

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Genistein

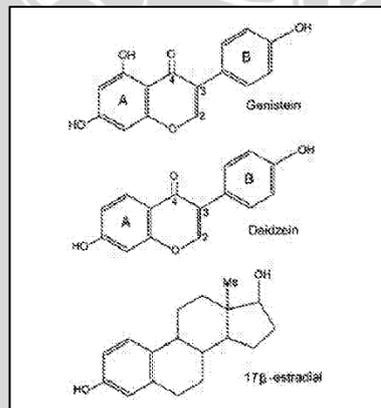
Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) merupakan senyawa isoflavon yang paling sederhana. Isoflavon termasuk ke dalam golongan flavonoid yang memiliki distribusi terbatas dibandingkan dengan flavonoid. Flavonoid banyak ditemukan pada berbagai jenis tanaman, sedangkan isoflavon umumnya hanya terdapat pada kacang-kacangan, seperti kedelai (Ni'mah, 2008). Selama proses pengolahan, baik melalui proses fermentasi maupun non-fermentasi, senyawa isoflavon dapat mengalami transformasi, terutama melalui proses hidrolisis, sehingga dapat diperoleh senyawa isoflavon bebas (aglikon) yang memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan isoflavon dalam bentuk terikat (glikon). Senyawa aglikon tersebut adalah genistein, daidzein, dan glisitein (Pawiroharsono, 1994; Pilsakova, 2010).

Dalam setiap kacang kedelai kering mengandung 1,2-4,2 mg/g isoflavon, konsentrasi ini dipengaruhi oleh faktor tanah, iklim, maturitas tanaman, dan cara pemrosesan tanaman (Pilsakova, 2010). Dixon dan Ferrerai (2002) menyebutkan dalam setiap satu gram konsumsi protein kedelai mengandung sebanyak 150 µg daidzein dan 250 µg genistein. Adlercreutz *et al.* (1993) seperti dikutip Sarkar dan Li (2002: 266) menyebutkan bahwa pada individu dengan diet kaya kedelai, kadar genistein plasma adalah 1-5 µM setelah melalui proses metabolisme dan ekskresi. Konsentrasi genistein dalam tubuh dipengaruhi oleh banyaknya konsumsi diet dari kacang kedelai dan produk olahannya, Adlercreutz *et al.* (1993) seperti dikutip Pilsakova *et al.* (2010) menyebutkan bahwa rata-rata

repository.ub.ac.id

konsentrasi genistein dalam serum pada orang Jepang sebanyak 276 nmol/L, 40 kali lebih banyak dibandingkan dengan sampel dari orang Finlandia.

Genistein dan daidzein juga dikenal merupakan senyawa fitoestrogen karena mempunyai struktur yang mirip dengan estrogen dan juga mempunyai karakteristik diphenolik yang mirip dengan ligannya (Gambar 2.1). Dengan adanya kemiripan struktur dengan estrogen, genistein dan daidzein dapat berikatan dengan reseptor estrogen (ER) yang terletak pada membrane nukleus. Genistein sebagai fitoestrogen berkompetisi dengan 17β -estradiol untuk berikatan dengan ER, dan selanjutnya bekerja pada jalur yang diperantarai estrogen dan androgen. Peran genistein dalam bidang kesehatan termasuk diantaranya mencegah penyakit kardiovaskular, mengatasi gejala post-menopause, bersifat osteoprotektif pada wanita post-menopause, dan juga bertindak sebagai agen kemopreventif pada kanker payudara dan prostat (Dixon dan Ferrerai, 2002).



Gambar 2.1 Struktur molekular genistein

Keterangan: Struktur dasar isoflavone adalah inti flavon yang terdiri dari 2 cincin benzene (A dan B) yang dihubungkan dengan cincin heterosiklik pyran C. Terdapat kemiripan struktur antara senyawa isoflavon genistein dan daidzein dengan estrogen sehingga keduanya dapat berikatan dengan reseptor estrogen, dan memiliki efek estrogen agonis yaitu menginduksi proliferasi sel maupun efek estrogen antagonis yaitu mencegah pertumbuhan sel kanker yang tergantung estrogen (Sarkar dan Li, 2002)

Efek sebagai fitoestrogen bergantung kepada level dari estradiol endogen. Genistein sebagai fitoestrogen berkompetisi dengan estradiol untuk berikatan pada ER. Sehingga, pada keadaan dimana kadar estrogen endogen tinggi, genisten akan menempati beberapa reseptor saja dan bersifat menghambat aktivitas estrogen. Di sisi lain, pada keadaan dimana kadar estrogen endogen rendah, genistein dapat memperbaiki aktivitas estrogen (Pilsakova, 2010).

Dalam penelitian lain yang dilakukan oleh Sassi-messai *et al.* (2009) terbukti bahwa genistein dapat memberikan efek apoptosis pada tahap perkembangan awal zebrafish melalui dua jalur, yaitu jalur yang tidak tergantung dengan reseptor estrogen dan jalur tergantung reseptor estrogen. Hasil pada penelitian tersebut menitikberatkan bahwa genistein memiliki multiaksi dalam sifatnya sebagai fitoestrogen.

Selain melalui aktivitas estrogenik, mekanisme kemopreventif oleh genistein juga dilakukan dengan menghambat protein tirosin kinase (PTK) dan DNA topoisomerase, menghambat aktivasi faktor transkripsi nuklear Nf- κ B dan Akt, dan menghambat aktivitas dalam siklus sel, yang kesemuanya berperan dalam terjadinya apoptosis atau kematian sel terprogram. Genistein juga diketahui menghambat angiogenesis dengan menghambat sinyal TGF- β , dan menghambat metastasis dengan menghambat matriks metaloprotein (MMP) (Sarkar dan Li, 2002).

