

## BAB 2

## TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Phytoestrogen*

Pada tahun 1954 diterbitkan sebanyak 53 daftar jenis tanaman yang memiliki aktifitas estrogenik, kemudian pada tahun 1975 berkembang menjadi lebih dari 300 daftar jenis tanaman yang mengandung *phytoestrogen* (Mazur, 2000). *Phytoestrogen* terbagi dalam dua kelompok yaitu isoflavon dan lignin yang banyak terdapat dalam produk makanan berbahan dasar kedelai. Isoflavon yang sering ditemukan dalam produk makanan berbahan dasar kedelai adalah genistein dan daidzein (Jarrel *et al*, 2012)

Mekanisme dan potensi *phytoestrogen* belum seluruhnya diketahui dan dibuktikan secara empiris. *Phytoestrogen* dianggap sebagai pengganggu sistem endokrin yang potensial oleh karena itu harus berhati-hati dalam penggunaannya. Sebagian besar domba yang mengonsumsi daun semanggi menunjukkan infertilitas dan gangguan reproduksi. Ceethah di dalam penangkaran yang mengonsumsi makanan kucing yang komposisinya terdiri dari kedelai dapat memiliki tingkat kesuburan yang lebih rendah dibandingkan dengan yang tidak mengonsumsi makanan tersebut. Bayi yang diberi asupan dasar kedelai memiliki konsentrasi daidzein dan genistein dalam plasma lebih tinggi 13.000-22.000 unit kali lipat pada awal kehidupan dan proporsinya lebih besar dibandingkan dengan asupan isoflavon normal pada orang dewasa (Ososki *et al*, 2003)

*Phytoestrogen* merupakan senyawa yang memberi efek estrogenik pada sistem saraf pusat, menginduksi estrus, dan merangsang pertumbuhan saluran kelamin hewan betina. *Phytoestrogen* mengikat reseptor estrogen, menginduksi produksi estrogen-responsif gen spesifik dan stimulasi reseptor estrogen pada pertumbuhan sel kanker payudara (Mazur, 2000)

Para peneliti mengajukan hipotesis bahwa *phytoestrogen* dapat menurunkan resiko penyakit kardiovaskular, menurunkan resiko fraktur oleh karena osteoporosis, menurunkan tingkat kanker payudara dan menurunkan kemerahan pada wajah orang asia. Beberapa penelitian menyatakan bahwa efek *phytoestrogen* berpotensi untuk menerapi kanker payudara, kanker endometrium, penyakit hati, dan kanker prostat. Beberapa mekanisme yang dipaparkan oleh peneliti adalah *phytoestrogen* dapat menghambat pertumbuhan sel-sel kanker melalui penghambatan topoisomerase DNA, supresi angiogenesis, induksi differensiasi pada garis sel kanker, dan induksi apoptosis (Ososki *et al*, 2003)

*Phytoestrogen* memiliki efek yang menguntungkan untuk menurunkan resiko dari hormon dependen kanker, akan tetapi *phytoestrogen* tertentu juga dapat meningkatkan resiko dari perkembangan sel kanker itu sendiri. *Phytoestrogen* digunakan sebagai terapi pengganti hormon atau biasa disebut *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs). Idealnya SERMs digunakan untuk menerapi gejala post menopause seperti kemerahan pada wajah, keringnya vagina, dan perubahan suasana perasaan serta melindungi dari osteoporosis dan penyakit jantung (Wanibuchi *et al*, 2003)

### 2.1.1 Genistein

Genistein (*4',5,7 Trihydroxyisoflavone*) merupakan salah satu jenis isoflavon dari *phytoestrogen*. Genistein termasuk dalam isoflavon aglikon yaitu salah satu bentuk isoflavon diantara glikosida, malonil glikosida, dan asetil glikosida. (Ni'mah, 2009)

