dan fascia rektovaginalis. Sistokel dapat memberikan gejala:

- a) Berkemih sering dan sedikit-sedikit.
- b) Perasaan seperti kandung kemih tidak dapat dikosongkan seluruhnya.
- c) Stres inkontinensia urine yaitu tidak dapat menahan berkemih jika batuk, mengedan. Kadang-kadang dapat terjadi retensio urin pada sistokel yang besar (Junizaf 2011).

Prolaps dinding anterior vagina merupakan kelainan tersendiri atau bersamaan dengan prolaps dinding posterior vagina (Gambar 3.3). Penyebab prolaps dinding anterior dan posterior vagina sampai saat ini belum dapat dipahami secara menyeluruh karena multifaktorial. Terjadinya prolaps dinding anterior dan posterior vagina disebabkan oleh mekanisme yang beragam seperti persalinan pervaginam, konstipasi, peningkatan tekanan intraabdominal kronik, obesitas, menopause dan faktor genetik. Multiparitas persalinan pervaginam dan menopause (hipoestrogen) merupakan etiologi utama terjadinya POP (Dietz HP, 2015; Young N *et al* 2017). Trauma vagina berupa persalinan pervaginam spontan atau dengan rangsangan akan menghasilkan gangguan regulasi gen yang mempengaruhi homeostasis serat elastin (Downing *et al*, 2013). Adanya kerusakan otot ataupun jaringan ikat yang berfungsi sebagai stabilisasi dinding anterior dan posterior vagina pada persalinan pervaginam akan menimbulkan kerusakan pada otot dan jaringan ikat tersebut (Handa *et al*, 2007).



Sumber: Dikutip dari Mariene MC, 2009

Gambar 2.3 Prolaps Dinding Anterior Vagina (A) dan Prolaps Dinding Posterior Vagina (B) Tampak tonjolan pada introitus vagina yang diakibatkan lemahnya dinding vagina.

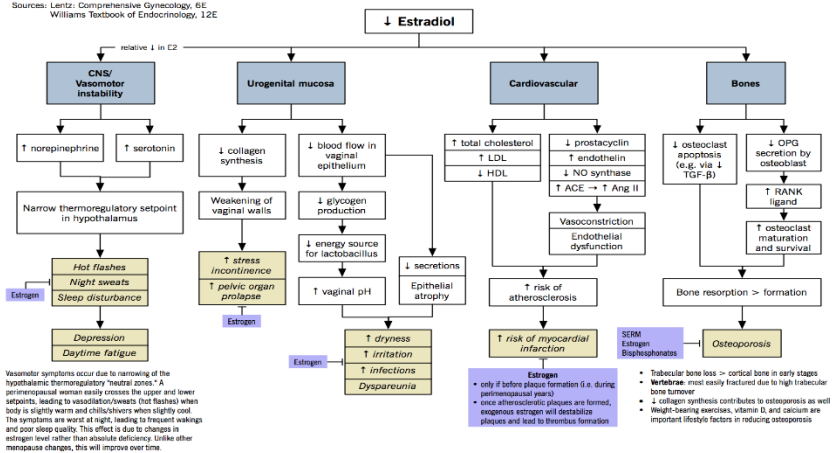
Menurut Patel *et al* (2007) tentang faktor resiko prolaps pada persalinan pervaginam pada wanita nullipara dan multiparitas, didapatkan pada wanita dengan paritas tinggi persalinan pervaginam mempunyai risiko lebih tinggi untuk terjadinya prolaps vagina sebesar 2.6 kali dibandingkan dengan wanita nullipara. Pada wanita dengan satu kali persalinan pervaginam odds ratio (OR) = 3.0 dan OR = 4,5 untuk wanita dengan 2 kali atau lebih. Hasil tersebut mendukung hipotesis bahwa persalinan pervaginam memberikan pengaruh yang signifikan pada kelemahan jaringan penyokong dasar panggul (vagina).

Pascamenopause menyebabkan dinding vagina menjadi lemah sehingga resiko terjadi prolaps dinding vagina menjadi besar. Ini terjadi karena adanya penurunan produksi dari hormon estrogen oleh ovarium yang mempunyai efek pada jaringan urogenital seperti penurunan kolagen sehingga menyebabkan atrofi vagina, uretra, kandung kemih dan otot-otot dasar panggul (Ibanez & Baulieu, 2005, Agius *et al*, 2009,) (Gambar 2.4)

Pathophysiology of menopause organ changes

Sources: Lentz: Comprehensive Gynecology, 6E
Williams Textbook of Endocrinology, 12E

Eric Wong



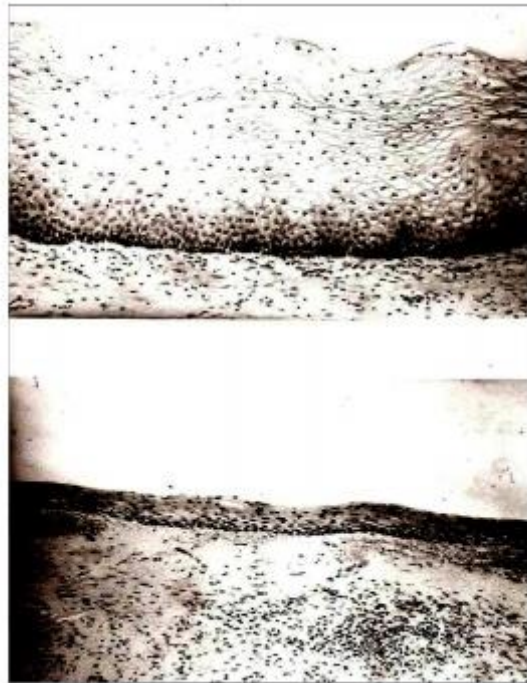
Sumber: Dikutip dari Ibanez & Baulieu, 2005

Gambar 2.4 Patofisiologi Perubahan Organ pada Menopause Menyebabkan Penurunan Estradiol (E2) Menimbulkan Pengaruh pada Sintesa Kolagen.

Farouk *et al*, (2013) menyatakan bahwa trauma akibat persalinan pervaginam merupakan faktor resiko terbesar pada kejadian prolaps vagina dan paritas berhubungan dengan perubahan histomorfologi jaringan vagina. Chen *et al* (2005) juga melaporkan bahwa umur pada wanita sebagai faktor risiko prolaps, semakin lanjut umur akan semakin tingginya tingkat keluhan disfungsi dasar panggulnya. Hipotesis ini merupakan penyebab sekunder dari berbagai faktor yang terlibat didalamnya seperti penurunan estrogen (hipoestrogen) selama masa pascamenopause. Untuk diketahui dinding vagina terdiri dari epitel skuamosa, lamina propria, lapisan otot polos dan adventitia semuanya berada di bawah kendali estrogen (Lara LAS *et al* 2009).

Fluktuasi perubahan kadar estrogen dalam sirkulasi darah dapat tergambarkan dengan jelas dalam fisiologi dinding vagina (Ballagh,2005). Tindakan pemberian estrogen terbukti sangat bermanfaat pada pemeliharaan ketebalan epitel, kepadatan lapisan otot, pembuluh darah, morfologi dan kepadatan syaraf. Mekanisme kerja estrogen dalam hal ini dengan cara memodulasi matriks ekstraselular, otot polos dan fibroblas yang bertanggung jawab untuk produksi kolagen (Soderberg W *et al* 2008).

Respon vagina terhadap terapi estrogen berlangsung dengan cepat dan tahan lama seperti hilangnya rugae dan menipisnya epitel vagina akan tampak pada 2-3 tahun pascamenopause (Gambar 2.20). Turunnya produksi hormon estrogen dari ovarium berhubungan dengan atrofi epitel vagina sedangkan degradasi kolagen meningkat sejalan dengan penambahan usia (Moalli *et al*, 2004; Philips *et al*, 2006; Tineli *et al*, 2010).



Sumber: Dikutip dari Strudee and Panay, 2010

Gambar 2.5 Pemeriksaan Histologis Vagina pada Pewarnaan HE. Tampak terjadi penipisan lapisan epitel pada premenopause (Gambar atas) dan hanya tertinggal sel parabasalis vagina pada pascamenopause (Gambar bawah)

Hal lain dilaporkan hipoestrogen menyebabkan perubahan morfologi sel dan matriks ekstraselular pada dinding vagina melalui perubahan globular actin. Globular actin hadir dalam sitoplasma sel sebagai komponen sitoskeleton dalam bentuk filamen paralel atau jaringan filamen. Globular actin menentukan kekakuan sel sebagai respons terhadap stimulus dan bertindak sebagai elemen penghubung dalam pemeliharaan ikatan sel yang memungkinkan pertukaran interselular (Gorodeski GI, 2005).

Hipoestrogen juga menyebabkan degenerasi mitokondria dan perubahan morfologis dinding vagina. Di ruang interselular, hipoestrogen menyebabkan peningkatan pengendapan kolagen II dan proteoglikan (Wen Y *et al*, 2007). Proteoglikan ini berinteraksi dengan serat kolagen dan elastin untuk menciptakan jaringan padat dengan kekuatan lebih tinggi dan fleksibilitas pada jaringan vagina (Resplande J, *et al* 2002). Pada tikus normal, estradiol memiliki efek hiperplasia epitel dan otot polos vagina. Pada hewan coba kelinci yang dilakukan ovariectomi, estradiol terbukti meningkatkan ketebalan epitel dan memperbaiki sebagian lapisan muskularis (Pessina *et al*, 2006).

2.1.3 Mekanisme Prolaps Dinding Vagina.

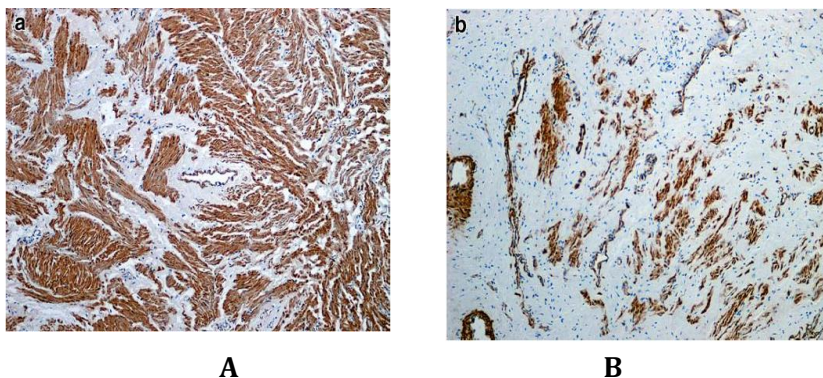
Prolaps dinding vagina akan terjadi jika struktur dan integritas mekanik dari vagina tidak menyokong. Pada keadaan normal setelah trauma persalinan, maka jaringan penyokong dinding vagina akan mengalami perbaikan sebagai suatu adaptasi terhadap stress yg timbul saat persalinan (Word *et al*, 2009). Trauma dinding vagina pada saat persalinan merupakan penyebab utama yang berhubungan dengan perubahan histomorfologi dinding vagina (Farouk *et al*, 2013). Ada beberapa mekanisme prolaps dinding vagina akibat persalinan pervaginam:

A. Disfungsi Otot Polos

Disfungsi otot vagina adalah ketidaknormalan pada anatomi, fisiologi dan biologi seluler dari otot polos dinding vagina. Hal ini ditunjukkan perubahan pada lapisan muskularis dinding anterior dan posterior vagina pada wanita dengan prolaps dimana jumlah sel otot polos mengalami penurunan dibandingkan tanpa prolaps (Ozdegirmenci *et al*, 2005).

Perubahan pada susunan otot polos berperan menimbulkan prolaps atau penurunan kepadatan sel otot polos lapisan muskularis. Penurunan jumlah sel otot polos pada lapisan muskularis dari jaringan vagina yang prolaps akan merusak tonus dinding vagina. Sebelumnya juga ada perbedaan bermakna kepadatan sel otot polos vagina wanita yang mengalami POP

dibandingkan dengan yang tidak POP [Boreham *et al*, 2002]. Pada pewarnaan imunohistokimia menunjukkan penyebaran sel otot polos merata, berbentuk tegas dan serupa (uniform) pada pasien tanpa POP (Gambar 2.6a). Hal ini kontras dengan penyebaran sel otot polos tidak merata pada pasien dengan POP (Gambar 2.6b)

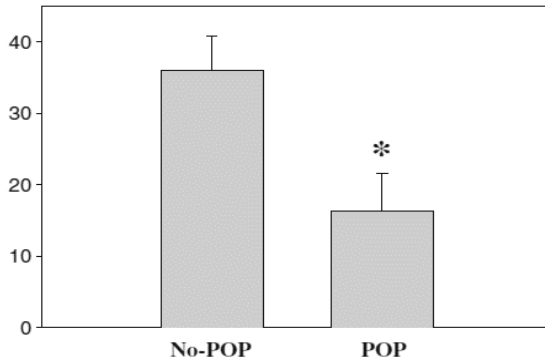


Sumber: Dikutip dari Takacs *et al*, 2008

Gambar 2.6 Analisa Imunohistokimia Otot Polos pada Dinding Vagina (100x). Biopsi dinding vagina dari pasien tanpa (a) dan dengan prolaps dinding vagina (b) yang diwarnai imunohistokimia dengan antibody α -actin pada otot polos.

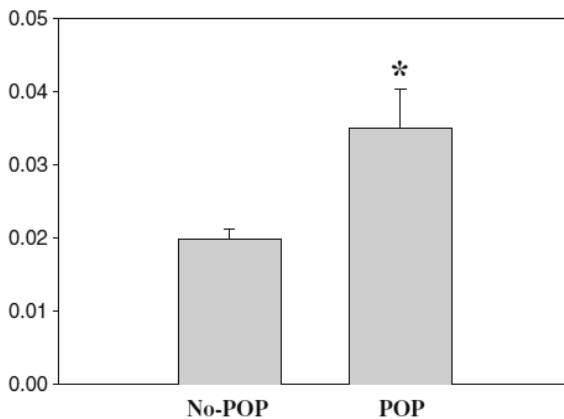
Pada analisa pertama morfometrik kuantitatif menunjukkan bahwa area fraksi otot polos non-vaskular pada biopsi dinding vagina yang prolaps secara bermakna menurun dibandingkan dengan tanpa prolaps (Gambar 2.4). Pemeriksaan apoptosis sel otot polos dinding vagina menunjukkan bahwa indeks apoptosis secara bermakna meningkat pada yang prolaps dibandingkan tidak prolaps (no POP) (Gambar 2.5).

Pada analisis kedua nukleus sel otot polos menunjukkan penurunan jumlah yang bermakna pada prolaps dibandingkan tidak prolaps (Gambar 2.7).



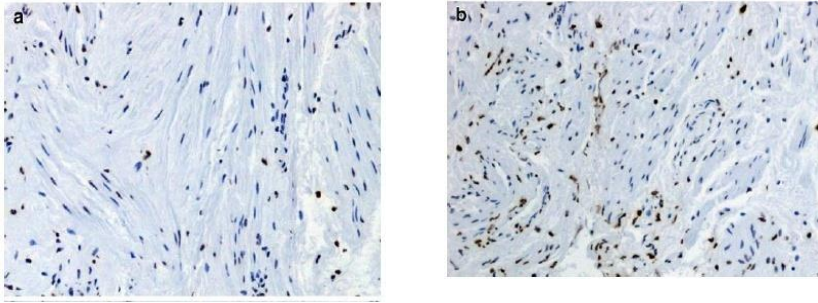
Sumber: Dikutip dari Takacs *et al*, 2008

Gambar 2.7 Fraksi Sel Otot Polos pada Dinding vagina. Area imunoreaktif dengan α -actin otot polos digambarkan sebagai fraksi total dinding vagina tanpa prolaps (no POP) dan dengan prolaps (POP)



Sumber: Dikutip dari Takacs *et al*, 2008

Gambar 2.8 Indeks Apoptosis Otot Polos pada Dinding Vagina Ditentukan dengan Pewarnaan HE. Indeks Apoptosis (IA) ditentukan sebagai jumlah sel apoptosis tiap 500 sel otot polos. IA dihitung pada wanita tanpa (no POP) dan dengan prolaps (POP).



Sumber: Dikutip dari Takacs *et al*, 2008

Gambar 2.9 Apoptosis Sel Otot Polos Dinding Vagina pada Biopsi Tanpa Prolaps (a) dan dengan Prolaps (b)

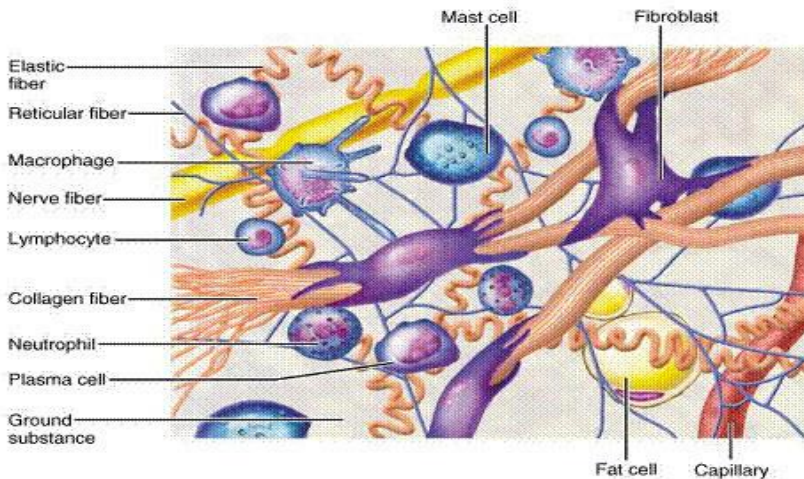
B. Kerusakan Jaringan Ikat

Sejak dihipotesiskan oleh Jackson tahun 1996 bahwa kerusakan jaringan ikat pada struktur penyanggah dasar panggul berhubungan dengan kejadian prolaps, maka banyak penelitian tentang jaringan ikat dilakukan untuk mengungkapkan patofisiologi kelainan ini. Berdasarkan literatur dan hasil penelitian biomolekuler terkini, mulai terungkap bahwa dasar kelainan prolaps adalah kerusakan jaringan ikat (Philip *et al*, 2006.). Pada prolaps terjadi suatu proses yang abnormal dalam perbaikan jaringan penyokong tersebut. Banyak peneliti sulit untuk membuktikan perubahan-perubahan tersebut apakah merupakan penyebab atau akibat prolaps (Kerchof *et al*, 2009).

Perubahan jaringan ikat pada dasar panggul merupakan suatu proses penting baik pada perempuan dengan prolaps. Jaringan ikat terdiri dari matrik ekstra selular (MES) antara lain kolagen dan elastin sebagai protein utama serta glikoprotein dan proteoglikan (Ewies *et al*, 2006). Ada dua komponen utama pada jaringan ikat ini sebagai penyokong vagina. Kolagen bertanggung jawab terhadap kekuatan regangan, sedangkan elastin untuk ketahanan dan kemampuan kembali dari peregangan vagina. Pada kejadian prolaps menunjukkan bahwa proses degradasi kolagen bergantung pada aktivitas matriks metaloproteinase (MMP) dan regulasinya (Kerkhof *et al*, 2009).

Jaringan ikat dasar panggul terdiri dari kolagen, elastin dan serat mikro yang ditautkan pada matriks ekstra seluler dari polisakarida. Kerusakan jaringan ikat dapat mengakibatkan seorang perempuan menderita POP. Jaringan ikat dasar panggul memberikan banyak sokongan anatomis terhadap panggul dan isinya. Fascia dan jaringan ikat dari dasar panggul akan kehilangan kekuatan seiring penambahan usia. Jaringan ikat vagina mengandung komponen fibril (kolagen dan elastin) dan komponen nonfibril (glikoprotein nonkolagen, hyaluronan dan proteoglikan).

Komponen fibril diperkirakan berkontribusi besar dalam proses biomekanik jaringan vagina. Lapisan subepitel dan lapisan muskularis secara bersama-sama membentuk lapisan fibromuskularis memberikan sokongan baik secara longitudinal maupun sentral. Jaringan ikat yang terletak pada lapisan adventia terdiri dari beberapa sel selain sel mast, sel lemak, terutama terdiri dari sel fibroblas yang menghasilkan MES (Gambar 2.10)



Sumber: Dikutip dari Kerkhof *et al*, 2009

Gambar 2.10 Matriks Ekstra Seluler (Mes) dan Komponen di Dalam Jaringan Ikat. Tampak fibroblas yang diantara kolagen dan serat elastin.

HUBUNGAN HORMON ESTROGEN DENGAN KOLAGEN, ELASTIN, DAN FIBROBLAS

3.1 Hormon Estrogen

Hormon Estrogen adalah hormon wanita yang memberikan efek pada beberapa organ. Konsekuensi dari penurunan hormon estrogen ini dapat memberikan gejala tidak menyenangkan dan berimplikasi terhadap perubahan kualitas hidup. Hormon estrogen dihasilkan terutama dari ovarium, bisa juga dihasilkan dalam jumlah yang sedikit dari plasenta, korteks adrenal dan sel Leydig dalam testis. Hormon estrogen termasuk kelompok steroid dan diproduksi oleh korteks adrenal, ovarium dan konversi lemak perifer oleh androstenedion.

Semua steroid berasal dari kolesterol menyebabkan perubahan pada aktivitas biologis dengan cara berikatan dengan reseptornya didalam sitoplasma sel. Kompleks reseptor-steroid berikatan dengan rangkaian asam deoksiribonukleat (DNA) di dalam nukleus sel dan mengaktivasi gen-gen spesifik. Perubahan kecil pada molekul kolesterol memproduksi tiga tipe steroid yang berbeda: 1) mineralokortikoid (seperti aldosterone) yang bekerja pada keseimbangan garam (mineral); 2) glukokortikoid (seperti kortisol) yang bekerja pada metabolisme glukosa; dan 3) gonadokortikoid, atau estrogen, progesteron, dan testosteron, yang dikelompokkan sebagai famili karena memiliki efek bersama pada fungsi reproduksi.

Ada tiga jenis hormon estrogen endogen diproduksi secara alami dalam tubuh wanita. Pertama, 17β -estradiol (E2) yang diproduksi oleh ovarium dengan jumlah terbesar. Estradiol adalah agen yang paling poten karena memiliki afinitas tertinggi dengan

reseptor estrogen. Pada wanita premenopause, kadar estrogen yang beredar di dalam sirkulasi berfluktuasi dari 40 hingga 200-400 pg/mL selama masih mendapat siklus menstruasi. Setelah menopause, kadar estradiol menurun drastis menjadi kurang dari 30 pg/mL.

Kedua, Estron (E1) bersifat kurang poten dibandingkan estradiol dan juga merupakan metabolit estradiol. Estron diproduksi melalui konversi androstenedion di jaringan adiposa. Pada wanita pascamenopause, ovarium berhenti memproduksi estradiol, tetapi glandula adrenal tetap memproduksi androstenedion (prekursor cepat menjadi estron) sehingga kadar estron tetap tidak berubah meskipun kadar estradiol di dalam plasma turun secara signifikan.

Ketiga, estriol (E3) adalah merupakan metabolit estradiol di perifer. Estriol merupakan estrogen utama yang diproduksi plasenta selama kehamilan, namun ditemukan dalam jumlah lebih kecil daripada estradiol atau estron pada wanita yang tidak hamil. Seperti semua steroid, hormon estrogen merupakan agen yang sangat larut-lemak, sehingga dengan mudah berdifusi melalui membran sel ke dalam sirkulasi darah. Pada organ target, estrogen berdifusi ke dalam sel melalui membran nucleus dan di dalam nukleus estrogen akan berikatan dengan reseptor estrogen (Speroff *et al*,2005).

Reseptor estrogen (RE) merupakan reseptor steroid/ thyroid hormon superfamili yang secara struktural berhubungan dengan faktor transkripsi yang diinduksi ligans. RE ini mempunyai beberapa domain fungsional dengan N-terminal (A/B) domain variabilitasnya sangat tinggi yang mengandung domain aktivasi transkripsi (AFI) yang berinteraksi langsung dengan faktor transkripsional. DNA-Binding Domain (DBD) yang sangat terkonservasi dan bertanggung jawab pada pengenalan sekuen DNA spesifik, mempunyai 2 jari Zn yang terlibat dalam ikatan reseptor dan dimerisasi (C) dimana C-terminai domain (E/F) merupakan ligand-binding domain (LBD) multifungsional untuk

dimerisasi dan aktivasi transkripsi (AF2) (Glass dan Fosenfelt, 2000; Peterson dan Gustafsson, 2001; Ananingati, 2006).

Umumnya reaksi jaringan yang spesifik terhadap hormon estrogen disebabkan oleh adanya reseptor protein intraseluler. Reseptor ini terutama bekerja pada proses transkripsi DNA melalui berbagai macam mekanisme. Adapun fungsi protein tersebut adalah sebagai faktor transkripsi ketika akan terjadi ikatan secara klasik dengan RE sebagai kontrol estrogen regulated gens. RE dapat juga mengirim sinyal melalui second messenger, seperti receptor modulation protein kinase pada membran atau dalam sitoplasma (Speroff *et al*, 2005; Chen *et al*, 2008).

Aktifitas hormon estrogen tidak bergantung hanya pada kadar di serum, tetapi juga pada kadar RE. Terdapat ko-regulator dan faktor transkripsi lainnya yang memiliki efek pada jalur dependen estrogen. Sebagian besar data mengenai peranan estrogen pada metabolisme jaringan ikat berasal dari hewan percobaan. Hal ini disebabkan percobaan pada manusia menghawatirkan dan hasilnya tidak dapat disimpulkan. Hal yang sama dengan pengaruh estrogen pada jaringan ikat bergantung pada regulasi metabolisme kolagen sebab estrogen bukan hanya menstimulasi biosintesis serat kolagen tetapi juga meningkatkan sintesis, sekresi dan aktivitas MMP (Kretowska *et al*, 2011).

Ada dua macam reseptor estrogen yang telah diketahui yaitu reseptor RE- α dan RE- β . Kedua reseptor ini dikode oleh gen dalam kromosom yang berbeda. Gen RE α terletak di lengan panjang kromosom 6 sedangkan gen RE- β terletak di q22-24 kromosom 14. Jumlah asam amino RE- α sebesar 595 dan RE- β sebesar 485. RE pada tikus mempunyai tingkat homolog yang tinggi terhadap protein RE α terutama pada LBD (>95% asam amino identik) dan C terminal LBD (55% asam amino identik). Perbedaan pada regio NH₂-terminal mungkin dapat menjelaskan adanya perbedaan respons terhadap berbagai ligan. Misalnya E2 agonist terhadap RE- α , tetapi bersifat antagonist murni terhadap RE- β (Ananingati, 2006)

RE- α dan RE- β mempunyai kemampuan meregulasi transkripsi melalui Aktivator Protein-1 (AP-1). Melalui AP-1 terjadi interaksi estradiol-17 β dengan RE- β menyebabkan aktivasi transkripsi, sedangkan pada RE- α menyebabkan hambatan transkripsi. Ketika terekspressi pada sel yang sama, RE- α dan RE- β akan membentuk heterodimer sehingga memberikan banyak kemungkinan variasi dalam regulasi gen (Wantri, 2005; Kohler *et al.*, 2005).

RE- β lebih berperan sebagai peredam efek RE- α dan banyak diekspresikan pada ovarium, prostat, uterus, otot polos, sistem limfatik dan testis. RE- β juga terlibat dalam homeostatis elastin dan kolagen baik melalui efek transkripsional pada elastin dan gen kolagen atau melalui regulasi protease yang terlibat dalam degradasi protein (Kochler KF *et al.* 2005). Pada sel kanker (contohnya mamma dan ovarium) ratio RE- α /RE- β cenderung meningkat, hal ini mungkin berhubungan dengan rendahnya ekspresi RE- β (Ananingati, 2006).

Dilaporkan juga bahwa hormon estrogen berperan dalam jaringan vaskular vagina melalui kedua genomic dan non-genomic. RE- β yang terletak di jaringan vaskular memediasi efek genom estrogen pada pembuluh darah vagina manusia (Fu X *et al.* 2003; Fuermetz *et al.* 2015). Ekspresi RE dikontrol oleh banyak faktor termasuk oleh hormon estrogen dalam darah. Pada siklus estrus, ekspresi RE- β di uterus tertinggi pada saat diestrus (estrogen rendah) kemudian menurun saat proestrus awal (estrogen mulai meningkat) dan mencapai titik terendah saat proestrus akhir.

