

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Estrogen

Estrogen merupakan hormon steroid yang berada dalam tubuh dan bekerja secara sistemik. Hormon ini mempunyai peran penting dalam sistem reproduksi, selain juga memelihara organ tubuh yang lain seperti otak, jantung, dan tulang (Notelovitz, 2006). Pada sistem saraf pusat estrogen berperan dalam regulasi umpan balik, yaitu sekresi hormon hipotalamus dan hipofisis, memodulasi perilaku motorik dan kognitif yang terkait aktifitas neuron, mengontrol mood, dan keadaan mental melalui pusat neurotransmisi aminergik dan peptidergik, serta berperan sebagai neuroprotektif pada proses neurodegeneratif (Beyer, 1999). Fungsi-fungsi tersebut menunjukkan bahwa estrogen bekerja pada neuron di otak tengah dan batang otak dalam memproduksi serotonin dan katekolamin, batang otak, korteks serebral, dan hipokampus (McEwen, 2002).

Terdapat tiga macam estrogen dalam tubuh yang memiliki perbedaan struktur kimia dan potensi terhadap reseptor estrogen. $17\text{-}\beta$ estradiol (E_2) merupakan estrogen yang paling poten, estrone (E_1), dan estriol (E_3) yang berasal dari E_1 dan memiliki potensi paling lemah. Estrogen merupakan steroid dengan 18 karbon yang berasal dari kolesterol, mempunyai berat molekul rendah dan bersifat lipofilik sehingga mudah melalui membran dari sel target dan sawar otak (Bartholomeuz, 2008; Gruber *et al.*, 2002).

2.1.1 Reseptor Estrogen

Estrogen yang berada dalam tubuh, baik di dalam maupun di luar sel mempunyai afinitas yang tinggi dan spesifik pada sel target tertentu melalui *intranuclear binding protein*, yang dikenal sebagai ER (Kuiper *et al.*, 1998). Pada penelitian menggunakan zebrafish, reseptor estrogen mulai terdeteksi antara 24 sampai 48 jam, yang merupakan onset transkripsi ER pada embrio (Kishida, 2001). Ikatan reseptor ini dengan estrogen akan mengakibatkan dimerisasi reseptor dan berikatan dengan sisi spesifik dari DNA pada *gene promotor region* yang dikenal sebagai ERE yang kemudian memodulasi transkripsi gen (Weiser *et al.*, 2007). Sejumlah kecil (2-3%) reseptor estrogen terletak pada membran sel dan berperan terhadap efek non-genomik dari estrogen (Cornwell *et al.*, 2004).

Estrogen bekerja melalui dua reseptor intraseluler, yaitu ER- α dan ER- β . Kedua reseptor ini terdistribusi ke berbagai jaringan dalam jumlah yang berbeda dan akan mempunyai efek yang berbeda apabila berikatan dengan agonis maupun antagonis estrogen. ER- α berperan dalam maturasi tulang pada wanita maupun laki-laki serta mengatur konsentrasi FSH dan LH di darah. ER- β berperan dalam pengaturan tulang pada wanita serta pengaturan memori dan proses belajar dari lobus frontal otak. Sementara itu, keduanya berfungsi juga pada perkembangan normal folikel ovarium, sel endotel vaskular, sel miokard jantung, otot polos, dan jaringan payudara (Cornwell *et al.*, 2004). Struktur kristal dari ER- β manusia dapat berikatan dengan genistein dan estradiol (Kumar *et al.*, 2011).

Reseptor estrogen merupakan reseptor steroid yang unik karena kemampuannya berinteraksi dengan berbagai macam komponen non steroid. Ikatan ER dengan berbagai komponen akan membentuk struktur yang berbeda-

beda. Ikatan tersebut dapat menyebabkan blok bagi estrogen binding site atau berikatan pada sisi yang berafinitas lemah dan menyebabkan perubahan pada daerah berafinitas tinggi bagi estrogen (Kuiper *et al.*, 1998).

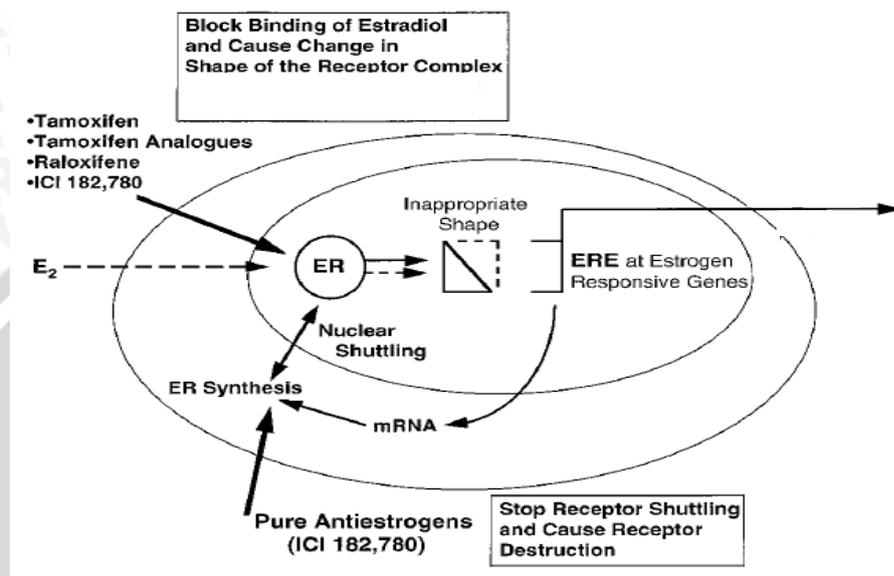
2.1.2 Antiestrogen

Antiestrogen merupakan suatu bahan yang apabila berikatan dengan reseptor estrogen akan menghambat aktivitas estrogenik. Antiestrogen dapat diklasifikasikan menjadi dua kelompok berdasarkan mekanisme kerjanya dan efek yang ditimbulkan, yaitu tipe I yang merupakan analog dari tamoxifen atau metabolitnya yang mempunyai aktivitas estrogenik dan antiestrogenik dan tipe II yang hanya mempunyai efek antiestrogenik sehingga disebut *pure antiestrogen*. Baik tipe I maupun tipe II, keduanya bersifat menghambat secara kompetitif (*competitive inhibitor*) (Macgregor dan Jordan, 1998).

