

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*)

2.1.1 Sejarah Teh

Teh merupakan salah satu minuman yang paling populer di dunia. Posisinya berada pada urutan kedua setelah air. Seiring dengan perkembangannya yang telah menyebar ke berbagai belahan dunia, teh telah menjadi bagian yang menyatu dengan tradisi setempat. Diperkirakan lebih dari 2,5 juta ton berat kering teh diproduksi tiap tahunnya di seluruh dunia (Soraya, 2007).

Teh berasal dari kawasan India bagian utara dan Cina Selatan. Ada dua kelompok varietas teh yang terkenal, yaitu *Camellia sinensis* var. *assamica* yang berasal dari Assam India dan *Camellia sinensis* var. *sinensis* yang berasal dari Cina (Soraya, 2007).

Pada masa lalu, teh yang dinikmati adalah teh alami, yaitu teh yang hanya mengandung daun teh atau campuran daun teh dan bunga melati. Namun, pada perkembangan saat ini, cita rasa teh telah diperkaya dengan menambahkan perasa untuk mendapatkan rasa dan aroma tertentu yang diinginkan (Soraya, 2007).

2.1.2 Taksonomi dan Morfologi Teh

Taksonomi tanaman teh (*Camellia sinensis*) adalah berikut ini:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivision	: Spermatophyta
Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Subclass	: Dilleniidae
Order	: Theales
Family	: Theaceae
Genus	: <i>Camellia</i> L.
Species	: <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze (USDA, 2015)



Gambar 2.1 A) *Camellia sinensis* var. *Assamica* Berasal dari Assam (India), B) *Camellia sinensis* var. *Sinensis* Berasal dari Cina (Soraya, 2007)

Camellia sinensis var. *assamica* (Gambar 2.1.A) memiliki daun agak besar dengan ujung runcing, sedangkan *Camellia sinensis* var. *sinensis* (Gambar 2.1.B) daunnya lebih kecil dan ujungnya agak tumpul. Pohon teh umumnya berukuran kecil dan tampak perdu karena sering dilakukan pemangkasan. Bila tidak dipangkas, tanaman teh akan tumbuh kecil ramping setinggi 5—10 meter dengan bentuk tajuk seperti kerucut. Tanaman teh memiliki batang tegak,

berkayu, bercabang-cabang, ujung ranting, dan daun muda berambut halus. Daunnya tunggal, bertangkai pendek, letak berseling, helai daun kaku seperti kulit tipis, bentuknya elips memanjang, ujung dan pangkal runcing, serta tepi bergerigi halus. Daunnya memiliki pertulangan menyirip, panjang 6—18 cm, lebar 2—6 cm, warnanya hijau, dan permukaan mengkilap. Pucuk daun muda merupakan bagian yang digunakan untuk pembuatan minuman teh (Soraya, 2007).



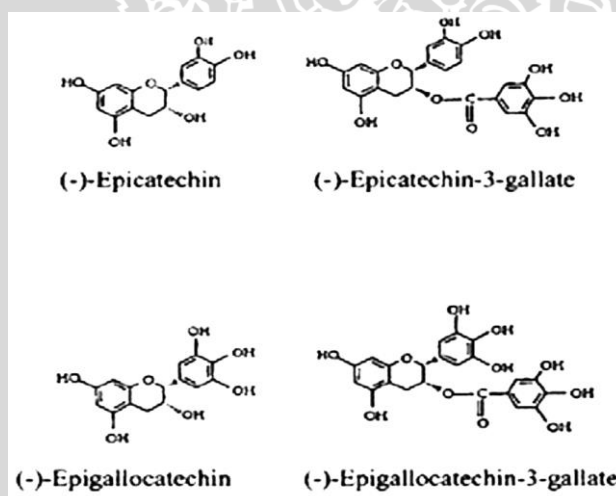
Gambar 2.2 Bunga Teh (*Camellia sinensis*) (Soraya, 2007)

Bunga muncul di ketiak daun, tunggal atau beberapa bunga bergabung menjadi satu, berkelamin ganda, garis tengah 3—4 cm, warnanya putih cerah dengan kepala sari berwarna kuning dan harum (Gambar 2.2). Buahnya berbentuk kotak, berdinding tebal, dan bila telah tua akan pecah. Ketika masih muda akan berwarna hijau dan setelah tua berubah coklat kehitaman. Perbanyakannya bisa dilakukan dengan biji, setek, sambung, dan cangkok (Soraya, 2007).

2.1.3 Kandungan Teh

Komposisi daun teh (*Camellia sinensis*) terkenal sangat kompleks. Lebih dari 400 komponen kimiawi telah diidentifikasi terkandung dalam daun teh.

Jumlah komponen kimiawi ini berbeda-beda tergantung pada tanah, iklim, dan usia daun teh ketika dipetik (Syah, 2006). Daun teh segar mengandung 36% senyawa fenolik, 25% karbohidrat, 15% protein, 6,5% lignin, 4% asam amino, 2% lipid, 1,5% asam organik, 0,5% klorofil, dan kurang dari 0,1% substansi volatile lainnya (Ting, 2008). Polifenol yang merupakan komponen utama pada daun teh. Polifenol yang utama pada daun teh adalah flavonoid yang sebagian besar dikenal sebagai katekin (Pastore dan Fratellone, 2006). Katekin (polifenol) adalah antioksidan yang kuat, lebih kuat daripada vitamin E, C, dan β -karoten. Di dalam teh terdapat beberapa jenis katekin, yaitu *epicatechin* (EC), *epicatechingallate* (ECG), *epigallocatechin* (EGC), *epigallocatechin gallate* (EGCG), *gallocatechin*, dan *catechin* (Gambar 2.3) (Syah, 2006).



Gambar 2.3 Kandungan Polifenol Utama dalam Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) (Pastore dan Fratellone, 2006)

Pada penelitian Oliveira (2012) yang membandingkan kandungan katekin dan kafein pada ekstrak teh hijau, konsentrasi rata-rata katekin total masih lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi kafein ($4,26 \pm 0,62$ vs $2,76 \pm 0,70$). Sedangkan konsentrasi katekin yang paling tinggi adalah EGCG, yaitu sebesar $2,00 \pm 1,08$ (Oliveira, 2012). Pernyataan berikut dapat dilihat pada Tabel 2.1. Pada penelitian Perva-Uzunalic *dkk.* (2005), ekstrak baku dianalisis untuk menguji

adanya kandungan katekin utama (EC, EGC, ECG, EGCG), kafein, proanthocyanidins dan flavonol (myricetin, caempherol, quercetin). Pada bahan awal ditemukan mengandung 191 g katekin/kg, 36 g kafein/kg dan 5,2 g flavonol/kg daun teh kering (Tabel 2.2).