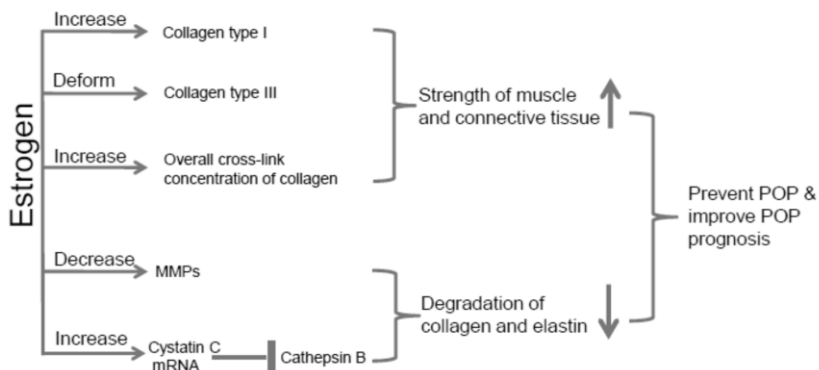
Hal sebaliknya untuk RE- α , pada endometrium manusia ekspresi RE- α terkuat saat pertengahan fase proliferasi sampai sebelum ovulasi, sedangkan ekspresi RE- β meningkat selama fase sekresi. Proses penuaan dapat menyebabkan reseptor bisa menurun dalam jumlah dan afinitasnya, oleh karena itu bisa jadi sistem menjadi kurang sensitif terhadap stimulasi hormonal sehingga fungsinya menurun (Petersson dan Gustafsson, 2001). Interaksi antara kompleks reseptor hormon dengan DNA akan

mengakibatkan terlepasnya hormon dari reseptor dan terjadi eliminasi estrogen dari sel. Estrogen akan mengalami metabolisme menjadi bentuk yang tidak berikatan kuat dengan reseptor dan berdifusi keluar dari sel (Wantri, 2005; Ananingati, 2006).

A. Hormon Estrogen dan Kolagen

Hormon estrogen memiliki pengaruh besar pada sintesis kolagen panggul. Diketahui kolagen merupakan salah satu konstituen utama dari jaringan ikat di panggul. Kolagen tipe I hadir dalam serat terorganisir dan ligamen jaringan, sedangkan kolagen tipe III umumnya ditemukan dalam jaringan areolar longgar. Komposisi tipe kolagen berbeda antara wanita dengan prolaps dan tidak prolaps. Secara umum, ekspresi kolagen tipe III memberikan dukungan struktural yang lebih lemah daripada tipe I kolagen, namun lebih tinggi pada ligamen uteri prolaps dibandingkan dengan ligamen uteri normal sehingga menyebabkan penurunan kekuatan ligamen (Ewies AA *et al* 2003). Pada kondisi pasca menopause (hipoestrogen) berpengaruh pada komposisi biomekanik, kualitas dan kuantitas kolagen. Terdapat banyak bukti hormon estrogen dapat meningkatkan sintesis kolagen (Jung HJ, 2007).

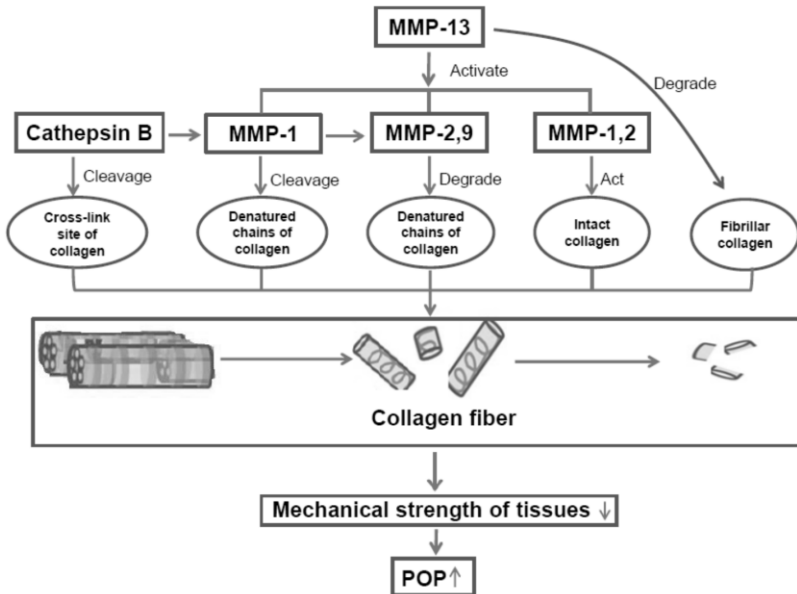
Hormon estrogen dapat meningkatkan ekspresi kolagen tipe I dan merusak kolagen tipe III di fibroblas sehingga mengarah peningkatan kekuatan otot. Kekuatan otot juga bisa ditingkatkan dengan meningkatkan ekspresi kolagen tipe I di jaringan organ panggul (Clark AL, *et al* 2005). Hormon estrogen juga dapat meningkatkan hubungan silang kolagen secara keseluruhan dan mengganti kolagen yang sudah tua dengan jaringan baru (Jackson S, *et al* 2005) (Gambar 3.1).



Sumber: Dikutip dari Jackson S. *et al*, 2005

Gambar 3.1. Estrogen dan Metabolisme Kolagen

Pada gambar 3.1 tampak hormon estrogen meningkatkan kekuatan otot dan jaringan ikat melalui ekspresi kolagen tipe I, keseluruhan cross-link konsentrasi kolagen dan deformasi kolagen tipe III. Sebaliknya, hormon estrogen menurunkan degradasi kolagen dan elastin melalui penurunan MMP dan meningkatkan cystatin C mRNA. Kolagen matriks dalam jaringan ikat umumnya terdegradasi oleh matriks metalloproteinase (MMPs), yang merupakan keluarga Zn-dependen tendopeptidases (Curran S, Muray GI 1999; Curran S, Muray GI 2000; Muray GI 2001; Visse R, Nagase H, 2004) (Gambar 3.2).



Sumber: Dikutip dari Leeman *et al*, 2002

Gambar 3.2 Matriksmetaloproteinase (MMP) Menurunkan Kolagen dalam Jaringan Penyokong Dasar Panggul. Peningkatan MMP dapat meningkatkan degradasi kolagen, sehingga kekuatan mekanik jaringan menurun yang mengarah terjadinya prolapse.

Matrik Metaloproteinase (MMP) adalah enzim protein degradasi dari kolagen. Semakin tinggi kadar MMP semakin besar proses degradasi pada kolagen. MMP memainkan peran penting dan bertanggung jawab terhadap pergantian kolagen. Ekspresi MMP dan aktifasinya dapat bervariasi sesuai dengan stimulus endogen dan lokal. Kerja MMP dibatasi oleh inhibitor MMP baik dari eksogen maupun endogen seperti Tissue Inhibitor MMP (TIMP). TIMP-1 merupakan inhibitor yang mengikat hampir semua MMP sehingga menghambat kerja MMP secara ireversibel. Fungsi MMP diatur dalam berbagai tingkat. Induksi ekspresi gen dikendalikan oleh jumlah faktor-faktor pertumbuhan, Transformation Growth Faktor (TGF) β dan glukokortikoid.

MMP-9 terikat pada kolagen tipe I melalui domain fibronectin yang berfungsi untuk menstabilisasi aktivitasnya (Ellerbroek *et al.*, 2001). Pada penelitian tentang efek penggunaan estrogen pada metabolisme kolagen vagina ditemukan adanya penurunan komposisi kolagen vagina berhubungan dengan peningkatan aktivitas proteinase disertai dengan peningkatan dari dua bentuk MMP-9 baik yang proaktif maupun aktif. Beberapa penelitian sebelumnya juga didapatkan hubungan silang antara estrogen dan jaringan ikat penyokong dasar panggul. Pengaruh estrogen pada jaringan ikat penyokong dasar panggul kemungkinan bergantung pada regulasi metabolisme kolagen (Kretowska *et al.*, 2011).

MMP-9 merupakan kontributor terbesar dalam remodelling jaringan sehingga sangat berkaitan dengan defek dasar panggul dengan cara mendegradasi elastin yang sangat penting dalam distensibilitas dasar panggul. MMP-9 akan memotong ikatan intermolekul melalui serangkaian reaksi kimia sehingga ikatan ini akan terpecah (Kontogiorgis *et al.*, 2005). Hasil yang sama pada wanita dengan prolaps memiliki kadar MMP-9 yang lebih tinggi dibandingkan dengan wanita yang tidak mengalami prolaps (Roh *et al.*, 2000). Penelitian lain juga menemukan ada hubungan antara peningkatan MMP-9 dengan penurunan kadar kolagen dalam struktur pendukung dasar panggul wanita dengan prolaps (Philips *et al.*, 2006). Hormon estrogen dapat menurunkan MMP-9 dan MMP-12 di dinding vagina, sehingga menyebabkan penurunan degradasi kolagen (Rahn D *et al.* 2014).

Menurut Rahn *et al.* (2008) ada bukti pengaruh distensi vagina (saat persalinan) terhadap homeostasis serat elastin pada dinding vagina. Dalam penelitiannya Rahn menggunakan balon simulasi partus dan mendapatkan peningkatan aktivitas ada MMP-9 pada dinding vagina baik pada hewan tikus yang bunting maupun tidak bunting yang terfragmentasi secara jelas pada dinding vagina. Disimpulkan distensi vagina merupakan potensi yang signifikan dalam patogenesis prolaps organ panggul.

B. Hormon Estrogen dan Elastin

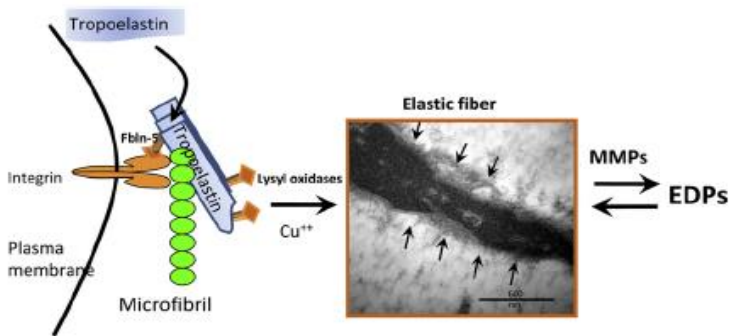
Elastin merupakan salah satu konstituen utama jaringan ikat di panggul. Berbeda dengan kekuatan kolagen, elastin berfungsi dalam fleksibilitas jaringan, ekstensi, ketahanan dan recoil (Liu X, *et al* 2006). Pada jaringan ikat yang berasal dari ligamen uterosakral dan dinding vagina wanita dengan prolaps ditemukan ekspresi elastin lebih rendah (Yamamoto K *et al* 1997; Goepel C 2008).

Serat elastin secara ultrastruktur terdiri dari 2 elemen besar yaitu komponen tidak berbentuk elastin dan komponen berbentuk seperti serat disebut mikrofibril. Mikrofibril berfungsi sebagai tempat melekatnya komponen tidak berbentuk elastin. Mikrofibril terdiri dari beberapa protein (termasuk fibrilin dan glikoprotein). Tropoelastin merupakan prekursor elastin yang dihasilkan dalam bentuk monomer oleh sel fibroblas dan sel otot polos. Tropoelastin disekresikan ke ekstraseluler dan berikatan dengan fibulin untuk pembentukan serat elastin yang baru.

Fibulin adalah protein yang berperan penting pada pembentukan serat elastin yang dihasilkan oleh glikoprotein. Fibulin akan bergabung kedalam matrik ekstra seluler fiber terdiri dari lima anggota keluarga, masing-masing saling overlapping namun berbeda pola ekspresinya. Dilaporkan Fibulin-5 sangat penting dalam pembentukan serat elastin yang baru karena akan menambatkan tropoelastin pada integrin di permukaan sel dan mengarahkan lokasi elastin ke mikrofibril. Beberapa studi terbaru mengidentifikasi fibulin-5 yang dikenal sebagai DANCE [Developing Arteries and Neural Crest Epidermal Growth Factor-Like Protein] atau EVEC [Embryonic Vascular Epidermal Growth Factor-Like Repeat-Containing Protein]. Selain sebagai protein yang fungsinya menghubungkan serat elastin pada sel, mengatur perakitan dan mengorganisir serat elastin, Fibulin-5 juga melokalisasi dan mengikat elastin pada permukaan serat elastin ke sel-sel melalui interaksi dengan integrin sebagai reseptor di

permukaan sel (Yanasigawa *et al*, 2002).

Residu lysin dari tropoelastin ini akan mengalami modifikasi membentuk ikatan kovalen dengan rantai tropoelastin lainnya untuk membentuk serat elastin matur yang dikelilingi mikrofibril. Ikatan kovalen ini mempunyai kemampuan besar untuk mengkerut dan meregang secara reversibel dengan diperantarai oleh Copper (Cu) dan dependen enzim ekstraseluler yang disebut Lysyl Oksidase (Gambar 3.3).



Sumber: Dikutip dari Kerchoff *et al*, 2009

Gambar 3.3 Peran Fibulin-5 dalam Pembentukan Serat Elastin. Tampak ikatan kovalen dengan rantai tropoelastin lainnya membentuk serat elastin matur yang dikelilingi mikrofibril.

Drewes *et al* (2007) melaporkan tikus percobaan dengan defisiensi fibulin -5 sebagian besar akan mengalami POP (96%) pasca persalinan pervaginam. Hal ini menunjukkan bahwa sintesa dan perakitan serat elastin sangat penting setelah persalinan pervaginam karena kelainan homeostasis serat elastin memainkan peran utama dalam patogenesis prolapse organ panggul. Hasil yang sama didapatkan penelitian Jung HJ *et al* (2009) yang melaporkan terjadi penurunan fibulin-5 pada penyokong dasar panggul pasien dengan prolaps vagina.

C. Hormon Estrogen dan Fibroblas

Jaringan ikat panggul terdiri dari fibroblas dikelilingi oleh matriks ekstraseluler (MES). Fungsi fibroblas adalah mensintesis kolagen dan glikosaminoglikans dari substansi dasar dengan mensekresi molekul prokolagen kedalam matriks intersel dan berpolimerasi menjadi mikrofibril yang terjadi diluar sitoplasma. Pada orang dewasa, fibroblas dalam jaringan ikat jarang mengalami pembelahan (mitosis) hanya terlihat bila memerlukan fibroblas lebih banyak, yaitu ketika jaringan ikat tersebut rusak (David, 1994). Fibroblas merombak matriks sekitarnya sebagai respon rangsangan mekanik dan biokimia untuk mempertahankan kekuatan MES. Pada jaringan yang prolaps, fibroblas memiliki kapasitas kontraktile yang lebih rendah dan mekanisme yang lebih lambat dibandingkan non-prolaps (Ruiz ZAM *et al* 2014; Ruiz ZAM *et al* 2016).

Fibroblas merupakan sel paling sering ditemukan didalam jaringan ikat yang bertanggung jawab pada sintesa serabut kolagen dan substansi dasar. Fibroblas mempunyai nukleus bulat besar dan berwarna merah muda dengan kromatin halus dan suatu nukleolus yang jelas. Sitoplasmanya penuh dengan retikulum endoplasmik dan aparatus Golgi. Hormon estrogen terbukti mempengaruhi sitoskeleton dan morfologi sel fibroblas dan terbukti dapat menekan remodeling yang berlebihan/ abnormal dengan memperbaiki sifat mekanik dari jaringan ikat. Hormon estrogen juga menjaga integritas dan fungsi fibroblas dalam jaringan ikat selama terjadi peregangan untuk mencegah dan mengobati prolaps organ panggul (Wang S *et al.* 2015).

GENISTEIN GLYCINE MAX (KEDELAI)

4.1 Kedelai (*Soybean*)

Kedelai (*Soybean*) adalah tanaman yang sudah dibudidayakan sejak 1500 tahun SM dan baru masuk Indonesia, terutama Jawa sekitar tahun 1750. Kedelai paling baik ditanam di ladang dan persawahan antara musim kemarau dan musim hujan. Tanaman kedelai mempunyai perawakan kecil dan tinggi batangnya dapat mencapai 75 cm. Bentuk daunnya bulat telur dengan kedua ujungnya membentuk sudut lancip dan bersusun tiga menyebar dalam satu untaian ranting yang menghubungkan batang pohon. Kedelai berbuah polong yang berisi biji-biji. Kulit luar buah polong maupun batang pohonnya mempunyai bulu-bulu yang kasar berwarna coklat.

Nama Lokal kedelai: Kedhele (Madura); Kedelai, Kacang jepun, Kacang bulu (Sunda), Lawui (Bima); Dele, Dangsul, Dekeman (Jawa), Retak Menjong (Lampung); Kacang Rimang (Minangkabau), Kadale (Ujung Pandang). Berbagai nama ini menunjukkan bahwa kedelai telah lama dikenal di Indonesia. Kedelai yang dibudidayakan terdiri dua spesies yaitu *Glycine Max* (disebut kedelai putih, yang bijinya bisa berwarna kuning, agak putih, atau hijau) dan *Glycine soja* (kedelai hitam, berbiji hitam). *Glycine max* merupakan tanaman asli daerah Asia subtropik seperti RRC dan Jepang Selatan, sementara *Glycine Soja* merupakan tanaman asli Asia tropis di Asia Tenggara. Tanaman ini telah menyebar ke Jepang, Korea, Asia Tenggara dan Indonesia.

Menurut Klasifikasi Tanaman Kedelai (Thomas, 1992)

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae
Ordo : Leguminales
Famili : Leguminosae
Marga : Glycine
Spesies : Glycine max (L.) Merrill



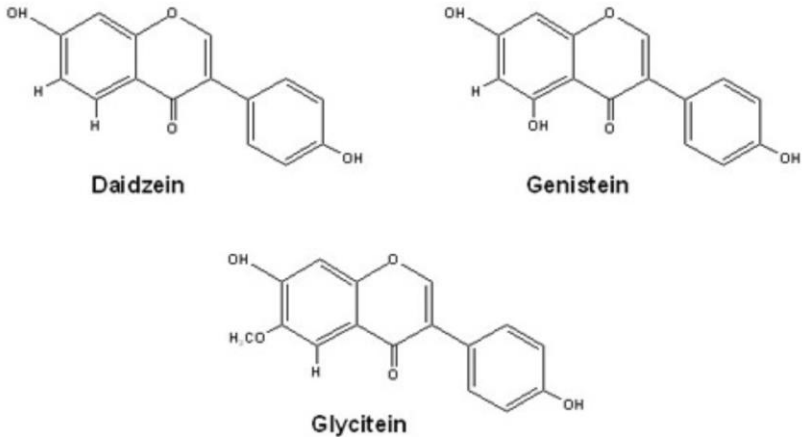
Sumber: Dikutip dari Thomas, 1992

Gambar 4.1. Kedelai (*soybean*)

Kedelai sudah lama dikonsumsi sebagai makanan dengan bukti beberapa aksi farmakologis termasuk dapat menurunkan gejala-gejala pascamenopause (Eden, 2012, Aquira *et al*, 2014) akibat adanya senyawa bioaktif isoflavon yang bermanfaat untuk menjaga dan memperbaiki sistem fisiologis maupun untuk pencegahan penyakit di masa pascamenopause (Cederoth *et al* 2012).

4.2 Isoflavon Kedelai

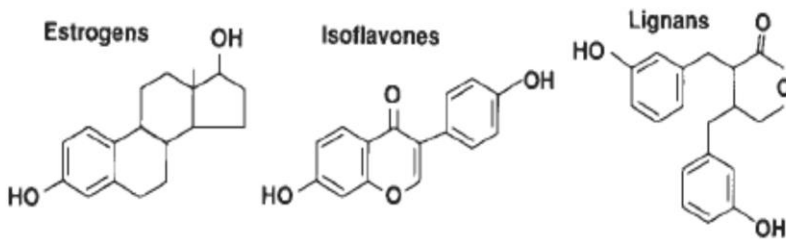
Unsur isoflavon utama dalam kedelai adalah genistein, glycitein dan daidzein. Pada kedelai spesies *Glycine Max* mengandung lebih banyak genistein dibandingkan dengan daidzein, meskipun rasio ini bervariasi pada produk kedelai yang berbeda (Barlow *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013).



Sumber: Dikutip dari Barlow *et al.*, 2007

Gambar 4.2 Struktur Kimia Isoflavon Kedelai

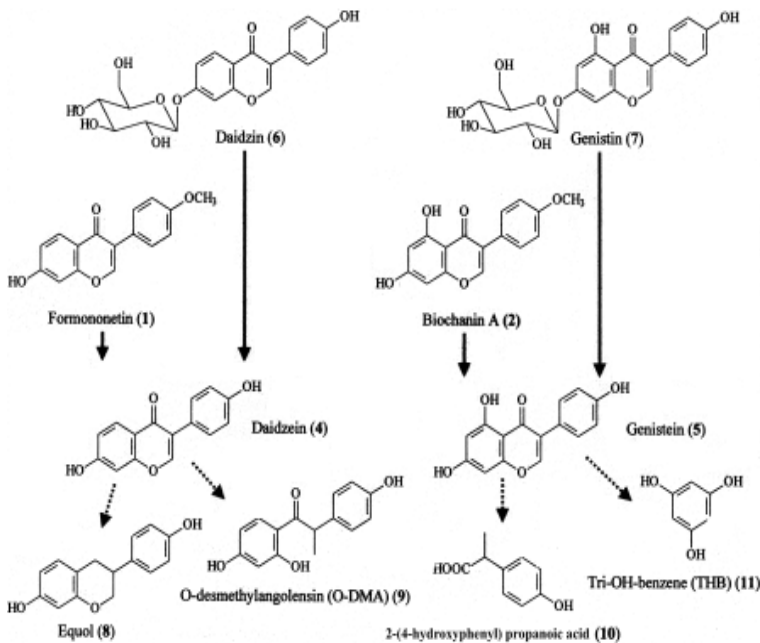
Isoflavon kedelai banyak ditemukan dalam bentuk tidak aktif sebagai glucoconjugate (bentuk glikosida yang berikatan dengan molekul gula). Bentuk aktifnya adalah aglycone, prosesnya dilakukan oleh bakteri intestinal kemudian diabsorpsi dari usus ke darah atau dimetabolisme lebih lanjut secara langsung di usus. Degradasi dari isoflavon kedelai terjadi di hati yang dikonjugasi dengan asam glukoronik menjadi molekul lebih kecil dan diekskresi dari dalam tubuh melalui urine atau empedu. Biosintesa isoflavon kedelai terjadi secara bertahap melalui sederetan senyawa antara yang digolongkan dalam senyawa metabolit sekunder dan digolongkan dalam satu kelompok senyawa khas yang hanya dapat ditemukan pada Family Leguminceae (kacang-kacangan). Isoflavon kedelai mempunyai struktur kimia yang sama dengan E2 (estradiol) dan mempunyai kemampuan berikatan dengan reseptor estrogen (RE).



Sumber: Dikutip dari Barlow *et al.*, 2007

Gambar 4.3 Struktur Kimia Estrogen dan Isoflavon Kedelai

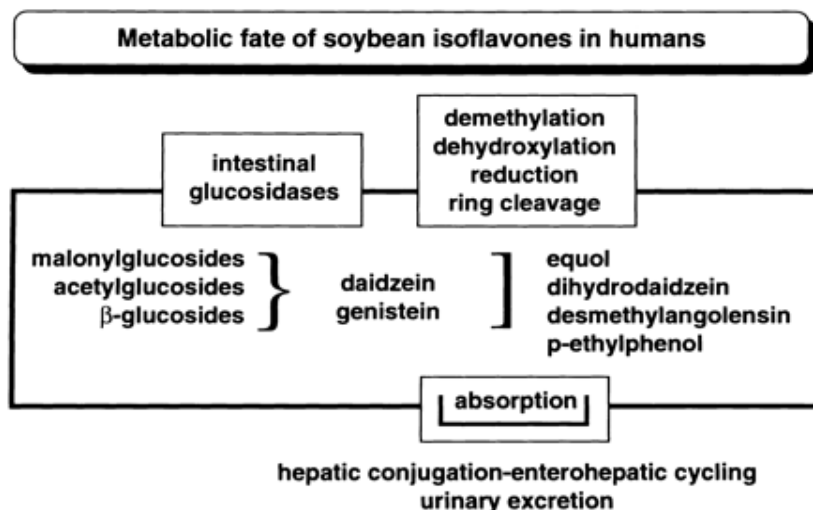
Mayoritas isoflavon tanaman dalam bentuk glikosida (yang berikatan dengan molekul gula), maka untuk mendapatkan efek biologiknya harus dipecah menjadi aglikon bebas gula. Dalam usus mengalami perpecahan sebanyak 1/3 akan diabsorpsi sebagai isoflavon bebas dan sebagian mengalami fermentasi oleh bakteri yang berada dalam usus besar dengan menjadi metabolit seperti Equol, Odesmethylangolensin (O-DMA) (dari daidzein), dan p-ethylphenol (dari genistein).



Sumber: Dikutip dari Paul *et al.*, 2003

Gambar 4.4 Formasi dan Biotransformasi Isoflavon Kedelai

Perubahan struktur isoflavon kedelai umumnya terjadi dalam usus dan hati. Dalam usus besar isoflavon kedelai dengan melalui proses reabsorpsi kemudian konjugasi dalam asam glukuronik atau sulfat lalu kembali diekskresi melalui saluran empedu untuk mengalami dekonjugasi oleh bakteri dan direabsorpsi kembali (Gambar 4.5.)



Sumber: Dikutip dari Paul *et al.*, 2003

Gambar 4.5 Metabolisme Isoflavon Kedelai pada Manusia

Isoflavon kedelai (*soybean*) mengandung gugus fenolik yang mempunyai kemampuan sebagai antioksidan kuat sehingga dapat mengurangi gejala menopause, baik dalam intensitas dan frekuensinya (Glaizer dan Bowman, 2001). Pengamatan ini diverifikasi melalui studi epidemiologi di daerah yang masyarakatnya mengkonsumsi kedelai (*soybean*) tinggi. Wanita Jepang memiliki 20% lebih sedikit yang mengalami gejala hot flushes bila dibandingkan dengan wanita Eropa karena wanita Jepang banyak konsumsi kedelai (Han *et al.*, 2002). Dilaporkan dalam konsumsi 50 sampai 80 mg isoflavon/hari selama satu tahun pada pascamenopause dapat mengurangi 40% sampai 50% keluhan hot flushes (Albertazzi dan Purdie, 2002).

Studi lain juga melaporkan ada penurunan yang signifikan hot flushes pada wanita yang mengkonsumsi isoflavon kedelai 50 mg/hari selama enam minggu (Scambia *et al.*, 2000). Hasil yang sama didapatkan pada penelitian terhadap 190 wanita menopause, bahwa isoflavon kedelai tidak hanya menghilangkan gejala hot flushes saja, tetapi juga gejala lain seperti gangguan tidur, kecemasan, depresi, kekeringan vagina, kehilangan libido dan nyeri tulang dengan mengkonsumsi isoflavon 35 mg/hari dalam dua dosis selama empat bulan (Aqira & Borbosa, 2014).

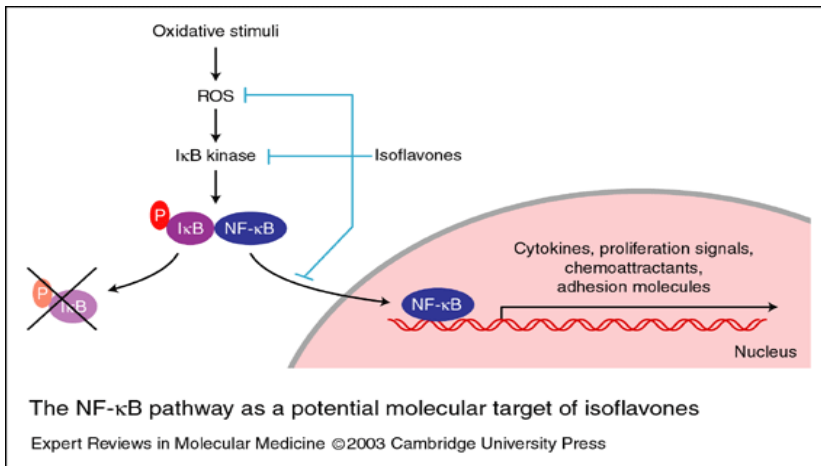
Isoflavon kedelai mengikat reseptor estrogen (RE) karena strukturnya memiliki kesamaan dengan 17- β -estradiol. Isoflavon bekerja sebagai agonis dari RE, tetapi aktivitasnya lebih rendah dari 17- β -estradiol. Pada jumlah yang cukup tinggi (lebih dari 100 nmol/l untuk genistein), pengaruh isoflavon dapat mendekati efek 17- β -estradiol pada tingkat fisiologisnya. Pengaruh isoflavon juga tergantung tingkat estradiol endogen, karena isoflavon dan estradiol bersaing untuk berikatan dengan RE.