Genistein dapat menimbulkan apoptosis pada sel tergantung konsentrasi, waktu paparan, durasi, dan jaringannya. Leung dan Wang (2000) membuktikan bahwa pemaparan genistein pada sel kanker payudara MCF-7 pada konsentrasi $\leq 25 \mu\text{M}$ tidak menimbulkan kematian sel yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Pada embrio zebrafish, pemaparan genistein dengan konsentrasi $10 \mu\text{M}$

menyebabkan mortalitas sampai 96,3% pada 120 hpf dan seluruh embrio mengalami defek morfologi (Aurora, 2012).

Li *et al.* (2005) dalam penelitiannya, membuktikan bahwa pemberian genistein *in vitro* pada sel kanker sebelum kemoterapi dapat memperbaiki resistensi terhadap kemoterapi dan tidak memberikan toksisitas sistemik ke sel normal. Dalam penelitian lain, Chan *et al.* (2007) membuktikan bahwa pemberian genistein pada *blastocyst* tikus bersifat teratogenik karena dapat berefek apoptosis dan jumlah sel total menurun.

Penelitian yang dilakukan oleh Balakrishnan *et al.* (2010), yang dilakukan secara *ex vivo* pada plasenta manusia, menunjukkan bahwa genistein dapat melalui jalur transplasental pada konsentrasi rendah. Selain itu, genistein yang memiliki kemiripan struktur dengan 17β -estradiol dapat berefek merusak atau pun menguntungkan tergantung pada dosis, jaringan, dan paparannya. Efek merusak dari genistein, seperti contohnya tumorigenesis, tampak lebih jelas saat fetus diberikan genistein secara *in utero*. Sementara efek menguntungkan mencegah tumor dari genistein tampak jika paparan diberikan post-natal sebelum pubertas (Balakrishnan *et al.*, 2010).

Sementara Xing *et al.* (2010), membuktikan bahwa bisphenol A dan genistein secara sinergis berpotensi menyebabkan efek teratogenik pada kultur embrio tikus. Penelitian yang dilakukan oleh Xing *et al.* (2010) menyarankan agar wanita hamil menghindari konsumsi suplemen kedelai, namun perlu penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan rekomendasi yang tepat.

2.2 Bcl-2

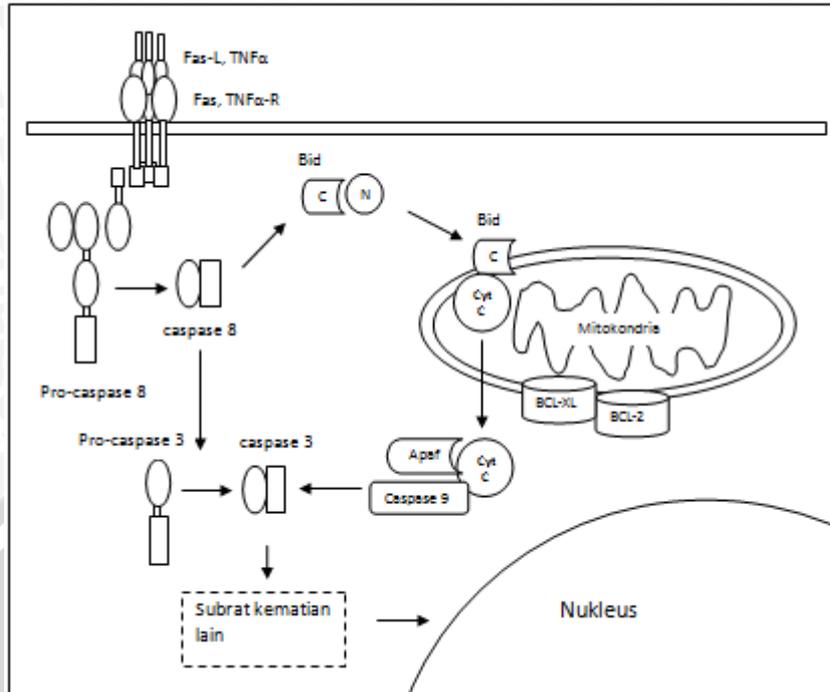
Keluarga protein B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) merupakan kelas protein yang berperan dalam regulasi apoptosis pada sel. Anggota dari protein Bcl-2 dibagi menjadi protein anti-apoptosis dan pro-apoptosis, termasuk diantaranya yang merupakan protein anti-apoptosis adalah Bcl-2 dan Bcl-xL, sementara yang merupakan pro-apoptosis adalah Bax, Bak, Bid, Bcl-xS dan Bad (Ruggiero, 2011; Leung dan Wang, 2000). Karakteristik dari keluarga protein Bcl-2 ialah kemampuannya untuk membentuk homo- dan heterodimer antara protein anti-apoptosis dengan pro-apoptosis yang saling berkompetisi sehingga dapat saling menetralkan. Rasio dari kedua subset protein anti-apoptosis dengan pro-apoptosis itu lah yang menentukan terjadinya apoptosis pada sel (Gross *et al.*, 1999; Abdelkader, 2012).

