

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT BUAH DELIMA (*Punica granatum* L.) TERHADAP KEJADIAN KURVATURA SPINAL DAN SURVIVAL RATE ZEBRAFISH (*Danio rerio*) YANG DIPAPAR KAFEIN

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

Mochammad Dwiki Rahman Sani

165070100111041

PROGRAM STUDI S1 PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN PERSETUJUAN **Error! Bookmark not defined.**

HALAMAN PENGESAHAN **Error! Bookmark not defined.**

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN **Error! Bookmark not defined.**

KATA PENGANTAR **Error! Bookmark not defined.**

DAFTAR ISI **viii**

DAFTAR GAMBAR **Error! Bookmark not defined.**

DAFTAR TABEL **Error! Bookmark not defined.**

DAFTAR LAMPIRAN **Error! Bookmark not defined.**

DAFTAR SINGKATAN **Error! Bookmark not defined.**

BAB I PENDAHULUAN **Error! Bookmark not defined.**

1.1 Latar Belakang **Error! Bookmark not defined.**

1.2 Rumusan Masalah **Error! Bookmark not defined.**

1.3 Tujuan **Error! Bookmark not defined.**

1.3.1 Tujuan Umum **Error! Bookmark not defined.**

1.3.2 Tujuan Khusus **Error! Bookmark not defined.**

1.4 Manfaat **Error! Bookmark not defined.**

1.4.1 Manfaat Akademik **Error! Bookmark not defined.**

1.4.2 Manfaat Praktis **Error! Bookmark not defined.**

BAB II TINJAUAN PUSTAKA **Error! Bookmark not defined.**

2.1. Kafein **Error! Bookmark not defined.**

2.1.1 Sifat Kimia Kafein **Error! Bookmark not defined.**

2.1.2 Sumber Kafein **Error! Bookmark not defined.**

2.1.3 Metabolisme Kafein **Error! Bookmark not defined.**

2.1.4 Efek Kafein Terhadap Tubuh **Error! Bookmark not defined.**

2.2 Stres Oksidatif **Error! Bookmark not defined.**

2.3 Radikal Bebas **Error! Bookmark not defined.**

2.4 Antioksidan **Error! Bookmark not defined.**

2.5 Buah Delima (*Punica granatum* L.) **Error! Bookmark not defined.**

2.5.1 Taksonomi **Error! Bookmark not defined.**

2.5.2 Kandungan Kulit Buah Delima **Error! Bookmark not defined.**





2.6 Vitamin C **Error! Bookmark not defined.**

2.6.1 Sifat Kimia Vitamin C **Error! Bookmark not defined.**

2.6.2 Farmakokinetik Vitamin C **Error! Bookmark not defined.**

2.6.3 Kemampuan Antioksidan Vitamin C **Error! Bookmark not defined.**

2.7 Zebrafish (*Danio rerio*) **Error! Bookmark not defined.**

2.7.1 Taksonomi Zebrafish (*Danio rerio*) **Error! Bookmark not defined.**

2.7.2 Pertumbuhan dan Perkembangan Embrio **Error! Bookmark not defined.**

2.7.4 Kurvatura Spinal **Error! Bookmark not defined.**

2.7.5 *Survival Rate* **Error! Bookmark not defined.**

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.. **Error! Bookmark not defined.**

3.1 Kerangka Konsep **Error! Bookmark not defined.**

3.2 Hipotesis Penelitian **Error! Bookmark not defined.**

BAB IV METODE PENELITIAN..... **Error! Bookmark not defined.**

4.1 Desain Penelitian **Error! Bookmark not defined.**

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian **Error! Bookmark not defined.**

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian **Error! Bookmark not defined.**

4.4 Variabel Penelitian **Error! Bookmark not defined.**

4.4.1 Variabel Bebas **Error! Bookmark not defined.**

4.4.2 Variabel Terikat **Error! Bookmark not defined.**

4.5 Definisi Operasional **Error! Bookmark not defined.**

4.6 Alat dan Bahan Penelitian **Error! Bookmark not defined.**

4.6.1 Bahan **Error! Bookmark not defined.**

4.6.2 Alat **Error! Bookmark not defined.**

4.7 Prosedur Penelitian **Error! Bookmark not defined.**

4.7.1 Penentuan Konsentrasi Kafein dan Kulit Delima **Error! Bookmark not defined.**

4.7.2 Pemeliharaan Ikan **Error! Bookmark not defined.**

4.7.3 Pengawinan Ikan **Error! Bookmark not defined.**

4.7.4 Pemanenan Telur **Error! Bookmark not defined.**

4.7.5 Pembuatan Medium Embrio **Error! Bookmark not defined.**

4.7.6 Kultur Embrio **Error! Bookmark not defined.**



4.7.7 Pembuatan Dan Pemaparan Kafein. **Error! Bookmark not defined.**

4.7.8 Pemaparan Vitamin C..... **Error! Bookmark not defined.**

4.7.9 Proses Ekstraksi Kulit Buah Delima (*Punica granatum L.*)..... **Error! Bookmark not defined.**

4.7.10 Pemberian Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum L.*) . **Error! Bookmark not defined.**

4.7.11 Pengamatan Kejadian Kurvatura Spinal **Error! Bookmark not defined.**

4.7.12 Pengamatan *Survival Rate*..... **Error! Bookmark not defined.**

4.8 Alur Penelitian **Error! Bookmark not defined.**

4.9 Analisis Statistik **Error! Bookmark not defined.**

BAB V HASIL PENELITIAN **Error! Bookmark not defined.**

5.1 Kurvatura Spinal..... **Error! Bookmark not defined.**

5.1.1 Uji Normalitas & Homogenitas..... **Error! Bookmark not defined.**

5.1.2 Uji Nonparametrik **Error! Bookmark not defined.**

5.1.2.1 Uji *Kruskall-Wallis*..... **Error! Bookmark not defined.**

5.1.2.2 Uji *Mann-Whitney*..... **Error! Bookmark not defined.**

5.2 *Survival Rate* **Error! Bookmark not defined.**

5.2.1 *Survival rate 120 hpf*..... **Error! Bookmark not defined.**

5.2.1.1 Uji Normalitas..... **Error! Bookmark not defined.**

5.2.1.2 Uji Homogenitas..... **Error! Bookmark not defined.**

5.2.1.3 Uji Nonparametrik **Error! Bookmark not defined.**

5.2.1.3.1 Uji *Kruskall-Wallis*..... **Error! Bookmark not defined.**

BAB VI PEMBAHASAN **Error! Bookmark not defined.**

6.1 Kejadian Kurvatura Spinal **Error! Bookmark not defined.**

6.2 *Survival Rate*..... **Error! Bookmark not defined.**

6.3 Keterbatasan Penelitian..... **Error! Bookmark not defined.**

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN **Error! Bookmark not defined.**

7.1 Kesimpulan **Error! Bookmark not defined.**

7.2 Saran..... **Error! Bookmark not defined.**

Daftar Pustaka..... **Error! Bookmark not defined.**

LAMPIRAN **Error! Bookmark not defined.**

ABSTRAK

Sani, Mochammad, Dwiki, Rahman. 2019. **Pengaruh Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum* L.) pada Kurvatura Spinal dan *Survival rate* Zebrafish (*Danio rerio*) yang Dipapar Kafein**. Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Yhusi Karina Riskawati, M.Sc. (2) Aswaty Nur, S.Si, M.Kes.

Kafein (1,3,7-trimethylxantine) dapat menyebabkan kelainan morfologi pada salah satunya adalah kelainan tulang belakang yang dapat mempengaruhi kualitas hidup janin. Kafein adalah zat psikoaktif yang dapat bertindak sebagai radikal bebas yang dapat merusak tubuh pada tingkat sel melalui mekanisme stres oksidatif. Ekstrak kulit buah delima (EKD) diketahui mengandung senyawa antioksidan potensial sekitar 92 persen. Antioksidan akan menghambat proses stres oksidatif. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek ekstrak kulit buah delima terhadap terjadinya kurvatura spinal dan *survival rate* pada larva zebrafish yang terpapar kafein. Embrio zebrafish dibagi menjadi sembilan kelompok yang terdiri dari satu kelompok kontrol, dua kelompok kontrol negatif (Kafein 100 ppm dan EKD 0,70 ppm), satu kelompok kontrol positif (Vitamin C 30 ppm), dan lima kelompok perlakuan yaitu kafein 100 ppm dan EKD 0,14, 0,28, 0,42, 0,56 dan 0,70 ppm. Pemberian EKD mampu menurunkan kejadian kurvatura spinal pada larva zebrafish yang dipapar kafein ($p < 0.05$), tetapi tidak berpengaruh dalam meningkatkan *survival rate* pada larva zebrafish yang dipapar kafein ($p > 0.05$). Ekstrak kulit buah delima dapat digunakan untuk menurunkan kejadian kurvatura spinal pada zebrafish yang dipapar dengan kafein.

Kata kunci: Kafein, Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum* L.), Zebrafish (*Danio rerio*), Kurvatura Spinal, *Survival rate*.

ABSTRACT

Sani, Mochammad, Dwiki, Rahman. 2019. **Effect of Pomegranate Peel Extract (*Punica granatum* L.) on Spinal Curvature and Survival rate in Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed by Caffeine**. Final Assignment, Program Study of Medical, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. Supervisor: (1) dr. Yhusi Karina Riskawati, M.Sc. (2) Aswaty Nur, S.Si, M.Kes.

Caffeine (1,3,7-trimethyl xanthine) can cause morphological abnormalities in one of them is spinal abnormalities that can affect the quality of life of the fetus. Caffeine is a psychoactive substance that can act as a free radical that can damage the body at the cellular level through the mechanism of oxidative stress. Pomegranate peel extract (EKD) is known to contain potent antioxidant compounds of around 92 percent. Antioxidants will inhibit the oxidative stress process. This study aims to prove the effect of pomegranate skin extract on the occurrence of spinal curvature and survival rate in zebrafish larvae exposed to caffeine. Zebrafish embryos were divided into nine groups consisting of one control group, two negative control groups (Caffeine 100 ppm and EKD 0,70 ppm), one positive control group (Vitamin C 30 ppm), and five treatment groups namely caffeine 100 ppm and EKD 0.14, 0.28, 0.42, 0.56 and 0.70 ppm. EKD administration was able to reduce the incidence of spinal curvature in caffeine-exposed zebrafish larvae ($p < 0.05$), but had no effect in increasing the survival rate in caffeine-exposed zebrafish larvae ($p > 0.05$). Pomegranate skin extract can be used to reduce spinal curvature events in zebrafish exposed to caffeine.

Keywords: Caffeine, Pomegranate Peel Extract (*Punica granatum* L.), Zebrafish (*Danio rerio*), Spinal Curvature, Survival Rate.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kelainan bawaan saat masa kehamilan menjadi salah satu penyebab kematian bayi yang dapat dideteksi dan dikoreksi, sehingga asupan nutrisi seorang ibu perlu diperhatikan demi pertumbuhan dan perkembangan janin yang dikandung. Hasil SUPAS menunjukkan Angka Kematian Bayi (AKB) di Indonesia pada tahun 2015, sebesar 22,3 per 1.000 kelahiran hidup. Meskipun sudah mencapai target MDG yaitu sebesar 23 persen, angka tersebut masih dianggap tinggi. Angka kematian bayi dapat digunakan untuk mengukur kualitas pada sektor kesehatan di Indonesia, sehingga perlu dikurangi untuk meningkatkan kualitas kesehatan di Indonesia (Kementerian Kesehatan Republik, 2017). Peningkatan kualitas kesehatan ini dapat dilakukan dengan cara memberikan informasi mengenai pentingnya status gizi ibu karena akan mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan janin (Retni, *et al.*, 2017).

