

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUAH NAGA MERAH (*Hylocereus
polyrhizus*) SEBAGAI PENGHAMBAT STRES OKSIDATIF TERHADAP
AKTIVITAS MOTORIK AKIBAT PEMBERIAN KAFEIN PADA EMBRIO IKAN
ZEBRA (*Danio rerio*) SECARA IN VITRO**

Tugas Akhir

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan**



Karunia Indahsari

NIM 145070600111022

PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUAH NAGA MERAH (*Hylocereus polyrhizus*) SEBAGAI PENGHAMBAT STRES OKSIDATIF TERHADAP AKTIVITAS MOTORIK AKIBAT PEMBERIAN KAFEIN PADA EMBRIO IKAN ZEBRA (*Danio rerio*) SECARA IN VITRO

Oleh:
Karunia Indahsari
NIM 145070600111022

Telah diuji pada
Hari : Kamis
Tanggal : 8 Maret 2018
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I,

dr. Indriati Dwi Rahayu, M.Kes
NIP. 197605192005012001

Pembimbing-I/ Penguji-II,

dr. Yhusi Karina Riskawati, M.Sc
NIP. 20140560051212001

Pembimbing II/ Penguji-III,

Yuseva Sanati, SST., SE., M.Keb
NIP. 2016097903192001

Mengetahui,
Ketua Program Studi S1 Kebidanan,



Linda Ratnawati, SST., M.Kes
NIP. 196409132014042001



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Karunia Indahsari

NIM : 145070600111022

Program Studi : Program Studi S1 Kebidanan

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 8 Maret 2018

Yang membuat pernyataan,

(Karunia Indahsari)

NIM. 145070600111022

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) sebagai Penghambat Stres Oksidatif terhadap Aktivitas Motorik Akibat Pemberian Kafein pada Embrio Zebrafish (*Danio rerio*) secara In Vitro”.

Ketertarikan penulis akan topik ini didasari oleh banyaknya konsumsi kafein umumnya pada masyarakat khususnya pada ibu hamil yang dapat berdampak pada janinnya. Salah satu efek negatif kafein adalah mempengaruhi perkembangan saraf yang selanjutnya dapat berakibat pada gangguan saraf. Buah naga, salah satu buah yang cukup populer di Indonesia dikenal mempunyai angka antioksidan yang cukup tinggi. Antioksidan sendiri berfungsi sebagai penangkal radikal bebas yang erat kaitannya dengan banyak penyakit, terutama penyakit neurodegeneratif.

Dengan selesainya proposal Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada:

1. dr. Yhusi Karina Riskawati, M.Sc sebagai pembimbing pertama yang senantiasa membimbing untuk bisa menulis dengan baik, serta senantiasa memberi semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal Tugas Akhir ini.
2. Ibu Yuseva Sariati, SST, SE, M.Keb sebagai pembimbing kedua yang senantiasa membimbing untuk bisa menulis dengan baik, serta senantiasa memberi semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal Tugas Akhir ini.

3. dr. Indriati Dwi Rahayu, M.Kes sebagai ketua Tim Penguji Ujian Tugas Akhir yang telah memberi masukan serta saran untuk menyempurnakan naskah Tugas Akhir ini.
4. Ibu Linda Ratna Wati, SST, M.Kes sebagai Ketua Program Studi S1 Kebidanan yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di PS S1 Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
5. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
6. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB, yang telah membantu melancarkan urusan administrasi.
7. Yang tercinta ayah, ibu, adik, dan keluarga atas segala pengertian, dan kasih sayangnya.
8. Rahmita sebagai kolega terbaik yang turut serta dalam penelitian ini serta semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan proposal Tugas Akhir yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa karya ilmiah ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun.

Akhirnya, semoga proposal Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 8 Maret 2018

Penulis

Abstrak

Indahsari, Karunia. 2018. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Naga Merah (Hylocereus Polyrhizus) sebagai Penghambat Stres Oksidatif terhadap Aktivitas Motorik Akibat Pemberian Kafein pada Embrio Ikan Zebra (Danio Rerio) Secara In Vitro*. Tugas Akhir, Program Studi S1 Kebidanan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Yhusi Karina Riskawati, M.Sc (2) Yuseva Sariati, SST,SE,, M.Keb.

Kesejahteraan janin salah satunya ditentukan oleh nutrisi yang dikonsumsi ibu untuk proses pertumbuhan dan perkembangan selama masa kehamilan. Kafein (1,3,7-trimethylxanthine) banyak dikonsumsi ibu hamil melalui berbagai makanan dan minuman diantaranya kopi, teh, coklat, dan minuman bersoda. Kafein mampu menembus barier plasenta serta menimbulkan keadaan stres oksidatif sehingga mampu mengubah fungsi sistem tubuh, salah satunya sistem saraf. Antioksidan diyakini mampu menghambat stres oksidatif dan banyak ditemukan dalam buah-buahan, salah satunya adalah buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) karena mengandung pigmen betasianin, vitamin C, dan flavonoid. Tujuan dari penelitian ini untuk menganalisis pengaruh pemberian ekstrak buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap aktivitas motorik embrio ikan zebra (*Danio rerio*) yang terpapar kafein. Terdapat enam kelompok, yaitu kontrol, kontrol negatif (Kafein 20 mg/L), kontrol positif (Vitamin C 44 mg/L) dan tiga kelompok perlakuan yang diberikan kafein 20 mg/L serta tiga dosis ekstrak berbeda, masing-masing untuk perlakuan 1,2, dan 3 adalah 29 mg/L, 58 mg/L, dan 87 mg/L. Aktivitas motorik diukur dengan memberikan rangsang taktil pada 48 hpf selama 1 menit dan kemampuan berenang diukur pada 120 hpf selama 1 menit. Uji Anova pada respon taktil menunjukkan nilai yang signifikan dengan $p=0,000$. Ekstrak buah naga merah secara signifikan meningkatkan respon taktil pada dosis 87 mg/L ($p=0,016$), sedangkan pada kemampuan berenang terjadi penurunan secara tidak signifikan pada perlakuan 1,2,3 dengan $p=0,353$. Peningkatan respon taktil pada pemberian ekstrak diduga dapat terjadi karena buah naga bertindak sebagai antioksidan.

Kata Kunci : Kafein, Buah Naga Merah, Respon Taktil, Kemampuan Berenang, Ikan Zebra

Abstract

Indahsari, Karunia. 2018. *The Effect of Red Pitaya (Hylocereus Polyrhizus) Extract as Oxydative Stress Blockade on Motor Activity as The Result of Caffeine Exposure in Zebrafish (Danio rerio) Embryos*. Final Assignment, Bachelor of Midwifery Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Yhusi Karina Riskawati, M.Sc (2) Yuseva Sariati, SST,SE,. M.Keb.

Foetus wellbeing determined by nutrition that consumed by their mother during pregnancy. Caffeine (1,3,7-trymethylxanthine) is widely consumed because it contained in some foods and beverages such as coffee, tea leaves, chocolate, and soft drink. Caffeine can across the placenta barrier thus causes stress oxidative condition that can alter body system function, such as nerve system. Antioxidant was believed had medicinal value that can alleviate adverse effect of caffeine, including red pitaya (Hylocereus polyrhizus) that has many antioxidant compounds such as betacyanin pigment, vitamin c, and flavonoid. The objective of this study is to determine the effect of red pitaya extract to caffeine exposure on mator activity in zebrafish (Danio rerio) embryos. We devided fertilized eggs into six groups include control groups; negative control (caffeine 20 mg/L and vitmain c 44 mg/L); and caffeine combined with three different doses for extract (29, 58, and 87 mg/L). Motor activity measured by tactile response at 48 hpf and swimming of the larvae at 120 hpf. One way Anova showed significantly different in tactile response ($p=0,000$) but not in swimming of the larvae ($p=0,353$). Tactile response increased significantly in high dose of extract 87 mg/L ($p=0,016$), nevertheless there is no significant different of extract on swimming of the larvae ($p>0,05$). We conclude that caffeine can decrease tactile response at 48 hpf and red pitaya extract can alleviate that effect because its' contain of antioxidant compounds.

Key words : Caffeine, Red Pitaya, Tactile Response, Swimming of Larvae, Zebrafish

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul.....	i
Halaman Persetujuan	ii
Kata Pengantar.....	iii
Daftar Isi	vii
Daftar Gambar	x
Daftar Tabel.....	xi
Daftar Lampiran.....	xii
Daftar Simbol, Singkatan, dan Istilah	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan.....	5
1.3.1. Tujuan Umum	5
1.3.2. Tujuan Khusus.....	5
1.4. Manfaat	6
1.4.1. Manfaat Akademik	6
1.4.2. Manfaat Praktis.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Kafein	7
2.1.1. Metabolisme Kafein	7
2.1.2. Makanan Mengandung Kafein	8
2.1.3. Efek Kafein terhadap Kehamilan.....	9
2.1.4. Efek Kafein terhadap Perkembangan Syaraf	11
2.1.5. Kafein Mendukung Radikal Bebas	13
2.2. Stres Oksidatif	13
2.2.1. Radikal Bebas.....	15
2.2.2. Stres Oksidatif pada Sistem Syaraf Pusat.....	17
2.3. Antioksidan.....	17
2.4. Aktivitas Motorik	19
2.5. Buah Naga Merah (<i>Hylocereus polyrhizus</i>)	21
2.5.1. Klasifikasi Buah Naga Merah (<i>Hylocereus polyrhizus</i>)	21
2.5.2. Kandungan Gizi Naga Merah (<i>Hylocereus polyrhizus</i>)	22
2.5.3. Pigmen Betasianin	23
2.5.4. Flavonoid dan Senyawa Fenol.....	23
2.6. Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>)	24
2.6.1. Karakteristik Ikan Zebra	25
2.6.2. Siklus Hidup Ikan Zebra	25
2.6.3. Perkembangan Embrio Ikan Zebra.....	26
2.6.4. Aktivitas Motorik Ikan Zebra	28

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	31
3.1. Kerangka Konsep.....	31
3.2. Hipotesis Penelitian.....	34
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	35
4.1. Rancangan Penelitian	35
4.2. Sampel Penelitian dan Pengulangan.....	36
4.3. Variabel Penelitian	36
4.3.1. Variabel Bebas.....	36
4.3.2. Variabel Terikat.....	37
4.3.3. Variabel Kontrol	37
4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian	37
4.5. Definisi Operasional	37
4.6. Bahan dan Alat Penelitian	38
4.6.1. Bahan	38
4.6.2. Alat	38
4.7. Prosedur Penelitian	38
4.7.1. Pemeliharaan Ikan Zebra.....	38
4.7.2. Pengambilan Telur.....	39
4.7.3. Pengamatan Telur Ikan Zebra yang Terfertilisasi	39
4.7.4. Pemberian Kafein	39
4.7.5. Pemberian Vitamin C	40
4.7.6. Proses Ekstraksi Buah Naga Merah (<i>Hylocereus polyrhizus</i>).....	40
4.7.7. Pemberian Ekstrak Buah Naga Merah (<i>Hylocereus polyrhizus</i>)	41
4.7.8. Penilaian Aktivitas Motorik	42
4.8. Analisa Statistik.....	42
4.9. Alur Penelitian	44
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	45
5.1. Penilaian Respon Taktil Embrio Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>)	46
5.1.1. Pengaruh Kafein dan Ekstrak Buah Naga Merah terhadap Respon Taktil Embrio Ikan Zebra.....	46
5.1.2. Analisis Data Pengaruh Ekstrak Buah Naga Merah terhadap Respon Taktil Embrio Ikan Zebra.....	47
5.2. Penilaian Kemampuan Berenang Larva Ikan Zebra	51
5.2.1. Pengaruh Kafein terhadap Kemampuan Berenang Larva Ikan Zebra.....	51
5.2.2. Analisis Data Pengaruh Ekstrak Buah Naga Merah terhadap Kemampuan Berenang Larva Ikan Zebra.....	52
BAB 6 PEMBAHASAN	54
6.1. Pengaruh Kafein terhadap Respon Taktil dan Kemampuan Berenang Embrio dan Larva Ikan Zebra	56
6.1.1. Pengaruh Kafein terhadap Respon Taktil Embrio Ikan Zebra.....	56

6.1.2. Pengaruh Kafein terhadap Kemampuan Berenang Larva Ikan Zebra.....	58
6.2. Pengaruh Ekstrak Buah Naga terhadap Respon Taktil Embrio Ikan Zebra.....	59
6.3. Pengaruh Ekstrak Buah Naga terhadap Aktivitas Motorik Larva Ikan Zebra.....	61
BAB 7 PENUTUP.....	65
7.1. Kesimpulan	Error! Bookmark not defined.
7.2. Saran	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR PUSTAKA	70



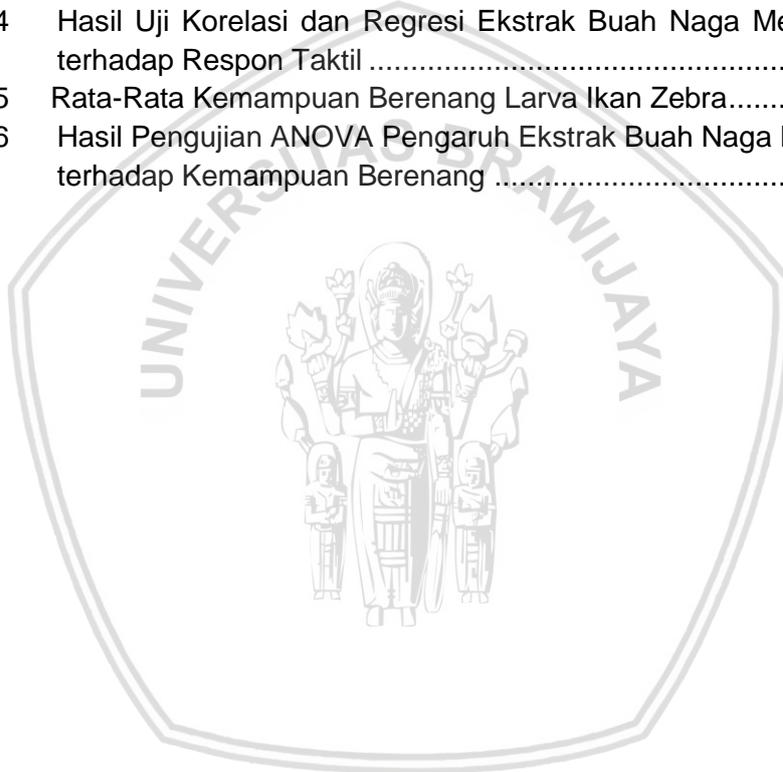
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Rumus Senyawa Kafein	6
Gambar 2.2	Bagan Pengaruh Kafein pada Tingkat Teseptor dan Organ	10
Gambar 2.3	Bagan Flavonoid Menginduksi Aktivasi <i>Neuronal Signaling</i>	17
Gambar 2.4	Jalur Kerja Dopamin pada Otak	19
Gambar 2.5	Buah Naga Merah	20
Gambar 2.6	Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>)	23
Gambar 2.7	Siklus Hidup Ikan Zebra	25
Gambar 5.1	Grafik Pemberian Ekstrak Buah Naga Merah terhadap Nilai Rata-Rata Respon Taktil	47
Gambar 5.2	Grafik Pemberian Ekstrak Buah Naga Merah terhadap Nilai Rata-Rata Kemampuan Berenang	52



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Kandungan Kafein dalam Makanan dan Minuman	8
Tabel 2.2	Spesies Oksigen Reaktif (ROS)	15
Tabel 2.3	Kandungan Nilai Gizi Buah Naga Merah per 100 gram	21
Tabel 2.4	Pembeda Ikan Zebra Jantan dan Betina	24
Tabel 2.5	Perkembangan Awal Embrio Ikan Zebra	26
Tabel 5.1	Pengamatan Rata-Rata Respon Taktil Embrio Ikan Zebra	46
Tabel 5.2	Hasil Pengujian ANOVA Pengaruh Ekstrak Buah Naga Merah terhadap Respon Taktil	48
Tabel 5.3	Hasil Uji Tukey Respon Taktil pada Kelompok Perlakuan	49
Tabel 5.4	Hasil Uji Korelasi dan Regresi Ekstrak Buah Naga Merah terhadap Respon Taktil	50
Tabel 5.5	Rata-Rata Kemampuan Berenang Larva Ikan Zebra.....	51
Tabel 5.6	Hasil Pengujian ANOVA Pengaruh Ekstrak Buah Naga Merah terhadap Kemampuan Berenang	53



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 : Keterangan Kelaikan Etik	78
Lampiran 2 : Analisa Statistik.....	79
Lampiran 3 : Dokumentasi Penelitian.....	83
Lampiran 4 : Determinasi Tanaman Buah Naga Merah	85
Lampiran 5 : Curriculum Vitae (CV)	86



DAFTAR ISTILAH

HPA = *Hypothalamus Pituitary Axis*

ET-1 = Endhotelin-1

NO = Nitrit oksida

MDA = Melinodialdehid

ROS = *Reactive oxygen species*

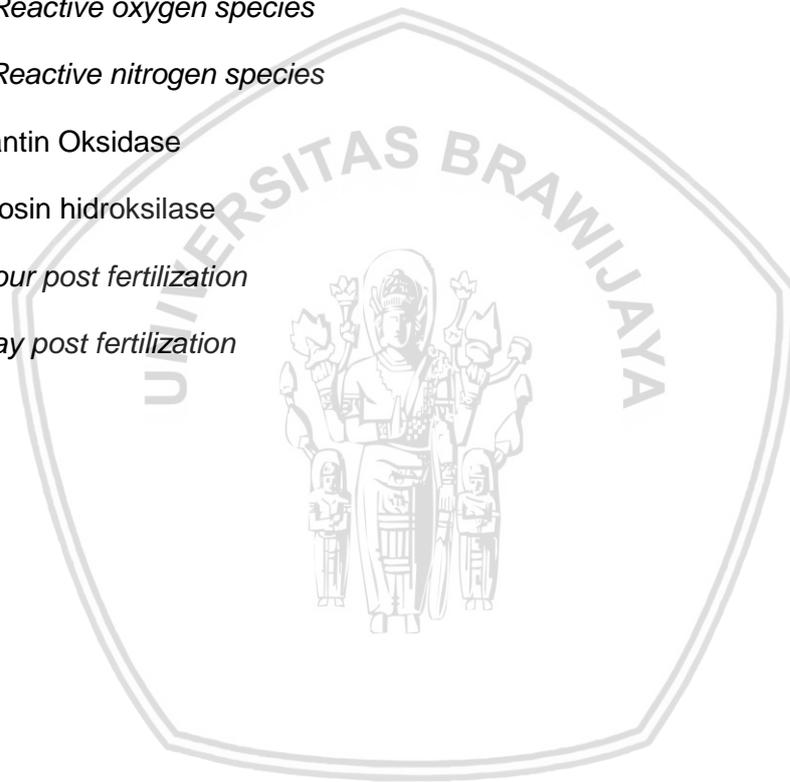
RNS = *Reactive nitrogen species*

XO = Xantin Oksidase

TH = Tirosin hidroksilase

Hpf = *Hour post fertilization*

Dpf = *Day post fertilization*



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Masa kehamilan merupakan salah satu periode penting dalam pertumbuhan dan perkembangan janin. Salah satu faktor yang berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan janin adalah faktor nutrisi. Selama ini sebagian ibu hamil masih mengkonsumsi makanan dan minuman yang mengandung kafein selama masa kehamilan. Kafein merupakan senyawa psikoaktif yang paling sering digunakan di dunia dan dapat ditemukan dalam berbagai makanan (Jahanfar dan Sh, 2013). Beberapa sumber makanan dan minuman yang mengandung kafein antara lain kopi, teh, coklat, dan *softdrink* serta beberapa obat pereda nyeri (Sengpiel, *et al.*, 2013).