Gen *Bcl-2* mengkode protein anti apoptosis Bcl-2 (Viatour, 2003). Bcl-2 merupakan protein dengan massa molekuler relatif sebesar 26.000 dan mempunyai rantai terminal-karboksil hidrofobik seperti pada semua membrane pada sel (Ruggiero, 2001; Gross *et al.*, 1999). Dalam kelompok anti-apoptosis, gen *Bcl-2* merupakan yang paling utama. Sedangkan dalam kelompok pro-apoptosis gen *Bax* yang paling utama (Demendi *et al.*, 2011). Gen *Bcl-2* pertama kali ditemukan pada translokasi gen $t(14;18)$ pada pasien dengan limfoma non-Hodgkin's. Berbagai bukti menunjukkan bahwa regulasi gen yang mengkode baik protein anti-apoptosis maupun pro-apoptosis dari keluarga *Bcl-2* mengalami perubahan pada penyakit kanker. Pada translokasi $t(14;18)$ tersebut, gen *Bcl-2* dari kromosom 18 bergabung dengan lokus immunoglobulin rantai berat dari kromosom 14, menyebabkan letak gen *Bcl-2* yang berdekatan dapat dikontrol juga oleh pengatur immunoglobulin rantai berat dan mengalami disregulasi ekspresi *Bcl-2* pada level transkripsional. Regulasi dari gen *Bcl-2* diduga

merupakan mekanisme yang terjadi pada level transkripsional, translasional, dan post-translasi. Studi tentang dasar molekuler dari gen *Bcl-2* masih terus berkembang sampai saat ini (Reed dan Yip, 2008; Ruggiero, 2011).

Fungsi utama protein *Bcl-2* ialah mendorong kelangsungan hidup sel dengan menghambat proses apoptosis (kematian sel terprogram) melalui jalur mitokondrial, sehingga dapat menjadi kunci dalam menghambat penyebaran sel neoplasma dalam pengobatan anti-kanker. Protein *Bcl-2* mempunyai dua fungsi, yaitu sebagai kanal ion atau protein dan sebagai adaptor protein pada membran. Fungsi sebagai kanal dapat dilakukan karena struktur tiga dimensi dari beberapa keluarga protein *Bcl-2* yang mempunyai kesamaan dengan toksin bakteri yang dapat membuat pori-pori pembentuk kanal yang memungkinkan transpor ion atau protein (Gambar 2.2). Fungsi lain dari protein *Bcl-2* dan homolog anti-apoptosisnya sebagai adaptor diperantarai oleh interaksi dengan sinyal transduksi dari protein (Gross, 1999; Reed dan Yip, 2008; Ruggiero, 2011).

Bcl-2 dan homolognya berlokasi di beberapa membran intraseluler, yaitu membran luar mitokondria, retikulum endoplasma, dan selubung nukleus. Kemampuan untuk membentuk kanal diperantarai oleh masuknya dua rantai hidrofobik heliks dari *Bcl-2* ke dalam membran fosfolipid bilayer. Kanal yang dibentuk oleh *Bcl-2* dapat berperan mencegah apoptosis, diduga melalui mekanisme transportasi balik ataupun sebagai antagonis dari molekul pro-apoptosis yang dibentuk dari keluarga protein *Bcl-2* lain (Ruggiero, 2011).



Gambar 2.2 Jalur apoptosis yang melibatkan *Bcl-2* melalui kanal ion

Keterangan : Mekanisme jalur apoptosis diawali dengan aktivasi reseptor TNF α atau Fas di permukaan sel akan memicu terjadinya aktivasi caspase 8. Selanjutnya, terdapat dua jalur yang ditempuh oleh caspase 8 untuk mengaktifkan caspase 3. Jalur pertama, caspase 8 memisahkan rantai karboksil terminal pada *Bid* di sitosol, fragmen *Bid* tersebut mengalami translokasi ke mitokondria untuk melepaskan sitokrom c. Sitokrom c yang lepas akan mengaktifkan Apaf-1 bersama caspase 9, dan selanjutnya mengaktifkan caspase 3. Pada jalur yang lain, caspase 8 secara langsung mempengaruhi aktivasi caspase 3. Setelah menjadi enzim matur, caspase 3 akan mengeluarkan protein yang akan mendegradasi DNA kromosom pada nucleus. *Bcl-2* atau *Bcl-xL* sebagai anti apoptosis menghambat pelepasan sitokrom C dengan mekanisme yang masih belum dipahami (Nagata, 2011; Gross, 1999).

Selain melalui pembentukan kanal, protein *Bcl-2* dapat melakukan interaksi terhadap sinyal transduksi dari protein-protein, diantaranya adalah homolog protein kinase Raf-1, protein G H-Ras dan R-Ras, protein pengikat p53-BP2, protein pro-apoptosis CED-4, dan protein fosfatase kalsineurin. Hubungan antara protein *Bcl-2* dengan kesemua protein tersebut menyebabkan apoptosis dengan cara sekuesterasi dan inaktivasi protein pro-apoptosis, juga dengan pengalihan target berikatannya protein tersebut ke membran seluler yang lain (Ruggiero, 2011).

2.3 Apoptosis

Kata apoptosis berasal dari turunan bahasa Yunani yaitu *apo-* yang berarti lepas, dari, dan menjauh, dan kata *ptosis* yang berarti jatuh atau prolapsus. Dalam bahasa Yunani, kata apoptosis dipakai untuk mendefinisikan 'jatuh' atau 'gugur' seperti jatuhnya kelopak dari bunga atau daun dari pohon (Pearce, 2008)

Apoptosis berarti kematian sel yang dipicu baik oleh sinyal ekstraseluler atau pun kejadian genetik yang menentukan dan dapat terjadi melalui proses fisiologis dalam sebuah sel. Kematian sel merupakan konsep penting dalam ilmu biologi dan kedokteran, juga merupakan karakteristik dari berbagai penyakit. Kematian sel dapat melalui dua mekanisme, apoptosis atau nekrosis. Apoptosis membutuhkan energi dan dapat diregulasi oleh sel itu sendiri, sedangkan nekrosis merupakan kematian sel pasif yang terjadi karena faktor luar, biasanya karena suplai darah yang kurang (Soini, 2007). Perbedaan antara apoptosis dan nekrosis dijabarkan dalam tabel 2.1.

