

RESEARCH ARTICLE

PENGARUH PAPARAN GENISTEIN TERHADAP PERKEMBANGAN AWAL SISTEM SARAF PUSAT PADA MODEL EMBRIO AYAM (*GALLUS GALLUS*) UMUR 48 JAM

EFFECTS OF GENISTEIN EXPOSURE TOWARD INITIAL DEVELOPMENT OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN CHICKEN EMBRYO MODEL (*GALLUS GALLUS*) AGE 48 HOURS

Indriati Dwi Rahayu*, Obed Trinurcahyo Kinantyo Paundralingga*, Vidia Purnama Sari**

*Laboratorium Anatomi-Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

**Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

pISSN : 2407-6724 • eISSN : 2442-5001 • <http://dx.doi.org/10.21776/ub.mnj.2018.004.01.3> • MNJ.2018;4(1):12-18

• Received 7 April 2017 • Reviewed 23 August 2017 • Accepted 28 August 2017

ABSTRAK

Latar belakang. Keamanan konsumsi Genistein pada kehamilan trimester pertama dan pengaruhnya pada perkembangan embrio, terutama pada perkembangan sistem saraf pusat masih belum banyak diketahui.

Tujuan. Mengetahui pengaruh paparan genistein terhadap perkembangan awal sistem saraf pusat.

Metode. Model yang digunakan dalam penelitian ini adalah embrio ayam (*Gallus gallus*) umur 48 jam. Genistein pada dosis 5 μ M, 10 μ M dan 20 μ M diinjeksikan secara *in ovo* ke dalam *yolk sac* telur sebelum diinkubasi. Telur kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37,5⁰ – 38,5⁰ C. Setelah 48 jam, cangkang telur dipecah, embrio diambil dan dilakukan pewarnaan menggunakan Toluidine Blue. Evaluasi dilakukan pada *neural tube*, *neuropore anterior*, *neuropore posterior* dan somit.

Hasil. Ditemukan defek *neural tube* pada kelompok perlakuan dengan genistein lebih banyak dibanding kelompok kontrol namun secara statistik hasil tersebut tidak signifikan.

Simpulan. Untuk somit, pada kelompok perlakuan genistein dengan dosis 10 μ M, jumlah somit lebih banyak dibanding kelompok kontrol dan secara statistik jumlah tersebut signifikan.

Kata kunci: Genistein, embrio ayam, sistem saraf pusat

ABSTRACT

Background. The safety of genistein consumption in the first trimester of pregnancy and its effect on embryonic development, especially in the development of Central Nervous System (CNS) is still not widely known.

Objective. To determine the effect of genistein exposure to the early development of the Central Nervous System.

Methods. The animal model used in this research is chick embryo (*Gallus gallus*). Genistein at a dose of 5 μ M, 10 μ M and 20 μ M *in ovo* injected into the *yolk sac* of the eggs before incubation. The eggs were then incubated for 48 hours at a temperature of from 37.5⁰ to 38.5⁰ C. After 48 hours, broken egg shell, embryos are taken and carried out using Toluidine Blue staining. The evaluation was done on the *neural tube*, *anterior neuropore*, *posterior neuropore* and *somites*.

Results. It was found *neural tube* defects in the group treated with genistein more than the control group but the result was not statistically significant.

Conclusion. For the *somites*, in the group treated with a dose of 10 μ M genistein, the number of *somites* more than the control group and statistically the number is significant.