Tingkat konsumsi kafein selama kehamilan dilaporkan pada wanita hamil yang mengkonsumsi berbagai olahan makanan yang mengandung kafein selama kehamilan, khususnya adalah kopi, teh, coklat, serta minuman bersoda (Peacock, 2018). Asupan harian kafein yang disarankan oleh CDC bagi ibu hamil adalah maksimal 144 mg/hari atau 2.4 mg/kgBB/hari (Chen *et al*, 2008). Berdasarkan studi meta analisis terkait asupan kafein, dilaporkan bahwa konsumsi kafein pada ibu hamil dibagi menjadi tiga berdasarkan jumlah kafeinnya, yaitu asupan kafein rendah (50 – 149 mg/hari), moderat (150 – 349 mg/hari), serta asupan kafein tinggi (\geq 350 mg/hari) (Chen, *et al.*, 2014).

Kafein (1-3-7,trimethylxanthine) merupakan derivat *xanthine* dan merupakan purin alkaloid yang banyak dikonsumsi. Kafein bersifat dapat melewati sawar plasenta dan terakumulasi pada otak janin (Gupta, 2007). Sebuah penelitian kohort di Norwegia menyebutkan terdapat 59.123 ibu yang mengkonsumsi kafein selama kehamilan dengan metode FFQ (*food frequency questionnaire*) dan di antaranya terdapat 4.503 kasus kelahiran dengan berat badan lahir rendah (BBLR) (Sengpiel *et al.*,2013). Penelitian lain menyebutkan bahwa ibu hamil dengan asupan kafein yang tinggi mengalami peningkatan risiko abortus spontan, perdarahan, lahir mati (*stillbirth*), dan gangguan pertumbuhan intrauterin (Weng, 2008; Yeh *et al.*, 2011).

Berkaitan dengan sistem saraf, kafein diduga juga berpengaruh terhadap perkembangan sistem saraf janin, karena kafein merupakan zat psikostimultan yang pada orang dewasa dapat memengaruhi sistem saraf pusat (Park, 2016). Sebuah penelitian menunjukkan bahwa konsumsi kafein pada masa prenatal dapat menurunkan neurogenesis di bagian hipokampus otak serta gangguan memori pada tikus dewasa (Han *et al.*, 2007).

Kafein bekerja dengan salah satunya menyebabkan peningkatan pelepasan katekolamin dari medula adrenal. Katekolamin ini akan menyebabkan vasokonstriksi pembuluh darah uteroplasenta sehingga dapat menyebabkan hipoksia pada janin. Hipoksia jaringan dapat mencetuskan timbulnya stres oksidatif dan terlepasnya senyawa radikal bebas, senyawa ini dapat menyebabkan kerusakan sel-sel saraf (Gupta, 2007). Stres oksidatif rentan terjadi pada daerah otak karena tingkat penggunaan

oksigen pada otak yang sangat tinggi dan dapat menyebabkan gangguan pada perkembangan otak (Semenza, 2012).

Rantai radikal bebas dapat dihentikan dengan keberadaan senyawa antioksidan di dalam tubuh yang bekerja dengan menurunkan agen-agen yang berkontribusi terhadap stres oksidatif (Choo, 2016). Senyawa antioksidan dalam peranannya sebagai pertahanan membutuhkan interaksi antara molekul antioksidan enzimatik dan non enzimatik. Dalam keadaan tinggi senyawa ROS, tubuh membutuhkan molekul non enzimatik yang bertindak secara langsung dalam menangkal radikal bebas. Molekul non enzimatik antioksidan yang berasal dari eksternal dapat berupa suplemen maupun dari bahan-bahan natural (Winarsih, 2011; Rahal, 2014).

Beberapa studi menilai perbedaan keamanan serta efektivitas konsumsi antioksidan sintesis dan alami dalam menangkal berbagai penyakit seperti kanker dan penyakit kronis lain. Disebutkan bahwa konsumsi suplementasi selenium dapat meningkatkan risiko diabetes melitus pada orang yang sehat. Dalam studi meta-analisis, disebutkan pula bahwa tidak terdapat bukti yang mendukung bahwa suplemen antioksidan dapat mencegah penyakit jantung (Myung *et al*, 2010). Di sisi lain, konsumsi makanan sehari-hari yang kaya akan antioksidan diyakini lebih efektif serta tidak memberikan efek samping lain pada manusia. Ini karena antioksidan dalam diet bersifat lebih toleran terhadap tubuh. Panduan *Dietary for Americans* pada tahun 2010 menyebutkan bahwa sumber optimal antioksidan berasal dari bahan-bahan alami yang dikonsumsi bukan dari suplementasi pil atau tablet antioksidan (Bjelakovic, *et al.*, 2014).

Sumber makanan sehari-hari yang banyak mengandung antioksidan diantaranya buah-buahan. Konsumsi buah-buahan di kalangan masyarakat saat ini menjadi sebuah gaya hidup bahkan konsumsi buah-buahan menjadi sebuah promosi gaya hidup sehat. Salah satu buah-buahan yang diyakini menjadi sumber antioksidan adalah buah naga merah.

Buah naga merah merupakan sumber makanan alami yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat karena nilai ekonomisnya, bentuk dan warnanya yang menarik, serta memiliki banyak manfaat bagi kesehatan karena kandungan gizi di dalamnya, salah satunya adalah senyawa antioksidan. Senyawa antioksidan ini berasal dari salah satunya adalah pigmen warna ungu yang banyak terdapat pada buah naga merah, yaitu betasianin. Sebuah penelitian menyebutkan aktivitas antioksidan yang tinggi dari buah naga merah didasarkan pada kandungan asam askorbik, total senyawa fenol, dan aktivitas anti radikal bebas, yaitu secara berurutan 36,25 mg/100 gram; 24,22 mg GAE/gram ekstrak kering; 226,51 μ M Vit.C equivalents/ gram ekstrak kering (Choo, 2011). Buah naga memiliki kandungan asam askorbik atau vitamin C (33.8 μ g AA) yang lebih tinggi dibandingkan dengan apel (20.6 μ g AA) , pisang (2.2 μ g AA), anggur merah (18.3 μ g AA), dan manggis (1.0 μ g AA). Selain itu, buah naga merah memiliki kandungan total senyawa fenol (0.76 mg GAE) yang lebih tinggi dibandingkan dengan buah naga putih (0.58 mg GAE), pepaya (0.45 mg GAE), dan buah nanas (0.61 mg GAE) (Isabelle, 2010).

Pengaruh pemberian buah naga (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap efek yang ditimbulkan oleh asupan kafein selama kehamilan berupa aktivitas motorik dapat dilakukan pada hewan coba berupa ikan zebra

(*Danio rerio*). Ikan zebra merupakan organisme yang ideal untuk mempelajari tumbuh kembang karena perkembangan ikan mulai dari embrio hingga dewasa dapat dengan mudah diamati secara langsung melalui cangkangnya yang transparan. Selain itu, ikan zebra memiliki kesamaan genetik dan jalur metabolisme dengan mamalia, termasuk pada manusia. Hal ini membuat ikan zebra merupakan organisme yang ideal dalam menggambarkan patologi pada manusia (Babin, 2014).

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap aktivitas motorik embrio dan larva ikan zebra (*Danio rerio*) yang diberikan kafein.

1.3. Tujuan

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap aktivitas motorik embrio ikan zebra (*Danio rerio*) yang diberikan kafein.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengetahui pengaruh pemberian buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap respon taktil embrio ikan zebra (*Danio rerio*) yang diberikan kafein
2. Mengetahui pengaruh pemberian buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap kemampuan berenang larva ikan zebra (*Danio rerio*) yang diberikan kafein

1.4. Manfaat

1.4.1. Manfaat Akademik

1. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi salah satu acuan dalam penelitian ilmiah selanjutnya bagi mahasiswi di Program Studi S1 Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang serta bagi profesi bidan.
2. Penelitian ini diharapkan dapat menambah khazanah keilmuan pada program studi S1 Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang berkaitan dengan asuhan kebidanan dalam masa kehamilan.

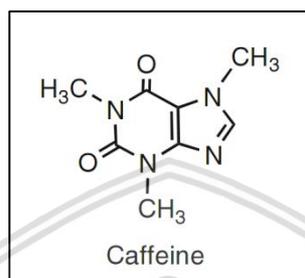
1.4.2. Manfaat Praktis

1. Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar penelitian awal berkaitan dengan pengaruh pemberian kafein selama masa kehamilan terhadap ibu dan janin.
2. **Penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar untuk penelitian lanjutan berkaitan dengan pemberian kafein dan ekstrak buah naga selama masa kehamilan untuk menjadi pertimbangan asuhan kebidanan selama kehamilan.**

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

1.1. Kafein



Gambar 2.1 Rumus Senyawa Kafein (Fredholm, 2011)

Kafein (*1,3,7-trimethylxanthine*) merupakan senyawa kimia purin alkaloid dan merupakan komponen penting dari tanaman non-alkoholik yang diolah menjadi minuman ataupun makanan (Fredholm, 2011). Selain itu, kafein adalah senyawa psikoaktif yang banyak dikonsumsi di dunia. Kafein dapat dijumpai dalam berbagai sumber makanan seperti kopi, teh, coklat, dan minuman ringan (*softdrink*) juga terdapat dalam berbagai obat seperti diuretik, analgesik, dan dekongestan (Echeverri, 2010). Kemampuan psikostimultan kafein karena kemampuannya untuk berinteraksi dengan neurotransmitter dalam beberapa regio di otak sehingga mempengaruhi fungsi perilaku (Fison, 2004).

1.1.1. Metabolisme Kafein

Kafein diabsorpsi secara sempurna di usus dan sebagian besar diserap pada bagian usus halus. Kafein memasuki air pada jaringan dan dapat ditemukan pada seluruh cairan tubuh, cairan serebrospinal, saliva, cairan empedu, semen, ASI, dan darah tali pusat (Arnaud, 2011). Kafein

dimetabolisme ke dalam lebih dari 25 metabolit pada manusia dan tiga di antaranya yang terbanyak adalah paraxanthin, theobromin, dan theofilin. Proses metabolisme kafein disebut dengan demetilasi. Enzim yang berperan dalam metabolisme kafein di antaranya adalah isoenzim sitokrom hepatic P-450 (CYP450) (Echeverri, 2010).

Kafein diserap secara cepat dan sempurna dari usus sehingga bioavailabilitasnya 100%. Konsentrasi dalam plasma bergantung pada genetik, jenis kelamin, dan kelainan hepar. Waktu maksimum konsentrasi plasma (*Tmax*) adalah 30 – 40 menit puasa dan akan lebih panjang apabila diikuti dengan makanan. Rata-rata waktu metabolisme kafein pada manusia adalah 2,5 sampai 4,5 jam (Echeverri, 2010). Level kafein dalam plasma tidak selalu mengindikasikan paparannya terhadap organ-organ spesifik (Brent, *et al.*, 2011).

Beberapa keadaan dapat mengganggu metabolisme kafein dari proses normal metabolismenya. Retensi kafein meningkat pada kondisi seperti kehamilan, fetus, dan neonatus dengan waktu paruh sekitar 2 sampai 3 jam. Diduga peningkatan retensi kafein tersebut merupakan hasil dari defisiensi enzim P-450 pada fetus dan neonatus. Metabolisme kafein pada manusia mencapai kemampuan seperti orang dewasa pada usia 7 bulan (Brent, *et al.*, 2011).

1.1.2. Makanan Mengandung Kafein

Kafein diproduksi secara komersial dengan cara ekstraksi dari tanaman tertentu atau dapat juga diproduksi secara sintesis. Berikut adalah beberapa jenis makanan dan/atau minuman dengan kandungan kafein di dalamnya:

Tabel 2.1 Kandungan Kafein dalam Makanan dan Minuman

Makanan / minuman	Kandungan Kafein (mg/sajian)
Coca cola classic	29.5
Pepsi	31.7
Starbucks mocha	71.8
Espresso	114
Minuman kopi	60-180
Minuman teh	20-90
Coklat batang	38

Sumber : Mc Cusker, 2006; Sengpiel, 2013.

1.1.3. Efek Kafein terhadap Kehamilan

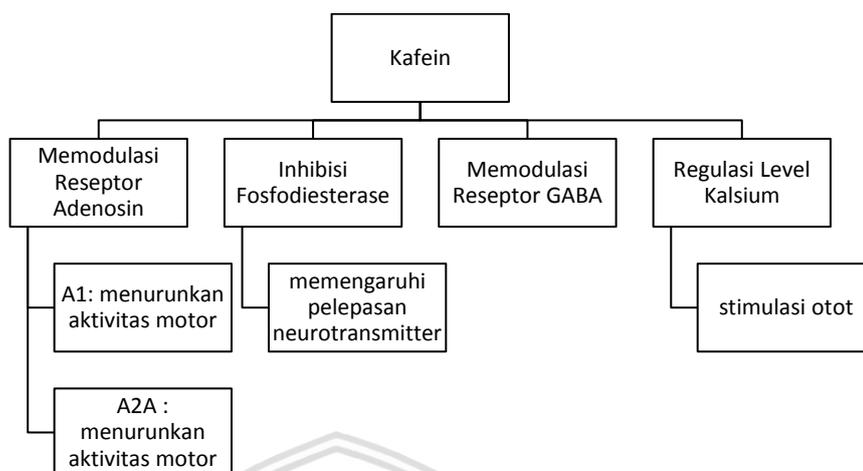
Kafein bersifat hidrofobik sehingga memungkinkan untuk melewati seluruh membran sel. Ikatan kafein plasma oleh protein yang rendah menyebabkan kafein dapat dengan bebas melewati sel-sel darah. Pada bayi baru lahir, konsentrasi kafein di dalam plasma sama dengan konsentrasinya dalam cairan serebrospinal (Fredholm, 2011). Selain itu, tidak terdapat barrier plasenta terhadap kafein dan konsentrasi yang tinggi ditemukan pada otak dan plasma fetus. Tiga bentuk metabolit utama kafein terakumulasi pada otak janin (Brent, 2011).

Kafein dapat berpengaruh terhadap divisi atau pembelahan sel. Paparan kafein akan menunda osifikasi skeletal selama paparan. Hal ini menyebabkan perkembangan janin intrauterin dapat terganggu dan menyebabkan penurunan berat badan. Penelitian menyebutkan bahwa kafein berhubungan dengan kejadian berat badan lahir rendah pada ibu hamil dan juga hewan coba yang dipapar kafein (Park, 2016).

Kafein menyebabkan terjadinya peningkatan pelepasan katekolamin pada pembuluh darah sehingga terjadi vasokonstriksi pembuluh darah, termasuk pembuluh darah uteroplasenta. Katekolamin berperan penting dalam mengontrol respon pembuluh darah perifer. Epinefrin dilepas ke

dalam sirkulasi dari kelenjar adrenal akibat rangsangan saraf simpatis sedangkan norepinefrin masuk ke dalam plasma setelah lepas dari ujung saraf simpatis. Sistem saraf simpatis diatur oleh hipotalamus yang juga mengatur aksis HPA sehingga terjadi juga pelepasan *corticotropin releasing factor* (CRF) yang mengatur pelepasan hormon. Kenaikan kadar epinefrin akan menyebabkan takikardi, meningkatkan tekanan darah, vasokonstriksi, menurunkan aliran darah ke kulit dan organ-organ dalam, serta mengeluarkan glukosa dari hepar (Halim, 2012). Di sisi lain, norepinefrin meningkatkan tekanan diastolik dan sistolik. Kedua hormon ini berperan penting dalam peningkatan *heart rate* (Han, 2011).

Pengaruh konsumsi kafein sebanyak 2 cangkir yang diinvestigasi pada 20 kehamilan menunjukkan peningkatan signifikan konsentrasi serum kafein dan epinefrin setelah 30 menit ($p < 0.01$). Aliran darah uteroplacenta menurun secara signifikan ($p < 0.05$). Penurunan aliran darah uteroplacenta serta peningkatan konsentrasi serum epinefrin maternal berpotensi terhadap gangguan pertumbuhan janin (Kirkinen, 1983). Hubungan antara konsumsi kopi selama kehamilan dengan restriksi pertumbuhan menunjukkan angka yang signifikan. Konsumsi kafein >200 mg per hari selama kehamilan berhubungan dengan penurunan berat badan lahir sebesar 60 – 70 gram ($p < 0.004$) (Konje, 2008).



Gambar 2.2. Bagan Pengaruh Kafein pada Tingkat Reseptor dan Organ (Fredholm, 2011; Monteiro 2014)

1.1.4. Efek Kafein terhadap Perkembangan Syaraf

Paparan kafein selama kehamilan memiliki beberapa efek pada perkembangan sistem saraf pusat janin diantaranya komponen otak, perilaku, tidur dan kontrol respiratori. Pada penelitian hewan coba tikus menunjukkan bahwa kafein berdifusi melalui plasenta dan terakumulasi di otak janin. Konsentrasi kafein pada otak janin lebih tinggi dibandingkan pada plasenta meskipun metabolit kafein didistribusikan baik ke otak maupun plasenta. Penelitian lain menyebutkan bahwa paparan kafein pada tikus betina selama kehamilan menyebabkan penurunan berat otak yang lebih signifikan daripada berat badan. Level DNA, RNA, kolesterol dan protein di otak lebih rendah pada tikus yang lahir dari induk yang dipapar kafein daripada yang tidak terpapar kafein. (Nehlig, 1994)

Kafein pada otak dapat menurunkan proliferasi sel-sel glial, baik itu astrosit dan oligodendrosit serta mempengaruhi matriks ekstraseluler sehingga dapat mengganggu proses mielinisasi. Penelitian menunjukkan bahwa diet protein yang rendah memperparah kerusakan atau gangguan

pada perkembangan otak. Selain itu, paparan kafein selama gestasi dan laktasi juga menginduksi perubahan konsentrasi komponen serebral seperti katekolamin, tirosin, triptofan, serotonin, asam 5-dihidroksilase asetat, dan nukleotida siklik, yang mana dapat berpengaruh terhadap abnormalitas perilaku seperti hipoaktivitas selama masa perkembangan janin (Nehlig, 1994).

Hipoksia berkepanjangan pada masa prenatal, yaitu dari hari ke 5 hingga ke-20 gestasi pada tikus diduga dapat menurunkan aktivitas enzim tirosin hidroksilase (TH) di daerah korteks motorik dan hipokampus. Selain itu, hipoksia-iskemia selama masa prenatal (ligasi karotid unilateral diikuti dengan paparan oksigen 8% selama 3 – 4 jam) menyebabkan penurunan enzim tirosin hidroksilase di substansia nigra pada neonatus. Hipoksia-iskemia yang menyebabkan gangguan motorik perilaku diketahui berkaitan dengan hilangnya aktivitas tirosin hidroksilase di daerah substansia nigra pada tikus remaja (Fan, 2005). Tirosin hidroksilase merupakan protein yang menjadi indikator keberadaan dopamin (DA). Dikarenakan kafein dapat menghambat perkembangan saraf pada masa-masa kritis, konsekuensi jangka panjang dapat terjadi akibat dari kerusakan formasi sinapsis pada otak (Park, 2016).

Asupan kafein sebanyak 15-20 mg/kg/hari pada tikus meningkatkan jumlah reseptor adenosin terutama pada 4 minggu pertama kehidupan, khususnya pada korteks serebral, serebelum, dan hipokampus. Hal ini menginduksi hipoaktivitas satu minggu setelahnya. Penurunan aktivitas ini diduga berkaitan dengan terganggunya perkembangan kontrol lokomotor oleh reseptor adenosin. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa paparan

kafein pada masa prenatal menurunkan neurogenesis atau pembentukan neuron pada area hipokampus otak sehingga mengganggu memori dan perilaku (Park, 2016).

1.1.5. Kafein Mendukung Radikal Bebas

Konsumsi kafein selama kehamilan menurunkan aliran darah plasenta (200 mg kafein). Endothelin-1 (ET-1), sebuah polipeptida vasoaktif berperan dalam peningkatan aliran darah, akan menurun sebanyak 51% setelah paparan kafein. Akibat dari penurunan aliran darah tersebut, terjadi beberapa respon stres, seperti pelepasan katekolamin yang dapat mempengaruhi perkembangan neuronal. Penurunan availabilitas oksigen dapat menyebabkan respon stres, peningkatan prekursor metabolik, dan perubahan hormonal (Park, 2016). Respon stres serta peningkatan metabolisme yang berlebihan dapat memicu terjadinya stres oksidatif.

