

EFEK PAPARAN PROGESTERONE TERHADAP EKSPRESI TIROSIN HIDROKSILASE DAN AKTIFITAS LOKOMOTOR, SERTA PENGARUHNYA TERHADAP KADAR AROMATASE-B PADA EMBRIO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Hanif[✉], Setyawati Soeharto^{**}, Hidayat Sujuti^{***}

Abstrak

Selain berperan dalam sistem reproduksi, progesterone juga mempunyai peran dalam sistem saraf. Progesterone diketahui berperan dalam proses perkembangan sel Purkinje pada tikus. Sel dopaminergik mempunyai peran penting dalam tubuh khususnya fisiologi pergerakan. Perubahan konsentrasi dopamin dapat berakibat pada timbulnya kelainan seperti Parkinson dan amyotropik lateral sklerosis. Pada zebrafish, sel dopaminergik dapat diidentifikasi dengan pengamatan pada tirosin hidroksilase dan pengamatan aktifitas pergerakan dapat dilakukan penilaian aktifitas lokomotor. Pemahaman terhadap hal ini akan membantu upaya terapi penyakit-penyakit neurodegeneratif terkait dopamin. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan pengaruh progesterone pada sel saraf dopaminergik embrio zebrafish melalui pengamatan ekspresi tirosin hidroksilase, aktifitas lokomotor dan peran progesterone dalam regulasi estrogen melalui aromatase B. Sebanyak 30 embrio zebrafish dipelihara dan dikultur dalam cawan dengan terpapar progesterone pada medium dengan konsentrasi 0,1, 1, dan 10 μ M. Penelitian diulang tiga kali menggunakan masa peneluran yang berbeda. Teknik imunositokimia dengan marker fluoresens digunakan untuk mengamati perubahan ekspresi tirosin hidroksilase pada diensefalon saat 48 hpf. Pengukuran aktifitas lokomotor dilakukan dengan kuantifikasi gerakan larva selama 1 menit pada usia 144 hpf. Ekspresi mRNA aromatase B dinilai dengan metode RT-PCR menggunakan primer Arom-B pada usia 48, 72, dan 96 hpf. Analisis statistik menggunakan ANOVA dengan nilai $p < 0,05$. Progesterone menurunkan ekspresi tirosin hidroksilase pada daerah diensefalon embrio zebrafish. Progesterone terbukti menurunkan aktifitas lokomotor larva. Paparan progesterone menyebabkan peningkatan ekspresi mRNA aromatase B terutama pada usia 72 hpf dan 96 hpf. Kesimpulannya, progesterone dapat mempengaruhi sel dopaminergik embrio zebrafish melalui penekanan ekspresi tirosin hidroksilase, aktifitas lokomotor, dan meningkatkan ekspresi mRNA aromatase B.

Kata kunci: aromatase B, progesterone, tirosin hidroksilase, zebrafish.

THE EFFECT OF PROGESTERONE ON TYROSINE HYDROXYLASE EXPRESSION, LOCOMOTOR ACTIVITY, AND ITS ROLE IN AROMATASE B LEVELS IN ZEBRA FISH (*Danio rerio*) EMBRYO

Abstract

Progesterone has a role in the reproductive system, also in the nervous system. Progesterone is known to play a role in the process of Purkinje cell development in mouse. Dopaminergic cells have an important role, especially in the physiology of movement. Dopamine concentration changes can result in several disorders such as Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. In zebrafish, dopaminergic cells can be identified by observing tyrosine hydroxylase, and movement activities can be assessed by locomotor activity observation. A good comprehension of these variables is expected to be able to enhance the therapeutic efforts of dopamine-related neurodegenerative diseases. This research was to verify the effect of progesterone on dopaminergic nerve cells in zebrafish embryos by observing tyrosine hydroxylase expression, locomotor activity and progesterone role in estrogen regulation through aromatase B. There were 30 zebrafish embryos maintained and cultured in each well exposed with progesterone in a medium with concentrations of 0.1, 1, and 10 μ M. The experiment was repeated three times using different stages of breeding ages. Immunocytochemistry with fluorescent markers is used to observe changes in tyrosine hydroxylase expression in diencephalon at 48 hpf. The measurement of locomotor activity was carried out by quantifying larval movements for 1 minute at the age of 144 hpf. Aromatase B mRNA expression was assessed by the RT-PCR method using Arom-B primers at ages 48, 72, and 96 hpf. Statistical analysis was done using ANOVA with a p -value < 0.05 . Progesterone decreases the expression of tyrosine hydroxylase in the diencephalon region of a zebrafish embryo. Progesterone has been shown to reduce locomotor activity of the larvae. Exposure to progesterone resulting in an enhanced expression of aromatase B mRNA especially at the age of 72 hpf and 96 hpf. To conclude, progesterone can affect zebrafish embryos dopaminergic cells by suppressing the expression of tyrosine hydroxylase, locomotor activity and enhance the expression of aromatase B mRNA.

