

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Estrogen

Estrogen merupakan hormon steroid yang berada dalam tubuh dan bekerja secara sistemik. Hormon ini mempunyai peran penting dalam sistem reproduksi, selain juga memelihara organ tubuh yang lain seperti otak, jantung dan tulang (Noteloviz, 2006). Estrogen alami dalam tubuh manusia yang paling kuat adalah  $17\beta$ -estradiol, diikuti estron dan estriol. Pada kehamilan, estriol diproduksi relatif lebih banyak dengan penghasil terbesar adalah plasenta (Murray, 2006).

Estrogen dibentuk oleh aromatisasi androgen dalam suatu proses kompleks yang melibatkan tiga tahap hidroksilasi yang masing-masing memerlukan  $O_2$  dan NADPH. Kompleks enzim yang dimaksud termasuk  $P_{450}$  monooksigenase. Pada wanita hamil, hampir 50% sumber estradiol ( $E_2$ ) berasal dari aromatisasi androgen (Murray, 2006).

Estrogen merupakan steroid dengan 18 atom karbon yang mengandung satu cincin A fenofilik (cincin aromatik dengan gugus hidroksil pada karbon 3) dan gugus  $\beta$  hidroksi atau keton di posisi 17 cincin D. Cincin fenofilik A inilah yang bertanggung jawab terhadap ikatan selektif dan afinitas tinggi pada reseptor estrogen (Hardman and Limbric, 2001).

### 2.1.1 Biosintesa Estrogen

Pembentukan estrogen diawali dengan ikatan kolesterol dengan reseptor lipoprotein yang terdapat pada sel steroidogenik. Kolesterol kemudian disimpan dan dibawa untuk sintesa steroid. Pergerakan intraseluler ini difasilitasi oleh sitoskeleton dan protein pembawa intraseluler seperti pembawa protein sterol. Atom karbon pada pembentukan steroid dipangkas dari 27 menjadi 18. Proses akhir dari pembentukan estrogen adalah aromatisasi yang dikatalisasi oleh enzim aromatase P<sub>450</sub> (Gruber *et al.*, 2002)

Sitokrom aromatase P<sub>450</sub> merupakan protein yang diproduksi oleh gen CYP19. Protein ini mengikat C19 androgenic steroid substrat dan mengkatalisa beberapa reaksi sehingga terbentuk cincin phenol A yang merupakan karakteristik dari estrogen. (Simpson, 2001). Berbeda dengan burung dan mamalia yang aromatasenya dikode oleh satu gen, pada ikan (teleost fish) terdapat dua gen yang mengkode enzim aromatase. Kedua gen ini mempunyai pola ekspresi yang berbeda, CYP19A mengkode aromatase A yang utamanya terekspresi di gonad, sedangkan CYP19B mengkode ekspresi aromatase B di otak (Mouriec *et al.*, 2009).

Selain sintesis oleh ovarium, estrogen juga diproduksi oleh kelenjar ekstragonad. Biosintesa estrogen pada jaringan ekstragonad memiliki beberapa tujuan penting yang berbeda dari fungsinya pada ovarium. Sintesa estrogen ekstragonad yang bekerja sebagai parakrin atau intrakrin pada jaringan lokal. Jumlah total dari jaringan lokal tinggi dan meningkatkan pengaruh biologisnya pada jaringan tersebut. Karenanya, biosintesa estrogen ekstragonad mempunyai

peranan penting, walaupun belum banyak diketahui, baik peranan fisiologis maupun patofisiologisnya (Simpson, 2001).

### 2.1.2 Reseptor Estrogen

Efek estrogen berupa interaksi melalui reseptor yang merupakan anggota superfamili nukleus. Terdapat dua reseptor berbeda yaitu ER  $\alpha$  maupun ER $\beta$  pada manusia, ER- $\alpha$  terekspresi pada otak, pituitari, ginjal, epididimis dan adrenal, sedangkan ER- $\beta$  didapatkan pada prostat, jantung, kandung kemih dan otak. ER $\alpha$  dan ER- $\beta$  didapatkan pada ovarium, testis dan uterus (Gustafson, 1999;McEwen, 2002).