Sebuah penelitian menunjukkan bahwa pemberian kafein pada tikus dengan dosis 30 mg/kgBB dan 100 mg/kgBB menunjukkan penurunan aktivitas arginase pada jaringan otak bersamaan dengan penurunan kadar MDA jaringan otak dan plasma, selain itu juga diikuti dengan peningkatan level NO jaringan otak dan serum. Hal ini menunjukkan bahwa stres oksidatif yang ditandai dengan peningkatan NO, berperan terhadap terjadinya gangguan perkembangan sel-sel saraf (Ofluoglu, 2009).

1.2. Stres Oksidatif

Stres oksidatif merupakan suatu rangkaian proses pada tingkat seluler berupa proliferasi sel, diferensiasi, dan *signaling*. Meskipun oksigen sangat esensial bagi kehidupan sel, metabolismenya yang berlebihan dapat menyebabkan diproduksi derivat atau zat-zat toksik, misalnya

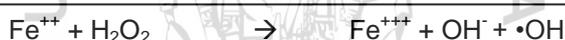
Reactive Oxygen Species (ROS) atau disebut juga sebagai radikal bebas (Gupta, 2007).

Radikal bebas terdiri dari *Reactive Oxygen Species* (ROS), *Reactive Nitrogen Species* (RNS), dan radikal lainnya. Radikal bebas akan bereaksi dengan molekul di sekitarnya untuk mencapai kestabilan atom atau molekulnya. ROS akan merusak organel seluler diantaranya mitokondria, DNA mitokondria, dan membran sel, serta menyebabkan kematian sel (Gupta, 2007).

Secara umum, tahapan reaksi pembentukan radikal bebas melalui 3 tahapan reaksi sebagai berikut:

1. Tahap Inisiasi, yaitu awal pembentukan radikal bebas.

Misalnya:



2. Tahap Propagasi, yaitu pemanjangan rantai radikal



3. Tahap Terminasi, yaitu bereaksinya senyawa radikal dengan radikal lain atau dengan penangkap radikal sehingga potensi propagasinya rendah



Dalam rangka menghindari kerusakan akibat ROS, sel tubuh memiliki sistem pertahanan antioksidan. Keseimbangan antara produksi ROS dan aktivitas antioksidan akan menjaga keseimbangan fisiologis sehingga terjadi homeostasis seluler. Ketika keseimbangan ini terganggu

misalnya pada keadaan produksi ROS yang berlebih, stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan dan disfungsi sel. Pada kehamilan, stres oksidatif dikaitkan dengan kejadian abortus spontan, mola hidatidosa, preeklampsia, dan malformasi (Gupta, 2007).

Xanthin merupakan salah satu senyawa yang reaktif apabila terjadi reaksi oksidasi. Xanthin oksidase (XO) secara fisiologis bekerja dengan mengkonversi hipoxanthin menjadi asam uric dan anion superoksidan radikal. Pada keadaan stress oksidatif di mana terjadi ketidakseimbangan antara kadar radikal bebas dengan kapasitas antioksidan, xanthin oksidase (XO) akan menghasilkan senyawa radikal bebas (ROS) melalui metabolisme purin. Keadaan ini dijumpai pada penyakit disfungsi endotel seperti gagal jantung dan diabetes (Elahi, 2009; Feoli, 2014).

2.2.1. Radikal Bebas

Radikal bebas (*free radical*) merupakan suatu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbit luarnya. Ini menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan dengan cara menyerang dan mengikat elektron di sekitarnya. Apabila senyawa yang diikat oleh senyawa radikal bebas tersebut merupakan senyawa kovalen maka akan menjadi berbahaya. Senyawa yang memiliki ikatan kovalen adalah molekul-molekul besar (bioakromolekul) seperti lipid, protein, polisakarida, dan DNA. Semakin besar molekul yang mengalami kerusakan, semakin parah akibatnya. Kerusakan sel akan berdampak negatif pada struktur dan fungsi sel tersebut. (Winarsi, 2011)

Radikal bebas menyebabkan kerusakan sel dengan tiga cara, yaitu peroksidasi komponen lipid dari membran sel dan sitosol sehingga menyebabkan serangkaian reduksi asam lemak yang mengakibatkan kerusakan membran; kerusakan DNA yang dapat menyebabkan mutasi DNA bahkan dapat menimbulkan kematian sel; ketiga yaitu dengan modifikasi protein teroksidasi oleh karena terbentuknya *cross linking* protein, melalui mediator sulfidril atas beberapa asam amino labil seperti sistein, metionin, lisin, dan histidin. Reaktivitas radikal bebas dapat dihambat melalui 3 cara, yaitu mencegah atau menghambat pembentukan radikal bebas baru, menginaktivasi atau menangkap radikal dan memotong propagasi (pemutusan rantai), serta memperbaiki (*repair*) kerusakan akibat radikal (Winarsi, 2011).

Radikal bebas dapat diklasifikasikan menjadi ROS dan RNS. ROS sebagian besar terdiri dari radikal superoksida, hidrogen peroksida, oksigen singlet, dan radikal hidroksil. RNS terdiri dari peroksinitrit dan nitrit oksida (NO) yang dapat beregenerasi selama hipoksia dan menyebabkan reperfusi kerusakan pada sel (Gupta, 2007).

Tabel 2.2 Spesies Oksigen Reaktif (ROS)

No	Radikal	
1	$O_2\cdot$	<i>Superoxide</i>
2	$HO\cdot$	<i>Hydroxyl radical</i>
3	HO_2	<i>Hydroperoxyl radical</i>
4	LO_2	<i>Lipid peroxy radical</i>
5	$LO\cdot$	<i>Lipid alkoxyl radical</i>
6	NO_2	<i>Nitrogen dioxide</i>
7	$NO\cdot$	<i>Nitric oxide</i>
8	H_2O_2	<i>Hydrogen peroxide</i>
9	1O_2	<i>Singlet oxygen</i>
10	$Fe=O$	<i>Lipid hydroperoxide</i>
11	$HOCl$	<i>Iron-oxygen complexes</i>

Sumber : Sayuti, 2014

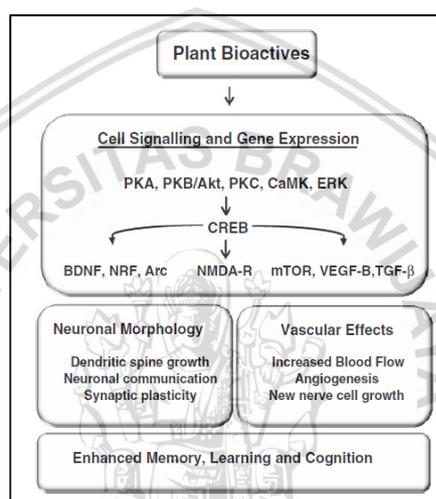
2.2.2. Stres Oksidatif pada Sistem Syaraf Pusat

Sistem syaraf pusat (CNS) sangat sensitif terhadap kerusakan akibat radikal bebas karena cenderung memiliki kapasitas antioksidan yang rendah. Selain itu, otak sangat sensitif terhadap aktivitas radikal bebas karena pemakaian oksigen, *poly unsaturated fatty acid* yang mudah teroksidasi, dan keberadaan logam yang aktif teroksidasi (Cu dan Fe) (Do, 2009). Produksi ROS pada jaringan dapat menyebabkan kerusakan langsung pada makromolekul seperti lemak, asam nukleat, dan protein. Asam lemak poliunsaturated merupakan salah satu target oksidasi dari ROS. Oksigen radikal bebas, radikal superoksida anion (O_2^-), radikal hidroksil (OH^-), dan radikal alkilperol merupakan inisiator yang kuat terhadap peroksidasi lipid yang berkontribusi terhadap berbagai penyakit. Jika sekali peroksidasi lipid diinisiasi, rantai reaksinya akan berlangsung terus menerus hingga produk terminasi diproduksi. Produk akhir peroksidasi lipid antara lain malondialdehyde (MDA) dapat terakumulasi pada sistem tubuh (Rahal, 2014). Disregulasi redoks dapat mengganggu perkembangan interneuron dan oligodendrosit. Hal ini menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas interneuron dan mielinisasi yang terganggu (Do, 2009).

1.3. Antioksidan

Dalam rangka bekerja melawan efek berbahaya pada sel akibat stres oksidatif, sistem tubuh memiliki pertahanan tubuh dengan beberapa strategi, di antaranya adalah mencegah kerusakan sel, mekanisme perbaikan untuk mengurangi kerusakan akibat oksidasi, dan mekanisme terpenting yaitu mekanisme pertahanan antioksidan. Antioksidan

merupakan pilihan lini pertama untuk mengatasi stres (Rahal, 2014). Antioksidan secara umum didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat, dan mencegah proses oksidasi lipid. Antioksidan bekerja dengan mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga reaktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat (Sayuti, 2014).



Gambar 2.3. Bagan Flavonoid menginduksi aktivasi *neuronal signaling* dan ekspresi gen pada otak. (Spencer, 2009)

Pertahanan antioksidan endogen di dalamnya adalah hubungan antara molekul antioksidan enzimatik dan nonenzimatik yang terdistribusi di sitoplasma dan organel sel lain. Beberapa molekul enzimatik di antaranya adalah SOD, katalase, beberapa peroksidase. Molekul-molekul ini mengkatalisis reaksi oksidasi dengan mengubah ROS untuk menjadi molekul yang lebih stabil misalnya air dan oksigen (O_2). Di samping molekul enzimatik primer, sejumlah besar enzim-enzim sekunder bekerja dengan membentuk siklus redoks serta sebagai ko-faktor untuk fungsi enzim antioksidan primer. Beberapa antioksidan nonenzimatik di antaranya adalah GSH, NADPH, thiredoxin, vitamin E, vitamin C, logam selenium,

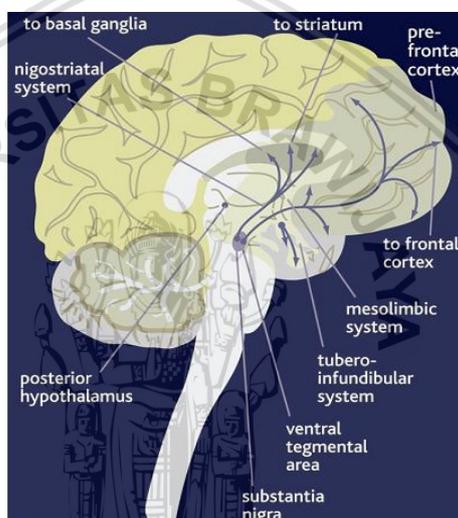
flavonoid, asam askorbik, glutathione, seluruhnya berfungsi sebagai *direct scavengers of ROS* (Rahal, 2014) seperti terlihat pada gambar 2.3. Antioksidan non-enzimatik banyak ditemukan dalam sayuran dan buah-buahan (Winarsih, 2011).

1.4. Aktivitas Motorik

Dopamin (3-hydroxytyramine; DA) merupakan neurotransmitter yang bertindak sebagai prekursor untuk sintesis neurotransmitter norepinefrin (NE). Dopamin disintesis dari hormon tirosin. Terdapat 4 *pathway* atau jalur kerja dopaminergik, antara lain: jalur tuberoinfundibular, jalur nigrostriatal, jalur mesokortikal, dan jalur mesolimbik. Jalur nigrostriatal terdiri dari neuron-neuron yang badannya berada pada substansia nigra dan berterminasi pada bagian dorsal striatum. Area ini berkaitan dengan pergerakan atau motorik karena degenerasi dari bagian ini telah diteliti dapat menyebabkan penyakit Parkinson yang memiliki ciri tremor, pergerakan yang tidak terkontrol (Speed, 2010). Neuron dopaminergik berperan dalam kontrol regulasi *mood*, fungsi kognitif, homeostasis fisiologis, dan koordinasi motorik. Pada mamalia, neuron ini terletak di otak pada bagian *caudal forebrain* dan *ventral midbrain* sedangkan pada zebrafish neuron dopaminergik terletak pada daerah forebrain terutama ventral diencephalon, ventral thalamus, posterior tuberculum, dan hypothalamus.

Dopamin merupakan neuromodulator yang penting dalam kontrol sistem motorik pada vertebrata dan invertebrata. Hilangnya neuron-neuron dopaminergik pada batang otak dapat menyebabkan gangguan perilaku motorik. Dopamin memodulasi proses *inhibitory dan excitatory* pada korda spinalis yang memengaruhi inisiasi dan kontrol perilaku motorik. Pada

manusia, ketidakseimbangan dopamin berkontribusi dalam defisit motorik pada penyakit Huntington dan Parkinson. Dopamin dilepaskan dari neuron nigrostriatal mengakibatkan pergeseran kesetimbangan glutamat pada ganglia basalis. Reseptor dopamin dapat bekerja melalui dua jalur, yaitu jalur langsung dengan mengaktifasi jalur motorik dan jalur tidak langsung dengan menghambat jalur motorik. Jalur kerja dopamin pada otak dapat diketahui pada gambar 2.4.



Gambar 2.4 Jalur Kerja Dopamin pada Otak (Speed, 2010)

Sebuah penelitian menyebutkan bahwa hipoksia yang menginduksi iskemia menyebabkan kerusakan pada otak, salah satunya adalah kerusakan neuron dopaminergik serta penurunan enzim tirosin hidroksilase (TH) pada bagian substansia nigra (Fan, 2005). Stres oksidatif dapat menginduksi disfungsi mitokondria, mutasi genetik, serta menyebabkan kematian sel. Kerusakan oksidatif tersebut dimediasi oleh senyawa-senyawa ROS (*reactive oxygen species*) (Choi, 2010). Pada keadaan setelah terjadi iskemia, dopamin banyak dilepaskan melalui mekanisme eksitasi neuronal. Ada dua bentuk dopamin yang dilepaskan, yaitu kalsium-

dependen dan kalsium-independen (Guo, 2011). Akumulasi dopamin pada sitosol dapat memicu stres oksidatif dan neurotoksisitas. Hal ini berkaitan dengan meningkatnya ekspresi transporer dopamin serta berkaitan dengan defisit motorik. (Masoud, 2015).

1.5. Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*)

Buah naga merupakan buah yang berbentuk unik dan berasal dari keluarga kaktus. Buah ini berasal dari Meksiko, Amerika Tengah, dan Amerika Selatan namun saat ini banyak dibudidayakan di negara-negara Asia seperti Taiwan, Vietnam, Filipina, Malaysia. Popularitas buah ini meningkat beberapa tahun terakhir karena tingginya manfaat bagi kesehatan (Jamilah, 2011). Di Indonesia sendiri buah naga merupakan salah satu tanaman hortikultura yang mulai dikembangkan. Tren produksi buah naga di Indonesia menunjukkan peningkatan seiring meningkatnya konsumsi masyarakat, yaitu di Kabupaten Jember misalnya meningkat setiap tahunnya dari 2010 produksinya mencapai 4274 dan pada 2011 menjadi 4720 (Harvey, 2009).

2.5.1. Klasifikasi Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*)



Gambar 2.5 Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*)(Arifin, 2009)

Buah naga merah memiliki karakteristik kulit buahnya berwarna merah dan daging buah berwarna merah keunguan dengan biji kecil-kecil berwarna hitam. Jenis buah naga yang banyak ditemukan di Pulau Jawa

adalah buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dan buah naga putih (*Hylocereus undatus*). Genus *Hylocereus* merupakan anggota dari tanaman kaktus yang merambat dengan batang segitiga. Adapun klasifikasi *Hylocereus polyrhizus* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Cactales
Famili	: Cactaceae
Subfamili	: Hylocereanae
Genus	: <i>Hylocereus</i>
Spesies	: <i>Hylocereus polyrhizus</i>

2.5.2. Kandungan Gizi Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*)

Buah naga merah memiliki daging buah yang berwarna menarik dan semakin berwarna merah semakin banyak kandungan pigmen warnanya yaitu betasianin. Kandungan nilai gizi buah naga merah adalah sebagai berikut:

Tabel 2.3 Kandungan Nilai Gizi Buah Naga Merah per 100 gram

Zat	Kandungan Gizi
Air (g)	82,5 – 83
Protein (g)	0,159 – 0,229
Lemak (g)	0,12 – 0,61
Karoten (mg)	0,005 – 0,012
Kalsium (mg)	6,3 – 8,8
Fosfor (mg)	30,2 – 36,1
Besi (mg)	0,55 – 0,65
Vitamin B1 (mg)	0,28 – 0,043
Vitamin B2 (mg)	0,043 – 0,045
Vitamin C (mg)	8 – 9
Thiamine (mg)	0,28 – 0,030
Riboflavin (mg)	0,043 – 0,044

Sumber : Taiwan Food Industry Develop & Research Authorities, 2005

2.5.3. Pigmen Betasianin

Buah naga diyakini memiliki aktivitas antiradikal yang tinggi dengan kandungan senyawa fenolik di dalamnya. Karakteristik unik buah naga merah adalah daging buah naga yang berwarna merah keunguan. Warna ini merupakan salah satu spektrum warna yang disebut betalain dari golongan betasianin. Betasianin merupakan pigmen warna yang mengandung gugus nitrogen dalam ikatan senyawanya (Rebecca, 2010). Betasianin dalam buah naga juga berkontribusi terhadap senyawa total fenol karena keberadaan struktur fenolik dalam molekulnya.

Konsentrasi betasianin pada daging buah naga merah sekitar 10.3 mg/ 100 gram (Wu, 2006). Pigmen warna betalain dari golongan betasianin dilaporkan memiliki aktivitas sebagai *neuroprotective* pada otak mencit, selain itu juga memiliki aktivitas biologis yang bermanfaat seperti anti inflamasi, hipolipidemik, hepatoprotektif, dan anti diabetik (Khan, 2016). Betasianin juga memiliki kemampuan dalam melawan sel karsinoma, tumor, dan melanoma dengan mekanisme kerja menunda atau menghambat oksidasi protein, lipid, karbohidrat, dan DNA yang disebabkan oleh ROS maupun RNS. Sebuah studi menyebutkan bahwa fraksi betasianin memiliki aktivitas anti radikal bebas yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan asam askorbik (vitamin C) dan asam galik. Selain itu, pigmen betasianin menunjukkan aktivitas anti radikal yang lebih baik dibandingkan dengan fraksi-fraksi flavonoid (Khan, 2016; Cai, 2003).

2.5.4. Flavonoid dan Senyawa Fenol

Senyawa flavonoid pada daging buah naga merah sekitar 7.21 mg/100 g (Wu, 2006). Senyawa flavonoid pada buah naga merah dapat

terdegradasi hingga 50% apabila terekspos pada suhu 90⁰ C selama 22.6 menit (Omidizadeh, 2014). Senyawa fenol meningkatkan aktivitas antioksidan pada buah naga merah. Senyawa fenol merupakan metabolit sekunder pada tanaman yang terdiri dari senyawa sederhana hingga senyawa kompleks seperti asam fenolik dan flavonoid. Senyawa-senyawa ini memiliki beberapa aktivitas biologis yang dilaporkan memiliki manfaat bagi kesehatan (Omidizadeh, 2014).

