

PENGARUH GENISTEIN TERHADAP APOPTOSIS PADA MATA

EMBRIO ZEBRAFISH (DANIO RERIO) YANG DIPAPAR GLUKOSA

TINGGI

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



Oleh:

Theakirana Firdaus

NIM 155070101111047

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

DAFTAR ISI

Judul	Halaman
Halaman Pengesahan.....	i
Pernyataan Keaslian Tulisan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	iv
Abstract	v
Daftar Isi	vi
Daftar Tabel	vii
Daftar Gambar	xviii
Daftar Lampiran	xix
Daftar Singkatan	xviii

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.4.1 Manfaat Akademik	3
1.4.2 Manfaat Praktis	3

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Mellitus	4
2.1.1 Pengertian dan Klasifikasi Diabetes Mellitus	4
2.1.2 Patofisiologi Diabetes Mellitus	4
2.1.3 Komplikasi Diabetes Mellitus	5
2.1.3.1 Diabetik Retinopati	6
2.2 Apoptosis	6
2.2.1 Pengertian dan Mekanisme Apoptosis	6
2.2.2 Hubungan Kondisi Hiperglikemia dengan Apoptosis pada Mata...	8
2.3 Genistein	8
2.4 Embrio Zebrafish	10

2.4.1	Pengertian Umum Zebrafish	10
2.4.2	Persamaan Zebrafish dengan Manusia	11
2.4.3	Perkembangan Kehidupan Zebrafish	13

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1	Kerangka Konsep	17
3.2	Hipotesis Penelitian	19

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1	Rancangan Penelitian	20
4.2	Populasi dan Sampel	20
4.2.1	Populasi Penelitian	20
4.2.2	Kriteria Inklusi dan Eksklusi	20
4.2.3	Sampel Penelitian dan Teknik Pengambilan Sampel	21
4.3	Tempat dan Waktu Penelitian	21
4.4	Variabel Penelitian	22
4.4.1	Variabel Bebas	22
4.4.2	Variabel Terkait	22
4.4.3	Variabel Kendali	22
4.5	Definisi Operasional	22
4.6	Bahan dan Alat	23
4.6.1	Bahan	23
4.6.2	Alat	24
4.7	Cara Kerja Penelitian	24
4.7.1	Pemeliharaan Zebrafish Dewasa	24
4.7.2	Pemberian Pakan Zebrafish Dewasa	24
4.7.3	Peneluran (<i>Breeding</i>) dan Kultur Embrio Zebrafish	25
4.7.4	Pelepasan Cangkang Telur	26
4.7.5	Pemaparan Glukosa pada Embrio Zebrafish	26
4.7.6	Pemaparan Genistein pada Embrio Zebrafish	26
4.7.7	Menghilangkan Pigmentasi Embrio Zebrafish	27
4.7.8	Anestesi Embrio Zebrafish	27
4.7.9	Memposisikan Embrio Zebrafish	27
4.7.10	Pewarnaan Acridine Orange dan	27

Pemeriksaan Mikroskop Fluorescence 27

4.7.11 Bagan Alur Penelitian 29

4.8 Analisis Data 30

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Hasil Penelitian 31

5.2 Analisa Data 34

5.2.1 Normalitas Distribusi Data 34

5.2.2 Homogenitas Data 35

5.2.3 Uji Kruskal-Wallis 36

5.2.4 Uji Mann-Whitney 37

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian 40

6.2 Implikasi terhadap Bidang Kedokteran 43

6.3 Keterbatasan Penelitian 43

BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan 44

7.2 Saran 44

Daftar Pustaka 45

Lampiran 53

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 5.1 Pengaruh Pemberian Genistein terhadap Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish yang Dipapar Glukosa Tinggi	34
Tabel 5.2 Hasil Pengujian Normalitas Data Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish	35
Tabel 5.3 Uji Homogenitas Data Apoptosis pada Mata	36
Tabel 5.4 Hasil Uji Analisis Kruskal-Wallis Apoptosis pada Mata	36
Tabel 5.5 Nilai Signifikansi Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish Antar Keenam Kelompok Paparan	37
Tabel 5.6 Kelompok Subset Berdasarkan Nilai Signifikansi Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish Antar Keenam Kelompok Paparan	38

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Struktur Kimia Genistein.....	9
Gambar 2.2 Struktur Kimia Genistein dan 17 β -estradiol	9
Gambar 2.3 Zebrafish Dewasa	10
Gambar 2.4 Embrio Zebrafish Usia 11 dan 12 Hpf Terbentuk Vesikel Optik	14
Gambar 2.5 Embrio Zebrafish Usia 18-19.5 Hpf Terbentuknya Lensa Mata	14
Gambar 2.6 Embrio Zebrafish Usia 22-31 Hpf dimana pada Usia 24-30 hpf Terbentuk Pigmentasi pada Retina	15
Gambar 2.7 Embrio Zebrafish Usia 48 Hpf	15
Gambar 2.8 Embrio Zebrafish Usia 72 Hpf	16
Gambar 2.9 Embrio Zebrafish Usia 120 Hpf	16
Gambar 5.1 Hasil Pemeriksaan Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish Usia 72 Hpf dengan Mikroskop Fluorescence	33
Gambar 5.2 Grafik Pengaruh Pemberian Genistein terhadap Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish yang dipapar Glukosa Tinggi	39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Kegiatan.....	53
Lampiran 2. Prosedur Pengukuran Jumlah Sel Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish dengan Aplikasi ImageJ	58
Lampiran 3. Hasil Pemeriksaan Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish Usia 72 Hpf dengan Mikroskop Fluorescence	64
Lampiran 4. Hasil Uji Mann Whitney	65
Lampiran 5. Surat Keterangan Kelaikan Etik.....	70
Lampiran 6. Surat Keterangan Uji Plagiasi	71



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH GENISTEIN TERHADAP APOPTOSIS PADA MATA EMBRIO
ZEBRAFISH (DANIO RERIO) YANG DIPAPAR GLUKOSA TINGGI**

Oleh:

Theakirana Firdaus

NIM 155070101111047

Telah diuji pada
Hari . . Selasa

Tanggal : 27 November 2018
dan dinyatakan lulus oleh:

Pengaji-I

Wibi Riawan, S.Si, M.Biomed
NIP. 197701312005011001

Pembimbing-I/Pengaji-II,

dr. Dewi Mustika, M.Biomed
NIP. 2016078711152001

Pembimbing-II/ Pengaji-III,

Edwin Widodo, S.Si, M.Sc, PhD
NIP. 198105042005011001



ABSTRAK

Firdaus, Theakiraha. 2018. *Pengaruh Genistein terhadap Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish (Danio rerio) yang Dipapar Glukosa Tinggi*. Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) dr. Dewi Mustika, M.Biomed (2) Edwin Widodo, S.Si, M.Sc, PhD

Paparan glukosa tinggi menyebabkan hiperglikemia yang memicu sekresi insulin dari sel beta pankreas. Sekresi dan kadar insulin yang terus menerus tinggi akan menyebabkan terjadinya kerusakan sel beta pankreas dan resistensi insulin sehingga glukosa tidak dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi. Hiperglikemia dapat menyebabkan masalah kesehatan pada mata. Hiperglikemia akan meningkatkan aktivasi caspase dan mempengaruhi keseimbangan antara zat pro-apoptosis dan anti-apoptosis yang akan mengarah pada suatu proses apoptosis sehingga dapat menyebabkan kerusakan vaskular dan lapisan pada mata. Selain itu, hiperglikemia dapat meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS). Penelitian ini menggunakan genistein atau senyawa isoflavon yang dapat meningkatkan proliferasi sel beta pankreas, menurunkan produksi ROS dan sebagai anti apoptosis. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan adanya pengaruh genistein terhadap apoptosis pada mata embrio zebrafish (*Danio rerio*) yang dipapar glukosa tinggi. Metode yang digunakan adalah embrio zebrafish didekorionisasi dan dipapar glukosa 5%(D5%), genistein 2 μ M, D5%+genistein 0,5 μ M, D5%+genistein 1 μ M, dan D5%+genistein 2 μ M sejak usia 24 hpf kemudian pada usia 72 hpf dilakukan pewarnaan *acridine orange* 5 μ g/ml untuk melihat pendarahan hijau dibawah mikroskop fluorescence yang kemudian dianalisis secara kuantitatif dengan software *ImageJ*. Hasil menunjukkan bahwa genistein dapat menurunkan apoptosis pada mata embrio zebrafish yang dipapar glukosa tinggi dengan dosis terbaik adalah 1 μ M walaupun pada paparan genistein 2 μ M tanpa glukosa terjadi sedikit peningkatan apoptosis. Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa genistein dapat menurunkan apoptosis pada mata embrio zebrafish yang dipapar glukosa tinggi ($p=0,021$).

Kata Kunci: Apoptosis pada Mata, Embrio Zebrafish, Genistein, Glukosa tinggi

ABSTRACT

Firdaus, Theakirana. 2018. *The Effect of Genistein to the Apoptosis in Zebrafish Embryos Eye (*Danio rerio*) with the Exposure to High Glucose*. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Dewi Mustika, M.Biomed (2) Edwin Widodo, S.Si, M.Sc, PhD

High glucose exposure causes a condition of hyperglycemia that triggers insulin secretion from pancreatic beta cells. Long term of high insulin level and secretion causes damage of pancreatic beta cells and insulin resistance so glucose cannot be used as the source of energy. Hyperglycemia causes various health problems, including the eyes. Hyperglycemia increases caspase activity and affect the balance between pro-apoptotic and anti-apoptotic substances that lead to an apoptotic process so it can cause vascular and lining damage in the eye. In addition, it can increases the production of reactive oxygen species(ROS). The isoflavone compound or genistein can increases pancreatic beta cell proliferation, reduce of ROS production, and as anti-apoptotic agent. The purpose of this study was to determine the effect of genistein to apoptosis of the eye of zebrafish embryos (*Danio rerio*) with high glucose exposure. The method was using zebrafish embryos which have been exposed glucose5%(D5%), genistein $2\mu M$, D5%+genistein $0,5\mu M$, D5%+genistein $1\mu M$, and D5%+genistein $2\mu M$ at the age of 24 hpf with dechorionization and at the age of 72 hpf with 5 $\mu g/ml$ acridine orange staining in 72 hpf to see the green light under fluorescence microscope and the result will be quantitatively analyzed with ImageJ. The results show that genistein can reduce apoptosis of the eye of zebrafish embryos with high glucose exposure with the best dose is $1\mu M$ even though exposure of $2\mu M$ genistein without glucose can increase apoptosis. The conclusion of this study is genistein can reduce the apoptosis in zebrafish embryos eye with the exposure to high glucose ($p=0,021$).

Keywords: Apoptosis of the Eye, Zebrafish Embryo, Genistein, High Glucose

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes Melitus (DM) adalah sebuah kondisi dimana terjadinya peningkatan jumlah glukosa dalam darah (hiperglikemia) dikarenakan adanya penurunan fungsi sel pankreas dalam memproduksi insulin atau terjadinya resistensi insulin (PERKENI, 2015). Berdasarkan data *International Diabetes Federation* (IDF) 2015, kurang lebih 450 juta orang penduduk terdiagnosis sebagai penyandang DM dan diprediksi terjadi kenaikan mencapai 642 juta di tahun 2040 (IDF, 2015). Sedangkan kondisi hiperglikemia saat kehamilan atau yang disebut diabetes gestasional terjadi sekitar lebih dari 200.000 kasus tiap tahun atau sekitar 7% kehamilan mengalami kondisi diabetes gestasional (*American Diabetes Association*, 2003).

Penyakit diabetes melitus disebabkan karena adanya penurunan *uptake* glukosa ke dalam sel sehingga menyebabkan kondisi hiperglikemia yang menimbulkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS). Hiperglikemia juga memicu pengeluaran sitokin pro-inflamasi yang menyebabkan kerusakan sel dan menginduksi terjadinya *hyperglycemic injury* (Kanwar et al., 2008; Sulistyoningrum, 2014). Hal ini menyebabkan terjadinya proses apoptosis yang dapat menyebabkan kerusakan multi organ seperti ginjal, mata, saraf, dan pembuluh darah (Allen et al., 2015; Kumar et al., 2015).

Mata merupakan organ yang sering mengalami gangguan akibat hiperglikemia. Gangguan yang terjadi akibat hiperglikemia saat kehamilan yaitu adanya proses apoptosis pada sel mata sehingga dapat menyebabkan

gangguan perkembangan atau malformasi pada mata (Barber *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2016). Apoptosis pada mata yang secara bertahap juga akan menyebabkan hilangnya fungsi *blood-retinal barrier* sehingga dapat menyebabkan terjadinya edema makular bahkan gangguan penglihatan (Barber *et al.*, 2006).