Keywords: Genistein, chick embryo, central nervous system

Korespondensi: paundralingga.2@buckeyemail.osu.edu

PENDAHULUAN

Kelainan kongenital telah menjadi masalah kesehatan global. Menurut data WHO, kelainan kongenital merupakan penyebab kematian 2,7 juta neonatus di 193 negara.¹ Di Amerika Serikat, diperkirakan sekitar 120.000 bayi terlahir dengan kelainan kongenital setiap tahun.²

Defek tabung saraf atau yang dikenal dengan *NTD* (*Neural tube Defect*) merupakan kelainan kongenital yang cukup banyak ditemui dan menempati urutan kedua setelah kelainan jantung bawaan. Di China, prevalensi *neural tube defect* adalah 6 kejadian per 1000 kelahiran. Bentuk *NTD* yang paling sering ditemukan adalah *anencephaly* dan *spina bifida*, diperkirakan mencapai 300.000 kejadian di dunia tiap tahunnya. Di Amerika Serikat, prevalensi kejadian *anencephaly* adalah 1 per 4859 kelahiran dan *spina bifida* adalah 1 per 2858 kelahiran.³

Sebagian besar kelainan kongenital terjadi pada trimester pertama kehamilan.² Awal minggu ketiga perkembangan, saat gastrulasi dimulai adalah stadium yang sangat sensitif terhadap gangguan teratogen. Perkembangan awal Sistem Saraf Pusat dimulai pada tahap ini. *Neural tube defect*, baik *spina bifida* maupun *anencephaly* terjadi karena kegagalan menutupnya *neuropore* (lubang pada ujung *neural tube*) yang normalnya terjadi antara hari ke-21 sampai hari ke-28, pada saat ini seorang ibu belum menyadari bahwa dirinya hamil.⁴

Dewasa ini, penggunaan suplemen cukup populer di masyarakat. Genistein adalah salah satu contoh suplemen yang cukup banyak dikonsumsi karena khasiatnya sebagai antioksidan dan antikanker.⁵ Senyawa ini merupakan *isoflavone* yang banyak ditemukan pada kedelai.⁶

Pengaruh genistein terhadap perkembangan janin jika dikonsumsi oleh ibu hamil belum banyak diketahui. Menurut studi sebelumnya, genistein diketahui dapat melewati plasenta.⁷ Hal ini membawa pada suatu pemikiran, jika genistein dapat melewati plasenta, genistein mungkin bisa mempengaruhi perkembangan janin.

Pengaruh genistein pernah diteliti pada embrio zebrafish. Dalam penelitian tersebut dijelaskan bahwa pemberian 17.5 μM genistein mengakibatkan mortalitas pada embrio zebrafish (mortalitasnya mencapai 90%). Pada konsentrasi dibawah 10 μM , genistein tidak mengakibatkan

kematian pada zebrafish embrio namun menyebabkan apoptosis. Apoptosis ditemukan terutama pada hindbrain dan anterior spinal cord. Yang menarik adalah, apoptosis tidak ditemukan di luar *CNS* (*Central Nervous System*).⁸ Hal ini membawa pada suatu pemikiran bahwa paparan genistein berpengaruh terhadap perkembangan sistem saraf pusat pada embrio.

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh paparan berbagai dosis genistein terhadap perkembangan embrio. Embrio yang digunakan dalam penelitian ini adalah embrio ayam. Dalam 50 tahun terakhir, embrio ayam telah menjadi suatu model penting untuk mempelajari perkembangan biologi pada vertebrae.⁹ Perkembangan awal embrio ayam memiliki kemiripan dengan embrio manusia sehingga hasilnya bisa lebih relevan dibanding menggunakan model vertebrae yang lebih rendah (ikan).¹⁰

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan *ran-domized control group post test design*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Anatomi-Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Model yang digunakan adalah embrio ayam (*Gallus gallus*). Telur ayam yang sudah dibuahi diperoleh dari peternak lokal di daerah Singasari, Kabupaten Malang. Tahap perkembangan embrio ayam mengikuti tabel perkembangan Hamburger Hamilton.¹¹ Telur dibagi secara acak menjadi 4 kelompok (n=9) yaitu kelompok kontrol negatif (hanya injeksi NS), kelompok perlakuan Genistein dengan dosis 5 μM , 10 μM dan 20 μM .