1.6. Ikan Zebra (*Danio rerio*)



Gambar 2.6 Ikan Zebra (*Danio rerio*) (Smit, 2014)

Ikan zebra berasal dari daerah Myanmar, India, dan Srilanka. Di dunia terdapat setidaknya 45 spesies *Danio rerio* atau ikan zebra dan termasuk ke dalam famili *Cyprinidae*. ikan zebra dapat hidup rata-rata tiga hingga empat bulan. Dalam laboratorium, rata-rata siklus hidup ikan zebra mencapai 3½ tahun. Aktivitas ikan zebra memiliki perbedaan antara siang dan malam, di mana pada siang hari memiliki pola sirkadian yang kuat sedangkan di malam hari aktivitas cenderung rendah (aktivitas tidur pada mamalia). (Reed, 2010) . Berikut ini merupakan taksonomi ikan zebra,

Kingdom : *Animalia*

Subfilum : *Vertebra*

Filum : *Chordata*

Kelas : *Teleostei*

<i>Ordo</i>	: <i>Cypriniformes</i>
<i>Famili</i>	: <i>Cyprinidae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Danio</i>
<i>Spesies</i>	: <i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822) – <i>zebra danio</i> (ITIS, 2015)

2.6.1. Karakteristik Ikan Zebra

Ikan zebra memiliki warna kulit loreng yang memanjang dari kepala sampai ekor serta anus. Dalam pemisahan ikan zebra saat penelitian, terlebih dahulu harus diketahui perbedaan antara ikan zebra jantan dan betina. Perbedaan ikan zebra jantan dan betina adalah sebagai berikut

Tabel 2.4 Pembeda Ikan Zebra Jantan dan Betina

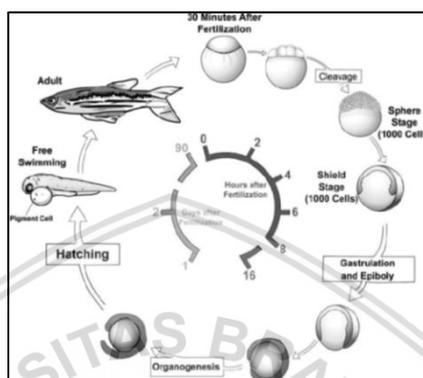
Ikan Zebra Jantan	Ikan Zebra Betina
1. Tubuh berwarna lebih gelap daripada betina	1. Warna tubuh lebih terang dibanding jantan
2. Garis tubuh lebih kontras pada warna kuning atau coklat	2. Ukuran rata-rata ikan zebra betina lebih besar daripada jantan
3. Permukaan pinggang bagian ventral lebih pipih dibanding betina	3. Pada permukaan ventral pinggang tampak lebih bulat karena perkembangan telur di dalam ovarium
4. Warna kuning lebih gelap pada bagian bawah sirip	4. Terdapat warna abu-abu kilat kebiruan pada bagian ventral tubuh
5. Lebih aktif bergerak	5. Kurang aktif bergerak

2.6.2. Siklus Hidup Ikan Zebra

Fertilisasi dapat terjadi apabila minimal terdapat satu ikan jantan di dalam akuarium. Rasio ideal untuk ikan jantan dan betina untuk dapat menghasilkan telur adalah 4 : 6 (Selderslagh, 2010). Ikan betina dapat menghasilkan telur hingga ratusan dalam satu hari dengan interval dua sampai tiga hari. Setelah dibuahi, perkembangan embrio dimulai dan telur yang dibuahi segera menjadi transparan. Tahap embrio ikan zebra adalah 0 – 72 jam pasca fertilisasi / *hour post fertilization* (hpf), tahap larva awal adalah 72 hpf sampai 13 hari pasca fertilisasi / *day post fertilization* (dpf),

pertengahan larva adalah 14 – 29 dpf, remaja 30 dpf, dan ikan zebra dewasa yang matang secara seksual dari usia 3 – 4 bulan (Spencer, 2007).

Siklus hidup ikan zebra dapat diketahui pada Gambar 2.5.



Gambar 2.7 Siklus Hidup Ikan Zebra (D'Costa, 2009)

2.6.3. Perkembangan Embrio Ikan Zebra

Embrio ikan zebra berkembang sangat cepat. Sejak terjadi fertilisasi atau pembuahan secara *in vitro*, telur akan berubah menjadi bentuk zigot dalam waktu 0-45 menit, kemudian embrio akan membelah sejak 45 menit sampai 2 jam hpf dan tahap ini disebut sebagai morula. Dua jam setelah fertilisasi, embrio akan memasuki tahap blastula selanjutnya terjadi fase gastrulasi yaitu pada 5 hpf hingga 10 hpf. Pada 10 hingga 24 hpf berikutnya, terjadi fase segmenta yaitu pembentukan somit, organogenesis primer, pergerakan awal, serta ekor ikan zebra mulai tampak. Selanjutnya, 24 hingga 48 hpf, ikan zebra dalam tahap faringula di mana mulai terbentuk aksis tubuh yang rata, mulai berdenyutnya jantung yang menandakan berjalannya sistem kardiovaskuler, mulai terbentuknya sirip, serta terdapat rangsang sensitivitas taktil. Pada 48 hingga 72 hpf, ikan zebra mengalami morfogenesis yang hampir sempurna serta merupakan tahap terakhir pada

masa embrio. Setelah 72 jam, embrio ikan zebra disebut sebagai larva, mulai aktif berenang dan mampu mencari makanan sendiri (Kimmel, 1995).

Perkembangan sistem saraf pusat ikan zebra berlangsung dimulai pada masa gastrulasi (6 hpf), dasar tubuh ikan zebra telah terbentuk dan sel-sel berkembang menjadi sistem saraf. Selanjutnya pada 10 hpf terbentuk korda spinal. Pada 24 hpf terbentuk tiga bagian otak, yaitu otak depan, tengah dan belakang. Ventrikel otak dan neuron pertama terbentuk pada 48 hpf, ini menyebabkan ikan zebra mulai dapat merespon terhadap stimulus. Pada 2 sampai 3 hari post fertilisasi (dpf), terbentuk neurotransmitter dan secara sempurna sistem saraf terbentuk pada 4 dpf. Area otak yang diyakini sama jika dibandingkan dengan ganglia basalis pada manusia terletak di bagian otak depan ikan zebra, hal ini homolog pada striatum dan hipokampus pada mamalia (Esch, 2012).

Tabel 2.5 Perkembangan Awal Embrio Ikan Zebra

Tahap	Waktu	Keterangan
Periode zigot (1 sel)	0 – $\frac{3}{4}$ jam	Telur yang baru difertilisasi berkembang menjadi zigot, sitoplasma menuju kutub untuk membentuk blastodisk
Periode pembelahan (2 – 64 sel)	$\frac{3}{4}$ - 2 jam	Sel membelah menjadi 2,4,8,16, 32 sampai 64 set
Periode blastula	2 $\frac{1}{4}$ - 5 $\frac{1}{4}$ jam	Embrio memasuki transisi midblastula, pembentukan yolk syncytial layer (YSL) dari epiboly. Diawali dengan terbentuknya kubah dan perubahan blastodisk menjadi blastoderm
Periode gastrula	5 $\frac{1}{4}$ - 10 jam	Epiboly sudah terbentuk secara sempurna, tail bud, aksis embrionik, dan primary germ layer telah terbentuk
Periode segmentasi	10 – 24 jam	Organogenesis awal dimulai. Diawali dengan neuron dan ginjal, telinga mulai nampak, ekor anterior memanjang, terjadi kontraksi miotom spontan.

Periode pharyngula	24 – 48 jam	Aksis tubuh mulai lurus ditandai dengan kepala yang memendek dan mulai lurus. Dimulainya pembentukan sirip. Jantung mulai berdenyut, serta mulai muncul sensitivitas terhadap rangsang taktil
Periode penetasan	48 – 72 jam	Morfogenesis telah sempurna dan terjadi penetasan secara spontan menjadi larva. Mulai aktif berenang dan mulai timbul refleks menghindar pada rangsang taktil.
Periode Larva Berenang Bebas	120 dpf	Pada usia ini larva ikan zebra dapat berenang bebas untuk mengeksplorasi lingkungannya serta mencari makanan.

2.6.4. Aktivitas Motorik Ikan Zebra

Embrio dan larva ikan zebra memiliki pola tahapan yang spesifik terhadap motilitas atau lokomotor. Struktur embrionik ikan zebra telah menuntaskan perkembangan sistem saraf pusat dan otot skeletal pada ikan dewasa. Ikan zebra memiliki setidaknya 20 populasi sel neuron yang berbeda pada otak yang mempersarafi saraf spinal, terletak di bagian batang otak (Granato, 1996).

Pada usia 24 hpf, morfogenesis otak ikan zebra meningkat dan bagian otak terbagi menjadi otak depan termasuk di dalamnya adalah diensefalon dan telensefalon, kemudian *midbrain*, *hindbrain*, dan korda spinal di mana neuron-neuronnya terkoneksi satu sama lain melalui akson. Pada 48 hpf ventrikel otak terbentuk dan embrio ikan zebra mulai merespon terhadap stimulus. Subtipe sel glial, oligodendrosit, sel schwan, dan astrosit ditemukan pada larva ikan zebra berusia 4 dpf oleh sebab itu penilaian aktivitas motorik dapat dilakukan dengan baik sejak usia 4 dpf. Beberapa regio sistem saraf pusat ikan zebra seperti hipotalamus, saluran optik, sistem olfaktori, korda spinalis, dan saraf kranial menunjukkan struktur yang homolog dengan otak manusia. Selain itu, neurotransmitter

pada mamalia seperti GABA, glutamat, dopamin, noradrenalin, serotonin, histamin, dan asetilkolin juga terdapat pada ikan zebra (Esch, 2010).

Sistem dopaminergik (DA) dapat diketahui baik pada embrio maupun pada ikan zebra dewasa. Sebuah penelitian membuktikan bahwa seluruh komplemen sistem aminergik pada ikan dewasa terdapat pada hari ke 4-5 *post fertilization* (dpf) yaitu ketika larva dapat berenang bebas (McLean, 2004). Neuron DA pertama terdeteksi pada 18 hingga 19 hpf di dalam kluster sel pada tuberkulum posterior dari diensefalon ventral. Neuron-neuron ini mewakili sistem DA asenden ke striatum, pada manusia ini homogen dengan sistem nigrostriatal (Flinn, 2008; Reimer, 2013). Penelitian lain menyebutkan bahwa neuron-neuron dopamin (DA) ikan zebra dibentuk di diensefalon dan telensefalon namun tidak dibentuk di mesensefalon. Sebagian besar analisis sistem dopaminergik pada ikan zebra dilakukan berdasarkan deteksi protein *Tyrosine hydroxylase* (TH) yang dimulai pada hari pertama masa perkembangan (Tay, 2011). Meskipun neuron-neuron dopaminergik terhitung kurang dari 1% dari total populasi neuronal di otak, neuron tersebut memiliki efek yang penting pada fisiologi otak. DA mengatur lokomotor, kognisi, dan emosi (Rico, 2010).

Perkembangan terkoordinasi dari batang otak dan neuron-neuron target spinalis merupakan hal penting untuk menghasilkan sistem fungsional lokomotor yang tepat. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa proyeksi dopaminergik desenden dari otak mendukung pembangkitan neuron motor pada interneuron korda spinalis embrio ikan zebra. Penghambatan sinyal esensial ini selama periode awal neurogenesis menyebabkan penurunan jangka panjang jumlah neuron motor dan

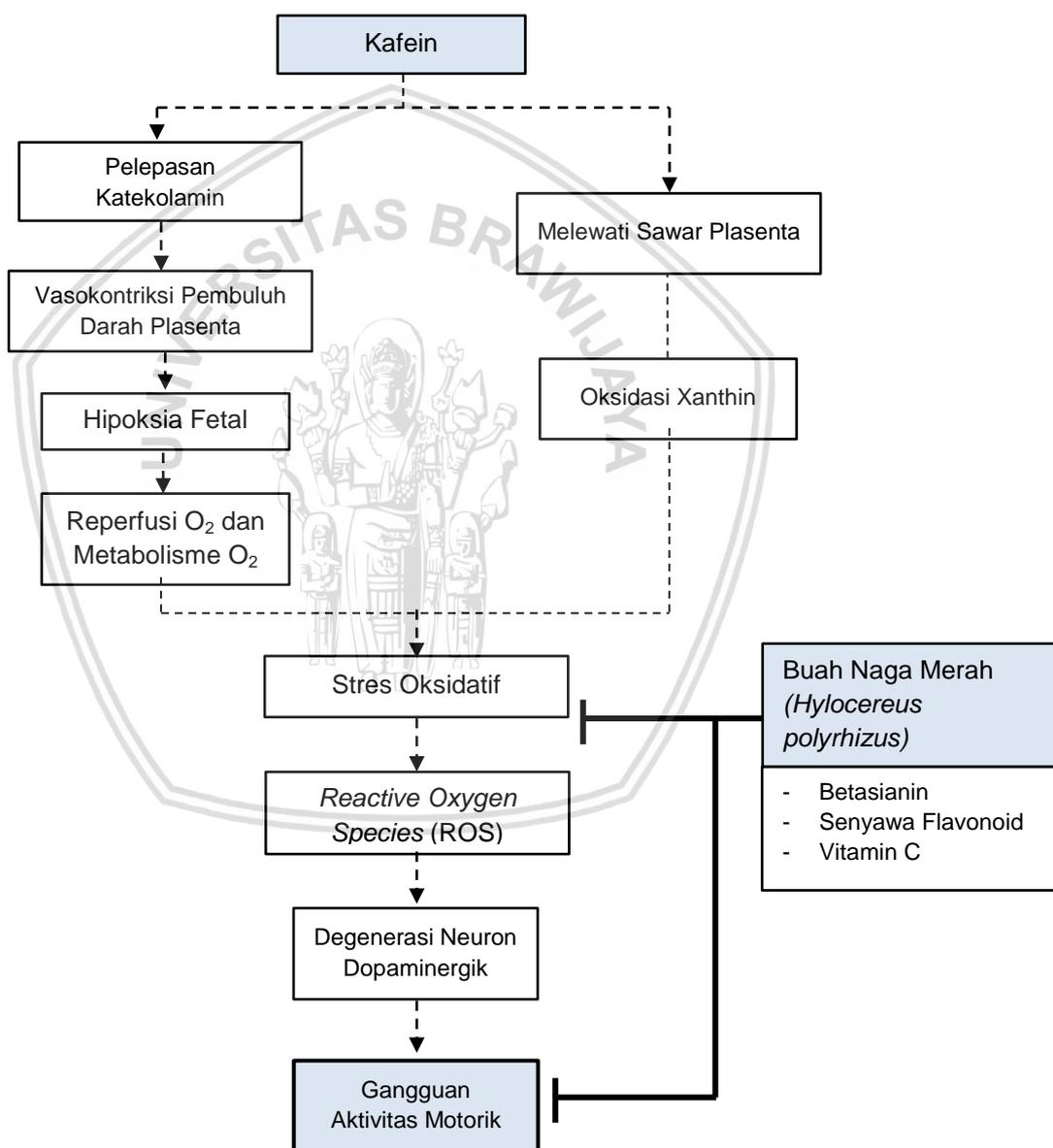
menyebabkan respon motorik yang buruk pada larva yang berenang bebas. Dopamin merupakan faktor yang mempengaruhi neurogenesis pada perkembangan otak serta pada otak dewasa. Penurunan *signaling* dopamin selama masa awal perkembangan menyebabkan gangguan perilaku motorik vital pada masa perkembangan selanjutnya (Reimer, 2013)

Embrio ikan zebra memiliki perilaku motorik yang mudah diamati . sebagian besar kegiatan motorik diatur oleh sumsum tulang belakang dan otak belakang. Perilaku motorik embrio muncul dalam urutan yang diawali dari periode awal yaitu kontraksi melingkar spontan, lalu respon berkedut saat disentuh, dan kemudian kemampuan berenang. Kontraksi melingkar dihasilkan oleh gabungan rangkaian listrik pada neuron-neuron tulang belakang dan bahan kimia glutamatergic serta glycerinergeric mendasari respon terhadap sentuhan dan kemampuan berenang. Kemampuan berenang semakin berkembang pada larva begitu sistem pengaturan neuron serotonergik dan dopaminergik berkembang. Hasil ini menunjukkan banyak kesamaan antara perkembangan motorik pada ikan zebra dengan vertebrata lainnya. Karenanya dapat dijadikan model untuk pebelajaran perkembangan kontrol neuron terhadap gerak vertebrata (De Esch, 2012).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

1.1. Kerangka Konsep



Keterangan:

⊥ : bekerja dengan menghambat

▭ : variabel yang diteliti

Kafein (1-2-3, *trimethylxanthine*) merupakan salah satu senyawa *xanthin* dari golongan purin alkaloid. Salah satu kandungan kafein adalah paraxanthin yang merupakan derivat *xanthin* (Fredholm, 2011). Metabolisme kafein terjadi di hepar dan dimetabolisme ke dalam lebih dari 25 metabolit. Enzim yang berperan dalam metabolisme kafein di antaranya adalah isoenzim sitokrom hepatik P-450 (CYP450) (Echeverri, 2010). Pada kehamilan, fetus, dan neonatus terjadi retensi kafein, di mana waktu paruh metabolisme kafein memanjang. Hal ini dikarenakan adanya defisiensi enzim P-450 pada keadaan-keadaan tersebut (Brent *et al.*, 2011).

Kafein bersifat hidrofobik sehingga memungkinkan untuk melewati seluruh membran sel dan dapat dengan bebas melewati sawar plasenta dan otak (Fredholm *et al.*, 2011). Metabolit kafein diketahui dapat terakumulasi pada otak janin (Brent *et al.*, 2011). Kandungan kafein berupa paraxanthin yang merupakan derivat *xanthin* merupakan salah satu sumber oksidasi yang menyebabkan terproduksinya senyawa radikal bebas atau ROS (Elahi, 2009).

Kafein berkontribusi terhadap peningkatan tekanan darah sistolik dan diastolik seiring dengan meningkatnya pelepasan katekolamin. Kafein dapat menginduksi stres kimiawi pada tubuh karena potensinya yang dapat meningkatkan pelepasan katekolamin (Yang, 2010). Katekolamin berperan penting dalam mengontrol respon vaskuler perifer, diantaranya adalah adrenalin dapat meningkatkan *heart rate* serta adrenalin berperan dalam peningkatan tekanan sistolik dan diastolik. Katekolamin dapat melewati plasenta ke janin (Han, 2011).

Janin membutuhkan gizi serta oksigenasi melalui aliran darah uteroplasenta. Vasokonstriksi pembuluh fetomaternal pada plasenta dapat menurunkan aliran oksigen dan nutrisi yang dibutuhkan oleh janin untuk berkembang sehingga janin mengalami hipoksia. Hipoksia pada jaringan akan menginduksi reperfusi oksigen dan metabolisme oksigen. Metabolisme oksigen yang meningkat akibat adanya hipoksia jaringan akan menyebabkan oksidasi oksigen. Oksidasi oksigen yang di luar batas normal disebut sebagai stres oksidatif (Gupta, 2007). Stres oksidatif dapat menginduksi disfungsi mitokondria, mutasi genetik, serta menyebabkan kematian sel. Kerusakan oksidatif tersebut dimediasi oleh senyawa-senyawa ROS (*reactive oxygen species*) (Choi, 2010).

Dopamin disintesis dari hormon tirosin serta bekerja melalui 4 jalur salah satunya adalah pada bagian substansia nigra. Pada bagian ini, dopamin berkaitan dengan aktivitas motorik (Speed, 2010). Kerusakan pada otak yang terjadi salah satunya adalah kerusakan neuron dopaminergik serta penurunan enzim tirosin hidroksilase (TH) pada bagian substansia nigra (Fan, 2005). Kerusakan akibat stres oksidatif dapat dihentikan dengan suatu senyawa yang disebut antioksidan.