Keywords: aromatase B, progesterone, tyrosine hydroxylase, zebrafish.

* Departemen Ilmu Fisiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

** Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

*** Departemen Biokimia-Biomolekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

✉E-mail: dokterhanip@yahoo.com

Pendahuluan

Progesterone bersama dengan estrogen dikenal sebagai hormon penting dalam sistem reproduksi. Selain itu, kedua hormon ini juga berperan dalam sistem lain, misalnya dalam sistem saraf. Progesterone diketahui berperan dalam memodulasi proses perkembangan sel Purkinje pada tikus, sedangkan estrogen terbukti memiliki sifat protektif terhadap sel syaraf, dan merupakan modulator dalam perkembangan otak mamalia.^{1,2,3} Tetapi peran progesterone dalam sistem dopaminergik masih perlu diteliti lebih jauh.

Penelitian sebelum ini umumnya didasari oleh peran estrogen dan xenoestrogen sebagai *endocrine disruptor*. Penelitian terdahulu membuktikan bahwa estrogen dengan berikatan dengan reseptornya di dalam sel, dapat mempengaruhi sel dopaminergik otak dalam perkembangan embrio zebrafish melalui penekanan ekspresi tirosin hidroksilase.⁴ Paparan estrogen juga terbukti meningkatkan ekspresi aromatase B, suatu enzim kunci dalam sintesis estrogen di dalam sistem saraf pusat. Adanya kesamaan struktur antara estrogen dan progesterone karena keduanya adalah hormon steroid, dan juga reseptor untuk keduanya yang berasal dari *superfamily* yang sama dapat dijadikan dasar untuk meneliti apakah progesterone juga mempunyai efek yang serupa dengan estrogen.¹

Progesterone umumnya disintesis di organ reproduksi, tetapi juga diproduksi di tempat lain, salah satunya adalah sistem saraf pusat. Steroid yang diproduksi di dalam sistem saraf pusat ini dikenal dengan istilah neurosteroid.¹ Ini menjadikan dasar pemikiran bahwa progesterone mempunyai peran penting di dalamnya. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa progesterone dapat memacu perkembangan sel saraf (Purkinje), dan juga dapat meningkatkan jumlah sel dopamin pada stem sel pluripoten.^{3,4}

Sel dopaminergik mempunyai peran

penting dalam tubuh khususnya fisiologi pergerakan. Gangguan pada sel dopaminergik yang akhirnya mengganggu jumlah neuro-transmitter dopamin, dapat berakibat pada timbulnya kelainan seperti Parkinson dan amyotropik lateral sklerosis (ALS). Penyakit Huntington juga dikaitkan dengan sistem dopaminergik dalam upaya pengobatannya.³ Pemahaman terhadap hal ini akan membantu penerapan terapi di bidang kesehatan khususnya dalam kaitannya dengan penyakit-penyakit neurodegeneratif.

Zebrafish merupakan model hewan coba standar untuk penelitian. Banyak penelitian yang telah menggunakan zebrafish sebagai hewan coba untuk penelitian penyakit-penyakit neurodegeneratif. Penggunaannya telah diterima secara luas dalam berbagai penelitian karena banyaknya keuntungan menggunakan hewan coba ini.⁴ Jumlah embrio yang banyak dan transparan, kemiripan sistem saraf dengan mamalia, dan telah diketahuinya *gene map* secara utuh, menjadikan hewan ini sebagai pilihan ideal dalam penelitian saat ini.⁵

Pada zebrafish, sel dopaminergik dapat diidentifikasi dengan pengamatan pada tirosin hidroksilase, suatu enzim penting dalam sintesis dopamin. Sementara untuk pengamatan aktifitas pergerakan dapat dilakukan pengamatan aktifitas lokomotor seperti jarak renang dan respons embrio terhadap sentuhan. Sejauh ini belum ada penelitian yang secara spesifik meneliti pengaruh progesterone terhadap sel dopaminergik khususnya ekspresi tirosin hidroksilase dan aktifitas lokomotor pada embrio.