Kedua reseptor estrogen diatas merupakan faktor transkripsi untuk deaktivasi ligan yang meningkatkan atau meurunkan sintesis mRNA dari gen target. *Estrogen Receptor* sebagai monomer setelah berikatan dengan estrogen, terjadi perubahan konfrontasi yang menyebabkan dimerisasi, yang meningkatkan laju pengikatan reseptor dengan DNA dan berikatan dengan Elemen Respon Estrogen (ERE) yang akan memodulasi transkripsi gen nukleus. Proses tersebut terjadi di dalam nukleus ( Hardman and Limbric, 2001). Aktivitas transkripsi dari ER tergantung pada dua domain aktivasi (AF1 dan AF2), yang berlokasi pada N-terminal domain (NTD) dan ligand binding domain (LBD) (Kumar *et al.*, 2011).

Pada manusia, struktur E- $\beta$  dapat berikatan dengan genistein. Bagian bisiklik dari genistein memiliki kesamaan dengan cincin C dan D dari estrogen, sehingga memfasilitasi pembentukan ikatan hidrogen dari gugus hidroksil dengan histidin pada reseptor. Kompleks ER/DNA merekrut satu atau lebih protein koaktivator seperti SRC-1 (Steroid receptor coactivator 1) dan CBP (Cyclic AMP response element binding protein) , yang memiliki aktivitas histon

asetilase. Aktivitas ini merubah struktur kromatin di daerah promoter gen target yang berperan dalam transkripsi. Interaksi ER dengan antagonis memudahkan koreseptor seperti NcoR/SMRT (*nuclear hormone receptor corepressor/silencing mediator of retinoid and thyroid receptor*) (Hardman and Limbric, 2001).

## 2.2 Phytoestrogen

*Phytoestrogen* adalah senyawa estrogenik yang ditemukan pada tumbuhan. Senyawa ini mampu memberikan efek estrogenik pada mamalia dan memiliki struktur mirip  $17\beta$ -estradiol (E2) (Price dan Fenwick *et al.*, 1985). Senyawa ini juga memberikan efek estrogenik lain pada sistem syaraf, menginduksi *etrus* dan menstimulasi pertumbuhan tractus genitarius pada hewan betina. Sumber *phytoestrogen* terdapat pada kacang-kacangan, semanggi, rumput laut, kubis, bayam, kedelai, dan gandum (Kurzer *et al.*, 1997).

Penemuan *phytoestrogen* mulai disadari pada 1940 ketika terjadi “*clover disease*” pada domba Australia Barat, yaitu ketika domba merumput di padang yang banyak mengandung semanggi mempunyai beberapa masalah dengan fertilitas (Murkies *et al.*, 1998; Cowen *et al.*, 2004).

Berdasarkan struktur kimianya untuk berikatan dengan E2, *phytoestrogen* dibagi menjadi beberapa kelompok yaitu:

- Isoflavone, merupakan kelas yang paling dikenal karena berperan pada “*clove disease*”. Isoflavone yang diketahui memiliki aktivitas estrogenik diantaranya : aglycones, daidzein, genistein(4',5,7-trihidroksiisoflavone), Biochanin A dan formonometin (Ososki, 2003).

- Coumestan, yang termasuk coumestrol dan 4'-methoxycoumestrol. Senyawa ini jumlahnya lebih sedikit pada bahan makanan dibandingkan isoflavone. Sumber bahan makanan diantaranya daun strawberi dan alfa-alfa (Ososki, 2003).
- Lignans, ditemukan pertama kali pada tumbuhan dan kemudian diidentifikasi pada cairan mamalia. Pada tanaman yang berbentuk secoisolariciresinol dan matairesinol, terjadi konversi menjadi enterodiol dan enterolacton di usus oleh bakteri. Lignans belum banyak diteliti tentang aktivitas estrogeniknya. Senyawa ini banyak ditemukan pada gandum, teh hitam dan hijau, kopi dan *flaxseed* (Ososki, 2003).
- senyawa lainnya, resveratrol (trans-3,4',5-trihidroxy-trans- $\alpha$ ) yang banyak terdapat pada kulit anggur, diethylstilbesterol (DES) dan mycotoxins seperti zearalenol.

