

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Genistein

2.1.1 Pengertian Umum

Genistein merupakan *isoflavone* pada kacang kedelai yang memiliki struktur kimia menyerupai struktur dari estrogen. Kemiripan struktur ini menyebabkan beberapa sifat genistein menyerupai estrogen. (Kim *et al.*, 2006). Genistein memiliki nama IUPAC *5,7-Dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one*. (Shin *et al.*, 2007). Selain itu nama lain yang cukup sering digunakan adalah *4',5,7-Trihydroxyisoflavone* (Whitsett *et al.*, 2006).

2.1.2 Efek Biologi Genistein

Dari beberapa penilitan, genistein memiliki beberapa manfaat sebagai berikut:

- 1 Oksidasi asam lemak (Sacks *et al.*, 2006).
- 2 Mencegah penurunan fungsi kognitif (Hogervorst *et al.*, 2008).
- 3 Upregulasi ekspresi dan aktivitas CPT1A, *rate-limiting enzyme* di jalur β -oksidasi, di sel HepG2 (Shin *et al.*, 2007).
- 4 Inhibisi proliferasi sel kanker payudara (Shu *et al.*, 2001).
- 5 Memacu apoptosis dan aktivasi dari *caspase-3* pada hewan coba genistein. (Chodon *et al.*, 2007).
- 6 Mencegah osteoporosis (Cheong *et al.*, 2007).

2.1.3 Efek Samping Genistein

Selain memiliki beberapa efek biologis yang menguntungkan, genistein juga memiliki efek samping. Sama dengan halnya estrogen, genistein memiliki *deleterious side-effect* berupa meningkatnya risiko *stroke* dan kanker (Kamalden *et al.*, 2011). Dari beberapa penelitian, intoksikasi genistein dapat menghambat pertumbuhan maupun proliferasi pada sel *blastocyt* tikus (Chan *et al.*, 2007). Efek lain dari genistein ini adalah menghambat aktivitas topoisomerase II, proliferasi dan diferensiasi sel tumor, serta mampu menghambat perkembangan embrio melalui cara merubah struktur dan fungsi mitokondria (Bogoliubova, 1999).

2.2 Apoptosis

Apoptosis adalah kematian sel yang terprogram dan bersifat fisiologis. Contoh dari apoptosis adalah kerusakan sel terprogram selama embryogenesis, seperti yang terjadi pada implantasi, organogenesis, dan involusi. Proses apoptosis terbagi menjadi empat proses, yaitu :

1. *Signaling* (pemberian sinyal). Apoptosis dapat dipicu dengan berbagai sinyal yang berkisar dari kejadian terprogram intrinsic, kekurangan factor tumbuh, interaksi ligan-reseptor spesifik, pelepasan granzim dari sel T sitotoksik, atau agen jejas tertentu. Sinyal transmembran juga dapat menekan program kematian yang terjadi sebelumnya atau menginisiasi kaskade kematian sel. Hal terpenting dalam kelompok terakhir tersebut adalah yang termasuk superfamili reseptor factor (TNFR) superfamili pada molekul membrane plasma. Reseptor membran plasma tersebut memberikan sekuens protein "domain kematian" intrasel, yaitu bila

dioligomerisasi (khususnya trimerisasi) menimbulkan aktivasi kaspase inisiator dan kaskade aktivasi enzim yang memuncak pada kematian sel (Sherwood, 2009)..

2. *Kontrol dan integrasi.* Kontrol dan integrasi dilengkapi 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 luas pada tahapan ini : (1) transmisi langsung sinyal kematian dengan *adapter proteins* terhadap mekanisme eksekusi, dan (2) pengaturan oleh anggota family protein BCL-2. Berbagai agonis (Ca^{++} , radikal bebas, dan lain-lain) dapat memengaruhi mitokondria dengan mengakibatkan transisi permeabilitas mitokondria. Pembentukan pori dalam membrane mitokondria menyebabkan reduksi potensial membrane, dengan pengurangan produksi ATP dan pembengkakan mitokondrial, peningkatan permeabilitas membran mitokondrial luar melepaskan pencetus apoptotic, sitokrom c, ke dalam sitosol. Terdapat dugaan bahwa sitoplasma c yang dilepaskan mengikat protein sitosol tertentu (misalnya, factor pengaktifan protease proapoptotik atau apaf-1) dan mengaktifkannya, mencetuskan aktivasi kaspase eksekusi dan pengaturan gerakan kejadian proteolitik yang membunuh sel. BCL-2 (ditemukan pada membran mitokondria) menekan apoptosis dengan mencegah peningkatan permeabilitas

mitokondrial dan menstabilkan protein, seperti Apaf-1, sehingga tidak terjadi aktivasi kaspase. Anggota lain family BCL-2 berikatan dengan BCL-2 dan memodulasi efek antiapoptotiknya, sehingga BCL-X_L menghambat apoptosis, sementara BAX dan BAD menyebabkan kematian sel terprogram (Sherwood, 2009).