Seluruh asupan ibu pada masa kehamilan memberikan kontribusi besar terhadap pertumbuhan dan perkembangan, sehingga perlu diperhatikan dari segi farmakologi mengenai kandungannya agar tidak menyebabkan adanya malformasi atau deformitas pada tubuh janin. Gangguan pembentukan tulang belakang merupakan salah satu bentuk deformitas pada janin yang dapat mempengaruhi kualitas hidup dari janin.

Pada penderita kelainan tulang belakang akan memiliki keterbatasan ruang

gerak tubuhnya, hal ini berkaitan dengan penurunan kualitas hidup dan tekanan mental yang dialami oleh penderita (Utari, *et al.*, 2018).

Kafein (1,3,7-trimethylxantine) atau $C_8H_{10}N_4O_2$ merupakan senyawa alkaloid yang secara luas dikonsumsi masyarakat dunia sebagai suatu zat psikoaktif. Di alam kafein dapat ditemukan di berbagai jenis tanaman seperti teh, kopi, dan coklat. Kafein sintesis juga dapat ditemukan di berbagai produk yang biasa dikonsumsi masyarakat seperti di dalam makanan, minuman bersoda, minuman berenergi, dan lain-lain. Tanpa disadari dosis kafein di dalam tubuh menumpuk karena banyaknya produk yang sehari-hari dikonsumsi oleh masyarakat mengandung kafein (Temple *et al.*, 2017).

Food and Drug Administration (FDA) Menjelaskan bahwa konsumsi kafein yang aman ialah 200 mg (~200 mg/L) dan 144 mg/hari untuk ibu hamil (Chen, 2008). Kafein terkandung di dalam obat yang digunakan untuk meredakan sakit kepala dengan variasi dosis 65 mg hingga 130 mg dalam setiap tabletnya. Kandungan kafein dalam tubuh akan semakin bertumpuk apabila konsumsi obat tersebut ditambah dengan makanan atau minuman lain seperti soda yang mengandung hingga ~71 mg kafein per botolnya (Lipton *et al.*, 2017).

Kafein merupakan suatu senyawa yang dapat mencetuskan terbentuknya radikal bebas yang memiliki berbagai macam efek pada tubuh, melalui mekanisme stress oksidatif, salah satunya adalah efek teratogenik yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan pada janin. Efek teratogenik kafein dibuktikan pada sebuah penelitian melalui perkembangan mata pada embrio ayam yang terpapar kafein. Pemberian kafein menyebabkan terjadinya microphthalmia dan tulang orbita tumbuh secara abnormal pada embrio ayam (Ma *et al.*, 2014). Kadar kafein pada pembuluh darah vena ibu hamil tidak berbeda dengan kadar kafein pada plasenta janin, hal ini menunjukkan bahwa plasenta tidak punya mekanisme perlindungan terhadap kafein (Wierzejska *et al.*, 2014). Meskipun dalam dosis rendah kafein dapat digunakan sebagai antioksidan, namun dalam dosis tinggi kafein dapat menjadi senyawa prooksidan dan memiliki efek teratogenik jika dipaparkan pada ibu hamil (Souza *et al.*, 2013; 2016).

Paparan kafein pada embrio ayam dapat menyebabkan perubahan ekspresi gen tertentu seperti Pax6 pada retina, HNK-1⁺ pada neural crest. Ekspresi gen tersebut menyebabkan perkembangan mata embrio tidak normal (Ma *et al.*, 2014). Kafein mengandung paraxanthine yang merupakan derivat xanthine yaitu sumber penting dari terjadinya pembentukan radikal bebas (prooksidan yang dapat meningkatkan keadaan stres oksidatif yang dapat menginduksi kerusakan komponen seluler yang bersifat *Irreversible* dan menyebabkan kematian sel melalui jalur apoptosis intrinsik melalui mitokondria, sehingga memicu kerusakan DNA mitokondria, disfungsi, dan peningkatan apoptosis sel (Zalukhu *et al.*,

2016). Kerusakan DNA yang disebabkan oleh paparan teratogen dapat mempengaruhi proses seluler berupa ekspresi gen pada embrio yang berada dalam proses organogenesis (Vinson dan Hales, 2001).

Aktivitas stress oksidatif dapat dihambat oleh senyawa antioksidan alami ataupun sintetis. Antioksidan sintesis turunan asam fenol seperti BHA, BHT, dan PG memiliki efek samping yang cukup membahayakan bagi tubuh yaitu memicu karsinogenesis (Chen *et al.*, 1992). Antioksidan alami yang berasal dari buah dan sayur-sayuran diketahui memiliki kemampuan antioksidan yang tinggi dan efek toksisitas yang jauh lebih rendah dibandingkan dengan antioksidan sintetis (Rohman *et al.*, 2010).

Buah delima merupakan salah satu buah yang terkenal dan dipercaya memberikan beberapa khasiat medis. Pohon delima dapat tumbuh diberbagai macam tanah, sehingga sangat mudah untuk dibudidayakan (Stein, *et al.*, 2015). Buah delima merupakan buah komoditas dengan nilai konsumsi dan ekonomi yang baik namun, proses industri pengolahan buah ini menimbulkan banyak sekali limbah dari buah delima berupa kulit dan biji yang tidak digunakan (Mohamad dan Khalil, 2015). Padahal, Jika dibandingkan dengan dagingnya, kulit buah delima memiliki kandungan antioksidan seperti lebih tinggi (Li *et al.*, 2006).

Kulit buah delima memiliki potensi antioksidan yang sangat tinggi yaitu sebesar 92%, hal ini dikarenakan pada kulit buah delima mengandung banyak zat punicalagin, sedangkan pada daging dan buah mengandung sangat banyak senyawa flavonoid. Buah delima memiliki kemampuan antioksidan yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan buah lain seperti jeruk, anggur, plum, dan nanas. Sifat antioksidan dari buah

delima dimediasi oleh gugus fenol hidroksil dengan ikatan ganda termasuk didalamnya tannin, flavonoid, dan *non-fatty acid* (Nge *et al.*, 2015).

Meskipun kulit buah delima mengandung zat antioksidan, namun kulit buah delima umumnya hanya dibuang dan tidak dimanfaatkan.

Efek pemberian ekstrak kulit buah delima dalam menghambat malformasi pada janin yang disebabkan oleh kafein dapat diteliti menggunakan hewan coba berupa zebrafish (*Danio rerio*). Kejadian kurvatura spinal pada embrio zebrafish dapat dikaitkan dengan kelainan tulang belakang seperti skoliosis pada manusia (Van Gennip, *et al.*, 2018).

Pemberian antioksidan pada masa kehamilan berperan besar, pada masa kehamilan stress oksidatif pada sel berperan penting terhadap proses organogenesis. Pemberian antioksidan pada masa kehamilan sangat berpotensi untuk menurunkan angka kejadian malformasi yang disebabkan oleh proses stress oksidatif (Zhao, 2016).

Embrio zebrafish dalam beberapa penelitian digunakan sebagai model hewan coba untuk meneliti penyakit dan respon terapi obat. Hewan ini cocok digunakan dalam penelitian ini untuk beberapa alasan, pertama ikan ini memiliki kesamaan 70% sekuen DNA dengan manusia, kedua ikan ini memiliki waktu generasi yang cukup pendek yaitu sekitar 3 bulan, ketiga zebrafish juga memiliki rasio fertilisasi yang tinggi sehingga mudah untuk melakukan penelitian dengan metode pengawinan, keempat embrio dari zebrafish bersifat transparan, sehingga mudah untuk mengamati perkembangan embrio, kelima hingga 82% penyakit pada manusia dapat diaplikasikan pada ikan ini, dan yang terakhir hewan ini mudah untuk dirawat serta terjangkau untuk digunakan sebagai hewan coba (Gutiérrez-

Lovera *et al.*, 2017). Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk mengamati potensi antioksidan ekstrak kulit buah delima yang akan dibandingkan dengan Vitamin C sebagai kontrol positif yang berpengaruh terhadap kejadian kurvatura spinal dan *survival rate* larva zebrafish yang dipapar dengan kafein.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dapat dijabarkan berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan sebagai berikut :

1. Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak kulit buah delima terhadap kejadian kurvatura spinal larva zebrafish yang dipapar dengan kafein ?
2. Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak kulit buah delima terhadap *survival rate* larva zebrafish yang dipapar dengan kafein ?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk menganalisis pengaruh pemberian ekstrak kulit buah delima terhadap kejadian kurvatura spinal dan *survival rate* pada larva zebrafish yang dipapar kafein.

1.3.2 Tujuan Khusus

- Menganalisis pengaruh paparan kafein terhadap kejadian kurvatura spinal larva zebrafish pada usia 72 *hpf* dan *survival rate* pada larva zebrafish selama 120 *hpf*.
- Menganalisis pengaruh ekstrak kulit buah delima terhadap kejadian kurvatura spinal larva zebrafish pada usia 72 *hpf* dan *survival rate* larva zebrafish yang dipapar kafein selama 120 *hpf*.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Akademik

1. Memberikan referensi bagi mahasiswa dalam meneliti, menangani hewan coba khususnya zebrafish dan menggunakan bahan alam serta bekerja sama dalam satu tim penelitian serta menulis secara ilmiah.
2. Mengetahui potensi ekstrak kulit buah delima sebagai antioksidan terhadap pengaruh paparan kafein pada perkembangan embrio zebrafish.
3. Hasil penelitian ini dapat menjadi bahan rujukan dasar mengenai potensi penggunaan ekstrak kulit buah delima bagi penelitian selanjutnya yang berkaitan dengan perkembangan embrio dan zat-zat teratogen baik pada zebrafish maupun hewan coba lainnya.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Masyarakat dapat memperoleh informasi secara ilmiah mengenai potensi penggunaan ekstrak kulit buah delima dalam mendukung perkembangan embrio hewan coba.
2. Masyarakat dapat memperoleh informasi ilmiah mengenai pengaruh kafein terhadap perkembangan embrio hewan coba.
3. Masyarakat dapat memperoleh informasi ilmiah tentang potensi kandungan antioksidan ekstrak kulit buah delima dalam mendukung perkembangan embrio hewan coba.

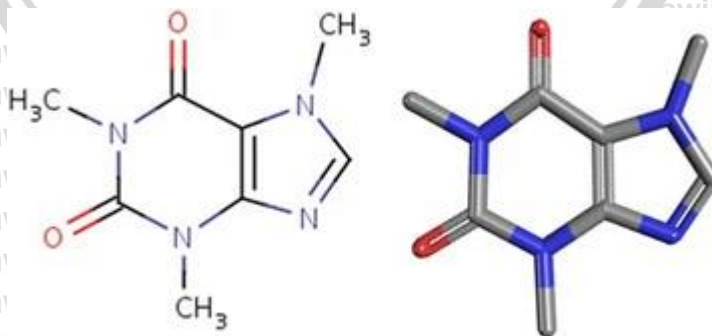
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kafein

2.1.1 Sifat Kimia Kafein

Kafein (1,3,7-Trimethylxanthine) merupakan suatu senyawa golongan metilxanthine dengan struktur kimia $C_8H_{10}N_4O_2$, kafein banyak digunakan sebagai stimulan sistem saraf pusat. Kafein memiliki berbagai efek farmakologis dan fisiologis, yaitu pada sistem kardiovaskular, respirasi, ginjal, dan pada otot polos. Di otak, kafein mempengaruhi suasana hati, ingatan, kesiagaan, dan performa fisik maupun kognitif (Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research, 2002). Secara fisik kafein berbentuk sebagai bubuk berwarna putih dengan rasa pahit tetapi tidak berbau. Kafein mempunyai berat jenis $1,2g/cm^3$ dengan volatilitas 0.5% dan memiliki tekanan uap sebesar 101 kPa pada suhu $178^{\circ}C$. Kafein memiliki pH 6,9 dan memiliki kelarutan dalam air 2,17%. Kafein memiliki titik didih pada suhu $178^{\circ}C$ dan titik leleh pada suhu $238^{\circ}C$. Kafein mengalami sublimasi pada titik didih (Agyemang-yeboah dan Oppong, 2013).