Bahan dan Metode

Pemeliharaan Ikan dan Kultur Embrio

Desain penelitian ini adalah *post test only control group design*. Penelitian ini dilakukan di laboratorium New Frontier Science and Technology, GSST Kumamoto University.

Zebrafish dewasa diperoleh dari toko lokal yang memiliki sertifikat dari institusi yang berwenang. Zebrafish dipelihara dalam sebuah tanki air dengan volume 60 liter, berisi 30 ekor ikan. Suhu air dipertahankan pada kisaran 26-28 °C. Ikan berada pada pencahayaan dengan siklus 14 jam kondisi terang diikuti 10 jam dalam kondisi gelap. Telur diperoleh melalui proses fertilisasi alami. Embrio dipelihara dalam medium embrio yang mengandung 0,1% NaCl, 0,163% MgSO₄, 0,004% CaCl₂, dan 0,003% KCl. Pemeliharaan dilakukan dalam inkubator dengan suhu 28 °C. Embrio dikultur pada cawan kultur (30 embrio dengan medium sebanyak 8 ml tiap cawan).

Paparan Progesterone

Dimethyl sulfoxide (DMSO) digunakan sebagai pelarut progesterone (4-Pregnene-3,20-dione, SIGMA-Aldrich) untuk membuat larutan stok dengan konsentrasi 20 mM. Pemaparan terhadap progesterone dilakukan di dalam medium embrio dengan tiga dosis berbeda yaitu 0,1 µM, 1 µM, dan 10 µM. Pemaparan dilakukan sejak 2 jam setelah fertilisasi (*hours post fertilization/hpf*) sampai hari ke enam perkembangan. Untuk proses imunositokimia, embrio dipelihara dengan tambahan fenil-tiourea (PTU) dengan konsentrasi 0,003% yang dilarutkan dalam medium embrio sejak 6 hpf.

Analisis Perkembangan Embrio

Dilakukan pencatatan pengaruh progesterone pada perkembangan embrio, di antaranya laju kematian, laju penetasan, dan defek morfologi. Penghitungan dilakukan pada saat embrio berusia 24, 48, 72, 96, dan 120 hpf. Defek morfologi diamati menggunakan mikroskop fluoresens (Leica M 165 FC) dengan perbesaran 40x pada saat larva hidup berusia 72 hpf. Penelitian diulang sebanyak tiga kali menggunakan masa peneluran yang berbeda.

Deteksi Ekspresi Tirosin Hidroksilase dengan Teknik Imunositokimia

Untuk mengetahui pengaruh progesterone pada ekspresi tirosin hidroksilase pada sel dopaminergik otak, dilakukan pemeriksaan dengan metode imunositokimia *whole-mount* dengan marker fluoresens. Pengamatan dilakukan pada daerah diencefalon dari otak embrio yang merupakan daerah utama sel dopaminergik pada usia embrio 48 hpf. Metode ini mengikuti metode yang telah dilakukan sebelumnya oleh McLean dan Fetcho (2004), dengan sedikit modifikasi.⁵ Metode ini terdiri dari 3 tahap yaitu fiksasi, pengecatan dan yang terakhir adalah pengamatan dan analisis. Embrio yang berusia 48 jam setelah fertilisasi didekoronisasi dan difiksasi dalam larutan PBS yang mengandung paraformaldehid 4% selama 24 jam pada suhu 4 °C. Embrio yang telah terfiksasi dicuci dengan PBS, kemudian diinkubasi dengan metanol 100% sebanyak tiga kali masing-masing 15 menit dan disimpan dalam metanol pada suhu -20 °C.

Proses pengecatan diawali dengan pencucian larva dengan PBS yang mengandung 0,1% Tween-20 dan 0,5% Triton X-100 (PBSTX). Kemudian larva diinkubasi dalam air destilata selama satu jam, dilanjutkan dengan larutan aseton selama 8 menit pada suhu -20 °C. Ikatan nonspesifik dari antibodi diblok dengan inkubasi menggunakan serum kambing normal (NGS) 1% dan serum albumin dari sapi (BSA) 3% selama 3 jam. Setelah dicuci beberapa kali dengan PBSTX, larva diinkubasi dalam antibodi primer untuk tirosine hidroksilase yang merupakan antibodi monoklonal yang berasal dari tikus (Immunostar #22941). Konsentrasi antibodi primer yang diberikan sebesar 1:1000 pada suhu 4 °C selama semalam.