3. *Eksekusi*. Jalur akhir apoptosis ini ditandai dengan konstelasi kejadian biokimiawi khas yang dihasilkan dari sintesis dan atau aktivasi sejumlah enzim katabolic sitosolik. Jalur itu memuncak dengan perubahan morfologik yang telah disebutkan sebelumnya. Walaupun terdapat variasi yang tidak kentara, eksekusi final jalur lintas itu memperlihatkan pola-pola pokok yang umumnya bias diaplikasikan pada semua bentuk apoptosis (Sherwood, 2009).

- Pemecahan protein oleh satu golongan protease yang baru dikenal, dinamakan kaspase, disebut demikian karena protein tersebut memiliki sistein sisi aktif dan pecah setelah residu asam aspartat. Pada system eksperimental, ekspresi berlebih setiap kaspase mengakibatkan apoptosis selular, mengesankan bahwa dalam kondisi normal, protein tersebut harus dikontrol dengan ketat. Aktivasi satu atau lebih enzim kaspase secara tak terduga menimbulkan rentetan bertingkat aktivasi protease lain, puncak yang tidak bias ditawarkan lagi berupa bunuh diri sel. 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 mengubah protein sitoplasma mudah larut dan terutama protein sitoskeletal menjadi selubung memadat berikatan secara kovalen yang dapat berfragmentasi menjadi badan-badan apoptotic
- Pemecahan DNA menjadi fragmen berpasangan dengan basa 180 sampai 200 (jarak antar nukleosom) terjadi melalui kerja endonuklease yang bergantung Ca^{++} dan Mg^{++} . Keadaan tersebut dapat digambarkan sebagai “penjenjangan” DNA tersendiri menjadi kepingan berukuran diskret pada elektroforesis gel agarosa, pola tersebut sering kali dibedakan dengan fragmentasi DNA acak (yang membentuk suatu “apusan” pada gel agarosa), yang secara khas tampak pada sel nekrotik. Seharusnya diperhatikan bahwa penjenjangan juga dapat terlihat pada stadium dini nekrosis. Jadi, walaupun merupakan penanda sangat berguna bagi apoptosis, penjenjangan DNA tidak bersifat diagnostic untuk kematian sel terprogram (Sherwood, 2009).

4. Pengangkatan sel mati. Sel apoptotic dan fragmennya memiliki molekul penanda pada permukaannya, yang mempermudah pengambilan dan pembuangan oleh sel yang berdekatan atau fagosit. Keadaan tersebut terjadi dengan membalikkan

fosfatidilserin dari permukaan sitoplasmik interna dari sel apoptotic ke permukaan ekstrasel. Perubahan tersebut dan perubahan lainnya memungkinkan pengenalan dan fagositosis dini sel apoptotic tanpa pelepasan mediator proinflamasi. Proses sangat efisien sehingga sel mati menghilang tanpa meninggalkan bekas, dan inflamasi tidak terjadi (Sherwood, 2009).

2.3 HSP (Heat Shock Protein)-70

2.3.1 Pengertian umum

HSP-70 adalah komponen utama dari jaringan selular molekul pendamping dan *folding catalyst*. HSP-70 membantu berbagai macam proses *protein folding* dalam sel dengan asosiasi transien dari *substrate binding domain* dengan segmen pendek peptide hidrofobik dalam substrat protein mereka. Selain itu, telah diketahui bahwa HSP-70 juga berperan dalam ketahanan suatu sel yang berada dalam keadaan *stress* dengan menghambat permeabilitas dari membran lisosom (Kirkegaard *et al.*, 2010).

2.3.2 Pembentukan HSP-70

HSP-70 merupakan salah produk transkripsi dari HSF(*Heat Shock Factor*). Ada beberapa bentuk HSF pada manusia, namun yang paling berperan adalah HSF-1. HSF-1 awalnya terdapat di sitoplasma sebagai monomer inaktif. Apabila HSF-1 terkena panas, maka monomer inaktif ini akan menjadi *DNA binding monotrimer* di sitoplasma dan berpindah ke nukleus. Di dalam nukleus, *DNA binding monotrimer* ini akan berikatan dengan HSEs (*Heat Shock Elements*)

dan terjadi reaksi hiperfosforilasi. Pada tahap akhir akan terjadi proses transkripsi aktif yang menghasilkan HSP-70 (Tabuchi dan Kondo, 2013).