Epigallocatechin gallate dalam daun teh merupakan komponen aktif yang paling signifikan dan bersifat antioksidan tinggi. *Epigallocatechin gallate* paling banyak ditemukan pada bagian tunas daun dan daun pertama (Pastore dan Fratellone, 2006). Teh hijau memiliki kandungan EGCG lima kali lebih banyak dibandingkan dengan teh biasa (Syah, 2006). Perbandingan komposisi antara teh hijau dan teh hitam dijelaskan dalam Tabel 2.3.

Pada proses ekstraksi daun teh, bahan pelarut yang berbeda akan menunjukkan derajat antioksidan yang berbeda pula (Hossain *dkk.*, 2013). Berdasarkan hasil penelitian Sikora dan Ogonowski (2011), ekstrak daun teh akan menunjukkan kandungan antioksidan terbaik dengan konsentrasi paling tinggi apabila diekstraksi dengan pelarut alkohol atau etanol.

Tabel 2.1 Kandungan dan Konsentrasi Kafein, Katekin, dan Flavonols dalam Daun Teh Hijau (Perva-Uzunalic *dkk.*, 2006; Oliveira, 2012)

Komponen Aktif	Kandungan (g/kg daun kering)	Konsentrasi (%)
Kafein	36.0	2.75±0.70
Katekin		
Epicatechin gallate	15.2	1.52±1.13
Epigallocatechin	46.0	-
Epigallocatechin gallate	129	2.00±1.08
Epicatechin	0.9	0.68±0.43
Katekin mayor	191	4.26±0.62
Flavonol		
Myricetin	0.8	-
Quercetin	1.8	-
Kaempherol	2.6	-

Tabel 2.2 Komposisi Teh Hijau dan Teh Hitam (Ting, 2008)

	Teh Hijau (%)	Teh Hitam (%)
Katekin	30	9
Theaflavin	-	4
Polifenol sederhana	2	3
Flavonol	2	1
Polifenol lainnya	6	23
Theanin	3	3
Asam amino	3	3
Peptida/protein	6	6
Asam organik	2	2
Gula	7	7
Karbohidrat lainnya	4	4
Lipid	3	3
Kafein	3	3
Potassium	5	5
Mineral lainnya	5	5

2.1.4 Penggunaan Teh di Masyarakat

Teh merupakan minuman yang berasal dari pucuk daun tanaman *Camellia sinensis* dan salah satu minuman yang paling sering dikonsumsi di dunia selain air putih (Ratnasooriya dan Fernando, 2009). Teh biasa dikonsumsi dengan diseduh dengan air panas dan dinikmati bersama dengan kudapan (*snack*) (Soraya, 2007). Teh banyak dikonsumsi oleh laki-laki dan perempuan termasuk ibu hamil. Saat ini teh dikonsumsi sekitar 3—5 juta botol setiap harinya (Ratnasooriya dan Fernando, 2009). Teh dibagi menjadi 3 tipe berdasarkan tingkatan fermentasinya, yaitu teh hijau atau *green tea* (tanpa ada tahap fermentasi), teh oolong (semifermentasi), dan teh hitam atau *black tea* (fermentasi penuh) (Sinija dan Mishra, 2008). Produk teh yang dikonsumsi terbesar dan terpopuler di Indonesia adalah teh hitam. Namun, seiring dengan perkembangan pangsa pasar, teh hijau pun kini menjadi produk unggulan dengan berbagai kelebihan yang dimiliki (Soraya, 2007).

Seiring dengan perkembangan ilmu pangan yang semakin maju, khasiat minum teh pun semakin banyak diketahui. Hal ini mendorong konsumsi

teh dari tahun ke tahun. Di Inggris misalnya konsumsi teh mencapai 2,5 kg/kapita/tahun, sedangkan konsumsi teh rata-rata penduduk dunia adalah 120 mL/hari per kapita (Soraya, 2007; Besral *dkk.*, 2007). Sayangnya, konsumsi teh di Indonesia masih rendah, yakni baru mencapai 0,2 kg/kapita/tahun. Padahal Indonesia merupakan penghasil teh kelima terbesar di dunia setelah India, Cina, Sri Lanka, dan Kenya. Diduga penyebab rendahnya tingkat konsumsi teh di Indonesia karena masyarakat belum banyak mengetahui khasiat teh terhadap kesehatan. Walau minum teh sudah menjadi semacam budaya dan tersedia hampir di setiap tempat, konsumsi teh belum begitu tinggi. Konsumsi teh di Indonesia lebih banyak memilih teh jenis *soft drink* atau minuman ringan yang rasa dan aromanya sudah dimodifikasi (Soraya, 2007).

2.1.5 Manfaat Teh

Khasiat utama teh berasal dari senyawa polifenol yang dikandungnya. Di dalam tubuh, senyawa polifenol yang dikandungnya membantu kinerja enzim *superoxide dismutase* (SOD) yang berfungsi meyingkirkan radikal bebas. Radikal bebas yang dihasilkan dari proses oksidasi di dalam tubuh berbahaya bagi kesehatan karena menghambat aliran darah sehingga dapat menimbulkan penyakit kardiovaskular. Selain itu, radikal bebas dapat menyebabkan kulit menjadi keriput dan membentuk noda hitam. Secara medis senyawa katekin teh hijau memiliki banyak manfaat seperti mampu mengurangi risiko kanker, tumor, menurunkan kolesterol darah, mencegah tekanan darah tinggi, membunuh bakteri dan jamur, serta menjaga nafas dari bau busuk (*halitosis*). Khasiat teh sebagai antikanker sudah dikenal luas. Kandungan terbesar dalam teh hijau adalah senyawa EGCG yang diunggulkan sebagai senyawa pencegah kanker (*chemopreventive agent*) (Syah, 2006).

Kemampuan katekin teh hijau menangkap radikal bebas 100 kali lebih efektif daripada vitamin C dan 25 kali lebih efektif daripada vitamin E. Selain itu, teh juga mengandung alkaloid dan mineral. Mineral yang penting adalah *fluoride* yang baik untuk kesehatan gigi. Sementara itu, kandungan kafein dalam teh dapat memperlancar pengeluaran air seni. Vitamin C mampu menurunkan stres dan mencegah flu, vitamin B-kompleks mampu membantu metabolisme karbohidrat, dan asam amino mampu menurunkan tekanan darah (Syah, 2006).