Genistein dapat mempengaruhi berbagai mekanisme seluler seperti menghambat enzim tyrosin kinase dan terbukti menurunkan sitokin pro inflamasi seperti IFN- $\gamma$ , IL-12, dan TNF  $\alpha$  (Castro *et al*, 2012). Genistein dan phytoestrogen lainnya terbukti dapat menjadi agen kemopreventif untuk berbagai macam penyakit seperti kanker sistem reproduksi, gejala menopause, osteoporosis, hiperkolesteremia, dan penyakit jantung. Hal ini berkaitan dengan modulasi estrogen yang dilakukan zat-zat tersebut. Akan tetapi dalam dosis tertentu genistein menyebabkan hambatan perkembangan embrio seperti pada total morfologi sistem (TMS), *branchial arch number*, *forebrain*, skor sistem visual, penutupan neurofor posterior, *small limb bud*, dan tidak normalnya perkembangan katub jantung. (Xing *et al*, 2009)

Paparan genistein pada embrio zebrafish menyebabkan turunnya frekuensi denyut jantung dan edema perikardium yang disebabkan oleh perkembangan jantung yang terhambat, meliputi pembelahan dan proliferasi sel saat embriogenesis, pada paparan sejak 24 hpf terjadi defek morfologi maupun fungsi jantung yang berhubungan dengan mekanisme konduksi aksi potensial, kemudian pada paparan sejak 48 hpf efeknya cenderung mengganggu fungsi jantung sedangkan pada morfologinya tidak terlalu berpengaruh karena sejak 48 hpf jantung embrio sudah berdenyut dengan morfogenesis yang hampir sempurna (Anggraeni *et al*, 2014).

Efek pemberian genistein terhadap apoptosis sel kanker payudara MDA-MB-231 dapat dilihat dari meningkatnya jumlah regulator pro apoptosis seperti *Bax* dan menurunnya regulator anti apoptosis seperti *Bcl-2*, dimana 43% dari seluruh jumlah sel yang dipapar akan mengalami apoptosis (Li *et al*, 1999)

## 2.2 Zebrafish



**Gambar 2.1** Zebrafish

Zebrafish dengan nama latin *Danio rerio* merupakan salah satu ikan air tawar tropis kecil yang memiliki tingkatan taksonomi sebagai berikut :

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Kelas : Acrinopterygii

Ordo : Cypriniformes

Famili : Cyprinidae

Genus : Danio

Species : Danio rerio

Zebrafish melakukan fertilisasi secara eksternal dengan umur regenerasi yang pendek yaitu 2-3 bulan dan memproduksi banyak telur sekitar 100-200 setiap kali fertilisasi. Embrio zebrafish memiliki bentuk sederhana dan transparan sehingga dapat mudah terlihat adanya mutasi dalam embrio tersebut. (Detrich *et al* ,1999)

Zebrafish di inkubasi dalam suhu 28,5°C , pada saat fertilisasi telur berdiameter 500-600 mikrometer. Fase pembelahan Zebrafish dimulai dari mitosis pertama. Pada periode ini embrio membelah secara bertahap yaitu membentuk tahap 2 sel pada sekitar 30 menit pertama sampai dengan 64 sel pada 2 hpf berikutnya. Perlu diketahui sampai dengan tahap 8 sel semua blastomer bersitoplasma kuning telur dan tidak ada sekat ataupun membran sel yang membatasi diantara blastomer dan kuning telur tersebut. Hal tersebut sangat bermanfaat untuk dilakukan studi manipulasi karena kuning telur tersebut dapat menjadi rute awal suntikan manipulatif terhadap embrio Zebrafish (Detrich *et al*,1999)

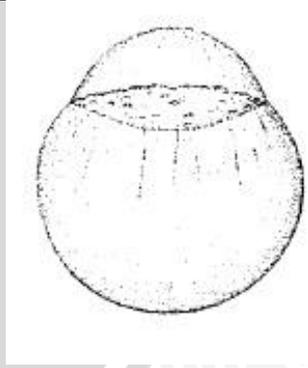
Zebrafish berkembang pesat diluar tubuh induknya. Hanya dengan 6 hari pasca fertilisasi Zebrafish telah memiliki struktur organ fungsional dengan sistem sirkulasi yang kompleks. Hal ini membuktikan bahwa Zebrafish merupakan objek yang cocok untuk penelitian yang berkaitan dengan hubungan tumbuh kembang embrio (Bailey *et al*, 2013)