Perlakuan dilakukan secara *in ovo* dengan melakukan injeksi ke dalam *yolk sac* pada ujung tumpul telur dengan menggunakan *disposable syringe* 1 cc. Sebelum injeksi, area injeksi diusap dengan alkohol *disposable*. Setelah selesai injeksi, ditutup dengan *vinyltape*. Kemudian posisi telur dibalik 180° sesuai aksisnya. Kemudian diinkubasi pada suhu 37,5–38,5 °C selama 48 jam.

Pengambilan dan Penyimpanan Embrio

Cangkang telur dipecahkan dengan cara mengetukkan dasar telur pada bidang yang agak tajam, dengan tidak merubah posisi telur. Telur dituang dalam cawan petri yang setengahnya telah

diisi dengan Larutan *Natrium Clorida (NaCl)* 0,9% (NS). Bingkai kertas saring diletakkan di atas *blastodisk* (embrio) sehingga nampak perlahan-lahan menjadi basah. Kemudian dilakukan penggungtingan *vitelline membrane* di sisi luar bingkai kertas saring, sehingga embrio ikut menempel pada lubang di bingkai kertas saring. Embrio dimasukkan dalam larutan NS yang lain dan digoyang-goyangkan beberapa kali. Kemudian dipindahkan lagi dalam larutan NS yang lain dan digoyang-goyangkan beberapa kali. Embrio dimasukkan ke dalam larutan formalin 10% dan dikirim ke Laboratorium Anatomi-Histologi untuk dilakukan pewarnaan.

Pengamatan Embrio

Pewarnaan menggunakan Toluidine Blue untuk melihat morfologi *neural tube*, penutupan *neuropore anterior*, *neuropore posterior* dan jumlah somit. Panjang *neural tube (neuroaxis)* diukur dengan menggunakan mikrometer mikroskop. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop cahaya. Pengambilan foto embrio dengan menggunakan kamera digital.

Analisis Data

Uji *Fisher* digunakan terhadap data morfologi *neural tube* dan penutupan *neuropore anterior* karena merupakan variabel kategorik. Data dengan variabel numerik (panjang *neural tube*, lebar *neuropore posterior* dan jumlah somit) dianalisis dengan uji *Kruskal Wallis*.¹²

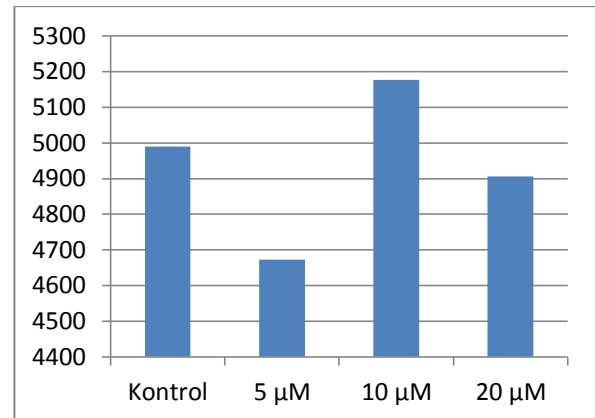
HASIL PENELITIAN

Neural tube

Pada penelitian ini, dilakukan deskripsi morfometrik dan morfologis untuk melakukan evaluasi pada *neural tube*. Pada deskripsi morfometris, dilakukan pengukuran panjang *neuroaxis* pada embrio ayam. Untuk kelompok perlakuan kontrol, panjang *neuroaxis* bervariasi antara 4110-5820 μm . Merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Straaten, hasil pengukuran panjang *neuroaxis* kelompok kontrol dalam penelitian ini adalah normal.¹³

Panjang *neuroaxis* kelompok perlakuan genistein memberikan hasil yang lebih bervariasi antara 2460 - 7890 μm . Merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Straaten *et al.*, panjang *neuroaxis* <2500 μm dan >7000 μm pada embrio ayam 48 jam adalah

tidak normal.¹³ Secara statistik hasil ini tidak signifikan ($p > 0.05$).