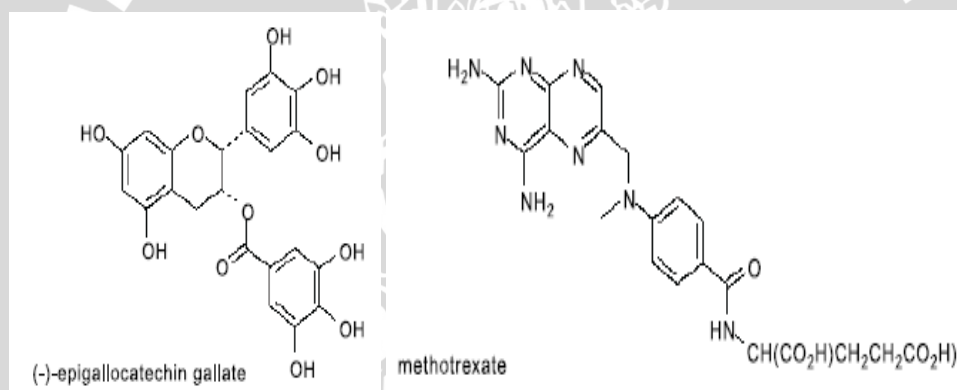
2.1.6 Toksikologi

Konsumsi teh hijau pada wanita hamil secara berlebihan dikenal dapat mengakibatkan kerusakan saraf janin. Oleh karena itu, perempuan yang mengonsumsi teh hijau harus diimbangi dengan pemberian suplemen asam folat (Syah, 2006). Hal ini disebabkan oleh kandungan katekin teh menghambat aktivitas enzim *dihydrofolate reductase* (DHFR) yang mengatalisis bentuk tidak folat, yaitu *7,8-dihydrofolate* (DHF) menjadi folat yang aktif *5,6,7,8-tetrahydrofolate* (THF). Mekanisme inhibisi ini memicu terganggunya *pathway* metabolisme folat dan rendahnya bioavailabilitas folat pada sel. Oleh karena itu, hal tersebut meningkatkan risiko terjadinya *neural tube defect* (NTD) (Ye *dkk.*, 2011).

Berdasarkan penelitian Ye *dkk.* (2011) peningkatan risiko NTD berkaitan dengan konsumsi teh selama periode perikonsepsi setiap hari dan disesuaikan dengan usia ibu, pendidikan, pekerjaan, dan suplementasi asam folat selama periode perikonsepsi. Terdapat 3 subtipe mayor NTD yang tampak, yaitu anensefali, spina bifida, dan ensefalokel. Dalam studi *case-control* tersebut, minum teh setiap hari selama periode perikonsepsi dikaitkan dengan peningkatan risiko NTD sebanyak 3 kali lipat.

Kandungan dalam ekstrak daun teh hijau lainnya adalah kafein yang merupakan golongan alkaloid. Pada beberapa penelitian yang menggunakan hewan coba, konsumsi kafein maternal dapat mengganggu kehamilan seperti terjadinya kehamilan preterm, waktu persalinan, abortus, atau *still birth* (Ratnasooriya dan Fernando, 2009). Terdapat hal menarik di sini, kandungan polifenol dalam teh membentuk suatu kompleks yang stabil dengan kafein dan menurunkan toksisitas kafein (Hewavitharanage, Karunaratne, dan Kumar, 1999).

2.2 Epigallocatechin Gallate (EGCG)



Gambar 2.4 Kemiripan Struktur antara *Epigallocatechin Gallate* dengan Methotrexate (Navarro-Peran *dkk.*, 2005)

Struktur EGCG mirip dengan struktur methotrexat (MTX) yang dikenal sebagai obat kanker yang diproduksi dari bahan sintesis (Gambar 2.4) (Syah, 2006). *Epigallocatechin gallate* mampu berikatan dengan enzim DHFR manusia pada tempat yang sama dan membentuk kompleks inhibitor DHFR. *Epigallocatechin gallate* berikatan dengan kuat pada banyak molekul biologi dan menyebabkan berbagai macam aktivitas enzim. Konsentrasi efektif EGCG pada darah atau jaringan adalah berkisar 0,1—1,0 $\mu\text{mol/L}$ (Navarro-Peran *dkk.*, 2005). Tingkat senyawa aktif teh akan berbeda dalam penyajian teh yang berbeda pula (Oliveira, 2012). Hal tersebut dijelaskan dalam Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Kandungan EGCG pada Berbagai Macam Penyajian Teh (Bhagwat, Haytowitz, & Holden, 2014)

Jenis Penyajian Teh	Kandungan EGCG (mg/100g)
Teh hitam diseduh	9.36
Teh hitam diseduh (dekafeinasi)	1.01
Teh hitam siap minum (diet)	0.12
Teh hitam siap minum	0.51
Teh diseduh (tambahan rasa buah)	4.15
Teh hijau diseduh	70.20
Teh hijau diseduh (dekafeinasi)	26.05
Teh hijau diseduh (tambahan rasa)	19.97
Teh hijau diseduh (Quingmao – daun lebar)	68.20
Teh hijau siap minum	3.69
Teh instan (dekafeinasi)	0.45
Teh instan (diet)	0.49
Teh instan bubuk (tanpa pemanis)	0.86
Teh oolong diseduh	34.48
Teh putih diseduh	42.45

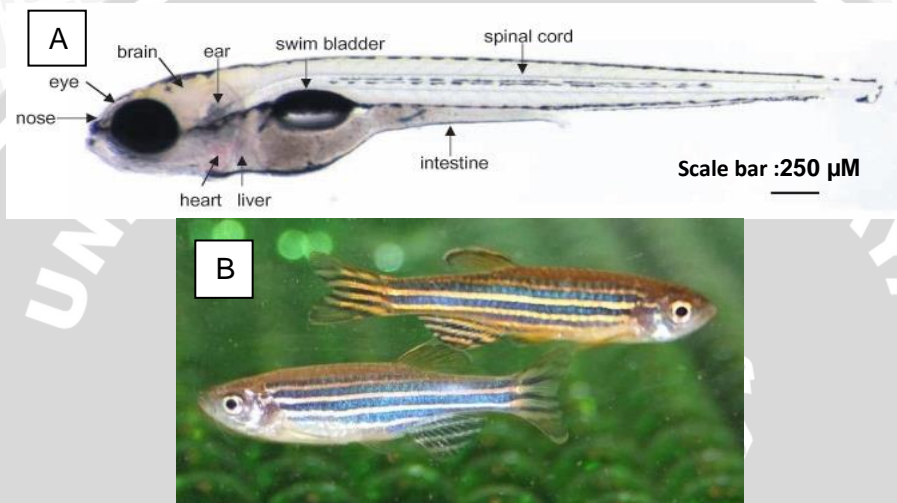
2.3 Ikan Zebra (*Danio rerio*)

Ikan zebra atau *zebrafish* (*Danio rerio*) adalah hewan coba vertebrata yang dapat digunakan dalam uji toksisitas dan teratogenesis suatu senyawa karena sifatnya yang sensitif terhadap paparan kimia selama masa perkembangan atau embriogenesisnya (Selderslaghs *dkk.*, 2009). Keseluruhan rangka sudah tersusun dalam 24 jam setelah fertilisasi, larva ikan zebra yang transparan sehingga organ, sel, dan jaringan dapat terlihat secara *in vitro* dan diikuti secara *real time* pada hewan yang masih hidup, serta, sistem kardiovaskular, saraf, dan pencernaan ikan zebra menyerupai mamalia (Ton *dkk.*, 2006).