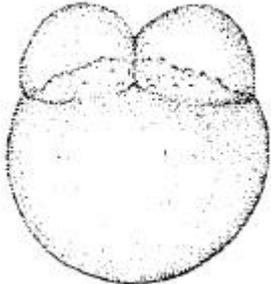
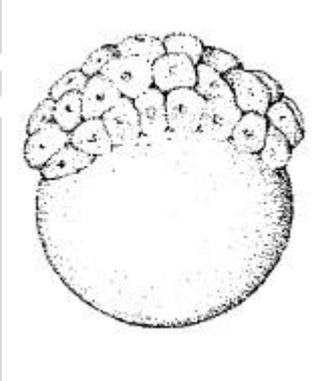
Alasan lain yang mendasari penggunaan zebrafish sebagai hewan coba dalam penelitian khususnya pada penelitian embriologis adalah (1) Embrio zebrafish berbentuk transparan dan telurnya cepat menetas sehingga dapat

terlihat organ dalam dan bisa diteliti secara *in vivo*, (2) Embriogenesis cepat dan sejumlah besar embrio dihasilkan setiap fertilisasi, sehingga tidak dibutuhkan biaya besar daripada hewan coba mamalia yang lain, (3) Zebrafish disetujui sebagai hewan coba pada penelitian molekular dan genetik karena determinasi pada ekspresi gen temporal & spasial yang cepat, pemeriksaan fungsi spesifik oleh perkembangan transgenik, *knockdown antisense gen*, dan mutagenesis skala besar, (4) Zebrafish memiliki system kardiovaskular, sistem syaraf dan sistem pencernaan yang sama dengan sebagian besar mamalia, organogenesis organ utama secara lengkap terbentuk pada usia larva 5-6 hari, (5) Genom zebrafish dan manusia memiliki kesamaan sekitar 75 %. (Hsin Hsu *et al*, 2007)

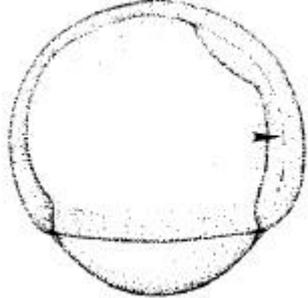
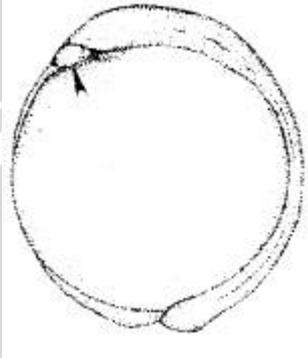
Berikut ini merupakan tahap-tahap perkembangan embrio zebrafish beserta diskripsinya menurut Kimmel *et al*, 1995 di Tabel 2.1 :

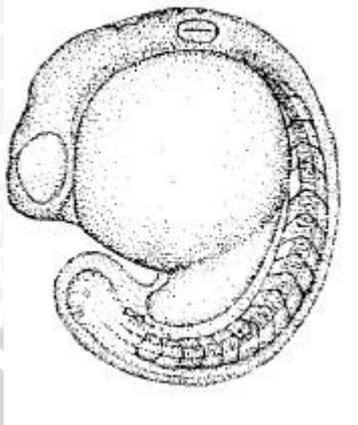
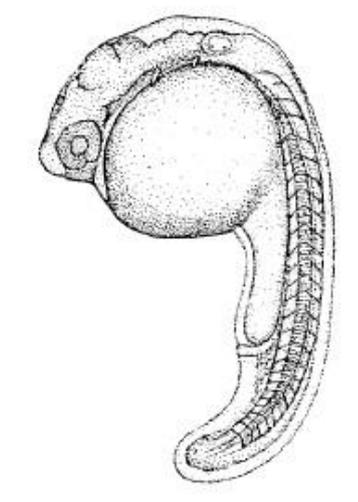
**Tabel 2.1** Tahap perkembangan awal embrio zebrafish (Kimmel *et al*, 1995)