Tabel 2.1 Perbedaan tingkat seluler antara apoptosis dan nekrosis

	Apoptosis	Nekrosis
DNA	Pembelahan internukleusomal	Degradasi
Nukleus	Marginasi kromatin	Piknosis
Integritas membran	Tetap	Berubah sejak awal
Inflamasi	Tidak ada	Ada
Pola	Mengenai sel secara individual	Mengenai beberapa sel dan membentuk fokus
Volume sel	Berkurang	Bertambah di awal
Fragmentasi sel	Membentuk badan apoptotis	Tidak ada, lisis

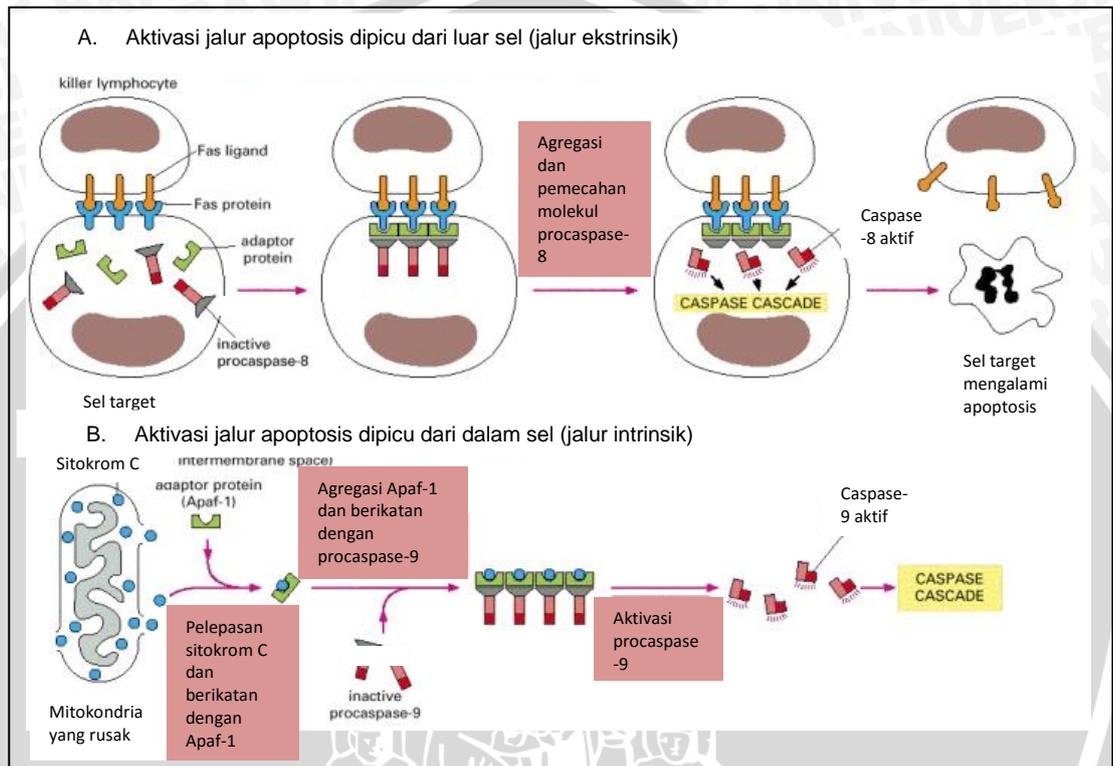
Keterangan : diambil dari Pearce (2008)

Secara fisiologis, apoptosis merupakan kematian sel terprogram yang merupakan suatu bentuk kematian sel untuk menjaga keseimbangan perkembangan sel-sel tubuh, dimana terjadi resorpsi sel tanpa kerusakan berat pada mekanisme selular. Pada keadaan fisiologis, apoptosis hanya terjadi pada beberapa sel dalam jumlah kecil dan selektif. Pada proses inflamasi, apoptosis berfungsi mengendalikan “kelebihan” sel inflamasi, membatasi kerusakan jaringan, dan meredakan proses inflamasi (Hidayat, 2011).

Melalui apoptosis, setiap organisme dapat mengatur jumlah sel pada jaringan dengan membuang sel yang tidak diinginkan tanpa melukai jaringan di sekitarnya. Pada manusia, proses apoptosis merupakan proses fisiologis dan apoptosis disebut sebagai ‘pemahat’ karena melalui apoptosislah terbentuk penampakan dari organisme. Salah satu contohnya, apoptosis berperan dalam pembentukan jari dalam perkembangan embrio, membuang sel-sel yang berlebihan sehingga terbentuk celah diantara jari-jari manusia. Apoptosis juga berperan dalam perkembangan sistem imun manusia. Di timus, sel leukosit matur yang tidak dapat membedakan molekul asing akan mengalami apoptosis. Peningkatan atau penurunan apoptosis dapat menyebabkan penyakit. Sebagai contoh, pada beberapa kasus limfoma terjadi penurunan apoptosis dan overproduksi dari protein yang menyebabkan kelangsungan hidup sel memanjang.

