

Efek Total Antosianin Ubi Ungu (*Ipomoea batatas* L) Kultivar Gunung Kawi pada Intake Pakan dan BMI (Body Mass Index) Zebrafish (*Danio rerio*) dengan Diet Induced Obesity (DIO)

Amirah Firdausy*, Retty Ratnawati**, Aswaty Nur**

ABSTRAK

Obesitas adalah penyakit metabolis kronis yang prevalensinya terus meningkat di dunia, terutama Indonesia. Obesitas terbukti menjadi faktor resiko tinggi terhadap kejadian diabetes dan penyakit kardiovaskular. Ubi Ungu (*Ipomoea batatas* L.) atau *sweet potato* memiliki kandungan senyawa antosianin. Antosianin merupakan pigmen ungu (*IbMYB1* dan *IbMYB2*) yang memiliki potensi dalam *scavenging* ROS (*Reactive Oxygen Species*), menurunkan NPY (*Neuropeptide Y*), C/EBP α dan PPAR γ . Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi ekstrak antosianin ubi ungu (*Ipomoea batatas* L) kultivar Gunung Kawi dapat menghambat peningkatan BMI (*Body Mass Index*) dan *intake* pakan pada zebrafish dengan DIO (*Diet Induced Obesity*). Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental laboratoris. Sampel yang digunakan adalah zebrafish *Danio rerio* 8 mpf (*months post-fertilization*) yang dibagi lima kelompok, yaitu Kontrol negatif (tidak dipapar ekstrak antosianin), Kontrol positif (dengan pakan *Diet Induced Obesity* (DIO)), DIO A (DIO + 80 ppm), DIO B (DIO + 120 ppm), dan DIO C (DIO + 160 ppm). Pada hasil dan kesimpulan penelitian, antosianin pada dosis tersebut tidak dapat mempengaruhi *intake* pakan dan BMI pada zebrafish dengan DIO.

Kata Kunci : antosianin ubi ungu (*Ipomoea batatas* L), zebrafish, obesitas, body mass index, intake pakan

Total Anthocyanin Effect of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L) Gunung Kawi Cultivar to Food Intake and BMI (*Body Mass Index*) in Zebrafish (*Danio rerio*) with Diet Induced Obesity (DIO)