Tahapan	Waktu (h)	Keterangan	Gambar
Zigot	0- $\frac{3}{4}$ h	Telur yang baru difertilisasi sampai pada terjadinya pembelahan pertama	

<p>Pembelahan</p>	<p><math>\frac{3}{4}</math>-<math>2\frac{1}{4}</math> h</p>	<p>Sel membelah menjadi 2, 4, 8, 16, 32, 64, dan 128 secara cepat</p>	 <p>Sel membelah menjadi 2 sel pada <math>\frac{3}{4}</math> h</p>  <p>Sel membelah menjadi 64 sel pada 2 h</p>
-------------------	-------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

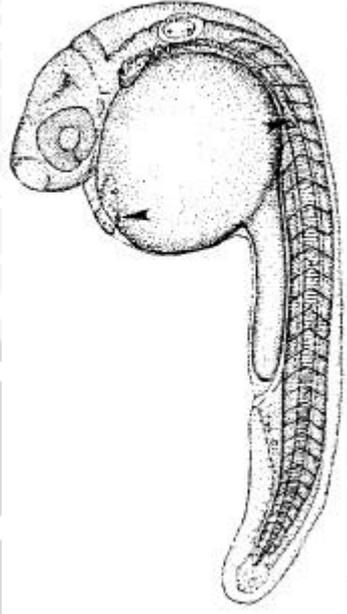
<p>Blastula</p>	<p>2¼- 5¼</p>	<p>Periode blastula yaitu periode ketika blastodisc mulai berbentuk seperti bola. Embrio masuk ke Midblastula Transition (MBT), Yolk Syncytial Layer (YSL) ,dan akhirnya terbentuklah epiboli. Epiboli dimulai pada akhir fase blastula. Epiboli merupakan penipisan dan penyebaran di YSL dan blastodisc ke seluruh yolk cell dan pada akhir fase gastrula yolk cell akan terenuhi oleh YSL dan blastodisc.</p>	<div data-bbox="1177 248 1453 539" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="1145 591 1493 689">Pembentukan kubah pada 4<sup>1</sup>/<sub>3</sub> h</p> <div data-bbox="1145 703 1493 1043" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="1150 1066 1485 1111">30% epiboli pada 4<sup>2</sup>/<sub>3</sub> h</p>
-----------------	---------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

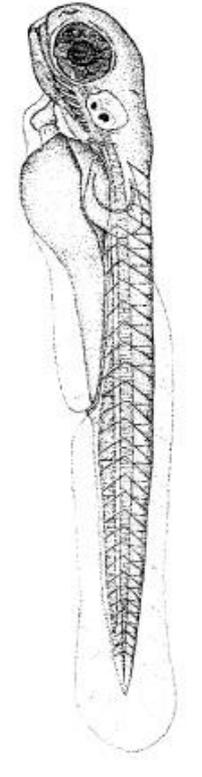
<p>Gastrula</p>	<p>5¼-10 h</p>	<p>Pergerakan morfogenesis dari involusi, konvergensi, dan ekstensi membentuk epiblast, hypoblast, dan embryonic axis sampai pada akhir epiboli.</p>	 <p>75 % epiboli pada 8 h</p>  <p>Bud pada 10 h</p>
-----------------	----------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>Segmentasi</p>	<p>10-24 h</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pembentukan somit, pharyngeal arch primordial, dan perkembangan neuromer.</li> <li>- Organogenesis primer</li> <li>- Pergerakan awal</li> <li>- Ekor mulai tampak</li> </ul>	<div style="text-align: center;">  <p>18 somite pada 18 h</p>  <p>26 somite pada 22 h</p> </div>
-------------------	----------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