Beberapa penelitian mengajukan hipotesis bahwa *phytoestrogen* mengurangi resiko penyakit kardiovaskular, fraktur osteoporosis, gejala menopause dan mencegah kanker. Aktivitas *phytoestrogen* bergantung pada beberapa faktor, seperti bentuk pemberian, dosis, lama paparan, metabolisme individu dan substansi farmakologis lain (Xiang *et al.*, 1995).

*Endocrine Disrupting Chemical* adalah bahan eksogen yang mengganggu kerja regulatorik hormonal hormon-hormon yang mengontrol proses perkembangan. Efek potensial *Endocrine Disrupting chemical* (EDC) harus diwaspadai pada konsumsinya pada masa kehamilan. Bahan ini mengintervensi kerja estrogen melalui reseptornya dan menyebabkan kelainan perkembangan sistem syaraf pusat dan saluran reproduksi (Saddler, 2001). Jumlah

*phytoestrogen* yang melimpah pada plasma darah akan mengganggu perkembangan fetus (Setchel *et al.*, 1998).

### 2.2.1 Genistein

Genistein merupakan senyawa alami, diklasifikasikan dalam kelas isoflavone, dan banyak ditemukan pada kacang-kacangan terutama kedelai. Penemuan pertama kali pada tahun 1949, genistein menyebabkan kemandulan pada domba Australia yang dikenal dengan "*clover disease*" (Polkowski dan Mazurek, 2000).

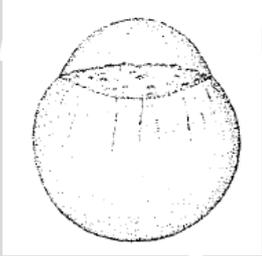
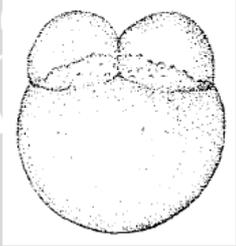
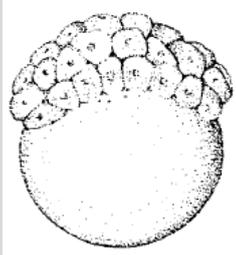
Pengaruh genistein pada jalur biokimia banyak berpengaruh pada pertumbuhan dan proliferasi sel. Protein tyrosin kinase (PTKs) akan mengaktifkan sinyal transduksi dari ekstraselular ke intraselular serta mengaktifkan berbagai peptida pertumbuhan seperti EGF(*Epidermal Growth Factor*), IGF(*Insulin Like Growth factor*), PDGF(*Platelet Derieved Growth Factor*), NGF(*Nerve Growth Factor*), dll. Genistein merupakan penghambat PTKs yang mengganggu beberapa chanel ion dan mengubah proses fosforilasi atau berikatan langsung (Chan *et al.*, 2007). Beberapa penelitian mengungkapkan pengaruh toksisitas senyawa ini diantaranya genistein menghambat pertumbuhan dan proliferasi pada blastocyt tikus (Chan *et al.*, 2007). Peran genistein dalam menghambat pertumbuhan diantaranya: meregulasi checkpoint dari siklus sel, memodulasi jalur transformasi pertumbuhan  $\beta$ -1, anti angiogenesis dan aktivitas antioksidan (Kim *et al.*, 1998). Genistein terbukti mampu menghambat aktivitas topoisomerase II, proliferasi dan diferensiasi sel tumor, serta mampu menghambat perkembangan embrio dengan merubah struktur dan fungsi mitokondria (Bogoliubova *et al.*, 1999).