Perkembangan malformasi jantung pada ikan zebra dapat dilihat dengan jelas pada usia 72 *hpf* yang pada periode waktu tersebut ikan zebra sudah dalam stadium larva yang dapat berenang aktif (Nagel, 2006; Kimmel *dkk.*, 1995). Keunggulan ikan zebra sebagai hewan coba dalam uji abnormalitas jantung adalah larva ikan zebra yang transparan sehingga dapat dengan mudah

mengamati organ terutama jantung secara *real time* dan defek berat pada pembentukan jantung tidak menimbulkan kematian yang cepat dan ikan zebra mampu bertahan hidup satu minggu pertama tanpa fungsi sirkulasi (Ton *dkk.*, 2006; Sehnert *dkk.*, 2002).

2.3.1 Taksonomi Ikan Zebra

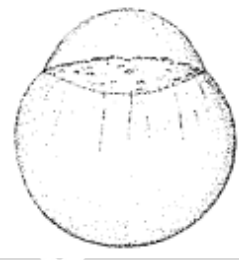
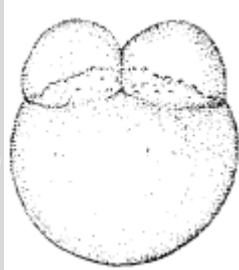
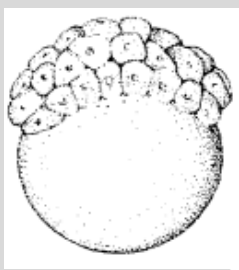
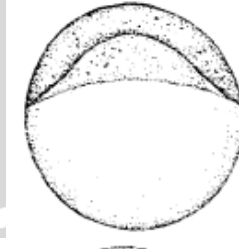
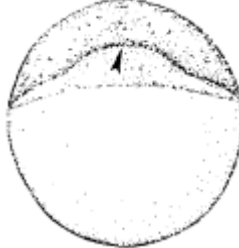


Gambar 2.5 A) Larva Ikan Zebra (*Danio rerio*) 6 dpf, B) Induk Ikan Zebra Dewasa (Rubinstein, 2003)

- Kingdom : Animalia
- Phylum : Chordata
- Subphylum : Vertebrata
- Infraphylum : Gnathostomata
- Class : Actinopterygii
- Subclass : Neopterygii
- Infraclass : Teleostei
- Order : Cypriniformes
- Family : Cyprinidae
- Genus : *Danio*
- Species : *Danio rerio* (Hamilton, 1822) – zebra danio (ITIS, 2015)

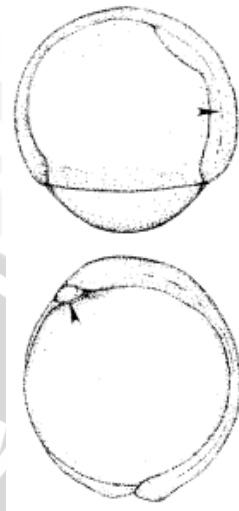
2.3.2 Perkembangan Embrio Ikan Zebra

Tabel 2.4 Tahapan Perkembangan Awal Ikan Zebra (Kimmel *dkk.*, 1995)

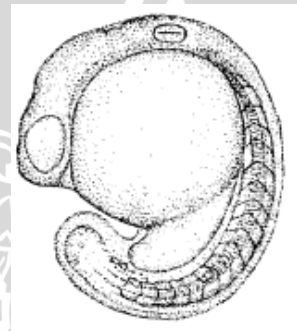
Stadium	Waktu (hpf)	Perkembangan	Gambar
Periode zigot	0 - 3/4	Telur yang baru difertilisasi	
Periode cleavage	3/4 - 2 1/4	Sel membelah menjadi 2, 4, 8, 16, 32, sampai 64 sel	 
Periode blastula	2 1/4 - 5 1/4	Pembentukan <i>epiboly</i> , yaitu penipisan dan penyebaran dari kedua <i>yolk syncytial layer</i> dan blastoderm melewati <i>yolk cell</i> , yang pada akhirnya seluruh <i>yolk cell</i> akan terliputi, tahapan ini diawali dengan: <ul style="list-style-type: none"> • Terbentuknya kubah • Perubahan <i>blastodisc</i> menjadi blastoderm 	 



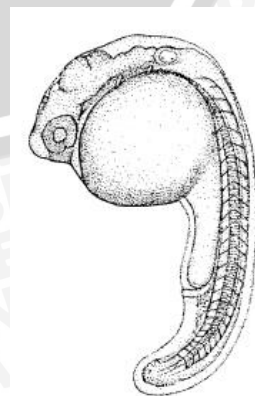
- Periode gastrula 5 ¼ - 10
- *Epiboly* terbentuk sempurna
 - Terbentuk *tail bud*
 - Terbentuk *primary germ layer* dan *embryonic axis*



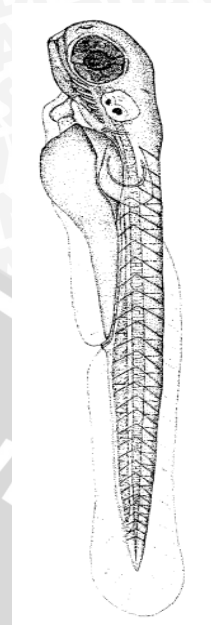
- Periode segmentasi 10 - 24
- Awal pembentukan neuron
 - *Optic primordium* dapat diidentifikasi
 - Awal pembentukan ginjal
 - *Optic placode* yang merupakan awal pembentukan telinga mulai tampak
 - Olfaktori primordium dapat diidentifikasi
 - Awal terjadinya pembagian dan diferensiasi sel darah
 - Pelurusan pada trunkus posterior hampir sempurna, pemanjangan ekor di anterior masih membentuk kurva di bagian ventral
 - Kontraksi miotom secara spontan



- Periode pharyngula 24 - 48
- Pembentukan sistem sirkulasi, jantung mulai berdenyut, mulai ada aliran darah
 - Terjadi pigmentasi
 - Sirip mulai terbentuk
 - Kepala memendek dan mulai lurus
 - Muncul sensitifitas terhadap rangsang taktil

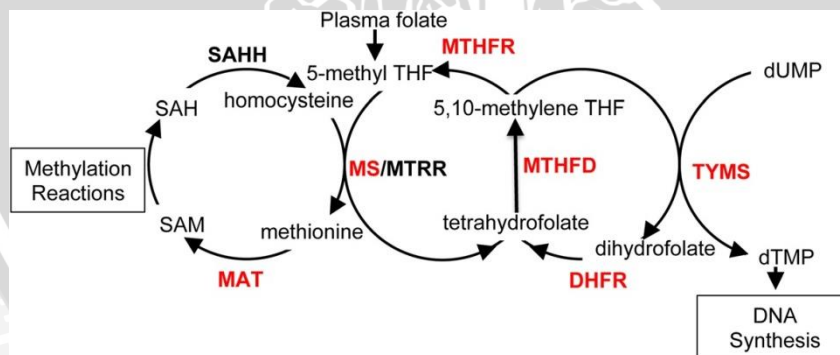


- Periode penetasan 48 – 72
- Perkembangan melambat mulai
 - Morphogenesis hampir sempurna



