

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Genistein merupakan salah satu phytoestrogen yang termasuk di dalam kelompok isoflavin (Polkowski *et al.*, 2000). Seperti phytoestrogen yang lain, genistein dapat berikatan dengan reseptor estrogen dan menghasilkan efek estrogenik maupun antiestrogenik. Genistein terbukti memiliki aktivitas antiangiogenik yang paling poten dibandingkan dengan bahan-bahan lain yang berasal dari tumbuhan melalui mekanisme apoptosis yang dimilikinya. Secara *in vitro*, genistein dapat menghambat proliferasi dari sel endotel vaskular pada konsentrasi 5 dan 150  $\mu\text{M/L}$ . Secara *in vivo*, aktivitas antiangiogenesis ini juga telah dibuktikan pada tikus yang diinduksi karsinoma kandung kemih. Pada pemberian genistein dengan dosis 50 mg/kgBB/hari terjadi penurunan ukuran tumor dan jumlah pembuluh darah kapiler. Proses angiogenesis sendiri sebenarnya bisa menjadi sebuah proses fisiologis yang penting, misalnya pada kasus atherosklerosis yang berlanjut dengan henti jantung (*cardiac arrest*). Namun, proses ini bisa juga menjadi patologis pada keadaan kanker. *Division of Cancer Prevention and Control*, NCI (*National Cancer Institute*) telah merekomendasikan genistein sebagai agen pencegahan secara kimia untuk kanker (Polkowski *et al.*, 2000).

Ketika terjadi paparan, genistein dapat berinteraksi dengan berbagai reseptor yang ada di dalam tubuh dan mempengaruhi proses biologis yang terjadi. Genistein dapat menghambat kerja protein tyrosin kinase melalui ikatannya dengan reseptor EGF. Selain itu, genistein juga dapat menghambat kerja dari enzim topoisomerase II. Kedua mekanisme ini dapat menginduksi

apoptosis pada sel (Polkowski *et al.*, 2000). Namun, dari penelitian yang ada disebutkan bahwa mekanisme apoptosis ini terjadi pada semua sel, tidak secara spesifik terjadi pada sel endotel. Sementara itu, hingga saat ini belum ada penelitian yang menjelaskan apakah interaksi antara genistein dengan reseptor estrogen berperan dalam mekanisme antiangiogenesisnya dan dapat menyebabkan efek teratogenisitas apabila paparannya terjadi saat proses organogenesis.

Zebrafish memiliki tahapan proses organogenesis yang sama dengan manusia. Namun, proses ini terjadi di luar tubuh atau di dalam telur dan periode waktu yang dibutuhkan lebih singkat. Setelah fertilisasi, terjadi periode zigot yang kemudian dilanjutkan periode pembelahan (*cleavage*). Embrio kemudian mengalami periode blastula kemudian gastrula. Pada 10 hingga 24 hpf, embrio mulai masuk pada periode segmentasi dimana pada periode ini embrio mulai mengalami organogenesis. Disini mulai terjadi pematangan sistem skeletal yang ditandai dengan terjadinya pelurusan pada trunkus posterior. Periode pharyngula terjadi pada 24-48 hpf dimana pada periode ini sistem sirkulasi mulai terbentuk, jantung mulai berdenyut, dan kepala mulai memendek serta lurus. Antara 48 sampai 72 hpf, perkembangan embrio mulai melambat, morfogenesis hampir sempurna, dan mulai didapatkan penetasan secara spontan (Kimmel *et al.*, 1995).

Laju mortalitas hanya berbeda secara signifikan pada 24 hpf. Pada kelompok kontrol, genistein 10  $\mu\text{M}$ , ICI, dan genistein 10  $\mu\text{M}$ +ICI didapatkan kematian embrio hanya terjadi pada 24 hpf. Menurut penelitian dari Sassi Messai *et al* pada 2009 dikatakan bahwa genistein mulai menginduksi apoptosis selama

akhir periode gastrulasi atau pada awal periode segmentasi yaitu pada 10 jam setelah fertilisasi.

