

Pemberian Kedelai Hitam (*Glycine soja*) Meningkatkan Ekspresi RE- α Aorta Tikus Ovariectomi

Dwi Yuliawati^{1✉}, Wuri Widi Astuti², Fitri Yuniarti²

¹ Poltekkes Kemenkes Malang, Indonesia

² STIKES Karya Husada Kediri, Indonesia

✉ liadil464@gmail.com



ABSTRAK

Menopause merupakan suatu kondisi pada wanita yang ditandai dengan penurunan fungsi estrogen akibat menurunnya fungsi ovarium dan berdampak pada peningkatan terjadinya masalah kardiovaskuler. Pemenuhan kebutuhan estrogen pada menopause dapat menggunakan jenis fitoestrogen dari kedelai hitam. Penelitian bertujuan membuktikan kedelai hitam (*Glycine soja*) dapat meningkatkan ekspresi RE- α pada aorta tikus ovariectomi. Sampel penelitian (25 ekor tikus betina) dibagi secara random menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (K-), kontrol positif (K+) dan perlakuan (P1,P2,P3). Ovariectomi dilakukan pada K+ dan P1,P2,P3. Tiga puluh hari *post* ovariectomi tikus diberi perlakuan dengan pemberian kedelai hitam dosis 50, 100, 150 mg/200 gr/hari selama 30 hari. Ekspresi RE- α menggunakan metode immunohistokimia. Hasil analisis *Kruskal Walls* ($\alpha=0,05$) menunjukkan *p value* $0,027 < \alpha=0,05$, artinya adanya efek signifikan pemberian kedelai hitam terhadap peningkatan ekspresi RE- α aorta tikus ovariectomi. Pengujian *Post Hoc* dengan *Mann Whitney* menunjukkan terjadi peningkatan signifikan ekspresi RE- α pada kelompok perlakuan dosis 150 mg/200 gr/hari dibandingkan kelompok kontrol positif (K+)

Kata kunci: ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*), reseptor estrogen α , aorta, tikus ovariectomi

ABSTRACT

*Menopause is a condition in women characterized by decreased estrogen function due to decreased ovarian function and has an impact on increasing the occurrence of cardiovascular problems. Fulfillment of estrogen needs in menopause can use phytoestrogens from black soybeans. The study aims to prove that black soybean (*Glycine soja*) can increase RE- α expression in the aorta of ovariectomized rats. Research samples (25 female rats) were randomly divided into 5 groups: negative control group (K-), positive control (K+) and treatment (P1, P2, P3). Ovariectomy was performed on K+ and P1,P2,P3. Thirty days post ovariectomy, the rats were treated with black soybean doses of 50, 100, 150 mg/200 g/day for 30 days. RE- α expression using immunohistochemical method. The results of *Kruskal Walls* analysis ($\alpha=0.05$) showed a *p value* of $0.027 < \alpha=0.05$, meaning that there is a significant effect of black soybean administration on increasing the expression of RE- α in the aorta of ovariectomized rats. *Post Hoc* testing with *Mann Whitney* showed a significant increase in RE- α expression in the 150 mg/200 gr/day dose treatment group compared to the positive control group (K+).*

*Keywords: black soybean extract (*Glycine soja*), estrogen receptor α , aorta, ovariectomized rats*

PENDAHULUAN

Menopause merupakan suatu kondisi pada wanita yang ditandai dengan

penurunan fungsi estrogen akibat menurunnya fungsi ovarium (Lestari *et al*, 2013). Resiko *Cardiovascular Disease* (CVD) secara umum mengalami peningkatan seiring bertambahnya usia, namun resiko lebih rendah pada wanita premenopause dibandingkan pria pada usia yang sama, resiko CVD ini akan meningkat tajam pada wanita *post* menopause (Muka *et al*, 2016). Aterosklerosis koroner merupakan penyebab utama penyakit jantung koroner (PJK), dimana PJK adalah penyebab kematian nomor satu di dunia. Faktor resiko mayor aterosklerosis pada PJK yaitu umur dan jenis kelamin, dimana yang tergolong umur beresiko pada median umur 56 (32-82) tahun dan pada median umur tersebut, rata-rata wanita sudah masuk fase menopause (Rahman *et al*, 2012).

Kondisi menopause yang ditandai menurunnya estrogen akan diikuti oleh menurunnya ekspresi reseptor estrogen pada aorta. Keadaan ini akan menghambat produksi eNOS dan penurunan aktivitas NO yang dapat mengganggu kontrol terhadap terjadinya arterosklerosis (Wang *et al*, 2013). Pada arteri koronaria normal wanita premenopause menunjukkan ekspresi reseptor estrogen normal, sedangkan pembuluh darah aterosklerosis wanita pascamenopause menunjukkan penurunan ekspresi reseptor estrogen (Osako *et al*, 2010).