Antioksidan bekerja dengan mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga reaktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat (Sayuti, 2014). Senyawa antioksidan bervariasi contohnya antara lain adalah vitamin C, vitamin E, flavonoid, asam askorvik. Senyawa-senyawa ini banyak ditemukan dalam sayuran dan buah-buahan, salah satunya adalah buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*). Buah naga dikenal sebagai buah yang unik karena bentuk

serta warna daging buahnya. Buah naga mengandung berbagai zat gizi seperti protein, kalsium, fosfor, vitamin B1 dan vitamin C. Buah naga diyakini memiliki aktivitas anti radikal yang tinggi karena kandungan senyawa fenolik di dalamnya. Selain itu, pigmen warna merah pada buah naga yang masuk dalam golongan betasianin dilaporkan memiliki aktivitas sebagai neuroprotektif pada otak mencit yang diinduksi stres oksidatif. Selain itu, pigmen betasianin memiliki aktivitas biologis seperti anti inflamasi, hipolipidemik, hepatoprotektif, dan anti diabetik (Khan, 2016). Betasianin bekerja dengan menghambat oksidasi lipid, protein, dan DNA yang disebabkan oleh ROS sehingga kerusakan sel atau jaringan akibat stres oksidatif dapat berkurang. (Khan, 2016; Cai, 2003)

1.2. Hipotesis Penelitian

1. Buah naga merah (*Hylocerus polyrhizus*) sebagai antioksidan dapat meningkatkan respon taktil pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*) yang diberikan kafein.
2. Buah naga merah (*Hylocerus polyrhizus*) sebagai antioksidan dapat meningkatkan kemampuan berenang pada larva ikan zebra (*Danio rerio*) yang diberikan kafein.

BAB 4

METODE PENELITIAN

2.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) secara *in vitro* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* yaitu rancangan yang digunakan untuk mengukur pengaruh perlakuan terhadap kelompok eksperimen dengan cara membandingkan perlakuan dengan kelompok kontrol.

Penelitian ini membagi sampel dalam enam kelompok perlakuan, yaitu:

1. Kelompok kontrol : sampel tidak diberikan paparan kafein maupun ekstrak buah naga merah.
2. Kelompok kontrol negatif : sampel diberikan kafein dosis 20 mg/L dan tidak diberikan ekstrak buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*)
3. Kelompok kontrol positif : sampel diberikan kafein dosis 20 mg/L dan diberikan antioksidan sederhana (vitamin C) dengan dosis 44 mg/L
4. Kelompok Perlakuan 1 : sampel diberikan kafein dosis 20 mg/L dan diberikan ekstrak buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dosis 1 yaitu 29 mg/L
5. Kelompok Perlakuan 2 : sampel diberikan kafein dosis 20 mg/L dan diberikan ekstrak buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dosis 2 yaitu 58 mg/L
6. Kelompok Perlakuan 3 : sampel diberikan kafein dosis 20 mg/L dan diberikan ekstrak buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dosis 3 yaitu 87 mg/L

2.2. Sampel Penelitian dan Pengulangan

Sampel penelitian adalah embrio ikan zebra. Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *Simple Random Sampling*. Jumlah sampel masing-masing kelompok adalah 20 embrio dengan tiga kali pengulangan. Jumlah tersebut sudah mewakili dan representatif untuk dilakukan penelitian. Perhitungan jumlah sampel minimal menggunakan Rumus Frederer :

$$\begin{aligned}(n - 1) (t - 1) &\geq 15 \\ (n - 1) (6 - 1) &\geq 15 \\ n - 1 &\geq 3 \\ n &\geq 4\end{aligned}$$

keterangan :

n = jumlah sampel; t = jumlah kelompok penelitian

Berdasarkan rumus tersebut didapatkan bahwa jumlah sampel minimal yang dapat digunakan adalah empat embrio ikan zebra. Selanjutnya untuk menilai apakah jumlah tersebut sudah adekuat untuk penelitian ini, digunakan metode Equation (E), sebagai berikut:

$$\begin{aligned}E &= \text{total hewan coba} - \text{total kelompok penelitian} \\ E &= (4 \times 6) - 6 \\ E &= 24 - 6 \\ E &= 18\end{aligned}$$

2.3. Variabel Penelitian

2.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan adalah pemberian kafein dengan konsentrasi tetap yaitu 20 mg/L serta pemberian ekstrak buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dengan konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi 1 (28 mg/L), konsentrasi 2 (58 mg/L), dan konsentrasi 3 (87 mg/L).

2.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas motorik yang diukur dengan respon taktil pada 48 hpf dan kemampuan berenang larva ikan zebra pada 120 hpf.

2.3.3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah umur ikan zebra yang digunakan serta pencahayaan inkubator dan pelaksanaan penilaian respon taktil serta kemampuan berenang.

2.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba dan lokasi penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Budidaya Ikan, Divisi Reproduksi Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli – Agustus 2017.

2.5. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Satuan	Skala	Instrumen
Kafein	Kafein yang digunakan dalam penelitian ini adalah kafein murni dalam bentuk bubuk yang didapat dari Lab. Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.	mg/L	Rasio	Neraca
Ekstrak Buah Naga Merah	Ekstrak buah naga merah adalah daging buah naga merah yang telah melalui proses ekstraksi dan berupa ekstrak murni atau pro analisis. Ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 100%. Buah naga merah didapatkan dari UPT Materia Medika, Batu. Proses pengeringan dan ekstraksi dilakukan di Lab. Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya	mg/L	Rasio	Neraca
Aktivitas Motorik	Aktivitas motorik ikan zebra diukur melalui respon taktil dan kemampuan berenang. Respon taktil embrio diukur pada 48 hpf. Respon berupa pergerakan embrio. Kemampuan berenang larva diukur pada 120 hpf	Kali/menit	Rasio	Mikroskop, stopwatch

atau 5 dpf. Sebelum dilakukan penilaian aktivitas motorik, dilakukan pengamatan malformasi pada larva ikan zebra. Larva dengan kelainan morfologi seperti *curved tail* / *kinked tail* tidak disertakan dalam tes perhitungan motorik

2.6. Bahan dan Alat Penelitian

2.6.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *Zebrafish* (*Danio rerio*) dewasa, medium embrio yang terdiri dari 0,004% CaCl₂, 0,163% MgSO₄, 0,1% NaCl, dan 0,003% KCl dalam aqua destilata, kafein bubuk yang dilarutkan dalam air terdestilasi, ekstrak buah naga merah.

2.6.2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanki / akuarium, incubator, jarum, mikroskop binokular (biner), cawan petri, mikropipet dan tip, kamera.

2.7. Prosedur Penelitian

2.7.1. Pemeliharaan Ikan Zebra

Ikan zebra (*Danio rerio*) diperoleh dari Laboratorium Budidaya Ikan, Divisi Reproduksi Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya. Dilakukan determinasi ikan zebra di LIPI untuk menentukan galur ikan zebra. Pemeliharaan ikan zebra dewasa dilakukan dalam tanki dengan kapasitas 60 L. Suhu air dijaga pada suhu 28,5⁰ C dan pH antara 7,9 – 8,3, kadar oksigen > 95%. Ikan zebra diberi makan sebanyak tiga kali setiap hari pada pagi hari dengan Tetramin dan sore hari dengan makanan ikan atau ulat sutra. Di dalam akuarium diberikan wadah berukuran 26 cm x 20 cm x 12,5 cm dengan diberikan jaring di atasnya agar telur ikan zebra dapat tertampung dan menghindari ikan dewasa yang memangsa telurnya.

Perawatan ikan zebra dilakukan dengan memperhatikan siklus gelap dan terang dengan perbandingan 14 : 10 jam.

2.7.2. Pengambilan Telur

Ikan zebra memproduksi telur setiap pagi (fotoperiodik). Pengambilan telur dilakukan dengan meletakkan keranjang berjala pada tanki ikan zebra dewasa setelah pemberian makan terakhir dan diambil 15-20 menit setelah periode terang dimulai karena fertilisasi terjadi pada saat tersebut. Telur yang diperoleh dipindahkan pada cawan petri dan diisi dengan air. Selanjutnya, telur dibilas menggunakan air kurang lebih sebanyak 5 kali untuk membersihkan dari debris.

2.7.3. Pengamatan Telur Ikan Zebra yang Terfertilisasi

Telur yang telah dibersihkan selanjutnya diletakkan dalam cawan petri kemudian diamati di bawah mikroskop untuk menentukan apakah telur tersebut terfertilisasi atau tidak. Telur yang terfertilisasi menunjukkan pada bagian dalam cangkang terdapat bulatan yang berwarna lebih keruh dari bagian tengahnya. Pengamatan ini dilakukan tidak lebih dari 2 jam. Berikutnya embrio diletakkan pada piring kultur atau cawan petri serta diinkubasi pada suhu 28 ± 0.5 °C. Proses deokorionisasi berlangsung secara alami, yaitu secara normal telur akan menetas pada 72 hpf (Kimmel, 1998). Medium embrio diganti satu kali setiap hari sesuai dengan paparan yang diberikan. Embrio dirawat hingga usia 120 hpf.

2.7.4. Pemberian Kafein

Kafein 1,3,7-trimethylxanthine (pro analisis) diberikan pada 2 hpf hingga 120 hpf. Pada 2 hpf embrio ikan zebra memasuki fase blastula yaitu

ketika sel telah berdiferensiasi menjadi 64-128 sel. Pada fase ini embrio dapat secara jelas dibedakan telah terfertilisasi atau tidak (Kimmel, 1995). Sebelumnya, kafein bubuk dilarutkan dalam air yang terdestilasi dan diencerkan dalam medium embrio dengan dosis 20 mg/L. Kafein dan medium embrio ikan zebra diganti setiap hari. Dosis kafein tersebut berdasarkan hasil penelitian Chen, *et al* (2008), di mana pada dosis tersebut secara signifikan menyebabkan penurunan respon taktil pada 48 hpf. Selain itu, berdasarkan penelitian pendahuluan yang dilakukan sebelumnya, didapatkan bahwa pada kafein dosis 19 mg/L menurunkan respon taktil dan kemampuan berenang.

2.7.5. Pemberian Vitamin C

Vitamin C yang digunakan dalam penelitian ini adalah vitamin C murni yang didapatkan dari Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Dosis vitamin C yang diberikan adalah 44 mg/L. Dosis vitamin C tersebut dibuat berdasarkan penelitian terdahulu oleh Reimer (2006) dimana vitamin C dengan dosis 250 μ M dengan dosis secara signifikan mampu menurunkan toksisitas akibat ROS pada embrio ikan zebra. Vitamin C diberikan bersama dengan kafein pada kelompok kontrol positif di dalam medium embrio mulai dari 2 hpf hingga 120 hpf.

2.7.6. Proses Ekstraksi Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*)

Buah naga merah diperoleh dari UPT Materia Medika. Sebelumnya dilakukan determinasi buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) di UPT Materia Medika untuk memastikan identifikasi buah naga merah sesuai dengan spesies yang diinginkan.

Ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol 100%. Metode maserasi merupakan salah satu jenis ekstraksi dingin yang sesuai untuk mendapatkan senyawa bioaktif yang volatil dalam buah naga merah ini seperti pigmen betasianin dan vitamin C. Disebutkan dalam sebuah studi bahwa kondisi optimum untuk memperoleh betasianin yang tinggi serta kadar vitamin C yang optimal adalah dengan melakukan ekstraksi pada suhu 30-40° C (Pichayajittipong, 2014). Di sisi lain proses ekstraksi panas yang menggunakan suhu lebih dari 90° C seperti soxhlet, dekok, infus, dan destilasi uap dapat merusak senyawa pigmen betasianin, vitamin C, dan senyawa fenol (Saifudin, 2014). (Proses pembuatan ekstrak dimulai dengan mencincang kecil buah naga merah yang telah dicuci kemudian dikeringkan selama 2 – 3 hari dalam oven dengan suhu maksimal 60 derajat celcius. Selanjutnya proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 100%. Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

2.7.7. Pemberian Ekstrak Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*)

Ekstrak buah naga merah diberikan bersama dengan kafein di dalam medium embrio dan diberikan mulai dari 2 hpf sampai 120 hpf. Penentuan dosis buah naga yang diberikan berdasarkan kandungan asam askorbat pada buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) yaitu 2.9 mM/gram ekstrak kering (Rebecca, 2010). Dosis yang diberikan masing-masing kelompok perlakuan adalah 29 mg/L, 58 mg/L, dan 97 mg/L. Dosis tersebut ditentukan berdasarkan konsentrasi plasma vitamin C pada manusia yaitu sebesar 0.6 – 2 mg/dl (Kraemer, 2014).

2.7.8. Penilaian Aktivitas Motorik

Penilaian respon taktil dilakukan pada 48 hpf. Setiap embrio diletakkan pada *object glass*. Respon taktil diukur dengan menghitung embrio yang bergerak di dalam cangkang setelah diberikan rangsangan berupa sentuhan menggunakan *needle* 23G selama 1 menit dengan frekuensi 5 kali dan interval 5 detik. Respon taktil berupa pergerakan ekor dan pergerakan memutar aksis tubuh setelah diberikan rangsang sentuhan. Pengamatan tersebut dilakukan di bawah mikroskop CX-21 dan direkam menggunakan kamera.

Setelah pemaparan berakhir yaitu pada 120 hpf, medium embrio diganti dengan medium tanpa paparan kafein maupun ekstrak buah naga merah. Tes kemampuan berenang dilakukan untuk menilai kemampuan motorik larva ikan zebra yang dilakukan pada 120 hpf karena pada usia ini larva dapat berenang bebas dan mampu mencari makanannya sendiri. Hal ini menunjukkan aktivitas motorik yang matur sehingga dianggap telah mencerminkan sistem saraf pusat pada vertebra (Wolman, 2012). Pada 120 hpf larva dibilas menggunakan air bersih sebanyak 3 kali kemudian diaklimatisasi di lingkungan baru selama 1 jam. Tes dilakukan dengan meletakkan 1 larva pada 1 well-plate berdiameter 3,5 cm berisi air bersih sebanyak 8 mL selanjutnya dilakukan pengamatan selama 1 menit dengan merekam menggunakan kamera.

2.8. Analisa Statistik

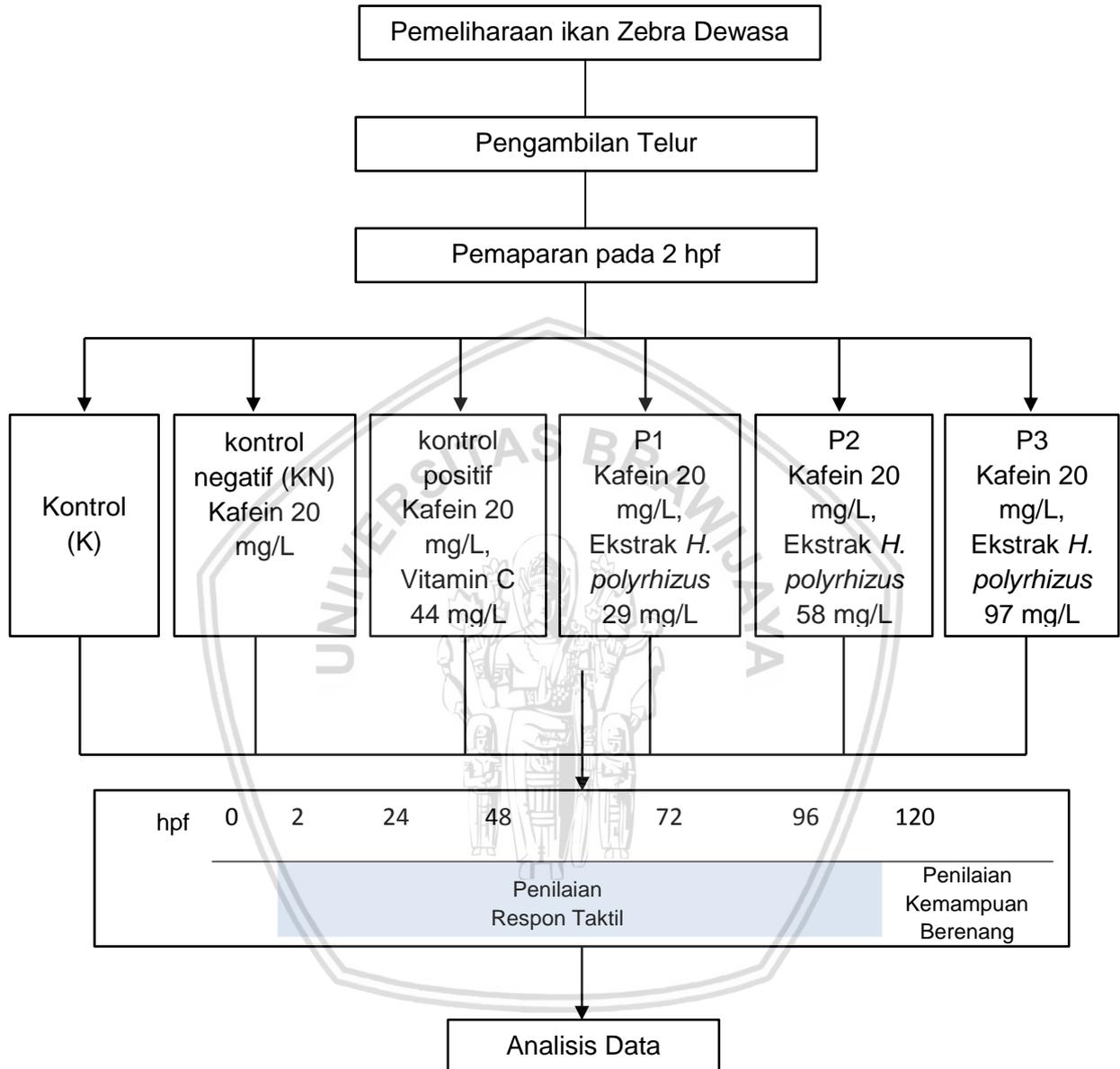
Data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis menggunakan program SPSS 19.0. Pertama, dilakukan uji normalitas dan homogenitas pada seluruh kelompok sebagai syarat atau asumsi uji parametrik

Independent T-Test dan ANOVA. Uji normalitas yang digunakan adalah Uji Kolmogorov Smirnov karena jumlah total sampel yang digunakan lebih dari 50 sampel. Sebaran data dikatakan normal dan homogen dengan *p-value* > 0.05.

Pada kelompok kontrol dan kafein menunjukkan sebaran data normal dan homogen, selanjutnya dilakukan Uji *Independent T-Test* dengan derajat kemaknaan yang digunakan adalah $p > 0.05$ untuk mengetahui perbedaan antara kedua kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif, serta perlakuan 1,2, dan 3 menunjukkan sebaran data yang normal dan homogen, selanjutnya dilakukan uji ANOVA untuk mengetahui perbedaan antar kelompok dengan derajat kebermaknaan yang digunakan adalah $p > 0.05$. Selanjutnya, pada penilaian pengaruh pemberian ekstrak buah naga merah terhadap respon taktil, uji ANOVA menunjukkan nilai signifikan ($p < 0.05$) maka dilanjutkan dengan uji *post hoc* untuk mengetahui letak perbedaan pada setiap kelompok.

Uji korelasi dan regresi dilakukan dengan syarat uji ANOVA menunjukkan nilai yang signifikan. Uji korelasi bertujuan untuk menguji ada atau tidaknya hubungan respon taktil dengan perlakuan serta arah hubungan tersebut sedangkan uji regresi bertujuan untuk mengetahui sejauh mana pengaruh perlakuan terhadap respon taktil setelah diketahui adanya hubungan di antara keduanya.

2.9. Alur Penelitian





BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Pada penelitian ini, dilakukan pengamatan motorik embrio ikan zebra (*Danio rerio*) setelah pemaparan kafein dan ekstrak buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) untuk melihat pengaruh aktivitas radikal bebas akibat pemberian kafein terhadap respon taktil dan kemampuan berenang pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*). Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik pada hewan coba berupa embrio ikan zebra (*Danio rerio*) yang secara acak dibagi ke dalam enam kelompok dengan jumlah sampel untuk masing-masing kelompok adalah 20 embrio serta dengan tiga kali pengulangan pada masing-masing kelompok perlakuan.