Kelompok genistein 5  $\mu\text{M}$ +ICI dan 10  $\mu\text{M}$ +ICI mengalami peningkatan laju mortalitas di 24, 48, dan 72 hpf apabila dibandingkan dengan kelompok genistein 5  $\mu\text{M}$  dan 10  $\mu\text{M}$ . Laju mortalitas sangat dipengaruhi oleh suhu lingkungan saat inkubasi. Embrio dapat berkembang secara normal jika suhu inkubasi berada antara 25 °C sampai 33 °C dengan suhu optimumnya sebesar 28,5°C. Inkubasi dengan suhu kurang atau di atas kisaran suhu tersebut dalam waktu yang lama dapat menimbulkan abnormalitas (Kimmel *et al.*, 1995). Pada penelitian sebelumnya, embrio zebrafish yang dipapar dengan genistein 5  $\mu\text{M}$  dan 10  $\mu\text{M}$  baru mengalami peningkatan laju mortalitas yang signifikan pada hari keenam (Aurora, 2012).

Laju penetasan berbeda secara signifikan pada 72 hpf. Pada kelompok 10  $\mu\text{M}$  tidak didapatkan embrio yang menetas. Embrio di dalam telur terlihat mengalami perkembangan yang lambat pada pembentukan sistem skeletalnya. Pada 24 dan 48 hpf belum ditemukan adanya embrio yang menetas di semua kelompok. Sementara itu, laju penetasan sebelum dan sesudah ditambahkan paparan ICI hanya mengalami perbedaan yang signifikan pada kelompok genistein 10  $\mu\text{M}$ . Setelah pemberian ICI, didapatkan peningkatan sebesar 66,68%. Pada dosis 5  $\mu\text{M}$  didapatkan penurunan laju penetasan antara sebelum dengan sesudah ditambahkan ICI. Menurut penelitian Kimmel *et al.*, 1995 disebutkan bahwa periode penetasan terjadi antara 48 sampai hpf. Namun waktu penetasan untuk setiap embrio dapat berbeda-beda selama tiga hari pertama perkembangannya meskipun diinkubasikan di dalam temperatur standar dan di dalam satu sumur yang sama. Embrio yang belum menetas tetap mengalami

perkembangan di dalam telur. Waktu penetasan tidak dapat digunakan sebagai indeks tunggal untuk menilai tahapan pertumbuhan dari zebrafish.

Perbedaan defek morfologis yang signifikan setelah penambahan ICI didapatkan pada kelompok genistein 5  $\mu\text{M}$ . Pada paparan genistein 10  $\mu\text{M}$ +ICI seolah-olah tampak adanya peningkatan defek morfologis jika dibandingkan dengan sebelum penambahan ICI. Namun hal ini sebenarnya terjadi karena pada paparan genistein 10  $\mu\text{M}$ +ICI telah didapatkan adanya embrio yang menetas sehingga dapat dievaluasi semua defek morfologisnya. Apabila dibandingkan dengan paparan genistein 5  $\mu\text{M}$  maupun 10  $\mu\text{M}$ , terjadi penurunan defek edema perikardial pada genistein 10  $\mu\text{M}$ +ICI.

Pada penelitian ini, masih ditemukan berbagai kekurangan. Adanya keterbatasan pada waktu dan bahan menyebabkan jumlah pengulangan yang dilakukan masih kurang. Pengulangan memang sudah dilakukan lebih dari tiga kali namun pada pengulangan dengan paparan genistein+ICI masih belum didapatkan pola hasil yang sama dalam tiga kali pengulangan. Oleh karena itu, simpangan dari hasil yang didapat masih cukup besar. Selain itu, masih sulit untuk mengontrol pengaruh-pengaruh yang dapat mempengaruhi variabel terikat, seperti suhu inkubasi dan juga waktu pemberian pakan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan ICI menimbulkan peningkatan pada laju penetasan pada dosis 10  $\mu\text{M}$  dan penurunan defek morfologis pada dosis 5  $\mu\text{M}$ . Pemberian antiestrogen dapat mengurangi efek teratogenisitas yang ditimbulkan oleh paparan genistein dosis tinggi.