Menurut Chen *et al.*, (2007) reseptor estrogen pada dinding vagina menurun pada wanita pascamenopause dibanding premenopause. Dalam keadaan tingkat estrogen endogen tinggi (misalnya wanita dalam fase folikuler dari siklus menstruasi), isoflavon dapat menghambat aktivitas penuh estrogen dengan menduduki bagian dari RE. Pada keadaan tingkat estrogen endogen rendah (setelah ovariectomi), aktivitas estrogen isoflavon dapat menjadi nyata. Dalam konteks inilah, isoflavon menjadi semakin sering digunakan sebagai alternatif pada terapi hormon pada wanita post menopause terutama dalam kasus pemberian jangka panjang (Pilsavoka *et al.*, 2010)

Dosis dan lama pemberian isoflavon tidak berhubungan linier dengan pengaruh pengobatan. Isoflavon bekerja dengan menghambat aktivitas 5 α -reduktase, mengkatalisis konversi testosteron menjadi 5 α -dihidrotestosteron dan aromatase P450, menengahi konversi testosteron ke estradiol. Dilaporkan bahwa aktivitas aromatase dihambat pada konsentrasi rendah isoflavon,

namun bila tingkat isoflavon tinggi akan meningkatkan aktivitas enzim ini untuk merangsang sintesa Sex Hormon Binding Globulin (SHBG) sehingga mengakibatkan perubahan pada konsentrasi hormon steroid yang bersirkulasi dalam tubuh. Hal ini dapat dijelaskan dengan peningkatan sintesis SHBG yang meningkatkan penyerapan testosteron bebas, yang perannya dapat merangsang produksi testosteron. Oleh karena itu, pada peningkatan konsentrasi testosteron total dalam serum maka tingkat testosteron bebas mungkin tidak berubah. Pada wanita, diet kaya isoflavon menurunkan atau malah tidak mempengaruhi kadar testosteron dalam serum.

Pada tikus normal (tanpa ovariektomi), tidak ada perubahan tingkat estradiol yang dilaporkan setelah pemberian isoflavon, namun peningkatan kadar estradiol serum ditemukan pada tikus yang diovariektomi. Apabila isoflavon kedelai diberikan pada perempuan pascamenopause, maka genistein akan diikat oleh reseptor di permukaan sel epitel. Ikatan antara genistein dengan reseptornya akan terjadi hantaran sinyal intraseluler yang dimulai aktivasi enzim (fosfolipase-C). Enzim ini akan mengubah fosfatidyl inositol di fosfat (PI-2p) menjadi fosfatidil inositol tri fosfat (PI-3p). Reseptor PI-3p ini berada di permukaan endoplasmik retikulum (ER). Ikatan antara PI-3p dengan reseptornya dipermukaan endoplasmik retikulum, mengakibatkan calcium gate open, sehingga ion kalsium akan dilepas ke daerah sitosolik, yang mengakibatkan terjadi peningkatan ion kalsium intraseluler. Ion kalsium tersebut akan berikatan dengan kalsineurin di dalam sitosolik. Keberadaan kalsineurin kompleks ini akan menghambat aktivitas dari Inhibitor kapa beta ($I\kappa\beta$), sehingga nuclear factor kappa beta (NF κ - β), mengalami translokasi ke inti sel dan akan memicu proses transkripsi (Gambar 4.6) (Alexande *et al*, 2002, Shakir dan Derek, 2002)



Sumber: Dikutip dari Alexande *et al.*, 2002; Shakir & Derek, 2004

Gambar 4.6 NF-κB Pathway. Tampak isoflavon menghambat ROS dan aktivitas dari Inhibitor kapa beta (Iκ-β) sehingga nuclear factor kappa beta (NF-κβ) mengalami translokasi ke inti sel yang memicu proses transkripsi.

Nuclear Factor Kappa β (NF-κβ) adalah kompleks protein yang mengendalikan transkripsi DNA dan ditemukan di hampir semua jenis sel dan terlibat dalam respons seluler terhadap rangsang seperti stres, sitokin, radikal bebas, radiasi ultra violet, antigen bakteri atau virus (Gilmore, 2006; Perkin, 2007). NF-κβ terdapat dalam sitoplasma sel hampir seluruhnya dalam bentuk tidak aktif dan terikat dengan protein penghambat (inhibitor protein) IκBα. Melalui reseptor membran intergral berbagai sinyal ekstraseluler isoflavon dapat mengaktifkan enzim IκB kinase (IKK) yang pada gilirannya memfosforilasi protein IκBα. NF-κβ yang diaktifkan kemudian ditranlokasi ke nukleus dengan mengikat sekuens tertentu dari DNA yang disebut dengan respon element. Kompleks DNA NF-κβ kemudian merekrut protein lain seperti coactivator promoterase dan RNA polimerase yang mentranskripsi DNA menjadi mRNA dan ditranslasikan kedalam protein yang menyebabkan perubahan fungsi sel (Glimore, 2006).

Dalam regulasi respons seluler adalah NF- κ B termasuk dalam kategori faktor transkripsi primer, dimana faktor transkripsi yang terdapat pada sel berada dalam keadaan tidak aktif dan tidak memerlukan sintesis protein baru agar dapat diaktifkan. Dalam sel yang tidak terstimulasi NF- κ B akan diasingkan di sitoplasma oleh inhibitor yang disebut I κ B (inhibitor of κ B). Protein I κ B menutupi Nuclear Localization Signals (NLS) dari protein NF- κ B dan menjaga NF- κ B tetap berada dalam keadaan tidak aktif di dalam sitoplasma.

Aktivasi NF- κ B diinisiasi oleh sinyal yang menginduksi degradasi protein I κ B sehingga kompleks NF- κ B bebas memasuki inti sel sehingga NF- κ B dapat mengaktifkan ekspresi gen tertentu yang mengikat sisi DNA yang berada di dekat NF- κ B. Pengaktifan gen oleh NF- κ B ini mengarah pada munculnya respons fisiologis misalnya respon peradangan atau respons imun. Untuk respon bertahan hidup atau proliferasi sel, NF- κ B mengaktifkan ekspresi reseptornya sendiri yakni I κ B α untuk menghambat kembali NF- κ B. Dengan demikian tercipta umpan balik otomatis, yang akan menghasilkan tingkat osilasi aktivitas dari NF- κ B (Nelson *et al.*, 2004).

EFEK GENISTEIN GLYCINE MAX (KEDELAI) DAN UJI ANALISIS JALUR (PATCH ANALYSIS)

Bukti pengaruh Genistein Glycine Max (Kedelai) terhadap perbaikan atrofi vagina pascamenopause dapat dibagi 5 kelompok pengamatan dengan masing-masing kelompok terdiri 5 ekor tikus Wistar, yaitu antara lain:

1. kelompok kontrol negatif (tikus post partum kebuntingan ke 3 pada hari ke 56 tanpa diovariectomi);
2. kelompok kontrol positif (tikus postpartum kebuntingan ke 3 pada hari ke 56 pasca diovariectomi + injeksi oil selama 28 hari per injeksi subcutaneus);
3. kelompok P1 (tikus bunting ke 3 pada hari ke 56 pasca diovariectomi + diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus);
4. kelompok P2 (tikus postpartum bunting ke 3 pada hari ke 56 pasca diovariectomi + diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.09 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus)
5. kelompok P3 (tikus postpartum bunting ke 3 pada hari ke 56 pasca diovariectomi + diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.18 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus).

Mengingat kedua variabel tersebut berskala rasio maka pendekatan statistik yang digunakan adalah statistika parametrik. Sebelum dianalisis dengan uji statistika parametrik digunakan maka terlebih dahulu data diuji apakah sebaran data mengikuti distribusi normal atau tidak, karena ukuran sampel yang digunakan termasuk kecil ($n = 5$). Untuk uji normalitas dilakukan

dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk, berikut hasil ekspresi RE- β , TGF- β , Fibulin-5, α Actin, Proliferasi Epitel, Hsp-70 dan Kadar MMP-9 pada dinding vagina tikus wistar yang tanpa intervensi dan yang mengalami intervensi dengan penyuntikan intracutaneus beberapa dosis Genistein Glycine Max (Kedelai).

5.1 Ekspresi RE- β

Pada analisis uji Shapiro-Wilk dijelaskan secara rinci pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.1.1 Uji Normalitas Data Ekspresi RE- β

Kelompok Pengamatan	p-value	Distribusi
kontrol (-)	0.547	normal
kontrol (+) (OVX)+ oil	0.776	normal
P1 (OVX + Gen 0.045 mg)	0.662	normal
P2 (OVX + Gen 0.09 mg)	0.789	normal
P3 (OVX + Gen 0.18 mg)	0.785	normal

Keterangan: Jika p-value<0.05 berarti data tidak berdistribusi normal dan jika p-value>0.05 berarti data berdistribusi normal.

Tabel 5.1.1 menunjukkan analisis data hasil uji Shapiro-Wilk diperoleh bahwa data ekspresi RE- β pada dinding vagina untuk masing-masing kelompok pengamatan telah menunjukkan nilai p-value yang semuanya lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$. Jadi semua data telah memenuhi uji prasyarat parametrik, yaitu data terbukti tersebar mengikuti distribusi normal. Selanjutnya data telah siap dianalisis lebih lanjut dengan uji statistika parametrik guna membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan.

Pada hasil uji perbandingan kelompok kontrol negatif (tikus postpartum bunting ke-3 dan tanpa ovariektomi) dengan kontrol positif (tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi) data ekspresi RE- β pada dinding vagina dengan menggunakan uji t (independent sample t test) ditunjukkan secara ringkas seperti tampak tabel di bawah ini.

Tabel 5.1.2 Hasil Perbandingan Antarkelompok Kontrol

Variabel	Kontrol negatif Rerata ± SD	Kontrol positif Rerata ± SD	p-value
ekspresi RE- β	82.71±11.18	59.73±3.30	0.002 < α

Keterangan: Jika p-value<0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan jika p-value>0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna.

Pada tabel 5.1.2 berdasarkan hasil uji t (independent sample t test) menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ($p=0.002<\alpha$) rerata konsentrasi ekspresi RE-β antara kelompok kontrol negatif (82.71±11.18 %) dengan kelompok kontrol positif (59.73±3.30 %). Berdasarkan nilai reratanya ekspresi RE-β tampak pada kelompok kontrol negatif lebih besar nilainya bila dibandingkan dengan rerata ekspresi RE-β pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi akan menunjukkan nilai rerata ekspresi RE-β yang lebih kecil bila dibandingkan dengan tikus postpartum bunting ke-3 yang tanpa ovariektomi. Berdasarkan hasil uraian di atas maka dapat dikatakan bahwa perlakuan pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi terbukti menunjukkan penurunan ekspresi RE-β.

Berdasarkan hasil uji Anova *one way* pada data ekspresi RE-β pada dinding vagina diperoleh ada perbedaan yang bermakna keempat kelompok sampel pengamatan, hal ini ditunjukkan dengan nilai p-value = 0.000<α. Analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (Multiple Comparisons) dengan uji Beda Nyata Terkecil/BNT (Least Significant Difference/LSD) diperoleh dan ditunjukkan secara lengkap pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.1.3 Perbandingan Ekspresi RE- β

Kelompok Pengamatan	Rerata \pm SD	p-value
kontrol (+) (OVX)+oil	59.73 \pm 3.30a	0.000 $<$ α
P1 (OVX + Gen 0.045 mg)	70.27 \pm 3.43b	
P2 (OVX + Gen 0.09 mg)	79.00 \pm 5.75c	
P3 (OVX + Gen 0.18 mg)	82.34 \pm 5.75c	

Keterangan: Pada rerata \pm SD menunjukkan hasil uji LSD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (p-value $<$ 0.05) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna (p-value $>$ 0.05).

Pada tabel 5.1.3 berdasarkan hasil uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi RE- β antara kelompok kontrol positif (59.73 \pm 3.30a %) dengan kelompok P1 (70.27 \pm 3.43b %), berbeda pula dengan kelompok P2 (79.00 \pm 5.75c %), dan juga berbeda bermakna dengan kelompok P3 (82.34 \pm 5.75c %). Bila berdasarkan nilai rerata ekspresi RE- β tampak ada peningkatan pada kelompok P1, P2, maupun P3, bila dibandingkan dengan kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg, dosis 0.09 mg, maupun dosis 0.18 mg selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan meningkatkan ekspresi RE- β . Tampak semakin tinggi dosis yang diberikan semakin besar nilai rerata ekspresi RE- β . Jadi dapat dikatakan bahwa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi mampu meningkatkan ekspresi RE- β . Demikian pula ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi RE- β antara kelompok P1 (70.27 \pm 3.43b %) dengan kelompok P2 (79.00 \pm 5.75c %), dan dengan kelompok P3 (82.34 \pm 5.75c %).

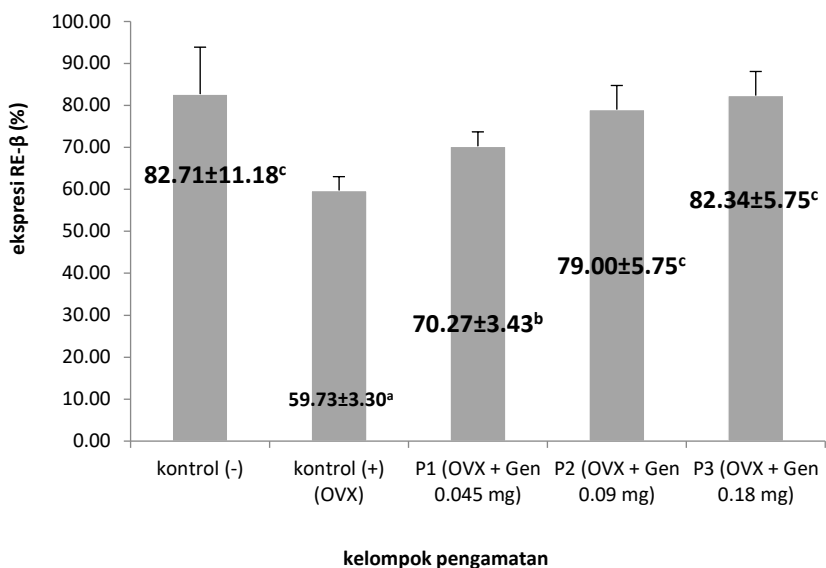
Bila berdasarkan nilai reratanya tampak rerata ekspresi RE- β ketiga kelompok tersebut semakin meningkat seiring dengan peningkatan dosis Genistein Glycine Max (*Soybean*) yang diberikan pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi. Jadi dengan kata lain ketiga dosis tersebut sama-sama mampu meningkatkan

ekspresi RE- β pada tikus postpartum bunting ke 3 yang ovariektomi.

Tidak ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi RE- β antara kelompok P2 ($79.00 \pm 5.75c$ %) dengan kelompok P3 ($82.34 \pm 5.75c$ %). Bila berdasarkan nilai reratanya tampak rerata kedua kelompok tersebut nilainya berdekatan satu sama lain. Jadi dengan kata lain kedua dosis tersebut memiliki kemampuan yang sama atau memberi pengaruh yang sama, yaitu mampu meningkatkan ekspresi RE- β pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi.

Berdasarkan uraian hasil dari tabel 5.1.3 di atas maka dapat diartikan bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg/kgbb/hari, dosis 0.09 mg/kgbb/hari dan dosis 0.18 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan berpengaruh terhadap ekspresi RE- β , yaitu mampu meningkatkan ekspresi RE- β .

Jadi hipotesis pertama terbukti, yaitu pemberian genistein dapat meningkatkan ekspresi RE- β pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi. Selanjutnya rerata ekspresi RE- β pada kelima kelompok sampel tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram (diagram batang) di bawah ini.

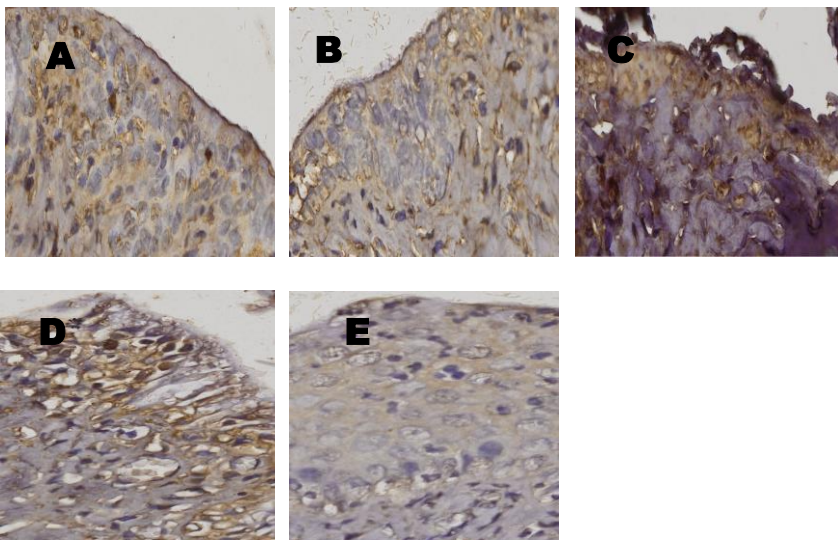


Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 5.1.1 Histogram Rerata Ekspresi RE-β

Pada gambar 5.1.1 tampak batang rerata ekspresi RE-β tikus postpartum bunting ke-3 tanpa ovariektomi (kelompok kontrol negatif) tertinggi dibandingkan dengan kelompok yang lainnya. Hal ini berarti bahwa perlakuan ovariektomi pada tikus postpartum bunting ke-3 mampu menurunkan ekspresi RE-β. Akan tetapi tampak ada peningkatan rerata ekspresi RE-β pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg, dosis 0.09 mg, maupun dosis 0.18 mg selama 28 hari per injeksi subcutaneus. Pada histogram rerata ekspresi RE-β kelompok kontrol negatif menunjukkan ada perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol positif dan juga dengan kelompok P1, P2, dan P3. Hal ini dapat dikatakan bahwa tikus postpartum bunting ke-3 tanpa ovariektomi dan tanpa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) menunjukkan rerata ekspresi RE-β lebih tinggi dibandingkan yang lain.

Sedangkan kelompok P3 menunjukkan rerata ekspresi RE- β yang mendekati nilai rerata ekspresi RE- β kelompok kontrol negatif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke-3 yang diovariectomi dan beri Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.18 mg selama 28 hari per injeksi subcutaneous akan mampu meningkatkan ekspresi RE- β . Dari histogram diatas disimpulkan pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.18mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneous pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariectomi merupakan dosis efektif dalam meningkatkan ekspresi RE- β . Adapun hasil pemeriksaan imunohistokimia didapatkan perbedaan Ekspresi RE- β pada epitel vagina sebagai berikut:



Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 5.1.2 Perbedaan Ekspresi RE- β pada epitel vagina

Keterangan: A=control negative. B=control positif, C=perlakuan dosis 1. D=perlakuan dosis 2. E=perlakuan dosis 3

Pada gambar 5.2 Tampak peningkatan ekspresi RE- β pada kelompok perlakuan yang diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 x. Dengan menggunakan metode pewarnaan imunohistokimia ekspresi RE- β yang ditunjukkan dengan warna coklat. Pecitraan hasil

pengamatan lalu diunggah untuk selanjutnya diolah menggunakan aplikasi imunoratio yang menghasilkan berupa presentasi area.

5.2 Kadar Estradiol (E2)

Pada analisis uji Shapiro-Wilk dijelaskan secara rinci tampak pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.2.1 Uji Normalitas Data Kadar Estradiol (E2)

Kelompok pengamatan	p-value	distribusi
	Kadar estradiol(E2)	
kontrol (-)	0.518	normal
kontrol (+) (OVX) (+) oil	0.369	normal
P1 (OVX + Gen 0.045 mg)	0.704	normal
P2 (OVX + Gen 0.09 mg)	0.830	normal
P3 (OVX + Gen 0.18 mg)	0.069	normal

Keterangan: Jika $p\text{-value} < 0.05$ berarti data tidak berdistribusi normal dan jika $p\text{-value} > 0.05$ berarti data berdistribusi normal.

Pada tabel 5.2.1 menunjukkan analisis data hasil uji Shapiro-Wilk diperoleh bahwa data kadar E2 (ng/L) untuk masing-masing kelompok pengamatan telah menunjukkan nilai p-value yang semuanya lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$. Jadi semua data telah memenuhi uji prasyarat parametrik, yaitu data terbukti tersebar mengikuti distribusi normal. Selanjutnya data telah siap dianalisa lebih lanjut dengan uji statistika parametrik guna membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan.

Pada hasil uji perbandingan kelompok kontrol negatif (tikus postpartum bunting ke-3 dan tanpa ovariektomi) dengan kontrol positif (tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi) data kadar E2 dengan menggunakan uji t (independent sample t test) ditunjukkan secara ringkas seperti tampak tabel di bawah ini.

Tabel 5.2.2. Perbandingan Antarkelompok Kontrol

Variabel	Kontrol Negatif Rerata ± SD	Kontrol Positif Rerata ± SD	p-value
Kadar E2	206.5±10.6	187.0±14.1	0.039 < α

Keterangan: Jika p-value<0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan jika p-value>0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna.

Pada tabel 5.2.2. berdasarkan hasil uji t (independent sample t test) menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ($p=0.039<\alpha$) rerata kadar E2 antara kelompok kontrol negatif (206.5±10.6 ng/L) dengan kelompok kontrol positif (187.0±14.1 ng/L). Berdasarkan nilai reratanya kadar E2 tampak pada kelompok kontrol negatif lebih besar nilainya bila dibandingkan dengan rerata kadar estradiol-2 pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi akan menunjukkan nilai rerata kadar E2 yang lebih rendah bila dibandingkan dengan tikus postpartum bunting ke-3 yang tanpa ovariektomi. Berdasarkan hasil uraian di atas maka dapat dikatakan bahwa perlakuan pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi terbukti menunjukkan penurunan kadar E2.

Berdasarkan hasil uji Anova *one way* pada data kadar estradiol (E2) diperoleh ada perbedaan yang bermakna keempat kelompok sampel pengamatan, hal ini ditunjukkan dengan nilai p-value = 0.000< α . Analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (Multiple Comparisons) dengan uji Beda Nyata Terkecil/BNT (Least Significant Difference/LSD) diperoleh dan ditunjukkan secara lengkap pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.2.3 Perbandingan Kadar E2

Kelompok pengamatan	Rerata ± SD	p-value
kontrol (+) (OVX) + oil	187.0±14.1a	0.000< α
P1 (OVX + Gen 0.045 mg)	214.6±18.7b	
P2 (OVX + Gen 0.09 mg)	245.9±8.1c	
P3 (OVX + Gen 0.18 mg)	252.9±19.0c	

Keterangan: Pada rerata±SD menunjukkan hasil uji LSD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (p-value<0.05) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna (p-value>0.05).

Pada tabel 5.2.3 berdasarkan hasil uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata kadar estradiol-2 antara kelompok kontrol positif (187.0±14.1a ng/L) dengan kelompok P1 (214.6±18.7b ng/L). Bila berdasarkan nilai rerata kadar E2 tampak ada peningkatan pada kelompok P1 bila dibandingkan dengan kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan berpengaruh terhadap kadar E2, yaitu mampu meningkatkan kadar E2 bila dibandingkan dengan tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi tanpa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*).

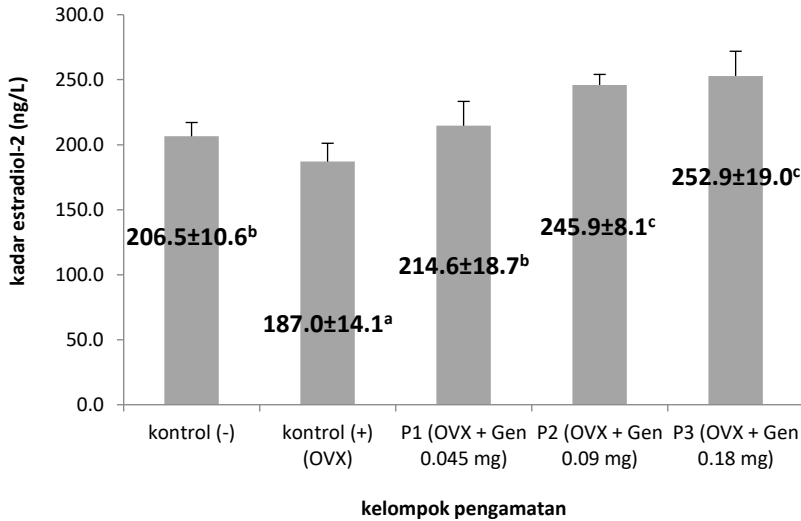
Tampak pada tabel 5.2.3 menunjukkan hasil yang sama yaitu ada perbedaan yang bermakna rerata kadar estradiol-2 antara kelompok kontrol positif (187.0±14.1a ng/L) dengan kelompok P2 (245.9±8.1c ng/L), juga berbeda dengan kelompok P3 (252.9±19.0c ng/L). Bila berdasarkan nilai reratanya tampak ada peningkatan pada kelompok P2 maupun pada P3 bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.09 mg/kgbb/hari maupun dosis 0.18 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan berpengaruh terhadap kadar E2, yaitu mampu meningkatkan kadar E2 bila dibandingkan dengan tikus postpartum bunting ke-3

dan ovariectomi tanpa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*).

Berdasarkan uraian hasil dari tabel 7.3 di atas maka dapat diartikan bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariectomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg/kgbb/hari, dosis 0.09 mg/kgbb/hari dan dosis 0.18 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan berpengaruh terhadap kadar E2, yaitu mampu meningkatkan kadar E2 dalam darah.

Hasil penelitian nilai rerata kadar E2 menunjukkan ada perbedaan yang bermakna antara kelompok P1 ($214.6 \pm 18.7b$ ng/L) dengan kelompok P2 ($245.9 \pm 8.1c$ ng/L) maupun dengan kelompok P3 ($252.9 \pm 19.0c$ ng/L), tetapi antara kelompok P2 tidak berbeda bermakna dengan kelompok P3. Tampak bahwa semakin tinggi dosis Genistein Glycine Max (*Soybean*) yang diberikan semakin besar rerata kadar E2 pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariectomi.

Selanjutnya rerata kadar E2 dalam darah pada kelima kelompok sampel tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram (diagram batang) di bawah ini.



Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 5.2.1 Histogram Rerata Kadar E2

Pada gambar 5.2.1 menunjukkan histogram rerata kadar E2 pada kelompok kontrol negatif (tikus postpartum bunting ke-3 dan tanpa ovariektomi), kontrol positif (tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi), P1 (tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus), P2 (tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.09 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus), dan P3 (tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.18 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus).

Tampak ada penurunan rerata kadar E2 pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi dibandingkan dengan tikus postpartum bunting ke-3 tanpa ovariektomi. Hal ini berarti bahwa perlakuan ovariektomi pada tikus postpartum bunting ke-3 mampu menurunkan kadar E2. Ada peningkatan rerata kadar E2 pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg, dosis 0.09 mg, maupun dosis 0.18 mg selama 28 hari per injeksi subcutaneus

dibandingkan dengan tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariectomi tanpa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*).

Pada histogram rerata kadar E2 kelompok kontrol negatif menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna dengan kelompok P1. Hal ini dapat dikatakan bahwa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariectomi merupakan dosis efektif dalam meningkatkan kadar E2.

5.3 Ekspresi Proliferasi Epitel

Pada analisis uji Shapiro-Wilk dijelaskan secara rinci tampak pada tabel di bawah ini:

Tabel 5.3.1 Uji Normalitas Data Proliferasi Epitel

Kelompok Pengamatan	p-value	Distribusi
kontrol (-)	0.175	normal
kontrol (+) (OVX)+oil	0.521	normal
P1 (OVX + Gen 0.045 mg)	0.831	normal
P2 (OVX + Gen 0.09 mg)	0.216	normal
P3 (OVX + Gen 0.18 mg)	0.266	normal

Keterangan: Jika p-value<0.05 berarti data tidak berdistribusi normal dan jika p-value>0.05 berarti data berdistribusi normal.

Pada tabel 5.3.1 menunjukkan analisis data hasil uji Shapiro-Wilk diperoleh bahwa data proliferasi epitel untuk masing-masing kelompok pengamatan telah menunjukkan nilai p-value yang semuanya lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$. Jadi semua data telah memenuhi uji prasyarat parametrik, yaitu data terbukti tersebar mengikuti distribusi normal. Selanjutnya data telah siap dianalisis lebih lanjut dengan uji statistika parametrik guna membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan.

Pada hasil uji perbandingan kelompok kontrol negatif (tikus postpartum bunting ke-3 dan tanpa ovariektomi) dengan kontrol positif (tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi) data proliferasi epitel dengan menggunakan uji t (independent sample t test) ditunjukkan secara ringkas seperti tampak tabel di bawah ini.

Tabel 5.3.2 Hasil Perbandingan Antarkelompok Kontrol

Variabel	Kontrol Negatif Rerata ± SD	Kontrol Positif Rerata ± SD	p-value
proliferasi epitel	150.94±36.28	36.76±8.05	0.000 < α

Keterangan: Jika p-value<0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan jika p-value>0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna.

Pada tabel 5.3.2 berdasarkan hasil uji t (independent sample t test) menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ($p=0.000<\alpha$) rerata proliferasi epitel antara kelompok kontrol negatif (150.94±36.28 μm) dengan kelompok kontrol positif (36.76±8.05 mm). Berdasarkan nilai reratanya proliferasi epitel tampak pada kelompok kontrol negatif lebih besar nilainya bila dibandingkan dengan rerata proliferasi epitel pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi akan menunjukkan nilai rerata proliferasi epitel yang menipis bila dibandingkan dengan tikus postpartum bunting ke-3 yang tanpa ovariektomi. Berdasarkan hasil uraian di atas maka dapat dikatakan bahwa perlakuan pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi terbukti menunjukkan penurunan proliferasi epitel.