Antibodi sekunder yang digunakan merupakan IgG anti-tikus dari kambing yang sudah terikat dengan fluoresens sebagai marker (Alexa Fluor 488 Invitrogen). Larva diinkubasi dalam antibodi sekunder dengan konsentrasi 1:200 selama 2 jam. Setelah dicuci dengan PBSTX, larva yang sudah terikat dapat diamati dalam jangka waktu sekitar 30 menit.

Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop fluoresens (Leica M 165 FC) dengan perbesaran 100x dan area ekspresi dari tirosin hidroksilase dianalisis dengan perangkat lunak (ImageJ) yang menggunakan referensi perhitungan area berdasarkan pixel. Untuk analisis statistik, masing-masing dosis perlakuan digunakan 3-4 larva, dan penelitian diulang menggunakan empat kelompok larva yang berbeda masa penelurannya.

Tes Aktivitas Lokomotor

Untuk menilai aktifitas lokomotor, larva yang berusia 6 hari dipindahkan ke wadah kultur 12 sumur, berisi satu ekor larva tiap sumur di dalam medium embrio 2 mL. Dasar sumur diberi garis pembatas untuk membagi menjadi 4 area sama luas. Setelah dilakukan habituasi selama 5 menit, dilakukan perekaman selama 1 menit. Pengukuran aktivitas lokomotor dilakukan pada usia embrio 144 hpf. Kuantifikasi dilakukan dengan menghitung jumlah garis yang dilewati oleh larva dalam satu menit. Masing-masing dosis perlakuan menggunakan 24 ekor larva, dan penelitian diulang dengan tiga kelompok larva yang berbeda masa penelurannya.⁵

Deteksi Ekspresi mRNA Aromatase B dengan Metode RT-PCR

Untuk mengetahui pengaruh progesterone terhadap ekspresi mRNA aromatase B, dilakukan pemeriksaan RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*). Tahapan pemeriksaan metode ini adalah isolasi RNA, reaksi reverse transcriptase (RT) dan polymerase chain reaction (PCR) dengan urutan basa untuk

Aromatase B.

Untuk isolasi RNA, digunakan 20 embrio setiap dosis perlakuan. Embrio dibekukan pada suhu -80 °C pada usia 48 hpf, 72 hpf dan 96 hpf. Metode isolasi dilakukan sesuai petunjuk dari Isogen (Nippon Gene Co., Ltd.). Sebanyak 1 µg RNA total yang didapat dari isolasi digunakan untuk proses reverse transcriptase menggunakan kit dari Promega. Sebanyak 1 µL hasil RT kemudian digunakan dalam proses PCR (34 siklus) menggunakan goTag, dengan primer aromatase B. Berikut adalah urutan basa *forward*: 5'GCAAATCGTACAGGAGATACAG3', dan *reverse*: 5' CGTCCAATGTTTCAGGATTAG 3'.

Hasil reaksi RT-PCR kemudian dijalankan pada alat elektroforesis dan difoto untuk dianalisis perbedaan intensitas pita yang terbentuk.

Analisis Statistik

Penentuan jumlah sampel dalam setiap perlakuan dan pemeriksaan didasarkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Chen (2009).⁶ Analisis statistik dalam penelitian ini menggunakan *single factor analysis of varian* (ANOVA) yang terdapat dalam perangkat lunak Microsoft Excel 2010. Nilai perbedaan dianggap bermakna jika $p < 0,05$.

Hasil

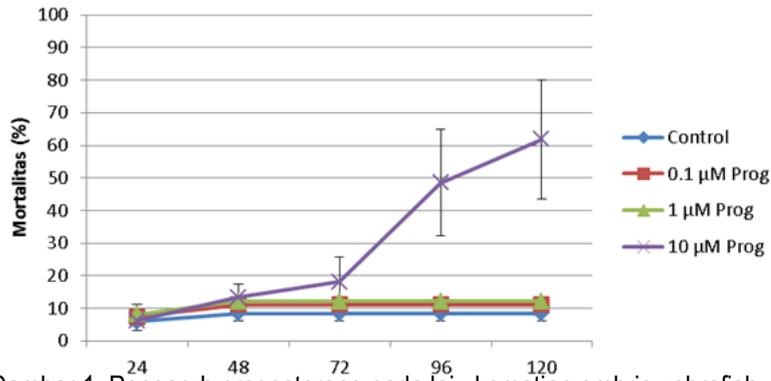
Laju Kematian, Laju Penetasan, Defek Morfologi

Dalam penelitian ini diamati pengaruh paparan progesterone terhadap laju kematian, laju penetasan, dan terjadinya defek morfologis pada embrio zebrafish.