Genistein merupakan senyawa isoflavon yang bersifat fitoestrogen yang dapat memberikan efek estrogenik dan antioksidan dengan cara menghambat terjadinya pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Borras *et al.*, 2010). Genistein diketahui sebagai penghambat *uptake* glukosa pada organ intestinal dan mencegah pembentukan bahan glukosa penginduksi peroksidasi lipid akibat pembentukan ROS (Shim *et al.*, 2007). Selain itu, genistein dapat mengurangi sitokin-sitokin proinflamasi vascular yang berkaitan dengan *diabetic endothelial dysfunction* (Babu *et.al.*, 2011).

Dalam penelitian ini, penulis mengusulkan untuk menggunakan bahan genistein yang diharapkan dapat memberikan manfaat dalam pengelolaan diabetes mellitus terutama mengurangi kerusakan yang terjadi akibat hiperglikemia (Lee, 2006). Penelitian ini menggunakan model embrio zebrafish yang memiliki sifat optik transparansi, perkembangan yang cepat dan kemiripan secara genetik serta sistem tubuh dengan janin manusia (Lieschke dan Currie, 2007). Zebrafish dapat dijadikan model hiperglikemia karena memiliki metabolisme glukosa yang mirip dengan manusia. Zebrafish membutuhkan glukosa untuk energi dalam tubuhnya terutama berperan dalam proses perkembangan (Rocha *et al.*, 2015). Zebrafish juga memiliki pankreas yang menghasilkan insulin dari sel beta pankreas seperti manusia dalam meregulasi kondisi glukosa yang tinggi dalam tubuh (Kinkel dan

Prince, 2009). Selain itu, zebrafish dapat dijadikan model apoptosis pada mata (L. Arneson *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2015). Berdasarkan beberapa sumber diatas maka peneliti mencoba untuk melakukan penelitian mengenai pengaruh genistein terhadap apoptosis pada mata embrio zebrafish (Danio rerio) yang dipapar glukosa tinggi.

1.2 Rumusan Masalah

- Bagaimana pengaruh genistein terhadap apoptosis pada mata embrio zebrafish yang dipapar glukosa tinggi?
- Berapa dosis genistein yang paling efektif dalam menurunkan apoptosis pada mata embrio zebrafish yang dipapar glukosa tinggi?

1.3 Tujuan Penelitian

Membuktikan adanya pengaruh genistein terhadap apoptosis pada mata embrio zebrafish yang dipapar glukosa tinggi.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Dengan dilakukannya penelitian ini dapat meningkatkan dan mengembangkan ilmu pengetahuan dalam bidang kedokteran dan kesehatan mengenai pengaruh genistein terhadap apoptosis pada mata embrio zebrafish yang dipapar glukosa tinggi.

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat dijadikan sumber informasi kepada masyarakat mengenai pengaruh genistein terhadap kondisi paparan glukosa tinggi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Mellitus

2.1.1 Pengertian dan Klasifikasi Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) merupakan penyakit gangguan metabolism yang ditandai dengan hiperglikemia dan ditemukannya tiga gejala klasik yaitu poliuria, polidipsia, dan polifagia. DM diklasifikasikan menjadi empat yaitu DM tipe 1, DM tipe 2, DM gestational dan DM tipe lain. Pada DM tipe 1 ditemukan adanya defisiensi insulin absolut sehingga membutuhkan insulin dalam pengobatannya, sedangkan pada DM tipe 2 terdapat resistensi insulin dan menurunnya produksi insulin (PERKENI, 2015).

2.1.2 Patofisiologi Diabetes Mellitus

Pada patofisiologi DM terjadi penurunan *uptake* glukosa dan resistensi insulin pada otot dan liver serta disfungsi sel beta pankreas dalam mensekresikan insulin (Kumar *et al.*, 2015). DM juga terjadi karena adanya proses-proses lain yang berperan dalam menimbulkan resistensi insulin seperti jaringan lemak yang meningkatnya lipolisis, menurunnya efek incretin pada sistem gastrointestinal, sel alpha pankreas produksi glukagon sehingga terjadi hiperglukagonemia, peningkatan absorpsi glukosa pada ginjal, dan resistensi insulin pada otak (PERKENI, 2015).

Diabetes mellitus gestasional adalah kondisi diabetes atau tingginya gula darah saat kehamilan dan belum pernah terdiagnosis diabetes sebelumnya. Pada kehamilan dapat terjadi peningkatan massa sel beta

pankreas sehingga meningkatkan pengeluaran insulin. Secara terus-menerus hal ini dapat menyebabkan resistensi insulin dan hiperglikemia (Kühl, 1991). Hiperglikemia dapat menyebabkan kelainan kongenital berupa gangguan embriogenesis pada tahap sebelum dan sesudah implantasi akibat kelainan metabolisme. Konsentrasi glukosa yang tinggi ini mempengaruhi ekspresi gen dalam perkembangan jaringan maupun organ sehingga dapat menyebabkan kelainan morfologi bahkan keguguran (Moley K.H, 2001).

2.1.3 Komplikasi Diabetes Mellitus

Komplikasi pada DM dibedakan berdasarkan waktu yaitu akut dan kronik. Komplikasi akut pada DM ditandai dengan adanya peningkatan glukosa darah yaitu Ketoasidosis Diabetik (KAD) dan Status Hiperglikemi Hiperosmolar (SHH). Pada Status Hiperglikemi Hiperosmolar (SHH) terjadi peningkatan glukosa darah yang sangat tinggi dan tidak ditemukan adanya gejala asidosis, sedangkan pada KAD terjadi peningkatan jumlah glukosa dan ditambah dengan gejala asidosis. Selain itu, hipoglikemia juga menjadi komplikasi akut DM yang sering terjadi karena penggunaan obat anti-diabetes salah satunya adalah sulfonilurea (PERKENI, 2015).

Komplikasi kronik DM dibagi menjadi mikroangiopati dan makroangiopati. Komplikasi mikroangiopati yaitu retinopati diabetikum, nefropati diabetikum, dan neuropati. Sedangkan kondisi seperti infark miokardial, penyakit iskemias arteri ekstremitas perifer, arterosklerosis dan stroke ditemukan pada komplikasi makroangiopati (Kumar et al., 2015).

2.1.3.1 Diabetik Retinopati

Diabetik retinopati merupakan komplikasi pada diabetes mellitus yang sering terjadi. Masalah utama yang sering menyebabkan gangguan penglihatan adalah terjadinya edema pada macular dan diabetik retinopati proliferatif seperti pendarahan vitreous, lepasnya retina dan glaukoma neovaskular. Hal ini terjadi dimulai dari kondisi hiperglikemia yang menyebabkan gangguan vaskular yaitu mikroangopati. Rusaknya pembuluh darah ini akan menyebabkan terjadinya edema pada makula. Di sisi lain, rusaknya pembuluh darah dapat menyebabkan oklusi aliran darah kapiler sehingga terjadi iskemia. Iskemia yang terjadi akan memicu pembentukan pembuluh darah baru atau yang disebut neovaskularisasi melalui peningkatan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Nentwich et al., 2015).

Secara umum, diabetik retinopati dibagi menjadi *nonproliferative diabetic retinopathy* (NPDR) dan *proliferative diabetic retinopathy* (PDR).

Pada NPDR dapat ditemukan adanya mikroaneurisme yaitu penonjolan dinding pembuluh darah, pendarahan retina dan adanya eksudat.

Sedangkan pendarahan vitreous dan neovaskularisasi dapat ditemukan pada tipe PDR (American Academy of Ophthalmology, 2014).

2.2 Apoptosis

2.2.1 Pengertian dan Mekanisme Apoptosis

Apoptosis merupakan proses kematian pada sel secara terprogram yang bisa terjadi pada kondisi normal selama perkembangan atau pada kondisi patologis tertentu. Apoptosis terinduksi karena adanya aktivasi

enzim caspase. Terdapat dua jalur mekanisme apoptosis yaitu jalur intrinsik dan jalur ekstrinsik.

Pada jalur intrinsik atau jalur mitokondrial terjadi peningkatan permeabilitas mitokondria yang salah satunya disebabkan oleh radikal bebas. Hal ini menyebabkan terjadi pelepasan protein pro-apoptosis atau

protein penginduksi apoptosis seperti BAX (*Bcl-2-associated X protein*)

dan BAK (*Bcl-2 Antagonist/Killer*) yang apabila teraktivasi akan

membentuk kanal pada membran luar mitokondria tersebut. Kemudian

mitokondria akan melepaskan sitokrom C dan faktor penginduksi

apoptosis lainnya (Kumar et al., 2015). Sitokrom C yang dikeluarkan

mitokondria akan berikatan dengan APAF-1 (*apoptosis-activating factor-1*)

membentuk *pro-caspase* sehingga *caspase* teraktivasi yang kemudian

membentuk apoptosom. Aktivasi *caspase* akan meningkatkan aktivitas

proteolitik sehingga protein pada sitoplasma terpecah, kromoson DNA

terdegradasi dan terjadi fagositosis pada sel (Corvianindya R dan

Joelijanto, 2003). Ketika adanya faktor pertumbuhan akan stimulasi

munculnya protein anti-apoptosis seperti Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) dan

Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra large*) yang akan menghambat atau

mencegah pembentukan kanal pada mitokondria (Kumar et al., 2015).

Pada jalur ekstrinsik, apoptosis terjadi karena aktivasi *death*

receptors seperti reseptor TNF-1 yang terkait dengan Fas dalam

membentuk kompleks ligan reseptor sehingga menginduksi aktivasi

caspase dalam proteolitik dan fragmentasi DNA lalu sel di fagosit.

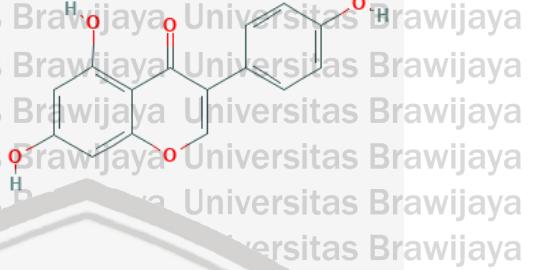
(Corvianindya R dan Joelijanto, 2003).

2.2.2 Hubungan Kondisi Hiperglikemia dengan Apoptosis pada Mata

Hiperglikemia dapat menyebabkan gangguan pada mata karena dapat menyebabkan disfungsi vaskuler yang bisa memburuk menjadi suatu kebutaan (Jung *et al.*, 2015). Glukosa tinggi menginduksi apoptosis melalui aktivasi caspase. Aktivasi caspase ini menyebabkan abnormalitas vaskuler dimana terjadi kerusakan pada sel endothelial pada mata. Rusaknya vaskuler pada mata khususnya retina akan menyebabkan kerusakan *blood-retinal-barrier* (Barber *et al.*, 2006). Kondisi hiperglikemia ini juga dapat meningkatkan terbentuknya ROS sehingga ROS dapat menumpuk didalam sel. Hasil dari terbentuknya ROS adalah peroksidasi lipid, kerusakan DNA dan kerusakan protein sehingga terjadi kerusakan sel dan apoptosis (Murray *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2015).

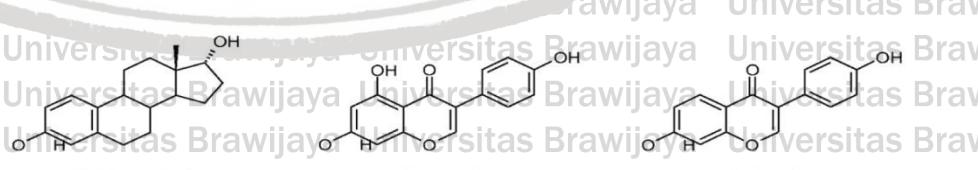
2.3 Genistein

Genistein merupakan senyawa aktif isoflavon yang dapat digunakan sebagai bahan penelitian dalam melakukan terapi pada suatu penyakit tergantung dosis dan durasinya. Genistein berasal dari produk kedelai yang bermanfaat terutama pada penyakit degeneratif. Genistein memiliki aktivitas yang dapat melawan faktor penginduksi stress oksidatif dan faktor-faktor penginduksi apoptosis (Zhao *et al.*, 2002).