ABSTRACT

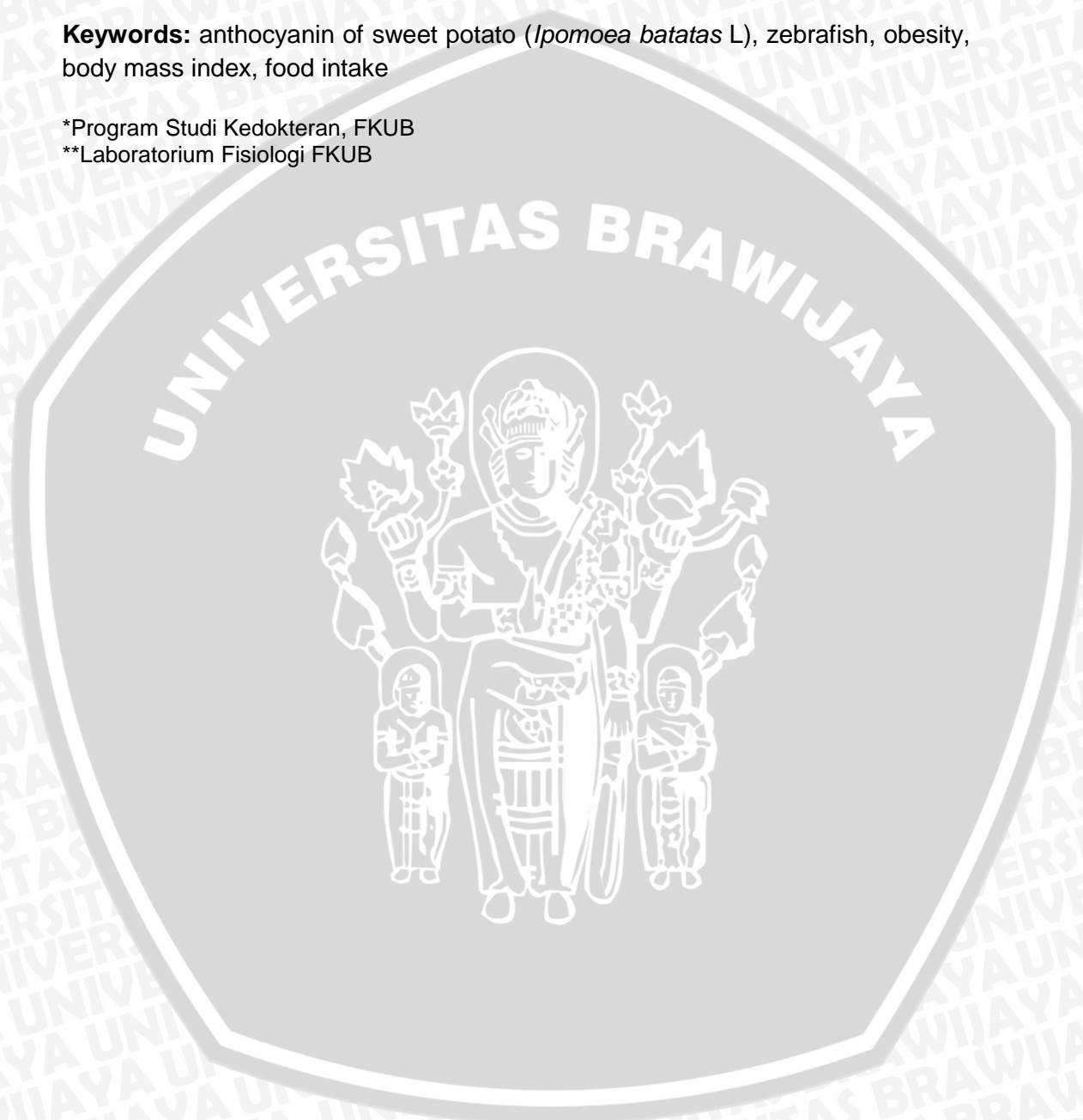
Obesity is a chronic metabolic disease that the prevalence is always increasing in the world, especially in Indonesia. Obesity proved to be high risk factors on the incidence of diabetes and cardiovascular disease. Purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) or sweet potato contains anthocyanin compounds. Anthocyanin is a purple pigment (*IbMYB1* and *IbMYB2*) which have potential in scavenging ROS (*Reactive Oxygen Species*), lowers NPY (*Neuropeptide Y*), C/EBP α , and PPAR γ . The purpose of this study was to determine the potential of anthocyanin extract of purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L) Gunung Kawi cultivar can inhibit the increasing of BMI (*Body Mass Index*) and food intake in zebrafish with DIO (*Diet Induced Obesity*). This research was conducted with laboratory experimental method. The sample used is the zebrafish *Danio rerio* 8 mpf (*months post-fertilization*) were divided five groups, the negative control (not

being exposed to extract anthocyanin), positive control (with feed Diet Induced Obesity (DIO)), DIO A (DIO + 80 ppm), B DIO (DIO + 120 ppm), and C DIO (DIO + 160 ppm). The results and conclusions of the study, anthocyanin cannot affect food intake and BMI in zebrafish with DIO.

Keywords: anthocyanin of sweet potato (*Ipomoea batatas* L), zebrafish, obesity, body mass index, food intake

*Program Studi Kedokteran, FKUB

**Laboratorium Fisiologi FKUB



PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hasil survei dari Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2007 hingga 2013 menunjukkan prevalensi obesitas di Indonesia pada masyarakat dewasa yang cenderung meningkat di semua provinsi, yaitu 18,8 % hingga 26,6 %. Angka ini diperkirakan akan semakin meningkat di tahun-tahun setelahnya¹. Sedangkan menurut WHO (2014), mengestimasi sekitar 13% populasi orang dewasa di dunia menderita obesitas dan 39% populasi orang dewasa berumur 18 tahun ke atas di dunia menderita overweight². Hal ini menunjukkan begitu besar dan begitu cepat peningkatan prevalensi obesitas di dunia khususnya di Indonesia.