Gambar 2.1. Struktur Kimia Kafein
(Sumber: Lipton *et al.*, 2017)

2.1.2 Sumber Kafein

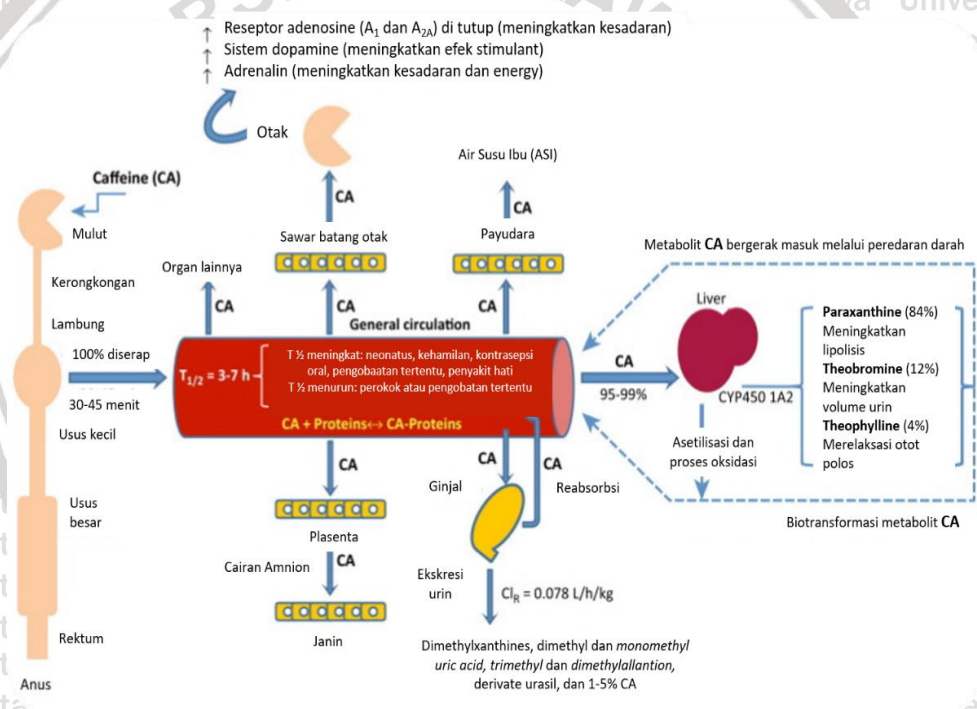
Kafein pada umumnya secara alami terdapat pada daun dan biji dari berbagai tanaman seperti : kopi, teh, dan coklat. Secara sintesis kafein dapat ditemukan di berbagai produk yang biasa dikonsumsi masyarakat seperti di dalam makanan, minuman bersoda, minuman berenergi, dan lain-lain (Temple *et al.*, 2017). Berbagai makanan yang biasa dikonsumsi juga mengandung kafein seperti kue, es krim, dan minuman ringan. Pada minuman berenergi juga mengandung kafein beserta taurine dan D-glucrono- γ -lactone. Selain itu, suplemen makanan yang dipromosikan sebagai penurun berat badan serta peningkatan performa fisik memiliki kandungan kafein dengan kombinasi p-synephrine. Kafein juga terdapat dalam produk kosmetik dan obat-obatan (Mayo Clinic Staff, 2017). Berikut kandungan kafein pada berbagai macam produk :

Tabel 2.1 Kandungan Kafein dalam Beberapa Produk Minuman, Makanan, dan Obat (Mayo Clinic Staff, 2017)

Jenis Produk	Kandungan Kafein (mg)
Jenis Kopi	
Kopi tubruk (237 ml)	95-200
Kopi tubruk, decaffeinated (237 ml)	2-12
Kopi tubruk, instan (237 ml)	75-150
Kopi tubruk, instan, decaffeinated (237 ml)	2-4
Espresso, ala restaurant (30 ml)	47-75
Espresso, ala restaurant, decaffeinated (30 ml)	0-15
Kopi instan (237 ml)	27-173
Kopi instan, decaffeinated (237 ml)	2-12
Kopi khusus (latte atau mocha) (237 ml)	63-175
Jenis Teh (237 ml)	
Teh hitam	14-70
Teh hitam, decaffeinated	0-12
Teh hijau	24-45
Teh instan dingin, dihidangkan dengan air	11-47
Es teh siap minum, dalam botol	5-40
Jenis Soft Drinks (355 ml)	
A&W Root Beer	0
Coca-Cola	23-35
Diet Coke	23-47
Diet Pepsi	27-37
7UP	0
Pepsi	32-39
Sprite, regular, dan diet	0

Minuman Berenergi	
Amp, regular atau <i>sugar-free</i> (237 ml)	71-74
Red Bull, regular atau <i>sugar-free</i> (248 ml)	79-80
Rockstar, regular atau <i>sugar-free</i> (237 ml)	75-80
Obat	
Excedrin Extra Strength 1 tablet	60-65
NoDoz Max Strength 1 tablet	200
Cafergot, Migralam Anouan, Aspir-code, BAC, Darvon, Fiorinal	100
Caffin-TD, Caffedrine	250
Vivarin, Ver	200
Quick-Pep	140-150
Amostat, Anorexin, Appendrine, Nodoz, Wakoz	100
Permen	
Cokelat chips 1 tablet	104
Cokelat hitam dilapisi biji kopi 28 buah	336
Energy mints 2 buah	95-200

2.1.3 Metabolisme Kafein



Gambar 2.2. Metabolisme Kafein Kafein diserap dengan cepat oleh usus halus secara menyeluruh dan diedarkan melalui sirkulasi pembuluh darah. Kafein dimetabolisme di hepar oleh sitokrom p450. Kafein dapat menembus sawar darah plasenta (de Mejia dan Ramirez-Mares, 2014)

Absorpsi kafein pada jalur gastrointestinal bersifat cepat dan total pada manusia, dengan 99% dari dosis yang di konsumsi akan diabsorpsi didalam usus dalam 45 menit. Kafein yang dikonsumsi secara oral dalam jumlah besar diabsorpsi oleh usus halus meskipun 20% telah diteliti



terabsorpsi di lambung. Farmakokinetik tidak terpengaruh dari rute pemberian. Kurva konsentrasi kafein yang diadministrasi secara oral maupun intravena bersifat *superimposable*, sehingga tidak didapatkan efek *first-pass* metabolisme oleh hepar. Kadar kafein dalam plasma setelah 48 jam dengan *loading dose* yang dibagi menjadi empat administrasi gastrointestinal pada 12 jam interval adalah diantara 11 dan 20 mg/L. (Arnaud, 1993).

Kadar kafein pada pembuluh darah ibu yang hamil sama dengan kadar kafein yang ada di dalam plasenta janin, hal ini membuktikan bahwa plasenta tidak memiliki mekanisme perlindungan terhadap kafein (Wierzejska *et al.*, 2014).

Konsentrasi puncak kafein dalam plasma tercapai dalam 15 hingga 120 menit. Setelah administrasi oral, dan untuk dosis 5-8 mg/L nilai rata-rata plasmanya adalah 8-10 mg/L. Fraksi dari kafein secara *reversible* berikatan dengan protein plasma bervariasi dari 10% hingga 30% (Arnaud, 1993).

Kafein dimetabolisme di hati oleh sistem enzim sitokrom P450 oksidase (lebih spesifik dikenal isozim (1A2/CYP1A2) menjadi tiga produk metabolik dimethylxanthines, yang masing-masing memiliki efek sendiri pada tubuh (Monteiro *et al.*, 2016). Yaitu :

- Paraxanthine (84%): memiliki efek lipolisis, yang menyebabkan peningkatan gliserol dan kadar asam lemak bebas dalam plasma Darah (Monteiro *et al.*, 2016).
- Teofilin (4%): merangsang sistem saraf pusat, bersifat diuretik dan digunakan untuk melemaskan otot polos pada saluran pernapasan serta

digunakan untuk pengobatan asma. Dosis terapi teofilin lebih besar diperoleh dari metabolisme kafein (Monteiro *et al.*, 2016).

- Theobromine (12%): mendilatasi pembuluh darah dan merangsang sistem saraf pusat namun lebih lemah dibandingkan dengan theofilin (Monteiro *et al.*, 2016).

Dalam keadaan normal, terdapat empat mekanisme kafein pada aktifitas seluler yaitu: antagonis terhadap reseptor adenosine, menghambat fosfodiesterase, modulasi reseptor GABA, dan regulasi kalsium intraseluler (Monteiro *et al.*, 2016).

Mekanisme utama kafein adalah dengan menghambat reseptor adenosine secara kompetitif pada tingkat sel. Hambatan ini meningkatkan hormon seperti norepinefrin, dopamin dan serotonin (Monteiro *et al.*, 2016). Kafein (methylxanthines) mampu menghambat keempat tipe dari reseptor adenosine (A1, A2A, A2B dan A3), tapi sebagian besar kerja kafein dimediasi dengan menghambat reseptor adenosine tipe A1 and A2A (Monteiro *et al.*, 2016). Sedangkan teofilin dan paraxanthine memiliki daya afinitas yang tinggi terhadap reseptor A1, A2A, dan A2B namun merupakan antagonis yang lemah bagi reseptor subtype A3. Theobromine memiliki afinitas yang lebih rendah dibandingkan dengan methylxanthine pada reseptor A1 dan A2 (Monteiro *et al.*, 2016).

Kafein bersifat kompetitif tidak selektif reversibel untuk menghambat enzim fosfodiesterase, terutama pada fosfodiesterase-4 (PDE4). Hal ini dapat mencegah degradasi siklus cAMP adenosine dan meningkatkan konsentrasi cAMP sebagai komponen yang penting pada respon seluler terhadap hormon dan neurotransmitter (Monteiro *et al.*, 2016). Hambatan

terhadap enzim fosfodiesterase oleh teofilin dapat menimbulkan dilatasi bronkus yang kemudian digunakan untuk mengobati asma. Efek kafein dalam menghambat modulasi terhadap reseptor GABA berpengaruh terhadap transportasi ion pada otak. Pelepasan kalsium intraselular melalui aktivasi reseptor ryanodine yang terdapat pada retikulum endoplasma (Monteiro *et al.*, 2016).

Kafein merupakan senyawa derivan xanthine yang dalam tubuh juga akan mengalami metabolisme oleh enzim Xanthin Oksidase di hepar. Kafein maupun bentuk metabolitnya yaitu paraxanthine, theofillin, theobromine akan di oksidasi oleh enzim xanthine oksidase menjadi asam urat yang kemudian akan di ekskresikan keluar tubuh oleh ginjal. Aktivitas enzimatik dari xanthine oksidase diketahui dapat menghasilkan radikal bebas yaitu radikal superoksida yang sangat reaktif dalam memicu proses rantai reaksi stress oksidatif (Yamaoka-Yano dan Mazzafera, 1999).