Gambar 2.1 Struktur kimiawi Genistein (Gambar diambil dari : PubChem)

Genistein memiliki efek estrogenik, anti-oksidan dan dapat menurunkan ROS dengan menurunkan enzim penghasil ROS (Si dan Liu, 2007). Genistein memiliki struktur kimia yang mirip dengan 17 β -estradiol dan berinteraksi dengan reseptor estrogen β . Dalam hal yang sama, 17 β -estradiol dan senyawa isoflavon dapat memproteksi sel dari apoptosis dengan mengeliminasi pengaktivasi caspase karena perubahan protein pro dan anti-apoptosis yang dimana aktivasi caspase ini mengakibatkan kematian sel (Adams *et al.*, 2012). Selain penghambatan aktivitas caspase, genistein juga meningkatkan Bcl-2 sebagai protein anti-apoptosis (Yousefi *et al.*, 2017).



Gambar 2.2 Struktur kimia Genistein dan 17 β -estradiol (Adams *et al.*, 2012).

Diabetes Mellitus merupakan hasil dari terjadinya resistensi insulin dan hilangnya fungsi sel beta pankreas. Resistensi insulin yang terus menerus akan mengarah pada destruksi sel beta pancreas sehingga tidak dapat memenuhi kebutuhan insulin yang semakin meningkat (Fu et al, 2012). Genistein mempunyai efek anti-diabetik yang secara langsung berefek pada proliferasi fungsi sel beta. Selain itu, Genistein juga memiliki manfaat lain seperti bekerja sebagai enzim inhibitor yaitu menghambat aktivitas protein tirosin kinase dan α -glukosidase pada *intestinal brush border* dalam pengambilan glukosa (Lee dan Lee, 2001; Gilbert dan Liu, 2013). Dengan menghambat aktivitas tirosin kinase maka akan menimbulkan sekresi insulin yang distimulasi glukosa (*glucose-stimulated insulin secretion*) (Gilbert dan Liu, 2013)

2.4 Embrio Zebrafish

2.4.1 Pengertian Umum Zebrafish



Gambar U2.3ers Zebrafishwija dewasaiver (Gambar awi diambil Unidarisitas Brawijaya <http://www.diabetes.co.uk/news/2015/aug/zebrafish-embryos-used-to-identify-potential-type-1-diabetes-drugs-95530698.html>)

Kingdom : Animalia
Phylum : Chordata
Class : Teleostei
Order : Cypriniformes
Family : Cyprinidae
Genus : *Danio*
Species : *Danio rerio*
(ITIS, 2017)

Zebrafish merupakan jenis ikan berukuran kecil dengan nama ilmiah

Danio rerio yang dapat ditemukan di sungai-sungai negara India dan Asia Selatan (Yuniarto dkk., 2017). Ikan ini merupakan jenis ikan yang berada pada daerah tropis dan memiliki mekanisme kamuflase untuk beradaptasi dengan lingkungannya yang diperankan oleh corak garis berwarna biru dan garis kuning keperakan pada tubuhnya yang terdiri dari sel pigmen melanofor dan iridiofor pada garis biru dan sel pigmen xantofor dan iridiofor pada garis kuning (Yuniarto dkk., 2017).

2.4.2 Persamaan Zebrafish dengan Manusia

Zebrafish merupakan model hewan coba eksperimental yang sering digunakan pada bidang *biomedical sciences* terutama dalam bidang mutasi genetik, penyakit-penyakit metabolismik, serta gangguan tubuh lainnya. Sifat zebrafish yang terjadi fertilisasi eksternal, tingginya tingkat reproduksi, proses perkembangan yang cepat, tingginya peta genetik, warnanya transparan dapat memudahkan pengamatan terutama pada

proses perkembangan ikan sehingga banyak penelitian yang menggunakan model zebrafish (Lieschke dan Currie, 2007).

Pola genetik ikan zebrafish memiliki persamaan dengan manusia atau mamalia termasuk kemampuan pada sensasi rasa, pola sirkadian

beristirahat pada malam hari, suara, sentuhan dan keseimbangan (Yuniarto dkk., 2017). Selain genetik, ikan zebrafish memiliki persamaan

lain yaitu dalam segi sistem tubuh. Zebrafish memiliki banyak persamaan dengan manusia terutama sistem gastrointestinal, sistem otot, endokrin, sistem saraf, dan lain-lain. (Lieschke dan Currie, 2007).

Berbagai penelitian telah mengembangkan studi mengenai diabetes mellitus terutama dengan menggunakan model zebrafish. Zebrafish memiliki fungsi eksokrin dan endokrin pankreas yang terhubung dengan sistem gastrointestinal seperti manusia. Secara sistem endokrin, pankreas zebrafish juga menghasilkan insulin dari sel beta, glucagon dari sel alfa dan sel delta penghasil somatostatin. Hal ini dijelaskan dalam beberapa penelitian yaitu pemberian streptozotocin, bahan yang digunakan pada penelitian diabetes mellitus, pada zebrafish dengan dosis tertentu dapat menyebabkan kerusakan pada sel beta-langerhans pankreas zebrafish (Yuniarto dkk., 2017).

Zebrafish juga memiliki struktur mata yang homolog dengan manusia dan banyak digunakan pada penelitian yang berhubungan dengan

penyakit dan perkembangan mata. Pada retina zebrafish yang matur terdapat tiga lapisan nuklear yang dipisahkan dua lapisan plexiform.

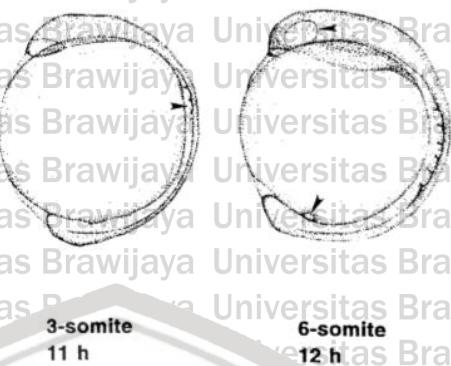
Sinyal penglihatan pada fotoreseptor ditransmisikan melalui retina ke sel

ganglion dimana aksonnya akan mengantarkan sinyal ke otak (Bibliowicz *et al.*, 2011).

2.4.3 Perkembangan Kehidupan Zebrafish

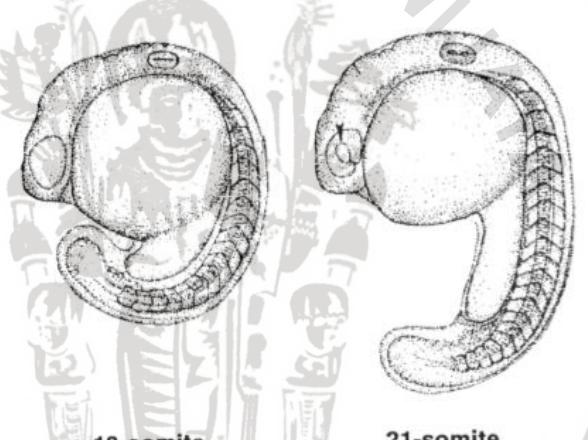
Sejarah kehidupan zebrafish dimulai dari embrio dimana periode penetasan dalam rentang waktu yang luas yaitu 48-72 jam pasca fertilisasi atau *hours post fertilization* (hpf) (Gambar 2.7 dan 2.8). Setelah perkembangan embrio, zebrafish menjadi larva yang kemudian menjadi *juvenile* atau remaja. Periode *Juvenile* berlangsung dari usia 4 minggu setelah fertilisasi sampai dengan 6-12 minggu setelah fertilisasi. Perkembangan dewasa ikan zebrafish ditentukan dengan adanya produksi gamet dan munculnya ciri seksual sekunder (Parichy *et al.*, 2009).

Perkembangan mata zebrafish dimulai usia 12 hpf terbentuk vesikel optik yang berevolusi dari *forebrain* (Gambar 2.4). Vesikel optik akan berkembang menjadi saraf retina dan *retina pigment epithelium* (Bibliowicz *et al.*, 2011). Zebrafish yang berusia 19 hpf (Gambar 2.5) terjadi pembentukan lensa pada mata dan pada usia 24 hpf (Gambar 2.6) dimulai adanya pigmentasi pada retina hingga usia 30 hpf (Kimmel *et al.*, 1995). Puncak apoptosis fisiologis pada saat perkembangan mata pada retina embrio zebrafish adalah saat embrio berusia 36 hpf, sedangkan puncak apoptosis fisiologis pada lensa terjadi saat embrio zebrafish berusia 24 hpf dan hilang pada saat usia 60 hpf (Cole dan Ross, 2001).

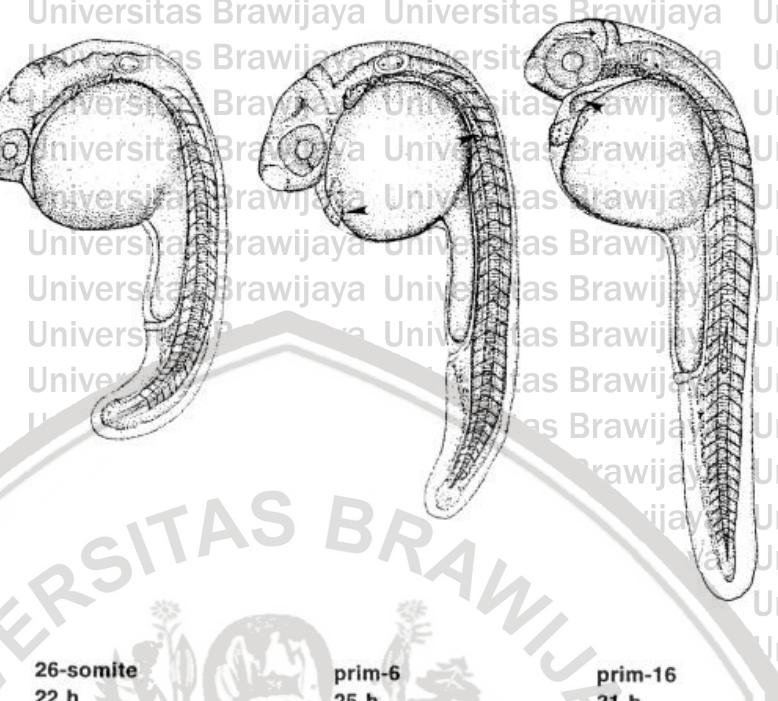


Gambar 2.4 Embrio Zebrafish Usia 11 dan 12 Hpf Terbentuk Vesikel

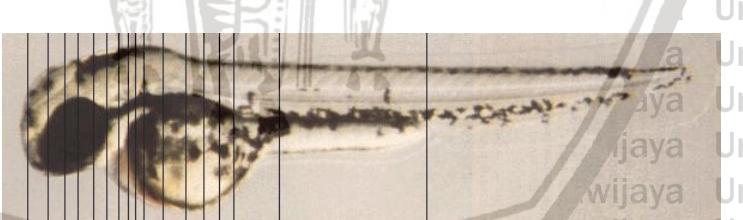
Optik (Kimmel et al., 1995)



Gambar 2.5 Embrio Zebrafish Usia 18-19.5 Hpf Mulai Terbentuknya Lensa Mata (Kimmel et al., 1995)



Gambar 2.6 Embrio Zebrafish Usia 22-31 Hpf dimana pada Usia 24-30 hpf Terbentuk Pigmentasi pada Retina

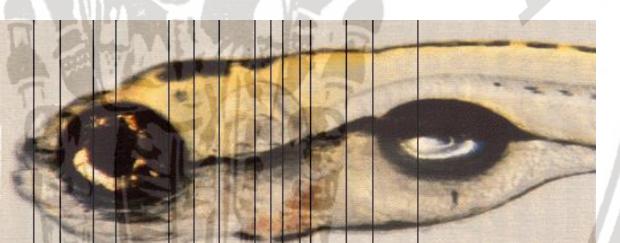


Gambar 2.7 Embrio Zebrafish Usia 48 Hpf (Kimmel et al., 1995; ZFIN, 1996)



Gambar 2.8 Embrio Zebrafish Usia 72 Hpf (Kimmel et al., 1995; ZFIN, 1996)