Pengamatan yang dilakukan pada tiga kali masa peneluran yang berbeda menunjukkan bahwa paparan progesterone dengan dosis 10 µM menyebabkan peningkatan laju kematian secara bermakna pada saat 120 hpf dibandingkan dengan kelompok kontrol maupun kelompok yang terpapar progesterone 0,1 µM dan 1 µM (Gambar 1).

Paparan progesterone 10 μM menyebabkan embrio cenderung mengalami penundaan laju penetasan, walaupun secara statistik tidak terlihat secara bermakna (Tabel 1). Pemberian progesterone 10 μM juga meningkatkan terjadinya defek morfologis (Gambar 2) yang terlihat berupa bentuk

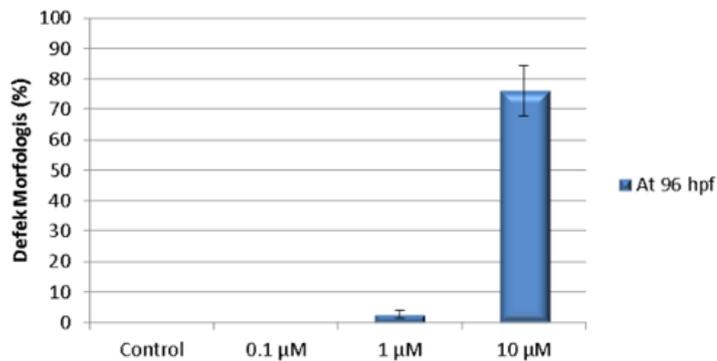
embrio yang melengkung pada usia 96 jam setelah fertilisasi (Gambar 3). Dari pengamatan juga tampak bahwa larva pada kelompok yang terpapar progesterone 10 μM memiliki tubuh yang lebih pendek dibanding kelompok lain (data tidak disertakan).



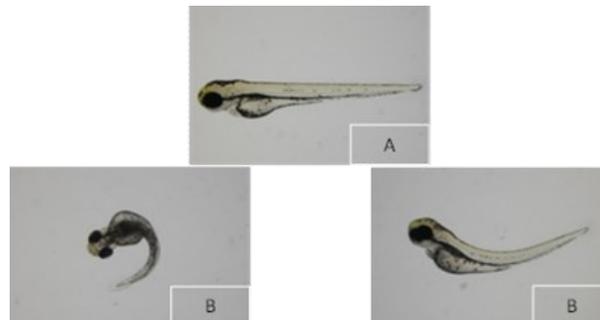
Gambar 1. Pengaruh progesterone pada laju kematian embrio zebrafish.

Tabel 1. Rerata laju penetasan embrio zebrafish.

Kelompok	24 hpf (%)	48 hpf (%)	72 hpf (%)	96 hpf (%)	120 hpf (%)
Kontrol	0	21,07	98,04	100	100
0,1 μM	0	36,07	97,22	100	100
1 μM	0	39,46	99,58	100	100
10 μM	0	18,86	61,09	76,78	81,74



Gambar 2. Pengaruh progesterone pada terjadinya defek morfologis.



Gambar 3. Larva zebrafish usia 96 hpf.

Keterangan: A. Larva pada kelompok kontrol, B. Larva pada kelompok yang terpapar progesteron 10 μM .

Ekspresi Tirosin Hidroksilase

Untuk mengamati pengaruh progesterone terhadap ekspresi tirosin hidroksilase, pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan dengan metode imunositokimia. Tabel 2 menunjukkan hasil dari 3 pengulangan yang telah dinormalkan terhadap kontrol. Hasil analisis menunjukkan paparan progesterone menurunkan ekspresi tirosin hidroksilase (Gambar 4). Penurunan ini bermakna pada semua kelompok perlakuan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, tetapi tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok yang terpapar progesterone. Penurunan luas area ekspresi ini tidak menunjukkan hubungan *dose-dependent*.