Apoptosis terjadi karena adanya rangkaian aktifitas dari caspase. Dalam sel, caspase merupakan protease yang secara normal ada dalam bentuk yang belum aktif, yaitu pro-caspase. Saat teraktifasi, caspase akan memecah dan mengaktifkan pro-caspase yang lainnya sampai pada akhirnya memecah dan mengaktifkan protein lain yang menjadi kunci terjadinya kematian sel, seperti contohnya *nuclear lamins* dan protein yang bertanggungjawab menjaga

keseimbangan DNase. Aktivasi rangkaian caspase ini terjadi melalui dua jalur, yang dapat terjadi dengan adanya faktor pemicu dari luar sel (jalur ekstrinsik) dan dapat juga terjadi dengan adanya faktor pemicu dari dalam sel (jalur intrinsik) (Alberts *et al.* 2002).



Gambar 2.3 Induksi apoptosis melalui stimulus ekstraselular ataupun intraselular

Keterangan : (A) aktivasi procaspase dapat dipicu dari luar sel melalui aktivasi reseptor kematian seperti Fas. (B) Saat sel rusak atau terdapat stress dari luar, kematian sel dapat terjadi dari dalam sel sendiri melalui jalur mitokondria yang melepaskan sitokrom C sehingga menyebabkan agregasi procaspase dan mengaktifkan caspase. Sumber didapat dari Alberts *et al.* (2002).

Apoptosis dapat diinduksi oleh beberapa faktor, termasuk diantaranya radiasi, panas, obat-obatan kimia, dan senyawa toksik yang dapat menyebabkan alterasi genetik. Apoptosis juga dapat diinduksi atau dihambat oleh aktivasi reseptor di permukaan sel. Beberapa sel memiliki reseptor yang merupakan tempat berikatan bagi ligan molekuler yang dapat mengaktifkan apoptosis. Di

dalam sel, terdapat dua protein yang berfungsi meregulasi apoptosis, yakni caspase dan keluarga protein *Bcl-2* (Gambar 2.2). Keseimbangan yang terbentuk antara keluarga protein *Bcl-2* yang menentukan apakah sel akan tetap hidup atau mati (Soini, 2007). Apoptosis juga dapat diinduksi karena kekurangan beberapa faktor, seperti contohnya pada pembentukan sel myeloid tergantung IL-3 (Nagata, 2001).

Sel yang mengalami apoptosis dapat terdeteksi melalui fluoresensi dari pengecatan Hoechst atau DAPI dari nukleus yang mengalami kondensasi. Sel yang mengalami apoptosis akan membuat phosphatidyl-serrine terekspos ke permukaan sel dan dapat diberi fluoresensi dengan label annexin V. Sedangkan, DNA yang mengalami fragmentasi dapat terdeteksi dengan melakukan prosedur TUNEL atau melakukan elektroforesis pada gel agarose dari DNA yang sudah terisolasi (Nagata, 2001).

2.4 Zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) adalah vertebrata yang termasuk famili Cyprinidae. Zebrafish merupakan spesies air tawar yang kecil dan dapat dibiakkan dalam akuarium. Pada akhir tahun 1970-an peneliti dari Universitas Oregon, George Streisinger, telah menggunakan zebrafish sebagai model hewan coba pada penelitian tentang perkembangan awal vertebrata. Sejak saat itu, penggunaan zebrafish sebagai hewan coba mulai banyak dipakai oleh peneliti dalam bidang embriogenesis (Hang, 2007).

Spesies ini sangat mudah untuk didapat dan dibiakkan, rata-rata ikan zebrafish betina dapat memproduksi ratusan telur setiap minggu. Selain itu juga memiliki sifat sangat sensitif terhadap perubahan dan dapat dipelihara dalam lingkungan yang berbeda. Selain itu, zebrafish mengalami fertilisasi eksternal,

sehingga embrio zebrafish mudah untuk diamati dan diberi perlakuan pada tahap perkembangan apapun (Abdelkader, 2013; Lu dan DeSmidt, 2013).

Zebrafish juga sering digunakan dalam penelitian karena mudah untuk dilakukan manipulasi genetik dan memiliki kekerabatan yang dekat dengan vertebrata yang lebih tinggi dibandingkan dengan model hewan lain seperti contohnya *Xenopus*. Sekuensi *genome* zebrafish yang telah dilakukan membuktikan bahwa manusia juga memiliki gen yang terdapat pada zebrafish. Maka dari itu, zebrafish banyak digunakan sebagai model dalam penelitian yang terkait dengan penyakit manusia. (Hang, 2007; Lu dan DeSmidt, 2013). Penggunaan zebrafish sebagai hewan coba pada penelitian manusia dirangkum dalam tabel 2.2.

Tabel 2.2 Perbandingan zebrafish dengan manusia sebagai hewan coba

Karakteristik	Persamaan dengan manusia	Perbedaan dan hal yang belum diketahui
Biologi Umum		
Struktur Genom	Diploid; mengandung gen yang esensial pada vertebrata secara lengkap	Duplikasi gen berasal dari duplikasi genom keseluruhan terdahulu, sehingga terdapat subfungsionalisasi dan neofungsionalisasi
Anatomi	Kerangka tubuh vertebrata	Adaptasi akuatik termasuk bentuk tubuh yang ramping dan strategi alat gerak yang berbeda
Diet dan metabolisme	Omnivora	Poikilotermis, pertumbuhan optimal pada suhu 28,5°C
Pertumbuhan	Pertumbuhan terbatas sampai ukuran hewan dewasa maksimal; mempunyai pola pertumbuhan saltatorik (contohnya regenerasi sirip)	Kapasitas regenerasi pada berbagai jaringan dan organ (jantung, sirip, retina)
Lama hidup	Fase remaja dan dewasa merupakan saat maturitas organ reproduksi; bukti adanya perubahan fisiologis yang tergantung usia (contohnya pada fungsi kognitif)	Lama hidup 3-5 tahun, masa generasi selama 3 bulan
Biologi Sistematis		
Embriologis	Tahap dan proses pembelahan, pola awal, gastrulas, somitogenesis, organogenesis tampak	Sangat cepat; non-plasenta, terjadi <i>ex-vivo</i> ; dipengaruhi oleh transkripsi maternal; terdapat periode penetasan
Sistem Rangka	Kompleks kerangka terdiri dari tulang dan tulang rawan	Tidak mempunyai tulang panjang, tulang kanselus,

