

## BAB 6

## PEMBAHASAN

Sesuai dengan tujuan dari penelitian ini yaitu membuktikan adanya pengaruh perbedaan dosis paparan genistein terhadap ekspresi protein Bax pada embrio zebrafish, maka didapatkan hasil yang menunjukkan bahwa paparan Genistein pada tahap perkembangan awal embrio zebrafish dalam dosis 0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; dan 5  $\mu\text{M}$  memberikan pengaruh terhadap ekspresi gen *Bax*, terutama pada dosis 2,5  $\mu\text{M}$  terdapat perbedaan yang besar dibandingkan kontrol, akan tetapi setelah dilakukan analisa ternyata perbedaan dinilai tidak signifikan secara statistik karena didapatkan nilai  $p = 0.274$  ( $p < 0.05$ ). Perbedaan rasio ekspresi gen *Bax* antar kelompok dosis perlakuan diduga karena semakin besar dosis paparan semakin banyak genistein yang terakumulasi di dalam organ-organ embrio zebrafish. Pada studi yang dilakukan oleh Sassi-Messai et al, 2009, ditemukan sel-sel apoptosis terbanyak pada *hindbrain* dan *anterior spinal cord* dengan pemberian dosis paparan genistein 2,5  $\mu\text{M}$ -10  $\mu\text{M}$  pada 24 hpf. Hal ini dapat disimpulkan bahwa adanya efek apoptosis akibat pemberian genistein, perlu diketahui bahwa *Bax* merupakan salah satu penanda terjadinya apoptosis.

*Bax* teraktivasi melalui aktivitas *caspase*, penghambatan protein kinase, aktivasi fosfatase, dan peningkatan pH intrasel. Molekul *Bax* berada dalam sitoplasma dan merespon berbagai stimulus dengan bermigrasi ke mitokondria, serta menyebabkan pelepasan sitokrom c. Hipotesis Khaled et al, 1999 menyatakan bahwa *Bax* menginduksi pelepasan sitokrom c dengan menghambat fungsi *Bcl-2*. Akan tetapi *Bax* dan *Bcl 2* memiliki fungsi masing-masing terhadap

regulasi apoptosis. Baik *Bcl-2* maupun *Bax*, dapat membentuk kanal ion pada artifisial membran, meskipun *Bcl-2* dapat menghambat aktivitas *Bax* pada pH yang netral.

Pada studi yang dilakukan Sassi-Messai *et al* (2009) dengan menggunakan pewarnaan *acridine orange* untuk melihat adanya apoptosis pada embrio zebrafish 24 hpf tanpa paparan genistein. Dilakukan pengamatan apoptosis dengan pewarnaan *acridine orange* yang diberikan perlakuan dosis genistein 2,5  $\mu\text{M}$  sampai 10  $\mu\text{M}$  menunjukkan peningkatan sel apoptosis, khususnya pada *hind brain* dan *anterior spinal cord*. Sedangkan paparan dosis genistein diatas 10  $\mu\text{M}$  dapat menimbulkan angka kematian embrio yang sangat besar. Pada teknik *TUNEL* yang lebih spesifik terhadap apoptosis, menunjukkan bahwa pada perlakuan dengan konsentrasi lebih dari 0.5  $\mu\text{M}$  menunjukkan peningkatan sel apoptosis yang berarti daripada konsentrasi dibawahnya, karena jumlah sel apoptosis lebih kecil daripada kontrol.

Penentuan dosis paparan genistein pada penelitian ini berdasarkan pada penelitian pendahuluan yang menyebutkan bahwa pada dosis 10  $\mu\text{M}$ , terdapat angka kematian embrio keseluruhan dari jumlah sampel. Rasio besarnya defek pada embrio zebrafish pada usia 72 hpf mulai terdeteksi pada dosis paparan 5  $\mu\text{M}$  senilai 19,4 dan pada dosis 10  $\mu\text{M}$  terjadi defek serta kematian embrio keseluruhan pada 144 hpf. Sehingga pada penelitian ini diberikan dosis paparan dibawah 10  $\mu\text{M}$  yaitu dosis 0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; dan 5  $\mu\text{M}$  untuk menghindari adanya kematian embrio karena tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengamati adanya apoptosis tanpa adanya kematian dengan mengetahui perbedaan rasio ekspresi *Bax*.

Berdasarkan penjelasan di atas, penelitian ini menunjukkan bahwa perbedaan paparan genistein dapat memengaruhi ekspresi gen *Bax* yang berhubungan dengan apoptosis Zebrafish. Secara keseluruhan pengaruh tersebut diduga terjadi karena variasi dosis paparan genistein yang berpengaruh terhadap ekspresi *Bax*. Kelemahan dari penelitian ini adalah tidak dilakukannya metode Pewarnaan dengan *Acridine Orange* dan *TUNEL* (penanda sel apoptosis) untuk dijadikan pembanding dengan metode Real Time PCR, adanya keterbatasan waktu, alat, dan bahan yang untuk melakukan pengulangan pemeriksaan, serta keadaan lingkungan yang sangat berpengaruh terhadap kualitas telur yang dihasilkan oleh zebrafish meskipun telah dilakukan pengontrolan terhadap suhu, makanan, dan juga kebersihan akuarium, serta pemindahan sampel yang berulang dari satu tempat ketempat yang lain