Penelitian hewan coba telah membuktikan bahwa estrogen memberikan perlindungan terhadap perkembangan aterosklerosis dikarenakan adanya reseptor estrogen, yaitu RE- α dan RE- β (Wang *et al*, 2013). Pengaruh positif dari terapi sulih hormon terhadap penyakit kardiovaskular sampai saat ini masih menjadi perdebatan dikarenakan resiko efek samping pada penggunaannya. Sebuah studi menunjukkan hasil bahwa penggunaan terapi sulih hormon dalam jangka panjang dapat meningkatkan resiko CVD pada wanita *post* menopause (Grady *et al*, 2002).

Fitoestrogen terutama isoflavon dipercaya dapat sebagai alternatif terapi pengganti hormon pada wanita *post* menopause. Isoflavon mampu berikatan dengan reseptor estrogen karena memiliki kemiripan struktur dengan 17 β estradiol. Unsur utama yang terkandung dalam isoflavon ialah genistein dan daidzein (Potocka *et al*, 2013). Kedelai hitam adalah jenis *legume* yang belum dimanfaatkan secara optimal. Kandungan genistein pada kedelai hitam (*Glycine soja*) sebesar 0,1130 gram (Rahma, 2010). Kedelai hitam juga mengandung antosianin tinggi yang memiliki kemiripan struktur seperti molekul estrogen sehingga dapat berikatan dengan reseptor estrogen yang menyebabkan efek estrogenik (Lee *et al*, 2017). Penelitian pada model tikus ovariektomi menunjukkan bahwa pemberian isoflavon kedelai menormalkan hampir semua parameter metabolik dan imunologi melalui perbaikan stres oksidatif dan promosi RE- α tulang (Abdelrazek *et al*, 2019). Penelitian bertujuan membuktikan kedelai hitam (*Glycine soja*) dapat meningkatkan ekspresi RE- α pada aorta tikus ovariektomi.

BAHAN & METODE PENELITIAN

Hewan coba

Sebanyak 25 tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang sehat, usia 8-12 minggu, BB tikus 200-400 g digunakan pada penelitian ini yang bertempat pada Laboratorium dan Analisis Biosains Universitas Brawijaya, Malang. Tikus dibiarkan dalam keadaan biasa tanpa perlakuan (masa adaptasi) selama 7 hari, kemudian dilakukan randomisasi tikus. Tikus dibagi ke dalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (tidak diberi intervensi), kelompok kontrol positif (OVX), 3 kelompok perlakuan (OVX + ekstrak kedelai hitam dengan dosis 50, 100, 150 mg/200 gr/hari). Ekstrak kedelai hitam diberikan setelah 30 puluh hari ovariektomi. Pemberian ekstrak kedelai hitam dilakukan selama 30 hari pada

kelompok perlakuan (OVX + ekstrak kedelai hitam sesuai dosis).

Ekstraksi kedelai hitam (*Glycine soja*)

Kedelai hitam (*Glycine soja*) didapat dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (Balitkabi), Malang, Jawa Timur, Indonesia. Kedelai hitam dikeringkan terlebih dahulu dalam oven pada suhu 50-70°C. Bahan yang sudah kering dihancurkan dengan blender untuk mendapatkan bubuk kedelai hitam. Pada proses awal ekstraksi, bubuk kedelai hitam direndam dengan etanol 96% sebanyak 900 ml dan dikocok hingga benar-benar tercampur. Proses perendaman dilakukan selama 3 hari. Hasil rendaman dimasukkan dalam labu evaporasi 1 L. Larutan etanol dibiarkan menguap pada labu evaporasi dan dibiarkan hingga berhenti menetes pada labu penampung (\pm 3 jam untuk 1 labu). Setelah selesai hasilnya ditempatkan dalam botol kaca tertutup dan disimpan di dalam lemari pendingin (*freezer*).

Ovariectomi

Anestesi tikus sebelum ovariectomi menggunakan Ketamin 120mg/kg, dan Xylazin 20mg/kg. Insisi transabdominal dilakukan kira-kira 1,5-2 cm di atas uterus. Uterus dicari dan setelah ditemukan diikat pada kornu uteri hingga oviduct dan ovarium kiri. Kemudian jika terdapat jaringan ikat dan jaringan lemak disekitar oviduct dan ovarium maka harus dibebaskan terlebih dahulu. Jika telah bersih dilakukan pengangkatan dan ligasi pada oviduct distal dan ovarium. Larutan betadin diberikan pada luka bekas potongan. Prosedur ovariectomi untuk ovarium kanan sama dengan ovarium kiri. Bekas sayatan pada proses ovariectomi di jahit hingga menutup dan diberikan betadine. Waktu pemulihan *post* ovariectomi yaitu selama 30 hari. Ovariectomi berpengaruh signifikan pada penurunan estradiol dalam darah tikus sehingga dapat digunakan sebagai metode artifisial model menopause pada tikus (Yulawati *et al*, 2019)

Analisis ekspresi reseptor estrogen α (RE- α)

Pengambilan bahan baku pemeriksaan yaitu aorta abdominalis pada semua kelompok (kontrol negatif, positif dan perlakuan) dilakukan 30 hari setelah pemberian ekstrak kedelai hitam. Aorta abdominalis disimpan dalam cairan formalin *buffer* 10% untuk persiapan pembuatan preparat histologis guna menilai ekspresi reseptor estrogen α . Pengukuran ekspresi RE- α pada jaringan aorta melalui metode immunohistokimia.