Triphenylethylene atau yang lebih dikenal sebagai tamoxifen merupakan dasar dalam pengembangan antiestrogen tipe I. Beberapa derivat yang termasuk dalam tipe I antara lain toremifene, idoxifene, droloxifine, dan TAT-59. Apabila bahan-bahan ini berikatan dengan ER di nukleus, maka akan menghambat estradiol untuk berikatan sehingga kemudian menghambat dimerisasi dari ER sehingga menimbulkan efek antiestrogenik (Macgregor dan Jordan, 1998).

Antiestrogen tipe II pertama yang ditemukan adalah ICI 164,384 yang merupakan derivat dari estradiol. Dari penelitian selanjutnya yang dilakukan oleh Wakeling *et al.* pada 1991 ditemukan ICI 182,780 yang memiliki kemampuan lebih poten. Oleh karena itu, hanya ICI 182,780 yang kemudian diteliti lebih lanjut. Ketika bahan ini berikatan dengan ER, bahan ini tidak mencegah dimerisasi dari reseptor sehingga reseptor tetap dapat berikatan dengan DNA di bagian ERE, namun bahan ini membuat unit transkripsi menjadi tidak aktif. Selain

itu, bahan ini juga berikatan dengan ER yang baru disintesis di sitoplasma dan mencegah reseptor tersebut dibawa ke nukleus (Macgregor dan Jordan, 1998).



Gambar 2.1.1 Mekanisme Kerja Antiestrogen

2.2 Genistein

Genistein termasuk dalam phytoestrogen, yaitu bahan kimia yang berasal dari tanaman dan memiliki aktivitas seperti estrogen. Phytoestrogen terdiri dari tiga kelompok besar, yaitu isoflavon, coumestren, dan lignan. Genistein termasuk dalam kelompok isoflavon (Polkowski *et al.*, 2000). Kandungan genistein banyak terdapat di kelompok kacang-kacangan (leguminosa), khususnya pada kedelai. Konsentrasi bahan ini pada kedelai sekitar 0,2-1 mg/g, kebanyakan dalam bentuk konjugat glikosida. Seperti isoflavon lain, genistein dapat berikatan dengan reseptor estrogen dan menghasilkan efek estrogenik maupun antiestrogenik. Genistein dapat berikatan dengan ER- α maupun ER- β namun afinitas ikatannya dengan ER- β lebih tinggi. Genistein termasuk dalam SERMs. Pada penelitian Waltz tahun 1931, ditemukan bahwa isoflavon termasuk

genistein menimbulkan *Clover disease* pada domba di Australia Barat, dimana domba tersebut mengalami infertilitas permanen setelah merumput di padang yang banyak mengandung semanggi. Didapatkan bahwa pada semanggi tersebut didapatkan sejumlah besar isoflavon, formonentin, dan biochanin A (Polkowski *et al.*, 2000; Cornwell *et al.*, 2004).

Paparan utama dari genistein adalah melalui makanan, susu formula bayi, dan/ atau suplemen yang mengandung kedelai maupun protein kedelai, bukan minyak kedelai. Semua makanan yang terbuat dari kedelai yang dikonsumsi mengandung sejumlah genistein dan daidzein (isoflavon), baik dalam bentuk tidak terkonjugasi (*aglycone*) maupun konjugasi glikosida. Namun, kebanyakan genistein yang berada di makanan dalam bentuk *active glucoside genistin*. Meskipun dalam satu kelompok isoflavon, namun kandungan genistein lebih banyak dibandingkan daidzein (Barlow *et al.*, 2007).

Dari makanan yang masuk, genistein masih berada dalam bentuk genistin. Kemudian terjadi fermentasi atau proses pencernaan yang menyebabkan lepasnya molekul glukosa dari glikosida yang menghasilkan *aglycone* genistein. Dalam bentuk inilah genistein baru bisa berinteraksi di dalam tubuh. Proses ini terjadi di lambung karena proses hidrolisis asam maupun di usus halus karena adanya enzim bakteri. Proses absorpsi dan metabolisme dari genistein dan genistin bervariasi antar individu. Beberapa data menyebutkan bahwa genistein memiliki bioavailabilitas lebih tinggi dibandingkan dengan genistin dan hanya ada sedikit data mengenai bagaimana distribusi genistein di dalam tubuh. Proses farmakokinetik genistein pada manusia cukup kompleks dan masih belum dimengerti secara jelas (Barlow *et al.*, 2007).

Jumlah penelitian mengenai genistein semakin meningkat sejak tahun 1987 hingga tahun 2000 karena melalui penelitian secara epidemiologi diketahui bahwa diet tinggi kedelai yang kaya akan genistein mempunyai efek pencegahan kanker. Penemuan ini kemudian membuat penelitian mengenai mekanisme genistein pada tingkat seluler dan molekuler semakin meningkat. Pada tahun 1989, Markovits *et al.* melaporkan efek penghambatan topoisomerase II, enzim di nukleus yang terlibat dalam replikasi seluler. Kemudian pada tahun 1995, *Division of Cancer Prevention and Control*, NCI merekomendasikan genistein sebagai agen pencegahan secara kimia untuk kanker (*cancer chemopreventive agent*) (Polkowski *et al.*, 2000).

Sebagai agen anti kanker, genistein memiliki efek untuk menginduksi apoptosis. Proses ini terjadi melalui beberapa jalur, antara lain:

- Penghambatan topoisomerase II yang menyebabkan rusaknya rantai DNA
- Hambatan pada protein tirosin kinase yang diketahui berfungsi sebagai enzim yang mencegah apoptosis sel
- Gangguan pada sinyal transduksi cascade fosfatidylinositol (Polkowski *et al.*, 2000).

2.3 Zebrafish

Zebrafish, *Danio rario*, termasuk famili Cyprinidae. Zebrafish merupakan ikan golongan tropical freshwater. Ikan ini mudah beradaptasi dengan lingkungan yang berbeda (Ganiyat, 2008). Meskipun terlihat seperti organisme yang sederhana, namun zebrafish memiliki genom yang lebih kompleks dibandingkan manusia. Hal ini dikarenakan zebrafish memiliki lebih dari dua pasang kromosom (Hill *et al.*, 2005).