Obesitas adalah penyakit metabolis kronis yang terbukti menjadi faktor resiko tinggi terhadap kejadian diabetes dan penyakit kardiovaskular seperti kardiomiopati, hipertensi, penyakit jantung koroner, gagal jantung, dan aritmia³. Hal ini penting karena penyakit kardiovaskular dan diabetes mellitus termasuk dalam 10 besar penyakit yang menyebabkan kematian tertinggi di dunia².

Obesitas disebabkan oleh ketidakseimbangan antara asupan energi dan pemakaian energi yang berlangsung kronis. Obesitas dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya faktor lingkungan, pola makan, perilaku makan, dan aktivitas fisik^{4,5}. Salah satu patofisiologis obesitas adalah oksidatif stress yang disebabkan oleh ROS (Reactive Oxygen Species) yang merupakan hasil metabolisme tubuh⁶ dan karena faktor eksternal dari tubuh yang bisa merangsang inisiasi proses adipogenesis^{7,8}. Maturitas adiposit atau adipogenesis dipengaruhi oleh faktor-faktor transkripsi seperti LPL

(lipoprotein lipase), C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein), dan PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor)⁹. Jaringan adiposit yang akan mensekresi beberapa mediator, yaitu adipokin-adipokin (seperti adiponektin, leptin, dan resistin)¹⁰.

Salah satu penyebab obesitas adalah asupan makanan yang berlebihan tanpa disertai aktivitas fisik yang sesuai. Hal ini jika terus berlangsung akan menyebabkan peningkatan BMI (Body Mass Index)¹¹. Selama ini telah banyak digunakan obat-obatan sintesis guna menghambat obesitas. Namun, penggunaan obat-obatan antiobesitas ini belum terbukti dapat berkerja secara efektif dan memiliki efek samping yang tidak diinginkan^{12,13,14}. Sehingga, diperlukan eksplorasi bahan alam sebagai antiobesitas, salah satunya adalah antosianin.

Antosianin banyak ditemukan pada buah beri dan tanaman yang berwarna merah atau ungu, salah satunya adalah pada ubi ungu (*Ipomoea batatas* L)¹⁵. *Ipomoea batatas* (L.) Lam, yang juga dikenal dengan ubi ungu, adalah sayuran yang mengandung gen ungu (*IbMYB1* dan *IbMYB2*) yang teraktivasi untuk menghasilkan pigmen antosianin ungu pada dagingnya. Jika dibandingkan dengan sumber antosianin yang lain seperti pada buah plum, bawang Bombay merah, lobak merah, stroberi, rasberi merah, kol merah, blueberry, blackberry, cranberry, dan anggur, kadar antosianin yang terdapat pada ubi ungu menempati peringkat pertama yaitu 84-600 mg/100g berat basah¹⁵. Pada ubi ungu (*Ipomoea batatas* L) kultivar Gunung Kawi, dari 2500 g berat basah didapat 68,6 g padatan antosianin bebas air. Ratnawati dkk

(2013) dan Maharani dkk (2013) telah melakukan penelitian tentang efek anti-aterogenik antosianin ubi ungu (*Ipomoea batatas* L) kultivar Gunung Kawi pada tikus strain Wistar yang diinduksi dengan diet tinggi lemak^{16,17}. Pada zebrafish, telah dilakukan penelitian tentang efek antosianin ubi ungu (*Ipomoea batatas* L) kultivar Gunung Kawi terhadap embrio zebrafish¹⁸. Sedangkan penelitian mengenai efek anti-obesitas dari antosianin telah dilakukan oleh Graf dkk (2007) pada tikus Fischer, Badshah dkk (2013) pada tikus Sprague-Dawley, dan Lee dkk (2014) pada sel 3T3-L1^{10,19,20}. Namun, belum ada penelitian yang mengeksplorasi tentang efek anti-obesitas antosianin pada ubi ungu (*Ipomoea batatas* L).