		sumsum tulang; sendi tidak menahan berat badan
Otot	Kesamaan otot aksial dan apendikularis; tipe sel otot lurik, jantung, polos; serat otot lurik cepat dan lambat	Otot denyut cepat dan lambat terpisah secara topografis, lokomotor yang diatur ekor tergantung dari kontraksi otot myotomal, gelendong otot apendikular kecil
Sistem Saraf dan Perilaku	Anatomi merepresentasikan otak depan, otak tengah, dan otak belakang, termasuk diencephalon, telencephalon, dan serebelum; sistem saraf perifer terdiri dari komponen sensoris dan motoris; sistem saraf enterik dan otonom; organ sensorik terspesialisasi (mata, sistem olfaktori, telinga); memiliki perilaku hewan tangka tinggi dan fungsi neural yang terintegrasi (memori, respon dan perilaku sosial seperti hidup berkelompok)	Telencephalon hanya terdiri dari korteks primitif; organ sensori spesifik untuk ikan (seperti garis lateral); perilaku ikan dan fungsi kognitif masih abstrak dan sederhana jika dibandingkan dengan manusia
Hematopoietik dan Limfoid/ sistem imun	Tipe sel hematopoietic bermacam-macam (eritrosit, netrofil, eosinophil, monosit, makrofag, limfosit T, dan limfosit B); rangkaian proses pembekuan darah untuk fungsi hemostasis; kemampuan kekebalan bawaan dan adaptif secara humoral maupun seluler	Eritrosit memiliki inti sel; jumlah trombosit lebih banyak dari platelet; lokasi hematopoiesis terletak di interstisial ginjal; regulasi kekebalan humoral dan proses hematopoiesis belum diketahui; mungkin memiliki evolusi sistem kekebalan spesifik untuk ikan (seperti contohnya reseptor tertentu)
Sistem Kardiovaskular	Jantung memiliki beberapa ruangan dengan atrium dan ventrikel; sirkulasi melalui arteri dan vena; sirkulasi limfatik terpisah	Anatomi jantung memiliki perbedaan bagian kanan dan kiri, namun sistem sirkulasi tidak; jantung hanya terdiri dari 2 ruang; tidak terbukti adanya pembentukan jantung sekunder; belum diketahui memiliki nodus limfatik
Sistem Respirasi	Pertukaran gas secara seluler; oksigenasi tergantung dari sirkulasi dan kemampuan angkut hemoglobin	Respirasi menggunakan insang; tidak terdapat sirkulasi pulmoner; memiliki kantung udara yang berasal dari endoderm (berfungsi untuk mengapung); kantung udara secara embriologis berhubungan dengan paru-paru namun tidak berfungsi seperti paru-paru
Sistem Gastrointestinal	Organ utama terdiri dari hati, pankreas endokrin dan eksokrin, dan kantung empedu; saluran pencernaan memiliki spesialisasi masing-masing untuk absorpsi; terdapat sel imunitas di lamina propria	Tidak memiliki organ pencernaan yang bersifat asam; memiliki pembesaran usus namun tidak memiliki lambung; tidak memiliki sel Paneth usus
Sistem Ginjal dan Kandung Kemih	Anatomi dan fungsi glomerulus	Filtrasi terjadi di bagian anterior dan posterior ginjal; ginjal dewasa berasal dari mesonefros bukan metanefros;



Sistem Reproduksi	Perkembangan molekuler dan embriologis sel nutfah; anatomi seluler pada organ testis dan ovarium	tidak terdapat kandung kemih dan kelenjar prostat Tidak memiliki kromosom seks; mekanisme penentuan jenis kelamin tidak diketahui; fertilisasi terjadi secara <i>ex vivo</i> (tidak memiliki uterus atau organ reproduksi wanita lain); oosit dikelilingi oleh korion yang harus ditembus oleh sperma, bukan zona pelusida; tidak menyusui; tidak memiliki payudara
Sistem Endokrin	Hampir seluruh sistem endokrin dimiliki yaitu aksis hipotalamus dan hipofisis (glukokortikoid, hormone pertumbuhan, hormon tiroid, prolactin), hormon paratiroid, insulin, dan renin	Perbedaan distribusi anatomi kelenjar, yaitu pemisahan kelenjar paratiroid tidak tampak dan prolaktin berfungsi mengatur osmoregulasi
Kulit dan struktur permukaan	Turunan dari ektoderm; pola pigmentasi diatur dari sel pigmen melanosit yang berasal dari krista saraf	Memiliki struktur yang khusus pada ikan seperti sisik dan sel lendir; tidak memiliki folikel rambut dan kelenjar keringat seperti mamalia; memiliki dua pigmen tambahan yaitu xanthofor dan iridofor