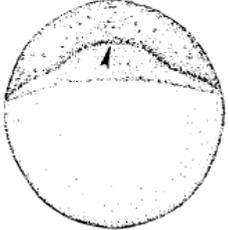
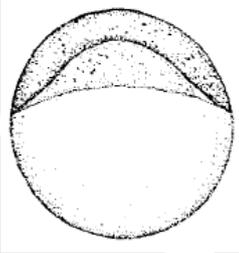
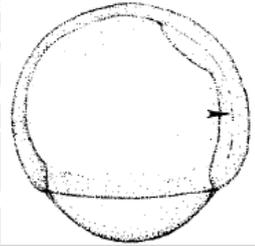
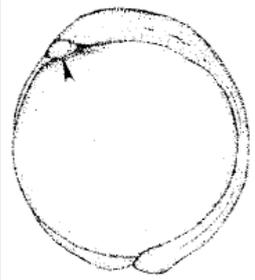
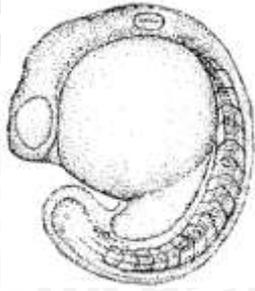
### 2.3 Zebrafish

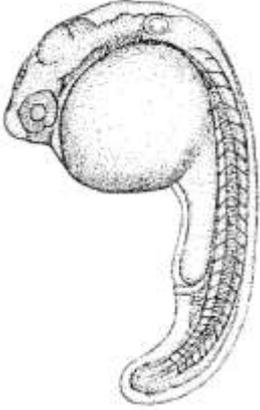
Jantung merupakan organ pertama yang berkembang pada embrio *zebrafish* yaitu pada 24 hpf . Perkembangan 24 hpf pada *zebrafish* sebanding dengan perkembangan jantung manusia pada 3 minggu. *Zebrafish* merupakan hewan coba yang digunakan untuk penelitian biomedis serta menguji tentang efek obat. Hewan coba ini juga digunakan sebagai model biologi perkembangan dan organogenesis (Rubistein, 2006). Beberapa karakteristik *zebrafish* yang menjadikannya sebagai model yang tepat dalam mempelajari perkembangan, dengan pendekatan seluler, molekuler, dan genetik, adalah:

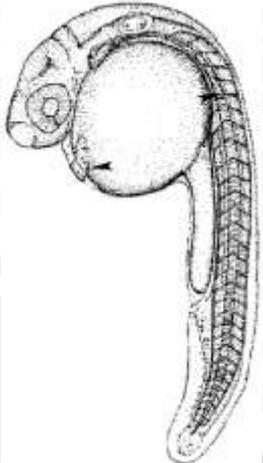
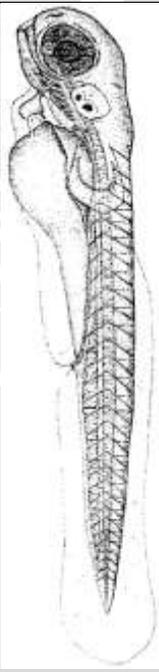
- *Zebrafish* mempunyai produktifitas yang tinggi sehingga dapat menghasilkan embryo dalam jumlah besar. Satu betina dewasa dapat memproduksi 200-250 telur setiap kali peneluran.
  - Embryogenesis yang cepat. Keseluruhan rangka sudah tersusun pada 24 jam setelah fertilisasi, sedangkan organ internal seperti jantung, ginjal, hepar dan usus berkembang secara sempurna pada 96 jam setelah fertilisasi.
  - Larva *zebrafish* transparan sehingga organ, sel, dan jaringan dapat terlihat secara *in vivo* dan dipelajari *real time*. Perkembangan neuron dapat diamati secara langsung.
- Sistem kardiovaskular, nervus, dan pencernaan *zebrafish* menyerupai pada mamalia. (Ton *et al.*, 2006; Chiranjib *et al.*, 2009).