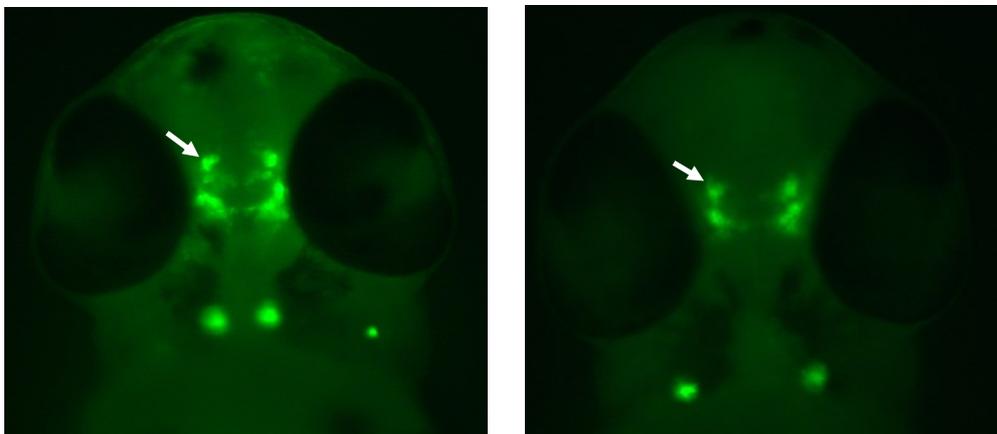
Aktifitas Lokomotor (Motilitas)

Data aktifitas lokomotor diperoleh dari perekaman selama satu menit pada masing-masing kelompok perlakuan (24 ekor) dan

dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Hasil analisis mendapatkan bahwa paparan progesterone menurunkan aktifitas lokomotor larva bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, walaupun secara statistik penurunan aktifitas lokomotor pada dosis 0,1 μM tidak terlihat signifikan (Tabel 3). Pada metode ini tidak dianalisis pengaruh paparan progesterone pada dosis tertinggi (10 μM) karena pada usia 6 hari hampir seluruh larva telah mati. Hasil rata-rata dari tiga percobaan dapat dilihat pada Tabel 3.

Ekspresi Aromatase B

Hasil RT-PCR menunjukkan bahwa paparan progesterone meningkatkan ekspresi mRNA aromatase B pada embrio zebrafish pada 48, 72, dan 96 hpf. Peningkatan ini khususnya terjadi pada paparan progesterone dengan dosis 10 μM dan terlihat lebih jelas pada saat embrio berusia 72 hpf dan 96 hpf (Gambar 5).



Gambar 4. Pengaruh progesterone terhadap ekspresi tirosin hidroksilase (tanda panah putih) dengan teknik imunositokimia (100x).

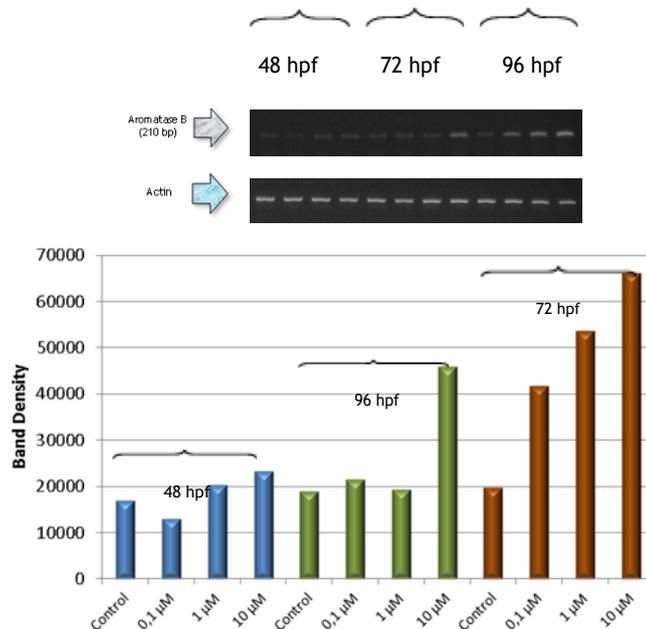
Keterangan: A. kelompok kontrol, B. kelompok perlakuan dengan paparan progesteron 10 μM .

Tabel 2. Rerata luas area ekspresi tirosin hidroksilase dari tiga pengulangan (%/kontrol).

Kelompok	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Rerata	SD
kontrol	100	100	100	100	± 0
0,1 μM	36,53	62,60	62,53	53,89*	$\pm 8,67$
1 μM	24,58	37,49	50,93	37,67*	$\pm 7,60$
10 μM	36,81	76,34	64,28	59,14*	$\pm 11,69$

Tabel 3. Rerata aktifitas lokomotor dari tiga pengulangan (garis/menit).

Perlakuan	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Rerata	±SD
Kontrol	5,42	7,00	8,96	7,13	±1,02
0,1 µM	5,38	6,88	4,96	5,74	±0,58
1 µM	2,54	2,92	3,33	2,93*	±0,22



Gambar 5. Pengaruh progesterone pada ekspresi mRNA aromatase B.