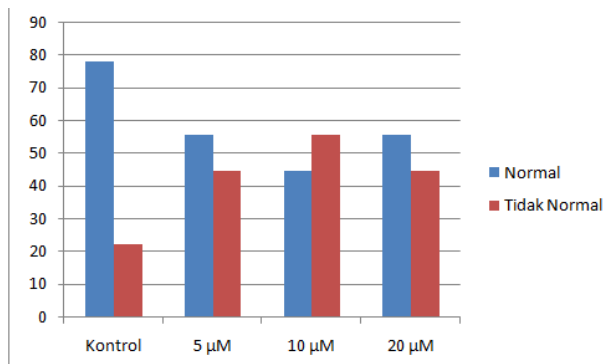
Gambar 1. Diagram rata-rata panjang *neural tube* (dalam satuan μm)

Karena hasil yang tidak signifikan, penghitungan data dilakukan lebih lanjut dengan *Cohen's d-type effect size*.¹⁴ Dengan *effect size*, kelompok kontrol dibanding kelompok perlakuan genistein 5 μM menunjukkan $d=0.55$, kontrol dibanding kelompok perlakuan genistein 10 μM menunjukkan $d=0.32$, kontrol dibanding kelompok perlakuan genistein 20 μM menunjukkan $d=0.14$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa genistein pada dosis 5 μM memberikan efek sedang pada panjang *neuroaxis* dan pada dosis lebih tinggi memberikan efek kecil pada panjang *neuroaxis*.

Pada kelompok perlakuan 5 μM genistein, panjang *neuroaxis* bervariasi antara 2460-7890 μm . Panjang *neuroaxis* <2500 μm menunjukkan perkembangan yang terhambat dan panjang *neuroaxis* >7000 μm menunjukkan perkembangan yang terlalu cepat untuk embrio ayam umur 48 jam. Pemanjangan *neuroaxis* terjadi seiring dengan pembentukan *neural plate* menjadi *neural tube* dan pada proses tersebut terjadi perkembangan sel-sel neuroepitel yang memungkinkan pemanjangan *neuroaxis* [10]. Apabila perkembangan sel-sel neuroepitel tersebut terganggu, tentunya dapat menyebabkan perkembangan *neuroaxis* menjadi terhambat dan apabila perkembangan sel-sel neuroepitel menjadi cepat, perkembangan *neuroaxis* pun menjadi cepat. Genistein adalah suatu *DNA topoisomerase II inhibitor*¹⁵ yang dapat mempengaruhi struktur DNA sehingga timbul suatu pemikiran bahwa genistein mungkin mempengaruhi perkembangan sel-sel neuroepitel sehingga dapat mempengaruhi proses

pemanjangan *neuroaxis*. Sejauh mana genistein mempengaruhi sel-sel neuroepitel masih belum dapat dievaluasi pada penelitian ini karena tidak dilakukan pengamatan secara histologis untuk melihat susunan sel-sel neuroepitel.

Pada deskripsi morfologis, dilakukan pengamatan berdasarkan ada atau tidaknya abnormalitas pada *neural tube*. Hasil penelitian menunjukkan adanya abnormalitas pada semua kelompok perlakuan (termasuk kontrol). Secara statistik tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0.05$) antara kelompok kontrol dan perlakuan dengan genistein namun pada kelompok perlakuan dengan genistein, abnormalitas yang ditemukan lebih banyak.