Berdasarkan hasil uji Anova one way pada data proliferasi epitel diperoleh ada perbedaan yang bermakna keempat kelompok sampel pengamatan, hal ini ditunjukkan dengan nilai p-value = 0.000< α . Analisa dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (Multiple Comparisons) dengan uji Beda Nyata Terkecil/BNT (Least Significant Difference/LSD) diperoleh dan ditunjukkan secara lengkap pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.3.3 Perbandingan Proliferasi Epitel

Kelompok Pengamatan	Rerata ± SD	p-value
kontrol (+) (OVX)+oil	36.76±8.05a	0.000<α
P1 (OVX + Gen 0.045 mg)	59.58±9.04b	
P2 (OVX + Gen 0.09 mg)	90.10±13.27c	
P3 (OVX + Gen 0.18 mg)	112.28±21.96d	

Keterangan: Pada rerata±SD menunjukkan hasil uji LSD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (p-value<0.05) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna (p-value>0.05).

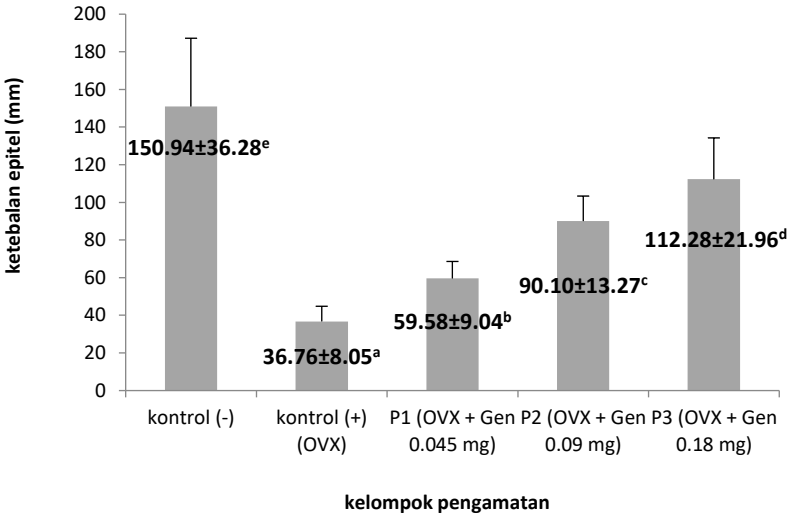
Pada tabel 5.3.3 berdasarkan hasil uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata proliferasi epitel antara kelompok kontrol positif (36.76±8.05a µm) dengan kelompok P1 (59.58±9.04b µm), berbeda pula dengan kelompok P2 (90.10±13.27c µm), dan juga berbeda bermakna dengan kelompok P3 (112.28±21.96d µm). Bila berdasarkan nilai rerata proliferasi epitel tampak ada peningkatan pada kelompok P1, P2, maupun P3, bila dibandingkan dengan rerata proliferasi epitel pada kelompok kontrol positif.

Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariectomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg, dosis 0.09 mg, maupun dosis 0.18 mg selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan meningkatkan proliferasi epitel. Tampak semakin tinggi dosis yang diberikan semakin meningkat proliferasi epitel. Jadi dapat dikatakan bahwa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariectomi mampu meningkatkan proliferasi epitel.

Demikian pula ada perbedaan yang bermakna rerata proliferasi epitel antara kelompok P1 (59.58±9.04b µm) dengan kelompok P2 (90.10±13.27c µm), juga tidak berbeda dengan kelompok P3 (112.28±21.96d µm). Demikian juga antara kelompok P2 ada perbedaan yang bermakna rerata proliferasi epitel dengan kelompok P3. Bila berdasarkan nilai reratanya tampak rerata proliferasi epitel ketiga kelompok tersebut semakin meningkat

seiring dengan peningkatan dosis Genistein Glycine Max (*Soybean*) pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi. Jadi dengan kata lain ketiga dosis tersebut sama-sama mampu meningkatkan proliferasi epitel pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi

Berdasarkan uraian hasil dari tabel 5.3.3 di atas maka dapat diartikan bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg/kgbb/hari, dosis 0.09 mg/kgbb/hari dan dosis 0.18 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan berpengaruh terhadap proliferasi epitel, yaitu mampu meningkatkan proliferasi epitel. Selanjutnya rerata proliferasi epitel pada kelima kelompok sampel tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram (diagram batang) di bawah ini.



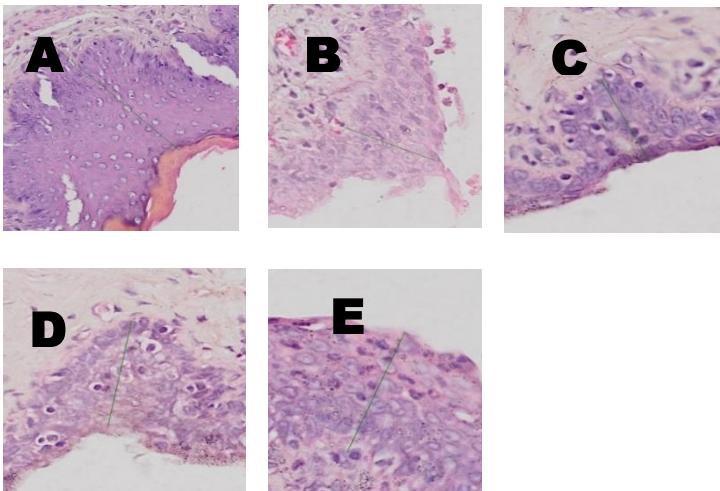
Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 5.3.1 Histogram Rerata Proliferasi Epitel

Pada gambar 5.3.1 tampak batang rerata proliferasi epitel tikus postpartum bunting ke-3 tanpa ovariektomi (kelompok kontrol negatif) tertinggi dibandingkan dengan kelompok yang lainnya. Hal ini berarti bahwa perlakuan ovariektomi pada tikus

postpartum bunting ke-3 mampu menurunkan proliferasi epitel. Akan tetapi tampak ada peningkatan rerata proliferasi epitel pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg, dosis 0.09 mg, maupun dosis 0.18 mg selama 28 hari per injeksi subcutaneus. Pada histogram rerata proliferasi epitel kelompok kontrol negatif menunjukkan ada perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol positif dan juga dengan kelompok P1, P2, dan P3. Hal ini dapat dikatakan bahwa tikus postpartum bunting ke-3 tanpa ovariektomidan tanpa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) menunjukkan epitel yang berproliferasi dibandingkan yang lain.

Sedangkan kelompok P3 menunjukkan rerata proliferasi epitel yang mendekati nilai rerata proliferasi epitel kelompok kontrol negatif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke-3 yang diovariektomi dan beri Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.18 mg/kkbb/hr selama 28 hari per injeksi subcutaneus merupakan dosis efektif meningkatkan proliferasi epitel. Hasil pewarnaan HE didapatkan perbedaan ketebalan/proliferasi epitel sebagai berikut:



Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 5.3.2 Perbedaan Proliferasi Epitel

Keterangan: A=control negatif. B=control positif. C=perlakuan dosis 1. D=perlakuan dosis 2. E=perlakuan

Pada gambar 5.3.2 tampak kenaikan ketebalan/proliferasi epitel pada kelompok perlakuan yang diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 x dengan metode pewarnaan HE. Pengukuran ketebalan atau proliferasi epitel dilakukan dengan aplikasi dotslide dalam μm

5.4 Ekspresi TGF- β

Pada analisis uji Shapiro-Wilk dijelaskan secara rinci tampak pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.4.1 Uji Normalitas Data Ekspresi TGF- β

Kelompok Pengamatan	p-value	Distribusi
kontrol (-)	0.140	normal
kontrol (+) (OVX)+oil	0.992	normal
P1 (OVX + Gen 0.045 mg)	0.255	normal
P2 (OVX + Gen 0.09 mg)	0.096	normal
P3 (OVX + Gen 0.18 mg)	0.776	normal

Keterangan: Jika $p\text{-value} < 0.05$ berarti data tidak berdistribusi normal dan jika $p\text{-value} > 0.05$ berarti data berdistribusi normal.

Pada tabel 5.4.1 menunjukkan analisis data hasil uji Shapiro-Wilk diperoleh bahwa data ekspresi TGF- β pada dinding vagina untuk masing-masing kelompok pengamatan telah menunjukkan nilai p-value yang semuanya lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$. Jadi semua data telah memenuhi uji prasyarat parametrik, yaitu data terbukti tersebar mengikuti distribusi normal. Selanjutnya data telah siap dianalisis lebih lanjut dengan uji statistika parametrik guna membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan.

Pada hasil uji perbandingan kelompok kontrol negatif (tikus postpartum bunting ke-3 dan tanpa ovariektomi) dengan kontrol positif (tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi) data ekspresi TGF- β pada dinding vagina dengan menggunakan uji t (independent sample t test) ditunjukkan secara ringkas seperti tampak tabel di bawah ini

Tabel 5.4.2 Hasil Perbandingan Antarkelompok Kontrol

Variabel	Kontrol Negatif Rerata \pm SD	Kontrol Positif Rerata \pm SD	p-value
ekspresi TGF- β	77.52 \pm 12.39	45.08 \pm 3.43	0.000 $<$ α

Keterangan: Jika p-value $<$ 0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan jika p-value $>$ 0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna.

Pada tabel 5.4.2 berdasarkan hasil uji t (independent sample t test) menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna (p=0.000 $<$ α) rerata konsentrasi ekspresi TGF- β antara kelompok kontrol negatif (77.52 \pm 12.39 %) dengan kelompok kontrol positif (45.08 \pm 3.43 %). Berdasarkan nilai reratanya ekspresi TGF- β tampak pada kelompok kontrol negatif lebih besar nilainya bila dibandingkan dengan rerata ekspresi TGF- β pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi akan menunjukkan nilai rerata ekspresi TGF- β yang lebih kecil bila dibandingkan dengan tikus postpartum bunting ke-3 yang tanpa ovariektomi. Berdasarkan hasil uraian di atas maka dapat dikatakan bahwa perlakuan pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi terbukti menunjukkan penurunan ekspresi TGF- β .

Berdasarkan hasil uji Anova *one way* pada data ekspresi TGF- β diperoleh ada perbedaan yang bermakna keempat kelompok sampel pengamatan, hal ini ditunjukkan dengan nilai p-value = 0.000 $<$ α (Lampiran 17). Analisa dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (Multiple Comparisons) dengan uji Beda Nyata Terkecil/BNT (Least Significant Difference/LSD) diperoleh dan ditunjukkan secara lengkap pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.4.3 Perbandingan Ekspresi TGF- β

Kelompok Pengamatan	Rerata \pm SD	p-value
kontrol (+) (OVX)+oil	45.08 \pm 3.43a	0.000 $<$ α
P1 (OVX + Gen 0.045 mg)	57.52 \pm .34b	
P2 (OVX + Gen 0.09 mg)	73.95 \pm 6.75c	
P3 (OVX + Gen 0.18 mg)	87.09 \pm 5.40d	

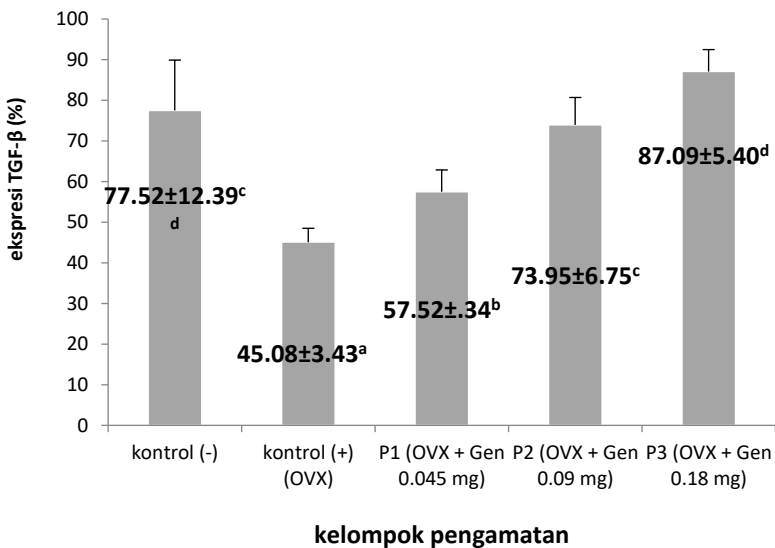
Keterangan: Pada rerata \pm SD menunjukkan hasil uji LSD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (p-value $<$ 0.05) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna (p-value $>$ 0.05).

Pada tabel 5.4.3 berdasarkan hasil uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi TGF- β antara kelompok kontrol positif (45.08 \pm 3.43a %) dengan kelompok P1 (57.52 \pm .34b %), berbeda pula dengan kelompok P2 (73.95 \pm 6.75c %), dan juga berbeda bermakna dengan kelompok P3 (87.09 \pm 5.40d %). Bila berdasarkan nilai rerata ekspresi TGF- β tampak ada peningkatan pada kelompok P1, P2, maupun P3, bila dibandingkan dengan rerata ekspresi TGF- β pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariectomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg, dosis 0.09 mg, maupun dosis 0.18 mg selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan meningkatkan ekspresi TGF- β . Tampak semakin tinggi dosis yang diberikan semakin meningkat ekspresi TGF- β . Jadi dapat dikatakan bahwa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariectomi mampu meningkatkan ekspresi TGF- β .

Demikian pula ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi TGF- β antara kelompok P1 (57.52 \pm .34b %), dengan kelompok P2 (73.95 \pm 6.75c %), juga berbeda pula dengan kelompok P3 (87.09 \pm 5.40d %). Demikian juga antara kelompok P2 ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi TGF- β dengan kelompok P3. Bila berdasarkan nilai reratanya tampak rerata ekspresi TGF- β ketiga kelompok tersebut semakin meningkat seiring dengan peningkatan dosis Genistein Glycine Max (*Soybean*)

pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi. Jadi dengan kata lain ketiga dosis tersebut sama-sama mampu meningkatkan ekspresi TGF- β pada tikus postpartum bunting ke 3 yang ovariektomi

Berdasarkan uraian hasil dari tabel 5.4.3 di atas maka dapat diartikan bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg/kgbb/hari, dosis 0.09 mg/kgbb/hari dan dosis 0.18 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan berpengaruh terhadap ekspresi TGF- β , yaitu mampu meningkatkan ekspresi TGF- β . Selanjutnya rerata ekspresi TGF- β pada kelima kelompok sampel tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram (diagram batang) di bawah ini.



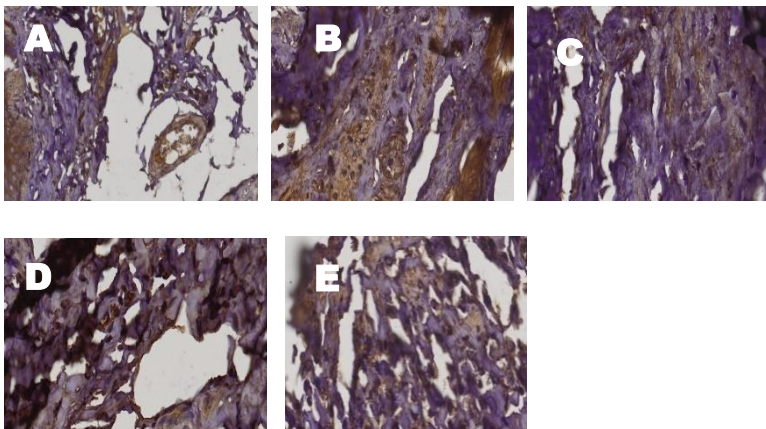
Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 5.4.1 Histogram Rerata Ekspresi TGF- β

Pada gambar 5.4.1 tampak batang rerata ekspresi TGF- β tikus postpartum bunting ke-3 tanpa ovariektomi (kelompok kontrol negatif) tertinggi dibandingkan dengan kelompok yang lainnya. Hal ini berarti bahwa perlakuan ovariektomi pada tikus postpartum bunting ke-3 mampu menurunkan ekspresi TGF- β .

Akan tetapi tampak ada peningkatan rerata ekspresi TGF- β pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariectomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg, dosis 0.09 mg, maupun dosis 0.18 mg selama 28 hari per injeksi subcutaneous. Pada histogram rerata ekspresi TGF- β kelompok kontrol negatif menunjukkan ada perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol positif dan juga dengan kelompok P1, sedangkan dengan kelompok P2 dan P3 tidak ada perbedaan yang bermakna. Hal ini dapat dikatakan bahwa tikus postpartum bunting ke-3 tanpa ovariectomidan tanpa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) menunjukkan nilai rerata ekspresi TGF- β yang tinggi dibandingkan yang lain. Sedangkan kelompok P2 menunjukkan rerata ekspresi TGF- β yang mendekati nilai rerata ekspresi TGF- β kelompok kontrol negatif.

Dari histogram diatas disimpulkan pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0,09mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneous pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariectomi merupakan dosis efektif dalam meningkatkan ekspresi TGF- β . Adapun hasil pemeriksaan imunohistokimia didapatkan perbedaan Ekspresi TGF- β pada stroma sebagai berikut.



Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 5.4.2 Perbedaan Ekspresi TGF- β pada stroma

Keterangan: A=control negative. B=control positif. C=perlakuan dosis 1.
D=perlakuan dosis 2. E=perlakuan dosis3

Pada gambar 5.4.2 tampak peningkatan ekspresi TGF- β pada kelompok perlakuan yang diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 x. Dengan menggunakan metode pewarnaan imunohistokimia ekspresi TGF- β yang ditunjukkan dengan warna coklat. Pecitraan hasil pengamatan lalu diunggah untuk selanjutnya diolah menggunakan aplikasi imunoratio yang menghasilkan berupa presentasi area.

5.5 Kadar MMP-9

Pada analisis uji Shapiro-Wilk dijelaskan secara rinci tampak pada tabel di bawah ini

Tabel 5.5.1 Uji Normalitas Data Kadar MMP9

Kelompok Pengamatan	p-value	Distribusi
kontrol (-)	0.173	normal
kontrol (+) (OVX)+oil	0.185	normal
P1 (OVX + Gen 0.045 mg)	0.640	normal
P2 (OVX + Gen 0.09 mg)	0.062	normal
P3 (OVX + Gen 0.18 mg)	0.186	normal

Keterangan: Jika p-value<0.05 berarti data tidak berdistribusi normal dan jika p-value>0.05 berarti data berdistribusi normal.

Pada tabel 5.5.1 menunjukkan analisis data hasil uji Shapiro-Wilk diperoleh bahwa data kadar MMP-9 pada gerusan vagina untuk masing-masing kelompok pengamatan telah menunjukkan nilai p-value yang semuanya lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$. Jadi semua data telah memenuhi uji prasyarat parametrik, yaitu data terbukti tersebar mengikuti distribusi normal. Selanjutnya data telah siap dianalisis lebih lanjut dengan uji statistika parametrik guna membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan

Pada hasil uji perbandingan kelompok kontrol negatif (tikus postpartum bunting ke-3 dan tanpa ovariektomi) dengan kontrol positif (tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi) data kadar MMP-9 pada gerusan vagina dengan menggunakan uji t

(*independent sample t test*) ditunjukkan secara ringkas seperti tampak tabel di bawah ini.

Tabel 5.5.2 Hasil Perbandingan Antarkelompok Kontrol

Variabel	Kontrol Negatif Rerata ± SD	Kontrol Positif Rerata ± SD	p-value
kadar MMP9	0.82±0.07	1.37±0.53	0.049 < α

Keterangan: Jika p-value<0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan jika p-value>0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna.

Pada tabel 5.5.2 berdasarkan hasil uji t (*independent sample t test*) menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ($p=0.049<\alpha$) rerata kadar MMP-9 antara kelompok kontrol negatif (0.82 ± 0.07 ng/L) dengan kelompok kontrol positif (1.37 ± 0.53 ng/L). Berdasarkan nilai reratanya kadar MMP-9 tampak pada kelompok kontrol negatif lebih kecil nilainya bila dibandingkan dengan rerata kadar MMP-9 pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi akan menunjukkan nilai rerata kadar MMP-9 yang lebih besar bila dibandingkan dengan tikus postpartum bunting ke-3 yang tanpa ovariektomi. Berdasarkan hasil uraian di atas maka dapat dikatakan bahwa perlakuan pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi terbukti menunjukkan peningkatan kadar MMP-9.

Berdasarkan hasil uji Anova *one way* pada data kadar MMP-9 pada gerusan vagina diperoleh ada perbedaan yang bermakna keempat kelompok sampel pengamatan, hal ini ditunjukkan dengan nilai p-value = $0.009<\alpha$ (Lampiran 5). Analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (*Multiple Comparisons*) dengan uji Beda Nyata Terkecil/BNT (*Least Significant Difference/LSD*) diperoleh dan ditunjukkan secara lengkap pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.5.3 Perbandingan Kadar MMP-9

Kelompok Pengamatan	Rerata ± SD	p-value
kontrol (+) (OVX)+oil	1.37±0.53a	0.009< α
P1 (OVX + Gen 0.045 mg)	0.78±0.02b	
P2 (OVX + Gen 0.09 mg)	0.80±0.04b	
P3 (OVX + Gen 0.18 mg)	0.85±0.09b	

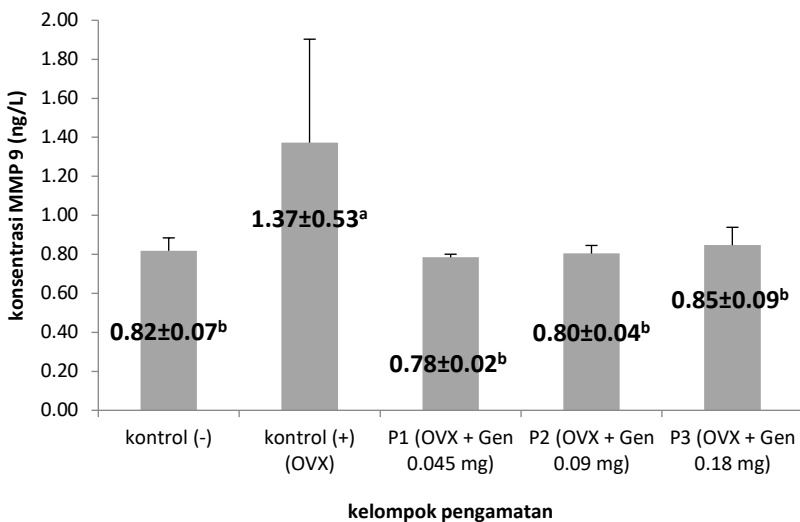
Keterangan: Pada rerata±SD menunjukkan hasil uji LSD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (p -value<0.05) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna (p -value>0.05).

Pada tabel 5.5.3 berdasarkan hasil uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata kadar MMP-9 antara kelompok kontrol positif (1.37±0.53 ng/L) dengan kelompok P1 (0.78±0.02b ng/L), berbeda pula dengan kelompok P2 (0.80±0.04b ng/L), dan juga berbeda bermakna dengan kelompok P3 (0.85±0.09b ng/L). Bila berdasarkan nilai rerata kadar MMP-9 tampak ada penurunan pada kelompok P1, P2, maupun P3, bila dibandingkan dengan kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg, dosis 0.09 mg, maupun dosis 0.18 mg selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan menurunkan kadar MMP-9. Tampak semakin tinggi dosis yang diberikan semakin turun kadar MMP-9. Jadi dapat dikatakan bahwa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi mampu menurunkan kadar MMP-9, akan tetapi tampak tidak ada perbedaan yang bermakna rerata kadar MMP-9 antara kelompok P1 (0.78±0.02b ng/L) dengan kelompok P2 (0.80±0.04b ng/L), juga tidak berbeda dengan kelompok P3 (0.85±0.09b ng/L).

Demikian juga antara kelompok P2 tidak berbeda bermakna rerata kadar MMP-9 dengan kelompok P3. Bila berdasarkan nilai reratanya tampak rerata ketiga kelompok tersebut nilainya sangat berdekatan satu sama lain. Jadi dengan kata lain ketiga dosis tersebut memiliki kemampuan yang sama atau memberi pengaruh

yang sama, yaitu mampu menurunkan kadar MMP-9 pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi.

Berdasarkan uraian hasil dari tabel 5.5.3 di atas maka dapat diartikan bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg/kgbb/hari, dosis 0.09 mg/kgbb/hari dan dosis 0.18 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan berpengaruh terhadap kadar MMP-9, yaitu mampu menurunkan kadar MMP-9. Jadi hipotesis pertama terbukti, yaitu pemberian genistein dapat menurunkan kadar MMP-9 pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi. Selanjutnya rerata kadar MMP-9 pada kelima kelompok sampel tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram (diagram batang) di bawah ini



Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 5.5.1 Histogram Rerata Kadar MMP-9

Pada gambar 5.5.1 tampak batang rerata kadar MMP-9 pada gerusan vagina tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi tertinggi dibandingkan dengan kelompok yang lainnya. Hal ini berarti bahwa perlakuan ovariektomi pada tikus postpartum bunting ke-3 mampu meningkatkan kadar MMP-9. Akan tetapi

tampak ada penurunan rerata kadar MMP-9 pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg, dosis 0.09 mg, maupun dosis 0.18 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus dibandingkan dengan tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi tanpa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*). Pada histogram rerata kadar MMP-9 kelompok kontrol negatif menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna dengan kelompok P1, P2, dan P3. Hal ini dapat dikatakan bahwa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) ketiga dosis tersebut efektif untuk menurunkan kadar MMP-9 dengan dosis efektif 0,09 mg/kgbb/hr

5.6 Ekspresi Fibulin-5

Pada analisis uji Shapiro-Wilk dijelaskan secara rinci tampak pada tabel di bawah ini

Tabel 5.6.1 Uji Normalitas Data Ekspresi Fibulin 5

Kelompok Pengamatan	p-value	Distribusi
kontrol (-)	0.074	normal
kontrol (+) (OVX)+oil	0.657	normal
P1 (OVX + Gen 0.045 mg)	0.633	normal
P2 (OVX + Gen 0.09 mg)	0.256	normal
P3 (OVX + Gen 0.18 mg)	0.897	normal

Keterangan: Jika $p\text{-value} < 0.05$ berarti data tidak berdistribusi normal dan jika $p\text{-value} > 0.05$ berarti data berdistribusi normal.

Pada tabel 5.6.1 menunjukkan analisis data hasil uji Shapiro-Wilk diperoleh bahwa data ekspresi fibulin5 pada dinding vagina untuk masing-masing kelompok pengamatan telah menunjukkan nilai p-value yang semuanya lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$. Jadi semua data telah memenuhi uji prasyarat parametrik, yaitu data terbukti tersebar mengikuti distribusi normal. Selanjutnya data telah siap dianalisis lebih lanjut dengan uji statistika parametrik guna membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan.

Pada hasil uji perbandingan kelompok kontrol negatif (tikus postpartum bunting ke-3 dan tanpa ovariektomi) dengan kontrol positif (tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi) data ekspresi fibulin-5 pada dinding vagina dengan menggunakan uji t (independent sample t test) ditunjukkan secara ringkas seperti tampak tabel di bawah ini

Tabel 5.6.2 Hasil Perbandingan Antarkelompok Kontrol

Variabel	Kontrol Negatif Rerata ± SD	Kontrol Positif Rerata ± SD	p-value
ekspresi fibulin5	97.60±1.87	70.26±6.11	0.000 < α

Keterangan: Jika p-value<0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan jika p-value>0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna.

Pada tabel 5.6.2 berdasarkan hasil uji t (independent sample t test) menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ($p=0.000 < \alpha$) rerata konsentrasi ekspresi fibulin5 antara kelompok kontrol negatif (97.60±1.87 %) dengan kelompok kontrol positif (70.26±6.11 %). Berdasarkan nilai reratanya ekspresi fibulin5 tampak pada kelompok kontrol negatif lebih besar nilainya bila dibandingkan dengan rerata ekspresi fibulin5 pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi akan menunjukkan nilai rerata ekspresi fibulin5 yang lebih kecil bila dibandingkan dengan tikus postpartum bunting ke-3 yang tanpa ovariektomi. Berdasarkan hasil uraian di atas maka dapat dikatakan bahwa perlakuan pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi terbukti menunjukkan penurunan ekspresi fibulin-5.

Berdasarkan hasil uji Anova *one way* pada data ekspresi fibulin-5 diperoleh ada perbedaan yang bermakna keempat kelompok sampel pengamatan, hal ini ditunjukkan dengan nilai p-value = $0.000 < \alpha$. Analisa dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (Multiple Comparisons) dengan uji Beda Nyata

Terkecil/BNT (*Least Significant Difference/LSD*) diperoleh dan ditunjukkan secara lengkap pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.6.3 Perbandingan Ekspresi Fibulin-5

Kelompok Pengamatan	Rerata ± SD	p-value
kontrol (+) (OVX)+oil	70.26±6.11a	0.000<α
P1 (OVX + Gen 0.045 mg)	79.52±4.24b	
P2 (OVX + Gen 0.09 mg)	81.80±2.78b	
P3 (OVX + Gen 0.18 mg)	88.70±2.95c	

Keterangan: Pada rerata± SD menunjukkan hasil uji LSD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value}<0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value}>0.05$).