2.1.4 Efek Kafein Terhadap Tubuh

Kafein memiliki efek farmakologis dan biologis yang luas. Kafein memiliki beberapa keuntungan bagi tubuh yakni dapat membantu seseorang untuk tetap terjaga, menjadi lebih fokus, produktif, dan dapat mengatasi stres (Rogers *et al.*, 2008).

Kafein merupakan senyawa yang berikatan dengan reseptor adenosine dan reseptor ryanodine yang terdapat banyak pada sistem saraf dan sistem kardiovaskular yang memiliki peran dalam regulasi pelepasan kalsium intaselular, peredaran darah koronaria, dan angiogenesis (Yeh *et al.*, 2012). Penekanan terhadap reseptor adenosine juga dapat menyebabkan peningkatan sekresi katekolamin: adrenalin, dopamin dan serotonin.

Peningkatan hormon-hormon tersebut dapat meningkatkan tekanan darah dan juga menyebabkan vasokonstriksi pembuluh darah (Temple, 2009).

Kafein dapat bersifat sebagai vasodilator pembuluh darah jika berikatan dengan reseptor ryanodine. Hal tersebut disebabkan karena ikatan kafein dengan reseptor ryanodine dapat menginduksi pelepasan nitrat oksida (NO) yang disintesis di retikulum endothelium pembuluh darah. Nitrat oksida merupakan mediator yang paling penting disintesis oleh sel endotel, yang merupakan vasodilator, antiplatelet, antiproliferatif, penurun permeabilitas, antiinflamasi, dan antioksidan (Umemura *et al.*, 2006). Namun, pada penelitian yang dilakukan oleh Umemura *et al.*, (2006). efek kafein sebagai vasodilator dihambat sepenuhnya oleh L-NMMA yang merupakan inhibitor dari sintesis nitrat oksida.

Batas konsumsi kafein yang aman menurut FDA adalah sebanyak 200 mg (~200 mg/L), dan dosis aman untuk ibu hamil adalah sebanyak 144 mg/hari (Chen *et al.*, 2008).

2.2 Stres Oksidatif

Stres oksidatif didefinisikan sebagai kondisi dimana proses oksidasi di dalam tubuh melebihi proses antioksidasi dan bersifat sekunder terhadap hilangnya keseimbangan diantara kedua proses tersebut. Selain menyebabkan berbagai kejadian yang berbahaya seperti peroksidasi lemak dan merusak DNA secara oksidatif, stress oksidasi juga dapat menyebabkan fenomena adaptasi fisiologi dan regulasi dari sinyal transduksi intracelluler. (Yoshikawa dan Naito, 2002). Stress oksidatif pada umumnya disebabkan oleh radikal bebas. Radikal bebas didefinisikan sebagai suatu molekul zat kimia yang bersifat reaktif karena memiliki elektron tidak berpasangan pada orbital

terluarnya sehingga zat tersebut akan mudah berikatan dengan molekul disekitarnya, seperti protein lipid, karbohidrat dan asam nukleat (Zalukhu et al., 2016).

Molekul *Reactive-Oxygen Species* (ROS) digunakan untuk mendeskripsikan sejumlah molekul yang bersifat reaktif dan radikal bebas yang berasal dari molekul oksigen. Produksi dari radikal yang berasal dari oksigen merupakan asal dari seluruh spesies aerobik. Molekul tersebut, diproduksi sebagai produk lain yang dihasilkan pada saat terjadinya transpor elektron pada respirasi aerobik atau dengan enzim oksidoreduktase dan oksidasi pada logam yang terkatalisir, memiliki potensi untuk menyebabkan hal yang membahayakan bagi tubuh (Held, 2012).

Pada awalnya hanya sel fagosit yang bertanggungjawab untuk produksi ROS sebagaimana peran mereka dalam mekanisme perlindungan sel. Dalam penelitian terbaru didemonstrasikan bahwa ROS mempunyai peran dalam sinyalisasi sel, termasuk didalamnya apoptosis, ekspresi gen, dan aktivasi dari kaskade sinyal sel. Dapat disimpulkan bahwa ROS dapat berperan sebagai *messenger* intraseluler maupun ekstraseluler (Held, 2012).

Stress oksidatif dapat mempengaruhi proses osteogenesis pada embrio dengan merubah proses dari *bone remodelling* yang disebabkan oleh ketidakseimbangan antara aktifitas osteoclast dan osteoblast. Stress oksidatif menyebabkan diferensiasi dari pre-osteoclast pada osteoclast dan meningkatkan proses resorpsi. Stress oksidatif yang disebabkan oleh ROS juga dapat menginduksi proses apoptosis dari osteoblast dan osteosit. Osteoblast dan Osteoclast memegang peran penting dalam proses osteogenesis maupun chondrogenesis, kelainan dalam aktivitas osteoclast dan osteoblast

menyebabkan terjadinya kelainan pembentukan tulang, salah satunya adalah pembentukan tulang belakang (Domazetovic, 2017). Pembentukan tulang tidak hanya diperankan oleh aktivitas osteoblast dan osteoclast, namun komponen vascular juga memegang peranan penting dalam proses osteogenesis, komponen osteoblast-osteoclast bekerja secara bersamaan dengan komponen vascular dalam proses osteogenesis (Grosso *et al.*, 2017).

Stress oksidatif dapat mempengaruhi angiogenesis melalui dua jalur yaitu HIF-VEGF2/VEGFR2 dan VEGF-Independent. ROS. Gangguan terhadap dua jalur tersebut akan menyebabkan kelainan dari proses angiogenesis (Kim dan Byzova, 2014).

Stress oksidatif berperan dalam pembentukan sistim saraf pusat. Jaringan saraf dari janin sangat rentan untuk mengalami jejas yang disebabkan oleh zat prooksidan, hal ini disebabkan membran dari jaringan otak mengandung sangat banyak *polyunsaturated fatty acid side chain* yang sangat mudah untuk teroksidasi (Laforgia *et al.*, 2018). Stress oksidatif dapat merusak ekspresi gen Shh dengan meaktivasi protein kinase A (PKA) saat proses perkembangan dari *neural tube*. Kerusakan DNA yang disebabkan oleh stress oksidasi akan mengganggu pertumbuhan dan perkembangan dari *neural tube* (Laforgia *et al.*, 2018). Kerusakan yang berlebihan akan menyebabkan sel pada *neural tube* untuk mengalami apoptosis dalam jumlah besar. Apoptosis yang berlebihan ini dapat menyebabkan *neural tube defect* (NTD) dengan mengganggu proses *folding* dan *fusion* dari neural tube (Laforgia *et al.*, 2018).

2.3 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan suatu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbit luarnya

sehingga sangat reaktif mencari pasangan dengan cara menyerang dan mengikat elektron di sekitarnya. Apabila senyawa yang berikatan dengan senyawa radikal bebas tersebut merupakan senyawa kovalen seperti lipid, protein, polisakarida, dan DNA, maka akan menjadi berbahaya. Semakin besar molekul yang mengalami kerusakan, semakin parah akibatnya. Kerusakan sel akan berdampak negatif pada struktur dan fungsi sel tersebut (Winarsi, *et al.*, 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. Proses peroksidasi lipid pada membrane sel dapat menghasilkan produk yaitu *Malondialdehyde* (MDA), senyawa yang bersifat mutagen, dan toksik terhadap komponen sel. Reaktivitas radikal bebas dapat dihambat melalui tiga cara, yaitu pertama, mencegah atau menghambat pembentukan radikal bebas baru, kedua dengan menginaktivasi atau menangkap radikal dan memotong propagasi (pemutusan rantai), serta yang ketiga yakni memperbaiki (*repair*) kerusakan akibat radikal (Winarsi, *et al.*, 2011).

2.4 Antioksidan

Terdapat dua grup utama dari antioksidan yang terdapat pada sel hidup yaitu antioksidan enzimatis dan antioksidan nonenzimatis. Kedua grup antioksidan tersebut dibagi lagi menjadi beberapa subgrup. Antioksidan

enzimatik dibagi menjadi perlindungan enzimatis primer dan sekunder.

Perlindungan primer terdiri dari tiga enzim penting yang menghambat pembentukan dan menetralkan radikal bebas, yaitu : pertama glutathione peroxidase, yang mendonasikan dua elektron untuk menghasilkan peroksida dengan membentuk senyawa dan juga mengeliminasi peroksida sebagai zat yang berpotensi memicu reaksi fenton, kedua katalase, yaitu mengubah hydrogen peroksida menjadi air dan oksigen molekular, dan merupakan antioksidan yang paling penting dan efisien yang dikenali pada saat ini. Hanya satu molekul katalase dapat mengubah enam milyar molekul hydrogen peroksida, ketiga superoksida dismutase, yang mengubah superoksida anion menjadi hydrogen peroksida sebagai zat yang penting untuk aksi sekunder dari katalase. Perlindungan enzimatis sekunder meliputi glutathione reductase dan glukosa-6-fosfat dehydrogenase. *Glutathione reductase* mereduksi *glutathione* yang teroksidasi menjadi bentuk tidak tereduksi, dengan proses ini sehingga dapat menetralkan lebih banyak proses oksidasi. Glukosa-6-fosfat menghasilkan NADPH yang menciptakan lingkungan tereduksi. Kelompok antioksidan nonenzimatik dibagi menjadi beberapa subgrup, yang utama yaitu : vitamin, kofaktor enzim, mineral, peptide, asam fenol, dan senyawa nitrogen (Shebis *et al.*, 2013)

2.5 Buah Delima (*Punica granatum* L.)

2.5.1 Taksonomi



Gambar 2.3 Buah Delima (*Punica granatum* L.)
(Sumber : Rajeswari, 2016)

Berikut adalah klasifikasi buah delima berdasarkan USDA (diakses Desember, 2019):

Kingdom	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta – tumbuhan berpembuluh
Superdivision	Spermatophyta – tumbuhan berbiji
Divisi	Magnoliophyta – tumbuhan berbunga
Kelas	Magnoliopsida – Dikotiledon
Subkelas	Rosidae
Ordo	Myrtales
Famili	Punicaceae –Famili Pomegranate
Genus	<i>Punica</i> L. – pomegranate
Spesies	<i>Punica granatum</i> L. – pomegranate

2.5.2 Kandungan Kulit Buah Delima

Bagian buah delima yang dapat dimakan, baik salut biji ataupun daging buah, umumnya mengandung kadar gula yang tinggi, serat (termasuk pektin, dan berbagai asam organik. Buah delima mengandung asam fenol yang berguna sebagai antioksidan berupa anthocyanins, asam ellagic dan ellagitannins, asam gallic dan gallotannins, flavanolol, dan proanthocyanidins. Senyawa asam fenol merupakan hasil metabolit sekunder dari tanaman yang umumnya ditemukan pada sayuran dan buah-buahan termasuk didalamnya buah delima (Mena *et al.*, 2011).

Tabel 2.2 Perbandingan Sifat Antioksidan antara Ekstrak Kulit dan Daging Buah Delima (Li. *et al.*, 2006)

Ekstrak	Hasil (%)	Fenol (mg/g)	Flavonoid (mg/g)	Proanthocyanidins (mg.g)	Asam Askorbat (mg/g)	Air (%)
Pulp	14.5 ± 1.7	24.4 ± 2.7	17.2 ± 3.3	5.3 ± 0.7	0.85 ± 0.02	10.9 ± 1.1
Kulit	31.5 ± 3.0	249.4 ± 17.2	59.1 ± 4.8	10.9 ± 0.5	0.99 ± 0.02	8.0 ± 0.8

Kandungan ekstrak kulit buah delima memiliki sifat antioksidan hingga sepuluh kali lipat lebih tinggi jika dibandingkan dengan ekstrak daging buahnya (Li *et al.*, 2006).