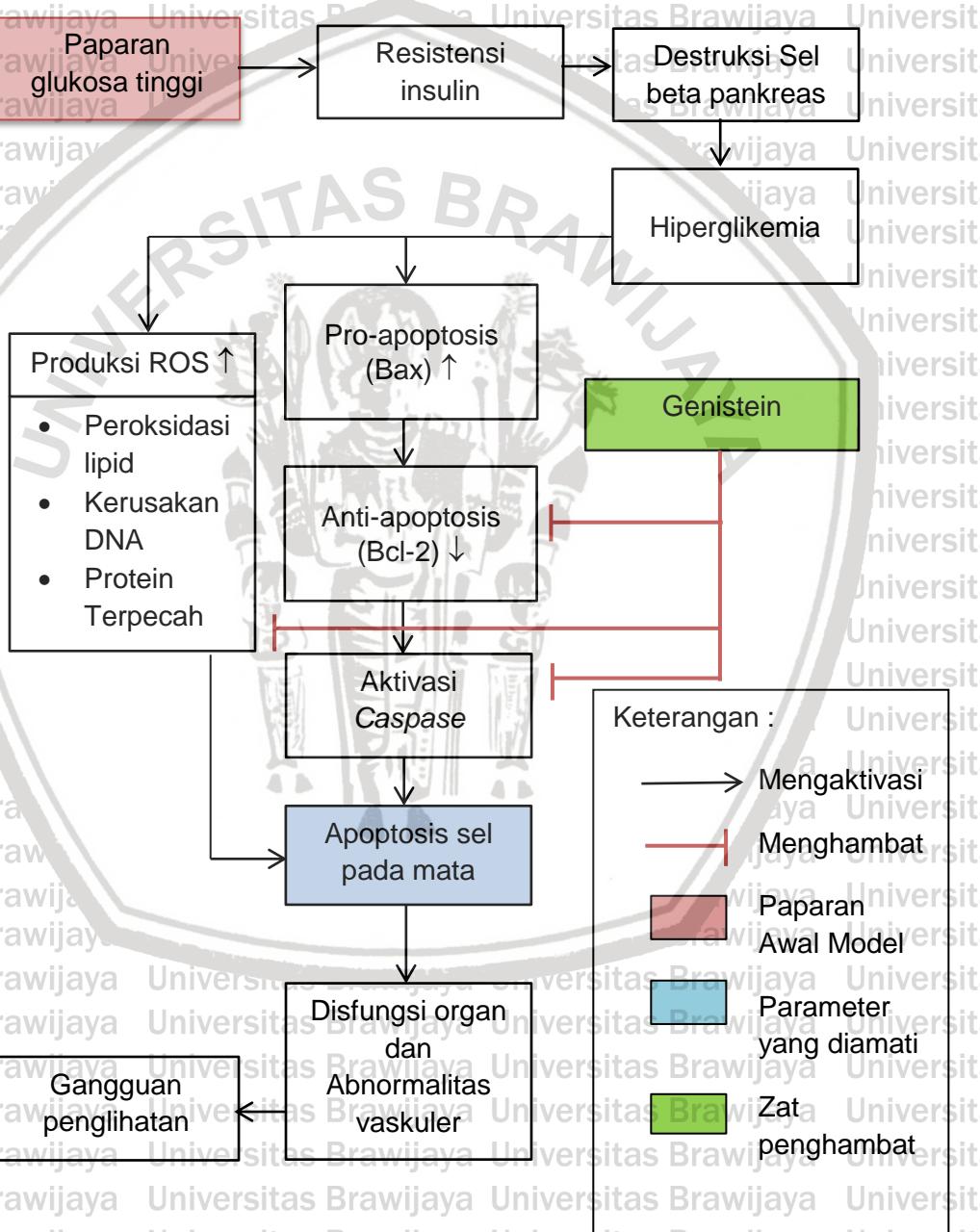
Gambar 2.9 Embrio Zebrafish Usia 120 Hpf (ZFIN, 1996)



BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Paparan tinggi glukosa pada embrio zebrafish akan menyebabkan terjadinya kondisi hiperglikemia. Hiperglikemia akan merangsang sekresi insulin pada pankreas yang lama-kelamaan dapat menyebabkan resistensi insulin (Tjandrawinata, 2016) dan kerusakan sel beta pankreas sehingga mengalami penurunan dalam memenuhi kebutuhan insulin (Fu *et al.*, 2012). Hiperglikemia memicu terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS), aktivasi caspase dan ketidakseimbangan antara aktivasi protein pro-apoptosis dan anti-apoptosis sehingga dapat meningkatkan terjadinya apoptosis atau kerusakan sel pada organ (Barber *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2015). Selain kerusakan sel, apoptosis yang terjadi juga menyebabkan abnormalitas vaskuler pada mata terutama sel endotel yang bisa memburuk menjadi gangguan penglihatan (Jung *et al.*, 2015). Tingginya produksi ROS akan menyebabkan peroksidasi lipid, kerusakan protein dan kerusakan DNA (Kumar *et al.*, 2015). Akibat tingginya ROS dan apoptosis pada mata karena hiperglikemia juga akan mempengaruhi perkembangan mata (Zhang *et al.*, 2016).

Genistein memiliki efek anti-oksidan yaitu dengan menurunkan produksi ROS (Si dan Liu, 2007). Genistein juga memiliki efek anti-diabetik dengan meningkatkan proliferasi sel beta pankreas dan meningkatkan sekresi insulin sehingga dapat menurunkan terjadinya hiperglikemia (Fu *et al.*, 2012; Gilbert dan Liu, 2013). Genistein memproteksi sel dari apoptosis dengan mengeliminasi pengaktivasi caspase karena perubahan protein pro dan anti-apoptosis yang dimana aktivasi caspase ini mengakibatkan kematian sel (Adams *et al.*, 2012). Selain itu, genistein dapat meningkatkan Bcl-2 (*B cell lymphoma* 2) sebagai protein anti-apoptosis (Yousefi *et al.*, 2017). Maka dari

itu, pemberian genistein diharapkan dapat menurunkan apoptosis pada mata.

3.2 Hipotesis Penelitian

Genistein dapat menurunkan apoptosis pada mata embrio zebrafish yang dipapar glukosa tinggi.

The logo of Universitas Brawijaya is a circular emblem. The outer ring contains the text "UNIVERSITAS BRAWIJAYA" in a bold, sans-serif font. Inside the circle, there is a central figure of a person standing, holding a spear and shield, flanked by two smaller figures. The entire logo is rendered in a light gray color, serving as a watermark across the page.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental yang dikerjakan di laboratorium secara *in vivo* dengan menggunakan metode rancangan *posttest only control group design* untuk mengetahui pengaruh pemberian genistein dalam menurunkan apoptosis pada mata embrio zebrafish yang dipapar glukosa tinggi.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah embrio zebrafish spesies *Danio rerio* yang berusia 72 hpf (*hours post fertilization*). Embrio diperoleh dari zebrafish dewasa yang dipelihara di dalam aquarium.

4.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Pengambilan telur zebrafish dilakukan dengan penyeleksian terlebih dahulu dengan pengelompokan kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi adalah telur yang telah terfertilisasi dan telur yang akan dikultivir adalah telur yang berusia kurang dari 2 hpf, sedangkan kriteria eksklusi adalah telur yang infertil, telur yang rusak, tidak utuh, berwarna putih pucat, dan berusia lebih dari sama dengan 2 hpf.

4.2.3 Sampel Penelitian dan Teknik Pengambilan Sampel

Estimasi besar sampel untuk masing-masing metode penelitian

memenuhi kriteria perhitungan sampel sebagai berikut (Solimun, 2001):

$$p(n - 1) \geq 15$$

$$6(n - 1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

Keterangan:

P: Jumlah perlakuan

N: Jumlah sampel per kelompok

Jumlah sampel = Jumlah perlakuan × Jumlah sampel per kelompok

$$= 6 \text{ kelompok} \times 4 \text{ sampel per kelompok}$$

$$= 24 \text{ sampel}$$

Jumlah sampel yang digunakan adalah 24 sampel pada satu kali eksperimen. Pengambilan sampel dilakukan dengan *simple random sampling* yaitu pengambilan embrio zebrafish secara acak.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Faal dan Laboratorium Biomedik

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Budidaya

Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya pada

Oktober 2018.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis paparan genistein pada embrio zebrafish yang dipapar glukosa tinggi.

4.4.2 Variabel Terkait

Variabel terkait pada penelitian ini adalah apoptosis pada mata embrio zebrafish

4.4.3 Variabel Kendali

Variabel kendali pada penelitian ini adalah kondisi paparan glukosa tinggi terkait dosis glukosa, suhu pada aquarium dan inkubator, pencahayaan, dan waktu paparan genistein.

4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah :

- Zebrafish (*Danio rerio*) merupakan hewan coba jenis *wild type* yang dipelihara dan diberi makan sesuai dengan cara kerja. Zebrafish dewasa dilakukan proses peneluran (*breeding*) untuk mendapatkan telur embrio yang akan digunakan dalam penelitian yaitu pengamatan apoptosis pada mata embrio zebrafish usia 72 hpf.

Pemberian glukosa tinggi dengan kadar 5% pada embrio zebrafish dimulai sejak usia 24 hpf yang telah dilakukan dekorionisasi. Glukosa dipaparkan hingga embrio berusia 72 hpf. Glukosa dilarutkan pada medium embrio yang diganti setiap hari (tiap 24 jam).

- Genistein (Sigma-adlrich G6649-5MG) merupakan senyawa yang diberikan pada saat embrio berusia 24 hpf yang telah didekorionisasi hingga embrio berusia 72 hpf bersamaan dengan glukosa 5%. Dosis genistein yang diberikan 0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM . Genistein diganti setiap 24 jam. Pengaruh genistein pada kondisi paparan glukosa tinggi dilihat melalui apoptosis pada mata embrio zebrafish.
- Apoptosis pada mata merupakan variabel yang diukur dengan pemeriksaan mikroskop fluorescence setelah dilakukan pewarnaan *acridine orange* yaitu pewarnaan untuk melihat apoptosis sel yang akan meresap kedalam membran sel dan berikatan dengan DNA yang berada pada inti sel. Setelah dilakukan pemeriksaan mikroskop fluorescence, dilanjutkan dengan menghitung jumlah sel apoptosis dengan software *ImageJ* yaitu menghitung sel yang berpendar hijau sebagai penanda apoptosis pada mata embrio zebrafish.

4.6 Bahan dan Alat

4.6.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah zebrafish dewasa, medium embrio zebrafish yang terdiri dari 0,04% CaCl_2 , 1,63% MgSO_4 , 1% NaCl dan 0,03% KCl dalam air steril, glukosa 5%, genistein (Sigma-adlrich G6649-5MG) yang dilarutkan dalam dimethylsulfoxide (DMSO) dengan dosis 0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM , *acridine orange* dengan dosis 5 $\mu\text{g/ml}$ sebagai pewarnaan fluorescence, *tricaine* 0,016% untuk anestesi, PTU (Phenylthiourea) 0,3% untuk menghilangkan warna pigmen pada embrio,

agarose 1% untuk memposisikan embrio, serta artemia sebagai pakan ikan.

4.6.2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuarium kapasitas 60 liter, keranjang berjala, tanaman artificial, batu pemberat, timer, lampu, asturo berwarna hitam, filter akuarium, aerator, termometer, heater akuarium, ember/baskom, pipet plastik, selang, cawan petri, gelas beker, mikropipet, *white tip, yellow tip, blue tip*, tabung falcon, *well-plate* dengan 6 sumur, gelas ukur 100 ml, 200 ml, 500 ml, inkubator, *hotplate stirrer, vortex, alumunium foil, spatula/sendok, jarum spuit modifikasi, mikroskop cahaya, mikroskop stereo, mikroskop fluorescence, gelas objek, kotak kosong.*

4.7 Cara Kerja Penelitian

4.7.1 Pemeliharaan Zebrafish Dewasa

Pemeliharaan zebrafish membutuhkan akuarium berukuran 60 liter, pengaturan suhu air dalam rentang suhu 25-30°C dan pengaturan cahaya dalam 14 jam periode terang dan 10 jam periode gelap (Anggraeni dkk., 2014).

4.7.2 Pemberian Pakan Zebrafish Dewasa

Zebrafish dapat diberikan makanan yang bersifat *lived food* (udang air asin). Telur udang air asin (*Artemia sp.*) dapat ditetaskan di laboratorium dengan menggunakan cara berikut.

a. Larutkan *red sea salt* (garam) dalam air dengan dilakukan peng-aerasi-an dengan tabung aerasi.

b. Masukkan air asin dan tambahkan telur udang dengan konsentrasi

1,2 sdm/liter. Aerasikan dengan menggunakan pompa udara dan

biarkan Artemia sp. menetas dalam waktu kurang lebih 48 jam.