Pada penelitian efek anti-obesitas antosianin telah banyak dilakukan pada tikus, namun belum pada zebrafish. Sebelum ini telah dilakukan penelitian anti-obesitas dari bahan-bahan alami pada zebrafish dengan DIO (Diet Induced Obesity) menggunakan parameter intake pakan dan BMI^{21,22}. Sehingga, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek total antosianin ubi ungu (*Ipomoea batatas* L) kultivar Gunung Kawi terhadap intake pakan dan BMI zebrafish dengan DIO.

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah eksperimental laboratorium, dimana digunakan kelompok kontrol dan perlakuan. Pada penelitian ini, zebrafish berusia 8 *mpf* (*months post-fertilization*) atau 8 bulan setelah fertilisasi dibagi menjadi lima kelompok. Masing-masing kelompok

berisi lima ekor zebrafish dalam 3,4 Liter air, sehingga dalam penelitian ini diperlukan zebrafish sebanyak 25 ekor.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 25 ekor yang berusia 8 *mpf* yang terdiri dari lima kelompok, tiap kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor ikan dalam 3,4 L akuarium. Lima kelompok tersebut terdiri dari kelompok DIO, Non DIO, DIO+80 *ppm* antosianin; 120 *ppm* antosianin; dan 160 *ppm* antosianin²⁰.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tangki akuarium dengan kapasitas 60L dan 6,4L, heater, aerator, filter set, timer, lampu ikan, thermometer, kertas label, jala ikan, alat tulis, timbangan analitik, cawan petri, jangka sorong, *plankton net* 120 μ m, gelas arloji, dan sendok plastik. Bahan yang digunakan adalah zebrafish (*Danio rerio*) strain *wild-type* berusia 8*mpf*, artemia kaleng, antosianin ubi ungu, tetramin flakes (Tetra Japan Inc.), saline, dan tricaine.

Prosedur Penelitian

Perlakuan pada masing-masing kelompok dilakukan selama 40 hari. Pemberian pakan DIO dan pengurusan akuarium dilakukan tiga kali sehari dengan jarak 2 jam antara pemberian pakan dan pengurusan, lalu pemaparan antosianin ubi ungu dilakukan setiap 15 menit setelah pemberian pakan sebanyak tiga kali sehari selama 40 hari²².

Pengukuran *intake* pakan atau *feeding volume assay* dilakukan pada hari ke-39 dengan menghitung sebanyak tiga kali pada jam 07.00, 12.00 dan 17.00 dengan orang yang sama^{22,23}.

Pengukuran BMI dilakukan setiap minggu, yakni pada hari ke-0, 14, 20, 27, 34 dan 40 pada zebrafish jantan dan betina dengan membandingkan pada kelompok kontrol DIO, kontrol Non DIO dan DIO + Antosianin dalam tiga dosis²².

Analisa data

Data yang didapatkan dari penelitian dianalisis dengan menggunakan program analisis statistik dengan metode uji statistik *One-Way ANOVA* dengan syarat data harus terdistribusi normal dan homogen. Untuk mengetahui data terdistribusi normal dilakukan analisis normalitas dengan uji *Shapiro-wilk*, sedangkan untuk mengetahui varian data dilakukan uji homogenitas dengan *Levene Test*. Apabila syarat terpenuhi, dilakukan uji *Post-Hoc Tukey* untuk melihat seberapa besar perbedaan tiap kelompok perlakuan dengan tingkat kepercayaan 95% ($p < 0.05$).