Aktivitas antioksidan pada kulit buah delima dua kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas antioksidan buah delima secara keseluruhan. Zat yang berperan penting dalam aktivitas antioksidan kulit buah delima adalah zat tannin yang terhidrolisa. Zat tannin ini bertanggung jawab hingga 92% terhadap aktivitas antioksidan dari buah delima secara keseluruhan. Zat tannin terhidrolisa tersebut adalah, punicalagin, asam ellagic, asam gallagic, dan punicalin (Tzulker *et al.*, 2007).

Guo *et al.*, (2003) dalam penelitiannya membuktikan sifat antioksidan dari berbagai produk buah delima berupa daging, kulit, dan biji, dengan

membandingkan dengan 28 jenis antioksidan dalam buah pada tabel 2.2 yang sering dikonsumsi di China dengan menggunakan penilaian FRAP (*Ferric Reducing Anti-oxidant Power*). Dengan hasil sebagai berikut :

Tabel 2.3 Aktivitas Antioksidan pada 28 Jenis Buah-Buahan (Guo *et al.*, 2003).

Buah	Pulp	Kulit	Biji
Howthorn Berry	13.42 ± 0.74	29.25 ± 1.50	0.43 ± 0.03
Angco (Kurma China)	6.98 ± 0.29	16.69 ± 0.55	1.77 ± 0.13
Jambu	6.07 ± 0.69	10.24 ± 0.24	4.71 ± 0.13
Kiwi	4.38 ± 0.20	11.13 ± 0.23	-
Mulberry	4.11 ± 0.25	-	-
Strawberi	3.29 ± 0.30	-	-
Delima	3.10 ± 0.12	82.11 ± 4.01	0.72 ± 0.05
Lukan Tangerine	2.29 ± 0.13	6.94 ± 0.40	1.15 ± 0.02
Madu Tangerine	2.19 ± 0.08	5.44 ± 0.88	-
Jeruk	1.89 ± 0.19	5.69 ± 0.26	-
Lemon	1.43 ± 0.07	2.30 ± 0.12	0.91 ± 0.07
Ceri	0.99 ± 0.21	2.82 ± 0.29	0.77 ± 0.12
Kelengkeng	0.94 ± 0.05	3.98 ± 0.30	24.26 ± 2.79
Pisang	0.80 ± 0.05	3.24 ± 0.39	0.84 ± 0.09
Nanas	0.80 ± 0.08	2.01 ± 0.03	-
Pisang Manggis	0.73 ± 0.11	3.16 ± 0.16	-
Leci	0.71 ± 0.01	8.09 ± 0.55	0.65 ± 0.06
Kumquat	0.59 ± 0.11	2.86 ± 0.12	22.36 ± 0.97
Anggur	0.50 ± 0.05	0.25 ± 0.05	0.66 ± 0.03
Pomelo	0.49 ± 0.04	11.02 ± 1.83	55.54 ± 1.62
Mangga	0.39 ± 0.03	1.84 ± 0.04	-
Peach	0.38 ± 0.08	10.13 ± 0.37	14.59 ± 0.55
Aprikot	0.38 ± 0.03	0.95 ± 0.08	1.17 ± 0.03
Melon	0.34 ± 0.07	0.79 ± 0.07	0.72 ± 0.09
Pear	0.24 ± 0.06	0.52 ± 0.07	0.31 ± 0.13
Jingxin	0.22 ± 0.03	0.89 ± 0.08	2.06 ± 0.09
Persimon	0.16 ± 0.01	0.42 ± 0.11	10.1 ± 0.07
	0.14 ± 0.03	0.62 ± 0.01	1.48 ± 0.08



2.6 Vitamin C

2.6.1 Sifat Kimia Vitamin C

Vitamin C (Asam Askorbat) merupakan suatu karbohidrat dengan berat molekul rendah dengan struktur enediol dapat ditemukan di berbagai tempat serta di alam Vitamin C merupakan pendonor elektron yang larut dalam air. Vitamin C berperan sebagai reduktan dengan cara mendonasikan satu elektron bebas ke suatu substrat jika Vitamin C teroksidasi menjadi radikal ascorbyl, suatu radikal bebas yang relatif stabil. Dua molekul radikal bebas ascorbyl dapat mengalami dismutase menjadi satu molekul ascorbate dan satu molekul dehydroascorbic acid (Lykkesfeldt, *et al.*, 2014).

2.6.2 Farmakokinetik Vitamin C

Ascorbate merupakan bentuk utama dari Vitamin C di dalam tubuh manusia. Molekul ini bersifat sebagai *co-substrate* untuk beberapa enzim yang penting untuk menjalankan fungsi dari suatu organisme. Vitamin C berperan sebagai antioksidan dengan cara berikatan dengan radikal bebas untuk menjadi bentuk oksidannya secara reversibel yaitu *ascorbyl* radikal kemudian menjadi *dehydroascorbate* (DHA). Molekul *ascorbate* dapat teroksidasi di jalur gastrointestinal dengan keberadaan zat lain yang bersifat sebagai prooksidan (Figuerola-Méndez dan Rivas-Arancibia, 2015).

Dalam tubuh, transportasi Vitamin C menuju sel diperantarai oleh adanya dua jenis *sodium-dependent Vitamin C transporters* (SVCT1 dan SVCT2). Kedua transporter ini adalah suatu molekul glikoprotein yang berfungsi untuk mentransportasikan molekul ascorbate kedalam sel.

Transporter SVCT1 banyak ditemukan terutama pada jaringan epithelial,

sedangkan SVCT2 banyak ditemukan di otak, otot skeletal, plasenta, dan mata dimana kontribusi ascorbate dikontrol secara ketat untuk mempertahankan konsentrasinya didalam jaringan (Figuroa-Méndez dan Rivas-Arancibia, 2015)

Terdapat 14 jenis *Glucose Transporters* (GLUT) yang merupakan suatu protein yang berfungsi untuk mentraspor glukosa kedalam dan keluar sel. Diantara 14 grup GLUT telah ditemukan bahwa hanya GLUT1, GLUT3 dan sedikit GLUT4 yang memiliki kapasitas untuk mentransportasikan DHA. Masing masing dari transporter memiliki karakteristik dan distribusi jaringan yang spesifik. Protein GLUT1 terdistribusi secara luas didalam tubuh, keberadaan GLUT1 di sel endotel dari *blood-brain barrier* dapat berkontribusi terhadap keseimbangan ascorbate di jaringan otak. Protein GLUT3 merupakan transporter dengan afinitas tinggi yang awalnya hanya diketahui terdapat pada sel neuron, tetapi saat ini juga ditemukan di sperma, embrio, dan leukosit. Protein GLUT4 terdapat paling banyak di jaringan adiposa, otot skeletal, dan otot jantung (Figuroa-Méndez dan Rivas-Arancibia, 2015).

Ascorbate dan DHA dapat masuk enterosit melalui transporter SVCT maupun GLUT. Pola absorpsi *ascorbate* berlawanan dari glukosa. *Ascorbate* lebih baik di absorpsi pada segmen distal ileum dari usus halus, dan dalam jumlah kecil di absorpsi pada segmen proksimal dari duodenum. DHA banyak di absorpsi di jejunum dan dalam jumlah kecil di absorpsi pada segmen distal ileum (Figuroa-Méndez and Rivas-Arancibia, 2015).

Untuk mencegah berkurangnya konsentrasi askorbat dan berbagai molekul antioksidan seperti *glutathione*. Sel memiliki mekanisme daur ulang

yang terbentuk dari antioksidan eksogen dan endogen. Radikal *ascorbyl* merupakan molekul yang relatif stabil. Rendahnya reaktivitas dari radikal *ascorbyl* berkaitan dengan adanya elektron bebas dari rantai karbon ke-satu dan ke-tiga untuk saling beresonansi tanpa adanya interaksi dengan molekul oksigen. Dua molekul radikal *ascorbyl* dapat bereaksi satu sama lain melalui reaksi dismutase. Satu molekul radikal *ascorbyl* akan di reduksi menjadi *ascorbate* dan satu molekul lainnya akan dioksidasi menjadi DHA (Figueroa-Méndez and Rivas-Arancibia, 2015).

Vitamin C dalam bentuk metabolit maupun bentuk molekul utuh dieksresikan melalui ginjal, dan dalam jumlah kecil dieksresikan melalui feses. Ekskresi Vitamin C dalam urin bersifat *dose dependent*, semakin tinggi dosis Vitamin C yang dikonsumsi maka konsentrasi Vitamin C di dalam darah dan jaringan akan meningkat. Kadar Vitamin C yang tinggi akan meningkatkan ekskresi oleh ginjal dan kulit (Yussif, 2018).

2.6.3 Kemampuan Antioksidan Vitamin C

Vitamin C memiliki kemampuan antioksidan. Vitamin C merupakan elektron donor yang larut dalam air. Kemampuan antioksidan vitamin sudah terbukti di banyak penelitian secara *in vitro*. Vitamin C bekerja sebagai antioksidan melawan reaksi stress oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas dengan berikatan dengan elektron bebas pada radikal bebas (Padayatty *et al.*, 2003).

2.7 Zebrafish (*Danio rerio*)

2.7.1 Taksonomi Zebrafish (*Danio rerio*)



Gambar 2.4 Zebrafish (*Danio rerio*) (Sumber : Holtzman *et al.*, 2016)

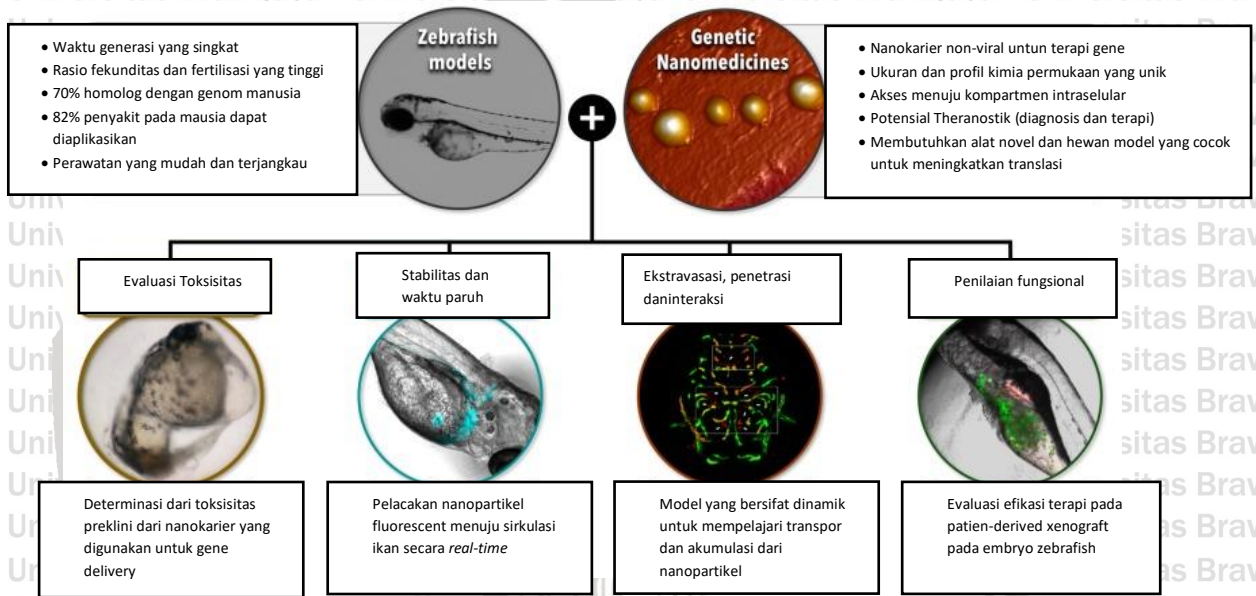
Berikut taksonomi zebrafish menurut ITIS diakses Desember, 2019:

- Kingdom [Animalia](#)
- Subkingdom [Bilateria](#)
- Infrakingdom [Deuterostomia](#)
- Filum [Chordata](#)
- Subfilum [Vertebrata](#)
- Infrafilum [Gnathostomata](#)
- Superkelas [Actinopterygii](#)
- Kelas [Teleostei](#)
- Superordo [Ostariophysii](#)
- Ordo [Cypriniformes](#)
- Superfamili [Cyprinoidea](#)
- Famili [Cyprinidae](#)
- Genus [Danio](#) Hamilton, 1822

Spesies *Danio rerio* (Hamilton, 1822) – zebra danio

Zebrafish memiliki berbagai kelebihan sehingga dapat dijadikan sebagai subjek penelitian. Kelebihan yang dimiliki oleh hewan ini sebagai

subjek penelitian karena memiliki kesamaan sekuen DNA sebesar 70% pada manusia, dan sebanyak 82% penyakit pada manusia dapat diaplikasikan pada hewan ini. Keuntungan lainnya adalah embrio bersifat transparan, dan memiliki rasio fertilitas yang tinggi (Gutiérrez-Lovera *et al.*, 2017).



Gambar 2.5 Kelebihan Zebrafish (*Danio rerio*) sebagai hewan coba. Beberapa kelebihan zebrafish yang dapat digunakan sebagai hewan coba, seperti waktu generasi yang singkat, rasio fekunditas yang tinggi, kesamaan genom 70% dengan manusia, 82% penyakit dapat diaplikasikan ke manusia serta perawatan yang mudah dan terjangkau (Gutiérrez-Lovera *et al.*, 2017).

Secara morfologis, zebrafish memiliki panjang tubuh <40 mm ukuran panjang standar atau *Standard Length* (SL) yakni dari ujung hidung sampai dengan daerah tulang kaudal. Ikan ini memiliki bentuk torpedo dengan tubuh ramping, dengan mulut terminal oblique yang langsung melengkung ke atas. Rahang bawah lebih menonjol dibandingkan rahang atas dan letak mata berada di tengah dan tidak terlihat dari atas.

Perbedaan spesies didasarkan pada garis lateral yang tidak lengkap pada dasar tulang pelvis, dua pasang barbel, dan lima hingga tujuh garis

longitudinal berwarna biru tua dari belakang operkulum hingga sirip kaudal.

Sirip anal biasanya bergaris sama, sedangkan sirip bagian dorsal mempunyai garis dengan tepi berwarna biru tua, dibatasi dengan putih.

Pola warna tersebut didasarkan pada tiga tipe pigmen yang berbeda, yakni melanofor biru tua, xanthofor emas, dan iridofor (Spence *et al.*, 2008).

Zebrafish jantan dan betina mempunyai warna yang sama, walaupun ikan jantan mempunyai sirip yang lebih besar dengan pewarnaan warna kuning.

Pengidentifikasi jenis kelamin akan susah ditegakkan tanpa menggunakan diseksi atau pembedahan, kemudian pada ikan betina gravid biasanya mempunyai bentuk tubuh yang lebih bulat, dan paling mudah untuk dibedakan dengan adanya papila genital kecil di depan sirip bagian anal (Spence *et al.*, 2008).

2.7.2 Pertumbuhan dan Perkembangan Embrio

Penghitungan usia pada zebrafish dimulai sejak 1 jam setelah pengambilan telur atau setelah lampu dinyalakan yang kemudian disebut dengan 0 *hpf*. Zebrafish memiliki siklus hidup 14 jam terang, dan 10 jam gelap yang disesuaikan dengan sistem kerja kardiovaskularnya. Dalam pertumbuhannya, hewan ini memiliki tujuh periode pada tahap embriogenesisnya yang terjadi dalam waktu tiga hari yaitu; zigot, cleavage, blastula, gastrula, segmentation, pharyngula, dan periode menetas (Kimmel *et al.*, 1995).

Pada tahap zigot, terhitung pada 0 – $\frac{3}{4}$ *hpf*. Kemudian tahap cleavage ($\frac{3}{4}$ *hpf*), mulai terbentuk 2-7 sel yang terjadi secara cepat dan tersinkronisasi antar individu. Pada tahap blastula ($2\frac{1}{4}$ *hpf*), terjadi siklus sel secara metasinkronis, dan pertumbuhan epiblast juga dimulai pada

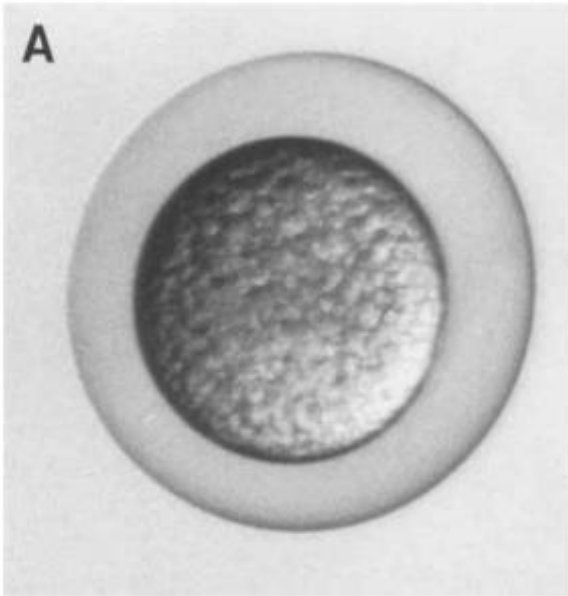
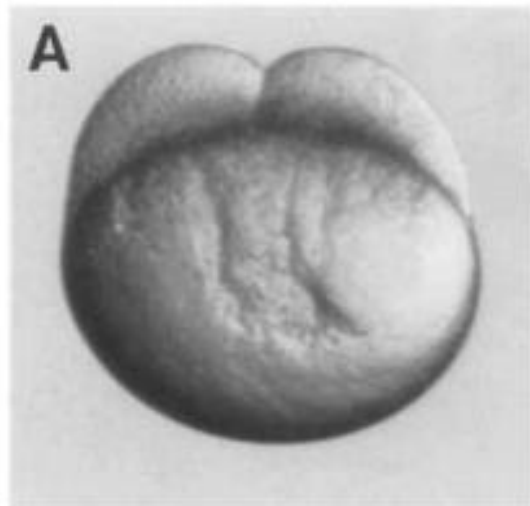
tahap ini. Pada tahap gastrula (5¼ hpf) terjadi pergerakan involusi morfologis, dan ekstensi bagian epiblast, hipoblas serta aksis embrio. Pada tahap segmentasi (10 hpf) terjadi organogenesis primer, munculnya neuromer, ekor dan segmen-segmen tubuh. Pada tahap pharyngula (24 hpf), aksis tubuh zebrafish mulai lurus dari awal kurvatura dalam yolksac, timbulnya sirkulasi, pigmentasi dan insang mulai terbentuk. Pada periode hatching (48 hpf) atau periode menetas, merupakan periode penyelesaian dari pembentukan organogenesis primer, pertumbuhan kepala dan insang zebrafish yang terjadi secara asinkronis. Waktu menetas hewan ini terjadi secara asinkronis, karena cepat atau lambat waktu menetas tidak menentukan kecepatan perkembangan (Kimmel *et al.*, 1995).

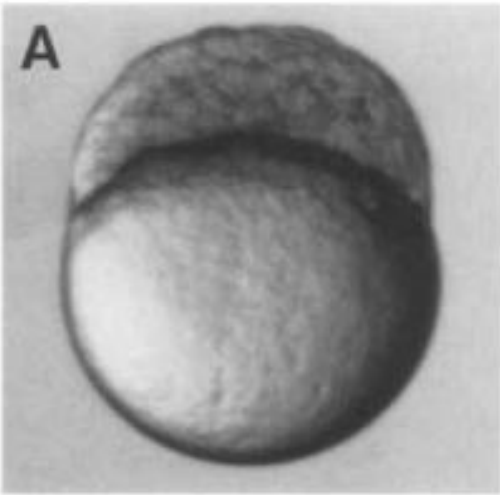
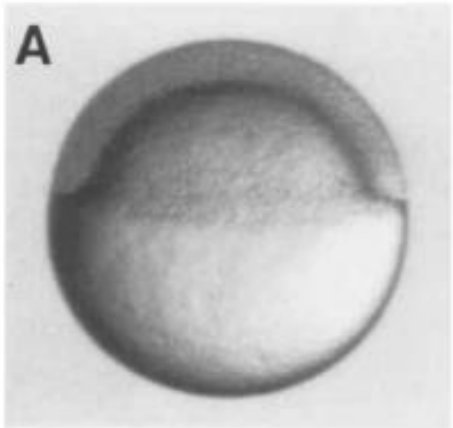
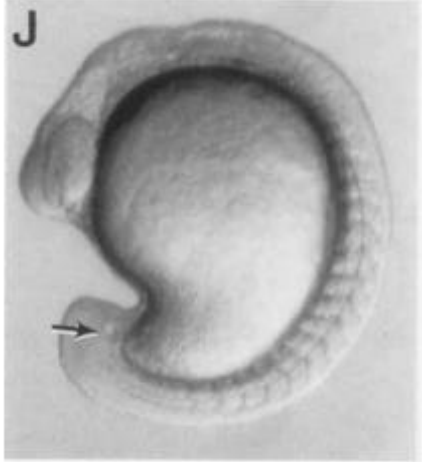
Periode menetas dari zebrafish yaitu 48-72 hpf, namun tidak dimasukkan ke dalam indeks tahap perkembangan karena setiap individu yang berada di dalam telur menetas secara sporadis dalam waktu 3 hari perkembangan (dalam suhu standar 27°C). Meskipun embrio belum menetas, terdapat kemajuan dalam perkembangan, dari jam ke jam, dan secara umum individu yang mempunyai kemampuan menetas secara spontan lebih dahulu tidak menentukan bahwa perkembangannya lebih cepat dibanding yang masih berada di dalam korion (Kimmel *et al.*, 1995).

Periode zigot hingga periode segmentasi (0-24 hpf) menggambarkan organogenesis yang terjadi pada janin manusia pada usia kehamilan trimester pertama. Periode pharyngula (24-48 hpf) menggambarkan organogenesis yang sudah mulai terbentuk matang pada janin manusia di trimester kedua. Periode penetasan (48-72 hpf)

menggambarkan morfogenenesis yang sudah sempurna pada janin pada trimester ketiga (Kimmel *et al.*, 1995).

Tabel 2.4 Tabel pertumbuhan dan perkembangan zebrafish (*Danio rerio*) (Kimmel *et al.*, 1995).