Analisis statistik

Data ditampilkan dalam bentuk rata-rata \pm SD. Uji komparatif menggunakan *Kruskal Walls* dilanjutkan dengan *Post Hoc* dengan *Mann Whitney* dikatakan signifikan (p value $<$ 0,05). Analisis data dibantu oleh program *SPSS 23 for Windows*

Etik

Pernyataan laik Etik diterbitkan oleh Komisi Etik Penelitian (*Animal Care and Use Committee*) Universitas Brawijaya, Malang setelah melalui serangkaian uji kelayakan prosedur penelitian.

HASIL PENELITIAN

Hasil

Gambaran ekspresi reseptor estrogen α (RE- α) pada Aorta Tikus (*Rattus novergicus*) Ovariectomi

Hasil pemeriksaan immunohistokimia, didapatkan gambaran ekspresi RE- α yang ditunjukkan pada tabel 1 berikut :

Tabel 1 Gambaran Ekspresi RE- α pada Aorta

No	Kelompok	Rata-rata	SD	Min	Mak
1	Kontrol negatif (K-)	10,102	2,120	7,667	12,703
2	Kontrol positif (K+)	5,700	2,618	3,500	9,250
3	P1(50mg/200gr/hari)	6,650	1,485	5,500	9,000
4	P2(100mg/200gr/hari)	8,900	4,368	3,250	13,000
5	P3(150mg/200gr/hari)	12,300	2,328	10,000	16,000

Berdasarkan tabel diatas diketahui, rata-rata peningkatan tertinggi ekspresi RE- α pada kelompok perlakuan setelah pemberian ekstrak kedelai hitam yaitu pada kelompok perlakuan 3 (P3) dengan dosis 150 mg/200 gr/hari

Pengaruh kedelai hitam (*Glycine soja*) terhadap ekspresi RE- α Aorta Tikus (*Rattus novergicus*) Ovariektomi

Berdasarkan uji analisis didapatkan *p-value* 0,027 lebih kecil dari $\alpha = 0,05$. Hal ini menunjukkan terdapat pengaruh yang signifikan pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*) terhadap peningkatan ekspresi RE- α . Dapat dikatakan bahwa terdapat perbedaan ekspresi RE- α yang signifikan akibat pemberian ekstrak kedelai hilam (*Glycine soja*) dengan dosis yang berbeda.

Uji lanjutan untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan dilakukan pengujian *Post Hoc* dengan *Mann Whitney* yang menunjukkan hasil terjadi peningkatan signifikan ekspresi RE- α pada kelompok perlakuan P3 jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+) dengan *p-value* 0,008 (lebih kecil dari $\alpha = 0,05$)

PEMBAHASAN

Pengaruh kedelai hitam (*Glycine soja*) terhadap ekspresi RE- α Aorta Tikus (*Rattus novergicus*) Ovariektomi

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kelompok P3 terjadi peningkatan ekspresi RE- α secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol positif (K+). Terdapat peningkatan ekspresi RE- α seiring dengan peningkatan dosis. Hal ini ditunjukkan bahwa pada dosis pemberian yang berbeda akan memberikan respon yang berbeda. Isoflavon dalam kedelai hitam mengandung genestein yang memiliki kemiripan struktur kimia dengan