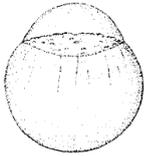
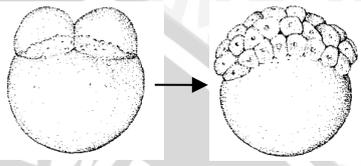
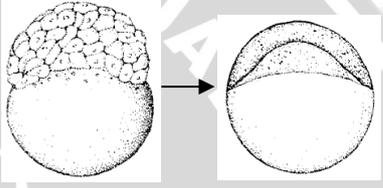
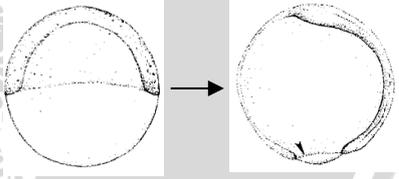
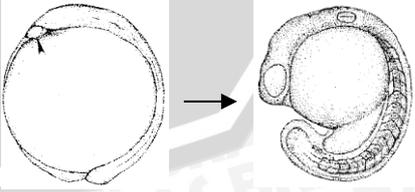
Keterangan : Diambil dari Lieschke dan Currie (2007)

2.4.1 Embriogenesis Zebrafish

Embrio zebrafish memiliki ukuran yang besar (diameter ~600 µm saat fase 1 sel) dan transparan, sehingga dapat dilihat dengan mata telanjang (Hang, 2007). Embriogenesis pada zebrafish dimulai sejak fertilisasi hingga terjadi penetasan menjadi larva, yang keseluruhan prosesnya terjadi dalam 72 jam atau 3 hari. Setelah itu embrio zebrafish akan menjadi larva yang sudah dapat berenang dan memiliki organ yang sudah berfungsi. Tahapan dalam perkembangan embrio zebrafish dibagi menjadi 7 tahap, yaitu zigot, pembelahan, blastula, gastrula, segmentasi, faringula, penetasan (Tabel 2.2). Penetapan tahapan ini didasarkan dari perubahan morfologi yang terjadi selama perkembangan embrio zebrafish, dan menitikberatkan pada jumlah sel atau jumlah somit yang terbentuk (Kimmel *et al.*, 1995; Hang, 2007).



Tabel 2.3 Tahap perkembangan awal zebrafish

Periode	Waktu (jam)	Deskripsi	Gambar
Zigot	0 - ¾	<ul style="list-style-type: none"> Telur yang baru difertilisasi 	
Pembelahan	¾ - 2¼	<ul style="list-style-type: none"> Sel membelah menjadi 2, 4, 8, 16, 32, sampai 64 sel secara cepat dan sinkron membentuk blastomer. 	
Blastula	2¼ - 5¼	<ul style="list-style-type: none"> Memasuki tahap <i>Mid Blastula Transition (MBT)</i> Mulai pembentukan <i>enveloping layer (EVL)</i>, <i>yolk syncytial layer (YSL)</i> dan <i>deep cell (DC)</i>. Pada akhir tahap blastula <i>epiboly</i> sampai 50 % 	
Gastrula	5¼ - 10	<ul style="list-style-type: none"> <i>Epiboly</i> terbentuk sempurna Terbentuk bakal ekor Terbentuk <i>primary germ layer</i> dan <i>embryonic axis</i> 	
Segmentasi	10-24	<ul style="list-style-type: none"> Pembentukan somit, <i>pharyngeal arch primordia</i>, dan neuromer Organogenesis primer Pergerakan awal Ekor tampak 	

Faringula	24-48	<p>Axis tubuh dari lengkung menjadi lurus</p> <p>Pembentukan system sirkulasi, jantung mulai berdenyut, mulai ada aliran darah</p> <p>Terjadi pigmentasi</p> <p>Sirip mulai terbentuk</p> <p>Kepala memendek dan mulai lurus</p> <p>Muncul sensitifitas terhadap rangsang taktil</p>	
Penetasan	48-72	<p>Perkembangan mulai melambat</p> <p>Morfogenesis hampir sempurna</p> <p>Penetasan secara spontan</p>	
Larva awal	>72	<p>Disebut sebagai larva</p> <p>Mulai berenang aktif</p> <p>Mulai mencari makan dan perilaku menghindar</p>	

Keterangan : Perkembangan embrio zebrafish dimulai sejak fertilisasi hingga menetas dari telur dan menjadi larva. Proses embriogenesis terjadi sejak 0-72 jam setelah fertilisasi (Kimmel *et al.*, 1995).

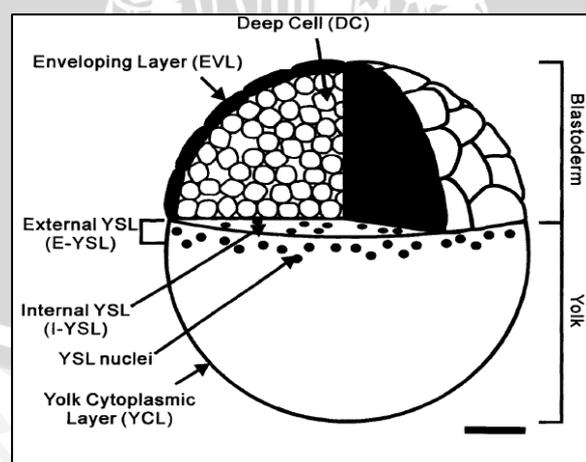
Tahapan perkembangan embrio zebrafish dimulai setelah telur mengalami fertilisasi, dan segera mengalami pembelahan sel atau *cleavage*. Pada tahap pembelahan sel zebrafish, pembelahan terjadi secara *meroblastic*, yaitu bidang pembelahan tidak bertambah panjang. Sel yang membelah (Blastomer) dihubungkan satu sama lain oleh jembatan sitoplasma, yang juga menghubungkan dengan *yolk cell* yang belum membelah dibawahnya (Kimmel



dan Law, 1985; Kimmel *et.al*, 1995; Hang, 2007). Pembelahan sel sampai dengan siklus ke 9 terjadi setiap 15 menit sekali secara metasinkron. Pada siklus pembelahan ke-6 bidang pembelahan sel masih sama, namun mulai siklus pembelahan ke-7 bidang pembelahan sel sudah tidak dapat ditentukan lagi dan mengawali periode Blastula (Kimmel *et. al*, 1995; Hang, 2007).