Untuk mengumpulkan Artemia sp., lepaskan pipa udara dan biarkan

selama 4-5 menit dan tidak lebih dari 10 menit. Artemia sp. yang telah

menetas akan berkumpul dibawah wadah penetas

a. Kumpulkan Artemia sp. dengan cara menepuk bagian bawah

wadah penetas. Pisahkan aliran pertama yang mana berisi Artemia

yang belum menetas

b. Setelah itu, kumpulkan Artemia sp yang telah menetas untuk

diberikan sebagai makanan zebrafish

c. Pisahkan artemia dari air asin dengan menggunakan jaring. Bilas

Artemia dari jaring tersebut ke dalam kontainer menggunakan air

Artemia yang telah dikumpulkan akan terkonsentrasi di bagian bawah

kontainer yang memberikan warna oranye. Berikan Artemia kepada

zebrafish dengan menggunakan pipet. Jumlah makan yang dipasok

disesuaikan dengan jumlah individu. Dalam pemberian makan tidak boleh

berlebihan karena dapat meningkatkan kadar nitrat dalam air, mungkin

mempengaruhi perkembangan ikan, viabilitasnya, atau bahkan mati

(Avdesh et al., 2012). Zebrafish diberikan makan artemia *Nauplii* yang

telah di kultur sebanyak 2-3 kali sehari (Westerfield, 2007).

4.7.3 Peneluran (Breeding) dan Kultur Embrio Zebrafish

Proses breeding diperlukan wadah berjala yang dirancang pada

akuarium yang dimulai setelah pemberian makan terakhir. Perbandingan

zebrafish jantan dewasa dan dewasa betina adalah 2:1 untuk melakukan

breeding (Westerfield, 2000). Telur diambil dalam 15-25 menit setelah periode terang dimulai. Setelah telur-telur zebrafish yang dipanen, telur

dibersihkan dari debris dengan medium embrio (Anggraeni dkk., 2014).

Selanjutnya kultur embrio dilakukan dengan cara telur yang

terfertilisasi dipisahkan dan diletakkan pada *well-plate* berisi 6 sumur

(maksimal 30 embrio/8 mL embrio medium/sumur) dan diinkubasi pada

suhu $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Medium embrio diganti tiap 24 jam (Anggraeni dkk.,

2014).

4.7.4 Pelepasan Cangkang Telur

Dekorionisasi dilakukan dibawah mikroskop stereo. Pelepasan cangkang telur menggunakan jarum spuit 1 cc modifikasi yaitu jarum spuit yang direkatkan dengan sebatang kayu atau sumpit. Dekorionisasi ini dapat membantu mempercepat penyerapan karena korion pada embrio bisa menghambat pertukaran cairan sekitar (Harvey *et al.*, 1983).

4.7.5 Pemaparan Glukosa pada Embrio Zebrafish

Kadar paparan glukosa pada embrio zebrafish adalah 5%. Glukosa 5 mg dilarutkan dalam 100 ml medium embrio. Pada usia embrio 24 hpf dilakukan pelepasan cangkang telur atau dekorionisasi kemudian dipaparkan glukosa untuk pertama kalinya dan diganti setiap 24 jam. Dengan pemberian glukosa 2-3% mampu memberikan efek hiperglikemia pada embrio zebrafish (Powers *et al.*, 2010)

4.7.6 Pemaparan Genistein pada Embrio Zebrafish

Embrio zebrafish pada usia 24 hpf diberikan paparan genistein dengan 3 dosis yaitu $0,5 \mu\text{M}$; $1 \mu\text{M}$; $2 \mu\text{M}$ bersamaan dengan pemaparan

glukosa 5% dalam medium. Penentuan dosis tersebut berdasarkan penelitian yang menyatakan bahwa pada dosis genistein 2,5 μM tidak menimbulkan efek genistein yang pro-apoptosis, sedangkan dosis genistein 5 μM tidak bekerja sebagai anti-apoptosis melainkan dapat menyebabkan apoptosis (Sassi-Messai *et al.*, 2009).

4.7.7 Menghilangkan Pigmentasi Embrio Zebrafish

Melanogenesis atau pembentukan pigmen dimulai saat embrio pada epithelium retinal hingga kulit bagian dorsal dan lateral. Pemberian phenylthiourea (PTU) dapat menghambat pembentukan pigmen embrio zebrafish dengan pemberian yang berkelanjutan (Karlsson *et al.*, 2001).

4.7.8 Anestesi Embrio Zebrafish

Tricaine merupakan bahan yang paling sering digunakan untuk melakukan anestesi pada ikan (Topic Popovic *et al.*, 2012)

4.7.9 Memposisikan Embrio Zebrafish

Pemberian agarose 1% dapat mengurangi pergerakan embrio zebrafish sehingga dapat memposisikan embrio sesuai dengan orientasi yang dibutuhkan yaitu posisi lateral (Wittbrodt *et al.*, 2014)

4.7.10 Pewarnaan Acridine Orange dan Pemeriksaan Mikroskop Fluorescence

Embrio zebrafish usia 72 hpf dilakukan pewarnaan dalam kondisi lingkungan gelap dengan menggunakan acridine orange (Sigma-Aldrich) 5 $\mu\text{g/ml}$ pada medium embrio selama 1 jam kemudian dibilas dengan medium embrio sebanyak tiga kali (Robu *et al.*, 2007; Beckman, 2017).

Pewarnaan *acridine orange* berguna untuk melihat pendaran warna hijau sebagai tanda adanya sel yang mengalami apoptosis pada mata. *Acridine*

orange akan menyerap dengan mudah kedalam membran sel dan akan memberikan warna hijau pada inti sel atau nukleus yaitu akan berikatan dengan DNA sedangkan apabila berikatan dengan lisosom sel akan menghasilkan pendaran warna merah (Vermes dan Haanen, 1994; Htut et

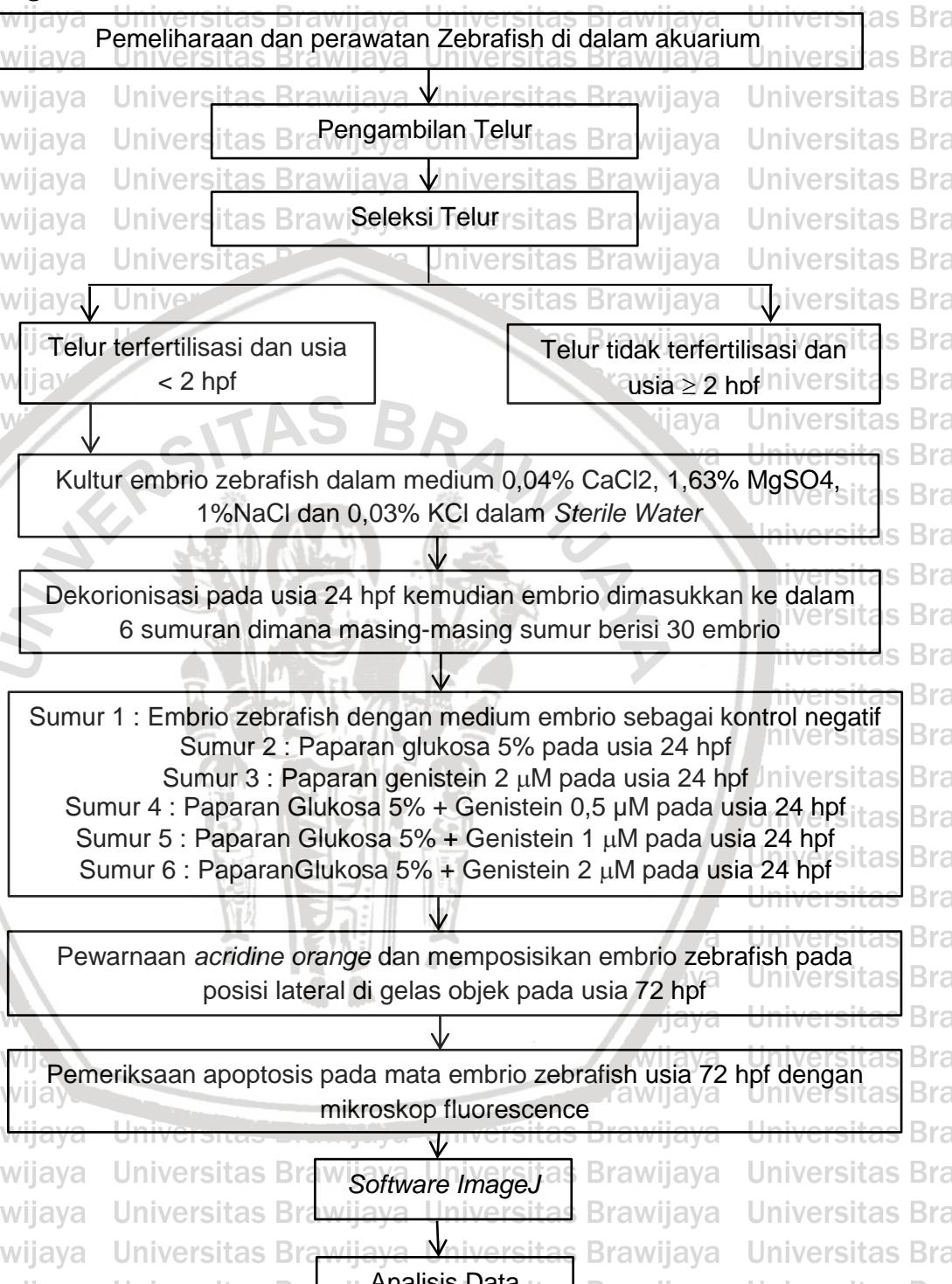
al., 2002; Ribble et al., 2005). Pendaran warna hijau akan terlihat dengan

menggunakan mikroskop fluorescence tipe Olympus IX-71 Inverted

Microscope dengan filter *acridine orange* (Beckman, 2017).



4.7.11 Bagian Alur Penelitian



4.8 Analisis Data

Analisa statistik yang digunakan adalah *One-way analysis of variance* (ANOVA) dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* dengan software SPSS 22 dan dianggap bermakna apabila nilai $p < 0,05$. Apabila data tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji ANOVA maka analisa statistik yang digunakan adalah uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjut dengan uji *Mann-Whitney* dengan software yang sama dan apabila nilai $p < 0,05$ maka dianggap bermakna.



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Hasil Penelitian

Pada penelitian ini terdapat 6 kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif (medium embrio (ME)), kontrol positif (glukosa 5%), genistein 2 μM , glukosa 5% + genistein 0.5 μM , glukosa 5% + genistein 1 μM , dan glukosa 5% + genistein 2 μM . Seluruh paparan dimulai pada usia 24 hours post-fertilization (hpf) setelah embrio dilakukan dekorionisasi.

Pemeriksaan apoptosis pada mata menggunakan mikroskop fluorescence dilakukan pada usia 72 hpf dan hasil pemeriksaan apoptosis dianalisa dengan menggunakan program *ImageJ* untuk mendapatkan data kuantitatif.

Pemeriksaan apoptosis pada mata dengan menggunakan mikroskop fluorescence menunjukkan bahwa pada kelompok glukosa 5% ditemukan gambaran apoptosis dimana terdapat pendararan berwarna kehijauan yang tampak di area mata embrio zebrafish posisi lateral dibandingkan dengan gambaran apoptosis pada mata embrio zebrafish kelompok kontrol negatif. Gambaran apoptosis pada mata embrio zebrafish kelompok genistein 2 μM lebih tampak dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yang dimana pada kelompok genistein 2 μM menunjukkan adanya pendararan warna hijau yang lebih banyak walaupun tidak sebanyak pada

kelompok glukosa 5%. Pada kelompok glukosa 5% + genistein 0,5 μM , glukosa 5% + genistein 1 μM , dan glukosa 5% + genistein 2 μM menunjukkan bahwa gambaran apoptosis pada mata menurun

dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (glukosa 5%) dan mendekati gambaran apoptosis pada mata embrio zebrafish kelompok kontrol negatif (Gambar 5.1).