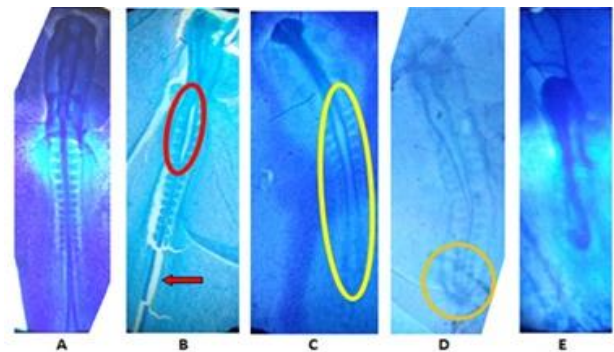
Gambar 2. Diagram Prosentasi *Neural tube* Normal dan Abnormal

Hipotesis pada penelitian adalah genistein akan mengganggu perkembangan *neural tube*. Paparan genistein mungkin mengganggu keseimbangan *FGF* dan *Wnts* sehingga turut mempengaruhi perkembangan *neural tube*. *FGF* dan *Wnts* merupakan jalur *signaling* yang penting dalam proses induksi saraf. *FGF* akan menekan *BMP4* agar terjadi induksi saraf.^{16,17} *Wnts* diekspresikan di regio kaudal pada tahap gastrula dan *Wnt inhibitor* diekspresikan lebih pada area rostral. Berdasarkan pembagian tersebut, *Wnt signal* berperan secara gradasi untuk menentukan sel-sel *neural plate* yang secara progresif lebih ke *caudal*.¹⁸ Apabila keseimbangan sinyal-sinyal tersebut terganggu karena paparan genistein, pembagian sinyal-sinyal molekuler *dorso-ventral* akan kacau sehingga *neural tube* yang terbentuk kemungkinan menjadi tidak teratur.

Selain abnormalitas bentuk *neural tube*, pada penelitian ini juga ditemukan *neuropore romboencephalon* yang masih terbuka dan *neural groove* yang masih terbuka. Menurut Straaten et

al., pada proses pembentukan *neural tube* yang multifasik, pembukaan kembali mungkin terjadi ke arah kranial tapi tidak terjadi ke arah kaudal¹³ ini menjelaskan mengapa pada penelitian ini terdapat *neuropore* romboencephalon yang terbuka saat *neuropore posterior* telah menutup.

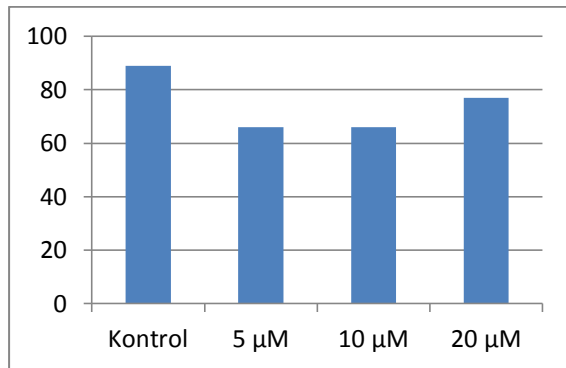
Pada penelitian ini, embrio dengan *neural groove* yang masih terbuka menunjukkan *axis* yang lebih melengkung dibandingkan kontrol. Hal ini sesuai dengan penelitian Straaten et al. bahwa faktor yang berperan pada proses penutupan *neural tube* antara lain adalah *axial curvature* dan somit.¹³ Seperti yang telah dijelaskan di atas, paparan genistein memungkinkan pembagian sinyal-sinyal molekuler *dorso-ventral* menjadi tidak seimbang sehingga dapat mengacaukan *axial curvature*. Somit juga berperan dalam proses penutupan *neural tube* namun dari penelitian terlihat bahwa *axial curvature* yang terganggu membuat somit berperan kurang maksimal dalam proses penutupan *neural tube*. Seberapa jauh genistein mempengaruhi sinyal *FGF* dan *Wnts* yang mengatur pola *dorso-ventral* sehingga mempengaruhi pembentukan *neural tube* tidak dievaluasi dalam penelitian ini karena tidak dilakukan evaluasi pada ekspresi *FGF* dan *Wnts*.