Tahap	Waktu	Keterangan
<p>Periode zigot (1 sel)</p> 	<p>0 – ¾ hpf</p>	<p>Telur yang baru difertilisasi berkembang menjadi zigot, sitoplasma menuju kutub untuk membentuk blastodisk</p>
<p>Periode pembelahan (2 – 64 sel)</p> 	<p>¾ - 2 hpf</p>	<p>Sel membelah menjadi 2,4,8,16, 32 sampai 64 sel</p>

<p>Periode blastula</p> 	<p>2 ¼ - 5 ¼ hpf</p>	<p>Embrio memasuki transisi midblastula, pembentukan yolk syncytial layer (YSL) dari epiboly. Diawali dengan terbentuknya kubah dan perubahan blastodisk menjadi blastoderm</p>
<p>Periode gastrula</p> 	<p>5 ¼ - 10 hpf</p>	<p>Epiboly sudah terbentuk secara sempurna, tail bud, aksis embrio, dan primary germ layer telah terbentuk</p>
<p>Periode segmentasi</p> 	<p>10 - 24 hpf</p>	<p>Organogenesis awal dimulai. Diawali dengan neuron dan ginjal, telinga mulai nampak, ekor anterior memanjang, terjadi kontraksi miotom spontan.</p>
<p>Periode pharyngula</p>	<p>24 - 48 hpf</p>	<p>Aksis tubuh mulai lurus ditandai dengan kepala</p>

 <p>B</p>		<p>yang memendek dan mulai lurus. Dimulainya pembentukan sirip. Jantung mulai berdenyut, serta mulai muncul sensitivitas terhadap rangsang taktil</p> <p>Perkembangan melambat</p>
<p>Periode penetasan</p>  <p>A</p>	<p>48 – 72 hpf</p>	<p>Morfogenesis telah sempurna dan terjadi penetasan secara spontan menjadi larva. Mulai aktif berenang dan mulai timbul refleks menghindari pada rangsang taktil.</p>
<p>Periode Larva Berenang Bebas</p>  <p>G</p>	<p>72 hpf</p>	<p>Pada usia ini larva zebrafish dapat berenang bebas untuk mengeksplorasi lingkungannya serta mencari makanan.</p>

2.7.4 Kurvatura Spinal

Pembentukan tulang belakang zebrafish dimulai sejak periode segmentasi (10 hpf) dimana pada periode ini fase awal organogenesis dimulai. Pada periode *pharyngula* (24-48 hpf), aksis tubuh zebrafish mulai lurus dan mulai terbentuknya organ-organ lain. Pada periode penetasan (48-72 hpf), morfogenesis larva telah selesai, dan telur akan mengalami penetasan secara spontan (Kimmel *et al.*, 1995). Pengamatan kurvatura spinal dapat dilakukan pada fase penetasan (48-72 hpf), dimana pada fase ini telah terjadi pembentukan kurvatura tubuh. Kurvatura ventral dapat diamati pada awal perkembangan embrio, tetapi kurvatura medial-lateral dapat diamati sepenuhnya pada fase larva awal (4-5 dpf) (Buchan *et al.*,

2014). Dalam banyak penelitian didapatkan bahwa zebrafish banyak digunakan untuk meneliti kejadian kaliaan morfologi tulang belakang, kelainan ini diukur berdasarkan morfologi tulang belakang ikan sepanjang kolomna vertebra (Hayes *et al.*, 2013). Berdasarkan penelitian terhadap kejadian malformasi kurvatura spinal pada zebrafish yang dilakukan oleh Tomasiewicz *et al.*, (2014) didapatkan deviasi aksis tulang belakang sebesar 18° - 40° pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol.



Gambar 2.6 Proyeksi Kolomna Vertebra Larva Zebrafish (*Danio rerio*) (Kimmel *et al.*, 1995)

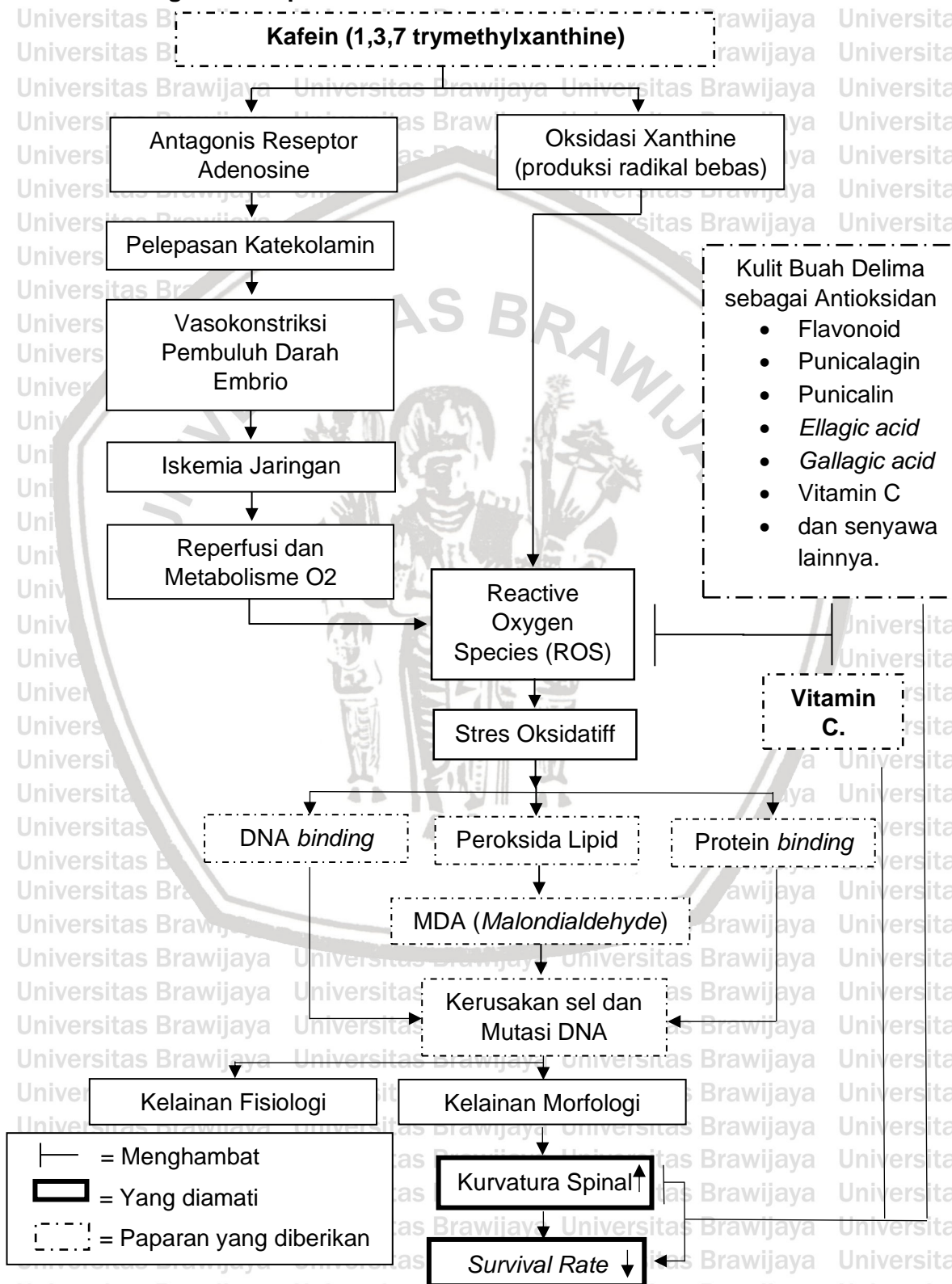
2.7.5 Survival Rate

Zebrafish di alam merupakan salah satu spesies yang bersifat musiman, musim kawin hewan ini berlangsung tepat sebelum berhumbusnya angin pergantian musim (Spence *et al.*, 2007). Rata-rata usia hidup zebrafish yang terdomestikasi adalah 42 bulan, dimana usia tertua daripada individu zebrafish adalah 66 bulan (Gerhard *et al.*, 2002).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Kafein bersifat antagonis terhadap reseptor adenosine yang menyebabkan katekolamin meningkat sehingga pembuluh darah menjadi vasokonstriksi. Vasokonstriksi pembuluh darah uteroplasental menyebabkan terjadi iskemia pada janin, kemudian 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 stres oksidatif. Selain itu, katekolamin juga dapat memicu senyawa-senyawa ROS sehingga dapat menyebabkan stress oksidatif

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. Proses peroksidasi lipid pada membrane sel dapat menghasilkan produk yaitu *Malondialdehyde* (MDA), senyawa yang bersifat mutagen, dan toksik terhadap komponen sel. Ketiga proses tersebut akan menyebabkan mutasi DNA sehingga menyebabkan malformasi.

Stres oksidatif dapat dicegah dengan dua cara, yaitu dengan mencegah formasi ROS atau menghilangkan efek ROS dengan antioksidan. Antioksidan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah

delima. Kulit delima mengandung senyawa flavonoid, asam fenolat, dan tannin diantaranya gallotannin, ellagitannin, anthocianin, asam ellagic, kuersetin, asam galat, katekin yang mempunyai khasiat sebagai antioksidan. Kulit buah delima kaya akan tannin, yang merupakan golongan polifenol.

Polifenol dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan memutus reaksi oksidasi berantai pembentukan radikal bebas. Dengan demikian, polifenol dapat menetralkan oksidan menjadi bentuk yang tidak toksik. Kandungan Flavonoid juga berpotensi mencegah pembentukan radikal bebas yang bekerja dengan mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga reaktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat.

Vitamin C bekerja sebagai antioksidan melawan reaksi stress oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas dengan berikatan dengan electron bebas pada radikal bebas

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian ekstrak kulit buah delima dapat mencegah terjadinya pembentukan kurvatura spinal pada larva zebrafish pada usia 72 *hpf* yang dipapar kafein.
2. Pemberian ekstrak kulit buah delima dapat meningkatkan *survival rate* pada larva zebrafish yang dipapar kafein selama 120 *hpf*.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan November 2018 di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya (FPIK-UB), Laboratorium Faal FKUB dan Laboratorium Farmakologi FKUB, Malang.

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian ini adalah embrio dari zebrafish dewasa yang berusia 3 bulan yang didapatkan dari Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Reproduksi Ikan FPIK-UB. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 20 embrio zebrafish (*Danio rerio*) pada setiap *wellplate*. Kelompok perlakuan pada sembilan *well* sebanyak 2x6 *wellplate*. Pada penelitian ini terdiri dari sembilan kelompok perlakuan dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali, sehingga jumlah total sampel yang digunakan sebanyak 540 embrio. Perhitungan jumlah sampel berdasarkan beberapa penelitian menggunakan embrio ikan zebra antara 20-30 embrio tiap kelompok untuk penelitiannya (Lucitt *et al.*, 2008). Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *Simple Random Sampling*.

Kriteria inklusi sampel hewan uji dalam penelitian ini adalah telur zebrafish fertil berusia 0 - 5,52 *hpf* dengan ciri-ciri berwarna jernih, tenggelam di bawah permukaan air, serta terdapat zigot jika diamati di bawah mikroskop. Kriteria eksklusi sampel hewan uji dalam penelitian ini adalah telur infertil dengan ciri-ciri terdapat gambaran *bleaching* (bintik putih di tengah telur), telur tidak mengapung, dan tidak didapatkan zigot jika diamati di bawah mikroskop (Kimmel *et al.*, 1995; Thisse *et al.*, 2004).

Penelitian ini membagi sampel menjadi sembilan kelompok perlakuan dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali dalam setiap kelompok.