<p>Faringula</p>	<p>24-48 h</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tahap embrio phylotypic</li> <li>- Sumbu tubuh menjadi lurus dari bentuk awal yang melengkung di yolk sac</li> <li>- Sistem sirkulasi terbentuk ( denyut jantung dan aliran darah)</li> <li>- Adanya pigmentasi</li> <li>- Terbentuknya sirip</li> <li>- Adanya kemampuan untuk menanggapi stimulasi rangsang taktil</li> </ul>	 <p>Prim 6 pada 25 h</p>
------------------	----------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>Penetasan</p>	<p>48-72 h</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Penyempurnaan morfogenesis dari system organ primer</li> <li>- Perkembangan tulang rawan di kepala dan sirip dada</li> <li>- Penetasan terjadi secara spontan</li> </ul>	 <p>Protruding mouth pada 72 h</p>
<p>Larva awal</p>	<p>&gt;72 h</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Swim bladder meningkat sehingga larva dapat berenang</li> <li>- Dapat mencari makan</li> <li>- Memulai perilaku menghindar secara aktif</li> </ul>	

### 2.3 Apoptosis

Istilah apoptosis pertama kali digunakan oleh Kerr, Wyllre, dan Currie dalam hasil laporan penelitian mereka di tahun 1972 untuk mendiskripsikan bentuk morfologis dari kematian sel, meskipun konsep-konsep apoptosis secara eksplisit telah dijelaskan pada penelitian-penelitian sebelumnya. (Elmore, 2007)

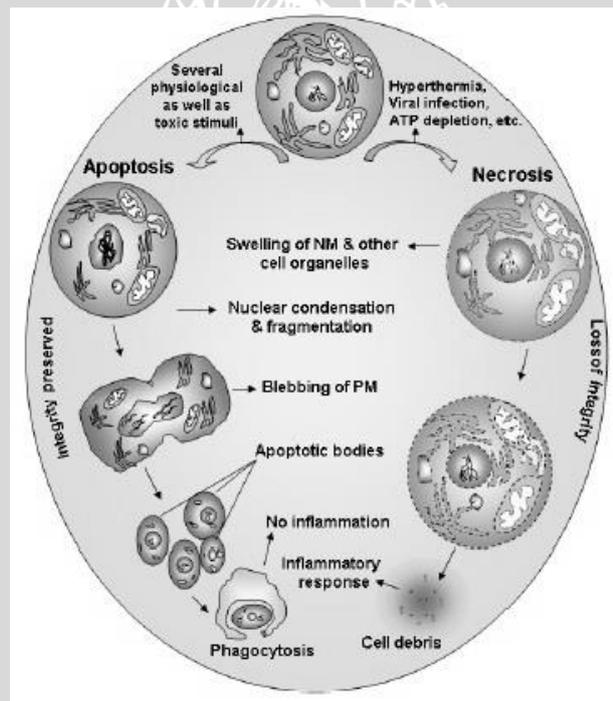
Apoptosis merupakan salah satu jalur kematian sel yang telah terprogram secara ketat dimana sel tersebut dapat mengaktifkan enzim yang dapat mendegradasi DNA, protein sel, dan sitoplasma. Kemudian sel yang telah terdegradasi membentuk fragmen-fragmen yang lebih kecil dengan membran sel yang masih utuh sehingga tidak terjadi proses peradangan. Fragmen-fragmen tersebut pada akhirnya akan mengalami fagositosis. (Kumar *et al*, 2007)

Apoptosis dapat berperan baik secara fisiologis maupun patologis. Secara fisiologis, apoptosis berfungsi untuk menghilangkan sel-sel yang tidak lagi dibutuhkan dan digunakan untuk menjaga keseimbangan jumlah sel dalam jaringan. Beberapa contoh apoptosis fisiologis seperti pada tahap embriogenesis, kerusakan sel endometrium ketika siklus menstruasi, dan regresi sel-sel payudara karena kehilangan *weaning cell*. Dalam situasi ini sel mengalami kehilangan sinyal kelangsungan hidup yang diperlukan. (Kumar *et al*, 2007)