- Periode larva awal > 72
- Disebut sebagai larva
 - Mulai berenang secara aktif
 - Melarikan diri dan mencari makan

2.4 Folate-mediated One-carbon Metabolism (FOCM)



Gambar 2.6 FOCM (Lee dkk., 2012)

Folate-mediated one-carbon metabolism berperan dalam perkembangan manusia dan perkembangan penyakit. Variasi genetik pada gen yang mengatur folat dalam tubuh manusia berhubungan dengan peningkatan risiko NTD, penyakit kardiovaskular, kanker, dan penurunan kognitif. Asam folat atau vitamin

B9 adalah kofaktor dalam FOCM, yang berperan sebagai kofaktor untuk enzim yang terlibat dalam reaksi transmetilasi seluler dan sintesis *de novo* untuk purin dan timidilat. Dalam bentuk yang tereduksi, molekul folat bertindak sebagai pembawa unit karbon tunggal. Folat yang termetilasi adalah kofaktor dalam dua langkah selama sintesis inosin (prekursor dari basa purin) dan dalam sintesis timidilat (prekursor yang diperlukan untuk sintesis DNA) (Lee *dkk.*, 2012).

Setelah metilasi, folat memasuki sirkulasi portal sebagai 5-*methyltetrahydrofolate* (5-*methyl* THF). Di dalam sel, 5-*methyl* THF bertugas sebagai pendonor metil dan sumber THF. *Tetrahydrofolate* bertugas sebagai akseptor unit karbon tunggal dan produksi folat yang lain. Reaksi reduksi 5,10-*methylene* THF menjadi 5-*methyl* THF oleh enzim 5, 10-*methylenetetrahydrofolate reductase* (MTHFR). Pembawa kelompok metil, 5-*methyl* THF, dibutuhkan untuk konversi homosistein menjadi metionin. Transportasi dan metabolisme folat dikendalikan di bawah kontrol genetik. Asam folat memiliki peranan penting juga dalam metabolisme DNA yang dibutuhkan saat sintesis *deoxythymidine monophosphate* (dTMP) dari *deoxyuridine monophosphate* (dUMP) atau sintesis *de novo* basa timin dan mempertahankan metilasi DNA (Alfarra *dkk.*, 2011). *Thymidilate synthase* adalah enzim yang mengatalisis konversi dUMP menjadi dTMP, di mana 5,10-*methylene* THF bertugas sebagai pendonor metil (Longley *dkk.*, 2003). Dalam kondisi kekurangan folat, dUMP akan menumpuk di sel dan akan mendapatkan kesempatan untuk menjadi DNA yang seharusnya menjadi peran timin. Penggabungan urasil yang berlebihan dalam DNA tidak hanya mengarah ke mutasi titik, tetapi akan memungkinkan menyebabkan kerusakan tunggal atau ganda dari rantai DNA, kerusakan kromosom, fragmentasi dan pembentukan

mikronukleus (Alfarra *dkk.*, 2011). Oleh karena itu, ibu hamil sangat memerlukan suplementasi asam folat sebelum konsepsi untuk mengurangi risiko terjadinya kelainan kongenital akibat defisiensi folat (Lee *dkk.*, 2012).

Dihydrofolate reductase (DHFR) adalah salah satu enzim kunci dalam FOCM (Kao *dkk.*, 2008). Pada *folate-mediated one-carbon metabolism*, DHFR bertugas mengatalisis asam folat dan mereduksi 7,8-*dihydrofolate* (DHF) menjadi 5,6,7,8-*tetrahydrofolate* (THF) yang bertugas sebagai koenzim pada reaksi transfer grup karbon tunggal ini termasuk di dalamnya adalah biosintesis nukleotida (Navarro-Peran *dkk.*, 2005). Proses reduksi tersebut merupakan satu-satunya *pathway* yang mengaktivasi bentuk oksidasi dari koenzim folat. Perubahan atau penghambatan aktivitas DHFR sering menyebabkan efek yang sangat besar pada stabilitas DNA, ekspresi gen, proliferasi sel yang abnormal, abnormalitas embriogenesis termasuk NTD dan penyakit lainnya (Kao *dkk.*, 2008).

Pada penelitian yang dilakukan Lee *dkk.* (2012) dengan hasil manusia dan ikan zebra (*Danio rerio*) memiliki mekanisme yang sama pada metabolisme asam folat (FOCM). Metabolisme asam folat penting dalam perkembangan awal ikan zebra. *Dihydrofolate reductase* pada ikan zebra dengan manusia juga memiliki kemiripan. *Dihydrofolate reductase* ditemukan pada ova dan otak embrio ikan zebra dalam jumlah besar pada fase awal perkembangan dan menurun setelah 3 *dpf* (Lee *dkk.*, 2012; Kao *dkk.*, 2008).

2.5 Pembentukan Jantung

2.5.1 Pembentukan Jantung Manusia

Seluruh sistem kardiovaskular, yaitu jantung, pembuluh darah, dan sel darah berasal dari lapisan germinativum mesoderm. Meskipun pada awalnya

berpasangan, pada hari ke-22 perkembangan kedua tabung jantung membentuk satu tabung jantung yang sedikit bengkok yang terdiri dari tabung endokardium di sebelah dalam dikelilingi oleh selubung miokardium. Selama minggu ke-4 sampai ke-7 jantung terbagi menjadi struktur beruang 4 yang khas (Sadler, 2012).