Variasi kelompok perlakuan pada penelitian ini antara lain, kelompok kontrol, kontrol negatif (pemberian kafein dosis 20 mg/L), kontrol positif (pemberian vitamin C dosis 44 mg/L), perlakuan 1 (kafein 20 mg/L dan ekstrak buah naga merah 29 mg/L), perlakuan 2 (kafein 20 mg/L dan ekstrak buah naga merah 58 mg/L), dan perlakuan 3 (kafein 20 mg/L dan ekstrak buah naga merah 87 mg/L). Paparan pada masing-masing perlakuan dilakukan sejak 2 hpf. Penilaian respon taktil pada 48 hpf dengan menyentuhkan jarum pada cangkang embrio ikan zebra serta dilakukan di bawah mikroskop Olympus C21 dengan perbesaran 40 kali. Penilaian aktivitas motorik dilakukan pada 120 hpf dengan meletakkan 1 larva ikan zebra dalam satu *well-plate*, penilaian dilakukan selama 1 menit dan dihitung berapa kali larva melewati garis.

Hasil uji normalitas pada data penilaian respon taktil menunjukkan sebaran data yang normal dengan $p\text{-value} > 0.05$, selain itu uji homogenitas menunjukkan variasi data yang homogen dengan $p\text{-value} 0.081$ ($p > 0.05$). Hasil uji normalitas pada data penilaian kemampuan berenang menunjukkan sebaran data yang normal dengan $p\text{-value} > 0.05$ sedangkan hasil uji homogenitas menunjukkan variasi data yang homogen dengan $p\text{-value} 0.213$ ($p > 0.05$). Dengan demikian uji statistik yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan uji parametrik yaitu ANOVA.

5.1. Penilaian Respon Taktil Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*)

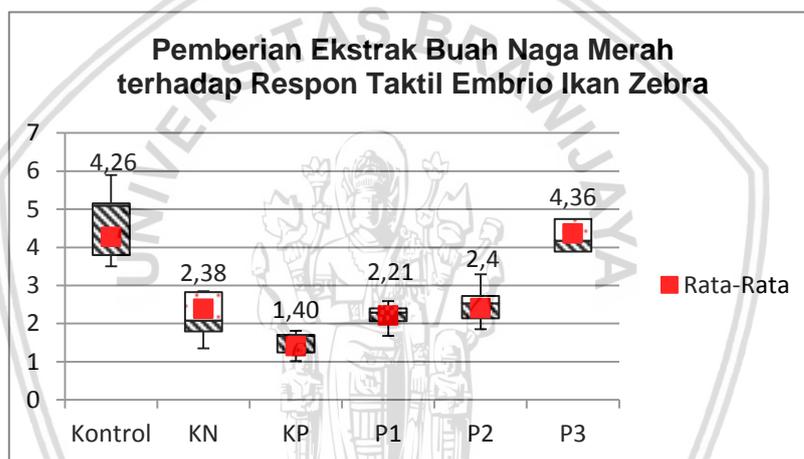
5.1.1. Pengaruh Kafein dan Ekstrak Buah Naga Merah terhadap Respon Taktil Embrio Ikan Zebra

Hasil rata-rata tiga kali pengulangan penilaian respon taktil pada 48 hpf menunjukkan adanya penurunan respon taktil pada kelompok kontrol terhadap kelompok kontrol negatif. Selanjutnya respon taktil menurun pada kelompok perlakuan 1 terhadap kontrol dan kontrol negatif. Respon taktil meningkat pada kelompok perlakuan 2 dan 3 terhadap kelompok kontrol negatif. Namun, respon taktil menurun pada kelompok kontrol positif terhadap kelompok kontrol negatif serta perlakuan 1, 2, dan 3. Rata-rata respon taktil dapat diketahui pada Tabel 5.1 berikut :

Tabel 5.1 Rata-Rata Nilai Respon Taktil pada Kelompok Perlakuan

Kelompok	Pengulangan ke-1	Pengulangan ke-2	Pengulangan ke-3	Rata-Rata
Kontrol	5.07	5.22	2.50	4.26
Kontrol negatif	2.08	3.56	1.50	2.38
Kontrol Positif	1.73	0.80	1.68	1.403
Perlakuan 1	2.50	1.84	2.29	2.21
Perlakuan 2	2.92	1.75	2.53	2.4
Perlakuan 3	4.17	3.60	5.31	4.36

Berdasarkan Tabel 5.1 di atas, terjadi penurunan rata-rata pada kelompok kontrol negatif terhadap kelompok kontrol. Selanjutnya pada kelompok perlakuan 2 dan 3 terjadi peningkatan respon taktil dengan peningkatan tertinggi pada kelompok perlakuan 3. Peningkatan respon taktil pada kelompok perlakuan 3 mendekati respon taktil pada kelompok kontrol. Namun, terjadi penurunan respon taktil pada kelompok kontrol positif dibandingkan dengan kelompok lain. Hasil penilaian respon taktil diketahui melalui Gambar 5.1 berikut:



Gambar 5.1. Grafik penilaian respon taktil pada kelompok pemberian ekstrak buah naga merah. Keterangan: KN merupakan Kontrol Negatif; KP merupakan Kontrol Positif; P1 merupakan Perlakuan 1; P2 merupakan Perlakuan 2; P3 merupakan Perlakuan 3

2.1.2. Analisis Data Pengaruh Ekstrak Buah Naga Merah terhadap Respon Taktil Embrio Ikan Zebra

Berdasarkan tabel 5.1 pada penilaian respon taktil, hasil rerata menunjukkan respon taktil menurun pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan 1 terhadap kelompok kontrol. Di sisi lain, respon taktil meningkat pada kelompok perlakuan 2 dan 3 terhadap kelompok kontrol negatif. Analisis yang dilakukan pada penilaian respon taktil menggunakan uji ANOVA, *post hoc*, korelasi dan regresi. Uji ANOVA dilakukan untuk

mengetahui apakah terdapat perbedaan rata-rata dari seluruh kelompok dengan hasil sebagai berikut:

Tabel 5.2. Hasil Pengujian ANOVA Pengaruh Ekstrak Buah Naga Merah terhadap Respon Taktil Embrio Ikan Zebra

Kelompok	Respon Taktil	
	Mean ± SD	p-value
Kontrol	0.59 ± 0.182	0.000
Kontrol Negatif	0.30 ± 0.285	
Kontrol Positif	0.07 ± 0.291	
Perlakuan 1	0.33 ± 0.127	
Perlakuan 2	0.36 ± 0.153	
Perlakuan 3	0.63 ± 0.111	

Berdasarkan tabel 5.2 di atas, menunjukkan bahwa pada seluruh kelompok yang diuji memiliki pengaruh signifikan terhadap respon taktil embrio ikan zebra dengan *p-value* sebesar 0.000 ($p < 0.05$). Selanjutnya, untuk mengetahui pada kelompok mana letak perbedaan rerata respon taktil antar kelompok, dilakukan uji *post hoc* Tukey sebagai berikut :

Tabel 5.3 Hasil Uji Tukey Respon Taktil pada Berbagai Perlakuan

Perbandingan		Beda Rata-Rata	p-value
Kontrol	Kontrol Negatif	0.291	0.045*
	Kontrol Positif	0.522	0.000*
	Perlakuan 1	0.261	0.093
	Perlakuan 2	0.227	0.192
	Perlakuan 3	-0.378	0.999
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	0.231	0.176
	Perlakuan 1	-0.0300	1.000
	Perlakuan 2	-0.0634	0.986
	Perlakuan 3	-0.3285	0.016*
Kontrol Positif	Perlakuan 1	-0.2616	0.091
	Perlakuan 2	-0.2950	0.040*
	Perlakuan 3	-0.5601	0.000*
Perlakuan 1	Perlakuan 2	-0.0333	0.999
	Perlakuan 3	-0.0298	0.036*
Perlakuan 2	Perlakuan 3	-0.2651	0.084

Tanda (*) menunjukkan nilai yang signifikan dengan CI 0.05

Berdasarkan hasil uji *post hoc* Tukey di atas, respon taktil pada kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol memiliki perbedaan yang signifikan ($p = 0.045$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian kafein secara signifikan menurunkan respon taktil dibandingkan dengan kelompok kontrol. Di sisi lain, penurunan respon taktil pada kelompok kontrol positif dan perlakuan 1 tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol negatif. Selain itu, meskipun terjadi peningkatan respon taktil pada kelompok perlakuan 2 dan 3 terhadap kontrol negatif, hanya pada kelompok perlakuan 3 yang memiliki perbedaan signifikan dengan *p-value* 0.016 ($p < 0.05$). Ini menunjukkan bahwa ekstrak buah naga merah dosis 87 mg/L meningkatkan respon taktil secara signifikan dibandingkan dengan dosis ekstrak lain serta vitamin C.

Uji *post hoc* pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 menunjukkan adanya perbedaan signifikan hanya pada kelompok perlakuan 1 terhadap perlakuan 3 yaitu dengan *p-value* 0.036 ($p < 0.05$) sehingga dikatakan bahwa pemberian ekstrak buah naga merah 87 mg/L secara signifikan meningkatkan respon taktil dibandingkan dengan dosis lainnya.

Hal lain yang perlu diperhatikan adalah respon taktil pada kelompok perlakuan 2 dan 3 memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kontrol positif dengan *p-value* 0.040 dan 0.000 secara berurutan. Respon taktil menurun secara signifikan pada kelompok kontrol positif dibandingkan dengan kontrol ($p = 0.000$). Ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah naga merah 58 dan 87 mg/L secara signifikan dapat meningkatkan respon taktil dibandingkan dengan pemberian vitamin C 44 mg/L.

Selanjutnya, dilakukan uji korelasi untuk menguji ada atau tidaknya hubungan respon taktil dengan perlakuan serta arah hubungan tersebut dan uji regresi untuk mengetahui sejauh mana pengaruh perlakuan terhadap respon taktil setelah diketahui adanya hubungan di antara keduanya. Hasil uji korelasi dan uji regresi dapat diketahui melalui tabel 5.6 berikut:

Tabel 5.4 Hasil Uji Korelasi dan Regresi Ekstrak Buah Naga Merah terhadap Respon Taktil

	Korelasi		Regresi		
	Nilai Korelasi	R-square	Koefisien a	Koefisien b	Signifikansi
Respon Taktil	0.527	0.278	0.151	0.102	0.001

Berdasarkan hasil uji korelasi di atas, menunjukkan adanya hubungan positif yang kuat dengan nilai korelasi sebesar 0.527. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan pemberian dosis ekstrak buah naga akan diikuti oleh peningkatan respon taktil. Sedangkan berdasarkan hasil uji regresi, didapatkan nilai R-square sebesar 0.278 (27.8%) yang berarti bahwa sebesar 27.8% respon taktil embrio ikan zebra pada penelitian ini disebabkan oleh pemaparan ekstrak buah naga, sedangkan sisanya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diteliti seperti suhu medium dan lingkungan sekitar.

Selain itu, pada uji regresi, koefisien a dan b masing-masing menunjukkan nilai sebesar 0.151 dan 0.102, di mana satuan koefisien keduanya tidak menunjukkan perbedaan sehingga dapat diartikan bahwa penambahan nilai paparan ekstrak buah naga tidak diikuti dengan penambahan nilai respon taktil.

5.2. Penilaian Kemampuan Berenang Larva Ikan Zebra

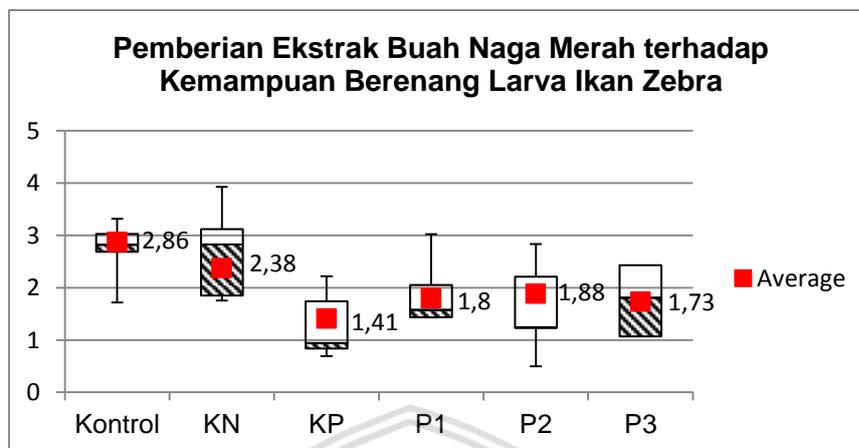
5.2.1. Pengaruh Kafein terhadap Kemampuan Berenang Larva Ikan Zebra

Hasil rata-rata tiga kali pengulangan penilaian kemampuan berenang pada 120 hpf menunjukkan adanya penurunan pada kelompok kafein terhadap kelompok kontrol dengan perbedaan rerata 0,503 kali/menit. Pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 terjadi penurunan terhadap kelompok kontrol dan kelompok kontrol negatif. Penilaian kemampuan berenang pada kelompok kontrol positif lebih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1,2, dan 3. Hasil penilaian kemampuan berenang di setiap pengulangan dapat diketahui pada Tabel 5.5 :

Tabel 5.5 Rata-Rata Kemampuan Berenang Larva Ikan Zebra pada Kelompok Perlakuan

Kelompok	Pengulangan Ke-1	Pengulangan Ke-2	Pengulangan Ke-3	Rata-Rata
Kontrol	2.80	3.24	2.56	2.86
Kontrol negatif	2.85	3.41	0.88	2.38
Kontrol Positif	2.55	0.94	0.74	1.41
Perlakuan 1	1.58	2.53	1.29	1.8
Perlakuan 2	1.23	3.18	1.24	1.883
Perlakuan 3	0.33	3.06	1.81	1.73

Pada penilaian kemampuan berenang terjadi penurunan pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 yaitu 1.8 kali/menit, 1.9 kali/menit, dan 1.73 kali/menit terhadap kelompok kontrol dan kelompok kontrol negatif. Penilaian kemampuan berenang pada kelompok kontrol positif lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif serta perlakuan 1,2, dan 3. Hasil penilaian kemampuan berenang dapat diketahui melalui Gambar 5.2 berikut:



Gambar 5.2. Grafik nilai rata-rata kemampuan berenang larva ikan zebra pada kelompok perlakuan. Keterangan: KN merupakan Kontrol Negatif; KP merupakan Kontrol Positif; P1 merupakan Perlakuan 1; P2 merupakan Perlakuan 2; P3 merupakan Perlakuan 3.

5.2.2. Analisis Data Pengaruh Ekstrak Buah Naga Merah terhadap Kemampuan Berenang Larva Ikan Zebra

Berdasarkan Tabel 5.5, pada penilaian kemampuan berenang meskipun terjadi penurunan kemampuan berenang, penurunan tersebut tidak bermakna ($p= 0.353$). Berdasarkan hasil ini dapat disimpulkan bahwa pemberian kafein berpengaruh signifikan terhadap respon taktil embrio ikan zebra pada 48 hpf namun tidak berpengaruh terhadap kemampuan berenang larva ikan zebra pada 120 hpf. Selanjutnya, untuk mengetahui adanya perbedaan rata-rata kemampuan berenang larva ikan zebra pada seluruh kelompok, dilakukan uji ANOVA dengan hasil sebagai berikut:

Tabel 5.6 Pengaruh Ekstrak Buah Naga Merah terhadap Kemampuan Berenang Larva Ikan Zebra

Kelompok	Kemampuan Berenang	
	Mean \pm SD	p-value
Kontrol	2.84 \pm 1.715	0.353
Kontrol Negatif	2.35 \pm 1.705	
Kontrol Positif	1.33 \pm 1.219	
Perlakuan 1	1.77 \pm 0.951	
Perlakuan 2	1.91 \pm 1.345	
Perlakuan 3	1.77 \pm 1.724	

Dari tabel 5.6 di atas diketahui bahwa perlakuan yang diberikan tidak berpengaruh secara signifikan terhadap kemampuan berenang larva ikan zebra dengan *p-value* sebesar 0.353 ($p > 0.05$). Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah naga merah dosis 29, 58, dan 87 mg/L serta pemberian vitamin C tidak mampu meningkatkan kemampuan berenang larva ikan zebra pada 120 hpf yang dipapar kafein.



BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini menilai pengaruh pemberian ekstrak buah naga merah terhadap aktivitas motorik berupa respon taktil dan kemampuan berenang pada embrio dan larva ikan zebra yang dipapar kafein. Analisis data untuk menilai pengaruh ekstrak buah naga merah terhadap respon taktil dan kemampuan berenang dilakukan dengan uji *One way ANOVA* yang dilanjutkan dengan Post Hoc.

Hasil uji *One way ANOVA* untuk respon taktil menunjukkan perbedaan signifikan dengan *p-value* 0.000 ($p < 0.05$) dan untuk kemampuan berenang menunjukkan nilai yang tidak signifikan dengan *p-value* 0.353 ($p > 0.05$), ini menunjukkan dosis kafein dan dosis ekstrak buah naga mempunyai pengaruh terhadap respon taktil embrio ikan zebra namun tidak mempunyai pengaruh terhadap kemampuan berenang larva ikan zebra. Berdasarkan uji Post Hoc pada variabel respon taktil, didapatkan perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol dengan kelompok kontrol positif (vitamin C 44 mg/L), serta kelompok kontrol negatif (kafein dosis 20 mg/L) dengan kelompok perlakuan 3 (ekstrak buah naga dosis 87 mg/L).

Rasionalisasi penentuan dosis kafein sebesar 20 mg/L berdasarkan nilai rata-rata kafein dalam plasma sebesar 8-10 mg/L (Arnaud, 2011) serta berdasarkan dosis yang biasa dikonsumsi manusia setiap harinya yaitu 5-8 mg/kgBB dalam tiga gelas kopi. Dosis ini setara dengan 50 μM dan apabila dikonversikan, hasilnya mendekati 10 mg/L. Sehingga penentuan dosis yang

digunakan pada penelitian ini berdasarkan dua kali kadar kafein dalam plasma manusia. Selain itu, penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa kafein pada dosis 17,5 mg/L menurunkan aktivitas motorik pada ikan zebra yang dinilai pada 48 hpf secara signifikan dibanding dengan kelompok kontrol (Chen *et al.*, 2008).

Paparan dilakukan sejak pembelahan 32 hingga 64 sel atau pada 2 hpf dengan dekorionisasi alami yang terjadi pada 72 hpf saat embrio menetas menjadi larva (Kimmel, 1995). Cangkang atau korion embrio ikan zebra bersifat aseluler dan terdiri dari kanal-kanal sebagai transport molekul. Seiring perkembangan embrio, struktur korion dan permeabilitas akan berubah. Pada 1 jam pertama korion bersifat lebih padat dan menurunkan permeabilitasnya sedangkan pada tahap blastula dan gastrulasi, stabilitas korion menurun sehingga korion embrio ikan zebra dapat dilewati oleh beberapa molekul tergantung dengan kelarutannya, sifat molekul yang lipofilik, serta ukuran molekul tersebut (Pelka, 2016). Pemberian dosis suatu paparan pada ikan zebra di awal periode kehidupannya yang paling sesuai adalah dengan melarutkan kafein dalam medium embrio karena embrio ikan zebra tidak dapat melakukan administrasi makanan melalui oral hingga mencapai 7 dpf (Chen *et al.*, 2008; Capiotti *et al.*, 2011). Cadangan makanan ikan zebra terdapat dalam *yolk sac* yang ada hingga larva berusia 6-7 hari. Zat-zat sebagai nutrisi bagi embrio masuk ke dalam cangkang melalui proses difusi (Pelka, 2016).

Pelka *et al* (2016) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa ukuran suatu molekul yang dapat melewati membran korion ikan zebra adalah < 4000 Da sedangkan kelarutan suatu molekul untuk dapat melewati korion embrio ikan zebra adalah maksimal 2000 g/mol. Penelitian lain menyebutkan bahwa molekul *fluorescent* dengan ukuran 3 kDa dapat melewati korion embrio ikan zebra

(Colwill dan Creton, 2011). Paparan dalam penelitian ini berupa kafein, memiliki sifat hidrofobik sehingga dapat dengan mudah berdifusi melewati cangkang embrio (Fein *et al.*, 2010). Di sisi lain, vitamin C memiliki memiliki kelarutan sebesar 33 g/100 ml atau kurang lebih 187,4 g/mol (Fei *et al.*, 2010) sehingga vitamin C yang dilarutkan dalam air diduga dapat melewati korion embrio. Flavonoid yang merupakan salah satu senyawa fenol, memiliki gugus hidroksil dan merupakan senyawa polar sehingga dapat larut dalam air. Selain itu polimer flavonoid merupakan polimer sederhana yang dapat melewati membran (Doloksaribu, 2009; Pelka, 2016). Namun demikian, paparan tidak dapat mencapai konsentrasi 100% di dalam telur apabila masih ada korion yang melapisi embrio (Capiotti, 2011).