2.3.3 HSP-70 dalam Fisiologi dan Sel Patologi

Dua fungsi HSP-70 yang menarik adalah *de novo folding* dari polipeptida baru dan interaksi dengan sinyal transduksi protein. HSP-70 *chaperon* diperkirakan dapat membantu *de novo folding* dari 10-20% dari semua protein bakteri dimana ketergantungan pada HSP-70 untuk mengefisiensikan *folding* yang berkaitan dengan ukuran protein. Karena ukuran protein rata-rata dalam sel eukariotik meningkat (52kDa pada manusia) dibandingkan dengan bakteri (35 kDa di *E. coli*), hal ini diharapkan bahwa persentase protein eukariotik yang lebih besar akan membutuhkan HSP-70 selama *de novo folding* (Muller *et al.*, 2013). Ketergantungan terhadap HSP-70 *chaperon* ini meningkat dalam keadaan *stress* (Singh *et al.*, 2006). Hal yang menarik bahwa protein yang termutasi lebih membutuhkan perhatian lebih oleh HSP-70 *chaperon* daripada *protein wild-type* yang sesuai. Sebagai konsekuensi dari interaksi ini, fungsi protein yang termutasi terpelihara. Dengan demikian fungsi HSP-70 sebagai kapasitor, penyangga mutasi destabilisasi. Mutasi tersebut hanya ditemukan ketika kebutuhan keseluruhan untuk aksi HSP-70 melebihi kapasitas HSP-70 *chaperon*, contohnya pada saat keadaan *stress*, beberapa tahap tertentu atau saat penuaan. Protein termutasi dapat ditarget oleh HSP-70 dan *co-chaperonnya* untuk mendegradasi. Perusakan protein termutasi dapat terakumulasi saat HSP-70 kewalahan dengan lainnya, *stress-denaturated protein*. Kedua mekanisme tersebut dapat berkontribusi dalam proses patologis seperti onkogenesis (p53 mutan) dan penyakit *neurodegenerative*, termasuk *amyotrophic*, *lateral sclerosis* (mutasi

SOD1), *Parkinson* (mutasi α -synuclein), *Huntington's chorea*, dan *spinocerebellar ataxia* (Kazuhiko et al., 2007).

De novo folding tidak terlalu dipengaruhi percepatannya oleh HSP-70 *chaperon*. Dalam beberapa kasus *folding* ditunda dengan beberapa alasan. Yang pertama, *folding* protein tertentu hanya dapat dilakukan setelah sintesis polipeptida selesai seperti yang ditunjukkan. Kedua, protein yang telah terbentuk untuk insersi post-translasional ke membran organela dicegah dari agregasi dan ditranspor ke pori translokasi. Ketiga, dalam proses *caspase-activated DNase* (CAD), protein aktif berbahaya untuk sel dan karena itu *folding* hanya bisa selesai dengan adanya inhibitor spesifik (ICAD). HSP-70 mengikat CAD secara *cotraslasional* dan memediasi *folding* hanya pada keadaan intermediet. *Folding* selesai setelah penambahan ICAD, yang dibentuk dalam kompleks dengan CAD secara HSP-70 dependen (Muller et al., 2013).

Seperti yang disebutkan di atas HSP-70 berinteraksi dengan kunci regulator dari banyak sinyal jalur transduksi mengendalikan homeostasis sel, proliferasi, diferensiasi, dan kematian sel. Interaksi HSP-70 dengan protein regulator ini berlanjut dalam aktivasi siklus yang melibatkan HSP-90 dan beberapa *co-chaperone*. Protein regulator, disebut klien, dengan demikian disimpan dalam keadaan inaktif yang diaktifkan dengan cepat oleh sinyal yang tepat. HSP-70 dan HSP-90 menekan regulator dengan tidak adanya sinyal *upstream* dan menjamin aktivasi penuh setelah sinyal jalur transduksi dinyalakan. HSP-70 dapat dititirasi dari klien ini protein gagal lain yang mungkin timbul dari *stress* eksternal maupun internal. Akibatnya, melalui HSP-70 gangguan sistem selular diinduksi oleh lingkungan, perkembangan, ataupun

proses patologis yang berperan dalam sinyal jalur transduksi (Mayer dan Bukau, 1998).