Zebrafish sebelumnya sudah banyak digunakan dalam penelitian mengenai perkembangan biologi dan genetik, namun saat ini zebrafish mulai banyak digunakan dalam penelitian mengenai toksikologi. Untuk menilai toksisitas dari suatu bahan kimia, penting untuk mengidentifikasi endpoint dari toksisitasnya, hubungan antara dosis dengan respon yang dihasilkan, mekanisme toksisitas, dan menentukan toksikodinamik dari bahan tersebut. Beberapa karakteristik zebrafish yang menjadikannya sebagai model yang tepat dalam mempelajari perkembangan dengan pendekatan seluler, molekular, dan genetik adalah:

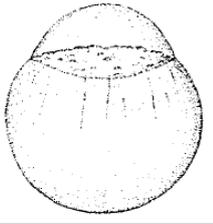
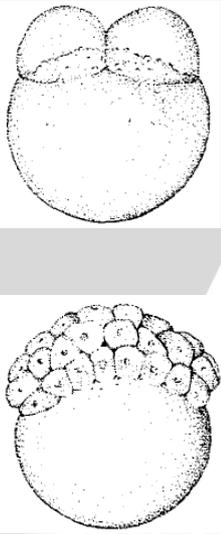
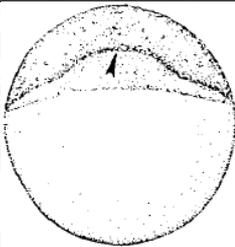
- Zebrafish memiliki ukuran tubuh yang kecil sehingga memudahkan dalam perawatan dalam jumlah banyak. Panjang zebrafish dewasa sekitar 1-1,5 inci. Selain itu, karena ukurannya yang kecil, zebrafish hanya membutuhkan dosis yang kecil untuk perlakuan baik untuk bahan kimia yang diberikan maupun dalam perawatannya.
- Zebrafish memiliki produktifitas yang tinggi sehingga dapat menghasilkan embrio dalam jumlah besar. Satu betina dewasa dapat memproduksi 200-300 telur setiap kali peneluran di pagi hari dan dengan perawatan yang baik, zebrafish betina dapat bertelur setiap 5-7 hari sekali. Produktifitas ini dapat ditingkatkan jika yang digunakan adalah zebrafish yang berumur antara 3-6 bulan.
- Embriogenesis yang cepat. Keseluruhan rangka sudah tersusun pada 24 jam setelah fertilisasi, sedangkan organ internal seperti jantung, ginjal, hepar, dan usus berkembang sempurna pada 96 jam setelah fertilisasi.
- Larva zebrafish transparan sehingga organ, sel, dan jaringan dapat terlihat secara *in vitro* dan diikuti secara *real time* pada hewan yang masih hidup.

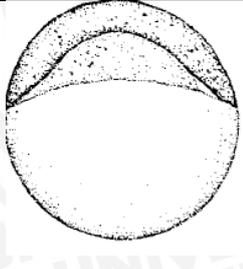
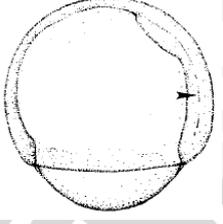
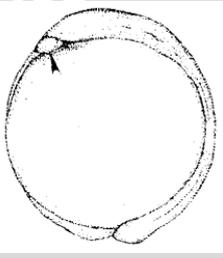
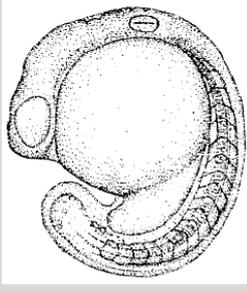
Hal ini memudahkan dalam identifikasi fenotip terkait mutagenesis dan pengukuran *endpoint of toxicity*.

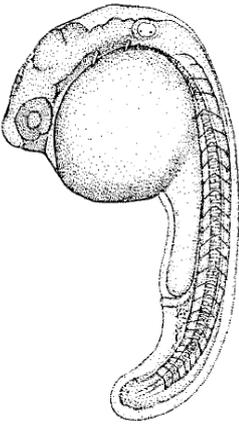
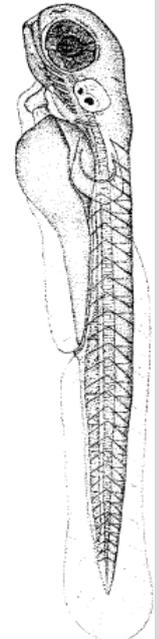
- Sistem kardiovaskular, saraf, dan pencernaan zebrafish menyerupai pada mamalia (Ton *et al.*, 2006; Hill *et al.*, 2005).

Dalam mempelajari perkembangan dengan menggunakan zebrafish sebagai model perlu mengetahui tahapan-tahapan pertumbuhan dari zebrafish sendiri.

Tabel 2.3 Tahapan Perkembangan Awal Zebrafish (Kimmel *et al.*, 1995)

Stadium	Waktu (jam)	Perkembangan	Gambar
Periode zigot	0 – ¾	Telur yang baru difertilisasi	
Periode cleavage	¾ - 2¼	Sel membelah menjadi 2, 4, 8, 16, 32, sampai 64 sel	
Periode blastula	2¼ - 5¼	Pembentukan epiboly, yaitu penipisan dan penyebaran dari kedua yolk syncytial layer dan blastoderm melewati yolk cell, yang pada akhirnya seluruh yolk cell	

		<p>akan terliputi, tahap ini diawali dengan:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Terbentuknya kubah • Perubahan blastodisc menjadi blastoderm 	
Periode gastrula	5¼ - 10	<ul style="list-style-type: none"> • Epiboly terbentuk sempurna • Terbentuk tail bud • Terbentuk primary germ layer dan embryonic axis 	 
Periode segmentasi	10 - 24	<ul style="list-style-type: none"> • Awal pembentukan neuron • Optic primordium dapat diidentifikasi • Awal pembentukan ginjal • Otic placode yang merupakan awal pembentukan telinga mulai tampak • Olfactory primordium dapat diidentifikasi • Awal terjadinya pembagian dan diferensiasi sel darah • Pelurusan pada trunkus posterior hampir sempurna, pemanjangan ekor di anterior masih membentuk kurva di bagian ventral • Kontraksi myotom secara 	

		spontan	
Periode pharyngula	24 - 48	<ul style="list-style-type: none"> • Pembentukan sistem sirkulasi, jantung mulai berdenyut, mulai ada aliran darah • Terjadi pigmentasi • Sirip mulai terbentuk • Kepala memendek dan mulai lurus • Muncul sensitifitas terhadap rangsang taktil 	
Periode penetasan	48-72	<ul style="list-style-type: none"> • Perkembangan mulai melambat • Morphogenesis hampir sempurna • Penetasan secara spontan 	
Periode larva awal	> 72	<ul style="list-style-type: none"> • Disebut sebagai larva • Mulai berenang secara aktif • Mulai ada respon untuk melarikan diri dan mencari makan 	