Estimasi terhadap paparan harian embrio ikan zebra tetap dapat dilakukan menggunakan perhitungan yang sesuai. Jumlah total dosis kafein 20 mg/L dalam 1 ml larutan adalah sekitar 20 µg. Dalam penelitian ini, 20 embrio menerima 20 µg kafein untuk 1 hari, sehingga rata-rata paparan harian untuk setiap embrio adalah 1 µg kafein jika kapasitas absorpsi mencapai 100%. Berat badan untuk setiap embrio ikan zebra adalah sekitar 1.2 mg, jadi paparan harian embrio ikan zebra adalah sekitar 1 µg/1.2 mg atau sekitar 833.3 mg/kgBB (Chen *et al.*, 2008).

6.1. Pengaruh Kafein terhadap Respon Taktil dan Kemampuan Berenang Embrio dan Larva Ikan Zebra

6.1.1. Pengaruh Kafein terhadap Respon Taktil Embrio Ikan Zebra

Pada penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok paparan kafein 20 mg/L pada hasil penilaian rangsang taktil, di mana pada kelompok kafein terjadi penurunan respon taktil terhadap kelompok kontrol secara signifikan. Hal tersebut

diduga terjadi karena kafein menyebabkan stres oksidatif dan menyebabkan kerusakan pada sistem saraf ikan zebra yang akan mempengaruhi respon taktil pada ikan zebra berusia 48 hpf. Kafein merupakan senyawa bioaktif yang memiliki berbagai efek biologis, di antaranya adalah menginduksi respon sel termasuk kematian sel, bersifat sitotoksik, serta menginduksi stres oksidatif (He *et al.*, 2003; Fernandez *et al.*, 2003; Abdelkader *et al.*, 2012).

Pada penelitian sebelumnya, pemberian kafein dosis 19.4 mg/L terbukti meningkatkan kerusakan sel dan apoptosis melalui mekanisme stres oksidatif yang ditandai dengan *up regulating* HSP70 sebagai biomarker molekuler terhadap stres seluler serta peningkatan regulasi dan rasio Bax dan Bcl2 yang mengindikasikan terjadinya apoptosis dan kerusakan DNA (Pavlovic *et al.*, 2006 dalam Abdelkader *et al.*, 2012; Abdelkader *et al.*, 2012). Penelitian ini juga sejalan dengan penelitian lain yang bertujuan mengamati gangguan pergerakan dan neuromuskuler ikan zebra akibat paparan kafein, di mana pada pemberian kafein dengan dosis 17.5 mg/L mampu menurunkan respon taktil ikan zebra pada 48 hpf dibandingkan dengan kelompok kontrol (Chen *et al.*, 2008).

Kafein dapat menyebabkan kerusakan DNA serta menginduksi stres oksidatif di tingkat seluler. Dopaminergik merupakan salah satu komponen terpenting dalam susunan sistem saraf, apabila kerusakan terjadi dalam sistem dopaminergik ini maka akan menyebabkan gangguan pada sistem neuron. Sebuah penelitian menyebutkan bahwa akibat paparan senyawa-senyawa toksin yang berperan dalam apoptosis akan menginduksi hilangnya sel-sel dopamin pada neuron serta menurunkan konsentrasinya

pada jaringan otak. Pada ikan zebra, hal ini akan menyebabkan penurunan kecepatan berenang dan jarak tempuh (Flinn *et al*, 2008).

6.1.2. Pengaruh Kafein terhadap Kemampuan Berenang Larva Ikan Zebra

Pada penilaian kemampuan berenang hasil menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok paparan kafein 20 mg/L. Sebuah penelitian yang dilakukan untuk mengetahui pengaruh kafein dengan dosis 19.4 mg/L terhadap respon stimulus yang diukur pada 7 dpf menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini dapat terjadi karena adanya *up-regulation* target reseptor adenosin secara langsung dan tidak langsung, mengingat kafein merupakan antagonis terhadap reseptor adenosin, yang berkaitan dengan mekanisme kompensasi yang menyebabkan tonus adenosinergik selama fase perkembangan sehingga mempertahankan stimulus dalam rentang normal (Capiotti *et al*, 2011).

Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa pada 24 hpf dan 48 hpf reseptor adenosin A1 dan A2A pada kelompok dipapar kafein tidak menunjukkan peningkatan signifikan. Selanjutnya pada 72 hpf terjadi peningkatan aktivitas secara signifikan yang diikuti hingga 168 hpf (Capiotti *et al*, 2011). Hal ini menunjukkan bahwa pada 2 hari pertama perkembangan embrio ikan zebra, kafein tidak bekerja secara optimal sebagai antagonis reseptor adenosin.

Penelitian lain menyebutkan bahwa pemberian dosis akut kafein yaitu 20 mg/L yang diberikan pada 7 dpf menunjukkan hasil penurunan kemampuan menghindar setelah diberi stimuli. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan saat ini, di mana terjadi penurunan baik

respon taktil pada 48 hpf dan kemampuan berenang pada 120 hpf (Richendrfer, 2012). Disebutkan bahwa pemberian kafein dosis rendah dapat meningkatkan motorik, namun sebaliknya pemberian dengan dosis tinggi justru akan menurunkan aktivitas motorik (Richendrfer, 2012).

Dopamin merupakan salah satu golongan neurotransmitter aminergik atau yang memiliki gugus amin berfungsi memediasi beberapa fungsi otak yang penting. Dopamin meregulasi pergerakan, kognisi, dan emosi (Rico *et al*, 2010). Abnormalitas pada level dopamin tersebut berimplikasi terhadap penyakit-penyakit pada manusia yang berkaitan dengan sistem saraf seperti penyakit Parkinson, sindrom Tourette, dan skizofrenia (Belmaker, 2008 and Murray *et al*, 2008 in Rico, 2010).

Perbedaan atau inkonsistensi hasil di mana pada 48 hpf terjadi penurunan signifikan sedangkan pada 120 hpf penurunan yang terjadi tidak signifikan, dapat dikarenakan adanya perbedaan target sasaran mekanisme kerja kafein pada embrio dan larva, selain itu dapat pula dipengaruhi oleh durasi paparan kafein, serta variabilitas biologis yang dapat menyebabkan terjadinya *false positive* (Selderslaghs, 2013).

6.2. Pengaruh Ekstrak Buah Naga terhadap Respon Taktil Embrio Ikan Zebra

Pada kelompok perlakuan 1 (kafein 20 mg/L + ekstrak buah naga merah 29 mg/L) dan perlakuan 2 (kafein 20 mg/L + ekstrak buah naga merah 59 mg/L) menunjukkan penurunan respon taktil terhadap kelompok kontrol dan kelompok kafein. Hal ini dapat terjadi diduga dikarenakan dosis antioksidan tersebut tidak adekuat untuk bekerja sebagai neuroprotektor. Pada kelompok perlakuan 3 (kafein 20 mg/L + ekstrak buah naga merah 87

mg/L) menunjukkan adanya peningkatan signifikan respon taktil terhadap kelompok kafein. Peningkatan ini menunjukkan nilai yang mendekati dengan nilai respon taktil pada kelompok kontrol sehingga dapat diduga bahwa pada dosis tersebut ekstrak buah naga merah mampu bekerja sebagai antioksidan.

Ekstrak buah naga merah dalam penelitian ini menggunakan pelarut pro analisis dengan metanol 100% sehingga selama proses ekstraksi tidak ada campuran dari bahan lain serta hasil akhir berupa ekstrak kental di mana pada kondisi ini ekstrak tidak lagi mengandung pelarut yang digunakan, yaitu metanol 100% (Widianingsih, 2016).

Buah naga merah telah banyak dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Departemen Agrokultur AS melaporkan bahwa ekstrak buah naga merah dengan pelarut hidroalkohol memiliki kapasitas antioksidan yang tinggi dengan nilai reduksi mencapai 1000 $\mu\text{mol Trolox/g}$, apabila dibandingkan dengan ekstrak *blackberry* (88.57 $\mu\text{mol Trolox/g}$), *strawberry* (32.26 $\mu\text{mol Trolox/g}$), dan anggur merah (22.94 $\mu\text{mol Trolox/g}$). Oleh karena kandungan antioksidannya yang tinggi, buah naga merah dapat bekerja sebagai pencegahan kimiawi kanker, anti-inflamasi, antidiabetik, serta pencegahan penyakit kardiovaskuler (Guimaraes, *et al.*, 2017). Penelitian lain melaporkan bahwa ekstrak metanol daging buah naga merah menunjukkan aktivitas antioksidan dan antiproliferatif yang baik pada sel ca serviks (HeLa) dan memiliki efek sitotoksik pada metastase sel kanker oral (Asmah, 2008).

Buah naga merah mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti betasianin, flavonoid, dan asam askorbat (vitamin C) yang bertindak

sebagai antioksidan. Senyawa antioksidan tersebut bekerja dengan memangsa radikal bebas sehingga dapat menekan produksi senyawa radikal bebas. Fakta ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang bertujuan mengetahui pengaruh betasianin dalam *Portulaca oleracea* terhadap kemampuan kognitif pada mencit, dimana hasil menunjukkan bahwa pada pemberian ekstrak dengan dosis 50 dan 100 mg/kg/BB dapat meningkatkan kemampuan kognitif mencit yang dipapar D-gal (menyebabkan stres oksidatif) dengan membersihkan ROS melalui peningkatan aktivitas kerja SOD, CAT, dan GPx sehingga menurunkan peroksidasi lipid (Wang and Yang, 2010). Dengan demikian, dosis ekstrak buah naga merah sebesar 87 mg/L yang pemberiannya bersamaan dengan kafein diduga bekerja sebagai antioksidan yang menangkal senyawa ROS yang disebabkan oleh kafein.

6.3. Pengaruh Ekstrak Buah Naga terhadap Kemampuan Berenang Larva Ikan Zebra

Pada penilaian kemampuan berenang 120 hpf, ketiga kelompok perlakuan yaitu perlakuan 1 (kafein 20 mg/L + ekstrak 29 mg/L), perlakuan 2 (kafein 20 mg/L + ekstrak 58 mg/L), dan perlakuan 3 (kafein 20 mg/L + ekstrak 87 mg/L) menunjukkan penurunan yang tidak signifikan secara statistik terhadap kelompok paparan kafein. Penurunan terbesar terjadi pada kelompok perlakuan 3. Ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak maka justru akan menurunkan kemampuan berenang larva ikan zebra pada 120 hpf. Selain itu, pemberian dosis ekstrak yang dilakukan secara bersamaan dengan kafein 20 mg/L diduga menyebabkan adanya

interaksi antara kafein dan senyawa di dalam buah naga sehingga memicu penurunan aktivitas motorik.

Penelitian sebelumnya yang menilai kemampuan berenang larva ikan zebra yang dipapar oleh suatu senyawa menunjukkan hubungan yang tidak persisten antara paparan selama masa embrio dan larva. Ini diduga dapat terjadi berkaitan dengan motor neuron sistem saraf (Selderslaghs *et al*, 2013). Namun demikian, untuk memastikannya perlu dilakukan penelitian terhadap sistem motor neuron secara spesifik. Durasi paparan diketahui juga berpengaruh terhadap penilaian aktivitas motorik. Hal ini terjadi karena perbedaan akumulasi senyawa akan menimbulkan perbedaan suatu zat dapat mencapai level toksik (Selderslaghs *et al*, 2013).

Berdasarkan teori, penggunaan antioksidan dengan dosis tinggi dapat bersifat toksin dalam tubuh serta bersifat karsinogenik (Jin *et al.*, 2012). Buah naga merah mengandung flavonoid yang termasuk dalam golongan fenolik. Fenol dapat bertindak sebagai pro oksidan apabila dalam tubuh terdapat sistem yang mengalami proses *redox-active metals*. Logam-logam ini di antaranya adalah Fe dan tembaga (Cu) yang dapat meningkatkan pembentukan ROS dan peroksidasi lipid (Carocho *et al.*, 2012; Valko, 2006). Penelitian lain yang dilakukan pada larva ikan zebra untuk mengetahui aktivitas flavonoid sebagai antioksidan menunjukkan bahwa dosis efektif guna mendapatkan efek antioksidan pada ikan zebra adalah 10 mg/L flavonoid (Shih *et al*, 2012). Hal ini menunjukkan adanya perbedaan dosis di mana pada penelitian ini menggunakan dosis 87 mg/L yang diberikan sejak 2 hpf hingga 120 hpf memungkinkan memberikan efek toksin. Di samping itu, pada penilaian respon taktil, dosis ini diduga

bekerja sebagai antioksidan dan tidak bersifat toksin karena embrio masih dilindungi oleh korion sehingga konsentrasi paparan yang masuk ke tubuh ikan zebra tidak sepenuhnya.

Pada kelompok kontrol positif (Vitamin C dosis 44 mg/L) menunjukkan penurunan baik pada respon taktil 48 hpf maupun pada kemampuan berenang 120 hpf dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok kafein. Hal ini menunjukkan bahwa vitamin C dengan dosis tersebut tidak bekerja sebagai antioksidan. Vitamin C dapat bertindak sebagai pro-oksidan dengan kontribusinya dalam pelepasan ion-ion metal seperti besi dan tembaga dari sel yang rusak. Sehingga ketepatan dosis vitamin C diduga mempengaruhi kerja vitamin C sebagai antioksidan.

Sebuah penelitian menyebutkan bahwa vitamin C dapat meningkatkan laju pertumbuhan serta proliferasi sel pada embrio ikan zebra dengan dosis 200 μ M atau 35,2 mg/L namun tidak menunjukkan aktivitas antioksidan (Francis, 2012). Sejalan dengan penelitian yang dilakukan, vitamin C pada dosis 17,6 mg/L dan 44,03 mg/L tidak memberikan proteksi terhadap edema perikardium pada embrio ikan zebra yang dipapar etanol. Hal ini mendukung dugaan bahwa pada penelitian ini, dosis vitamin C sebesar 44 mg/L tidak cukup untuk bekerja sebagai antioksidan (Reimers, *et al.*, 2006).

Penelitian lain menyebutkan bahwa vitamin C dengan dosis 1,76 g/L memberikan proteksi terhadap stres oksidatif dengan memulihkan aliran darah otak pada embrio ikan zebra yang diinduksi zat toksin TCDD (Teraoka, *et al.*, 2010). Hal ini menunjukkan bahwa diduga pemberian vitamin C dosis 44 mg/L sebagai kontrol positif dalam penelitian ini tidak

cukup untuk bertindak sebagai antioksidan terhadap aktivitas motorik embrio dan larva ikan zebra akibat pemberian kafein. Pada penelitian lain yang dilakukan pada mencit dimana pemberian vitamin C dosis 10 mg/kgBB atau setara dengan 10 mg/L ketika terjadi kerusakan seluler justru meningkatkan kerusakan oksidatif. Sedangkan apabila vitamin C diberikan sebelum terjadinya kerusakan seluler akan menurunkan kerusakan oksidatif (Ahkang, 1998).

Teori lain menyebutkan bahwa dalam teori embriogenesis, tahap pertama embriogenesis terjadi pada lingkungan hipoksik atau anoksik di mana lapisan terluar trofoblas mencegah masuknya aliran darah maternal sehingga level oksigen di dalam uterus rendah. Selanjutnya, dalam keadaan ini akan terjadi aktivasi *Hypoxia-induced factors* (HIFs) di mana akan terjadi ikatan HIF-1 α dan HIF-1 β yang akan menginduksi gen-gen target transkripsi untuk meregulasi homeostasis oksigen seperti eritropoetin (EPO), endotelial vaskuler, VEGF yang berperan dalam angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru, serta metabolisme energi *glucose transporter* 1-3 (GLUT 1-3) (Lopez, *et al.*, 2009; Li, 2012; Semenza, 2012). Pemberian vitamin C sebagai antioksidan dimana menurunkan senyawa ROS dan menghentikan keadaan hipoksia pada embrio diduga akan berpengaruh terhadap aktivasi HIFs sehingga akan menyebabkan gangguan terhadap perkembangan organ-organ khususnya otak. Ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa pemberian vitamin C pada kultur embrio secara signifikan mempengaruhi perkembangan embrio (Wang, 2002).

Pada penilaian aktivitas motorik pada tahap larva memerlukan beberapa perhatian karena pada tahap ini ikan bersifat sangat responsif terhadap lingkungannya dikarenakan telah terjadi dekontaminasi dan lainnya adaptasi untuk mencari makanan sendiri yaitu pada 8 dpf. Penilaian aktivitas motorik berupa kemampuan berenang yang tepat adalah menggunakan metode pengukuran jarak pergerakan (*Distance moved/DM*) karena menunjukkan aktivitas motorik yang sesungguhnya dan secara reliabel dan tepat diukur menggunakan alat ukur otomatis (*Video tracking*) yang terstandarisasi (de Esch *et al.*, 2012). Hal lain yang dapat mempengaruhi aktivitas motorik larva ikan zebra adalah diameter wadah, dan kedalaman (Ingerbreston and Masino, 2013).

Selama proses perkembangan dari tahap embrio hingga dewasa, embrio ikan zebra melalui beberapa tahapan perkembangan perilaku yang dikaitkan dengan sistem neuronal, diantaranya adalah gerakan menggulung ekor secara spontan (*spontaneous tail coilings*) dimulai pada 17 hpf yang diatur oleh korda spinalis; respon terhadap sentuhan pada 24 – 48 hpf yang dikoordinasikan oleh korda spinalis dan otak belakang (*hindbrain*); dan kemampuan berenang pada tahap larva berusia lebih dari 72 hpf yang melibatkan sistem saraf secara fungsional dan sistem muskular (Mc Collum, *et al.*, 2011).

Embrio ikan zebra berusia 24 – 48 hpf menunjukkan perkembangan sistem saraf berupa respon terhadap sentuhan (*Embryonic Touch Response*) yang secara normal menunjukkan aktivitas gerakan singkat dan jelas pada sumbu tubuh sebagai respon terhadap stimulus yang diberikan (Kokel, *et al.*, 2010). Bentuk aktivitas sederhana ini dikontrol oleh sistem neuron dan korda spinal. Pada korda spinal, akson motoneuron primer menginervasi target otot aksial yang akan menghasilkan inisiasi kontraksi otot yang lemah dan spontan

pada embrio ikan zebra (Rafferty, 2014). Selain itu, pada 24 hpf mulai dihasilkannya neurotransmitter pada otak, diantaranya adalah dopamin (Esch, 2012). Drapeau, *et al* (2002) menyebutkan bahwa respon spontan terhadap sentuhan muncul ketika input sinaptik kimiawi (baik dari korda spinal dan dari *hindbrain*) telah terbentuk.

Pada tahap larva ikan zebra berusia 120 hpf atau 5 dpf, larva telah memasuki perkembangan yang lebih kompleks dan sempurna. Sebagian besar sistem tubuh telah matur, diantaranya adalah sistem penglihatan, sistem hepatic, gastrointestinal, kardiovaskular, serta sistem lokomotor. Pada sistem lokomotor, larva berusia 120 hpf memiliki aktivitas pergerakan yang lebih aktif, telah terbentuk sel Schwann, serta melibatkan sistem lain dalam pergerakannya seperti sistem muskuloskeletal (Esch, 2012). Selain itu, kemampuan berenang larva berusia 120 hpf lebih kuat karena pada tahap ini *air bladder* dan sistem sensori lain seperti penglihatan telah fungsional. Kemampuan berenang dimulai ketika sinapsis kimiawi premotor menjadi lebih terintegrasi dengan modulasi serotonergik dan neurotransmitter lain (Drapeau, *et al.*,2002).