Tabel 5.1 menunjukkan data hasil pemeriksaan mikroskop

fluorescence yang dilakukan analisis dengan program *ImageJ* untuk mendapatkan data kuantitatif. Data tersebut juga disajikan dalam bentuk

grafik pada gambar 5.2. Hasil analisis dengan program *ImageJ*

menunjukkan bahwa jumlah rata-rata apoptosis pada mata embrio

zebrafish pemberian glukosa 5% meningkat yaitu 26.236 *density cell* pada

area salah satu mata embrio zebrafish, sedangkan pemberian genistein

dosis 0,5 μM , 1 μM , dan 2 μM pada embrio zebrafish yang dipapar

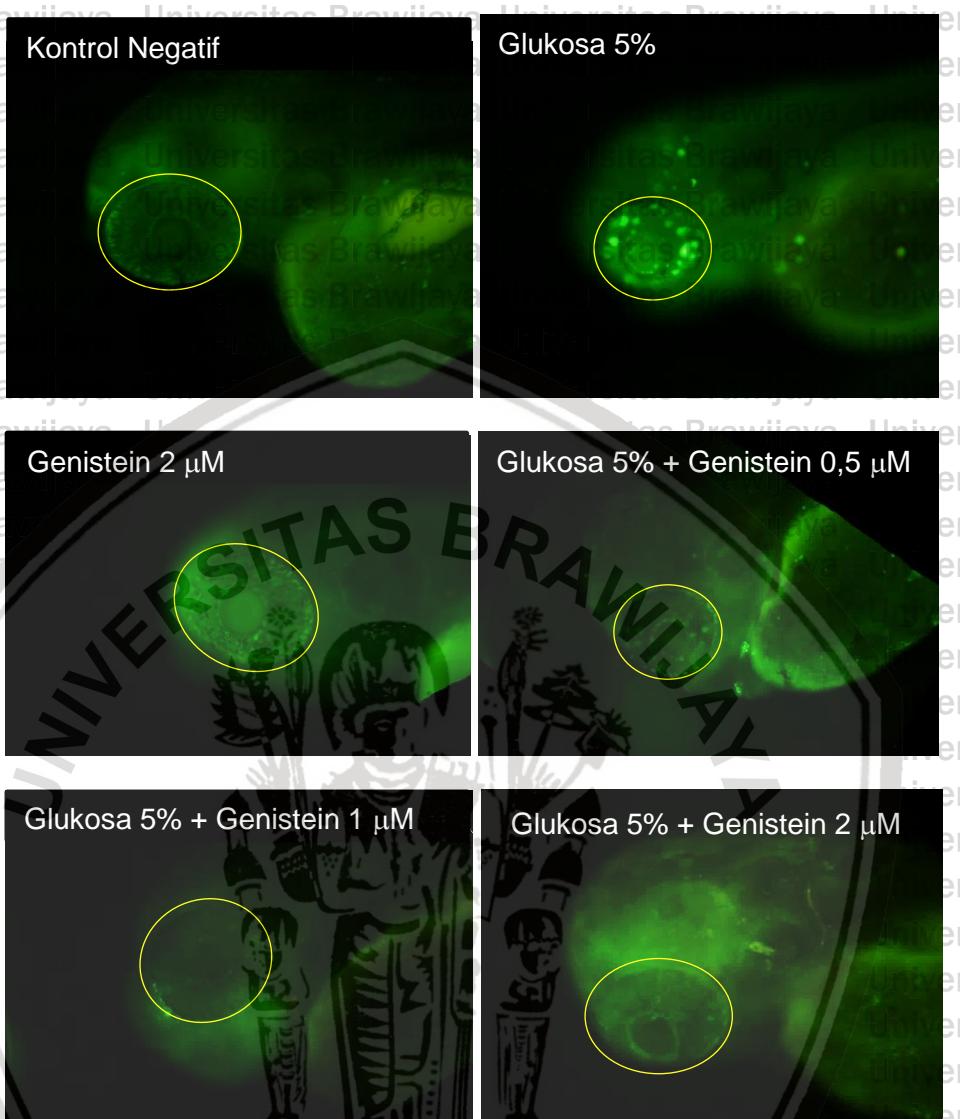
glukosa tinggi dapat menurunkan apoptosis pada mata yang dimana

dosis genistein 1 μM adalah dosis yang paling efektif dalam menurunkan

apoptosis pada mata. Namun, pada pemberian genistein 2 μM tanpa

glukosa 5% menunjukkan adanya peningkatan apoptosis pada mata

embrio zebrafish.



Gambar 5.1 Hasil Pemeriksaan Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish Usia 72 hpf dengan Mikroskop Fluorescence

Tabel 5.1 Pengaruh Pemberian Genistein terhadap Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish yang Dipapar Glukosa Tinggi

Sampel	Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish Usia 72 hpf (density cell pada salah satu area mata)					
	Kontrol Negatif (ME)	Glukosa 5%	Genistein 2 μM	Glukosa 5% + Genistein 0,5 μM	Glukosa 5% + Genistein 1 μM	Glukosa 5% + Genistein 2 μM
1	9.480	29.680	16.542	14.958	10.710	11.490
2	11.828	32.075	13.561	15.733	11.184	15.316
3	10.503	22.974	14.409	14.048	7.726	11.902
4	9.555	20.213	18.953	14.223	6.644	13.108
Mean	10.342	26.236	15.866	14.741	9.066	12.954
SD	± 1.095	± 5.564	± 2.410	± 0.770	± 2.225	± 1.718

Keterangan : ME: Medium Embrio; SD: Standar Deviasi

5.2 Analisa Data

Analisa statistik yang digunakan adalah *One-way analysis of variant* (ANOVA) dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* dengan software SPSS 22 dan dianggap bermakna apabila nilai $p < 0,05$. Apabila data tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji ANOVA maka analisa statistik yang digunakan adalah uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjut dengan uji *Mann-Whitney* dengan software yang sama dan apabila nilai $p < 0,05$ maka dianggap bermakna.

5.2.1 Normalitas Distribusi Data

Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*.

Sebuah data dikatakan terdistribusi normal apabila $P > 0,05$. Pada hasil uji normalitas data menunjukkan bahwa data memiliki distribusi normal, yaitu $P = 0,307$ untuk kelompok kontrol negatif, $P = 0,564$ pada kelompok glukosa 5%, $P = 0,693$ untuk kelompok Genistein 2 μ M, $P = 0,543$ untuk kelompok glukosa 5% + genistein 0,5 μ M, $P = 0,342$ untuk kelompok

glukosa 5% + genistein 1 μM , dan $P = 0,455$ untuk kelompok glukosa 5% + genistein 2 μM (Tabel 5.2).

Tabel 5.2 Hasil Pengujian Normalitas Data Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish

Tests of Normality

Kelompok Paparan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Kontrol Negatif	.264	4	.	.872	4	.307
Kontrol Positif (Glukosa 5%)	.232	4	.	.925	4	.564
Genistein 2 μM	.227	4	.	.946	4	.693
Glukosa 5% + Genistein 0.5 μM	.249	4	.	.921	4	.543
Glukosa 5% + Genistein 1 μM	.270	4	.	.881	4	.342
Glukosa 5% + Genistein 2 μM	.230	4	.	.905	4	.455

5.2.2 Homogenitas Data

Untuk mengetahui apakah data yang dimiliki memiliki homogenitas ragam data atau tidak maka dilakukan uji statistik Levene. Hasil pengujian data didapatkan signifikansi < 0.05 yang artinya data tersebut tidak homogen yaitu $P < 0,001$. (Tabel 5.3).

Tabel 5.3 Uji Homogenitas Data Apoptosis pada Mata

Test of Homogeneity of Variance					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish Usia 72 hpf	Based on Mean	10.779	5	18	.000
	Based on Median	9.448	5	18	.000
	Based on Median and with adjusted df	9.448	5	10.947	.001
	Based on trimmed mean	10.760	5	18	.000

5.2.3 Uji Kruskal-Wallis

Hasil uji data sebelumnya menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan data tidak homogen maka data tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji One-way ANOVA sehingga dilakukan uji *Kruskal-Wallis*.

Tabel 5.4 Hasil Uji Analisis Kruskal-Wallis Apoptosis pada Mata

Ranks			
	Kelompok Paparan	N	Mean Rank
Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish Usia 72 hpf	Kontrol Negatif	4	5.25
	Kontrol Positif (Glukosa 5%)	4	22.50
	Genistein 2 μ M	4	16.50
	Glukosa 5% + Genistein 0.5 μ M	4	15.25
	Glukosa 5% + Genistein 1 μ M	4	4.00
	Glukosa 5% + Genistein 2 μ M	4	11.50
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}			
		Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish Usia 72 hpf	
Chi-Square			19.950
Df			5
Asymp. Sig.			.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok Paparan

Pada hasil analisis data didapatkan nilai signifikansi $P = 0,001$ ($p <$

$< 0,05$), yang artinya terdapat perbedaan yang bermakna pada kondisi

apoptosis pada mata antar keenam kelompok (Tabel 5.4)

5.2.4 Uji Mann-Whitney

Setelah dilakukan uji Kruskal-Wallis dengan hasil yang signifikan ($P =$

$0,001$), kemudian dilanjutkan uji Mann-Whitney untuk mengetahui

kelompok-kelompok yang memiliki perbedaan berarti atau nilai signifikansi

$< 0,05$ yang dapat dilihat pada tabel 5.5.

Tabel 5.5 Nilai Signifikansi Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish Antar Keenam Kelompok Paparan

Kelompok	Kontrol Negatif	D5%	G 2 μ M	D5% + G 0,5 μ M	D5% + G 1 μ M	D5% + G 2 μ M
ME		0,021	0,021	0,021	0,564*	0,043
D5%	0,021		0,021	0,021	0,021	0,021
G 2 μ M	0,021	0,021		0,564*	0,021	0,083*
D5% + G 0,5 μ M	0,021	0,021	0,564*		0,021	0,149*
D5% + G 1 μ M	0,564*	0,021	0,021	0,021		0,021
D5% + G 2 μ M	0,043	0,021	0,083*	0,149*	0,021	

Keterangan: * : tidak signifikan atau tidak ada perbedaan yang bermakna; ME : Medium Embrio atau Kontrol Negatif; D5% : Glukosa 5%; G : Genistein.

Kontrol Negatif memiliki perbedaan yang berarti dengan kelompok

glukosa 5%, kelompok genistein 2 μ M, kelompok glukosa 5% +

genistein 0,5 μ M dan kelompok glukosa 5% + genistein 2 μ M. Namun,

pada kontrol negatif tidak memiliki perbedaan yang bermakna dengan

kelompok glukosa 5% + genistein 1 μ M.

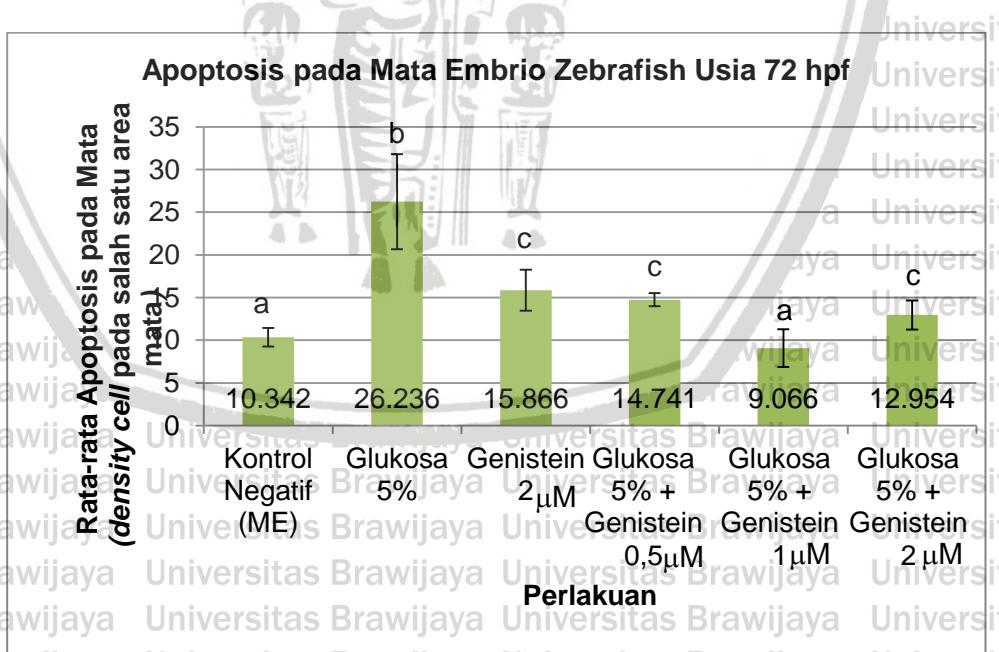
- Kelompok glukosa 5% memiliki perbedaan yang berarti dengan semua kelompok lainnya.
- Kelompok genistein 2 μM memiliki perbedaan yang bermakna dengan kelompok lainnya kecuali dengan kelompok glukosa 5% + genistein 0,5 μM dan kelompok glukosa 5% + genistein 2 μM .
- Kelompok glukosa 5% + genistein 0,5 μM memiliki perbedaan yang bermakna dengan kelompok lainnya kecuali dengan kelompok genistein 2 μM dan kelompok glukosa 5% + genistein 2 μM .
- Kelompok glukosa 5% + genistein 1 μM tidak memiliki perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol negatif.
- Kelompok glukosa 5% + genistein 2 μM memiliki perbedaan bermakna dengan kelompok lain kecuali kelompok genistein 2 μM dan kelompok glukosa 5% + genistein 0,5 μM .

