

BAB 6

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan pengamatan motorik embrio *zebrafish* (*Danio rerio*) setelah pemaparan larutan genistein dan ICI 182 780 untuk melihat pengaruh reseptor estrogen terhadap respon taktil embrio. Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorik pada hewan coba embrio *zebrafish* sejumlah 50 ekor pada setiap perlakuan dosis dengan tiga kali pengulangan pada masing – masing dosis. Variasi dosis genistein yang diberikan pada penelitian pendahuluan sebesar 2,5 μ M, 5 μ M dan 10 μ M. Pada kontrol digunakan DMSO 0,05% 20mM yang digunakan sebagai pelarut genistein terbesar. Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mendapatkan dosis genistein dengan signifikansi terbesar terhadap kelompok kontrol.

Dari hasil penelitian pendahuluan didapatkan penurunan respon taktil secara signifikan pada kelompok dengan paparan genistein sebesar 5 μ M dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada kelompok dengan paparan genistein sebesar 10 μ M ditemukan kematian sampel (n<50) sehingga tidak didapatkan jumlah sampel yang dibutuhkan untuk pengukuran motorik. Peningkatan apoptosis dan mortalitas pada pemberian genistein 10 μ M di 120 jam fertilisasi tidak hanya bekerja pada reseptor estrogen (Sassi-Messai *et al.*, 2009). Embrio berkembang secara normal jika suhu inkubasi berada diantara 25°C sampai 33°C dengan suhu optimumnya sebesar 28,5°C. Inkubasi dengan suhu kurang atau diatas kisaran tersebut menyebabkan abnormalitas (Kimmel *et al.*, 1995).

Genistein merupakan senyawa alami, diklasifikasikan dalam kelas isoflavone, dan banyak ditemukan pada kacang-kacangan terutama kedelai. Sifat-sifat biologis dan struktur kimiawi dari genistein memungkinkan berbagai mekanisme aksi dalam jalur biokimiawi diantaranya sifat genistein sebagai antiestrogenik dan agonis estrogen. Efek estrogenik atau agonis estrogen telah dibuktikan dengan penelitian *in vitro* peningkatan marker kanker setelah pemberian terapi estradiol dan genistein. Secara *in vivo*, penelitian pada tikus dengan kanker payudara diterapi estradiol dan genistein memberikan hasil peningkatan proliferasi sel tumor akibat efek agonis estrogen (Mazurek, 2000).

Endocrine disruptors (Perusak-perusak endokrin) adalah senyawa-senyawa kimiawi sintetik atau alami yang dapat menyerupai atau memodifikasi kerja dari hormon-hormon endogen. Isoflavones mengikat pada kedua jenis reseptor estrogen (ER α dan ER β), walaupun lebih potensial untuk mengikat ER β . Genistein memiliki efek estrogenik dan antiestrogenik. Pada penelitian secara *in vivo*, Genistein memiliki aktivitas estrogenik satu hingga tiga kali lebih besar dari glycitein dan empat kali lebih besar dari daidzein (Mesiina, 2006).

Organogenesis pada *zebrafish* berlangsung cepat; keseluruhan rangka sudah terbentuk pada 24 jam setelah fertilisasi dan jantung serta sistem vaskuler pada 2 hari setelah fertilisasi. Proses tersebut berlangsung dimulai dari fertilisasi yang menghasilkan *zygot*. Periode pembelahan (*cleavage*) berlangsung dalam 2 jam setelah fertilisasi dan berakhir dengan terbentuknya blastula. Pada periode blastula ditandai dengan perubahan blastodisc menjadi blastoderm. Pada periode gastrula terbentuk *tail bud*, *primary germ layer* dan *embryonic axis*. Pada 10 hingga 24 jam setelah fertilisasi menjadi awal pembentukan neuron atau memasuki proses organogenesis (Kimmel *et al.*, 1995).

Lokomotor pada embrio *zebrafish*, dimulai dari membalikkan ekor secara perlahan pada 18 jam setelah fertilisasi, berenang melarikan diri pada 28 jam setelah fertilisasi, hingga berenang spontan secara sempurna pada 5 hari setelah fertilisasi. Pengukuran respon berenang setelah pemberian stimulus taktil terbentuk mulai 27 jam setelah fertilisasi hingga 72 jam setelah fertilisasi. (Thirumalai, 2008; Drapeau, 2001). Substansia Nigra adalah nukleus motorik besar dan terletak diantara tegmentum dan krus serebri kedua sisi. Nukleus ini berwarna gelap karena tersebar nya pigmen melanin yang terkandung di badan sel syaraf. Selain itu, substansia nigra bertugas mengirimkan serabut aferen dopaminergik ke striatum; adanya degenerasi nigrostriatal dopaminergik pada komponen ini mengakibatkan penyakit parkinson (Baehr dan Frotscher, 2005).

Pada penelitian ini, larva *zebrafish* mengalami penurunan respon taktil terhadap stimulus jarum pada 72 jam setelah fertilisasi setelah mendapat paparan genistein. Penurunan aktivitas motorik tersebut sebanding dengan jumlah dosis genistein yang diberikan. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu bahwa pemberian genistein pada embrio *zebrafish* menyebabkan penurunan ekspresi TH pada neuron dopaminergik yang berdampak pada penurunan aktivitas motorik dari larva *zebrafish* (Aurora, 2012). Senyawa-senyawa yang berpotensi toksik terhadap neuron-neuron dopaminergik, seperti pemberian 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) dapat mengurangi aktivitas motorik (Betraud, 2004).

Hasil uji *Post Hoc Tukey* didapatkan bahwa perlakuan genistein 2,5 μM dan 5 μM memiliki perbedaan signifikan terhadap kelompok kontrol dengan nilai $p=0,035$ dan $p=0,000$ ($p<0,05$). Hal ini membuktikan bahwa pada penelitian pendahuluan didapatkan bahwa pemberian genistein dapat mempengaruhi

penurunan motorik secara bermakna. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa paparan *phytoestrogen*; genistein dan *coumestrol* meningkatkan ekspresi mRNA aromatase-B, peningkatan ini menyebabkan penurunan ekspresi *tyrosine hydroxylase* pada neuron dopaminergik yang berdampak pada penurunan aktifitas motorik larva *zebrafish* (Aurora, 2012). Larva *zebrafish* menunjukkan perilaku motorik yang stereotipe seperti kontraksi-kontraksi spontan, pemberian respon stimulus akan berpindah dan berenang. Pada kelompok pemberian genistein 5 μ M+ICI mengalami perbaikan berupa peningkatan aktivitas motorik jika dibandingkan dengan kelompok genistein 5 μ M. Pemberian bloker estrogen reseptor (ICI) akan menghambat penurunan ekspresi TH sehingga membuktikan kerja estrogen terhadap estrogen reseptor (Ivanova *et al.*, 2008).

Pada penelitian respon taktil masih ditemukan beberapa kekurangan diantaranya alat dan bahan yang diperlukan masih kurang serta uji yang dilakukan bersifat subyektif dengan visual makroskopik Pengulangan tiga kali serta jumlah sampel yang besar ($n=50$) dilakukan untuk mengontrol pengaruh-pengaruh yang mempengaruhi variabel terkait, seperti suhu inkubasi, pemberian pakan dan jumlah produksi telur setiap hari.

Hasil penelitian menunjukkan adanya korelasi yang signifikan antara peningkatan dosis genistein dengan penurunan respon taktil pada larva *zebrafish*. Pemberian ICI sebagai antiestrogen yang bekerja langsung berikatan dengan reseptor estrogen mampu berkompetisi dengan genistein sehingga mengembalikan respon taktil mendekati normal.