Pada karyotyping dari zebrafish, perbedaan kromosom dari jenis kelamin yang berbeda tidak dapat diidentifikasi. Pada ikan, faktor lingkungan seperti temperatur, pH, dan polutan lingkungan juga berperan dalam determinasi seksual. Pada awal perkembangan dari semua embrio zebrafish terdapat struktur

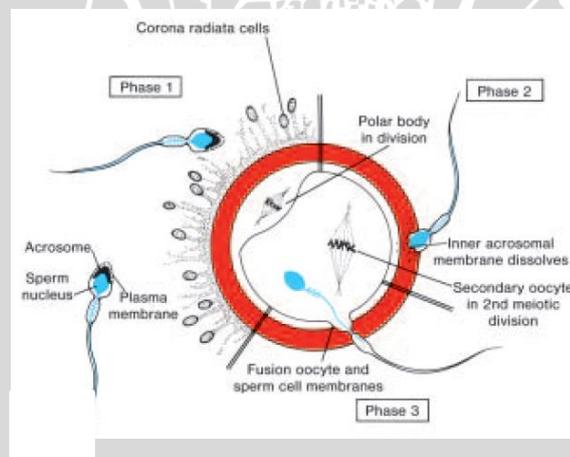
yang menyerupai ovarium. Struktur ini akan berkembang menjadi ovarium pada betina atau setelah mengalami kematian dari oosit akan menjadi testis pada ikan jantan (Slanchev *et al.*, 2005). Zebrafish dikatakan matang secara seksual setelah berumur tiga bulan tetapi perbedaan jenis kelamin dapat diketahui pada 21-23 hari setelah fertilisasi. Pembentukan ovarium diawali pada hari ke-10 setelah fertilisasi dan berkembang sampai hari ke-20 sedangkan testis mulai terbentuk pada hari ke-21 sampai ke-30 bersamaan dengan apoptosis dari ovarium (Hofsten *et al.*, 2005)

Ikan termasuk zebrafish sensitif terhadap paparan bahan-bahan kimia tertentu selama perkembangan awal kehidupan. Pada penelitian Adrian J Hill pada 2005, paparan TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) pada telur yang baru difertilisasi menyebabkan terjadinya edema perikardial dan *yolk sac*, penurunan denyut jantung, gangguan pada fungsi kardiovaskuler yang menyebabkan penurunan curah jantung dan iskemia pada jaringan perifer, gangguan pada perkembangan rahang, dan perdarahan. Namun dibandingkan dengan spesies ikan yang lain, embrio zebrafish kurang sensitif terhadap paparan TCDD. Manifestasi dari paparan TCDD tergantung paparan tersebut diberikan saat tahap perkembangan apa. Zebrafish yang terpapar TCDD segera setelah fertilisasi akan mengalami edema saat 72 jam setelah fertilisasi. Namun, jika paparan baru diberikan setelah 96 jam setelah fertilisasi, edema tidak akan terjadi (Hill *et al.*, 2005).

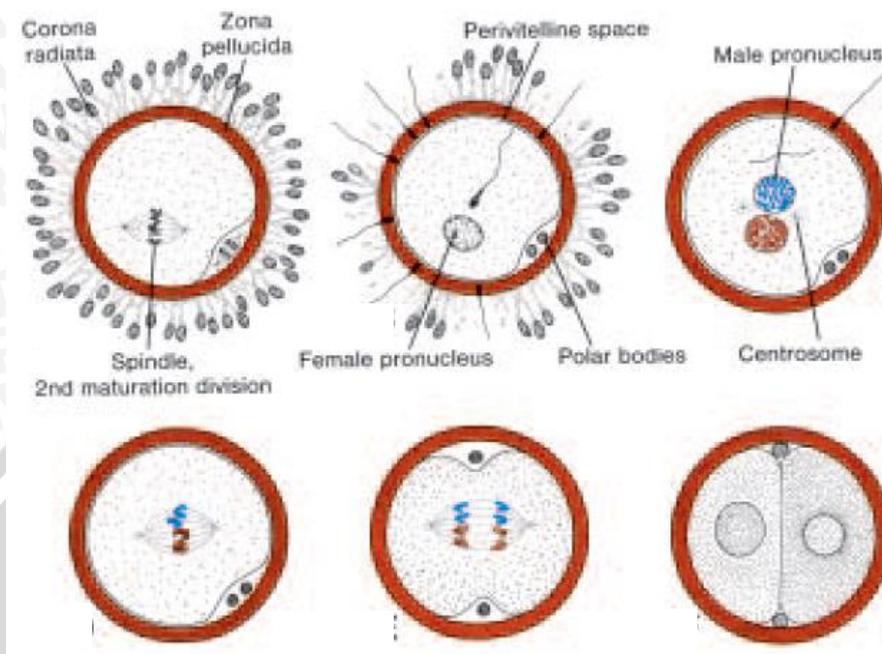
2.4 Organogenesis

Proses perkembangan dari satu sel melalui periode pembentukan primordia organ (8 minggu pertama pada perkembangan manusia) disebut masa embriogenesis atau kadang-kadang disebut juga sebagai masa organogenesis.

Proses ini dimulai setelah terjadinya fertilisasi (pembuahan), yaitu proses penyatuan gamet pria dan wanita yang terjadi di daerah ampulla tuba uterina. Saat fertilisasi, spermatozoa harus menembus korona radiata, zona pelusida, dan membran sel oosit. Segera setelah spermatozoa masuk oosit, akan terjadi reaksi zona yang mencegah penetrasi sperma dan menginaktifkan tempat-tempat reseptor spesifik-spesies untuk spermatozoa di permukaan zona. Selain itu, oosit akan menyelesaikan pembelahan meiotik keduanya dan membentuk pronukleus wanita sedangkan kepala sperma akan terpisah dari ekornya lalu bergerak maju hingga mendekati pronukleus wanita, kemudian nukleusnya membengkak dan membentuk pronukleus pria. Setelah itu masing-masing pronukleus akan mereplikasi DNA-nya kemudian keduanya akan bercampur dan mengalami pembelahan mitotik, menghasilkan stadium dua-sel (Sadler, 2009).