17 β estradiol, sehingga dapat berikatan dengan reseptor estrogen. Afinitas genistein dari RE- β 87% atau sekitar 20-30 kali lebih tinggi dibanding RE- α yang afinitasnya sebesar 4% dan sebanding dengan afinitas 17 β -estradiol. Interaksi antara genistein dengan reseptor estrogen mengarah pada aktivasi yang disebut *estrogen receptor element* (ERE) yang bertempat di sisi bagian dalam dari membran inti yang merupakan jalur mekanisme *genomic*, khususnya proses transkripsi (Pilsakova, 2010; Kim and Park, 2012). Berkaitan dengan hal tersebut, ikatan antara genistein dan reseptor estrogen akan mengaktifkan jalur genomik, sehingga dapat meningkatkan produksi NO dan selanjutnya dapat menghambat terjadinya disfungsi endotel pembuluh darah sebagai patogenesis dari penyakit aterosklerosis. Genistein memiliki potensi estrogenik 97,21% dari energi afinitas terhadap RE- α dan paling tinggi afinitasnya dibandingkan isoflavon lainnya (Mulyati, 2019). Penelitian pada model tikus ovariektomi menunjukkan bahwa pemberian kedelai yang mengandung genistein menormalkan hampir semua parameter metabolik dan imunologi melalui perbaikan stres oksidatif dan promosi RE- α tulang (Abdelrazek *et al*, 2019). Penelitian lainnya menunjukkan hasil efek fitroestrogenik Blackcurrent yang kaya antosianin secara signifikan meningkatkan kadar mRNA eNOS dan sintesis NO yang dimediasi oleh RE- α (Horie *et al*, 2019). Hal ini menguatkan hasil penelitian yang menunjukkan adanya peningkatan secara signifikan ekspresi RE- α aorta tikus ovariektomi setelah pemberian kedelai hitam.

PENUTUP

Pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*) berbagai dosis meningkatkan secara signifikan ekspresi reseptor estrogen α (RE- α) aorta tikus (*Rattus novergicus*) ovariektomi

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelrazek, H.M.A., Mahmoud, M.M.A., Tag, H.M., Greish, S.M., Eltamany, D.A., Soliman, M.T.A. 2019. Soy Isoflavones Ameliorate Metabolic and Immunological Alterations of Ovariectomy in Female Wistar Rats: Antioxidant and Estrogen Sparing Potential. *Hindawi Oxidative Medicine & Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2019/571360>
- Grady, D., Herrington, D., Bittner, V., Blumenthal, R., Davidson, M., Hlatky, M., Hsia, J., Hulley, S., Herd, A., Khan, S., et al. 2002. HERS Research Group. Cardiovascular Disease Outcomes during 6.8 Years of Hormone Therapy: Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study Follow-Up (HERS II). *J. Am. Med. Assoc.* 288: 49-57
- Horie, K., Naoki, N., Hayato, M. 2019. Phytoestrogenic effects of blackcurrant anthocyanins increased endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in human endothelial cells and ovariectomized rats. *Molecules*. 24(7): 125989.
- Kim S.H and Park M.J. 2012. Effects of Phytoestrogen on Sexual Development. *The Korean Pediatrics Society*. 55 (8): 265-271.
- Lee, Y.M., Yoon, Y., Yoon, H., Park, H.M., Song, S., Yeum, K.J. 2017. Dietary anthocyanins against obesity and inflammation. *Nutrients*. 9 (10):1089115.
- Lestari, TW., Elisa U, Suparmi. 2013. Buku Ajar Kesehatan Reproduksi Berbasis Kompetensi. Jakarta: EGC
- Muka, T., Oliver-Williams, C., Kunutsor, S., Laven, J.S., Fauser, BC., Chowdhury, R., Kavousi, M., Franco, OH. 2016. Association of Age at Onset of Menopause and Time Since Onset of Menopause with Cardiovascular Outcomes, Intermediate Vascular Traits, and All-cause Mortality: a Systematic Review and Meta-analysis. *Jama Cardiol.* 1: 767-776
- Mulyati, B. Peran Genistein pada Pengikatan Reseptor Estrogen α . *INDEPT*. 8 (2): 1-9
- Osako MK, Nakagami H, Koibuchi N, Shimizu H, Nakagami F, Koriyama H et al. 2010. Estrogen Inhibits Vascular Calcification Via Vascular RANKL System: Common Mechanism of Osteoporosis and Vascular Calcification. *Circ Res*. 107: 466-475
- Pilsakova, L., Rieckansky, I., and Jagla F., 2010. The Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens. *Physiological Research*. University of Vienna, Austria. 59 : 651-664.
- Potocka, I., Manneli, C., Boruszewska, D et al. 2013. Diverse Effects of Phytoestrogens on the Reproductive Performance: Cow as Model. *International Journal of Endocrinology*
- Rahma, Heny. 2010. *Karakterisasi Senyawa Bioaktif Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Tempe Berbahan Baku Kedelai Hitam (Glycine soja), Koro Hitam (Lablab purpureus. L.), dan Koro Kratok (Phaseolus lunatus.L.)*. Program Pascasarjana Universitas Sebelas Maret Surakarta : Tesis diterbitkan
- Rahman, A., Charles L, Yosef P. 2012. *Faktor-faktor Resiko Mayor Aterosklerosis pada Berbagai Penyakit Aterosklerosis di RSUP dr. Kariadi Semarang (Skripsi)*. Semarang: Universitas Diponegoro Semarang
- Yuliawati, D., Astuti, W.W, Yuniarti, F. 2019. Pengaruh Ovariectomi terhadap Kadar Estradiol dalam Darah Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Menopause. *Jurnal Ilmu Kesehatan*. 10(2): 95-102.