Tabel 5.6 Kelompok Subset Berdasarkan Nilai Signifikansi Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish Antar Keenam Kelompok Paparan

Kelompok	a	b	C
Kontrol Negatif	Kontrol negatif		
Glukosa 5%		Glukosa 5%	
Genistein 2 μM			Genistein 2 μM
Glukosa 5% + Genistein 0,5 μM			Glukosa 5% + Genistein 0,5 μM
Glukosa 5% + Genistein 1 μM	Glukosa 5% + Genistein 1 μM		
Glukosa 5% + Genistein 2 μM			Glukosa 5% + Genistein 2 μM

Huruf yang berbeda (a, b, c) pada kelompok paparan (Gambar 5.2)

dan tabel 5.6) menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna sesuai dengan tabel 5.5 yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$). Huruf yang sama pada kelompok kontrol negatif dengan kelompok Glukosa 5% + Genistein 1 μM menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan diantara kedua kelompok tersebut. Huruf yang sama antara kelompok Genistein 2 μM , kelompok Glukosa 5% + Genistein 0,5 μM dan kelompok Glukosa 5% + Genistein 2 μM juga menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan diantara ketiga kelompok tersebut. Pada kelompok glukosa 5% menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna dengan kelompok lainnya.



Gambar 5.2 Grafik Pengaruh Pemberian Genistein terhadap Apoptosis pada Mata Embrio Zebrafish yang Dipapar Glukosa Tinggi

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa paparan glukosa tinggi dapat menyebabkan apoptosis pada mata embrio zebrafish yaitu dengan rata-rata jumlah apoptosis adalah 26.236 *density cell*. Hal ini terjadi melalui aktivasi caspase-3 yang menyebabkan abnormalitas vaskuler dimana terjadi kerusakan pada sel endothelial pada mata. Rusaknya vaskuler pada mata khususnya retina akan menyebabkan kerusakan *blood-retinal-barrier* (Barber *et al.*, 2006). Selain itu, kondisi paparan glukosa tinggi atau hiperglikemia dapat menyebabkan peningkatan protein pro-apoptosis seperti Bax (*Bcl-2 associated X protein*) dan penurunan protein anti-apoptosis seperti Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) sehingga juga memicu aktivasi caspase yang akan meningkatkan aktivitas proteolitik sehingga terjadi apoptosis pada mata (Kumar *et al.*, 2015). Disamping itu, penurunan insulin dan kondisi paparan glukosa tinggi atau hiperglikemia dapat menyebabkan peningkatan reactive oxygen species (ROS) yang mengarah pada kondisi stress oksidatif sehingga terjadi oksidasi lipid, protein, dan DNA yang berujung apoptosis pada mata (Mugoni *et al.*, 2014; Kowluru *et al.*, 2015).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa apoptosis terkait dengan peningkatan aktivasi caspase-1, -2, -6, -8, -9 pada retina yang lebih meningkat pada tikus diabetes setelah 2 bulan dalam kondisi hiperglikemia (Mohr *et al.*, 2002). Penelitian lain juga membuktikan adanya peningkatan reaksi infiliasi yang menyebabkan apoptosis pada mata melalui aktivasi

caspase-3 pada retina tikus yang selama 3 bulan diberikan paparan streptozotocin yaitu bahan penginduksi diabetes (Krady *et al.*, 2005).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada pemberian genistein 2 μM saja terjadi peningkatan apoptosis pada mata embrio zebrafish yaitu 15.866 density cell dimana 1,53 kali dibanding dengan kontrol negatif yaitu 10.342 density cell. Hal ini dikarenakan genistein memiliki efek pro-apoptosis selain efek anti-apoptosis. Hal ini dibuktikan pada penelitian lain yang menunjukkan bahwa pemberian genistein pada tikus dapat menginduksi apoptosis pada retinal pigment epithelial (RPE) tergantung dengan waktu dan jumlah dosisnya yaitu apabila semakin tinggi konsentrasi dan semakin lama waktu paparan genistein maka apoptosis semakin meningkat (Yoon *et al.*, 2000).

Pada penelitian dengan model embrio zebrafish lain menunjukkan bahwa pemberian genistein 2 μM dapat terjadi penurunan atau secara komplit menghambat pertumbuhan pembuluh darah sehingga mengganggu perkembangan embrio zebrafish (Bakkiyanathan *et al.*, 2010)

Apoptosis yang terjadi akibat pemberian genistein berhubungan dengan ratio Bax/Bcl-2, mitokondria dalam melepaskan sitokrom C dan aktivasi caspase melalui jalur apoptosis mitokondrial. Selain itu, genistein dalam memicu apoptosis dapat melalui peningkatan regulasi dari Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-alfa) dan ligan Fas sehingga aktivasi caspase meningkat yang dapat menyebabkan kerusakan DNA (Corvianindya R dan Joelijanto, 2003; George *et al.*, 2010). Pada penelitian lain, efek apoptosis pada mata juga bermanfaat untuk menekan proliferasi dan pertumbuhan sel retinoblastoma pada manusia dengan meningkatkan regulasi gen supresi tumor yaitu miR-145 (Wei *et al.*, 2017).

Hasil penelitian ini juga menunjukkan pemberian genistein dapat

menurunkan apoptosis pada mata yaitu pada dosis genistein 0,5 μM (14.741

density cell), dosis 1 μM (9,066 *density cell*) dan dosis 2 μM (12,952 *density*

cell) dibandingkan dengan apoptosis pada mata pemberian glukosa 5% saja

yaitu 26.236 *density cell*. Hal ini dikarenakan genistein dapat menstimulasi

proliferasi sel beta pankreas dalam mensekresikan insulin melalui

peningkatan protein *cyclin D1* sebagai regulator pertumbuhan sel beta

pankreas sehingga dapat menurunkan risiko diabetes maupun

komplikasinya pada mata (Fu *et al.*, 2010). Selain itu, pada penelitian lain,

genistein dapat menurunkan apoptosis melalui peningkatan anti-apoptosis

Bcl-2 dan penurunan *caspase-3* penginduksi apoptosis pada tikus diabetes

yang dilakukan ovariectomy yaitu pengangkatan ovarium karena genistein

memiliki sifat fitoestrogen yang dapat berikatan dengan reseptor estrogen

(Yousefi *et al.*, 2017). Pemberian genistein dosis 10 mg/kg, 30 mg/kg, 90

mg/kg pada hewan coba tikus dengan penyakit degeneratif juga dapat

menghambat jalur apoptosis mitokondrial dengan ditemukan penurunan

sitokrom C (Wang, 2016). Penelitian lainnya menunjukkan bahwa genistein

dapat menurunkan marker inflamasi seperti *nuclear factor kappa B (p65)*,

phosphorylated inhibitory kappa B alpha, *C-reactive protein*, *tumor necrosis*

factor-alpha dan menurunkan marker stress oksidatif (*glutathione*

peroxidase, *heme oxygenase-1*, *superoxide dismutase*) sehingga

menurunkan apoptosis (Min dan Yunsook, 2013)

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian genistein dengan

dosis 0,5 μM , 1 μM , dan 2 μM dapat menurunkan apoptosis pada mata

embrio zebrafish yang dipapar glukosa tinggi. Sedangkan, dosis genistein

yang paling efektif dalam menurunkan apoptosis pada mata embrio zebrafish yang dipapar glukosa tinggi adalah $1 \mu\text{M}$.

6.2 Implikasi terhadap Bidang Kedokteran

Pemberian genistein menunjukkan adanya manfaat terapi dalam mencegah terjadinya komplikasi akibat hiperglikemia salah satunya adalah mencegah terjadinya gangguan pada mata berupa gangguan penglihatan dengan cara menurunkan apoptosis pada mata.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah membuktikan pengaruh genistein terhadap apoptosis pada mata embrio zebrafish yang dipapar glukosa tinggi. Pada penelitian ini tidak dilakukan pengukuran terhadap proses metabolisme glukosa dan kadar glukosa darah pada embrio zebrafish. Peneliti mengacu pada penelitian Powers *et al* (2010) yang mengatakan bahwa dosis glukosa 2-3% sudah dapat menyebabkan kondisi hiperglikemia dan pada penelitian ini menggunakan glukosa 5%. Pada penelitian ini juga tidak dilakukan pemeriksaan protein terkait pro- maupun anti-apoptosis seperti aktivasi caspase, Bcl-2, Bax serta kadar reactive oxygen species (ROS). Untuk melengkapi kekurangan dan keterbatasan penelitian ini, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, pemberian genistein dengan dosis 0,5 μM , 1 μM , dan 2 μM dapat menurunkan apoptosis pada mata embrio zebrafish yang dipapar glukosa tinggi. Sedangkan dosis genistein yang paling efektif dalam menurunkan apoptosis pada mata embrio zebrafish yang dipapar glukosa tinggi adalah 1 μM ($p=0,021$ atau $p<0,05$).

7.2 Saran

Penelitian ini dapat dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai:

1. Ekspresi bahan pro-apoptosis dan anti-apoptosis seperti caspase, Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), Bax (*Bcl-2-associated X protein*), dan kadar reactive oxygen species (ROS) seperti pemeriksaan *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) atau *Polymerase Chain Reaction* (PCR).
2. Metode yang lain dalam membuktikan adanya apoptosis pada mata seperti penggunaan *Confocal microscope* atau *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) assay.
3. Mengetahui area atau bagian mata yang mengalami kerusakan atau apoptosis akibat paparan glukosa tinggi seperti pemeriksaan histologi.
4. Genistein dapat dimanfaatkan sebagai bahan anti-apoptosis dalam kondisi paparan glukosa tinggi sehingga dapat dikembangkan untuk penelitian pada organ selain mata atau penelitian pada hewan coba tingkat lebih tinggi seperti tikus.

DAFTAR PUSTAKA

Adams SM, Aksanova MV, Aksenov MY, Mactutus CF, Booze RM. 2012. *Soy Isoflavones Genistein and Daidzein Exert Anti-Apoptotic Actions via a Selective ER-mediated Mechanism in Neurons following HIV-1 Tat₁₋₈₆ Exposure.* PLOS ONE 7(5): e37540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037540>

Allen, David A., Yaqoob, Muhammad M., Harwood, Steven M. 2005. Reviews *Mechanisms of High Glucose-Induced Apoptosis and Its Relationship to Diabetic Complications.* Journal of Nutritional Biochemistry. Volume 16, Issue 12, Pages 705-713

American Academy of Ophthalmology Retina-Vitreous Panel. Preferred Practice Pattern® Guidelines. *Diabetic Retinopathy.* San Francisco, CA: American Academy of Ophthalmology; 2014. Available at: www.ao.org/ppp

American Diabetes Association. 2003. *Gestational Diabetes Mellitus.* Diabetes Care, Volume 26, Supplement 1: s103-s105. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.2007.S103>

Anggraeni P, Devi., Aurora, Habiba., Lyrawati, Diana. 2014. *Efek Waktu Paparan Genistein terhadap Pembentukan Jantung Embrio Zebrafish.* Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 28, No. 1. Halaman 22-25

Avdesh A¹, Chen M, Martin-Iverson MT, Mondal A, Ong D, Rainey-Smith S, Taddei K, Lardelli M, Groth DM, Verdile G, Martins RN. 2012. *Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction.* J Vis Exp. 18;(69):e4196. doi: 10.3791/4196

Babu, PVA., et al. 2012. *Genistein Prevents Hyperglycemia-Induced Monocyte Adhesion to Human Aortic Endothelial Cells through Preservation of the cAMP Signaling Pathway and Ameliorates Vascular Inflammation in Obese Diabetic Mice.* 1–3. Page: 724-730.

Bakkiyanathan, Antony., Joseph, Asha Mary., Tharani, Loganathan., Malathi, Raghunathan. 2010. *Genistein, the phytoestrogen induces heart-and-soul (has) phenotypes in zebrafish embryo.* Journal of Developmental Biology and Tissue Engineering Vol. 2(2) pp. 18-22

Barber, Alistair J., Gastinger, Matthew J., VanGuilder, Heather D. 2006. *Apoptosis in diabetic retinopathy*. Transworld Research Network 63-88
ISBN: 81-7895-217-3

Beckman, Sarah. 2017. *Using Acridine Orange to Measure Cell Death in Ethanol Treated Zebrafish Embryos : Using Gen5 to Analyze Cell Death in Zebrafish Embryos*. Biotek

Bibliowicz, J., Tittle, R. K., & Gross, J. M. (2011). *Towards a better understanding of human eye disease: insights from the zebrafish, Danio rerio*. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 100, 287-330.
<http://doi.org/10.1016/B978-0-12-384878-9.00007-8>

Borrás, Consuelo., Gambini, Juan., López-Grueso, Raúl., Pallardó, Federico V., Viña, Jose. 2010. *Direct Antioxidant and Protective Effect of Estradiol on Isolated Mitochondria*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. Volume 1802, Issue 1, January 2010, Pages 205-211
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.09.007>

Cole LK, Ross LS. 2001. *Apoptosis in The Developing Zebrafish Embryo*. Dev Biol. Dec 1;240(1):123-42.