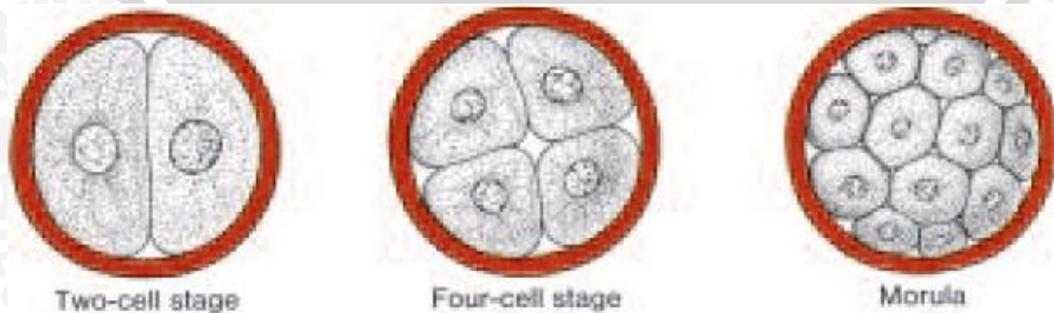


Gambar 2.4.1 Fase Penetrasi Oosit

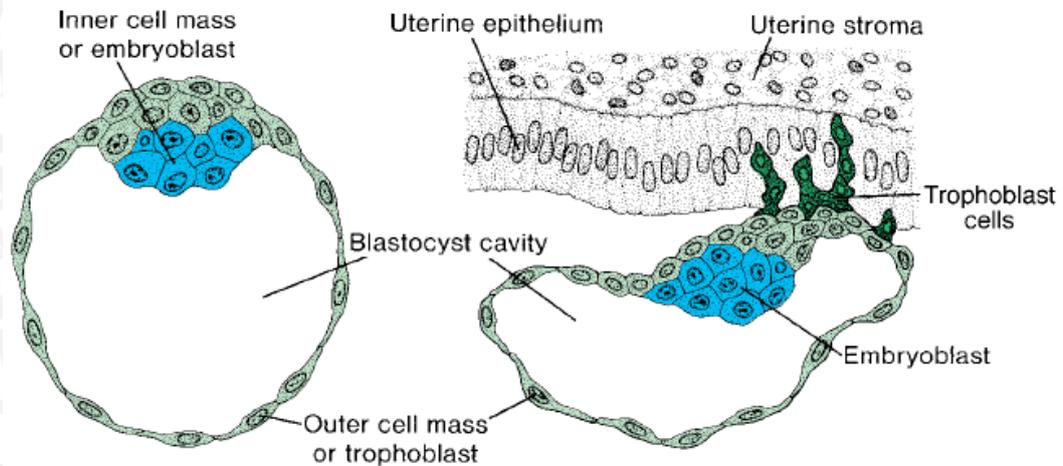


Gambar 2.4.2 Fase Fertilisasi

Setelah mengalami fertilisasi, zigot akan mengalami fase pembelahan (*cleavage*) yaitu serangkaian pembelahan mitotik yang menghasilkan blastomer. Setelah tiga kali pembelahan, blastomer mengalami pepadatan (*compaction*) dan membelah kembali untuk menghasilkan morula 16-sel. Sel di bagian dalam morula membentuk massa sel dalam (*inner cell mass*) yang disebut embrioblas dan massa sel luar yang disebut trofoblas. Sewaktu morula masuk ke uterus pada hari ketiga atau keempat fertilisasi, mulai terbentuk suatu rongga karena masuknya cairan ke zona pelusida, dan terbentuklah blastokista (Sadler, 2009).



Gambar 2.4.3 Fase Cleavage



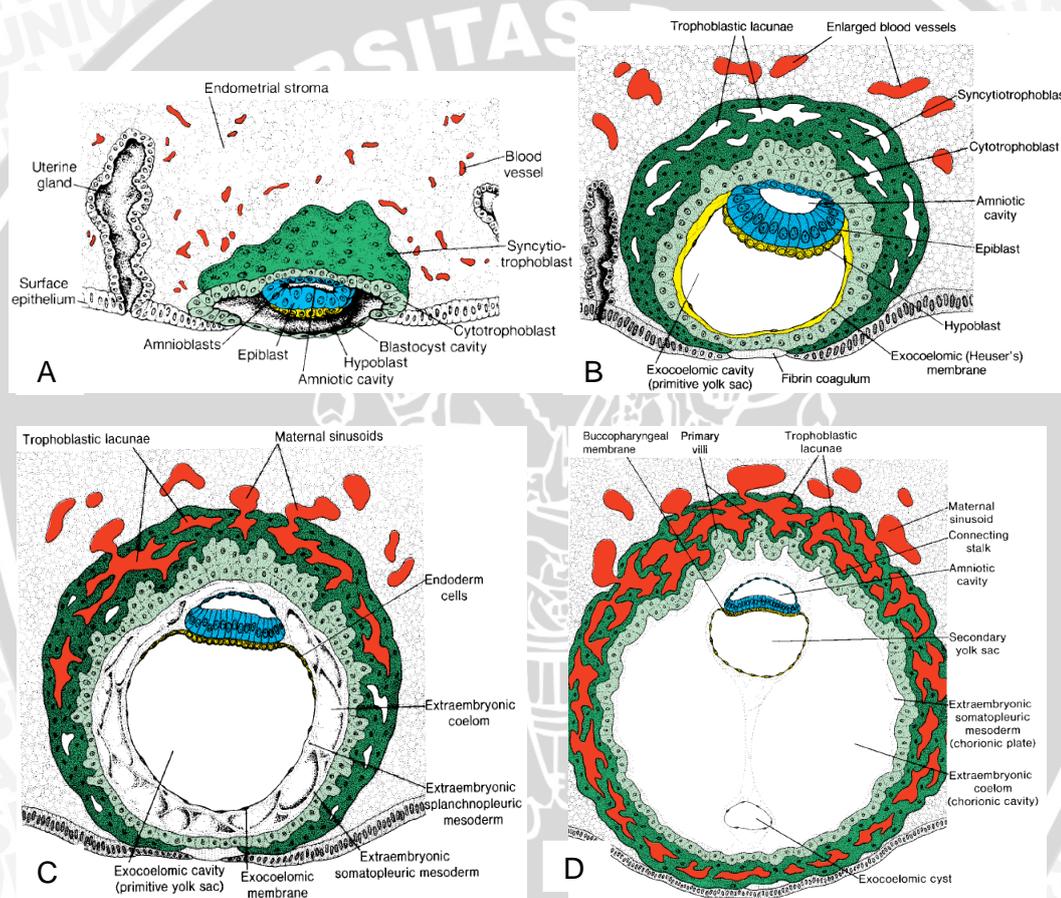
Gambar 2.4.4 Fase Blastokista

Pada awal minggu kedua, blastokista sudah tertanam sebagian di dalam stroma endometrium. Trofoblas berdiferensiasi menjadi lapisan dalam, sitotrofoblas dan lapisan luar, sinsitiotrofoblas yang pada akhir minggu kedua akan membentuk sirkulasi uteroplasenta primitif. Pada akhir minggu kedua, blastokista sudah tertanam seluruhnya dan defek di mukosa permukaan telah sembuh (Sadler, 2009).

