

BAB 6

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perbedaan paparan konsentrasi genistein mempengaruhi ekspresi *Bcl-2* pada embrio zebrafish. Famili *Bcl-2* merupakan gen regulator utama dalam apoptosis yang meregulasi tingkat ekspresi gen pro-apoptosis dan anti-apoptosis. Pada penelitian ini, mRNA diisolasi dari seluruh tubuh embrio zebrafish. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa dengan perbedaan pemberian konsentrasi paparan, genistein menyebabkan apoptosis pada otak zebrafish. Genistein dapat bekerja melalui reseptor estrogen dan tanpa melalui reseptor estrogen (Messai, 2009). Penelitian lain juga menyebutkan bahwa perbedaan konsentrasi genistein juga dapat memberikan pengaruh yang berbeda pada reseptor estrogen. Pada konsentrasi 1–10 μM , genistein dibuktikan secara efektif bekerja sebagai agonis reseptor estrogen. Namun, pada konsentrasi genistein yang lebih tinggi yakni $> 10 \mu\text{M}$, genistein justru bertindak sebagai antagonis pada reseptor estrogen (Sun, 2012). Pada penelitian pendahuluan yang telah dilakukan, pemberian paparan genistein 1–2,5 μM tidak menunjukkan adanya defek morfologis. Namun pada konsentrasi genistein 5 μM , mulai terjadi defek morfologis berupa ekor yang bengkok pada embrio zebrafish di 72 hpf.

Pada kelompok genistein 0,1 μM dan 1 μM , tidak terjadi perubahan ekspresi *Bcl-2* yang bermakna ($p > 0,05$). Hal ini menguatkan penelitian sebelumnya dimana setelah dilakukan pengecatan menggunakan metode TUNEL pada konsentrasi genistein 0,1 μM , apoptosis tidak terjadi karena diduga adanya mekanisme protektif dari zebrafish (Messai, 2009).

Kelompok yang dipapar genistein 2,5 μM pada penelitian ini menunjukkan peningkatan ekspresi *Bcl-2* sebesar 2,80 kali lipat dibanding kelompok kontrol. Pada penelitian lain, ekspresi gen *Bax* juga meningkat sebesar 2,59 kali lipat pada kelompok paparan genistein 2,5 μM (Ramadhani, 2015). Hal ini diduga karena adanya apoptosis pada kelompok paparan genistein 2,5 μM merangsang *Mitochondrial Voltage-dependent Anion-selective Channel Protein 2* (VDAC-2). Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa VDAC-2 dapat mendeaktivasi faktor pro-apoptosis seperti *BAK*. Keberadaan VDAC-2 yang tinggi dapat mempertahankan integritas membran mitokondria pada pemberian paparan genistein dengan konsentrasi 1 μM (Sun, 2012).

Dengan konsentrasi genistein yang lebih tinggi (5 μM), ekspresi *Bcl-2* turun menjadi 0,12 kali lipat dibanding kontrol. Hal ini diduga karena tubuh zebrafish sudah tidak mampu melindungi sel dari kerusakan akibat pemberian paparan genistein 5 μM . Namun masih harus dibuktikan dengan pewarnaan akrudin oranye untuk melihat adanya apoptosis pada embrio zebrafish. Perbedaan pemberian konsentrasi paparan genistein juga mempengaruhi ekspresi *Bax* dimana ekspresi *Bax* menurun sebanyak 0,2 kali lipat pada kelompok paparan genistein 5 μM . Hasil perbandingan *Bax/Bcl-2* menunjukkan rasio lebih dari satu. Sehingga diduga apoptosis dapat terjadi pada konsentrasi genistein 5 μM (Ramadhani, 2015).

Apoptosis terjadi karena ketidakseimbangan gen *Bax* dan *Bcl-2*. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa genistein dapat menurunkan ekspresi *Bcl-2* dan meningkatkan ekspresi *Bax*, sehingga apoptosis meningkat pada sel kanker payudara yang diisolasi (Ferenc, 2010). Proses ini diperantarai

oleh gen *p53* yang merupakan gen yang akan aktif bila ada kerusakan DNA dan selanjutnya akan meregulasi ekspresi *Bax* dan *Bcl-2*. Pemberian paparan genistein memicu apoptosis pada sel kanker payudara yang diisolasi dengan mendesensitisasi *p53* setelah pemberian genistein di 72 *hpf* (Sarkar, 2002). Bila *p53* gagal meregulasi, *Bcl-2* akan kehilangan fungsinya untuk mencegah pelepasan sitokrom c dari mitokondria sehingga terjadilah kaskade apoptosis melalui aktivasi kaspase.

Dari hasil penelitian ini, menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh perbedaan pemberian paparan konsentrasi genistein terhadap ekspresi *Bcl-2*. Genistein diduga bekerja pada jalur lain yakni perforin melalui jalur ekstrinsik. Pada jalur ini, perforin mensekresi granul-granul sitoplasma untuk menembus pori mitokondria dan menuju sel target. Komponen terpenting pada jalur ini adalah protease granzim A dan B. Granzim A dapat mengaktifasi kaspase secara independen melalui produk gen yang mencegah pertumbuhan tumor, yakni DNase NM23-H1. Setelah gen supresor tumor itu teraktivasi, apoptosis akan terjadi ditandai dengan degradasi DNA. Berbeda dengan Granzim A, Granzim B akan mengaktifkan prokaspase 10 yang selanjutnya dapat membelah ICAD (*Inhibitor of Caspase Activated DNase*). Sedangkan granzim B memfasilitasi jalur mitokondria untuk memperbanyak sinyal kematian dengan pembelahan *Bid* dan menginduksi pelepasan sitokrom c (Elmore, 2007).

Pada penelitian ini, masih ditemukan keterbatasan waktu dan bahan untuk mengulang *real-time PCR*. Pengulangan sudah dilakukan sebanyak tiga kali, namun hasil pemeriksaan ekspresi *Bcl-2* menunjukkan simpang deviasi yang cukup besar. Sulitnya mengontrol suhu lingkungan yang mudah berubah,

jarak pengambilan sampel dan penyimpanan yang lama, serta penyimpanan sampel yang berpindah-pindah (*freeze-thaw* berulang).