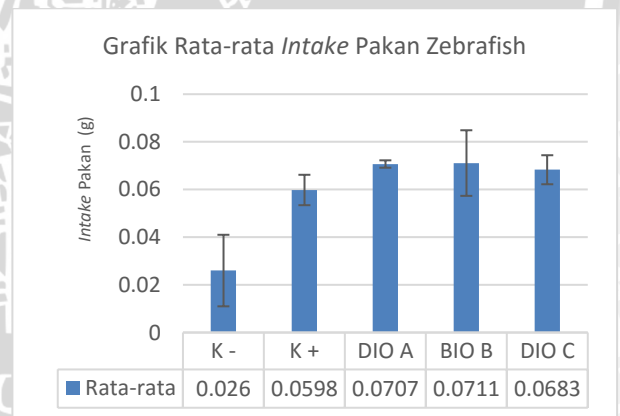
HASIL PENELITIAN

Hasil analisa data *intake* pakan secara statistik dengan menggunakan uji *One-Way Anova* menunjukkan bahwa paparan antosianin ubi ungu tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap perlakuan DIO A, DIO B, dan DIO C bila dibandingkan dengan kontrol positif ($p = 0,829$;

0,642; dan 0,669). Sedangkan pada pengukuran BMI juga didapatkan bahwa paparan antosianin ubi ungu tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap perlakuan DIO A, DIO B, dan DIO C bila dibandingkan dengan kontrol positif (0,664; 0,573; dan 0,284).

Tabel 1. Hasil Pengukuran Intake Pakan Zebrafish

Jam	Jumlah Intake Pakan Zebrafish				
	K -	K +	DIO A	DIO B	DIO C
07:00	0,026	0,0634	0,069	0,0829	0,0658
12:00	-	0,0524	0,0712	0,056	0,0638
05:00	-	0,0635	0,072	0,0745	0,0752
Rata-rata	0,026	0,0598	0,0707	0,0711	0,0683
St. dev	0.0150 111	0.0063 79916	0.0015 53491	0.0137 62388	0.0060 87145

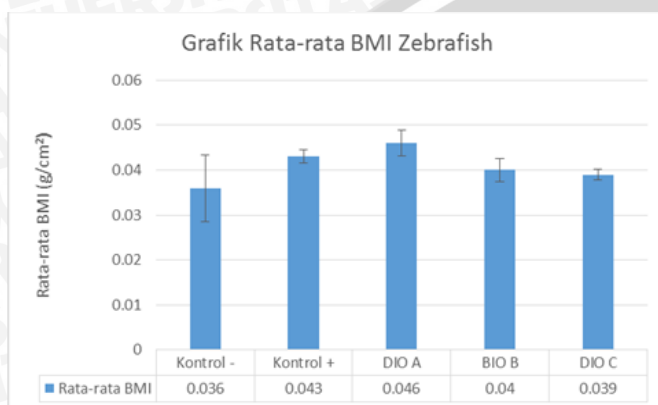


Gambar 1. Grafik Rata-rata Intake Pakan Zebrafish

Tabel 2. Hasil Pengukuran BMI Zebrafish

Rata-Rata BMI (g/cm2)					
Hari ke	K -	K +	DIO A	DIO B	DIO C
0	0.048	0.046	0.051	0.04	0.039
14	0.041	0.044	0.048	0.043	0.041
20	0.038	0.042	0.047	0.041	0.038

27	0.033	0.043	0.045	0.042	0.039
34	0.032	0.043	0.043	0.037	0.038
40	0.027	0.042	0.044	0.037	0.038
Rata-rata	0.036	0.043	0.046	0.04	0.039
St. dev	0.007	0.001	0.002	0.002	0.001
	45	505	944	530	169



Gambar 2. Grafik Rata-rata BMI Zebrafish

Keterangan:

K - : Kelompok kontrol negatif yaitu zebrafish normal

K + : Kelompok kontrol positif yaitu zebrafish dengan DIO (diberi artemia *nauplii* 60mg/hari/ekor)

DIO A : Kelompok zebrafish dengan DIO + paparan ekstrak antosianin 80ppm

DIO B : Kelompok zebrafish dengan DIO + paparan ekstrak antosianin 120ppm

DIO C : Kelompok zebrafish dengan DIO + paparan ekstrak antosianin 160ppm

PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini, zebrafish berusia 8 mpf diberi paparan berupa antosianin ubi ungu dalam tiga konsentrasi, yaitu konsentrasi 80 ppm (DIO A), konsentrasi 120 ppm (DIO B), dan konsentrasi ketiga 160 ppm (DIO C). DIO yang diberikan adalah artemia *nauplii* yang mengandung 22% lemak, 16%

karbohidrat, dan 44% protein dengan perhitungan 1 mg artemia mengandung 5 kalori, dengan estimasi bahwa seekor zebrafish mendapat 20 kalori dari 5 mg artemia pada 80% artemia yang dikonsumsi, dan 150 kalori dari 60 mg artemia pada 50% artemia yang dikonsumsi²¹.

Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan perbedaan intake pakan zebrafish yang tidak signifikan pada semua kelompok perlakuan jika dibandingkan dengan kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa antosianin ubi ungu tidak memberikan pengaruh terhadap perlakuan tersebut yang menunjukkan tidak adanya penurunan asupan makanan yang berarti pada zebrafish dengan DIO. Hal tersebut diduga disebabkan oleh beberapa faktor seperti laju metabolisme, lingkungan, dan tingkat stres dari zebrafish yang diteliti²⁴. Peningkatan intake pakan bisa disebabkan oleh berbagai macam stressor pada zebrafish, seperti stresor fisik, stresor lingkungan²⁵, dan stresor sosial²⁶. Adanya perbedaan variasi genetik tiap ikan menyebabkan perbedaan tingkat stress setiap ikan^{26,27}. Selain itu, paparan zebrafish dengan TMS (*Tricaine methanesulfonate*) yang digunakan sebagai agen anestesi yang berulang dapat ikut serta dalam meningkatkan stres²⁸. Ukuran akuarium yang dua kali lebih besar memungkinkan zebrafish lebih banyak bergerak, sehingga dapat mempengaruhi perilaku konsumsi makan. Hal ini didukung dengan

penelitian Pomerleau dkk (2004) bahwa aktivitas fisik yang tinggi dapat meningkatkan nafsu makan²⁹.

Selain itu, pada hasil penelitian ini diduga antosianin tidak berkerja pada jalur NPY dalam menghambat intake pakan. Hal ini diduga karena perbedaan struktur antosianin pada ubi ungu (*Ipomoea batatas* L) dengan struktur antosianin pada black soybean pada penelitian Badhshah dkk (2013) terhadap efek penurunan ekspresi NPY³⁰. Pada ubi ungu, struktur antosianin yang terbanyak adalah *peonidin* & *cyanidin*³¹, sedangkan pada *black soybean* struktur antosianin yang terbanyak adalah *delphinidin* & *cyanidin*³².

Berdasarkan hasil penelitian, tidak didapatkan perbedaan BMI pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol positif yang signifikan. Sehingga antosianin ubi ungu (*Ipomoea batatas* L) pada penelitian ini tidak memberi efek terhadap BMI. Hasil ini didukung dengan hasil intake pakan zebrafish pada pembahasan sebelumnya yang menunjukkan tidak terdapat pengaruh antosianin ubi ungu (*Ipomoea batatas* L) terhadap intake pakan zebrafish. Hal ini dikarenakan BMI juga dipengaruhi oleh *intake* pakan³³.

KESIMPULAN

Pemaparan antosianin ubi ungu (*Ipomoea batatas* L.) pada zebrafish berusia 8 *mpf* dengan DIO (*Diet Induced Obesity*) tidak dapat mempengaruhi *intake* pakan dan BMI (*Body Mass Index*).

SARAN

1. Diperlukan konversi konsentrasi total antosianin ubi ungu dari dosis yang diberikan pada zebrafish ke dosis yang dapat dikonsumsi manusia.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi peningkatan BMI dan intake pakan seperti C/EBP α , Neuropeptida Y, dan struktur antosianin spesifik agar dapat diketahui mekanisme kerja antosianin yang lebih jelas