Pada tabel 5.6.3 berdasarkan hasil uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi fibulin5 antara kelompok kontrol positif (70.26±6.11a %) dengan kelompok P1 (79.52±4.24b %), berbeda pula dengan kelompok P2 (81.80±2.78b %), dan juga berbeda bermakna dengan kelompok P3 (88.70±2.95c %). Bila berdasarkan nilai rerata ekspresi fibulin5 tampak ada peningkatan pada kelompok P1, P2, maupun P3, bila dibandingkan dengan rerata ekspresi fibulin-5 pada kelompok kontrol positif.

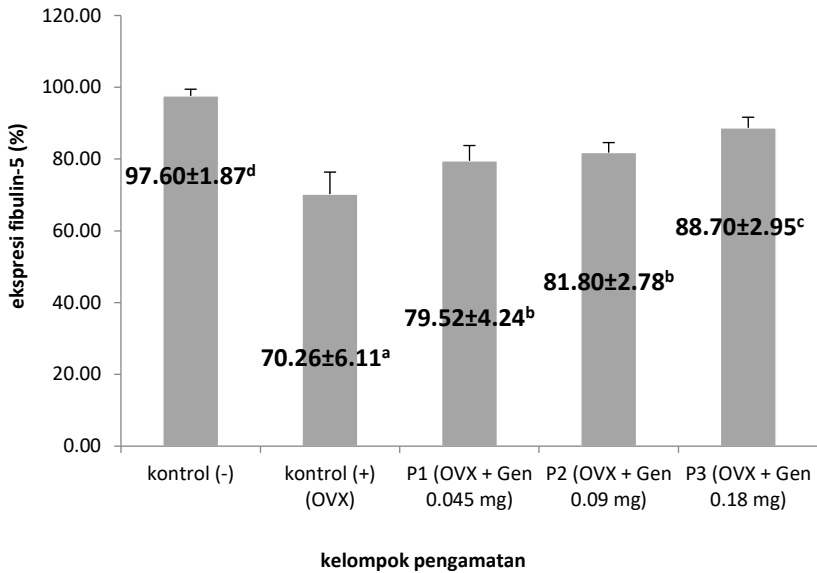
Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg, dosis 0.09 mg, maupun dosis 0.18 mg selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan meningkatkan ekspresi fibulin5. Tampak semakin tinggi dosis yang diberikan semakin meningkat ekspresi fibulin5.

Jadi dapat dikatakan bahwa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi mampu meningkatkan ekspresi fibulin5. Demikian pula ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi fibulin5 antara kelompok P1 (79.52±4.24b %) dengan kelompok P3 (88.70±2.95c %), sedangkan tidak ada perbedaan yang bermakna

rerata ekspresi fibulin5 antara kelompok P1 ($79.52 \pm 4.24b$ %) dengan kelompok P2 ($81.80 \pm 2.78b$ %). Hal ini berarti kelompok P1 dan P2 memiliki kemampuan yang sama dalam meningkatkan ekspresi fibulin5. Selanjutnya antara kelompok P2 ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi fibulin5 dengan kelompok P3. Bila berdasarkan nilai reratanya tampak rerata ekspresi fibulin5 ketiga kelompok tersebut semakin meningkat seiring dengan peningkatan dosis Genistein Glycine Max (*Soybean*) pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi. Jadi dengan kata lain ketiga dosis tersebut sama-sama mampu meningkatkan ekspresi fibulin5 pada tikus postpartum bunting ke 3 yang ovariektomi.

Berdasarkan uraian hasil dari Tabel 10.3 di atas maka dapat diartikan bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg/kgbb/hari, dosis 0.09 mg/kgbb/hari dan dosis 0.18 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan berpengaruh terhadap ekspresi fibulin5, yaitu mampu meningkatkan ekspresi fibulin-5.

Selanjutnya rerata ekspresi fibulin5 pada kelima kelompok sampel tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram (diagram batang) di bawah ini.



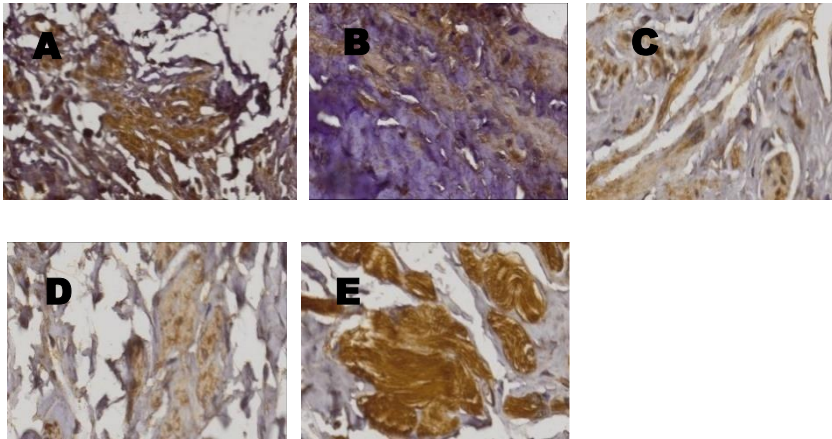
Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 5.6.1 Histogram Rerata Ekspresi Fibulin 5

Pada gambar 5.6.1 tampak batang rerata ekspresi fibulin 5 tikus postpartum bunting ke-3 tanpa ovariektomi (kelompok kontrol negatif) tertinggi dibandingkan dengan kelompok yang lainnya. Hal ini berarti bahwa perlakuan ovariektomi pada tikus postpartum bunting ke-3 mampu menurunkan ekspresi fibulin-5. Akan tetapi tampak ada peningkatan rerata ekspresi fibulin-5 pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg, dosis 0.09 mg, maupun dosis 0.18 mg selama 28 hari per injeksi subcutaneus.

Pada histogram rerata ekspresi fibulin-5 kelompok kontrol negatif menunjukkan ada perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol positif dan juga dengan kelompok P1, P2 dan P3. Hal ini dapat dikatakan bahwa tikus postpartum bunting ke-3 tanpa ovariektomidan tanpa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) menunjukkan nilai rerata ekspresi fibulin-5 yang tinggi dibandingkan yang lain. Sedangkan kelompok P3 menunjukkan rerata ekspresi fibulin5 yang mendekati nilai rerata ekspresi fibulin5 kelompok kontrol negatif. Hal ini berarti bahwa tikus

postpartum bunting ke-3 yang diovariectomi dan beri Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.18 mg selama 28 hari per injeksi subcutaneus merupakan dosis efektif untuk meningkatkan ekspresi fibulin-5. Adapun hasil pemeriksaan imunohistokimia didapatkan perbedaan Ekspresi Fibulin-5 pada stroma sebagai berikut:



Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 5.6.2 Perbedaan Ekspresi Fibulin -5 pada Stroma

Keterangan: A=kontrol negatif. B=kontrol positif. C=perlakuan dosis1. D=perlakuan dosis 2. E=perlakuan dosis 3

Pada gambar 5.6.2 Tampak peningkatan ekspresi Fibulin-5 pada kelompok perlakuan yang diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 x. Dengan menggunakan metode pewarnaan imunohistokimia ekspresi Fibulin-5 yang ditunjukkan dengan warna coklat. Pecitraan hasil pengamatan lalu diunggah untuk selanjutnya diolah menggunakan aplikasi imunoratio yang menghasilkan berupa presentasi area.

5.7 Ekspresi α -Actin

Pada analisis uji Shapiro-Wilk dijelaskan secara rinci tampak pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.7.1 Uji Normalitas Data Ekspresi α -Actin

Kelompok Pengamatan	p-value	Distribusi
kontrol (-)	0.472	normal
kontrol (+) (OVX)+oil	0.700	normal
P1 (OVX + Gen 0.045 mg)	0.363	normal
P2 (OVX + Gen 0.09 mg)	0.690	normal
P3 (OVX + Gen 0.18 mg)	0.122	normal

Keterangan: Jika $p\text{-value} < 0.05$ berarti data tidak berdistribusi normal dan jika $p\text{-value} > 0.05$ berarti data berdistribusi normal.

Pada tabel 5.7.1 menunjukkan analisis data hasil uji Shapiro-Wilk diperoleh bahwa data ekspresi α -Actin pada dinding vagina untuk masing-masing kelompok pengamatan telah menunjukkan nilai p-value yang semuanya lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$. Jadi semua data telah memenuhi uji prasyarat parametrik, yaitu data terbukti tersebar mengikuti distribusi normal. Selanjutnya data telah siap dianalisis lebih lanjut dengan uji statistika parametrik guna membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan.

Pada hasil uji perbandingan kelompok kontrol negatif (tikus postpartum bunting ke-3 dan tanpa ovariektomi) dengan kontrol positif (tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi) data ekspresi α -Actin pada dinding vagina dengan menggunakan uji t (independent sample t test) ditunjukkan secara ringkas seperti tampak tabel di bawah ini.

Tabel 5.7.2 Hasil Perbandingan Antarkelompok Kontrol

Variabel	Kontrol Negatif Rerata ± SD	Kontrol Positif Rerata ± SD	p-value
ekspresi α -Actin	73.84±5.76	44.95±6.62	0.000 < α

Keterangan: Jika p-value<0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan jika p-value>0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna.

Pada tabel 5.7.2 berdasarkan hasil uji t (independent sample t test) menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ($p=0.000 < \alpha$) rerata konsentrasi ekspresi α -Actin antara kelompok kontrol negatif (73.84±5.76 %) dengan kelompok kontrol positif (44.95±6.62 %). Berdasarkan nilai reratanya ekspresi α -Actin tampak pada kelompok kontrol negatif lebih besar nilainya bila dibandingkan dengan rerata ekspresi α -Actin pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi akan menunjukkan nilai rerata ekspresi α -Actin yang lebih kecil bila dibandingkan dengan tikus postpartum bunting ke-3 yang tanpa ovariektomi. Berdasarkan hasil uraian di atas maka dapat dikatakan bahwa perlakuan pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi terbukti menunjukkan penurunan ekspresi α -Actin.

Berdasarkan hasil uji Anova *one way* pada data ekspresi α -Actin diperoleh ada perbedaan yang bermakna keempat kelompok sampel pengamatan, hal ini ditunjukkan dengan nilai p-value = 0.000< α . Analisa dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (Multiple Comparisons) dengan uji Beda Nyata Terkecil/BNT (Least Significant Difference/LSD) diperoleh dan ditunjukkan secara lengkap pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.7.3 Perbandingan Ekspresi α -Actin

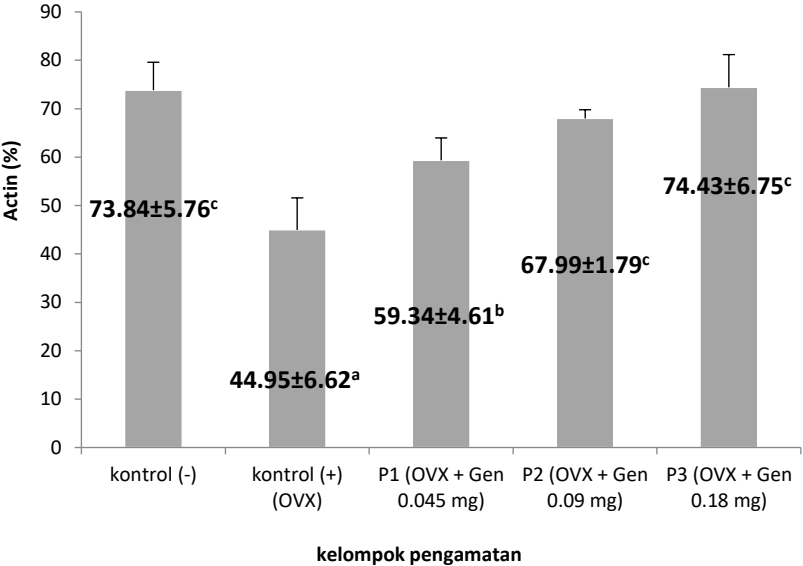
Kelompok Pengamatan	Rerata \pm SD	p-value
kontrol (+) (OVX)+oil	44.95 \pm 6.62a	0.000 $<$ α
P1 (OVX + Gen 0.045 mg)	59.34 \pm 4.61b	
P2 (OVX + Gen 0.09 mg)	67.99 \pm 1.79c	
P3 (OVX + Gen 0.18 mg)	74.43 \pm 6.75c	

Keterangan: Pada rerata \pm sd menunjukkan hasil uji LSD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (p-value $<$ 0.05) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna (p-value $>$ 0.05).

Pada tabel 5.7.3 berdasarkan hasil uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi α -Actin antara kelompok kontrol positif (44.95 \pm 6.62a %) dengan kelompok P1 (59.34 \pm 4.61b %), berbeda pula dengan kelompok P2 (67.99 \pm 1.79c %), dan juga berbeda bermakna dengan kelompok P3 (74.43 \pm 6.75c %). Bila berdasarkan nilai rerata ekspresi α -Actin tampak ada peningkatan pada kelompok P1, P2, maupun P3, bila dibandingkan dengan rerata ekspresi α -Actin pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg, dosis 0.09 mg, maupun dosis 0.18 mg selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan meningkatkan ekspresi α -Actin. Tampak semakin tinggi dosis yang diberikan semakin meningkat ekspresi α -Actin. Jadi dapat dikatakan bahwa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi mampu meningkatkan ekspresi α -Actin.

Demikian pula ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi α -Actin antara kelompok P1 (59.34 \pm 4.61b %), dengan kelompok P2 (67.99 \pm 1.79c %), juga berbeda pula dengan kelompok P3 (74.43 \pm 6.75c %). Selanjutnya antara kelompok P2 tidak ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi α -Actin dengan kelompok P3. Hal ini berarti kelompok P2 dan P3 memiliki kemampuan yang sama dalam meningkatkan ekspresi α -Actin.

Bila berdasarkan nilai reratanya tampak rerata ekspresi α -Actin ketiga kelompok tersebut semakin meningkat seiring dengan peningkatan dosis Genistein Glycine Max (*Soybean*) pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi. Jadi dengan kata lain ketiga dosis tersebut sama-sama mampu meningkatkan ekspresi α -Actin pada tikus postpartum bunting ke 3 yang ovariektomi. Berdasarkan uraian hasil dari tabel 12.3 di atas maka dapat diartikan bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg/kgbb/hari, dosis 0.09 mg/kgbb/hari dan dosis 0.18 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan berpengaruh terhadap ekspresi α -Actin, yaitu mampu meningkatkan ekspresi α -Actin. Selanjutnya rerata ekspresi α -Actin pada kelima kelompok sampel tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram (diagram batang) di bawah ini.

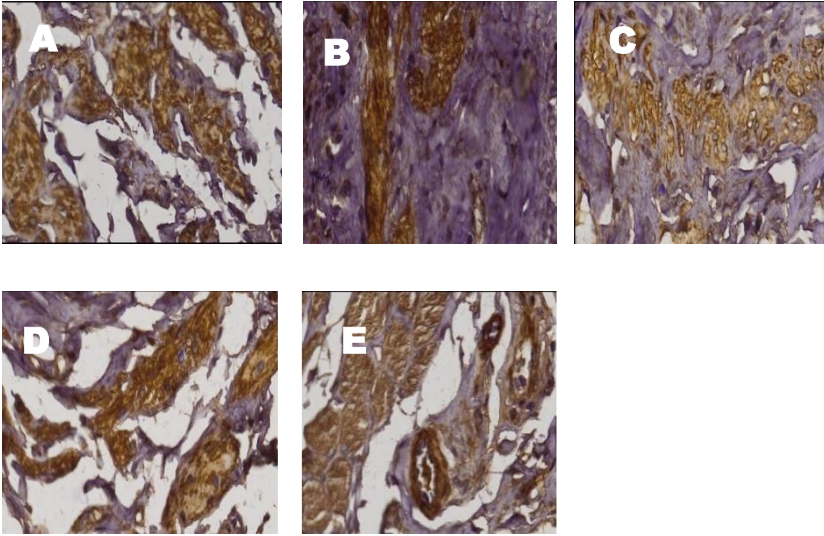


Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 5.7.1 Histogram Rerata Ekspresi α -Actin

Pada gambar 5.7.1 tampak batang rerata ekspresi α -Actin tikus postpartum bunting ke-3 tanpa ovariektomi (kelompok kontrol negatif) tertinggi dibandingkan dengan kelompok yang lainnya. Hal ini berarti bahwa perlakuan ovariektomi pada tikus postpartum bunting ke-3 mampu menurunkan ekspresi α -Actin. Akan tetapi tampak ada peningkatan rerata ekspresi α -Actin pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg, dosis 0.09 mg, maupun dosis 0.18 mg selama 28 hari per injeksi subcutaneus.

Pada histogram rerata ekspresi α -Actin kelompok kontrol negatif menunjukkan ada perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol positif dan juga dengan kelompok P1, sedangkan dengan kelompok P2 dan P3 tidak ada perbedaan yang bermakna. Hal ini dapat dikatakan bahwa tikus postpartum bunting ke-3 tanpa ovariektomidan tanpa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) menunjukkan nilai rerata ekspresi α -Actin yang tinggi dibandingkan yang lain. Sedangkan kelompok P2 dan P3 menunjukkan rerata ekspresi α -Actin yang mendekati nilai rerata ekspresi α -Actin kelompok kontrol negatif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke-3 yang diovariektomi dan beri Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.18 mg/kkbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus merupakan dosis efektif meningkatkan ekspresi α -Actin. Adapun hasil pemeriksaan imunohistokimia didapatkan perbedaan Ekspresi α Actin pada sel otot polos vagina sebagai berikut:



Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 5.7.2 Perbedaan Ekspresi α ACTIN Pada Otot Polos

Keterangan: A=control negative. B=control positif. C=perlakuan dosis 1. D=perlakuan dosis 2. E=perlakuan dosis 3

Pada gambar 5.7.2 Tampak peningkatan ekspresi α ACTIN pada kelompok perlakuan yang diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 x. Dengan menggunakan metode pewarnaan imunohistokimia ekspresi α ACTIN yang ditunjukkan dengan warna coklat. Pecitraan hasil pengamatan lalu diunggah untuk selanjutnya diolah menggunakan aplikasi imunoratio yang menghasilkan berupa presentasi area.

5.8 Ekspresi Hsp-70

Pada analisis uji Shapiro-Wilk dijelaskan secara rinci tampak pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.8.1 Uji Normalitas Data Ekspresi Hsp-70

Kelompok Pengamatan	p-value	Distribusi
kontrol (-)	0.737	normal
kontrol (+) (OVX)+ oil	0.712	normal
P1 (OVX + Gen 0.045 mg)	0.102	normal
P2 (OVX + Gen 0.09 mg)	0.136	normal
P3 (OVX + Gen 0.18 mg)	0.101	normal

Keterangan: Jika p-value<0.05 berarti data tidak berdistribusi normal dan jika p-value>0.05 berarti data berdistribusi normal.

Pada tabel 5.8.1 menunjukkan analisis data hasil uji Shapiro-Wilk diperoleh bahwa data ekspresi Hsp-70 pada dinding vagina untuk masing-masing kelompok pengamatan telah menunjukkan nilai p-value yang semuanya lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$. Jadi semua data telah memenuhi uji prasyarat parametrik, yaitu data terbukti tersebar mengikuti distribusi normal. Selanjutnya data telah siap dianalisis lebih lanjut dengan uji statistika parametrik guna membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan.

Pada hasil uji perbandingan kelompok kontrol negatif (tikus postpartum bunting ke-3 dan tanpa ovariektomi) dengan kontrol positif (tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi) data ekspresi Hsp-70 pada dinding vagina dengan menggunakan uji t (independent sample t test) ditunjukkan secara ringkas seperti tampak tabel di bawah ini

Tabel 5.8.2 Hasil Perbandingan Antarkelompok Kontrol

Variabel	Kontrol negatif Rerata \pm SD	Kontrol positif Rerata \pm SD	p-value
ekspresi Hsp-70	73.18 \pm 6.75	94.98 \pm 1.78	0.000 < α

Keterangan: Jika p-value<0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan jika p-value>0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna.

Pada tabel 5.8.2 berdasarkan hasil uji t (independent sample t test) menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ($p=0.000 < \alpha$) rerata konsentrasi ekspresi Hsp-70 antara kelompok kontrol negatif ($73.18 \pm 6.75 \%$) dengan kelompok kontrol positif ($94.98 \pm 1.78 \%$). Berdasarkan nilai rerata ekspresi Hsp-70 tampak pada kelompok kontrol negatif lebih kecil nilainya bila dibandingkan dengan rerata ekspresi Hsp-70 pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi akan menunjukkan nilai rerata ekspresi Hsp-70 yang lebih besar bila dibandingkan dengan tikus postpartum bunting ke-3 yang tanpa ovariektomi. Berdasarkan hasil uraian di atas maka dapat dikatakan bahwa perlakuan pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi terbukti menunjukkan peningkatan ekspresi Hsp-70

Berdasarkan hasil uji Anova *one way* pada data ekspresi Hsp-70 pada dinding vagina diperoleh ada perbedaan yang bermakna keempat kelompok sampel pengamatan, hal ini ditunjukkan dengan nilai $p\text{-value} = 0.000 < \alpha$. Analisa dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (Multiple Comparisons) dengan uji Beda Nyata Terkecil/BNT (Least Significant Difference/LSD) diperoleh dan ditunjukkan secara lengkap pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.8.3 Perbandingan Ekspresi Hsp-70

Kelompok Pengamatan	Rerata \pm SD	p-value
kontrol (+) (OVX) +oil	94.98 \pm 1.78a	0.000 $<$ α
P1 (OVX + Gen 0.045 mg)	70.65 \pm 15.61b	
P2 (OVX + Gen 0.09 mg)	50.30 \pm 9.52c	
P3 (OVX + Gen 0.18 mg)	40.80 \pm 5.70c	

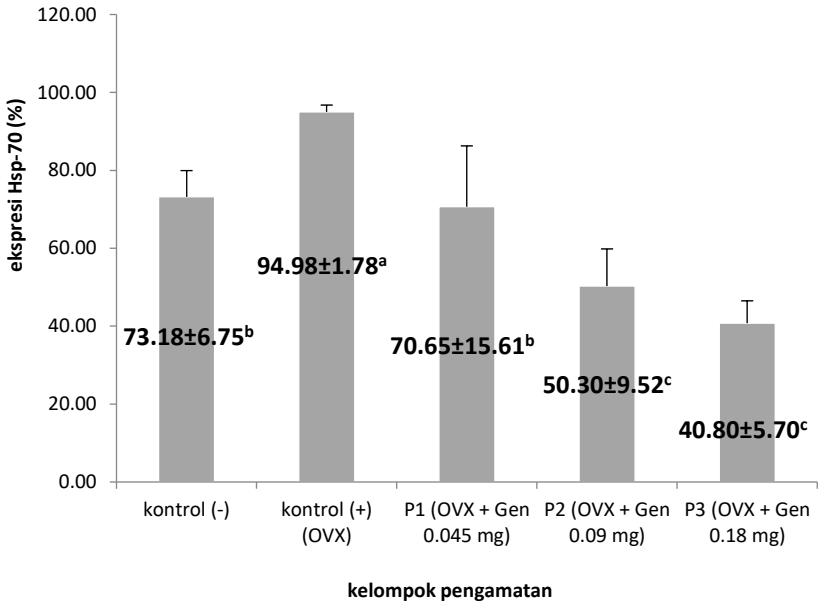
Keterangan: Pada rerata \pm SD menunjukkan hasil uji LSD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} > 0.05$).

Pada tabel 5.8.3 berdasarkan hasil uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi Hsp-70 antara kelompok kontrol positif ($94.98 \pm 1.78a$ %) dengan kelompok P1 ($70.65 \pm 15.61b$ %), berbeda pula dengan kelompok P2 ($50.30 \pm 9.52c$ %), dan juga berbeda bermakna dengan kelompok P3 ($40.80 \pm 5.70c$ %). Bila berdasarkan nilai rerata ekspresi Hsp-70 tampak ada penurunan pada kelompok P1, P2, maupun P3, bila dibandingkan dengan kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg, dosis 0.09 mg, maupun dosis 0.18 mg selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan menurunkan ekspresi Hsp-70. Tampak semakin tinggi dosis yang diberikan semakin turun ekspresi Hsp-70. Jadi dapat dikatakan bahwa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi mampu menurunkan ekspresi Hsp-70.

Demikian pula ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi Hsp-70 antara kelompok P1 ($70.65 \pm 15.61b$ %) dengan kelompok P2 ($50.30 \pm 9.52c$ %), dan dengan kelompok P3 ($40.80 \pm 5.70c$ %).

Bila berdasarkan nilai reratanya tampak rerata ekspresi Hsp-70 ketiga kelompok tersebut semakin menurun seiring dengan peningkatan dosis Genistein Glycine Max (*Soybean*) pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi. Jadi dengan kata lain ketiga dosis tersebut sama-sama mampu menurunkan ekspresi Hsp-70 pada tikus postpartum bunting ke 3 yang ovariektomi. Akan tetapi tampak tidak ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi Hsp-70 antara kelompok P2 ($50.30 \pm 9.52c$ %) dengan kelompok P3 ($40.80 \pm 5.70c$ %). Bila berdasarkan nilai reratanya tampak rerata kedua kelompok tersebut nilainya berdekatan satu sama lain. Jadi dengan kata lain ketiga dosis tersebut memiliki kemampuan yang sama atau memberi pengaruh yang sama, yaitu mampu menurunkan ekspresi Hsp-70 pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi.

Berdasarkan uraian hasil dari tabel 5.8.3 di atas maka dapat diartikan bahwa tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg/kgbb/hari, dosis 0.09 mg/kgbb/hari dan dosis 0.18 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus akan berpengaruh terhadap ekspresi Hsp-70, yaitu mampu menurunkan ekspresi Hsp-70. Jadi hipotesis pertama terbukti, yaitu pemberian genistein dapat menurunkan ekspresi Hsp-70 pada tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi. Selanjutnya rerata ekspresi Hsp-70 pada kelima kelompok sampel tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram (diagram batang) di bawah ini.



Sumber: Dokumen Penulis

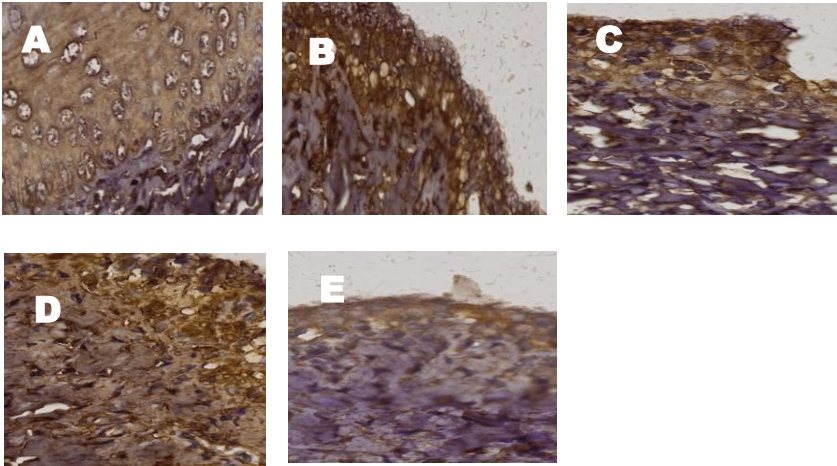
Gambar 5.8.1 Histogram Rerata Ekspresi Hsp-70

Pada gambar 5.8.1 menunjukkan histogram rerata ekspresi Hsp-70 pada kelompok kontrol negatif (tikus postpartum bunting ke-3 dan tanpa ovariektomi), kontrol positif (tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi), P1 (tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis

0.045 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus), P2 (tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.09 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus), dan P3 (tikus postpartum bunting ke 3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.18 mg/kgbb/hari selama 28 hari per injeksi subcutaneus).

Tampak batang rerata ekspresi Hsp-70 pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi tertinggi dibandingkan dengan kelompok yang lainnya. Hal ini berarti bahwa perlakuan ovariektomi pada tikus postpartum bunting ke-3 mampu meningkatkan ekspresi Hsp-70. Akan tetapi tampak ada penurunan rerata ekspresi Hsp-70 pada tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi yang diberi Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.045 mg, dosis 0.09 mg, maupun dosis 0.18 mg selama 28 hari per injeksi subcutaneus dibandingkan dengan tikus postpartum bunting ke-3 dan ovariektomi tanpa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*).