Secara patologis apoptosis berlangsung ketika adanya kerusakan DNA akibat radiasi, obat antikanker, sitotoksik, suhu yang ekstrim, dan bahkan hipoksia yang secara langsung atau melalui radikal bebas. Bila mekanisme perbaikan sel tidak berhasil maka akan memicu jalur apoptosis intrinsic untuk menginduksi apoptosis daripada mempertaruhkan terjadinya mutasi DNA dan dapat menjadi suatu bentuk keganasan. (Kumar *et al*, 2007)

Apoptosis dan nekrosis merupakan proses kematian sel yang berbeda mekanismenya, dapat dijelaskan sebagai berikut, apoptosis merupakan proses kematian sel yang normal. Sel yang mati akibat apoptosis bergantung kepada adanya *Adenosin Tri Phosphate* (ATP) dan terjadi akibat stimulus eksogen dan endogen. Pada apoptosis terjadi penurunan volume sel, perubahan inti sel akibat

kondensasi kromatin, serta terjadinya marginasi dan fragmentasi diikuti oleh *blebbing* dan perusakan sel dengan membran yang masih intak. Hal ini menyebabkan pembentukan badan-badan apoptosis yang memiliki konten sitoplasma yang dikelilingi oleh membran sel yang kemudian difagositosis tanpa menimbulkan reaksi inflamasi. Berbeda dengan apoptosis, nekrosis merupakan proses kematian sel yang disebabkan oleh injuri pada bagian eksternal sel. Nekrosis ditandai oleh meningkatnya volume sel dan diikuti oleh pembesaran organel sel termasuk inti sel, menurunnya integritas membran, dan melepaskan enzim seperti hidrolase yang menimbulkan adanya reaksi inflamasi. (Rastogi *et al*, 2009)



**Gambar 2.2** Diagram perbedaan antara apoptosis dan nekrosis (Rastogi *et al*, 2009)

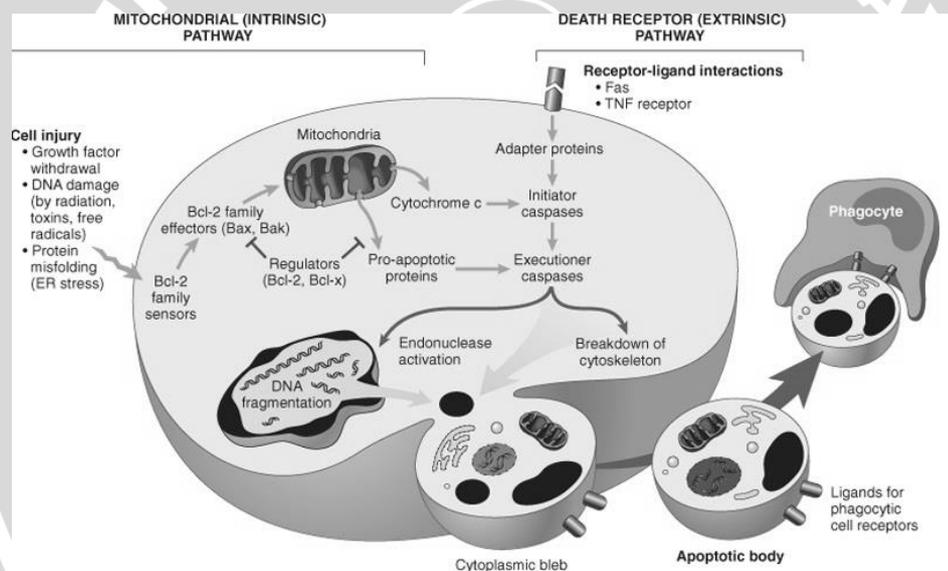
Hal yang mendasari dalam proses apoptosis adalah aktivasi enzim yang disebut *Cystein containing aspartat specific protease* (Caspase). Caspase yang aktif membelah dengan banyak target sel berujung pada aktivasi nuklease yang

akan menurunkan DNA dan enzim lain, dan dapat menurunkan nukleoprotein serta protein sitoskeletal. Aktivasi caspase tergantung pada adanya keseimbangan antara molekul pro dan anti apoptosis. Terdapat dua jalur berbeda dalam aktivasi caspase yaitu jalur mitokondria (intrinsik) dan jalur reseptor kematian (ekstrinsik). Meskipun dua jalur ini berhubungan akan tetapi keduanya berfungsi dalam kondisi berbeda, molekul berbeda, serta peran dalam fisiologis dan patologis yang berbeda. (Kumar *et al*, 2007)