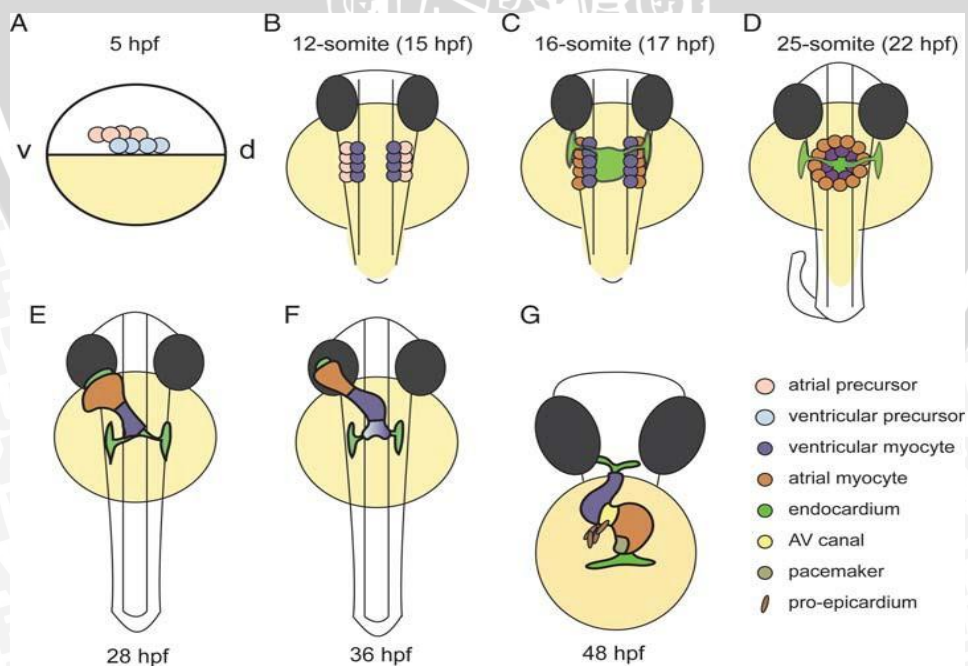
Septum-septum utama jantung terbentuk antara hari ke-27 dan ke-37 perkembangan. Pembentukan septum di jantung sebagian terjadi melalui pembentukan jaringan bantalan endokardium di kanalis atrioventrikularis dan di region konotrunkal. Pembentukan septum di atrium dimulai dengan suatu septum primum. Septum primum, suatu krista berbentuk bulan sabit yang turun dari atap atrium mulai membagi atrium menjadi dua, tetapi meninggalkan sebuah lubang, ostium primum, untuk menghubungkan kedua bagian atrium tersebut. Kemudian saat ostium primum mengalami obliterasi akibat penyatuan ostium primum dengan bantalan endokardium, terbentuk ostium sekundum akibat kematian sel yang menciptakan lubang di septum primum. Akhirnya terbentuk septum sekundum, tetapi suatu lubang antar atrium, foramen ovale, menetap. Hanya pada saat lahir, ketika tekanan di atrium kiri menetap, kedua septum saling menekan dan menutup hubungan antara keduanya (Sadler, 2012).

Terdapat empat bantalan endokardium yang mengelilingi kanalis atrioventrikularis. Penyatuan bantalan superior dan inferior yang saling berhadapan membagi ostium menjadi kanalis atrioventrikularis kanan dan kiri. Jaringan bantalan ini kemudian menjadi fibrosa dan membentuk katup mitral (bikuspid) di kiri dari katup trikuspid di kanan. Septum interventrikularis terdiri dari pars muskularis yang tebal dan pars membranasea tipis yang dibentuk oleh bantalan atrioventrikel endokardium inferior, penebalan konus kanan dan penebalan konus kiri. Bulbus dibagi menjadi (a) trunkus

(trunkus pulmonalis dan aorta), (b) konus (saluran aliran keluar aorta dan trunkus pulmonalis), dan (c) bagian bertrabekula dari ventrikel kanan. Regio trunkus dibagi oleh septum aortikopulmonal berbentuk spiral menjadi dua arteri utama. Penebalan konus membagi saluran aliran keluar pembuluh pulmonal dari aorta dan dengan jaringan bantalan endokardium inferior yang menutup foramen interventrikularis (Sadler, 2012).

Pada awalnya pacemaker jantung terletak di bagian kaudal tabung jantung kiri. Kemudian sinus venosus mengambil alih fungsi ini, dan sewaktu sinus bergabung ke dalam atrium kanan, pacemaker terletak di dekat muara vena kava superior. Nodus dan berkas atrioventrikel (berkas His) berasal dari dua sumber, yaitu sel di dinding kiri sinus venosus dan sel dari kanalis atrioventrikularis yang kemudian menempati posisinya di dasar septum interatrial (Sadler, 2012).

2.5.2 Pembentukan Jantung Ikan Zebra



Gambar 2.7 Tahapan Perkembangan Jantung Ikan Zebra (Bakkers *dkk.*, 2011)



Jantung merupakan organ yang pertama kali terbentuk dan berfungsi selama perkembangan embrio vertebrata. Pembentukan jantung dimulai dengan spesifikasi sel progenitor *myocardial* dan *endocardial*. Terdapat dua kelompok sel progenitor (sel atrial dan ventrikular) yang terletak di *lateral marginal zone* pada masing-masing sisi embrio sebelum gastrulasi dimulai. Sel progenitor atrial terletak lebih ventral di *lateral marginal zone* dibandingkan sel progenitor ventrikular. Selama gastrulasi, sel-sel progenitor jantung bergerak ke arah dorsal melalui garis tengah hingga berakhir di *anterior later plate mesoderm* (ALPM). Diferensiasi jantung diinisiasi oleh sel-sel *myocardial* ventrikel dengan mengekspresikan myosin pada stadium 12 somit (Gambar 2.7.B). Selama stadium somit tengah dan akhir (Gambar 2.7.B-C), jaringan *myocardial* mengalami ekspansi ke arah lebih lateral dari ALPM akibat adanya diferensiasi atrial miosit. Selagi sel-sel *endocardial* bermigrasi dari ALPM ke *midline*, sel-sel *myocardial* juga mengikuti. Ketika dua arkus jantung bersatu di garis tengah, terbentuk struktur *cardiac disc* dengan sel-sel *endocardial* di tengah dan *ventricular myocytes* di sekelilingnya dan *atrial myocytes* di tepi *cardiac disc* (Gambar 2.7.D). Terjadi transformasi *cardiac disc* menjadi *cardiac tube*. *Endocardium* membentuk lapisan dalam *myocardial tube*. Pada 28 hpf, *linear heart tube* sudah terbentuk dengan *venous pole* terletak di anterior kiri dan *arteriol pole* terletak di garis tengah (Gambar 2.7.E). Diferensiasi jantung berlanjut pada *arteriol pole* dan menghasilkan kardiomiosit tambahan di region ini. Pada 36 hpf, *cardiac looping* telah dimulai dengan perpindahan ventrikel ke arah garis tengah dan konstrik pada kanal AV pertama kali terlihat (Gambar 2.7.F). *Heart tube* terus-menerus mengalami looping sampai terbentuk S-shaped loop (gambar 2.7.G). *Ellipsoid dextra cardiac pro-epicardial cell* terletak di dekat

kanal AV, dari situ menutupi *myocardium* dengan lapisan *epicardial*. Pacemaker berada di inner kurvatura atrium bagian dalam di dekat venous pole (Bakkers *dkk.*, 2011). Gambar jantung ikan zebra tanpa kelainan dapat dilihat pada Gambar 2.8. di mana atrium (a) berada di kanan, ventrikel (v) berada di kiri sisi embrio, dan *outflow tract* (o) atau bulbus arteriosus (Chen *dkk.*, 1996).