Selain trofoblas, embrioblas juga mengalami diferensiasi menjadi epiblas dan hipoblas yang bersama-sama membentuk diskus bilaminar. Hipoblas menghasilkan sel-sel lain yang bermigrasi di sepanjang bagian dalam membran eksoselom membentuk rongga baru di dalam rongga eksoselom yang dikenal sebagai yolk sac sekunder atau yolk sac definitif (Sadler, 2009).

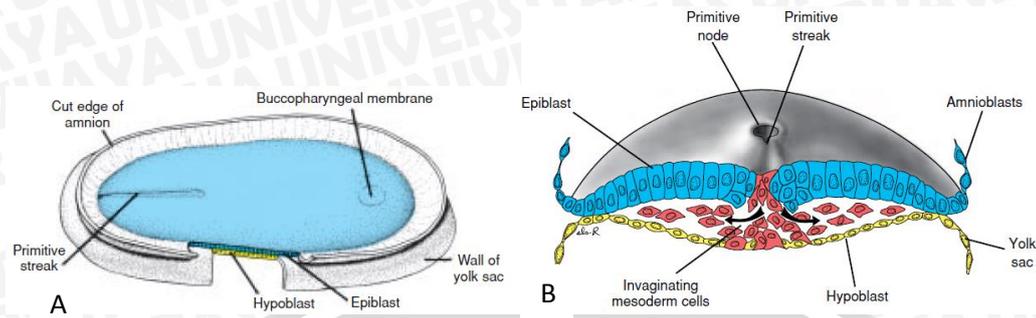
Pada minggu ketiga proses paling khas yang terjadi adalah gastrulasi, yaitu proses yang membentuk ketiga lapisan germinativum ektoderm, mesoderm, dan endoderm pada mudigah. Proses ini diawali oleh munculnya *primitive streak*, dengan ujung sefaliknya, nodus primitif. Di daerah nodus dan garis ini, sel-sel epiblas bergerak ke arah dalam (invaginasi) untuk membentuk lapisan sel baru, endoderm dan mesoderm. Sel-sel yang tidak bermigrasi melalui garis tetap di

epiblas membentuk ektoderm. Sel-sel prenotokord yang mengalami invaginasi di lubang primitif bergerak maju sampai mencapai lempeng prekordal. Sel-sel ini terselip di antara endoderm sebagai lempeng notokord. Dengan perkembangan lebih lanjut, lempeng terlepas dari endoderm dan terbentuk notokord yang akan membentuk suatu sumbu garis tengah yang akan berfungsi sebagai dasar bagi kerangka aksial (Sadler, 2009).



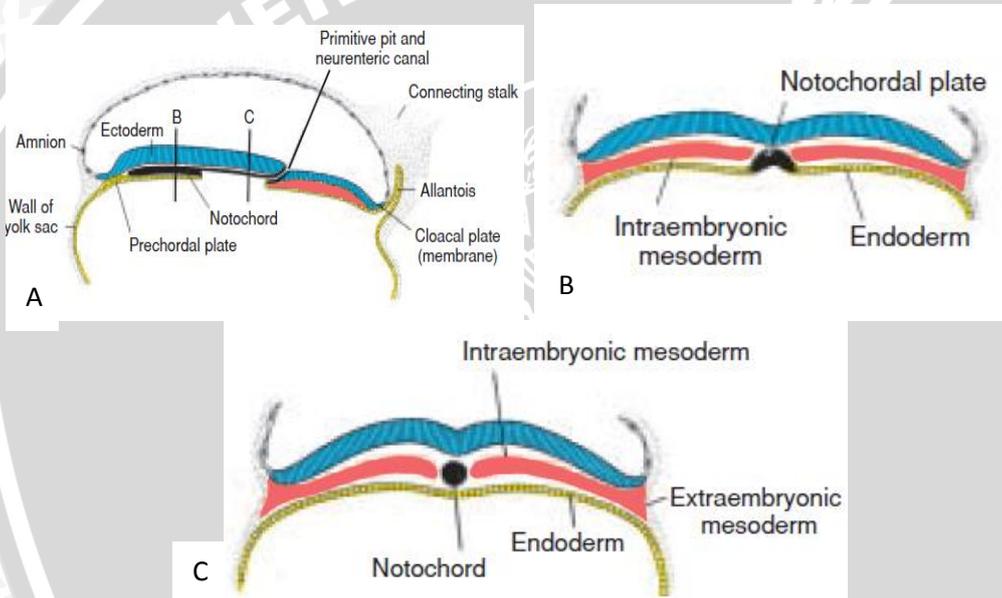
Gambar 2.4.5 Fase Diskus Germinativum Bilaminar

A. Blastokista usia 7,5 hari. B. Blastokista usia 9 hari. C. Blastokista usia sekitar 12 hari. D. Blastokista usia sekitar 13 hari



Gambar 2.4.6 Fase Invaginasi Epiblas

A. Diskus germinativum pada akhir minggu kedua. B. Invaginasi epiblas membentuk endoderm dan mesoderm.



Gambar 2.4.7 Fase Pembentukan Notokord

A. Bagian paling kranial dari notokord definitif telah terbentuk. B. Lempong notokord mulai terlepas dari endoderm. C. Notokord definitif.

Periode mudigah atau organogenesis yang berlangsung dari minggu ketiga hingga kedelapan merupakan periode di saat ketiga lapisan germinativum, ektoderm, mesoderm, dan endoderm membentuk jaringan dan sistem organ masing-masing. Ektoderm menghasilkan organ dan struktur yang mempertahankan kontak dengan dunia luar seperti sistem saraf pusat; saraf tepi;

epitel sensorik telinga, hidung, dan mata; kulit, termasuk rambut dan kuku; hipofisis, kelenjar mamaria, kelenjar keringat, serta email gigi (Sadler, 2009).