Keterangan: Progesterone meningkatkan ekspresi mRNA aromatase B pada embrio zebrafish pada 48, 72, dan 96 hpf

Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan pengamatan pengaruh paparan progesterone terhadap ekspresi tirosin hidroksilase, aktifitas lokomotor dan ekspresi aromatase B pada embrio zebrafish. Hal ini bertujuan untuk membuktikan bahwa progesterone dapat mempengaruhi sel saraf khususnya yang berhubungan dengan sistem dopaminergik selama masa perkembangan. Selain itu, juga diamati efek progesterone terhadap laju kematian, laju penetasan dan timbulnya defek morfologi. Embrio zebrafish digunakan pada penelitian ini karena pada masa perkembangan otak lebih sensitif terhadap paparan suatu zat kimia dibandingkan otak dewasa, dan paparan pada saat perkembangan mempunyai implikasi terjadinya penyakit neurologis.

Paparan progesterone 10 µM diketahui meningkatkan laju kematian embrio dibandingkan kelompok kontrol sejak awal perkembangan dan terlihat nyata pada usia 120 hpf. Kelompok yang dipapar dengan progesterone dosis 10 µM mengalami kematian hampir 100% pada usia setelah 120 hpf. Paparan progesterone 10 µM cenderung menyebabkan penundaan penetasan pada embrio. Terjadinya defek morfologi yang diamati saat embrio berusia 96 hpf sangat tinggi pada kelompok yang terpapar progesterone 10 µM (76%). Pada kelompok embrio yang terpapar progesterone 1 µM terdapat sedikit embrio yang mengalami defek morfologis (2,6%), dan tidak ada embrio yang mengalami defek pada kelompok progesterone 0,1 µM dan kelompok kontrol.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa paparan progesteron 10 μM menyebabkan toksisitas yang mematikan dan terjadi defek morfologis pada embrio. Selama ini, progesterone telah digunakan sebagai obat untuk mempertahankan kehamilan pada kondisi yang mengancam kehamilan terutama pada awal kehamilan. Progesterone juga dapat menjadi zat yang menyebabkan gangguan perkembangan, sehingga menjadi bahan pertimbangan kembali terhadap penggunaannya selama kehamilan karena dapat memberikan efek samping bagi janin. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa paparan estrogen menunjukkan hasil yang serupa dengan penelitian ini.¹

Pengaruh progesterone pada ekspresi tirosin hidroksilase yang diamati dengan metode imunositokimia menunjukkan bahwa progesterone menurunkan ekspresi tirosin hidroksilase pada daerah diencefalon embrio. Area ini merupakan area spesifik untuk sel dopaminergik pada embrio zebrafish saat berusia 48 hpf. Oleh karena regulasi enzim tirosin hidroksilase melalui mekanisme transkripsional, maka dapat diasumsikan bahwa penurunan ekspresinya juga menunjukkan adanya penurunan aktifitas enzim. Teori dan penelitian sebelum ini membuktikan bahwa tirosin hidroksilase berperan penting dalam pembentukan dopamin, sehingga penurunan dari aktifitas enzim ini akan menyebabkan turunya jumlah dopamin yang terbentuk dalam sel.

Dopamin berperan penting dalam sistem pergerakan di dalam tubuh. Turunya kadar dopamin akan menyebabkan timbulnya kelainan dalam sistem saraf khususnya yang berkaitan dengan pergerakan seperti penyakit Parkinson. Sebaliknya, penekanan aktifitas dopamine merupakan suatu upaya terapi untuk mengurangi gejala *chorea* pada penyakit Huntington. Pada zebrafish, adanya gangguan dalam sistem motorik ini dapat diamati melalui beberapa cara, salah satunya adalah pengamatan aktifitas lokomotor. Dugaan awal kami adalah progesterone dapat

menurunkan aktifitas lokomotor pada larva zebrafish yang dibuktikan dengan mengamati aktifitas lokomotor larva saat berusia 144 hpf. Pada usia ini larva telah menunjukkan beberapa perilaku seperti berenang bebas, mencari makanan, dan perilaku menghindar.⁷ Hasil penelitian menunjukkan bahwa progesterone menurunkan aktifitas lokomotor larva. Seiring dengan efek progesterone yang menurunkan ekspresi enzim tirosin hidroksilase. Maka dapat dikatakan bahwa paparan progesterone dapat mempengaruhi sel dopaminergik embrio melalui penurunan ekspresi tirosin hidroksilase yang menyebabkan penurunan aktifitas lokomotor.