Gambar 2.8 Jantung Normal Ikan Zebra 2 dpf (Chen *dkk.*, 1996)

Tabel 2.5 Perbandingan Periode Waktu Pembentukan Jantung Ikan Zebra dan Manusia (Kowalski *dkk.*, 2014)

Tahap Pembentukan Jantung	Ikan Zebra (dpf)	Manusia (dpf)
Kehamilan	-	9 bulan
<i>Linear heart tube</i>	1	28
Detak jantung pertama	1	28
Onset aliran darah	1	29
<i>Cardiac looping</i>	1-2	28—32
Onset trabekulasi ventrikel	2	29
Septasi atrium	-	30—46
Septasi ventrikel	-	30—46
Pembentukan AV <i>cushion</i>	2	32
Pembentukan <i>outflowtract cushion</i>	-	32

2.6 Malformasi Jantung

2.6.1 Mekanisme Malformasi Jantung

Penjelasan mengenai respon sel normal maupun sel kanker terhadap kandungan fenol dalam teh adalah adanya kemiripan struktur EGCG dalam daun teh dengan salah satu inhibitor DHFR, yaitu methotrexat dan aminopterin. Oleh karena itu, EGCG membentuk kompleks inhibitor DHFR sehingga menghambat

kinerja dari enzim DHFR sendiri. Alhasil, inhibisi dari DHFR mengakibatkan kekacauan biosintesis DNA sehingga karena aksinya inhibitor DHFR disebut sebagai “antifolat” (Navarro-Peran *dkk.*, 2005).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Navarro-Peran *dkk.* (2005) ekstrak teh hijau yang mengandung EGCG dengan jumlah signifikan mampu menghambat aktivitas DHFR secara kuat pada liver sapi dan ayam. Penelitian tersebut mampu menjelaskan kejadian anensefali dan spina bifida yang sering kali dikaitkan dengan defisiensi asam folat karena konsumsi teh hijau yang tinggi oleh ibu selama periode prakonsepsi (Correa, Stolley, dan Liu, 2000). Defek jantung kongenital juga dapat disebabkan karena gangguan FOCM dan DHFR. Defek jantung merupakan malformasi yang sering terjadi pada manusia (Zhu *dkk.*, 2012).

Ikan zebra dan manusia memiliki anatomi jantung yang berbeda, tetapi keduanya memiliki fungsi DHFR yang homolog. *Dihydrofolate reductase* memiliki peran dalam perkembangan jantung dan embrio pada ikan zebra dan manusia (Sun *dkk.*, 2011). Pada penelitian Sun *dkk.* (2011), ekspresi DHFR diblok untuk mengetahui fungsi dari DHFR itu sendiri. Malformasi jantung disebabkan oleh *knockdown* DHFR pada embrio. Pada penelitian tersebut penurunan proliferasi sel dan peningkatan apoptosis terdeteksi pada embrio yang mengalami *knockdown* DHFR. Sedangkan overekspresi DHFR menunjukkan peningkatan proliferasi sel. Oleh karena itu, DHFR dapat menaikkan proliferasi sel. Multipel malformasi pada jantung juga ditemukan pada embrio dengan *knockdown* DHFR. Atrium dan ventrikel memiliki bentuk dan posisi yang abnormal, tekanan sistolik yang lemah, frekuensi jantung dan *ventricular shortening fraction* (VSF) yang berkurang (Sun *dkk.*, 2011).

Proliferasi dan apoptosis berperan penting dalam perkembangan jantung. Ketidakseimbangan proses tersebut dapat memicu berbagai malformasi jantung, seperti *ventricular septal defect* (VSD), defek jantung kongenital sering kali akibat dari insufisiensi proliferasi atau peningkatan apoptosis dari septum atau jaringan sekitarnya. Hipoplasia miokardium dapat disebabkan oleh terganggunya fungsi proliferasi dan apoptosis miokardium. Terdapat beberapa mekanisme yang dapat menjelaskan folat berefek pada proliferasi. Derivat folat terlibat dalam berbagai reaksi seluler yang sangat penting, meliputi sintesa nukleotida, sintesis asam amino, dan reaksi metilasi (Li dan Rozen, 2006)


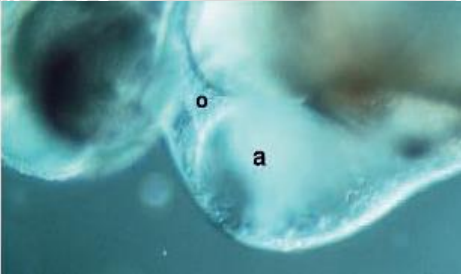
2.6.2 Bentuk Malformasi Jantung pada Ikan Zebra

Pada ikan zebra periode waktu 6—10 *hpf* adalah fase gastrulasi di mana fase tersebut adalah fase krusial dalam perkembangan jantung (Sun *dkk.*, 2009). Pada semua vertebrata termasuk ikan zebra, jantung berasal dari fusi jantung primordial bilateral yang terletak di antara tahap somite ke 21—26 (Stainier *dkk.*, 1993). Jantung mulai berdetak secara reguler segera setelah fusi dan berputar ke arah kanan sisi embrio (Chen *dkk.*, 1996).

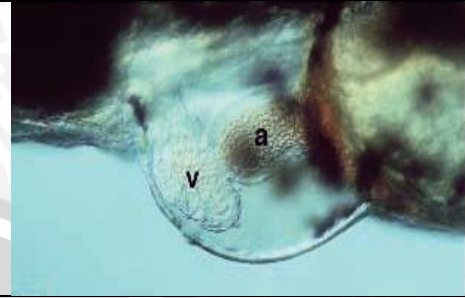
Pada penelitian yang dilakukan oleh Chen *dkk.* (1996) terdapat 40 mutasi yang dapat mempengaruhi pembentukan pola jantung dan pemeliharaan fungsi jantung. Mutasi ini dikategorikan dalam 2 subkelas, yaitu morfogenik dan fungsional. Terdapat 11 mutasi pada grup morfogenik yang secara jelas tampak pada pola jantung, sedangkan 29 mutasi pada grup fungsional menunjukkan defek fungsi jantung sebelum bentuk jantung abnormal tampak dengan jelas. Grup morfogenik secara umum dikategorikan menjadi bentuk malformasi cardia bifida, ruang jantung, posisi ruang jantung, ukuran jantung, dan matrix jantung yang tipis yang dijelaskan lebih mendalam pada Tabel 2.6. Grup fungsional

secara umum dibagi menjadi 2 subgrup, yaitu kontraktilitas jantung dan ritme detak jantung yang abnormal yang lebih lanjut dijelaskan dalam Tabel 2.7 (Chen *dkk.*, 1996). Selain itu, beberapa mutan ikan zebra teridentifikasi memiliki fenotip yang mirip dengan kardiomiopati pada manusia. Identifikasi gen pada mutan ini dapat menjadikan pemahaman yang lebih baik pada penyakit jantung pada manusia (Tabel 2.8) (Bakkers *dkk.*, 2011).