Dalam mempelajari perkembangan dengan menggunakan *zebrafish* sebagai model perlu mengetahui tahapan-tahapan pertumbuhan dari *zebrafish* sendiri.

Stadium	Waktu (jam)	Perkembangan	Gambar
Periode zygote	0- $\frac{3}{4}$	Telur yang baru terferlitisasi	
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	

		<p>yolk cell, yang pada akhirnya yolk cell akan terliputi, tahap ini diawali dengan:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-terbentuknya kubah</li> <li>-perubahan blastodisc menjadi blastoderm.</li> </ul>	 
Periode Gastrula	5¼-10	<ul style="list-style-type: none"> <li>-epiboly terbentuk sempurna</li> <li>-terbentuk tail bud</li> <li>-terbentuk primary germ layer dan embryonic axis</li> </ul>	 
Periode Segmentasi	10-24	<ul style="list-style-type: none"> <li>-awal pembentukan neuron</li> <li>-optic primordium dapat diidentifikasi</li> </ul>	

	<p>-awal pembentukan ginjal</p> <p>-otic placode, yang merupakan awal pembentukan telinga tampak</p> <p>-olfactory primordium dapat diidentifikasi</p> <p>-awal terjadinya pembagian dan diferensiasi sel darah</p> <p>-Pelurusan pada trunkus posterior hampir sempurna, pemanjangan ekor dianterior masih membentuk kurva di bagian ventral</p> <p>-kontraksi myotom secara spontan</p>	
--	---	---

Periode Pharyngula	24-48	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Pembentukan sistem sirkulasi, jantung mulai berdenyut, mulai ada aliran darah</li> <li>-terjadi pigmentasi</li> <li>-sirip mulai terbentuk</li> <li>-muncul sensitifitas terhadap rangsang taktil</li> </ul>	
Periode Penetasan	48-72	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Perkembangan mulai melambat</li> <li>-Morphogenesis hampir sempurna</li> <li>-Penetasan secara spontan</li> </ul>	
Periode Larva Awal	>72	<ul style="list-style-type: none"> <li>-disebut sebagai larva</li> <li>-mulai berenang secara aktif</li> <li>-mulai ada respon untuk melarikan diri dan mencari makan</li> </ul>	

Tabel 2.3 Tahapan perkembangan awal zebrafish (Kimmel et al., 1995)

Pada Karyotyping dari *zebrafish* perbedaan kromosom dari jenis kelamin yang berbeda tidak dapat diidentifikasi. Pada ikan, faktor lingkungan seperti temperatur, pH dan polutan lingkungan juga berperan pada determinasi seksual. Pada perkembangan awal dari semua embrio *zebrafish* terdapat struktur yang menyerupai ovarium, struktur ini akan berkembang menjadi ovarium pada betina, atau setelah mengalami kematian dari oosit, akan menjadi testis pada ikan jantan (Slancev, 2005). *Zebrafish* dikatakan matang secara seksual setelah berumur tiga bulan, tetap perbedaan jenis kelamin dapat diketahui pada 21-23 hari setelah fertilisasi. Pembentukan ovarium diawali pada hari ke-10 setelah fertilisasi dan berkembang sampai hari ke-20, sedangkan testis mulai terbentuk pada hari ke-21 sampai ke-30 bersamaan dengan apoptosis dari ovarium (Hofsten, 2005).

Embrio *zebrafish* mempunyai perilaku motorik yang mudah diamati. Sebagian besar kegiatan motor diatur sumsum tulang belakang dan otak belakang. Perilaku motorik embrio muncul dalam urutan yang diawali dari periode awal yaitu kontraksi melingkar spontan, diikuti respon berkedut saat disentuh, dan kemudian kemampuan berenang. Kontraksi melingkar dihasilkan oleh gabungan rangkaian listrik pada neuron-neuron tulang belakang sedangkan bahan kimia (*glutamanergic* dan *glycerinergic*) mendasari repon terhadap sentuhan dan kemampuan berenang. Renang semakin berkembang pada larva begitu sistem pengaturan neuron serotonergik berkembang. Hasil ini menunjukkan banyak kesamaan antara perkembangan motorik pada *zebrafish* dengan vertebrata lainnya. Karenanya *zebrafish* dapat menjadi model untuk pembelajaran perkembangan kontrol neuron terhadap gerak vertebrata (Drapeu, 2002).