Efek progesterone terhadap ekspresi tirosin hidroksilase dan aktifitas lokomotor ini tidak berbeda jauh dengan penelitian lain yang menggunakan estrogen sebagai bahan paparan. Adanya paparan estrogen pada embrio zebrafish menyebabkan penurunan ekspresi tirosin hidroksilase dan aktifitas lokomotor.^{1,7} Hal ini memunculkan sebuah pertanyaan baru apakah progesterone mempunyai peran dalam regulasi aktifitas estrogen selama masa perkembangan. Mengingat bahwa reseptor estrogen dan progesterone berasal dari *superfamily* yang sama, tersebar luas pada area otak yang sebagian besar sama, dan kedua zat ini mempunyai kemiripan struktur steroid, maka dugaan bahwa progesterone dapat mempengaruhi reseptor estrogen tidak dapat diabaikan.³

Bukti lain menunjukkan bahwa paparan estrogen menyebabkan peningkatan ekspresi mRNA aromatase B, maka dugaan awal dalam penelitian ini adalah progesterone dapat menyebabkan hal yang serupa. Hasil pengamatan terhadap ekspresi mRNA aromatase B menunjukkan bahwa progesterone meningkatkan ekspresi aromatase B. Peningkatan ini mencapai dua kali lipat pada usia 72 hpf dan lebih dari tiga kali lipat pada usia 96 hpf (dosis progesterone 10 μM dibanding kelompok kontrol).

Hal ini kemungkinan karena progesterone masih membutuhkan waktu untuk berefek pada sistem regulasi estrogen dan aromatase B. Temuan ini masih perlu diperjelas untuk mengetahui apakah efek progesterone bersifat langsung terhadap reseptor estrogen ataupun melalui mekanisme lain.

Terdapat dua jenis reseptor progesterone di dalam inti yaitu PR-A dan PR-B.⁷ Salah satu metode yang dapat dilakukan untuk membuktikan bahwa progesterone bekerja melalui reseptornya di dalam inti adalah dengan menggunakan reseptor bloker yang spesifik untuk progesterone.

Diperlukan pula penelitian mengenai kemungkinan penggunaan progesterone dalam upaya terapi pada keadaan kadar dopamin yang melebihi normal. Upaya terapi yang digunakan untuk mengurangi gejala *chorea* pada penyakit Huntington adalah neuroleptik tipikal dan atipikal yang merupakan penghambat reseptor dopamin, dan agen penekan dopamin (tetrabenazine).³ Penggunaan obat-obat ini menyebabkan efek samping yang sangat mengganggu dan karena itu penggunaannya masih terbatas. Hasil penelitian ini, yang menunjukkan bahwa progesterone dapat menurunkan aktifitas dopamin melalui penekanan kerja tirosin hidroksilase, menjadi awal kemungkinan penggunaan progesterone sebagai alternatif terapi penyakit Huntington.

Kesimpulan

Progesterone dapat mempengaruhi sel dopaminergik embrio zebrafish melalui penekanan ekspresi tirosin hidroksilase, aktifitas lokomotor, dan meningkatkan ekspresi mRNA aromatase B.

Daftar Pustaka

1. Zheng P. Neuroactive Steroid Regulation of Neurotransmitter Release in the CNS: Action, Mechanism and Possible Significance. *Progress in Neurobiology*. 2009; 89:134-152.
2. Diaz NF, Diaz-Martinez NE, Velasco I, Camacho-Arroyo I. Progesterone Increases Dopamine Neuron Number in Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells. *J Neuroendocrinol*. 2009; 21(8): 730-736.
3. Roos R. Huntington's Disease: a Clinical Review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2010; 5: 40.
4. Filippi A, Mahler J, Schweitzer J, Driever W. Expression of the Paralogous Tyrosine Hydroxylase Encoding Genes th1 and th2 Reveals the Full Complement of Dopaminergic and Noradrenergic Neurons in Zebrafish Larval and Juvenile Brain. *The Journal of Comparative Neurology*. 2010; 518: 423-438.
5. Kabashi E, Brustein E, Champagne N, Drapeau P. Zebrafish Models for the Functional Genomics of Neurogenetic Disorder. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011; 1812(3):335-45.
6. Chen Q, Huang N, Huang J, Chen S, Fan J, Li C, Xie F. Sodium Benzoate Exposure Downregulates the Expression of Tyrosine Hydroxylase and Dopamine Transporter in Dopaminergic Neurons in Developing Zebrafish. *Birth Defect Research Part B*. 2009; 86: 85-91.
7. Fatimah R and Kishida M. Estrogen Regulates Motility through Dopamine Signaling in Early Development of Zebrafish (*Danio rerio*). 2010.