Tabel 2.6 Mutasi yang Berefek pada Morfogenesis Jantung Ikan Zebra (Chen *dkk.*, 1996)

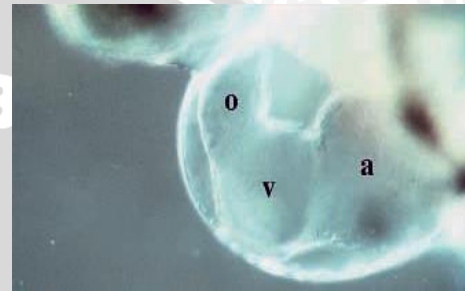
Malformasi dan Lokus Gen	Penjelasan	Gambar
Cardia bifida (<i>miles apart (mil)</i> , <i>casanova (cas)</i> , <i>faust (fau)</i> , <i>natter (nat)</i>)	Terdapat 2 buah jantung (panah), satu jantung pada masing-masing sisi garis tengah, dua kantong perikardium yang membengkak dengan struktur detak jantung pada masing-masing bagian.	
Ruang jantung (<i>lonely atrium (loa)</i>)	Pada embrio ikan zebra, struktur atrium dan ventrikel dapat dibedakan secara jelas pada 36 <i>hpf</i> . Pada embrio mutan dengan <i>lonely atrium (loa)</i> , jantung akan membesar secara signifikan pada 30 <i>hpf</i> . Setelah 2 hari perkembangan, struktur yang mirip tabung, secara morfologi mirip dengan <i>outflow tract (o)</i> atau bulbus arteriosus, menghubungkan ke ruang jantung yang membesar yang secara morfologi mirip atrium (<i>a</i>).	
Posisi ruang jantung (<i>overlooped (olp)</i>)	Pada keadaan normal, embrio ikan zebra 2 <i>dpf</i> , lokasi atrium dan ventrikel terletak paralel satu sama lain, di mana atrium berada di kanan dan ventrikel berada di kiri sisi embrio.	

Namun, apabila terjadi mutasi ventrikel (v) akan terletak di atas atrium (a) dengan sudut 90°. Setelah 3 hari perkembangan, *outflow tract* sedikit membesar.



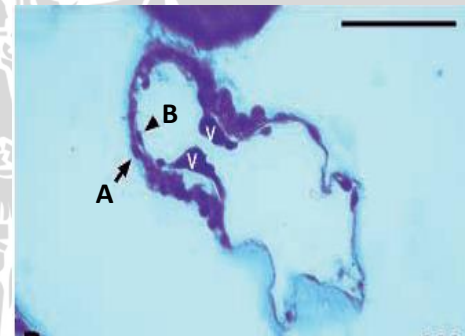
Ukuran Jantung (*santa (san)*)

Pembesaran jantung terlihat jelas setelah 36 hpf. Dalam 2 hari, jantung tampak seperti tiga gelembung besar yang saling terhubung dengan atrium (a) terletak di posterior, ventrikel (v) di tengah dan *outflow tract* (o) pada anterior jantung.



Matrix jantung yang tipis (*scotch tape (sco)*, *superglue (sug)*)

Jantung ikan zebra terdiri dari 2 tabung konsentris, lapisan luar *myocardial cell layer* (A) dan lapisan dalam *endocardial cell layer* (B). Matrix ekstraseluler (*cardiac jelly*) terletak di antara dua layer tersebut. Atrium sedikit membesar dan *endocardial cell layer* (B) tidak tampak di bawah mikroskop. Namun, lapisan endokardium (B) masih dapat diamati secara histology dan jarak antara miokardium (A) dan endokardium (B) sangat sempit. Disimpulkan bahwa *cardiac jelly* berkurang secara signifikan pada mutan.



Tabel 2.7 Mutasi yang Berefek pada Fungsi Jantung Ikan Zebra (Stainier *dkk.*, 1996)

Abnormalitas	Lokus Genetik	Fenotip
Kontraktilitas atrium	<i>weak atrium (wea)</i>	Atrium diam
Kontraktilitas ventrikel	<i>sisyphus (sis)</i>	Ventrikel
	<i>main squeeze (msq)</i>	Ventrikel
	<i>hal (hal)</i>	Ventrikel lemah
	<i>weiches herz (whz)</i>	Ventrikel lemah
	<i>low octane (loc)</i>	Ventrikel lemah
	<i>dead beat (ded)</i>	Ventrikel lemah
Kontraktilitas atrium dan ventrikel	<i>pickwick (pik)</i>	Detak lemah
	<i>lazy susan (laz)</i>	Detak lemah
	<i>peipe dream (ppd)</i>	Detak lemah
	<i>beach bum (bem)</i>	Detak lemah
	<i>pipe line (ppl)</i>	Detak lemah
Frekuensi jantung	<i>slow mo (smo)</i>	Detak lambat
Ritme jantung	<i>tremblor (tre)</i>	Fibrilasi
Konduksi	<i>island beat (isl)</i>	<i>Isolated twithes</i>
	<i>reggae (reg)</i>	Spasmodik
	<i>silent partner (sil)</i>	Ventrikel diam
	<i>ginger (gin)</i>	Ventrikel menjadi diam
	<i>tell tale heart (tel)</i>	Jantung hampir tidak bekerja
Aliran retrograde	<i>ping pong (png)</i>	Regurgitasi
	<i>tennis match (ten)</i>	Regurgitasi
	<i>yoyo (yyo)</i>	Regurgitasi

Tabel 2.8 Abnormalitas Jantung Ikan Zebra Berhubungan dengan Penyakit pada Manusia (Bakkers *dkk.*, 2011)

Nama Gen pada Ikan Zebra	Fenotip Ikan Zebra	Nama Gen pada Manusia	Penyakit pada Manusia
<i>one-eyed-pinhead/egf-cfc</i>	<ul style="list-style-type: none"> • reduksi mesonderm • visceral laterality defect • cardia bifida 	<i>CRYPTIC</i>	<ul style="list-style-type: none"> • dextrocardia • transposition of the great arteries • double-outlet-right-ventricle • atrioventricular septal defect (AVSD)
<i>lost-a-fin/alk8</i>	unlooped heart dengan reduksi atrium	<i>ALK2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • AVSD • mitral valve malformation
<i>jekyll/ugdh</i>	kegagalan katup AV	<i>UGDH</i>	AVSD
<i>Apc</i>	unlooped heart dengan hyperplastic cushion	<i>APC</i>	AVSD
<i>silent-heart/tnnt2</i>	kontraksi atrium dan ventrikel yang lemah	<i>TNNT2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • dilated cardiomyopathies (DCM) • hypertrophic cardiomyopathies (HCM)
<i>pickwick/ttn</i>	kontraksi atrium dan ventrikel yang lemah	<i>TTN</i>	DCM
<i>lost-contact/main-squeeze/ilk</i>	<ul style="list-style-type: none"> • kontraktilitas berkurang • bentuk cardiomyocyte yang abnormal • pembuluh darah dilatasi dan ruptur 	<i>ILK</i>	DCM
<i>laminin alpha 4</i>	Interaksi genetik dengan <i>lost-contact/ilk</i>	<i>LAMA4</i>	DCM
<i>nexilin/nexn</i>	Integritas sarkomer yang terganggu dan dilatasi jantung	<i>NEXN</i>	DCM
<i>chap</i>	Integritas sarkomer yang terganggu dan dilatasi jantung	<i>CHAP</i>	Tidak diketahui