Gambar 3. Embrio ayam 48 jam dengan pewarnaan *toluidine blue*. (A) Perkembangan embrio normal pada kelompok kontrol; (B) Abnormalitas pada embrio dengan perlakuan 20 µm genistein. Terlihat *neuropore romboencephalon* (lingkaran merah) masih terbuka saat *neuropore posterior* (tanda panah) sudah menutup; (C) Abnormalitas pada embrio dengan perlakuan 5 µm genistein. Terlihat adanya *neural groove* (lingkaran kuning) masih terbuka; (D) Abnormalitas pada embrio dengan perlakuan 20 µm genistein. Terlihat perkembangan *neural tube* yang terhenti pada somit terakhir (lingkaran orange). (E) Abnormalitas pada embrio dengan perlakuan 5 µm. Terlihat perkembangan *neural tube* yang terlalu pendek dibanding harga normal.

Penutupan *Neuropore anterior*

Pada penelitian ini, prosentase penutupan *neuropore anterior* pada kelompok kontrol cenderung lebih tinggi dibanding prosentase penutupan *neuropore anterior* pada kelompok dengan paparan genistein. Secara statistik, hasil ini tidak signifikan ($p > 0.05$).



Gambar 4. Diagram prosentase penutupan neuropore anterior

Pada embrio ayam, *neuropore anterior* seharusnya sudah menutup sempurna pada stage 12 Hamburger-Hamilton (45-49 jam perkembangan).¹⁹ *Neuropore anterior* yang belum menutup sempurna pada umur tersebut menunjukkan adanya gangguan dalam proses penutupannya. Dalam penelitian ini, genistein diduga menghambat proses penutupan tersebut. Genistein menghambat ekspresi *FGF*.²⁰ Pada embrio, aktivasi *FGF* menghambat transkripsi *BMP4* dan meningkatkan *chordin* dan *noggin* yang menghambat aktifitas *BMP*.^{16,10} Paparan genistein yang menghambat *FGF* dapat menyebabkan tingginya aktifitas *BMP* yang kemudian memungkinkan terjadinya hambatan formasi *MHP* dan gangguan penutupan *neuropore anterior*. *Neural fold bending* pada *MHP* (*Mid Hinge Points*) dan *DLHP* (*Dorso-Lateral Hinge Points*) merupakan proses yang penting pada penutupan *neuropore anterior* namun mekanisme yang pasti tentang bagaimana posisi *bending* ditentukan pada tingkat molekuler dan seluler belum sepenuhnya jelas.²¹ Aktivitas *BMP* telah diidentifikasi secara 2 dimensi pada *neural plate* dan didapatkan bahwa supresi *BMP* diperlukan untuk formasi *MHP*. Aktivitas *BMP* yang berlebihan akan mengakibatkan gangguan formasi *MHP* dan hambatan pada penutupan *neural tube*.²² Adanya *neuropore anterior* yang belum menutup pada embrio kelompok kontrol menunjukkan bahwa mekanisme ini bukan satu-satunya yang mempengaruhi

penutupan *neuropore anterior*. Masih banyak faktor selain *BMP* yang mempengaruhi *neural fold bending*.

Neuropore posterior

Karena *neuropore posterior* embrio kelompok kontrol belum menutup sempurna, dilakukan pengamatan terhadap lebar *neuropore posterior* embrio kelompok kontrol dan embrio kelompok paparan genistein. Pada embrio kelompok kontrol lebar *neuropore posterior* bervariasi antara 30 μm – 135 μm. Ukuran ini sesuai dengan penelitian Straaten, dimana pada tahap ini (stadium 10-14 somit), lebar *neuropore posterior* bervariasi dari 180 μm – 0 μm.¹³ Embrio kelompok paparan genistein juga memberikan hasil pengukuran *neuropore posterior* yang bervariasi yaitu antara 0 μm – 300 μm. Hasil ini secara uji statistik tidak signifikan ($p > 0.05$) yang berarti tidak ada perbedaan lebar *neuropore posterior* antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan genistein.