Pada histogram rerata ekspresi Hsp-70 kelompok kontrol negatif menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna dengan kelompok P1, sedangkan menunjukkan ada perbedaan yang bermakna dengan kelompok P2 dan P3. Hal ini dapat dikatakan bahwa pemberian Genistein Glycine Max (*Soybean*) dosis 0.09 mg/kgbb/hari dan dosis 0,045 mg/kgbb/hari tersebut efektif untuk menurunkan ekspresi Hsp-70. Adapun hasil pemeriksaan imunohistokimia didapatkan perbedaan Ekspresi Hsp-70 pada intraparabasal vagina sebagai berikut.



Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 5.8.2 Perbedaan Ekspresi HSP-70 pada Intraparabasis Vagina

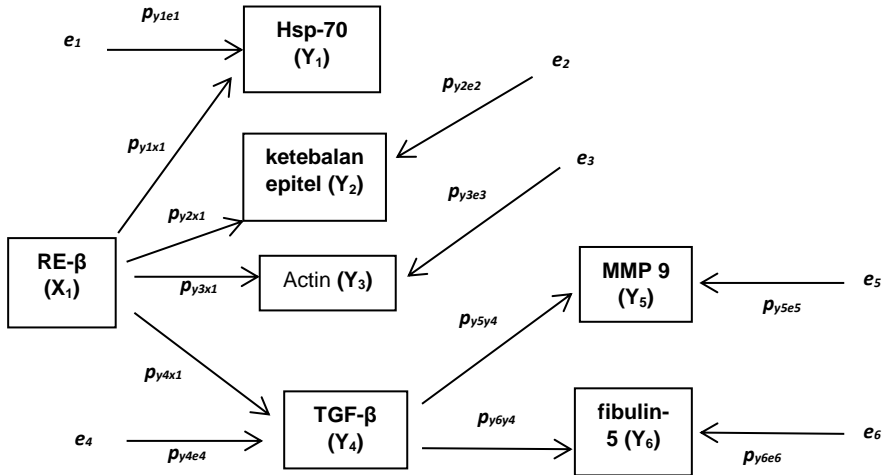
Keterangan: A=kontrol negatif. B=kontrol positif. C=perlakuan dosis 1. D=perlakuan dosis 2. E=perlakuan dosis 3.

Pada gambar 5.8.2 tampak penurunan ekspresi HSP-70 pada kelompok perlakuan yang diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 x. Dengan menggunakan metode pewarnaan imunohistokimia ekspresi HSP-70 yang ditunjukkan dengan warna coklat. Pecitraan hasil pengamatan lalu diunggah untuk selanjutnya diolah menggunakan aplikasi imunoratio yang menghasilkan berupa presentasi area.

5.9 Hasil Uji Analisis Jalur (Patch Analysis)

5.9.1 Model Analisis Jalur

Langkah pertama dalam analisis jalur adalah pembuatan model analisis jalur berdasarkan teori yang menggambarkan hubungan antar variabel. Model tersebut berupa diagram jalur dan sistem persamaan yang menunjukkan hubungan sebab akibat (cause-effect). Model diagram jalur hubungan antara ekspresi RE- β , ekspresi Hsp-70, ketebalan epitel, ekspresi α Actin, ekspresi TGF- β , kadar MMP 9, dan ekspresi fibulin-5 dari data pengukuran yang diperoleh adalah sebagai berikut.



Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 5.9.1 Diagram Jalur Pada Model Hubungan Antara Ekspresi Re-B (X1), Ekspresi Hsp-70 (Y1), Ketebalan Epitel (Y2), Actin (Y3), Ekspresi Tgf-B (Y4), Kadar Mmp 9 (Y5), dan Ekspresi Fibulin-5 (Y6).

Model yang tersaji pada gambar 5.9.1 dapat pula dibentuk ke dalam sebuah sistem persamaan, yaitu:

- 1) $Y_1 = p_{y1x1} X_1 + p_{y1e1} e_1$
- 2) $Y_2 = p_{y2x1} X_1 + p_{y2e2} e_2$
- 3) $Y_3 = p_{y3x1} X_1 + p_{y3e3} e_3$
- 4) $Y_4 = p_{y4x1} X_1 + p_{y4e4} e_4$
- 5) $Y_5 = p_{y5y3} Y_3 + p_{y5e5} e_5$
- 6) $Y_6 = p_{y6y3} Y_3 + p_{y6e6} e_6$

Sebagai dasar penghitungan koefisien jalur adalah penghitungan koefisien korelasi antar variabel. Dimana nilai koefisien korelasi menunjukkan nilai tingkat keeratan hubungan dua variabel. Secara ringkas tingkat keeratan hubungan antar variabel atau koefisien korelasi (r) beserta nilai tingkat/probabilitas kesalahan empiris (p -value) disajikan pada tabel 5.9.1 di bawah ini.

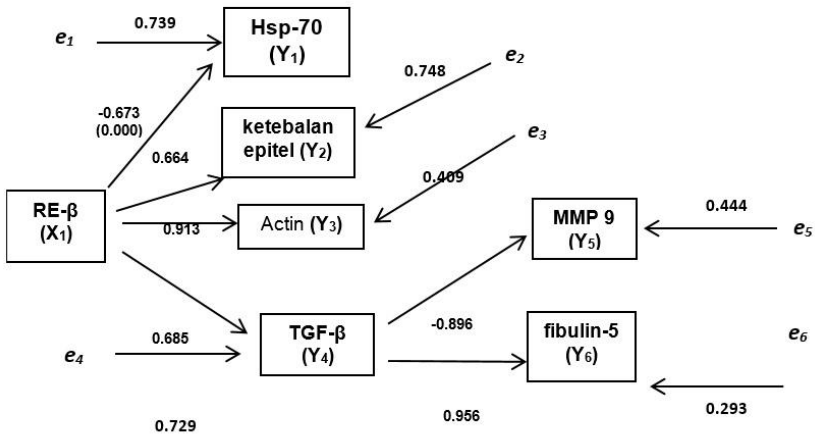
Tabel 5.9.1 Koefisien Korelasi

Korelasi antara		Koefisien Korelasi (r)	p-value	Kesimpulan
ekspresi RE- β	ekspresi Hsp-70	-0.673	0.006	Signifikan
	proliferasi epitel	0.664	0.007	Signifikan
	Actin	0.913	0.000	Signifikan
	ekspresi TGF- β	0.685	0.005	Signifikan
ekspresi TGF- β	kadar MMP 9	-0.896	0.000	Signifikan
	ekspresi fibulin-5	0.956	0.000	Signifikan

Keterangan: Pada kolom p-value jika $p\text{-value} < 0.05$ berarti ada korelasi yang bermakna dan jika $p\text{-value} > 0.05$ berarti ada korelasi yang tidak bermakna.

Koefisien korelasi antara ekspresi RE- β dengan ekspresi Hsp-70 adalah -0.673 ($p\text{-value} = 0.006 < \alpha$), demikian pula ada korelasi yang bermakna antara ekspresi RE- β dengan ketebalan epitel dan seterusnya secara lengkap dapat dilihat pada tabel 5.9.1 tersebut di atas. Berdasarkan hasil korelasi antar variabel tersebut pada tabel di atas menghasilkan korelasi yang bermakna (signifikan), maka analisa dapat dilanjutkan dengan analisis jalur (path analysis).

Diagram jalur yang menggambarkan koefisien-koefisien jalur atau hubungan antara kausal dan efek beserta koefisien sisaan (error) antara ekspresi RE- β , ekspresi Hsp-70, ketebalan epitel, ekspresi α Actin, ekspresi TGF- β , kadar MMP 9, dan ekspresi fibulin-5 ditunjukkan sebagai berikut.



Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 5.9.2 Koefisien Jalur pada Model Hubungan Antara Ekspresi RE-β (X1), Ekspresi Hsp-70 (Y1), Ketebalan Epitel (Y2), Actin(Y3), Ekspresi TGF-β (Y4), Konsentrasi MMP 9 (Y5), dan Ekspresi Fibulin-5 (Y6).

Dari hasil penghitungan koefisien jalur diperoleh persamaan untuk model persamaan (1) sampai (6) adalah sebagai berikut:

- 1) $Y_1 = -0.673 X_1 + 0.739 e_1$ ($p=0.006$)
- 2) $Y_2 = 0.664 X_1 + 0.748 e_2$ ($p=0.007$)
- 3) $Y_3 = 0.913 X_1 + 0.409 e_3$ ($p=0.000$)
- 4) $Y_4 = 0.685 X_1 + 0.729 e_4$ ($p=0.005$)
- 5) $Y_5 = -0.896 Y_4 + 0.444 e_5$ ($p=0.000$)
- 6) $Y_6 = 0.956 Y_3 + 0.293 e_6$ ($p=0.000$)

5.9.2 Validasi Model

Untuk menentukan model yang terbaik digunakan koefisien determinasi. Penghitungan koefisien determinasi total adalah sebagai berikut.

$$\begin{aligned}
 R^2_{y_5} &= 1 - P^2_{y_5e_5} \\
 &= 1 - [(0.444)^2] \\
 &= 0.803 \\
 R^2_{y_6} &= 1 - P^2_{y_6e_6} \\
 &= 1 - [(0.293)^2] \\
 &= 0.914
 \end{aligned}$$

Interpretasi $R^2_{y_5}$ dan $R^2_{y_6}$ sama dengan interpretasi koefisien determinan (R2) pada analisis regresi linier berganda. Nilai $R^2_{y_5} = 0.803$ mempunyai arti keragaman data yang dijelaskan oleh model persamaan (5) tersebut adalah sebesar $R^2_{y_4} \times 100\% = 0.803 \times 100\% = 80.3\%$, sedangkan sisanya sebesar 19.7% dijelaskan oleh variabel lain yang belum terdapat dalam model dan error. Dengan kata lain secara bersama-sama antara ekspresi RE- β dan ekspresi TGF- β mempengaruhi konsentrasi MMP-9 sebesar 80.3% dan konsentrasi MMP-9 dipengaruhi variabel lain yang tidak terdapat dalam model sebesar 19.7%. Demikian pula nilai $R^2_{y_6} = 0.914$ mempunyai arti keragaman data yang dijelaskan oleh model persamaan (6) tersebut adalah sebesar $R^2_{y_6} \times 100\% = 0.914 \times 100\% = 91.4\%$, sedangkan sisanya sebesar 8.6% dijelaskan oleh variabel lain yang belum terdapat dalam model dan error. Dengan kata lain secara bersama-sama ekspresi RE- β dan ekspresi TGF- β mempengaruhi fibulin-5 sebesar 91.4% dan fibulin-5 dipengaruhi variabel lain yang tidak terdapat dalam model sebesar 8.6%.

5.9.3 Interpretasi Hasil

Dari hasil analisis jalur dapat diambil beberapa informasi. Penjelasan tentang informasi dari hasil penggunaan analisis jalur adalah sebagai berikut:

Berdasarkan hasil validitas model diperoleh nilai $R^2_{y_5} = 0.803$ yang ternyata sama dengan nilai dari $R^2 = 0.803$ yang diperoleh dari hasil regresi (Lampiran 25). Dengan demikian model pada persamaan (5) dalam analisis jalur dapat dikatakan model sama

baiknya bila dibandingkan dengan model pada regresi dalam menjelaskan pengaruh ekspresi TGF- β terhadap MMP-9.

- 1). Validitas model diperoleh nilai $R_{y_6}^2 = 0,914$ yang ternyata dengan dengan nilai dari $R^2 = 0.914$ yang diperoleh dari hasil regresi. Dengan demikian model pada persamaan (6) dalam analisis jalur sama baiknya dibandingkan dengan model pada regresi dalam menjelaskan pengaruh ekspresi TGF- β terhadap fibulin-5.
- 2). Pengaruh langsung dari variabel ekspresi RE- β , ekspresi Hsp-70, ketebalan epitel, Actin, ekspresi TGF- β , konsentrasi MMP 9, dan ekspresi fibulin-5 sebagai akibat pengaruh pemberian genestein pad tikus yang telah dioverextomi ditunjukkan oleh tabel 5.9.2 di bawah ini.

Tabel 5.9.2 Pengaruh Langsung

Variabel	Pengaruh langsung		p-value
	Koefisien pengaruh	Berpengaruh terhadap	
ekspresi RE- β	-0.673	ekspresi Hsp-70	0.006
	0.664	proliferasi epitel	0.007
	0.913	Actin	0.000
	0.685	ekspresi TGF- β	0.005
ekspresi TGF- β	-0.896	kadar MMP 9	0.000
	0.956	ekspresi fibulin-5	0.000

Tabel 5.9.2 menjelaskan bahwa ekspresi RE- β berpengaruh langsung terhadap ekspresi Hsp-70 ditunjukkan dengan koefisien pengaruh sebesar -0.673 ($p=0.006 < \alpha$). Nilai negatif pada -0.673 dapat diartikan ada pengaruh hubungan yang berlawanan antara ekspresi RE- β terhadap ekspresi Hsp-70. Dengan kata lain peningkatan ekspresi RE- β akan menurunkan ekspresi Hsp-70 atau sebaliknya, penurunan ekspresi RE- β akan meningkatkan ekspresi Hsp-70.

Selanjutnya ekspresi RE- β berpengaruh langsung terhadap proliferasi atau ketebalan epitel ditunjukkan dengan koefisien pengaruh sebesar 0.664 ($p=0.007<\alpha$) yang bermakna secara statistik. Nilai positif pada 0.664 dapat diartikan ada pengaruh hubungan yang seiring antara ekspresi RE- β terhadap ketebalan epitel. Dengan kata lain peningkatan ekspresi RE- β akan meningkatkan ketebalan epitel atau sebaliknya, penurunan ekspresi RE- β akan menurunkan ketebalan epitel.

Demikian pula ekspresi RE- β berpengaruh langsung terhadap α Actin ditunjukkan dengan koefisien pengaruh sebesar 0.913 ($p=0.000<\alpha$). Nilai positif pada 0.913 dapat diartikan ada pengaruh hubungan yang positif atau seiring antara ekspresi RE- β terhadap α Actin.

Dengan kata lain peningkatan ekspresi RE- β dalam penelitian ini akan meningkatkan kadar α Actin atau sebaliknya, penurunan ekspresi RE- β akan menurunkan α Actin.

Pada tabel 5.9.2 menunjukkan pula ekspresi RE- β berpengaruh langsung terhadap ekspresi TGF- β ditunjukkan dengan koefisien pengaruh sebesar 0.685 ($p=0.005<\alpha$). Nilai positif pada 0.685 dapat diartikan ada pengaruh hubungan yang positif atau seiring antara ekspresi RE- β terhadap ekspresi TGF- β . Dengan kata lain peningkatan ekspresi RE- β akan meningkatkan ekspresi TGF- β atau sebaliknya, penurunan ekspresi RE- β akan menurunkan ekspresi TGF- β .

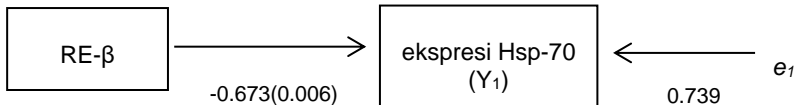
Hasil pada tabel 5.9.2 menjelaskan ada pengaruh langsung ekspresi TGF- β terhadap konsentrasi MMP-9 ditunjukkan dengan koefisien pengaruh sebesar -0.896 ($p=0.000<\alpha$). Nilai negatif pada -0.896 dapat diartikan ada pengaruh hubungan yang negatif atau berlawanan antara ekspresi TGF- β terhadap konsentrasi MMP-9. Dengan kata lain peningkatan ekspresi TGF- β akan menurunkan konsentrasi MMP-9 atau sebaliknya, penurunan ekspresi TGF- β akan meningkatkan konsentrasi MMP-9.

Tampak pada tabel 5.9.2 memperlihatkan ada pengaruh langsung ekspresi TGF- β terhadap fibulin-5 ditunjukkan dengan koefisien pengaruh sebesar 0.956 ($p=0.000<\alpha$). Nilai positif pada 0.956 dapat diartikan ada pengaruh hubungan yang positif atau seiring antara ekspresi TGF- β terhadap fibulin-5. Dengan kata lain peningkatan ekspresi TGF- β dalam penelitian ini akan meningkatkan fibulin-5 atau sebaliknya, penurunan ekspresi TGF- β akan menurunkan fibulin-5.

5.9.4 Analisis Jalur Perblok

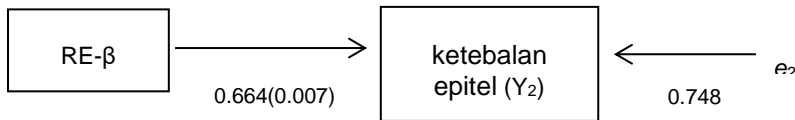
Diagram jalur gambar 5.9.2 dapat dipecah menjadi 6 buah model atau 6 blok sebagai berikut.

Model 1: $Y_1 = - 0.673 X_1 + 0.739 e_1$ ($p=0.006$)



Ada pengaruh yang sangat signifikan secara langsung ekspresi RE- β (X₁) terhadap ekspresi Hsp-70 (Y₁) sebesar -0.673 ($p=0.006<\alpha$), nilai negatif menunjukkan adanya hubungan yang berlawanan. Kenaikan ekspresi RE- β yang diakibatkan pengaruh pemberian genestein pada tikus bunting yang diovariectomi akan dapat berpengaruh terhadap penurunan ekspresi Hsp-70. Prosentase pengaruh ekspresi RE- β terhadap ekspresi Hsp-70 sebesar koefisien determinasi kali seratus persen: $R^2 \times 100\% = 0.453 \times 100\% = 45.3\%$. Hal ini dapat diartikan bahwa dalam penelitian ini ekspresi Hsp-70 dipengaruhi oleh ekspresi RE- β sebesar 45.3%, sedangkan sisanya 54.7% ekspresi Hsp-70 dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak ada pada model 1.

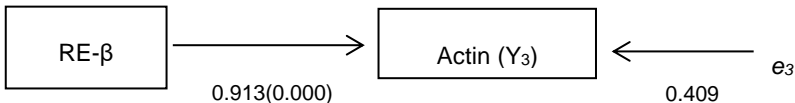
Model 2: $Y_2 = 0.664 X_1 + 0.748 e_2$ ($p=0.007$)



Ada pengaruh yang sangat signifikan secara langsung ekspresi RE- β (X_1) terhadap proliferasi atau ketebalan epitel (Y_2) sebesar 0.664 ($p=0.007 < \alpha$), nilai positif menunjukkan adanya hubungan yang seiring. Kenaikan ekspresi RE- β yang diakibatkan pengaruh pemberian genestein pada tikus bunting yang diovariektomi akan dapat berpengaruh terhadap peningkatan ketebalan epitel.

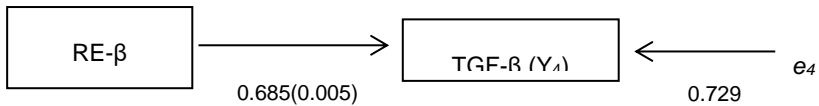
Prosentase pengaruh ekspresi RE- β terhadap ketebalan epitel sebesar koefisien determinasi kali seratus persen: $R^2 \times 100\% = 0.440 \times 100\% = 44.0\%$. Hal ini dapat diartikan bahwa ketebalan/proliferasi epitel dipengaruhi oleh ekspresi RE- β sebesar 44%, sedangkan sisanya 56% ketebalan epitel dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak ada pada model 2.

Model 3: $Y_3 = 0.913 X_1 + 0.409 e_3$ ($p=0.000$)



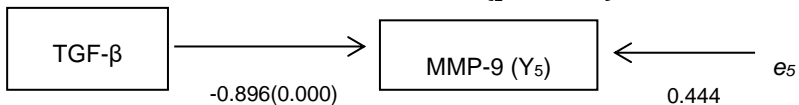
Ada pengaruh yang sangat signifikan secara langsung ekspresi RE- β (X_1) terhadap Actin (Y_3) sebesar 0.913 ($p=0.000 < \alpha$), nilai positif menunjukkan adanya hubungan yang seiring. Kenaikan ekspresi RE- β yang diakibatkan pengaruh pemberian genestein pada tikus bunting ke 3 yang diovariektomi akan dapat berpengaruh terhadap peningkatan α Actin. Prosentase pengaruh ekspresi RE- β terhadap Actin sebesar koefisien determinasi kali seratus persen: $R^2 \times 100\% = 0.833 \times 100\% = 83.3.0\%$. Hal ini dapat diartikan bahwa dalam penelitian ini Actin dipengaruhi oleh ekspresi RE- β sebesar 83.3%, sedangkan sisanya 16.7% Actin dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak ada pada model 3.

Model 4: $Y_4 = 0.685 X_1 + 0.729 e_4$ ($p=0.005$)



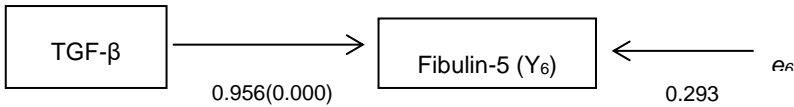
Ada pengaruh yang signifikan secara langsung ekspresi RE- β (X_1) terhadap ekspresi TGF- β (Y_4) sebesar 0.685 ($p=0.005<\alpha$), nilai positif menunjukkan adanya hubungan yang seiring. Kenaikan ekspresi RE- β akan dapat berpengaruh meningkatkan ekspresi TGF- β . Prosentase pengaruh ekspresi RE- β terhadap ekspresi TGF- β sebesar koefisien determinasi kali seratus persen: $R^2 \times 100\% = 0.469 \times 100\% = 46.9\%$. Hal ini dapat diartikan bahwa dalam penelitian ini ekspresi TGF- β dipengaruhi oleh ekspresi RE- β sebesar 46.9%, sedangkan sisanya 53.1% ekspresi TGF- β dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak ada pada model 4.

Model 5: $Y_5 = -0.896 Y_4 + 0.444 e_5$ ($p=0.000$)



Ada pengaruh yang sangat signifikan secara langsung ekspresi TGF- β (Y_4) terhadap konsentrasi MMP-9 (Y_5) sebesar -0.896 ($p=0.000<\alpha$), nilai negatif menunjukkan adanya hubungan yang berlawanan. Kenaikan ekspresi TGF- β yang diakibatkan pengaruh pemberian genestein pada tikus bunting yang dioverextomi akan dapat berpengaruh terhadap penurunan konsentrasi MMP-9. Prosentase pengaruh ekspresi TGF- β terhadap konsentrasi MMP-9 sebesar koefisien determinasi kali seratus persen: $R^2 \times 100\% = 0.803 \times 100\% = 80.3\%$. Hal ini dapat diartikan bahwa dalam penelitian ini konsentrasi MMP-9 dipengaruhi oleh ekspresi TGF- β sebesar 80.3%, sedangkan sisanya 19.7% konsentrasi MMP-9 dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak ada pada model 5.

Model 6: $Y_6 = 0.956 Y_3 + 0.293 e_6$ ($p=0.000$)



Ada pengaruh yang sangat signifikan secara langsung ekspresi TGF- β (Y_4) terhadap fibulin-5 (Y_6) sebesar 0.956 ($p=0.000<\alpha$), nilai positif menunjukkan adanya hubungan yang seiring. Kenaikan ekspresi TGF- β yang diakibatkan pengaruh pemberian genestein

Pada tikus bunting yang diovariektomi akan dapat berpengaruh terhadap peningkatan fibulin-5. Prosentase pengaruh ekspresi TGF- β terhadap fibulin-5 sebesar koefisien determinasi kali seratus persen: $R^2 \times 100\% = 0.914 \times 100\% = 91.4\%$. Hal ini dapat diartikan bahwa dalam penelitian ini fibulin-5 dipengaruhi oleh ekspresi TGF- β sebesar 91.4%, sedangkan sisanya 8.6% fibulin-5 dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak ada pada model 6.

AGLIKON ISOFLAVON KEDELAI DAN DOSIS GENISTEIN GLYCINE MAX

6.1 Studi In Silico Aglikon Isoflavon Kedelai

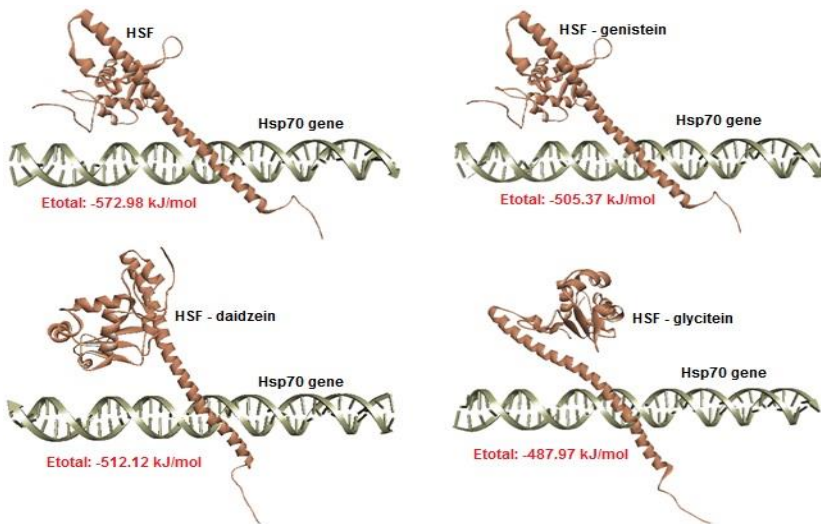
Kedelai mengandung empat struktur isoflavon antara lain Aglycone (genistein, daidzein, dan glycitein), Glycoside (genistein, daidzein, dan glycitein), Acetyl Glycoside (acetyl genistein, acetyl daidzein, dan acetyl glycitein) dan Malonyl Glycoside (malonyl genistein, malonyl daidzein, dan malonyl glycitein) (Shao S *et al*,2011). Tujuan dari studi in silico adalah untuk menganalisis ikatan molekul yang ada guna menemukan aglikon isoflavon kedelai pada TGF- β , Hsp70, dan jalur apoptosis pada prolaps organ panggul (POP). Studi in silico ini melibatkan prosedur pencari protein dan urutan nukleotida dalam pemodelan ikatan struktur tiga dimensi dan analisis interaksi. Terhadap sinyal TGF- β terdapat interaksi antara TGF- β dan reseptor TGF- β yang difasilitasi genistein, terhadap sinyal Hsp70 didapatkan daidzein memfasilitasi interaksi HSF dan Hsp70 dan terhadap sinyal NF- κ B untuk gen Bcl-xl didapatkan daidzein dan glycitein memfasilitasi interaksi gen NF- κ B dan Bcl-xl. Hasil studi insilico didapatkan:

6.1.1 Daidzein Memiliki Induksi Langsung Transkripsi Gen Hsp70

Untuk memeriksa kemungkinan peran senyawa aktif kedelai dalam induksi transkripsi gen Hsp70, analisis docking dilakukan antara protein faktor transkripsi Hsp70, HSF, dengan promotor gen Hsp70. Analisis ini menunjukkan bahwa dalam kondisi normal, energi yang dibutuhkan oleh HSF untuk mengikat promotor gen Hsp70 sama dengan 507.82 kJ / mol, dengan ikatan yang terbentuk sebanyak 18 (3 ikatan hidrogen, 15 interaksi van der waals). Ketika disimulasikan dengan menyela daidzein dalam protein HSF

sebelum ia berikatan dengan promotor gen Hsp70, ditemukan energy diperlukan untuk berinteraksi lebih rendah daripada di bawah kondisi basal (512,12 kJ / mol). Selain itu, ditemukan bahwa ikatan hidrogen, yang merupakan salah satu ikatan terkuat, berkurang (ikatan hidrogen terbentuk dan berinteraksi van derwaals).

Dalam simulasi menggunakan senyawa genistein dan glycitein, energi yang dibutuhkan oleh HSF untuk mengikat promotor gen Hsp70 menunjukkan bahwa energi yang dibutuhkan menjadi sedikit lebih besar dari pada kondisi basal (Gambar 6.1.1)



Sumber: Dokumen Penulis

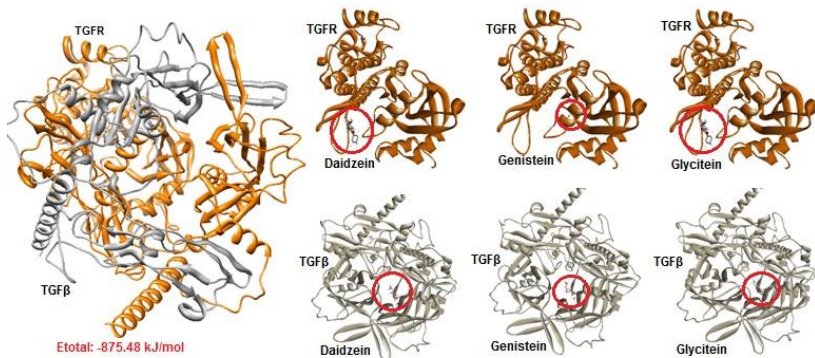
Gambar 6.1.1. Efek Senyawa Isoflavon Kedelai Terhadap Interaksi Hsf Pada Promotor Gen Hsp-70

6.1.2 Genistein Diperkirakan Mendukung Aktivasi Persinyalan TGF- β 1

Analisis ini dilakukan untuk melihat kemungkinan efek senyawa aktif kedelai terhadap sinyal TGF- β . Ditemukan ada satu kemungkinan bahwa senyawa isoflavon kedelai (yaitu genistein) untuk mendukung interaksi antara TGF- β 1 dengan reseptornya, yaitu ketika genistein berikatan dengan TGFR sebelum TGF- β 1 mengikat (897,01 kJ / mol). Di docking lain ketika genistein

mengikat TGF- β 1 terlebih dahulu sebelum mengikat ke TGFR, pengikatan energi yang dibutuhkan menjadi lebih besar (835,54 kJ / mol).