Komponen-komponen penting mesoderm adalah mesoderm lempeng lateral, paraksial, dan intermediat. Mesoderm paraksial membentuk somitomer yang menghasilkan mesenkim kepala dan tersusun menjadi somit di segmen oksipital dan kaudal. Somit menghasilkan miotom (jaringan otot), sklerotom (tulang rawan dan tulang), dan dermatom (jaringan subkutis kulit), yang semuanya adalah jaringan penunjang tubuh. Mesoderm juga menghasilkan sistem vaskular, sistem urogenital kecuali kandung kemih, limpa, dan korteks kelenjar suprarenal. Lapisan germinativum endoderm membentuk lapisan epitel untuk bagian dalam saluran cerna, saluran napas, dan kandung kemih. Lapisan ini juga membentuk parenkim tiroid, paratiroid, hati, pankreas, lapisan epitel kavitas timpani, dan tuba auditiva (Sadler, 2009).

Sistem vaskular yang berasal dari lapisan mesoderm, terbentuk melalui dua cara, yaitu vaskulogenesis dan angiogenesis. Vaskulogenesis yaitu pembentukan pembuluh darah dari pulau-pulau darah yang pertama kali muncul di mesoderm yang mengelilingi yolk sac pada minggu ketiga perkembangan. Pulau-pulau ini berasal dari mesoderm yang terinduksi prekursor hemangioblas yang diinduksi oleh VEGF yang disekresikan oleh mesoderm di sekitarnya. Angioblas, bagian dari hemangioblas yang terletak lebih perifer akan terinduksi membentuk sel endotel akibat induksi dari VEGF. Hal ini juga akan mengatur penyatuan sel-sel endotel membentuk pembuluh darah primitif yang pertama. Angiogenesis, pembentukan pembuluh darah dari pembuluh darah yang sudah ada, terjadi setelah vaskulogenesis membentuk aorta dorsalis dan vena-vena kardinalis. Proses ini juga diperantarai VEGF yang merangsang proliferasi

endotel di titik-titik tempat pembentukan pembuluh darah baru. Maturasinya kemudian diatur oleh PDGF dan TGF β (Sadler, 2009).

Akibat pembentukan sistem organ dan pertumbuhan pesat sistem saraf pusat, diskus embrional yang semula datar mulai melipat secara sefalokaudal, membentuk lipatan kepala dan ekor. Diskus juga melipat secara transversal (lipatan lateral) sehingga tubuh berbentuk bulat. Hubungan dengan yolk sac dan plasenta masing-masing dipertahankan melalui duktus vitelinus dan tali pusat (Sadler, 2009).

2.5 Apoptosis

Seratus triliun sel di dalam tubuh merupakan anggota dari komunitas yang sangat terorganisir, tidak hanya melalui pengaturan kecepatan pembelahan sel tetapi juga oleh pengaturan kecepatan kematian sel. Ketika sel tidak dibutuhkan atau menjadi suatu ancaman bagi organisme, sel-sel tersebut akan mengalami proses kematian sel yang terprogram atau disebut dengan apoptosis. Proses ini melibatkan kaskade proteolitik khusus yang menyebabkan sel mengerut dan memadat, membongkar sitoskeletonnya dan mengubah permukaan selnya sehingga sel fagositik yang berdekatan, seperti makrofag, dapat menempel pada membran sel dan mencerna sel tersebut (Guyton dan Hall, 2007).

Apoptosis berbeda dengan nekrosis atau kematian sel akibat jejas akut. Pada proses nekrosis, sel membengkak dan pecah akibat hilangnya integritas membran. Sel yang nekrotik dapat mengeluarkan isi selnya, menyebabkan inflamasi dan jejas ke sel yang berdekatan. Sedangkan pada apoptosis penghancuran dan fagositosis sel terjadi sebelum ada kebocoran isi sel. Selain

itu, pada apoptosis sel-sel yang berdekatan biasanya masih tetap sehat (Guyton dan Hall, 2007).

Apoptosis menyebabkan kematian sel terprogram pada beberapa proses fisiologis penting dan proses patologik, meliputi:

- Selama proses embriogenesis seperti yang terjadi pada saat implantasi, organogenesis, dan terjadinya involusi.
- Involusi fisiologik bergantung hormon, seperti involusi endometrium selama siklus menstruasi atau payudara di masa laktasi setelah penyapihan, atau atrofi patologik seperti pada prostat setelah kastrasi.
- Delesi sel pada populasi yang berproliferasi, seperti epitel kriptas usus atau kematian sel pada tumor.
- Delesi sel T autoreaktif di timus (>95% timosit mati dalam timus selama proses maturasi), kematian sel dari limfosit yang kekurangan sitokin, atau kematian sel yang diinduksi oleh sel T sitotoksik.
- Berbagai rangsang cedera ringan (panas, radiasi, obat kanker sitotoksik untuk kanker, dan lain-lain) yang menyebabkan kerusakan DNA yang tidak dapat diperbaiki, sebaliknya memicu jalur lintas bunuh diri sel (misalnya, melalui protein supresor tumor p53) (Kumar *et al.*, 2007)

Mekanisme yang mendasari apoptosis merupakan subjek investigasi yang luas dan berkembang. Proses dasar mekanisme tersebut dapat dipahami sebagai empat komponen terpisah tetapi saling tumpang tindih:

1. *Signalling* (pemberian sinyal). Apoptosis dapat dipicu dengan berbagai sinyal yang berkisar dari kejadian terprogram intrinsik misalnya pada perkembangan terjadi kekurangan *growth factor*. Sinyal transmembran juga dapat menekan program kematian yang terjadi sebelumnya atau menginisiasi kaskade