Jalur apoptosis mitokondria atau intrinsik dapat dijelaskan sebagai jalur yang diprakarsai oleh mitokondria yang memiliki beberapa protein yang dapat menginduksi apoptosis. Apoptosis dikendalikan oleh lebih dari 20 prototipe family *Bcl-2*. Sel-sel yang akan mengalami apoptosis adalah sel yang telah hilang faktor pertumbuhan, hormone tropik, terkena agen yang merusak DNA, akumulasi jumlah sel yang tidak dapat melipat (*misfolding*) proteinnya, atau sensor apoptosis yang diaktifkan. Sensor ini akan mengaktifkan dua anggota pro apoptosis yaitu *Bax* dan *Bak* yang telah mengalami dimerisasi kemudian masuk kedalam mitokondria dan membentuk kanal untuk jalan berpindahnya sitokrom c dan protein mitokondria lainnya berpindah ke sitosol. Sensor yang lain akan menghambat agen anti apoptosis yaitu *Bcl-2* dan *Bcl-xL*. Sitokrom c bersama dengan beberapa kofaktor akan mengaktifkan caspase 9 sedangkan protein yang lain menghambat aktivitas caspase lain yang berfungsi sebagai anti apoptosis. Hasilnya adalah aktivasi *cascade* caspase yang memicu fragmentasi sel. (Kumar *et al*, 2007).

Jalur ekstrinsik yaitu ketika banyak sel menghasilkan molekul permukaan yang disebut reseptor kematian dan memicu apoptosis. Molekul tersebut sebagian besar adalah anggota dari *Tumor Necrotizing Factor* (TNF) yang dalam sitoplasmanya terdapat domain kematian, yaitu kemampuan protein tersebut

untuk dapat berinteraksi dengan protein lain. Prototype reseptor kematian adalah reseptor TNF tipe 1 dan Fas (CD95). Fas-ligand (FasL) merupakan protein membran yang dihasilkan ketika limfosit T teraktivasi. Ketika sel T mengenali Fas-expressing target maka molekul Fas akan berikatan silang melalui FasL dan kemudian berikatan dengan protein adaptor dan caspase 8. Kelompok-kelompok caspase ini memicu inisiasi cascade caspase. Pada banyak sel, caspase 8 akan membelah dan mengaktifkan anggota proapoptosis family Bcl-2 yaitu Bid yang kemudian masuk jalur intrinsic atau mitokondria. (Kumar *et al*, 2007)