DAFTAR PUSTAKA

1. Balitbang Kemenkes RI. 2013. Laporan Nasional Riset Kesehatan Dasar; RISKESDAS. Jakarta: Balitbang Kemenkes RI
2. WHO. 2014. The top 10 causes of death. (Online). (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> diakses tanggal 11 November 2016).
3. Poirier, P., Giles, T.D., Bray, G.A., Hong, Y., Stern, J.S., Sunyer, F.X.P., et al. 2006. Obesity and Cardiovascular Disease Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss. *Circulation*, 113, pp: 898-918.
4. Cecchini, M., Sassi, F., Lauer, J.A., Lee, Y.Y., Barron, V.G., Chisholm, D. 2010. Tackling Of Unhealthy Diets, Physical Inactivity, and Obesity: Health Eff Ects and Cost-Eff Ectiveness. *Lancet*, 376, 1.
5. KemenkesRI. 2011. *Pedoman Pencegahan dan Penanggulangan Kegemukan dan Obesitas Pada Anak*

- Sekolah, Jakarta: Kementrian Kesehatan RI.
6. Kenney, W. L., Wilmore, J.H., & Costill, D.L. 2015. *Physiology of Sport and Exercise*. 6th ed. US: Human Kinetics.
 7. Mundy, A. L., Haas, E., Bhattacharya, I., Widmer, C.C., Kretz, M., Baumann, K., et al. 2007. Endothelin Stimulates Vascular Hydroxyl Radical Formation: Effect of Obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293, pp: R2218–R2224.
 8. Liu, G. S., Chan, E.C., Higuchi, M., Dusting, G.J., Jiang, F. 2012. Redox Mechanisms in Regulation of Adipocyte Differentiation: Beyond A General Stress Response. *Cells*, 1, pp: 976-993.
 9. Ntambi, J. M., & Kim, Y.C. 2000. Adipocyte Differentiation and Gene Expression. *J. Nutr*, 130, pp: 3122s-3126s.
 10. Graf, D., Seifert, S., Jaudszus, A., Bub, A., Watzl, B. 2013. Anthocyanin-Rich Juice Lowers Serum Cholesterol, Leptin, and Resistin and Improves Plasma Fatty Acid Composition in Fischer Rats. *Anthocyanins Affect Fat Metabolism*, 8.
 11. Newby, P.K., Muller, D., Hallfrisch, J., Qiao, N., Andres, R., & Tucker, K.L. 2014. Dietary patterns and changes in body mass index and waist circumference in adults. *Am J Clin Nutr*, 77(6), pp: 1417-1425.
 12. Kang, J.G. & Park, C.Y. 2012. Anti-obesity Drug: A Review about Their Effect and Safety. *Diabetes Metab J*, 36(1), pp: 13-25.
 13. Rodgers, R.J., Tschöp, M.H., & Wilding, J.P.H. 2012. Anti-obesity drugs: past, present and future. *Dis Model Mech*, 5(5), pp: 621-626.
 14. Go, R.E., Hwang, K.A., Kim, S.H., Lee, M.Y., Kim, C.W., Jeon, Y.B., & Choi, K.C. 2014. Effects of anti-obesity drugs, phentermine and mahuang, on the behavioral patterns in Sprague-Dawley rat model. *Lab Anim Res*, 30(2), pp: 73-078.
 15. Seafast Center. 2012. *Merah-Ungu Antosianin*. Jawa Barat: Seafast Center. pp: 23-43.
 16. Ratnawati, R., Sriwahyuni, E., Aurora, H., Nur, A., Ciptati, Maharani, T., dkk. 2013. Anthocyanin of Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L) cultivars Gunung Kawi influences antherogenesis via Lipid Profile, MCP-1, MDA, SOD, IL-6, and HSP-70, on *Rattus norvegicus* Wistar strain Induced by High Fat Diet, (belum terpublikasi).
 17. Maharani, T., Sargowo, D., Tjokropranowo, A., & Ratnawati, R. Effect of extract purple Ipomoea Batatas cultivar kawi mountain chronic inflammation in Wistar Rats with atherogenic diet. *IEESE International Journal of Science and Technology*, 2(1), pp: 1-7
 18. Ratnawati, R., Nur, A., Suprpto, R.P., Chandra, K., Wangta, C., Prayogo, W., dkk. 2015. Peran Antosianin Ubi Jalar (*Ipomea Batatas* L) Varietas Ungu Kultivar Gunung Kawi Pada Sistem Kardiovaskuler dan Sistem Lokomotorik Zebrafish (*Danio*