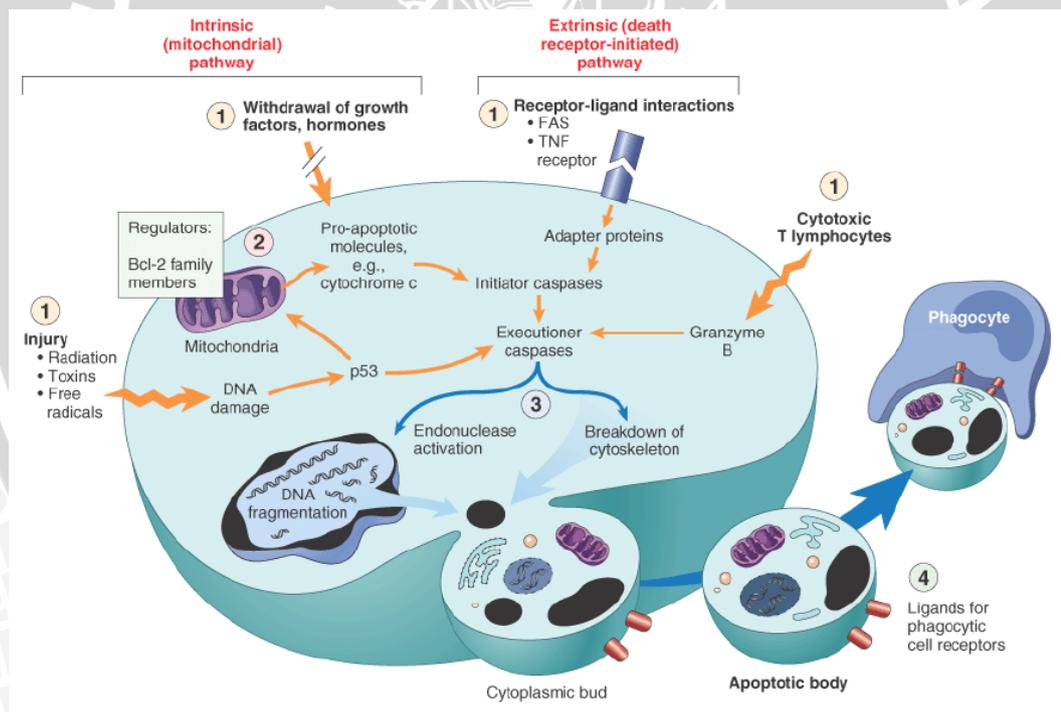
kematian sel. Pada jalur sinyal transmembran, yang terpenting adalah adanya superfamili TNFR dan superfamili pada molekul membran plasma, meliputi molekul permukaan Fas. Reseptor ini dapat menimbulkan aktivasi kaspase inisiator dan kaskade aktivasi enzim yang memuncak pada kematian sel.

2. Kontrol dan integrasi. Tahap ini dilakukan oleh protein spesifik yang menghubungkan sinyal kematian asli dengan program eksekusi akhir. Protein tersebut penting karena kerjanya dapat menimbulkan “komitmen” atau pembatalan sinyal yang berpotensi letal. Terdapat dua jalur dalam tahap ini, yaitu (a) jalur ekstrinsik, berupa transmisi langsung sinyal kematian dengan protein pencocok (*adapter proteins*) terhadap mekanisme eksekusi, dan (b) jalur intrinsik, berupa pengaturan permeabilitas mitokondria oleh anggota famili protein Bcl-2. Berbagai faktor, seperti Ca^{2+} dan radikal bebas dapat meningkatkan permeabilitas melalui pembentukan pori pada mitokondria. Hal ini menyebabkan keluarnya sitokrom C yang dilepas ke sitosol kemudian berikatan dengan faktor pengaktivasi protease proapoptotik atau Apaf-1 dan mengaktifkannya, mencetuskan aktivasi kaspase eksekusi dan pengaturan gerakan kejadian proteolitik.

3. Eksekusi. Pada tahap ini terjadi aktivitas biokimiawi khas yang dihasilkan dari sintesis dan/ atau aktivasi sejumlah enzim katabolik sitosolik. Meskipun terdapat variasi, namun tahap ini memperlihatkan pola-pola pokok yang umumnya bisa diaplikasikan pada semua bentuk apoptosis.

- Pemecahan protein oleh kaspase. Sebagai contoh, aktivasi *endonuklease down-stream* mengakibatkan fragmentasi DNA khas sementara perubahan volume dan bentuk sel sebagian dapat disebabkan oleh pemecahan komponen sitoskeleton.

- Ikatan silang protein yang luas melalui aktivasi transglutaminase yang menyebabkan protein sitoplasmik, terutama sitoskeleton memadat dan berfragmentasi.
 - Pemecahan DNA menjadi fragmen berpasangan melalui kerja endonuklease yang bergantung pada Ca^{2+} dan Mg^{2+} .
4. Pengangkutan sel mati. Sel apoptotik dan fragmennya memiliki molekul penanda pada permukaannya, yang mempermudah pengambilan dan pembuangan oleh sel yang berdekatan atau fagosit. Proses ini sangat efisien sehingga sel mati menghilang tanpa meninggalkan bekas dan inflamasi benar-benar tidak ada (Kumar *et al.*, 2007).



Gambar 2.5 Mekanisme Apoptosis

Protein Bcl-2 pada jalur intrinsik dapat diaktivasi oleh berbagai faktor, salah satunya oleh protein tyrosin kinase. Protein ini merupakan komponen penting yang mengatur pertumbuhan, mitosis, dan diferensiasi sel. Pembentukan

protein ini dimulai ketika terjadi aktivasi dari reseptor tyrosin kinase oleh berbagai faktor seperti EGF, IGF, PDGF, NGF, dan faktor pertumbuhan yang lain. Ketika faktor-faktor pertumbuhan ini berikatan dengan reseptor tyrosin kinase, maka akan terjadi dimerisasi dan fosforilasi yang menyebabkan pembentukan dari protein tyrosin kinase (Polkowski *et al.*, 2000).

Pada penelitian dari Otani *et al.* 1993 disebutkan bahwa protein tyrosin kinase mempengaruhi proses regulasi dari Bcl-2. Pemberian herbimycin A, suatu penghambat reseptor tyrosin kinase, menyebabkan penurunan regulasi dari Bcl-2, suatu protein antiapoptosis di tingkat mRNA dan juga mencegah peningkatan Bcl-2 yang dipengaruhi oleh faktor-faktor pertumbuhan lain. Hal ini menunjukkan bahwa protein tyrosin kinase dapat meregulasi Bcl-2.

Selain melalui jalur diatas, proses apoptosis dapat terjadi langsung akibat dari adanya kerusakan DNA. Proses ini dapat terjadi apabila terjadi hambatan pada aktivasi dari enzim topoisomerase II. Topoisomerase II merupakan suatu enzim nuklear yang secara aktif bekerja pada replikasi dan transkripsi DNA dan mungkin pada proses perbaikan DNA. Peningkatan aktivitas dari protein ini berhubungan dengan peningkatan proliferasi sel khususnya pada fase S dan G₂ dari siklus sel. Ketika terjadi hambatan pada enzim ini, misalnya oleh karena paparan genistein, maka akan dapat terjadi kerusakan pada DNA yang menyebabkan apoptosis sel (Polkowski *et al.*, 2000)