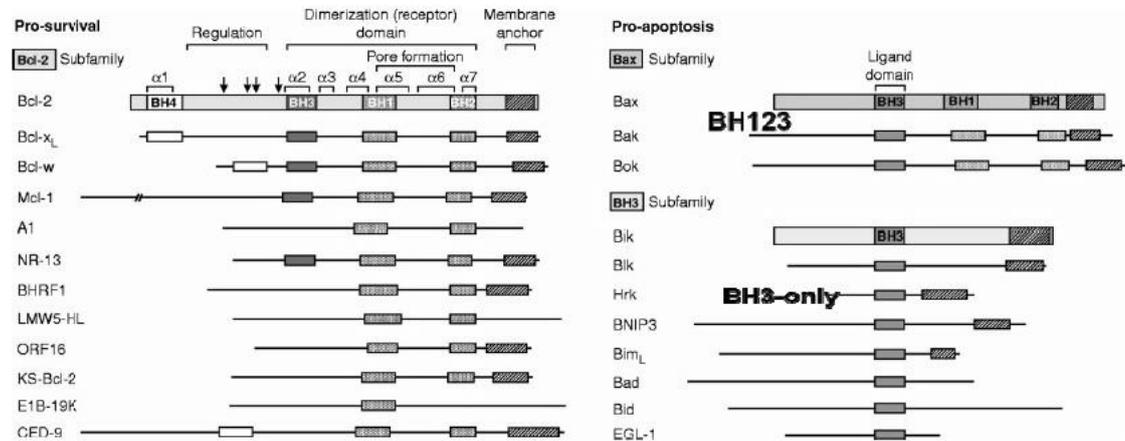


**Gambar 2.3** Skema mekanisme jalur apoptosis (Kumar *et al*, 2007)

### 2.3.1 Bax

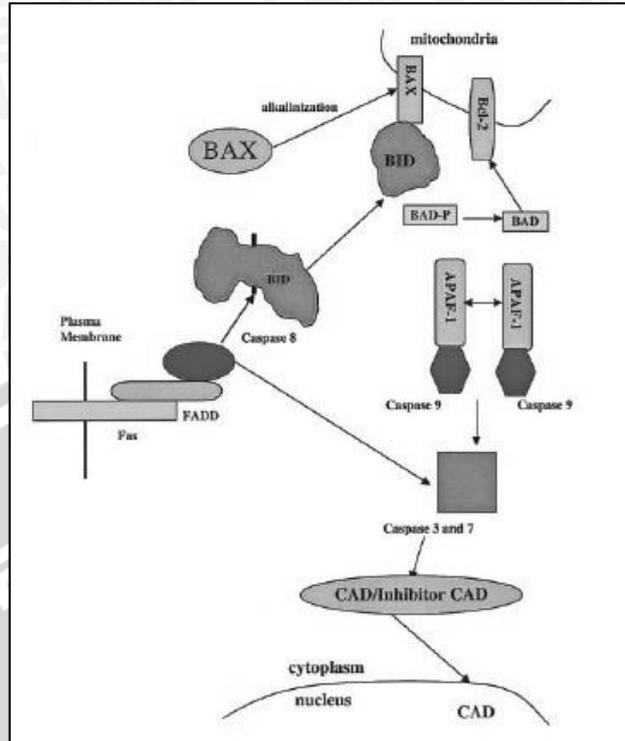
Famili *Bcl-2* merupakan regulator apoptosis yang terbagi menjadi 3 kelompok berdasarkan struktur dan fungsinya. Kelompok pertama berfungsi sebagai anti apoptosis diwakili oleh *Bcl-2* dan *Bcl-xL*. Kelompok kedua merupakan *Bcl-2 associated killer* yang diwakili oleh *Bax* dan *Bak*. Kelompok ketiga yaitu merupakan molekul proapoptosis yang diwakili oleh *Bid* (*a novel BH3*

domain only death agonist) dan Bad (*the Bcl-2 associated death molecule*).  
(Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi UGM)



**Gambar 2.4** Famili BCL-2 (Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi UGM)

*Bax* teraktivasi melalui pembelahan oleh caspase, dihambatnya protein kinase, dan atau aktivasi fosfatase serta meningkatnya pH intrasel. Molekul *Bax* tinggal di dalam sitoplasma dan merespon berbagai stimulus dengan bermigrasi ke mitokondria dan dapat menyebabkan pelepasan sitokrom c. Sebuah hipotesis menyatakan bahwa *Bax* menginduksi pelepasan sitokrom c dengan menghambat fungsi *Bcl-2*. Akan tetapi secara *evidence* menyatakan bahwa *Bax* dan *Bcl-2* memiliki fungsi masing-masing terhadap regulasi apoptosis. Baik *Bcl-2* maupun *Bax* dapat membentuk kanal ion pada artificial membran meskipun *Bcl-2* dapat menghambat aktivitas *Bax* pada pH yang netral. (Polkowski *et al*, 2000)



**Gambar 2.5** Cascade yang terbentuk sebagai hasil apoptosis, *Caspase Activated Deoxyribonuclease (CAD)*, tentunya dipengaruhi oleh Bax (Polkowski *et al*, 2000)