Corvianindy R, Yani., Joelijanto, Rudy. 2003. *Jalur Molekuler Mekanisme Apoptosis*. Jurnal Kedokterann Gigi Univenitas Indonesia. 2003: 10 (Edisi Khusus) 69-73

Fu Z¹, Gilbert ER, Pfeiffer L, Zhang Y, Fu Y, Liu D. 2012. *Genistein ameliorates hyperglycemia in a mouse model of nongenetic type 2 diabetes*. Appl Physiol Nutr Metab. 37(3):480-8

Fu, Z., Zhang, W., Zhen, W., Lum, H., Nadler, J., Bassaganya-Riera, J., Liu, D. 2010. *Genistein Induces Pancreatic β -Cell Proliferation through Activation of Multiple Signaling Pathways and Prevents Insulin-Deficient Diabetes in Mice*. Endocrinology, 151(7), 3026–3037. <http://doi.org/10.1210/en.2009-1294>

George J¹, Banik NL, Ray SK. 2010. *Genistein induces receptor and mitochondrial pathways and increases apoptosis during BCL-2 knockdown in human malignant neuroblastoma SK-N-DZ cells*. J Neurosci Res. Mar;88(4):877-86. doi: 10.1002/jnr.22244.

Gilbert, ER., and Liu, Dongmin. 2013. *Anti-diabetic functions of soy isoflavone genistein: mechanisms underlying effects on pancreatic β-cell function*. *Food Funct.* 4(2): 200–212. doi:10.1039/c2fo30199g.

Integrated Taxonomic Information System (online)

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&sear

ch_value=163699#null diakses pada tanggal 5 Desember 2017

International Diabetes Federation <https://www.idf.org/about-diabetes/what-is-diabetes> diakses pada tanggal 28 Oktober 2017

Jung SH¹, Kim YS¹, Lee YR¹, Kim JS. 2016. *High glucose-induced changes in hyaloid-retinal vessels during early ocular development of zebrafish: a short-term animal model of diabetic retinopathy*. *Br J Pharmacol.* Jan;173(1):15-26. doi: 10.1111/bph.13279

Kanwar, YS., Wada, J, Sun, L, Xie, P, Elisabeth,W. 2012. *Diabetic Nephropathy : Mechanisms of Renal Disease Progression*. Experimental and Biology Medicine. Vol 233 : 4-11.

Karlsson J, von Hofsten J, Olsson PE. 2001. *Generating Transparent Zebrafish: A Refined Method to Improve Detection of Gene Expression During Embryonic Development*. Mar Biotechnol (NY). Nov;3(6):522-7.

Kimmel CB¹, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. 1995. *Stages of Embryonic Development of The Zebrafish*. Dev Dyn. Jul;203(3):253-310.

Kinkel, M. D., & Prince, V. E. 2009. On the diabetic menu: zebrafish as a model for pancreas development and function. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 31(2), 139-52.

Kowluru, Renu A; Mishra, Manish. 2015. *Review : Oxidative stress, mitochondrial damage and diabetic retinopathy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. Volume 1852, Issue 11, November 2015, Pages 2474-2483

Krady JK¹, Basu A, Allen CM, Xu Y, LaNoue KF, Gardner TW, Levison SW. 2005. *Minoxycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy*. Diabetes. May;54(5):1559-65.

Kühl C. (1991). *Aetiology of gestational diabetes*. Baillieres Clin Obstet Gynaecol., 5: 279–92

Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C. 2015. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders

L. Arneson, M. Gleeson, V. Connaughton. 2006. *Induction of Hyperglycemia and Microvascular Retinal Complications in Zebrafish, Danio rerio*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci; 47(13):1739.

Lee DS & Lee SH (2001). *Genistein, a soy isoflavone, is a potent alpha-glucosidase inhibitor*. Fed Eur Biochem Soc letters 501:84- 86

Lee JS (2006). *Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin- induced diabetic rats*. Life Sci 79:1578-1584.

Lieschke, G. J., Currie, P. D. 2007. *Animal Models of Human Disease: Zebrafish Swim into View*. Nature Publishing Group. Vol.8 Page: 353- 367

Min Ju Kim and Yunsook Lim. 2013. *Protective Effect of Short-Term Genistein Supplementation on the Early Stage in Diabetes-Induced Renal Damage*. Mediators of Inflammation, Vol. 2013 Article ID 510212, 14 pages. <https://doi.org/10.1155/2013/510212>.

Mohr S, Xi X, Tang J, Kern TS. 2002. *Caspase Activation in Retinas of Diabetic and Galactosemic Mice and Diabetic Patients*. Diabetes. Apr;51(4):1172-9

Moley KH. 2001. *Hyperglycemia and apoptosis: mechanisms for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women*. Trends Endocrinol Metab. 2001 Mar;12(2):78-82.

Mugoni, V., Camporeale, A., & Santoro, M. M. (2014). Analysis of oxidative stress in zebrafish embryos. Journal of visualized experiments : JoVE, (89), 51328. doi:10.3791/51328

Murray, R. K., dkk. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26th ed. New York: McGraw-Hill Companies.

NCBI. 2017. Genistein (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/genistein#section=Compute d-Properties, diakses pada tanggal 4 November 2017) (online),

Nentwich, M. M., & Ulbig, M. W. 2015. *Diabetic Retinopathy - Ocular Complications of Diabetes Mellitus*. World Journal of Diabetes, 6(3), 489–499. http://doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.489

Parichy, D. M., Elizondo, M. R., Mills, M. G., Gordon, T. N., & Engeszer, R. E. 2009. *Normal Table of Post-Embryonic Zebrafish Development: Staging by Externally Visible Anatomy of the Living Fish*. Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists, 238(12), 2975–3015. http://doi.org/10.1002/dvdy.22113

PERKENI. 2015. *Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia*. Penerbit: PB PERKENI. Jakarta

Powers, J.W., Mazilu, J.K., Lin, S., and McCabe, E.R. 2010. *The Effects of Hyperglycemia on Adrenal Cortex Function and Steroidogenesis in the Zebrafish*. Molecular genetics and metabolism 101(4): 421-422 (Journal)

Retrieved [Des, 4, 2017], from the Integrated Taxonomic Information System on-line database, <http://www.itis.gov>.

Ribble, D., Goldstein, N. B., Norris, D. A., & Shellman, Y. G. 2005. *A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates*. BMC biotechnology, 5, 12. doi:10.1186/1472-6750-5-12

Robu, M. E., Larson, J. D., Nasevicius, A., Beiraghi, S., Brenner, C., Farber, S. A., & Ekker, S. C. 2007. *p53 activation by knockdown technologies*. *PLoS genetics*, 3(5), e78.

Rocha F, Dias J, Engrola S, Gavaia P, Geurden I, Dinis MT, Panserat S. 2015. *Glucose Metabolism and Gene Expression in Juvenile Zebrafish (Danio rerio) Challenged with a High Carbohydrate Diet: Effects of an Acute Glucose Stimulus During Late Embryonic Life*. *Br J Nutr*. Feb 14;113(3):403-13. doi: 10.1017/S0007114514003869. Epub 2015 Jan 22.

Sassi-Messai, S., Gibert, Y., Bernard, L., Nishio, S., Ferri Lagneau, K. F., Molina, J., Andersson-Lendahl, M., Benoit, G., Balaguer, P., Laudet, V. (2009). *The phytoestrogen genistein affects zebrafish development through two different pathways*. *PloS one*, 4(3), e4935.

Si H, Liu D. 2007. *Phytochemical genistein in the regulation of vascular function: new insights*. *Curr Med Chem*, 14(24):2581-9

Shim, J.-Y., Kim, K.-O., Seo, B.-H., & Lee, H.-S. 2007. *Soybean isoflavone extract improves glucose tolerance and raises the survival rate in streptozotocin-induced diabetic rats*. *Nutrition Research and Practice*, 1(4), 266–272. <http://doi.org/10.4162/nrp.2007.1.4.266>

Solimun. 2001. *Kaidah dan Metode Analisis Data*. Modul Penataran Analisa Data Universitas Pembangunan Nasional-UPN Surabaya

Sulistyoningrum, Evy. Januari 2014. *Artikel Jurnal Mandala of Health: Perubahan Seluler dan Molekuler pada Nefropati Diabetik*. Vol. 7 No.1 Hal: 514-520

Tjandrawinata, Raymond R. 2016. *Patogenesis Diabetes Tipe 2: Resistensi Insulin dan Defisiensi Insulin*. Dexa Laboratories of Biomolecular Sciences (DLBS) Dexa Medica Group

Topic Popovic, N., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Barisic, J., Jadan, M., Persin Berakovic, A. and Sauerborn Klobucar, R. 2012. *Tricaine methanesulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia*. *Journal of Applied Ichthyology*, 28: 553-564. doi:10.1111/j.1439-0426.2012.01950.x

Vermes I, Haanen C. 1994. *Apoptosis and programmed cell death in health and disease*. *Adv Clin Chem*.31:177-246.

Wang, Y., Cai, B., Shao, J., Wang, T. T., Cai, R. Z., Ma, C. J., Han, T., Du, J. (2016). Genistein suppresses the mitochondrial apoptotic pathway in hippocampal neurons in rats with Alzheimer's disease. *Neural regeneration research*, 11(7), 1153-8.

Wei, D., Yang, L., Lv, B., & Chen, L. (2017). Genistein suppresses retinoblastoma cell viability and growth and induces apoptosis by upregulating miR-145 and inhibiting its target ABCE1. *Molecular Vision*, 23, 385–394.

Westerfield M. (2000). *The Zebrafish Book. Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. (Univ. of Oregon Press, Eugene), 4th Ed

Westerfield, M. 2007. *The Zebrafish Book, 5th Edition; A Guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. Eugene, University of Oregon Press. Paperback. (4th Edition available online)

Wittbrodt JN, Liebel U, Gehrig J. 2014. Generation of orientation tools for automated zebrafish screening assays using desktop 3D printing. *BMC Biotechnol.* May 1;14:36. doi: 10.1186/1472-6750-14-36

Wood, Kurt. 2015. *Zebrafish Embryos Used to Identify Potential Type 1 Diabetes Drugs* (<http://www.diabetes.co.uk/news/2015/aug/zebrafish-embryos-used-to-identify-potential-type-1-diabetes-drugs-95530698.html> diakses pada 7 November 2017)

Yoon HS¹, Rho SH, Jeong JH, Yoon S, Yoo KS, Yoo YH. 2000. Genistein produces reduction in growth and induces apoptosis of rat RPE-J cells. *Curr Eye Res.* Mar;20(3):215-24

Yousefi, H., Karimi, P., Alihemmati, A., Alipour, M. R., Habibi, P., & Ahmadiasl, N. 2017. Therapeutic potential of genistein in ovariectomy-induced pancreatic injury in diabetic rats: The regulation of MAPK pathway and apoptosis. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(9), 1009–1015. <http://doi.org/10.22038/IJBM.2017.9269>

Yuniarto, Ari., Sukandar, E. Y., Fidrianny, Irda., Adnyana, I. K. 2017. Aplikasi Zebrafish (Danio rerio) pada Beberapa Model Penyakit Eksperimental. *Media Pharmaceutica Indonesiana*. Vol. 1 No. 3 Hal: 116-126.

Zebrafish Information Network (ZFIN). 1996. Anatomy of the 24, 48, 72 and 120 hours Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo (https://zfin.org/zf_info/anatomy.html diakses pada 7 November 2017)

Zhang, S.-J., Li, Y.-F., Tan, R.-R., Tsui, B., Huang, W.-S., Huang, Y.-H., He, R.-R. 2016. A new gestational diabetes mellitus model: hyperglycemia-induced eye malformation via inhibition of Pax6 in the chick embryo. Disease Models & Mechanisms, 9(2), 177–186. <http://doi.org/10.1242/dmm.022012>

Zhao L, Chen Q, Diaz Brinton R. 2002. Neuroprotective and neurotrophic efficacy of phytoestrogens in cultured hippocampal neurons. *Exp Biol Med (Maywood)*, 227(7):509-19.

Zhou R, Zhang H, Wang Z, Zhou X, Si J, Gan L, Li J, Liu Y. 2015. The developmental toxicity and apoptosis in zebrafish eyes induced by carbon-ion irradiation. *Life Sci.* Oct 15;139:114-22. doi: 10.1016/j.lfs.2015.08.014. Epub 2015 Aug 24.