Periode blastula terjadi pada siklus pembelahan sel ke 8 sampai 14, dimana jumlah sel terdapat 128 dan membelah sampai 8000 sel. Periode ini terjadi pada waktu 2,25 *hpf* sampai dengan 5,25 *hpf* dan berhenti saat sudah terbentuk 50% epiboli (Hang, 2007). Periode ini terdapat beberapa tahapan kunci dalam perkembangan embrio, yaitu *Mid Blastula Transition (MBT)*, sehingga dapat disebut sebagai tahap spesifikasi regional. Pada tahap ini terjadi pembentukan *Enveloping Layer (EVL)* pada 2,5 *hpf*, *Yolk Syncitial Layer (YSL)* pada 2,75 *hpf*, dan *Deep Cells (DC)* (Kane dan Warga, 2004; Kane dan Kimmel, 1993).

Pembentukan EVL (Gambar 2.3) terjadi karena bagian blastoderm yang paling luar mengalami penipisan dan berikatan dengan erat, sehingga melapisi embrio dan membentuk struktur yang mirip dengan epitel, berfungsi sebagai proteksi bagi embrio sebelum terbentuk epitel yang sebenarnya (Hang, 2007).



Gambar 2.4 Anatomi embrio zebrafish pada periode *Mid Blastula Transition* (~1.000.000 sel pada 3 *hpf*)

Keterangan : Gambar diambil dari Hang (2007)

Pada akhir tahap blastula *epiboly* akan terbentuk dari YSL dan *blastodisc* yang mengalami penipisan dan akan melingkupi seluruh yolk sel. Proses pembentukan *epiboly* terus berlanjut sampai masa gastrulasi. Tahap perkembangan awal zebrafish memiliki beberapa kemiripan dengan pembentukan organ pada manusia (Tabel 2.4).

Tabel 2.4 Perbandingan Embriogenesis Zebrafish dengan Manusia

Zebrafish		Manusia	
Deskripsi	Periode Waktu	Deskripsi	Periode Waktu
1 sel	0 hpf	1 sel	0 hpf
2 sel	$\frac{3}{4}$ hpf	2 sel	30 hpf
4 sel	1 hpf	4 sel	40 hpf
16 sel	1 $\frac{1}{2}$ hpf	16 sel	3 s.d 4 hari, menjadi morula
Blastula	2 $\frac{1}{4}$ hpf s.d 4 $\frac{2}{3}$ hpf: tidak terbentuk blastokel, terjadi pembentukan YSL dan MBT. Pembentukan <i>epiboly</i> terus berlangsung dan terlihat kutub hewan dan kutub vegetal.	Blastokista	4 s.d 5 hari: tampak ada blastokel, terjadi implantasi ke endometrium, terbentuk masa sel dalam dan masa sel luar. Pada 8-14 hari terjadi diferensiasi embrioblas dan trofoblas, terbentuk rongga amnion, <i>yolk sac</i> primitif, mulai terbentuk rongga korion awal sirkulasi utero-plasenta
Gastrula	5 $\frac{1}{4}$ hpf s.d 10 hpf: <i>epiboly</i> terbentuk sempurna, epibas dan hipoblas mulai tampak, alur midsagittal (<i>midsagittal groove</i>) terbentuk, bakal otak dan tunas ekor menebal	Gastrulasi	15 s.d 21 hari: terbentuk <i>primitive streak</i> dan dimulainya diferensiasi tiga lapisan germinativum; endoderm, mesoderm, ektoderm secara seflokaudal, terjadi neurulasi
Segmentasi	10 $\frac{1}{3}$ hpf s.d 22 hpf: pembentukan somit 1-26, terbentuk vesikula optika, lensa mata, otak, duktus pronefros, vesikel otik, otot, ekor terbentang	Minggu ke-3 s.d ke-8	20 s.d 28 hari, pembentukan somit 1-35, dan dimulainya periode organogenesis, terjadi penyatuan lipatan saraf, tabung jantung mulai melipat, lempeng telinga, tunas ekstremitas munul, terbentuk vesikula optika dan lempeng lensa

		mata, terbentuk jari, ekor lenyap, dan wajah makin mirip dengan manusia
Faringula	24 hpf s.d 42 hpf, jantung mulai berdetak, refleks sentuhan timbul, pembentukan sirkulasi darah, pembentukan sirip, motilitas tampak, pigmentasi retina, ekor, dan tubuh ventral, pembentukan ruangan jantung, pementukan tulang mandibula dan tulang hyoid, pembentukan usus <i>foregut</i> , silia olfaktori terbentuk	
Penetasan	48 hpf s.d 72 hpf, sirip dan ekor terbentuk sempurna, warna kepala kekuningan, silia olfaktori berdenyut, motilitas tinggi, terbentuk iridofor pada retina, mulut kecil dan terbuka, insang tampak pada arkus brakialis	

Keterangan : Diambil dari Kimmel et al. (1995) dan Langman J (2003)