Ketika daidzein dan glycitein hadir, energi ikat yang dibutuhkan untuk interaksi menjadi lebih besar, baik ketika senyawa terikat TGF- β 1 sebelum mengikat ke TGFR, atau ketika senyawa berikatan dengan TGFR terlebih dahulu sebelum TGF- β 1 mengikat (Gambar 6.1.2).



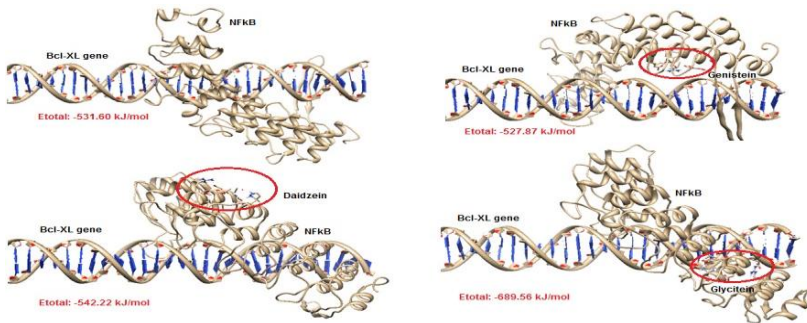
Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 6.1.2 Interaksi Antara Isoflavon Kedelai dengan TGF β dan TGFR

6.1.3 Daidzein dan Glycitein Menginduksi Aktivasi Transkripsional Gen Anti-Antiapoptosis Bcl-xl

Studi ini menunjukkan bahwa situs ikatan antara glycitein dan NF κ B terletak di situs di mana ikatan antara NF κ B dan gen Bcl-xl, sehingga diduga bahwa senyawa ini dapat mendukung induksi Bclxl sebagai transkripsi gen secara langsung. Analisis ini dilakukan untuk menguji kemungkinan kemampuan kedelai sebagai senyawa aktif yang mendukung proses transkripsi gen anti-apoptosis Bcl-xl. Dengan tidak adanya senyawa aktif, energi yang dibutuhkan untuk interaksi adalah 531,60 kJ / mol (dengan 2 ikatan hydrogen dan 21 interaksi van der waals). Ketika daidzein hadir, energi ikat menjadi lebih kecil (542,22 kJ / mol); ketika ada genistein, ikatan energi menjadi lebih besar (527,87 kJ / mol); dan kapan ada glycitein, energi pengikat yang dibutuhkan untuk

interaksi antara NFkB dan gen Bcl-xl promotor jauh lebih rendah (689,56 kJ / mol) (Gambar 6.1.3)



Sumber: Dokumen Penulis

Gambar 6.1.3 Efek Senyawa Isoflavon Kedelai Terhadap Interaksi Nfkb Pada Promotor Gen Bcl-XI

Pada penelitian sebelumnya dilaporkan kasus prolaps vagina yang sudah menopause ada penurunan indeks mitosis fibroblas dibandingkan dengan prolaps vagina pra-menopause, namun setelah distimulasi oleh TGF- β didapatkan tidak ada perbedaan dalam hal respon proliferasi fibroblas. Hal ini mungkin karena downregulation dari reseptor TGF- β (Sun B *et al* 2014). Transforming Growth Factor- β (TGF- β) adalah sitokin multifungsi yang mengatur berbagai fungsi seluler, termasuk proliferasi, apoptosis, dan diferensiasi. Pada kasus POP, ekspresi mRNA dan protein TGF- β 1 berkorelasi negatif dengan tingkat terjadinya prolaps (Li BS *et al* 2013; Liu C, 2017). Hasil yang sama dalam uji in vitro menggunakan strain model degradasi matriks ekstraseluler, aplikasi TGF- β 1 dapat menghambat hilangnya matriks ekstraseluler melalui sinyal TGF- β 1 (Liu C *et al* 2017).

Saat ini jalur TGF- β dianggap sebagai target terapi terbaru untuk POP [Liu c *et al* 2017] karena TGF- β akan berinteraksi dengan reseptor TGF- β tipe II (TGF- β II) dan reseptor TGF- β tipe I (TGF- β I). Interaksi ini akan memicu penataan ulang kompleks reseptor heterotetramerik yang menghasilkan lokasi ikatan untuk Smad2/smud3 dan mengarah ke fosforilasi. Fosforilasi protein Smad2 / Smad3 akan membentuk kompleks heteromer dengan

Smad4 dan bergerak ke inti untuk mengikat ke daerah target promotor gen TGF- β . Ekspresi gen ini terlibat dalam diferensiasi, proliferasi, apoptosis dan migrasi matriks ekstraseluler (Massague J,2000; Derynck R,2003; Akhurst RJ *et al* 2012).

Pada studi *in silico* ini terungkap data bahwa energi interaksinya antara TGF- β 1 dan reseptor TGF- β 1 adalah 875,48 kJ / mol, namun ketika ada Genistein maka energi interaksi menjadi 897,01 kJ / mol (Gambar 6.1.2). Hal ini menunjukkan bahwa genistein mampu memfasilitasi interaksi antara reseptor TGF- β 1 dan TGF- β , sementara daidzein dan glycetin lebih sulit berinteraksi sebagai reseptor TGF- β 1 dan TGF- β .

Hal yang sama pada penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa ekspresi protein TGF- β 1 dapat berubah atau lebih rendah pada kasus prolaps daripada tanpa prolaps (Qi Xy *et al* 2011; Meijerink AM *et al* 2013;). Dengan demikian pada penelitian pendahuluan ini bahwa genistein adalah kandidat untuk pengobatan POP melalui modulasi sinyal TGF- β 1 dengan cara meningkatkan ekspresi mRNA TGF- β 1 dan protein TGF- β 1 (Polito F *et al* 2012).

Pencarian bahan aktif dari tanaman kedelai (*soybean*) pada penelitian pendahuluan ini juga dimaksudkan untuk menginduksi Hsp 70 melalui fosforilasi pada Heat Shock Factor-1 (HSF-1). Hsp70 adalah protein berlimpah yang dapat diinduksi dan diekspresikan secara konstitutif pada suhu normal dan berfungsi sebagai molekul pendamping untuk siklus hidup protein. Dalam kondisi stres, level mRNA Hsp70 akan meningkat untuk menghambat kerusakan protein intraseluler (Harti FU *et al* 2002; Cui Y *et al* 2010; Tazawa H *et al* 2015).

HSF adalah master pengatur Hsp dimana ketika suatu organisme mengalami rangsangan panas, maka monomer HSF-1 yang tidak aktif akan dikonversi menjadi trimer sehingga terikat-DNA yang memiliki aktivitas transkripsi dan trimer HSF-1 akan mengikat ke daerah promotor gen Hsp sehingga proses transkripsi dimulai dan memicu peningkatan regulasi Hsp (Miozo F *et al* 2015;

Zhou JB *et al* 2018). Hasil yang sama pada penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa pada POP terjadi peningkatan stres oksidatif yang ditandai dengan peningkatan 8-oHdG hidroksinonenal dan penurunan glutation peroksidase dibandingkan dengan kontrol (Li Bs *et al* 2013; Kim EJ *et al* 2013). Peneliti menyimpulkan peningkatan stres ini disebabkan oleh ketidakmampuan homeostasis stres oleh Hsp70 dan peningkatan status oksidatif dikaitkan dengan Hsp 70 (De Toda IM *et al* 2016).

Apoptosis adalah proses kematian sel terprogram dan merupakan hal mendasar dalam berbagai proses fisiologis, termasuk embriogenesis dan remodeling jaringan. Apoptosis terjadi melalui mekanisme intrinsik dan ekstrinsik. Mekanisme ekstrinsik dimulai dengan pengikatan ligan yang memicu kematian reseptor pada permukaan sel. Kerusakan DNA, deprivasi faktor pertumbuhan dan stres oksidatif dapat menginduksi jalur intrinsik yang akan memicu depolarisasi mitokondria, sehingga melepaskan Cytochrome-c. Selanjutnya Cytochrome-c akan melepaskan Apoptotic Protease Activating Factor-1 (APAF-1) dan akan membentuk apoptosome. Apoptosome akan mengaktifkan caspase-9, yang kemudian mengaktifkan caspase-3 dan menginduksi apoptosis (Danial NN 2004; Jin Z *et al* 2005; Ashkenazi A *et al* 2017). Pada POP terjadi peningkatan apoptosis mitokondria, protein apoptosis dan penurunan rasio protein antiapoptosis dibandingkan dengan kontrol (Wen Y *et al* 2011; Kim EJ *et al* 2013). Selain itu, ada upregulasi protein proapoptosis, Cytochrome-c, caspase-3, caspase-9 pada POP dibandingkan kontrol (Zhao X *et al* 2011).

Pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa pada POP ada peningkatan apoptosis mitokondria dibandingkan kontrol (Kim EJ *et al* 2013). Selain itu, peningkatan protein apoptosis dan juga ditemukan penurunan rasio protein anti-apoptosis dengan protein apoptosis (Wen Y *et al* 2011) dan Bcl-xl adalah protein anti-apoptosis. Pada penelitian pendahuluan ini, daidzein dan glycitein dapat memfasilitasi interaksi antara gen NFkB dan Bcl-xl. Hal ini

menunjukkan bahwa kedua senyawa ini akan mendukung upregulasi protein anti-apoptosis pada POP.

Sebelumnya dilaporkan daidzein dapat memicu peningkatan regulasi Bcl-xl (Jin X *et al* 2017), sementara sampai saat ini tidak ada penelitian yang mengevaluasi efek glycitein pada Bcl-xl. Ini membuktikan bahwa daidzein dapat mempromosikan interaksi antara gen Hsp 70 dan HSF yang akan mendukung aktivitas Hsp 70 sebagai protein anti-apoptosis (Cheng EH *et al* 2001).

Sebagai kesimpulan pada studi *in silico* bahwa aglikon isoflavon kedelai dapat memodulasi TGF- β 1, Hsp70, Bcl-xl sinyal anti-apoptosis dan aglikon isoflavon Kedelai (*soybean*) bisa menjadi nutrisi alternatif atau kandidat dari produk herbal untuk tatalaksana prolaps dinding vagina.

6.2 Dosis Genistein Glycine Max (Kedelai)

Sampai saat ini dosis pemberian yang efektif dari genistein belum ada kesepakatan di antara para ahli. Dosis genistein yang biasanya digunakan berada dalam kisaran 0,25 mg sampai 1 mg/kgBB/hari (Landa JFR *et al* 2009). Pada penelitian ini dosis yang digunakan berdasarkan penelitian terdahulu tentang efek genistein glycine max (*soybean*) pada tikus yang diovariectomi yaitu dosis 0, 045 mg/kgbb/hari, 0,09 mg/kbb/hari dan dosis 0,18 mg/kbb/hari (Landa JFR *et al* 2017). Dosis genistein glycine max terhadap perbaikan atrofi vagina pasca ovariektomi didapatkan bahwa dosis 0,18 mg/kg bb/hari merupakan dosis yang paling efektif untuk peningkatan ekspresi RE- β pada epitel vagina, peningkatan proliferasi/ketebalan lapisan epitel, penurunan kadar MMP-9 pada gerusan vagina, peningkatan ekspresi Fibulin-5 pada stroma dan peningkatan ekspresi α Actin pada otot polos.

Hal ini dapat dilihat dari gambar histogram yang mendekati hasil yang didapat pada kelompok kontrol negatif. Semua data berikut telah memenuhi uji prasyarat parametrik, yaitu data telah terdistribusi normal sehingga data bisa dianalisa lebih lanjut dengan uji statistik guna membuktikan hipotesis penelitian.

6.2.1 Ekspresi RE- β

Terdapat adanya perbedaan yang bermakna rerata ekspresi RE- β pada kelompok kontrol positif ($59.73 \pm 3.30\%$) dengan kelompok perlakuan P1 ($70.27 \pm 3.43\%$), P2 ($79.00 \pm 5.75\%$) dan P3 ($82.34 \pm 5.75\%$). Bila berdasarkan nilai rerata \pm SD ekspresi RE- β tampak ada peningkatan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 bila dibandingkan dengan kontrol positif (tabel 5.1.3). Hal ini dapat dianggap terjadi peningkatan ekspresi RE- β pada kelompok perlakuan dan peningkatan ini bermakna secara statistik. Hasil menunjukkan bahwa secara statistik terjadi peningkatan ekspresi RE- β pada permukaan sel parabasalis vagina. Ekspresi RE- β yang tinggi pada epitel vagina karena paparan Genistein Glycine Max (*Soybean*) yang terus menerus selama 28 hari (gambar 5.1.1).

Diketahui reseptor merupakan mekanisme yang mempertahankan homeostasis. Reseptor dapat mengalami penurunan kepekaan yang dikenal dengan desensitisasi atau penurunan jumlah yang dikenal down regulation dikarenakan adanya rangsangan terus menerus oleh agonis, keadaan patologis atau karena proses degenerasi. Interaksi antara agonis dan reseptor yang terus menerus meningkatkan kepekaan reseptor yang disebut super-sensitive atau meningkatkan jumlah reseptor yang dikenal sebagai up regulation (Glass, 2000). Hal ini sesuai dengan teori bahwa RE- β diekspresikan dalam sel otot polos, epitel dan vaskular, sedangkan untuk RE- β yang terletak di jaringan vaskular memediasi efek genom estrogen pada pembuluh darah vagina (Fu X *et al.* 2003; Fuermetz *et al* 2015)

6.2.2 Kadar MMP-9

Terdapat adanya perbedaan yang bermakna rerata kadar MMP-9 pada kelompok kontrol positif (1.37 ± 0.54) dengan kelompok perlakuan P1 (0.78 ± 0.02), P2 (0.80 ± 0.04) dan P3 (0.85 ± 0.09). Bila berdasarkan nilai rerata \pm SD kadar MMP-9 tampak ada penurunan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 bila dibandingkan dengan kontrol positif (tabel 5.5.3). Hal ini dapat dianggap penurunan

kadar MMP-9 pada kelompok perlakuan dan penurunan ini bermakna secara statistik.

Genistein Glycine Max (*Soybean*) mampu menurunkan kadar MMP-9 pada gerusan vagina pada kelompok perlakuan (Gambar 5.9.1) Hal ini terlihat dari besarnya koefisien korelasi yang bermakna (signifikan) antara ekspresi TGF- β dan kadar MMP-9 yaitu -0.896 dengan p-value 0.000 (tabel 5.9.1). Kadar MMP-9 yang menurun pada dinding vagina berperan penting sebagai penyokong dasar panggul. Hal ini terjadi karena MMP-9 mengatur regulasi kolagen tipe I, III dan elastin pada dinding vagina. Kolagen tipe I bersifat lebih kuat dan meningkatkan *tensile strength* untuk support dasar panggul. Kolagen tipe III pada vagina sangat penting untuk akomodasi fetus saat persalinan. Jaringan ikat dinding vagina terdiri dari kolagen tipe I dan tipe III dalam proporsi seimbang. Bila proporsi ini berubah dan kolagen tipe III jumlah meningkat dibanding tipe I, akan menyebabkan prolaps dinding vagina (Moalli *et al* 2005).

Pada teori tentang efek penggunaan estrogen pada metabolisme kolagen dinding vagina ditemukan adanya penurunan komposisi kolagen tipe 1 vagina disertai dengan peningkatan dari dua bentuk MMP-9 baik yang proaktif maupun yang aktif (Kretowska *et al.*, 2011). MMP-9 mengalami up regulation setelah suatu jaringan mengalami regangan. Pada periode pasca salin, MMP-9 mengalami peningkatan. Ekspresi matriks metalloproteinase dibatasi oleh inhibitor MMP baik dari eksogen maupun endogen seperti tissue inhibitor matrix metalloproteinase 1 (TIMP-1). TIMP-1 merupakan inhibitor yang mengikat secara stoikiometri pada hampir semua MMP sehingga menghambat MMP secara ireversibel dan perubahan kadar TIMP-1 akan sangat mempengaruhi kadar MMP-9 (Rahn *et al.*, 2008).

Dilaporkan pada wanita dengan prolaps dinding vagina memiliki kadar MMP-9 yang lebih tinggi dibandingkan dengan wanita yang tidak mengalami prolaps (Roh *et al*, 2000; Zong W *et al* 2010). Dilaporkan juga ada hubungan antara peningkatan kadar

MMP-9 dengan penurunan kadar kolagen dalam struktur pendukung dasar panggul wanita dengan POP (Philips *et al*, 2006).

6.2.3 Ekspresi Fibulin-5

Terdapat adanya perbedaan yang bermakna rerata ekspresi Fibulin-5 pada kelompok kontrol positif ($70.26 \pm 6.11\%$) dengan kelompok perlakuan P1 ($79.52 \pm 4.24\%$), P2 ($81.80 \pm 2.78\%$) dan P3 ($88.70 \pm 2.95\%$). Bila berdasarkan nilai rerata \pm SD tergambar ekspresi Fibulin-5 tampak ada peningkatan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 bila dibandingkan dengan kontrol positif (tabel 5.6.3). Hal ini dapat dianggap peningkatan ekspresi Fibulin-5 pada kelompok perlakuan dan peningkatan ini bermakna secara statistik.

Genistein Glycine Max (*Soybean*) pada semua dosis mampu meningkatkan ekspresi fibulin -5 (Gambar 5.9.1). Hal ini terlihat dari besarnya koefisien korelasi yang bermakna (signifikan) antara ekspresi TGF- β dan ekspresi Fibulin-5 yaitu 0.956 dengan p-value 0.000 (tabel 5.9.1). Peningkatan ekspresi fibulin-5 pada dinding vagina dalam penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa defisiensi fibulin-5 dapat menyebabkan terjadinya prolaps (Tackas *et al*, 2009). Fibulin-5 berperan penting pada dinding vagina untuk mencegah terjadinya prolaps karena fibulin -5 sebagai protein yang berperan dalam perakitan serat elastin baru dan menghubungkan elastin ke sel melalui integrin sebagai reseptor di membran sel (Yanasigawa *et al* 2002). Diketahui elastin merupakan salah satu konstituen utama dari jaringan ikat di vagina. Berbeda dengan kekuatan kolagen, elastin berfungsi dalam fleksibilitas jaringan, eksistensi, ketahanan dan recoil (Liu X *et al* 2006).

Dilaporkan jaringan ikat dinding vagina wanita dengan POP ditemukan ekspresi tingkat elastin lebih rendah (Goepel C *et al* 2008). Beberapa penelitian menunjukkan hasil yang sama bahwa tingkat ekspresi mRNA LOXL-1 pada dinding vagina wanita dengan POP lebih tinggi dari non POP, namun setelah pemberian 17 β estradiol (E2) mengakibatkan ekspresi gen LOX mengalami

peningkatan pada dinding vagina tikus (Jung Hj *et al* 2009), Hasil yang sama pada penelitian lain menunjukkan bahwa E2 dapat meningkatkan ekspresi gen LOX dan bisa dipertimbangkan dapat digunakan untuk POP pada manusia (Zong W *et al* 2015).

6.2.4 Ekspresi α ACTIN

Terdapat adanya perbedaan yang bermakna rerata ekspresi α Actin pada kelompok kontrol positif ($44.95 \pm 6.62\%$) dengan kelompok perlakuan P1 ($59.34 \pm 4.61\%$), P2 ($67.99 \pm 1.79\%$) dan P3 ($74.43 \pm 6.75\%$). Bila berdasarkan nilai rerata \pm SD ekspresi α Actin tampak ada peningkatan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 bila dibandingkan dengan kontrol positif (tabel 5.7.3). Hal ini dapat dianggap peningkatan ekspresi α Actin pada kelompok perlakuan dan peningkatan ini bermakna secara statistik.

Peningkatan ekspresi α Actin pada penelitian ini menunjukkan Genistein Glycine Max (*Soybean*) mampu menurunkan apoptosis sel otot polos vagina (gambar 5.7.1). Hal ini terlihat dari besarnya koefisien korelasi yang bermakna (signifikan) antara ekspresi RE- β dan ekspresi α Actin yaitu 0.913 dengan p-value 0.000 (tabel 5.9.1). Apoptosis adalah proses kematian sel terprogram dan merupakan hal mendasar dalam berbagai proses fisiologis, termasuk embriogenesis dan remodeling jaringan. Apoptosis digambarkan sebagai akibat dari hipoksia, trauma, denervasi dan peningkatan metabolisme. Trauma persalinan pervaginam 3 kali pada hewan coba pada penelitian ini merupakan faktor resiko utama prolaps dinding vagina dimana regangan hebat pada dinding vagina saat persalinan pervaginam menimbulkan trauma otot polos vagina yang meningkatkan apoptosis pada keadaan akut (Faried *et al* 2013).

Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa ada perbedaan bermakna kepadatan sel otot polos pada dinding vagina yang mengalami prolaps dibandingkan yang tidak prolaps. Pada dinding vagina yang prolaps didapatkan fraksi sel otot polos vagina secara signifikan menurun dibandingkan dengan yang tidak prolaps (Tackas *et al* 2008). Hasil

yang sama juga didapatkan Meljerink AM *et al* (2013) bahwa ekspresi α Actin pada otot polos berperan pada patogenesis prolaps dinding vagina.

6.2.5 Ekspresi TGF- β

Terdapat adanya perbedaan yang bermakna rerata ekspresi konsentrasi TGF- β pada kelompok kontrol positif ($45.08 \pm 3.43\%$) dengan kelompok perlakuan P1 ($57.52 \pm 3.4\%$), P2 ($73.95 \pm 6.75\%$) dan P3 ($87.09 \pm 5.40\%$). Bila berdasarkan nilai rerata \pm SD ekspresi TGF- β tampak ada peningkatan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 bila dibandingkan dengan kontrol positif (tabel 5.4.3). Hal ini dapat dianggap peningkatan ekspresi TGF- β pada kelompok perlakuan dan peningkatan ini bermakna secara statistik.

Genistein Glycine Max (*Soybean*) mampu menginduksi peningkatan TGF- β pada kelompok perlakuan (Gambar 5.4.1). Hal ini terlihat dari besarnya koefisien korelasi yang bermakna (signifikan) antara ekspresi RE- β dan ekspresi TGF- β yaitu 0.685 dengan p-value 0.005 (tabel 5.9.1). Seperti dilaporkan pada penelitian sebelumnya bahwa TGF- β dapat merangsang proferasi fibroblas pada dinding vagina.

Fibroblas adalah sel yang paling banyak dalam jaringan ikat dan berperan dalam sintesis komponen matriks ekstraseluler. Fibroblas mensintesa kolagen dan elastin. Pada proses translasi yang terjadi di sel parabasalis vagina menghasilkan beberapa protein, antara lain, CDK dan Cyclin yang berperan dalam siklus pembelahan sel yang juga merangsang mitogenesis fibroblas (Jung *et al*, 2009).

Ekspresi TGF- β berperan penting pada dinding vagina. Hal ini karena Transforming Growth Factor- β (TGF- β) adalah sitokin multifungsi yang mengatur berbagai fungsi seluler, termasuk proliferasi, apoptosis, dan diferensiasi. Di sisi lain, CDK dan cyclin juga berperan dalam siklus pembelahan sel yang juga merangsang mitogenesis fibroblas dimana proliferasi fibroblas diinduksi oleh TGF- β (Leaks & Abraham 2004).

6.2.6 Proliferasi Epitel

Terdapat adanya perbedaan yang bermakna rerata proliferasi epitel pada kelompok kontrol positif ($36.76 \pm 8.05 \mu\text{m}$) dengan kelompok perlakuan P1 ($59.58 \pm 9.04 \mu\text{m}$), P2 ($90.10 \pm 13.27 \mu\text{m}$) dan P3 ($112.28 \pm 21.96 \mu\text{m}$). Bila berdasarkan nilai rerata \pm SD proliferasi epitel tampak ada peningkatan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 bila dibandingkan dengan kontrol positif (tabel 5.3.3). Hal ini dapat dianggap peningkatan proliferasi epitel pada kelompok perlakuan dan peningkatan ini bermakna secara statistik.

Hasil ini sesuai dengan pengamatan mikroskopis sayatan dinding vagina dengan pewarnaan Hematoksilin /HE (gambar 5.3.2) tampak terjadi peningkatan proliferasi /penebalan epitel dinding vagina pada hewan coba setelah diberi genistein glycine max (*soybean*) dibandingkan dengan yang tidak diberi genistein glycine max. Hal ini terlihat dari besarnya koefisien korelasi yang bermakna (signifikan) antara ekspresi RE- β dan ekspresi proliferasi yaitu 0.664 dengan p-value 0.007 (tabel 5.9.1).

Hal ini dimungkinkan terjadi karena keberadaan ikatan antara Genistein Glycine Max (*Soybean*) dengan reseptor estrogen (RE- β) di permukaan membran sel parabasal bagian, menyebabkan hantaran sinyal intraseluler yang dimulai dengan aktivasi enzim (fosfolipase -C). Enzim ini akan mengubah fosfatidil inositol di fosfat (PI-2p) menjadi fosfatidil inositol trifosfat (PI-3p). Reseptor PI-3p ini berada di permukaan endoplasmik retikulum (ER). Ikatan antara PI-3p dengan reseptor tersebut mengakibatkan calcium gate open, sehingga terjadi peningkatan ion kalsium intra seluler. Ion kalsium tersebut akan berikatan dengan calsineurin di dalam sitoplasma. Keberadaan calsineurin kompleks ini menghambat aktivitas dari Inhibitor kappa beta (Ik- β), sehingga nuclear factor kappa beta (NFk- β) aktif, selanjutnya mengalami translokasi ke inti sel, dan memicu proses transkripsi. Proses transkripsi menghasilkan mRNA yang ditransfer ke sitoplasma (ribosom). Di ribosom terjadi proses translasi menghasilkan beberapa protein antara lain CDK, Cyclin yang berperan pada siklus

pembelahan sel dan protein untuk peningkatan ekspresi RE- β (Alexande, 2002; Lu *et al*, 2004; Shakir dan Derek, 2004).

Di sisi lain, genistein glycine max (*soybean*) yang ditangkap oleh RE- β bertindak sebagai antioksidan yang akan menghambat ROS, akibatnya oksidan di dalam sel parabasalis vagina akan diregulasi. Akibat regulasi tersebut maka kerusakan protein intraseluler akan menurun sehingga sintesis HSP-70 teregulasi. Kondisi HSP-70 yang teregulasi tersebut akan berfungsi sebagai chaperon (pengarah protein) yang akan menginduksi faktor transkripsi untuk meningkatkan sintesis protein khususnya seperti: CDK (Cyclin Dependent Protein Kinase) dan Cyclin yang meningkatkan proliferasi epitel (Lee, 2006).

6.2.7 Ekspresi Hsp 70

Terdapat adanya perbedaan yang bermakna rerata ekspresi HSP-70 pada kelompok kontrol positif ($94.98 \pm 1.78\%$) dengan kelompok perlakuan P1 ($70.65 \pm 15.61\%$), P2 ($50.30 \pm 9.52\%$) dan P3 ($40.80 \pm 5.70\%$). Bila berdasarkan nilai rerata \pm SD ekspresi HSP-70 tampak ada penurunan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 bila dibandingkan dengan kontrol positif (tabel 5.8.3). Hal ini dapat dianggap penurunan ekspresi HSP-70 pada kelompok perlakuan dan penurunan ini bermakna secara statistik.

Genistein glycine max (*soybean*) mampu menurunkan HSP-70 (gambar 5.8.1). Hal ini terlihat dari besarnya koefisien korelasi yang bermakna (signifikan) antara ekspresi RE- β dan ekspresi HSP-70 yaitu -0.673 dengan p-value 0.006 (tabel 5.9.1). Hal ini terjadi karena genistein glycine max (*soybean*) sebagai antioksidan kuat (Ullah dan Obayed, 2009; Pitella *et al*, 2009) dapat menghambat pembentukan ROS.

Sebelumnya dilaporkan genistein glycine max (*soybean*) yang ditangkap oleh RE- β bertindak sebagai antioksidan yang akan menurunkan ROS dan oksidan di dalam sel akan diregulasi sehingga kerusakan protein intraseluler menurun. Dalam hal ini fungsi HSP-70 menjadi sangat penting sebagai respons terhadap

stress akibat ovariectomi dan kematian sel merupakan mekanisme utama dalam tubuh (Faried, 2003; Goetz *et al.*, 2003).