Keterbatasan dari penelitian ini antara lain adalah tidak dilakukannya dekontaminasi pada embrio sehingga memungkinkan paparan tidak sepenuhnya masuk ke dalam embrio serta durasi penelitian yang tidak dilanjutkan hingga ikan dewasa. Hal ini mengingat pemberian dosis secara kronik selama tahap embrionik dan larva dapat mengganggu perkembangan otak dan *patterning neural* untuk mengetahui apakah pengaruh tersebut memberikan kecacatan yang permanen pada ikan dewasa.

Keterbatasan lain di antaranya adalah terdapat variabel eksternal yang tidak dikontrol seperti suhu medium embrio. Variabel eksternal berupa suhu medium dapat mempengaruhi pergerakan embrio dan larva ikan zebra. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa untuk mengamati motorik larva ikan zebra

perlu memperhatikan berbagai periode tingkah laku ikan zebra misalnya menghindari, inaktif, aktif-rendah, sangat-aktif, bergerak mendekati dinding (tikmotaksis) dengan durasi kurang lebih 5 menit (Colwill and Creton, 2010). Selain itu penilaian respon taktil pada 48 hpf belum menggunakan alat ukur otomatis. Keterbatasan lain pada penelitian ini adalah sebelumnya tidak dilakukan optimasi dosis vitamin C sehingga dosis vitamin C pada penelitian ini tidak representatif sebagai kontrol positif.



BAB 7

PENUTUP

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Pemberian ekstrak buah naga merah meningkatkan respon taktil embrio ikan zebra pada 48 hpf yang diberikan kafein secara signifikan dengan dosis 87 mg/L.
2. Pemberian ekstrak buah naga merah dapat menurunkan kemampuan berenang larva ikan zebra pada 120 hpf, namun secara statistik tidak signifikan.

7.2. Saran

Berkaitan dengan pengembangan ilmu pengetahuan, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai :

1. Melakukan metode dekontaminasi atau metode mikroinjeksi pada embrio guna memastikan paparan masuk ke dalam tubuh embrio secara optimal.
2. Penelitian lanjutan berkaitan dengan pengaruh ekstrak buah naga terhadap aktivitas motorik yang dilakukan hingga ikan dewasa sehingga dapat mengetahui pengaruh paparan bersifat permanen ataukah sementara.
3. Penelitian dengan pengontrolan faktor eksternal yang lebih baik seperti suhu lingkungan serta pencahayaan serta menggunakan alat ukur

otomatis yang akan memudahkan pengamat serta dapat memberikan hasil yang lebih objektif.

4. Penelitian lanjutan mengenai dosis efektif ekstrak buah naga merah sebagai antioksidan pada keadaan stres oksidatif dengan optimasi dosis vitamin C sebagai kontrol positif sebelumnya.



DAFTAR PUSTAKA

- Abdelkader TS, Chang SN, Kim TH, Song J, Kim DS, Park JH. Exposure time to caffeine affects heartbeat and cell damage-related gene expression of zebrafish *Danio rerio* embryos at early developmental stages. *J Appl Toxicol*. 2013;33(11):1277-1283.
- Agustina, Yulianti RI. 2014. *Gambaran Persepsi Ibu Hamil Tentang Dampak Mengonsumsi Kopi Dalam Kehamilan Di Polindes Idoela Desa Bedoho Kecamatan Soko Kabupaten Ponorogo* (Doctoral dissertation, Universitas Muhammadiyah Ponorogo).
- Ahkang, Soon, Yeon Jin Jang & Hyongsuf' Park. 1998. *In Vivo* Dual Effects of Vitamin C on Paraquat-Induced Lung Damage: Dependence on Released Metals from the Damaged Tissue. *Free Radical Research Journal* Volume 28 – Issue 1.
- Ariffin, Abdul Aziz, et al. Essential fatty acids of pitaya (dragon fruit) seed oil. *Food Chemistry*. 2009. 114: 561 – 564.
- Arnaud, Maurice J. Pharmacokinetics and Metabolism of Natural Methylxanthines in Animal and Man. *Nutrition and Biochemistry*. 2011.
- Babin, P. J. Zebrafish models of human motor neuron diseases: Advantages and limitations. *Progress in Neurobiology*. 2014. 118: 36 – 58.
- Belmaker RH. The future of depression psychopharmacology. *CNS Spectr* 2008;13:682–7.
- Brent RL, Christian ÅMS, Diener RM. Evaluation of the Reproductive and Developmental Risks of Caffeine. 2011;187(January):152–87.
- Cai Y, Sun , Corke. 2003. Antioxidant activity of betalains from plants of The Amaranthaceae. *J Agric Food Chem* 51: 2288 – 94.
- Capiotti KM, Menezes FP, Nazario LR, Pohlmann JB, de Oliveira GMT, Fazenda L, et al. Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol* [Internet]. 2011;33(6):680–5.
- Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*. 2013;51(1):15–25.

- Chen YH, Huang YH, Wen CC, Wang YH, Chen WL, Chen LC, et al. Movement disorder and neuromuscular change in zebrafish embryos after exposure to caffeine. *Neurotoxicol Teratol*. 2008;30(5):440–7.
- Chen, L.W., Yi Wu, Nithya N., Chong, M.F.F., Pan, A., Dam, van R M. Maternal caffeine intake during pregnancy is associated with risk of low birth weight: a systematic review and dose – response meta-analysis. 2014;1–12.
- Chen, Ling-Wei. Et al. 2015. *Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of pregnancy loss: a categorical and dose–response meta-analysis of prospective studies*. Public Health Nutrition : 1-12.
- Choo, Jia Chi, et al. 2016. Medicinal properties of Pitaya: a Review. *Spatula DD*; 6(2): 0-0.
- Colwill RM, Creton R. Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Behav Processes*. 2011;86(2):222–9.
- D’Costa, Allison. Zebrafish Development and Genetics: Introducing Undergraduates to Developmental Biology and Genetics in a Large Introductory Laboratory Class. Department of Biology, Emory University, Georgia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009. 2:5, 259 – 269.
- De Esch C, Slieker R, Wolterbeek A, Woutersen R, de Groot D. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing. A mini review. *Neurotoxicol Teratol*. 2012;34(6):545–53.
- de Esch C, van der Linde H, Slieker R, Willemsen R, Wolterbeek A, Woutersen R, et al. Locomotor activity assay in zebrafish larvae: Influence of age, strain and ethanol. *Neurotoxicol Teratol*. 2012;34(4):425–33.
- Do, Kim Q, Jan H Cabungcal, et al. Redox Dysregulation, Neurodevelopment, and Schizophrenia. *Current Opinion in Neurobiology* . 2009.19: 220- 230.
- Doloksaribu. 2009. Isolasi Senyawa Flavonoid dari Daun Tumbuhan Harimonting, Medan- Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
- Drapeau P, Saint-Amant L, Buss RR, Chong M, McDearmid JR, Brustein E. Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog Neurobiol*. 2002;68(2):85–111.
- Drapeau, Pierre & Saint-Amant, Louis & R Buss, Robert & Chong, Mabel & R McDearmid, Jonathan & Brustein, Edna. (2002). *Development of the locomotor network in zebrafish*. *Progress in neurobiology*.
- Echeverri, Dario; Felix R. Montes. Caffeine’s Vascular Mechanisms of Actions. *International Journal of Vascular Medicine*. 2010.

- Elahi MM, Kong YX, Matata BM. Oxidative Stress as a Mediator of Cardiovascular Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2009;2(5):259–69.
- Fan LW, Lin S, Pang Y, Lei M, Zhang F, Rhodes PG, et al. Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. *Behav Brain Res*. 2005;165(1):80–90.
- Feoli AMP, Macagnan FE, Piovesan CH, Bodanese LC, Siqueira IR. Xanthine oxidase activity is associated with risk factors for cardiovascular disease and inflammatory and oxidative status markers in metabolic syndrome: effects of a single exercise session. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:587083.
- Fernandez MJ, Lopez A, Santa-Maria A. Apoptosis induced by different doses of caffeine on Chinese hamster ovary cells. *J. Appl. Toxicol*. 2003. 23: 221–224.
- Ferre, Sergi. Role of The Central Ascending Neurotransmitter Systems in The Psychostimulant Effects of Caffeine. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010. 20: s35 – s49.
- Fison, G; A. Borgkvist and A Usiello. 2004. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 857 - 872.
- Flinn L, Bretaud S, Lo C, Ingham PW, Bandmann O. Zebrafish as a new animal model for movement disorders. *J Neurochem*. 2008;106(5):1991–7.
- Francis S, Delgoda R, Young R. Effects of embryonic exposure to α -lipoic acid or ascorbic acid on hatching rate and development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquac Res*. 2012;43(5):777–88.
- Fredolm, Bertil B; Karl Battig. 1999. Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. *Pharmacological Reie*. Vol. 51, No. 1.
- Granato, Michael. 1996. Genes Controlling And Mediating Locomotion Behavior Of The Zebrafish Embryo And Larva. *Development* 123: 399 – 413.
- Guo, Min-Fang, Jie-Zhong Yu. 2011. Mechanisms related to neuron injury and death in cerebral hypoxic ischaemia. *Folia Neuropathol*; 49 (2): 79 – 87.
- Gupta, Sajal, et al. 2007. *The Role of Oxidative Stress in Spontaneous Abortion and Recurrent Pregnancy Loss: A Systematic Review*. *Obstetrical and Gynecological Survey* Vol.62 No.5.
- Halim, Samsirun. 2012. Respons Metabolik terhadap Stres. Volume 2 Nomor 4.
- Han, Jin-Yi, Chung Soo Kim, Kyu Hee Lim. 2011. Increases in Blood Pressure and Heart rate induced by Caffeine are Inhibites by Epigallocatechin-3-

- O-Gallate: Involvement of Catecholamines. *Journal of Vascular Pharmacology*.
- Harvey, Friska Indira Wardani. 2009. Trend Produksi Dan Prospek Pengembangan Komoditas Buah Naga Di Kabupaten Jember. *J-SEP* Vol.3 No. 2.
- He Z, Ma WY, Hashimoto T, Bode AM, Yang CS, Dong Z. 2003. Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. *Cancer Res.* 63: 4396–4401. doi:10.1158/0008-5472.2003.063110.003.
- Ingebretson, J. J. and Masino, M. A. (2013) 'Quantification of locomotor activity in larval zebrafish: considerations for the design of high-throughput behavioral studies', *Frontiers in Neural Circuits*, 7(June), pp. 1–9. doi: 10.3389/fncir.2013.00109.
- Isabelle, Mia., Bee Lan Lee, Meng Thiam Lim, Woon-Puay Koh. 2010. Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. *Food Chemistry* 123: 77 – 84.
- Jamilah, B; Shu C.E; Kharidah. 2011. Physico-chemical characteristics of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel. *International Food and Research Journal* 18: 279 – 286.
- Khan, Mohamad Imtiyaj. 2016. Plants Betalains: Safety, Antioxidant Activity, and Bioavailability. *Comprehensive review in food science and food safety*. Vol.15.
- Kimmel, Charles. 1995. Stages of Embryonic Development of The Zebrafish. *Developmental dynamics* 203: 253 – 310.
- Kirkinen, P. 1983. The Effect of Caffeine on Placental and Fetal Blood Flow in Human Pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 147: 939-942.
- Kokel D, Bryan J, Laggner C, White R, J CY, Mateus R, et al. Rapid Behaviour-Based Identification of neuroactive small Molecules in the Zebrafish. *Nat Chem Biol.* 2010;6(3):231–7.
- Konje, Justin C. 2008. Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of fetal growth restriction: a large prospective observational study. *BMJ* : 337
- Kraemer, Carl M. 2014. Vitamin C (Ascorbic Acid). *Drugs and Disease*, MedScape.
- Li, Y, Pablo G, Lubo Z. Fetal Distress and Programming of Hypoxic/Ischemic-Sensitive Phenotype in Neonatal Brain. *Prog Neurobiol.* 2012 ;98(2):145–65.

- Masoud, St. 2015. Increased expression of the dopamine transporter leads to loss of dopamine neurons, oxidative stress and L-DOPA reversible motor deficits. *eurobiol Dis*; 74: 66–75.
- Mccollum CW, Ducharme NA, Bondesson M, Gustafsson JA. Developmental toxicity screening in zebrafish. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev.* 2011;93(2):67–114.
- McCusker, Rachel R, Bruce A Goldberger and Edward J. Cone. 2006. Caffeine Content of Energy Drinks, Carbonated Sodas, and Other Beverages. *Journal of Analytical Toxicology*. Vol.30.
- Monteiro, Joao P., Marco G. Alves, Pedro F. Oliveira, and Branca M. Silva. 2014. Structure-Bioactivity Relationships of Methylxanthines: Trying to Make Sense of All the Promises and the Drawbacks. *Molecules* 21: 974.
- Murray RM, Lappin J, Di Forti M. Schizophrenia: from developmental deviance to dopamine dysregulation. *Eur Neuropsychopharmacol* 2008(Suppl 3):S129–34
- Nehlig, Astrid and Gerrard Debry. 1994. Potential Teratogenic and Neurodevelopmental Consequences of Coffee and Caffeine Exposure: A Review on Human and Animal Data. *Neurotoxicology and Teratology*. Vol. 16 No. 6: 531 – 543.
- Ofluoglu, Ebru; Hatice Pasaoglu. 2009. *The Effects of Caffeine on L-Arginine Metabolism in The Brain of Rats*. *Neurochemical Research* 34: 395 – 339.
- Omidzadeh, Alireza. Et al. 2014. Anti-diabetic activity of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) fruit. *Royal Society of Chemistry* 4,62978–62986.
- Padilla, S. *et al.* (2011) 'Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables', *Neurotoxicology and Teratology*, 33(6), pp. 624–630. doi: 10.1016/j.ntt.2011.08.005.
- Park, Jee Eun. 2016. An in vivo study of the effects of perinatal caffeine exposure on synaptic efficacy in the hippocampus of freely moving adult rats. Department of Biology, Hartford.
- Pavlovic V, Cekic S, Kocic G, Sokolovic D, Zivkovic V. 2006. Effect of monosodium glutamate on apoptosis and bcl-2/bax protein level in rat thymocyte culture. *Physiol. Res.* 56: 616–626.
- Pelka KE, Henn K, Keck A, Sapel B, Braunbeck T. Size does matter – Determination of the critical molecular size for the uptake of chemicals across the chorion of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat Toxicol [Internet]*. 2017;185:1–10.
- Pichayajittipong, P dan Siwatt Thaiudom. Optimum Condition of Beta-Cyanin Colorant Production from Red Dragon Fruit (*Hylocercus polyrhizus*)

Peels using Response Surface Methodology. *CMUJ NS Special Issues on Food and Applied Bioscience*. 2014. Vol. 131(1): 483-490.

Pin-Zhen, Lu., Ching Y.L., Chan, W.H. Caffeine Induces Cell Death via Activation of Apoptotic Signal and Inactivation of Survival Signal in Human Osteoblast. *Int. J. Mol. Sci.* 2008. 9(5), 698-718.

Prado-Lopez S, Conesa A, Armi A, Martinez-Losa M, Escobedo-Lucea C, Gandia C, et al. Hypoxia promotes efficient differentiation of human embryonic stem cells to functional endothelium. *Stem Cells*. 2010;28(3):407–18.

Rafferty TD, Isales GM, Yozzo KL, Volz DC. High-content screening assay for identification of chemicals impacting spontaneous activity in zebrafish embryos. *Environ Sci Technol*. 2014;48(1):804–10.

Ratnasari, Elisa. 2014. *Pengaruh konsumsi kopi Robusta (Coffea canephora) terhadap daya tahan otot diukur dengan one minute sit up test*. (Skripsi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember).

Rebecca, O.P.S. 2010. Potential Natural Dye with Antioxidant Properties from Red Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*). ISHS Acta Horticulture 875.

Reed, Barney and Maggy Jennings. 2010. *Guidance Zebrafish*. Research Animals Department, Science Group, RSPCA.

Reimers MJ, La Du JK, Periera CB, Giovanini J, Tanguay RL. 2006. Ethanol-dependent toxicity in zebrafish is partially attenuated by antioxidants. *Neurotoxicol Teratol*; 28:497–508.

Richendrfer, H. et al. 2012. On The Edge: pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. *Behav Brain Res*. 228(1): 99 – 106.

Rico, E. P. et al. (2011) 'Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets', *Neurotoxicology and Teratology*. Elsevier Inc., 33(6), pp. 608–617. doi: 10.1016/j.ntt.2011.07.007.

Saifudin, Azis. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*. Yogyakarta: Depublish.

Selderslaghs, I. W. T. et al. (2013) 'Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae', *Neurotoxicology and Teratology*. Elsevier Inc., 37(June), pp. 44–56.

Selderslaghs, Ingrid and Jef Hooyberghs. 2010. Locomotor activity in zebrafish embryos: A new method to assess developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology and Teratology* 32: 460–471.

- Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* [Internet]. 2012;148(3):399–408.
- Sengpiel, Verena. Et al. 2013. *Maternal caffeine intake during pregnancy is associated with birth weight but not with gestational length: results from a large prospective observational cohort study*. *BMC Medicine* 11: 42.
- Shih, T. et al. 'An Alternative Synthesis of 3',4'-Diaminoflavones to Evaluate Their Antioxidant Ability and Cell Apoptosis of Zebrafish Larvae'. 2012.pp. 8206–8216.
- Smit, G. How to Mark Zebrafish without Compromising their Behavior. *Behavioral Research Blog by Noldus Information Technology*. 2014.
- Speed, Nicole K. 2010. The Role Of Insulin Signaling On Dopamine Transporter Trafficking. Dissertation- Graduate School of Vanderbilt University.
- Spencer, Jeremy P.E. Flavonoids and Brain Health: Multiple by Common Mechanisms. *Genes Nutrition*. 2009. 4: 243 – 250.
- Takano K, Obata S, Komazaki S, Masumoto M, Oinuma T, Ito Y, et al. Development of Ca²⁺-signaling mechanisms and cell motility in presumptive ectodermal cells during amphibian gastrulation. *Dev Growth Differ*. 2011;53(1):37–47.
- Teraoka, H. et al. Malformation of certain brain blood vessels caused by TCDD activation of Ahr2/Arnt1 signaling in developing zebrafish. *Aqua Toxicol*. 2010. 99(2): 241 – 247.
- Valko, M. et al. 'Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer', *Chemico-Biological Interactions*, 2006. 160(1), pp. 1–40.
- Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil Steril*. 2002;78(6):1272–7.
- Wang, C. Q. and Yang, G. Q. (2010) 'Betacyanins from *Portulaca oleracea* L. ameliorate cognition deficits and attenuate oxidative damage induced by D-galactose in the brains of senescent mice', *Phytomedicine*. Elsevier, 17(7), pp. 527–532. doi: 10.1016/j.phymed.2009.09.006.
- Widianingsih, M. Maceration RO. ANTIOXIDANT ACTIVITY EXTRACT METHANOL OF RED DRAGON FRUIT AND EVAPORATION BY DRY AIR Mastuti Widianingsih. 2016;146–50.
- Winarsi, Hery. 2011. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas* Cetakan ke-5. Yogyakarta : Kanisius.

Wisborg, Kirsten, et al. Maternal consumption of coffee during pregnancy and stillbirth and infant death in first year of life: prospective study. *BMJ* . 2003. volume 326.

Wolman, Marc and Michael Granato. Behavioral genetics in larval zebrafish: Learning from the young. *Developmental and Neurobiology*. 2012.

Wu Li-chen, Hsiu We Hsu. 2006. *Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya*. *Food Chemistry* 95 : 319 – 327.

Yang, Amy and Abraham A. Palmer. Genetics of caffeine consumption and responses to caffeine. *Psychopharmacology*. 2010. 211(3): 245 – 257.

Yeh, Chien-Hung, et al. Caffeine Treatment disturbs the Angiogenesis of Zebrafish Embryos. *Drug and Chemical Toxicology*.2012.35(4): 361 – 365.