- erio). Riset BOPTN 2015, (belum terpublikasi).
19. Badshah, H., Ullah, I., Kim, S.E., Kim, T.H., Lee, H.Y., & Kim, M.O. 2013. Anthocyanins attenuate body weight gain via modulating neuropeptide Y and GABAB1 receptor in rats hypothalamus. *Neuropeptides*, 47(5), pp: 347-353.
 20. Lee, B., Lee, M., Lefevre, M., Kim, H.R. 2014. Anthocyanins Inhibit Lipogenesis During Adipocyte Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. *Plant Foods Hum Nutr*, 69, pp: 137-141.
 21. Oka, T., Nishimura, Y., Zang, L., Hirano, M., Shimada, Y., Wang, Z., et al. 2010. Diet-Induced Obesity in Zebrafish Shares Common Pathophysiological Pathways with Mammalian Obesity. *BMC Physiology*, 10, pp: 1-13.
 22. Hasumura, T., Shimada, Y., Kuroyanagi, J., Nishimura, Y., Meguro, S., Takema, Y., dkk.. 2012. Green Tea Extract Suppresses Adiposity and Affects the Expression of Lipid Metabolism Genes in Diet-induced Obese Zebrafish. *Nutrition & Metabolism*, 9, pp: 1-7.
 23. Meguro, S., Hasumura, T., & Hase, T., 2015. Body Fat Accumulation in Zebrafish is Induced by a Diet Rich in Fat and Reduced by Supplementation with Green Tea Extract. *PLoS ONE*, 10(3), pp: 1-12.
 24. Zahangir, M.M., Haque, F., Mostakim, G.M. and Islam, M.S., 2015. Secondary stress responses of zebrafish to different pH: Evaluation in a seasonal manner. *Aquaculture Reports*, 2, pp:91-96.
 25. Dhabhar, F.S., 2009. Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection and Immunopathology. *Neuroimmunomodulation*, 16(5), pp: 300-317.
 26. Larson, E. T., O'malley, D. M. & Melloni Jr, R.H. 2006. Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 167, pp: 94-102.
 27. Clark, K.J., Boczek, N.J. and Ekker, S.C., 2011. Stressing zebrafish for behavioral genetics. *Reviews in the neurosciences*, 22(1), pp:49-62.
 28. Carter, K.M., Woodley, C.M., & Brown, R.S., 2011. A Review of Tricaine Methanesulfonate for Anesthesia of Fish. *Rev Fish Biol Fisheries*, 21, pp: 51-59.
 29. Pomerleau, M., Imbeault, P., Parker, T., & Doucet, E., 2004. Effects of Exercise Intensity on Food Intake and Appetite in Women. *Am J Clin Nutr*, 8, pp: 1230-1236.
 30. Badshah, H., Ullah, I., Kim, S.E., Kim, T.H., Lee, H.Y., & Kim, M.O. 2013. Anthocyanins attenuate body weight gain via modulating neuropeptide Y and GABAB1 receptor in rats hypothalamus. *Neuropeptides*, 47(5), pp: 347-353.
 31. Mohanraj, R., & Sivasankar, S. 2014. Sweet Potato

(Ipomoea Batatas [L.] Lam) -
A Valuable Medicinal Food: A
Review. *J Med Food*, 17, pp:
733-741.

32. Koh, K., Youn, J.E., & Kim,
H.S. 2014. Identification of
anthocyanins in black
soybean (*Glycine max* (L.)
Merr.) varieties. *J Food Sci
Technol*, 52(2), pp: 377-381.
33. Newby, P.K., Muller, D.,
Hallfrisch, J., Qiao, N.,
Andres, R., & Tucker, K.L.
2014. Dietary patterns and
changes in body mass index
and waist circumference in
adults. *Am J Clin Nutr*, 77(6),
pp: 1417-1425.