## 2.4 Neuron Dopaminergik, Dopamin dan Induksi Motorik

Neuron dopaminergik berperan dalam kontrol regulasi mood, fungsi kognitif, homeostasis fisiologis dan koordinasi motorik. Pada mamalia neuron-neuron ini terletak pada caudal forebrain dan ventral midbrain, sedangkan pada *zebrafish* terdapat pada forebrain terutama ventral diencephalon: ventral thalamus, posterior tuberculum, hypothalamus (Lohr, 2009).

Dopamin merupakan neuromodulator yang penting dalam kontrol sistem motorik pada vertebrae dan invertebrae. Hilangnya neuron-neuron dopaminergik pada brainstem menyebabkan gangguan perilaku motorik pada manusia, rodent dan ikan. Dopamin memodulasi proses inhibitory dan excitatory pada otak dan korda spinalis yang mempengaruhi inisiasi dan kontrol perilaku motorik (Fillipi, *et al.*, 2009).

Pada manusia, ketidakseimbangan dopamin berperan dalam defisit motorik pada penyakit Huntington dan Parkinson. Pada Parkinson, terjadi penurunan jumlah neuron dopaminergik pada substansia nigra, menyebabkan hiperaktivitas dari neurotransmitter eksitatorik (glutamat). Dopamin dilepaskan dari neuron nigrostriatal, mengakibatkan pergeseran kesetimbangan glutamat pada ganglia basalis. Reseptor dopamin dapat bekerja melalui dua jalur, jalur langsung akan mengaktifasi jalur motorik sedangkan jalur tidak langsung akan menghambat jalur motorik (Valsava, 2008).

Pada *zebrafish*, aktivitas dopamin termasuk dalam koordinasi dan frekuensi perilaku motorik dan dapat mengikuti pola yang serupa pada gangguan motorik pada manusia. Sel Mauthner merupakan neuron pada *hindbrain* yang diketahui menerima input dari neuron dopamin. Serat-serat *dopaminergic*

terdistribusi pada daerah sinaptik pada dendrit –dendrit dari sel *Mauthner's* . Pada penelitian Gabrielle membuktikan pengaruh dopamin dalam memodulasi *Mauthner* postsinaps dan meningkatkan konduksi gap junction (*electrical coupling*) dan aktivasi reseptor glutamat (transmisi kimia) pada *Mauthner* ESPS (Sturchio, 2012).

Pada penelitian Aurora 2012, didapatkan penurunan respon taktil *zebrafish* secara signifikan pada pemberian Genistein dan Coumestrol pada dosis 10  $\mu$ M. Penurunan aktivitas motorik tersebut karena terjadi peningkatan ekspresi mRNA aromatase-B yang mampu menurunkan ekspresi TH pada neuron dopaminergik dari embrio *zebrafish* (Aurora, 2012).

ICI 182 780 merupakan salah satu contoh antiestrogen type II yang biasa digunakan di laboratorium dan bisa digunakan secara klinis. Hal yang unik dari reseptor tipe II adalah kemampuannya untuk menimbulkan kerusakan pada reseptor estrogen yang secara klinis digunakan untuk penelitian sel kanker payudara dengan kultur sel (Mc Greagor, 1998).

Embrio *zebrafish* memiliki kemampuan untuk merespon taktil stimuli pada 24-27 post fertilisasi diamati dengan pemberian stimulasi pada kepala atau kaki. Tes motorik lainnya yaitu tes kemampuan berenang dan tes melarikan diri dengan cepat. Pengamatan respon taktil untuk melihat pengaruh mutasi gen sensoris bukan gen – gen motorik pada neuron – neuron mekanoreseptor primer (Carmean, 2010).