Mekanisme proses penutupan *neuropore posterior* merupakan proses yang tidak dapat dipisahkan dari proses pembentukan *neural tube* secara keseluruhan. Penutupan *neuropore posterior* dipengaruhi oleh berbagai macam faktor seperti yang sudah dibahas pada proses pembentukan *neural tube*. Seiring dengan penutupan *rhombocervical* yang berlangsung sangat cepat, titik penutupan *neuropore posterior* secara bertahap menuju ke arah kaudal di bawah level somit terakhir dan dikelilingi oleh mesoderm pre somit.¹³ Ada faktor lain yang mempengaruhi penutupan selain somit yang secara bertahap menjadi lebih penting dalam proses penutupan. Seperti telah dijelaskan di atas, genistein mengganggu proses sinyal-sinyal yang mengatur pola dorsoventral dan turut mengatur *curvature axis*. *Curvature axis* yang lebih melengkung akan menghambat penutupan *neural tube*.¹³ *Neuropore posterior* yang belum menutup mungkin terjadi karena *curvature angle* yang terlalu cembung atau terlalu cekung. Faktor-faktor yang mempengaruhi *curvature axis* belum banyak diketahui.

Somit

Pada penelitian ini, somit juga dievaluasi karena di luar dugaan, jumlah somit signifikan secara statistik untuk embrio ayam dengan perlakuan 10 μM genistein. Evaluasi dilakukan dengan

membandingkan jumlah somit pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan genistein. Pada penelitian ini, jumlah somit pada embrio dengan kelompok perlakuan genistein 10 μ M lebih banyak dibanding kelompok kontrol dan hasil ini signifikan secara uji statistik. Jumlah somit yang lebih banyak menunjukkan perkembangannya yang lebih cepat. Hal ini mungkin terjadi karena hambatan pada *FGF* akan membuat *RA* lebih mudah meningkatkan gen-gen penentu pola somit sehingga somit terbentuk lebih cepat. Genistein diketahui menghambat ekspresi *FGF*.²⁰ *FGF* diekspresikan lebih banyak pada daerah posterior.¹⁰ *FGF* signaling berperan penting selama proses perkembangan mesoderm posterior.²³ Somit merupakan turunan lapisan germinativum mesoderm yang dikenal sebagai mesoderm paraksial. Pembentukan somit bersegmen dari mesoderm presomit (paraksial) bergantung pada *segmentation clock* yang dibentuk oleh gen-gen siklik. Gen-gen siklik tersebut mencakup anggota jalur sinyal *Notch* dan *Wnts* yang diekspresikan di mesoderm presomit. Batas untuk ekspresi gen-gen penentu pola somit diatur oleh asam retinoat (*RA*) dan *FGF8*. *RA* diekspresikan dalam suatu gradien *rostrokaudal* sedangkan *FGF8* diekspresikan dalam gradien *kaudorostral*. *RA* meningkatkan gen-gen penentu pola somit sementara *FGF 8* menekan aktivitas *RA* dan menghambat pematangan mesoderm presomit menjadi somit.¹⁶

Di penelitian selanjutnya sebaiknya lebih banyak untuk mengurangi kemungkinan *error* yang terjadi. Perlu adanya penelitian lebih lanjut tentang *marker-marker* yang mungkin mempengaruhi pembentukan *neural tube*. Perlu dilakukan pengamatan irisan melintang pada embrio ayam umur 48 jam untuk melihat posisi pasti *notochord*, *MHP* dan *DLHP* yang juga turut berperan pada pembentukan *neural tube*.

SIMPULAN

Paparan genistein mempengaruhi pembentukan *neural tube* namun secara statistik memberikan hasil yang tidak signifikan.

Paparan genistein menghambat penutupan *neuropore anterior* namun secara statistik memberikan hasil yang tidak signifikan.

Paparan genistein tidak mempengaruhi penutupan *neuropore posterior*.