Kondisi HSP-70 yang teregulasi tersebut akan berfungsi sebagai chaperon (pengarah protein) menginduksi faktor transkripsi untuk meningkatkan sintesis protein khususnya seperti: CDK (Cyclin Dependent Protein Kinase) dan Cyclin yang meningkatkan proliferasi epitel (Lee, 2006). Peningkatan ekspresi HSP-70 merupakan kompensasi dan berperan mempertahankan homeostasis struktur dan fungsi sel baik pada keadaan normal maupun pada situasi stres (Snoeck dan Cornelussen, 2001). Dalam hal ini HSP-70 yang tinggi mempunyai efek antiapoptosis diperlukan untuk menghindari kerusakan sel dengan menekan produksi ROS (Christians *et al*2002; Sudiana,2008).

DAFTAR PUSTAKA

- Agius JC, Brincat MP. 2009. Urogenital Atrophy. *Climacteric* 12:279-285.
- Akhtrust RJ, Hata A. 2012. Targeting the TGF beta signaling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov* 11(10): 799=811
- Albertazzi P, Purdie DW.2002. The nature and utility of the phytoestrogens: a review of the evidence. *Maturitas* 42(3):173-185.
- Alexande A, Rehli M, Kabingu E. 2002. Novel Signal Transduction Pathway Utilized by extracellular Hsp-70, *J.Biol.Chem.*277(17):15028-15035.
- Ananingati, 2006. Pengaruh isoflavon Genistein Daidzein ekstrak pueraria Lobata Terhadap ekspresi reseptor beta pada endotel aorta tikus hipoestrogen. Tesis Program studi obstetri ginekologi Universitas Brawijaya.
- Arsana IWA. 2012. Peran genistein dalam meningkatkan pembentukan dan menghambat resorpsi tulang ratus novergicus wistar hipoestrogen melalui pemingkatan superoksidismutase dan glutathion peroksidase. Disertasi. Program Doktorat Universitas Brawijaya.
- Aqira PM and Barbosa AP. 2014. Use of soy isoflavones on hormone replacement therapy during climateric, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1071-1078.
- Ballagh SA. 2005. Vaginal hormone therapy for urogenital and menopausal symptoms. *Semin Reprod Med* 223: 126-140.
- Barlow J, Jo Ann, Johnson P, Scofield L. 2007.Fact Sheet on The Phytoestrogen Genistein. *Bcerc Cotc* 47:47-55.
- Baziad A. 2003. Menopause dan Andropause. Yayasan Balai Pustaka. Sarwono Prawirohardjo hal 100-123.

- Biro Pusat Statistik,2005. Proyeksi Penduduk Indonesia. Jakarta.
- Boreham MK, Wai CY, Miller RT, Schaffer JI, Word RA.2002. Morphometric analysis of smooth muscle in the anterior vaginal wall of women with pelvic organ prolapse. *Am J Obstet Gynecol* 187:56–63.
- Borras C, Gambini J, Gomez MC, Sastre J, Pallardo FV, Mann GE, and Vina J. 2005 17 β -oestradiol upregulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. *Aging Cell*;4: 113–118.
- Budatha M, Roshanravan S, Zheng Q, 2011, Extracellular matrix proteases contribute to progression of pelvic organ prolapsed in mice and humans. *J Clin Invest* 2011;121:2048-59.
- Cederroth CR, Zimmermann C, Nef S.2012. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Molecular and Cellular Endocrinology* 355, 191-200.
- Chen, GD. 2007. Pelvic Floor Dysfunction in Aging Women. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 46, 374-8.
- Chen HY, Chung YW, Lin WY, Chen WC, Tsai FJ, Tsai CH.2008. Estrogen receptor alfa polymorphism is associated with pelvic organ prolapse risk. *Int Urogynecol J* 19: 1159-116.
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavel RA, Mak TW, Lindsten T *et al.* 2001. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain only molecules preventing BAX and BAK mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8(3): 705-11.
- Christian ES, Liang -Jun Y, Benjamin IJ.2002. Heat shock factor 1 and heat shock proteins: Critical partner in protection against acute cell injuri. *Critical Care Medicine* 30(1):S43-S50.

- Clark AL, Slayden OD, Hettrich K, Brenner RM (2005) Estrogen increases collagen I and III mRNA expression in the pelvic supporttissues of the rhesus macaque. *Am J ObstetGynecol* 192: 1523-1529.
- Clarkson TB, Eden J, Messina M, Setchell R, Barnes S. 2000. The role of isoflavonses in menopausal health; Consensus Opinion of the north American Menopause Socirty. *Menopause* 4; p 215-229.
- Cui Y, Zhou J, Li C, Wang P, Zhang M, Liu Z, *et al* 2010. Effect of stimulated weightsness n liver Hsp and Hsp 70 and Hsp 70 mRNA esprestion in rats. *Iny JClin Exp Med* 3:48-54.
- Curran S, Murray GI (1999) Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 189: 300-308.
- Curran S, Murray GI (2000) Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36:1621-1630.
- Danial NN, Korsmeyer SJ, 2004. Celldeath: critical control points. *Cell* 116 (2):205-19.
- David H, 1994. Jaringan ikat dalam histology, Binarupa aksara, 201-27.
- De Toda IM, Vida C, Ortega E, Fuente MDL. 2016. HSP 70 baal levels, a tissue marker of the rate of aging and longevity in mice *Exp Gerontol* 84: 21-8.
- Derynck R, Zhang YE, 2003. Smad dependent and smad in independent pathway in TGF β family signaling. *Nature* 425 (6958): 577-84.
- Dietz HP, 2015. Pelvic Organs Prolaps-A Rieview.The Royal Australian College for General Practise, 44, 446-452.

- Downing KT, Strobe FA, Mikhail MS, Disanto ME. 2013. Pregnancy with and Without birth trauma modulates the gene expression of proteins involved in elastic fiber homeostasis in the rat vagina, *Journal of Obstetrics and Gynecology* 3; 603-608.
- Drewes PG, Yanagisawa H, Starcher B, Hornstra I, Csiszar K, Marinis SI, Keller P, Word RA. 2007. Pelvic organ prolapse in fibulin-5 knockout mice: pregnancy-induced changes in elastic fiber homeostasis in mouse vagina. *Am J Pathol* 170(2):578-589.
- Eden JA, 2012. Phytoestrogens for menopausal symptoms: A reiview, *Maturitas* 72, p 157-159.
- Ellerbroek, S. M., Wu, Y. I., Overall, C. M., Stack, M. S. 2001. Functional Interplay between Type I Collagen and Cell Surface Matrix Metalloproteinase Activity. *J Biol Chem*, 276, 24833-42.
- Ewies Ayman A. A., 2006. Cellular and molecular characterisation of pelvic ligaments fibroblasts: Effects of gonadal steroids. Thesis submitted for the degree of Doctor of Medicine. Department of Cancer Studies and Molecular Medicine. Leicester and Warwick Medical School. University of Leicester.
- Faried A. 2003. Heat shock protein dan kanker: Antara harapan dan Tantangan. Postdoctoral Fellow Departement of General Surgical Science, Graduate School Medicine, Gunma University, Japan 1-4.
- Farouk H, Fatah AAE, Ibrahim K, and Helmy W. 2013. Vaginal wall changes in muscles and connective tissues after vaginal birth, *Life Science Jorunal* 10(1): 2816-2823.
- Fu X, Rezapour M, Wu X, Li L, Sjogren C, *et al* (2003) Expression of estrogen receptor-alpha and -beta in anterior vaginal walls of genuinestress incontinent women. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 14:276-281.

- Fuermetz A, Schoenfeld M, Ennemoser S, Muetzel E, Jeschke U, *et al* (2015) Change of receptor steroid expression in the posterior vaginal wall after local estrogen therapy. *Eur J ObstetGynecolReprod Biol* 187: 45-50.
- Gilmore TD. 2006. Introduction to NF- κ B: player, pathway, perspectives. *Oncogene* 25(51):6680-4.
- Glaizer GM, Bowman MA. 2001. Review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. *Arch. Intern. Med.* 161(9).
- Glass C & Fosenfelt MG, 2000 The coregulator exchange in transcriptional function of nuclear receptor. *J Endocrinol* 163: 379-383.
- Goepel C (2008) Differential elastin and tenascin immunolabeling in the uterosacral ligaments in postmenopausal women with and without pelvic organ prolapse. *Acta Histochem* 110: 204-209.
- Goetz, MP, Toft DO, Ames MM, Erlicman C. 2003. The Hsp 90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Annals of oncology* 14: 1169-1176.
- Gorodeski GI. 2005. Aging and estrogen effects on transcervical-transvaginal epithelial permeability. *J Clin Endocrinol Metab*; 90:345-51
- Han KK, Soares JM, Haidar M.A, de Lima GR, Baracat EC (2002b). Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstet. Gynecol.* 99:389-94.
- Handa VL, Garrett E, Hendrix S *et al.* 2004. Progression and remission of pelvic organ prolapse: a longitudinal study of menopausal women. *Am J Obstet Gynecol*; 190: 27-32.
- Hartl FU, Hayer Hartl M. 2002. Molecular chaperones on the cytosol: Form nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-8.

- Ibanez C, Baulieu EE, 2005. Mechanism of action of sex steroid hormones and the analog. *Current Management of the Menopause*. p 94.
- Inal HA, Kaplan PB, Usta U. 2010. Neuromuscular morphometry of the vaginal wall in women with anterior vaginal wall prolapse. *Neurourol Urodyn* 29:458-463.
- Jyoti, Agrawal SS, Saxena S, Sharma A. 2015. Phytoestrogen "Genistein": Its Extraction and Isolation from *Soybean Seeds*; 7(6); 1121-1126.
- Jackson S, James M, Abrams P. 2002. The effect of oestradiol on vaginal collagen metabolism in postmenopausal women with genuine stress incontinence. *BJOG* 109: 339-344.
- Jin X, Sun J, Yu B, Wang Y, Sun WJ, Yang J *et al* 2017. Daizeiin stimulates osteogenesis facilitating proliferation, differentiation and anti apoptosis in human osteoblast like MG-63 cells via estrogen receptor dependent MEK/ERK and P13K/Akt Activation. *Nutr Res* ;42:20-30.
- Jung HJ, Jeon MJ, Yim GW, Kim SK, Choi JR, Bai SW. 2009. Change in expression of fibulin-5 and lysyl oxidase like-1 associated with prolaps organ pelvis, *European Journal of Obstetric and Reproductive Biologi*. 195: p 117-122.
- Junizaf Z, Riskar M 2011. Prolaps organ panggul. *Himpunan Uroginekologi Indonesia edisi 1*; hal 29-37..
- Karam JA, Vazques DV, Lin VK, Zimmern PE. 2007. Elastin expression and elastic fiberwidth in the anterior vaginal wall of postmenopausal women with and without prolaps. *BJU Int* 100(2); p346-350.
- Kerkhof, M. H., L. Hendriks and H. A. M. Brölmann. 2009. Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapse - a review of the current literature. *Int Urogynecol J* 20:461-474.

- Kiety CM, Sherratt MJ, Shtleworth CA. 2002. Elastic fibres. *J Cell Sci* 115(pt14): 28: 2817-28.
- Kim EJ, Chung N, Park SH, Lee KH, Kim SW, Kim JY *et al* 2013. Involvement of oxidative stress and mitochondrial apoptosis in the pathogenesis of pelvic organ prolapse. *J Urol* 189(2):588-94.
- Kochler KF, Huelguero LA, Haldosen LA. 2005. Reflections on discovery and significance of estrogen receptor β . *Endocrine review*. vol.26(3):465-78.
- Kontogiorgis CA, Papaioannaou P, Ltina DJ.2005. Matrix Metalloproteinase Inhibitor: A Review on Pharmacophore Mapping and (q) Sars Results *Current Medical Chemistry* 12;339-355.
- Kretowska MZ, Braun NM, Eboue C, Abeguile G, Wolcnski S, Kotler M, Theobald PV, 2011, Expression of estrogen receptors in the pelvic floor of pre and post menopausal women presenting pelvic organ prolapse, *Folia Histochemia et Cytobiologica* vol 49 No 3, 521-527.
- Landa JFR, Escobedo JC, Olguin AP, Dominguez ER, Morales BB, Huerta EVH, Torres AS. 2017. The Phytoestrogen Genistein Produces Similar Efek 17β -Estradiol on Anxiety like behavior in Rats at 12 Week s after Ovairectomy, *Biomed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2017/9073816>.
- Landa JFR, Hernandez JD, Hernandez C, Saavedra M. 2009. Anxilotic like effect of phytoestrogen genistein in rats with long term absence of ovarian hormones in the black and white model“*Progress in Neuro Psychopharmacology Biological Psychiatry*, vol 33,no 2,pp 367-372.
- Lansheere. LD, Munaut C, Nusgens B, MILLrd C, Rubod C, Nisolle M, Cosson M, Foiidart JM. 2013. Histology of the vaginal wall with pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J*,DOI 10.1007/s00192-013-21111-1.

- Lara LAS, Useche B, Ferrriani RA, Reis RM, Sa MFS, Freitas MMS, Rosa e Silva ACJS. 2009. The effects of hypoestrogenism on the vaginal wall: Interference with the normal sexual response. *J Sex Med* 6: 30-39.
- Leask A and Abraham DJ. 2004. TGF- β signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 18:816-827.
- Lee J, 2006. Asiaticoside Induce Human Collagen I Synthesis through TGF β Receptor I Kinase (T β RI Kinase)-Independent Smad Signaling. *Planta Med.* 72:324-328.
- Leeman MF, Curran S, Murray GI (2002) The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37: 149-166.
- Li BS, Hong L, Min J, Wu DB, Hu M, Guo WJ. 2013. The expression of glutathione peroxidase -1 and the anabolism of collagen regulation pathway transforming growth factor beta1-connective tissue growth factor in women with uterine prolapse and the clinic significance. *Clin Exp Obstet Gynecol* 40(4):586-90.
- Li T, Ma Y, Zhang H, Yan P, Huo L, Hu Y, Chen X. Li T, Zhang M, Liu Z. 2016. Differential Regulation of Morphology and Estrogen Receptor-Alpha Expression in the vagina of ovariectomized Adult Virgin Rats by Estrogen Replacement: A Histological Study, *International Journal of Endocrinology*. <http://dx.Doi.org/10.1155/2016/1093512>
- Liu C, Wang Y, Li BS, Yang Q, Tang JM, Min J *et al* 2017. Role of transforming growth factor beta 1 in the pathogenesis of pelvic organ prolapse.: a potential therapeutic target. *Int J Mol Med* 40: 347-56.
- Liu X, Zhan Y, Pawkyj B, Damaser M, Liu T. 2006. Failure of elastic fiber homeostasis leads to pelvic floor disorders. *Am J Pathol* 168: 519-528.

- Mariene MC, 2009, Anatomy of pelvic Floor Dysfunction. *Obstet Gynecol Clin N Am* 36: 401-419.
- Masaque J. 2000. How cell read TGF beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1 (3):169-78.
- Mazumder AR, Hongsprabhas P. 2016. Genistein as antioxidant and antibrowning agents in in vivo and in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 82; p 379-392.
- Meijerink, A. M., van Rijssel, R. H. and van der Linden, P. J. 2013. 'Tissue composition of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse', *Gynecol Obstet Invest*, 75(1), pp. 21-7.
- Miozo F, Saberan Djonaidi D, Mezge V. 2015. HSFs, stress sensors and sculpptors of transcription compartements and epigenetic landscape. *J Mol Biol* 427: 3793-816.
- Moalli PA, Talarico LC, Sung VW. 2004. Impact of menopause on collagen subtyoes in the arcus tendenneous fasciae pelvis. *Am J Obstet Gynecol* 190: 620-7.
- Moalli PA, Shad SH, Zyczynski HM, Gordy SC, Meyn LA. 2005. Remodelling of vaginal connective Tissue in Patients with Prolapse. *Obstet Gynecology*: 106(5): 953-63.
- Murray GI (2001) Matrix metalloproteinases: a multifunctional group of molecules. *J Pathol* 195: 135-137.
- Moreira AC, Silva AM, Santos MS, Sardao VA. 2014. Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. *Jurnal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 143.p 61-71
- Nelson DE, Ihekwaba AE, Elliot M. 2004. Oscillation in NF- κ B signaling control the dynamics of gene expression. *Science* 306 (5696);704-708.
- Noerpramana, NP.2005. Fitoserm: Terapi terkini dalam mengatasi Masalah Kesehatan Menopause, Simposium PERMI, Jakarta, hlm.16-36.

- Novida A, 2013. Perbedaan ekspresi MMP-9 dan TIMP-1 pada nulipara dan postpartim. Studi pada otot levator ani, dinding vagina dan ligamentum sacrouterina Tikus betina norvegicus, Tesis PPDS Obgin Universitas Brawijaya, hal. 69-70.
- Ozdegirmenci O, Karslioglu Y, Dede S.2005. Smooth muscle fraction of the round ligament in women with pelvic organ prolapse: a computer-based morphometric analysis. *Int Urogynecol J*;16:39-43.
- Patel, P. D., Amrute, K. V. & Badlani, G. H. 2007. Pelvic Organ Prolapse and Stres Urinary Incontinence: A Review of Etiological Factors. *Indian Journal of Urology*, 23, 135-41
- Paul C, Tess DB, Sandara. 2003. Phytoestrogen: Recent Developmens *Planta Med* 69: 589-599.
- Perkins ND.2007. Integrating cell signalling pathway with NF- κ B and IKK function. *Nat.Rev.MOL.Cell Biol.* 8(1):49-62.
- Pessina MA, Hoyt RF, Goldetein I, Traish AM. 2006. Deferential regulation of the expression estrogen, progesterone, and androgen receptors by sex steroid hormones in the vvagina: Immunohistochemical studies. *J Sex Med* 3:804-14.
- Petersson K & Gustafsson J.2001. A role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Ann Rev Physio* 163: 165-192.
- Phillips CH, Anthony F, Benyon C, Monga AK.2006. Collagen metabolism in the uterosacal ligaments and vaginal sikin of women with uterine prolapse. *BJOG* 113: 39-46.
- Pilsakova L, Rieicansky L, Jagla F. 2010. The Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens, *Physiol. Res.*59: 651-664.
- Pitella, F; Dutra, RC; Junior, DD; Lopes MTP, Barbosa NR.2009. antioxidant and cytotoxic Activities of centella asiatica (L) Urb. *IntJ.Mol Sci.* 10(9), 3713-3721.

- Polito F, Marini H, Bitto A, Irrera N, Vaccaro M, Adamo EB, *et al* 2017. Genistein Aglycone, a soy derived isoflavon improve skin change induced by ovariectomy in rats. *Br J Phaarmacol* 165(4):994-1005.
- Qi XY, Hong L, Guo FQ, Fu Q, Chen L, Li BS, 2011. Expression of transforming growth factor beta 1 and connetive tissue growth factor in women with pelvic organ prolapse. *Saudi Med J*32(%):474-8.
- Rahn DD, Acevedo JV, Word RA, 2008. Effect of vaginal distension on elastic fiber synthesis and matrix degradation in the vaginal wall: potential role in the pathogenesis of pelvic organ prolapsed. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:R1351-R1358.
- Resplande J, Gholami SS, Graziottin TM, Rogers R, Lin CS, Leng W, Lue TF.2002. Long-term effect of ovariectomy and simulated birth trauma on the lower urinary tract of female rats. *J Urol*;168: 323–30.
- Rodriguez-DF, Martinenez-O, Kawa-KS, VillanuevaEL. 2011. Comparisonof hemodynamic, biochemical and hematological parameters of healthy pregnanat women in the third trimester of pregnancy and the active labor phase. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 11(33):1471-2393.
- Roh, CR, Yoon BK, Lee JH 2000. Up regulation of Matrix Metallpproteinase -9 in Human Myometrium During Labour: a Cytokine Mediated Process in Uterine Smooth Muscle Cel. *Molecular Human Reproduction* 6 (1): 96-102.
- Rosdiana, Nenden 2008. Heat shock protein dan efek proteksinya terhadap miokardium. *Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Univ.Indonesia.*
- Ruiz-Zapata AM, Kerkhof MH, Ghazanfari S, Zandieh-Doulabi B, StoopR, (2016) Vaginal fibroblastic cells from women with pelvic organprolapse produce matrices with increased stiffness and collagen content. *Sci Rep* 6: 22971.

- Ruiz-Zapata AM, Kerkhof MH, Zandieh-Doulabi B, Brolmann HA, SmitTH, (2014) Functional characteristics of vaginal fibroblastic cells from premenopausal women with pelvic organ prolapse. *Mol Hum Reprod* 20: 1135-1143.
- Rosic S, Kendic S, Rosic M. 2013. Phytoestrogens Impact on Menopausal Symptomatology Jun 25 (2): 97-100.
- Scambia G, Mango D, Signorile P G, Anselmi Angeli R A, Palena C, Gall Bombardelli E.2000. Clinical effects of a standardized soy extract in postmenopausal women: A pilot study. *Menopause* 7 (2):105–111.
- Shakir and Derek,A.M. 2004. Signal Transduction via NF-KB pathway: a targeted treatment modality for infection, inflammation and repair, 22:67-69.
- Shao, S., Duncan, A. M., Yang, R., Marcone, M. F., Rajcan, I. and Tsao, R. 2011. 'Systematic evaluation of pre-HPLC sample processing methods on total and individual isoflavones in soybeans and soy products', *Food Research International*, 44(8), pp. 2425-2434.
- Söderberg MW, Johansson B, Masironi B, Byström B, Falconer C, Sahlin L, Ordeberg GE. 2007. Pelvic floor sex steroid hormone receptors, distribution and expression in pre- and postmenopausal stress urinary incontinent women. *Acta Obstet Gynecol Scand*;86:1377–84.
- Speroff L, Glass RH, Kase NG.2005. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Six Ed. Philadelphia: William & Wilking.
- Strudee DW and Panay N. 2010. Recommended therapy atrophy vagina in postmenopausal women, *International Menopause Society*.
- Sudiana IK.2008. *Patobiologi molekuler kanker*. Penerbit Salemba, Jakarta:36,85.

- Sun B, Zhou L, Wen Y, Wang C, Baer TM, Pera RR, *et al* 2014. Proliferative behavior of vaginal fibroblasts from women with pelvic organ prolapse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 183: 1-4.
- Swift S, Woodman P, O'Boyle A, *et al*: 2005. Pelvic Organ Support Study (POSST): The distribution, clinical definition, and epidemiologic condition of pelvic organ support defects. *Am J Obstet Gynecol* 192:795.
- Takacs P, Saiz C, Jaramillo Sm Zhang Y, Yaavagak S, Candotti K, Medina CA. 2011. Cellular proliferation in female pelvic organ prolapse: A Pilot Study. *Arch Gynecol Obstet* 281: 1329-1332.
- Tazawa H, Sato K, Tsutiya A. Tokeshi M. Oktani konekoR. 2015. A microfluidic cell culture system of monitoring of sequential changes in endothelial cell after heat stress. *Thromb Res* 136: 328-34.
- Thomas, ANS.1992. *Tanaman Obat Tradisional* 2. Kanisius, Yogyakarta.
- Tinelly A, Malvasi A, Rahimi S. 2010. Age related pelvic floor modifications and prolapse risk factors in postmenopausal women. *Menopause* 17:204-12.
- Trowers OC, Meyer I, Markland A, Richter HE, Addis I. 2018. A Review of Phytoestrogens and their Association with Pelvic Floor Conditions, *Female Pelvic Med Reconstr Surg* 24(3), 193-202.
- Ullah, M Obayed, 2009. Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activity of *Centella asiatica*. *European Journal of Scientific Research*. vol 30 No.2, pp.260-264.
- Velde CV.2000. Bcl-2 and Genetic Control of necrosis Like cell death through the mitochondrial Permeability Transition Pore. *J Molecular and Cellular Biology*-August 20(15): 5464-5468.

- Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92: 827-839.
- Wang R, Tu J, Zhang Q, Zhang X, Zhu Y, Ma W, Cheng C, Brann DW, Yang F. 2013. Genistein attenuates ischemic oxidative damage and behavioral deficits via eNOS/Nrf2/HO-1 Signaling. *HIPPOCAMPUS*;23:634-647.
- Wang S, Zhang Z, Lu D, Xu Q (2015) Effects of mechanical stretching on the morphology and cytoskeleton of vaginal fibroblasts from women with pelvic organ prolapse. *Int J Mol Sci* 16: 9406-9419.
- Wantri AK. 2005. Efek isoflavone genistein dan daidzein ekstrak *Peuraria lobata* strain kangean terhadap endometrium tikus (*Rattus novergicus*) hipoestrogen. Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya Malang.
- Wen Y, Zhao YY, Li S, Polan ML, Chen BH. 2007. Differences in mRNA and protein expression of small proteoglycans in vaginal wall tissue from women with and without stress urinary incontinence. *Hum Reprod*;22:1718-24.
- Word RA, Pathi S, Schaffer JI. 2009, Pathophysiology of pelvic organ prolapse. *Obstet Gynecol Clin N Am* 36:521-539.
- Yamamoto K, Yamamoto M, Akazawa K, Tajima S, Wakimoto H, *et al* (1997) Decrease in elastin gene expression and protein synthesis in fibroblasts derived from cardinal ligaments of patients with prolapses uteri. *Cell Biol Int* 21: 605-611.
- Yanagisawa H, Schluterman MK, Brekken RA. 2009. Fibulin-5, an integrin-binding matricellular protein: its function in development and disease. *J Cell Commun Signal* 3:337-47.
- Young N, Rossamilia A, Arkwright J, Lee J, Tuck MD, Meendez J, Werkmeister J, Garget CE, 2017. Vaginal wall weakness in parous ewes: a potential preclinical model of pelvic organ prolapse, *Int Urogynecol J*28: 999-1004.

- Yuan D, Ying PAN, Yan Chen, Toshio Uno, Shahui Zhang, Yoshihiro Kano. 2008. An improved method for basic hydrolysis of isoflavone malonylglucosides and quality evaluation of chinese soy materials, *Chem Pharm Bull*, 56(1), 1-6.
- Zhao X, Ma C, Li R, Xue J, Liu J, Liu P, 2017 Hypoxia induce apoptosis through HIF -1 α signal pathway in human uterosacral ligament of pelvic organ prolapse. *Biomed Res Int*: 8 Article ID 8316094.
- Zhou JB, Zheng YL, Zeng YX, Wang JW, Pei Z, Pang JY. 2018. Marine derived xyloketal derivatives exhibit anti stress and anti ageing effect through HSF pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Eur J Med Chem* 148: 63-72.
- Zong W, Jiang Y, Zhao J, Zhang J, Gao JG. 2015. Estradiol plays a role in regulating the expression of lysyl oxidase family genes in mouse urogenital tissues and human Ishikawa cells. *J Zhejiang Univ Sci B* 16:857-864.

BIOGRAFI PENULIS

Dr.dr. Pribakti Budinurdjaja, SpOG(K), lahir di Balikpapan pada tanggal 16 Oktober 1959. Staf pengajar di Bagian Obstetri dan Ginekologi di Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin. Lulus dokter umum tahun 1987 dan dokter spesialis obstetri dan ginekologi tahun 1997 di FK Universitas Airlangga Surabaya, lulus konsultan subspesialis uroginekologi tahun 2005 di FK Universitas Indonesia Jakarta dan lulus doktor tahun 2019 pada Program Studi Doktor Fakultas Kedokteran Kekhususan Biomedik di FK Universitas Brawijaya Malang.

Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG-KFER, lahir di kota Tabanan Bali, tanggal 30 Juni 1957. Staf pengajar di Bagian Obstetri dan Ginekologi di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Lulus dokter umum dari FK Universitas Udayana Bali tahun 1984. Lulus spesialis Obstetri dan Ginekologi dari FK Universitas Airlangga Surabaya tahun 1994. Lulus konsultan subspesialis Fertilitas Endokrinologi Reproduksi dari FK Universitas Airlangga Surabaya tahun 2007. Meraih gelar doktor biomedik dengan predikat cumlaude dari Pascasarjana FK Universitas Brawijaya Malang tahun 2012.

Dr.dr. Ika Kustiyah Oktavianti, M Kes.SpPA, lahir di Banjarmasin, 12 Oktober 1968. Sebagai Staf pengajar di bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin. Lulus Kedokteran Umum tahun 1994 dan Spesialis Patologi Anatomi tahun 2004 di Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Lulus Doktor tahun 2012 di Biomedik Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Prof. Dr. dr. Djanggan Sargowo SpPD, SpJP (K), FIHA, FACC, FCAPC, FESC, FASCC, lahir di Sragen pada tanggal 21 September 1947. Staf pengajar di bagian Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya / RSUD Dr. Saiful Anwar Malang. Lulus dokter umum pada tahun 1974 di Fakultas Kedokteran Universitas Gajahmada, lulus dokter spesialis penyakit dalam pada tahun 1989 di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, lulus dokter spesialis penyakit jantung dan pembuluh darah pada tahun 1983 di Fakultas Kedokteran Universitas Gajahmada, dan lulus doktor pada tahun 1996 di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.