Dengan cara tersebut respon *stress* dan apoptosis merupakan hal yang saling berhubungan. HSP-70 menghambat apoptosis yang bekerja pada jalur *caspase-independent* pada step tertentu baik *upstream* maupun *downstream* dari aktivasi caspase (Blanchard *et al.*, 2000) dan dalam jalur *caspase-independent* (Luigi *et al.*, 2001). Produksi HSP-70 berlebih menyebabkan peningkatan resistensi terhadap agen penginduksi apoptosis seperti nekrosis tumor *factor-α* (TNF- α), *staurosporin* dan *doxorubicin*, sementara *downregulation* tingkat HSP-70 oleh teknologi anti-sense menyebabkan peningkatan sensitivitas agen-agen ini. Pengamatan ini berhubungan dengan banyak proses patologi, seperti onkogenesis, neurodegenerasi, dan penuaan. Pada sel tumor peningkatan tingkat HSP-70 diamati dan berkorelasi dengan peningkatan keganasan dan resistensi terapi (Maehara *et al.*, 2000). Downregulasi tingkat HSP-70 di sel kanker menginduksi diferensiasi dan kematian sel. Penyakit neurodegeneratif seperti *Alzheimer*, *Parkinson*, *Huntington corea*, dan *ataksia spinocerebellar* ditandai dengan apoptosis berlebihan (Koller *et al.*, 2004). Dalam beberapa system model yang berbeda *overexpression* HSP-70 atau salah satu *co-chaperone* dapat mengatasi gejala neurodegenerative yang disebabkan ekspresi gen yang berhubungan dengan penyakit (*huntingtin*, α -*synuclein* atau *ataxin*). Penuaan pada kultur sel serta penuaan *in vivo* berkorelasi dengan penurunan yang kontinu dalam kemampuan untuk mengatasi *stress*. Gejala dan penyakit terkait usia mencerminkan kemampuan penurunan ini untuk mengatasi *stress* selular. Hal yang menarik, orang-orang dengan umur lebih dari seratus tahun tampaknya tidak sesuai dengan hukum tersebut, karena mereka menunjukkan

induksi yang signifikan dari produksi HSP-70 setelah *heat-shock-challenge* (Singh *et al.*, 2006).

2.4 Zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) merupakan salah satu model yang populer saat ini dalam studi perkembangan embrio. Zebrafish ini memiliki beberapa karakteristik, antara lain (Fleming dan Alderton, 2013) :

- 1 Fekunditas yang tinggi (200 telur / minggu)
- 2 Embryogenesis yang cepat. Rangka secara utuh terbentuk pada 24 jam setelah fertilisasi. Organ dalam (jantung, ginjal, hepar, dan usus) berkembang sempurna pada 96 jam setelah fertilisasi
- 3 Mudah untuk *me-maintain*
- 4 Larva yang transparan
- 5 Mudah dilakukan manipulasi genetik

Tentu ada beberapa keuntungan yang dipertimbangkan sehingga zebrafish kini populer sebagai model penelitian. Keuntungan pertama adalah dari sisi harga. Harga zebrafish ini terbilang murah. Maka dalam penelitian hal ini sangat dipertimbangkan. Kemudian juga dari hal *timeline*. Zebrafish memiliki waktu embryogenesis yang relatif cepat. Tentu waktu juga sangat penting untuk kelancaran suatu penelitian, baik penelitian itu sendiri, maupun penelitian lanjutan berikutnya. Embryogenesis zebrafish yang menyerupai proses pembelahan, gastrulasi, somitogenesis, dan organogenesis pada sel manusia mendukung zebrafish untuk digunakan sebagai model dalam penelitian (Lieschke *et al.*, 2007).

Zebrafish memiliki beberapa tahap perkembangan. Berikut tabel tentang perkembangan zebrafish (Kimmel *et al.*, 1995).

Tabel 2.1 Stadium Perkembangan Zebrafish

Stadium	Waktu (jam)	Perkembangan
Periode zygote	0 - $\frac{3}{4}$	Telur yang baru terfertilisasi
Periode Cleavage	$\frac{3}{4}$ - $2\frac{1}{4}$	Sel membelah menjadi 2, 4, 8, 16, 32, sampai 64 sel.
Periode Blastula	$2\frac{1}{4}$ - $3\frac{1}{4}$	Pembentukan epiboly, yaitu penipisan dari kedua yolk syncitial layer dan blastoderm melewati yolk cell, yang pada akhirnya yolk cell akan terliputi, tahap ini diawali dengan : -terbentuknya kubah -perubahan blastodisk menjadi blastoderm
Periode Grastula	$5\frac{1}{4}$ - 10	-epiboly terbentuk sempurna -terbentuk tail bud -terbentuk primary germ layer dan embryonic axis
Periode Segmentasi	10 - 24	-awal pembentukan neuron -optic primordium dapat diidentifikasi -awal pembentukan ginjal -otic placode, yang merupakan awal pembentukan telinga 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
--	--	---