Paparan genistein mempercepat perkembangan somit pada dosis 10 μ M.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. Congenital Anomalies. (Online), <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs370/en/>, 2014. (diakses tanggal 20 Agustus 2014)
2. CDC. Facts about Birth Defects. (Online), <http://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/facts.html>, 2014. (diakses tanggal 20 Agustus 2014)
3. CDC. Birth Defects: Data & Statistic. (Online), <http://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/data.html>, 2013. (diakses tanggal 20 Agustus 2014)
4. Christianson A, Howson CP, and Modell B. March of Dimes: Global Report on Birth Defects. March of Dimes Birth Defects Foundation: White Plains, New York. 2006
5. Polkowski K and Mazurek AP. Biological Properties of Genistein. A Review of In Vitro and In Vivo Data. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* 2000.57 (2):135-55
6. Banerjee S, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Mini-review Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Letters* 2008.269:226–42
7. Balakrishnan B, Thorstensen, Ponnampalam, Mitchell. Transplacental Transfer and Biotransformation of Genistein in Human Placenta. *Placenta* 2010. 31 : 506-11
8. Sassi-Messai S, Gibert Y, Bernard L, Nishio S-I, Ferri Lagneau KF, et al. The Phytoestrogen Genistein Affects Zebrafish Development through Two Different Pathways. *PLoS ONE* 2009. 4 (3) : 4935. doi:10.1371/journal.pone.0004935
9. Stern CD. The Chick Embryo – past, present and future as a model system in developmental biology. *Mechanism of Development* 2004. 121: 1011-13
10. Colas JF and Schoenwolf, GC. A Peer Reviewed Forum. Towards a Cellular and Molecular Understanding of Neurulation. *Developmental Dynamics* 2001. 221: 117-45
11. Hamburger V and Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J.Morph.* 1951. 88:49-92
12. Dahlan, MS. Statistik Untuk Kedokteran dan Kesehatan. Cetakan ketiga. Jakarta: Salemba Medika. 2013

13. Straaten H, Janseen H, Peeters M, Copp AJ, Heeking J. Neural Tube Closure in the Chick Embryo Is Multiphasic. *Developmental Dynamics* 1996. 207:309-18
14. Sullivan, G.M., Feinn, Richard. Using Effect Size—or Why the P Value Is Not Enough. *J Grad Med Educ* 2012. 4(3): 279-82
15. Zhou J, Kim HY, and Davidson LA. Actomyosin stiffens the vertebrate embryo during crucial stages of elongation and neural tube closure. *Development*. 2009. 136 (4) : 677-88
16. Sandler TW. *Langman's Medical Embryology*. 10th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2006
17. Corral RD and Storey KG. Markers in vertebrate neurogenesis. *Nature Reviews Neuroscience* 2001. (2): 835-39
18. Patthey C, Gunhaga L, Edlund T. Early Development of the Central and Peripheral Nervous Systems Is Coordinated by Wnt and BMP Signals. *PLoS ONE* 2008. 3(2):1625. doi:10.1371/journal.pone.0001625
19. Bellairs R and Osmond M. *The Atlas of Chick Development*. Elsevier, Ltd. 2005
20. Kawa-uchi T, Nifuji A, Mataga N, et al. Fibroblast Growth Factor Downregulates Expression of a Basic Helix-Loop-Helix-type Transcription Factor, Scleraxis, in a Chondrocyte-Like Cell Line, TC6. *Journal of Cellular Biochemistry* 1998. 70:468–77
21. Yamaguchi Y and Miura M. How to form and close the brain: insight into the mechanism of cranial neural tube closure in mammals. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013. 70: 3171–86
22. Eom D, Amarnath S, Fogel J, Agarwala S. Bone morpho-genetic proteins regulate neural tube closure by interacting with the apicobasal polarity pathway. *Development*, 2011. 138:3179–88
23. Draper BW, Stock DW, Kimmel CB. Zebrafish FGF24 Functions with FGF8 to Promote Posterior Mesodermal Development. *Development* 2003. (19):4639-54