Sembilan kelompok tersebut, yakni :

1. Kontrol : sampel dipapar dengan medium embrio zebrafish tanpa tambahan bahan lain
2. KVC: sampel dipapar dengan kafein konsentrasi 100 ppm dan Vitamin C konsentrasi 30 ppm
3. KF : sampel dipapar dengan kafein konsentrasi 100 ppm.
4. EKD 0,70 : sampel dipapar dengan ekstrak buah delima konsentrasi 3 yaitu 0,70 ppm.
5. KFEKD 0,14 : sampel dipapar dengan kafein konsentrasi 100 ppm dan diberikan ekstrak kulit buah delima konsentrasi 1 yaitu 0,14 ppm
6. KFEKD 0,28 : sampel dipapar dengan kafein konsentrasi 100 ppm dan diberikan ekstrak kulit buah delima konsentrasi 2 yaitu 0,28 ppm
7. KFEKD 0,42 : sampel dipapar dengan kafein konsentrasi 100 ppm dan diberikan ekstrak buah delima konsentrasi 3 yaitu 0,42 ppm.
8. KFEKD 0,56 : sampel dipapar dengan kafein konsentrasi 100 ppm dan diberikan ekstrak buah delima konsentrasi 4 yaitu 0,56 ppm.

9. KFEKD 0,70 : sampel dipapar dengan kafein konsentrasi 100 ppm dan diberikan ekstrak buah delima konsentrasi 5 yaitu 0,70 ppm.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan adalah pemaparan kafein dengan konsentrasi tetap yaitu 100 ppm yang di campur dengan ekstrak kulit buah delima (EKD) dengan lima konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi 1 (EKD 0,14 ppm), konsentrasi 2 (EKD 0,28 ppm), dan konsentrasi 3 (EKD 0,42 ppm), konsentrasi 4 (EKD 0,56 ppm), konsentrasi 5 (0,7 EKD ppm).

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kejadian kurvatura spinal dan *survival rate* yang dipengaruhi oleh paparan kafein, Vitamin C, dan ekstrak kulit buah delima (EKD).

4.5 Definisi Operasional

Tabel 4.1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Pengukuran	Kategori Penilaian	Skala Ukur
Kafein yang ditambahkan ekstrak kulit buah delima dalam 5 konsentrasi	Perlakuan yang diberikan kepada spesimen dan merupakan variabel bebas yang kemudian dilihat hubungannya dengan variabel terikat yaitu kejadian kurvatura spinal dan <i>survival rate</i>	Pembuatan sediaan dilakukan dengan mencampurkan kafein dalam bentuk larutan kedalam seluruh kelompok kecuali kelompok kontrol.	Kelompok perlakuan 1. Kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,14 ppm 2. Kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,28 ppm 3. Kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,42 ppm 4. Kafein 100 ppm dan ekstrak kulit	Ordinal



			buah delima 0,56 ppm 5. Kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,7 ppm	
Kurvatura Spinal	Kurvatura spinal zebrafish mengacu pada perubahan aksis tulang belakang sepanjang kolumna vertebra larva zebrafish diatas 18°.	Kurvatura spinal zebrafish diamati pada jam ke-72 pasca fertilisasi dengan menggunakan mikroskop Olympus CX21 yang kemudian di foto dan kemudian dibuat garis sepanjang tubuh ikan menggunakan <i>ImageJ software</i> . Embrio zebrafish dikatakan terdapat kurvatura spinal jika didapatkan mengubah dari aksis tubuh ikan > 18° (Tomasiewicz <i>et al.</i> , 2014)	Ada dan Tidak untuk kejadian kurvatura spinal	Nomin al
<i>Survival Rate</i>	<i>Survival rate</i> adalah persentase larva zebrafish dalam 1 well yang hidup setelah diberi perlakuan selama 120 hpf.	<i>Survival rate</i> diamati sejak telur diberi perlakuan yaitu 0 jam paska fertilisasi sampai 120 jam paska fertilisasi. Setiap 24 jam telur diamati di bawah mikroskop menggunakan mikroskop Olympus CX21, untuk mengeksklusikan telur yang mengalami <i>bleaching</i> dan embrio ikan yang mati.	Persentase ikan yang hidup setelah 120 hpf	Rasio



4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Bahan

1. Induk zebrafish *Wild Type* dewasa yang berusia 3 bulan.
2. Telur zebrafish fertil, yang ditandai dengan bersifat transparan dan tenggelam di bawah permukaan air.
3. Medium embrio yang terdiri dari 0,004% CaCl₂, 0,163% MgSO₄, 0,1% NaCl dan 0,003% KCl dalam Aqua Destilata.
4. Kafein bubuk murni (Caffeine Anhydrous. BP2016, USP39) nomor katalog 1025841000 diperoleh dari CV. Dunia Kimia Lestari Kota Malang yang telah dilarutkan dalam air terdestilasi (100 ppm).
5. Bubuk kulit buah delima dari UPT Materia Medika Batu, Jawa Timur yang selanjutnya diekstraksi dalam bentuk pasta yang dilarutkan dengan 0,14 ppm, 0,28 ppm, 0,42 ppm, 0,56 ppm, 0,7 ppm.
6. Vitamin C bubuk murni nomor katalog A92902-100G yang diperoleh dari CV. Duta Jaya Kota Malang dan dilarutkan dalam Aqua Destilata (30 ppm).
7. Cacing blok beku sebagai makanan ikan.
8. Makanan ikan merk Tetramin Tropical Flakes nomor katalog TSN16623.

4.6.2 Alat

1. Aquarium dengan kapasitas 60 liter.
2. Inkubator buatan Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Reproduksi Ikan FPIK-UB.
3. Mikroskop stereo merk Olympus CX21.
4. Cawan petri.

5. Dua buah *Wellplate* dengan 6 *well*.
6. *Beaker glass*.
7. Mikropipet dengan merek Socorex Acura 825 adjustable volume dengan kapasitas volume 0,1 – 100 μL .
8. Kamera HP (Samsung Galaxy A8+).
9. Termometer alkohol tanpa merk dengan Panjang 300 mm dan skala pengukuran suhu antara -10°C – 100°C .
10. Pengukur kelembapan ruangan HTC2-3-RD.
11. Pipet 1 ml .
12. Spatula.
13. Timbangan digital Ohaus Pioneer PA214210.
14. Vortex.
15. Tabung Erlenmeyer 1000 ml.
16. Tabung falcon.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Penentuan Konsentrasi Kafein dan Kulit Delima

Konsentrasi kafein didapatkan dari hasil penelitian sebelumnya yaitu 100 ppm yang dapat menyebabkan gangguan dan malformasi (Basnet *et al.*, 2017). Penelitian oleh Chen *et al.*, (2008) membuktikan bahwa konsentrasi tersebut secara signifikan mempengaruhi malformasi dan mortalitas embrio zebrafish

Konsentrasi ekstrak kulit buah delima yang digunakan berdasarkan dari penelitian sebelumnya yaitu 50 mg/kg/BB/hari pada tikus yang diketahui dapat menangkal stress oksidatif (Pandey dan Rizvi, 2009; Kumar *et al.*, 2013). Kemudian konsentrasi tersebut dikonversikan dengan

membandingkan berat rata rata tikus terhadap berat rata rata zebrafish

(Nair dan Jacob, 2016). Selain itu optimasi konsentrasi juga didukung

dengan penelitian pendahuluan yang mencoba kafein dalam berbagai

konsentrasi dan pada konsentrasi tersebut terjadi peningkatan denyut

jantung dan malformasi zebrafish pada 72 hpf.

$$\frac{150 \text{ (berat rata - tikus)}}{50 \text{ mg/kg (dosis terhadap tikus)}} = \frac{0,42 \text{ (berat rata - rata zebrafish)}}{x \text{ (konsentrasi)}}$$

$$X = 0,14 \text{ mg/L}$$

Sehingga didapatkan konsentrasi:

1. Konsentrasi 1 = 0,14 mg/L = 0,14 ppm
2. Konsentrasi 2 = 0,28 mg/L = 0,28 ppm
3. Konsentrasi 3 = 0,42 mg/L = 0,42 ppm
4. Konsentrasi 4 = 0,56 mg/L = 0,56 ppm
5. Konsentrasi 5 = 0,70 mg/L = 0,70 ppm

4.7.2 Pemeliharaan Ikan

Pemeliharaan zebrafish dewasa dilakukan dalam akuarium

dilengkapi dengan sistem resirkulasi yang berkelanjutan. Ikan dipelihara

dalam tangki dengan kapasitas 60 L. Suhu air dijaga pada suhu 28,5^o C dan

pH antara 7,9 – 8,3, kadar oksigen > 95%. Zebrafish diberi makan sebanyak

tiga kali setiap hari dengan Tetramin dan cacing blok. Akuarium tempat

pemeliharaan berukuran 60 cm x 40 cm x 40 cm dengan diberikan jaring di

bawahnya agar telur zebrafish dapat tertampung dan menghindari ikan

dewasa memangsa telurnya. Perawatan zebrafish dilakukan dengan

memperhatikan siklus gelap dan terang dengan perbandingan 14 : 10 jam.

Periode terang selama 14 jam dimulai dari pukul 08.00 pagi (Reed dan

Jennings, 2011).

4.7.3 Pengawinan Ikan

Pengawinan dilakukan dengan meletakkan ikan jantan dan ikan betina dengan perbandingan 1 : 2 kedalam akuarium pengawinan dengan ukuran 40 x 32 x 32 cm suhu air tetap dijaga pada suhu 28,5^o C dan pH antara 7,9 – 8,3, kadar oksigen > 95%, dan ikan dewasa tetap diberi makan tiga kali sehari. Di dalam akuarium telah diletakkan jala pemisah dibagian dasar untuk memisahkan antara telur dengan ikan dewasa dan menghindari telur dimakan oleh ikan dewasa. Selain itu, di dalam akuarium telah diletakkan pula tanaman air untuk merangsang perkawinan (Nasiadka dan Clark, 2012). Proses pengawinan dilakukan pada pagi hari yakni pukul 07.00 WIB. Pengambilan telur dilakukan pada hari yang sama di pukul 15.00 WIB.

4.7.4 Pemanenan Telur

Pemanenan telur zebrafish dimulai dengan memindahkan kan semua induk zebrafish dari akuarium pemijahan ke dalam akuarium awal menggunakan jaring. Jala pemisah diambil, kemudian telur dipindahkan ke wadah sementara dari dasar akuarium pemijahan. Telur dicuci menggunakan aqua destilata, kemudian dicuci kembali dengan menggunakan medium embrio (Avdesh *et al.*, 2012).

4.7.5 Pembuatan Medium Embrio

Pembuatan medium embrio diantaranya dengan melarutkan MgSO₄ 0,815 g, NaCl 5 g, KCl 0,15 g, CaCl₂ 0,02g yang ditimbang menggunakan timbangan digital Ohaus Pioneer PA214210 ke dalam Aquades 500 ml di dalam Tabung Erlenmeyer 1000 ml (Meyers, 2018).

4.7.6 Kultur Embrio

Telur yang telah dibersihkan diletakkan di cawan petri lalu diamati di bawah mikroskop untuk menentukan apakah telur tersebut telah terfertilisasi atau belum. Telur yang telah terfertilisasi pada bagian cangkang terdapat bulatan yang berwarna lebih keruh dari tengahnya. Pengamatan tidak lebih dari dua jam. Embrio diletakkan dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu 28.5^o C. Medium embrio diganti setiap hari dan ikan dirawat sampai 120 hpf.

Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *simple random sampling*. Pada penelitian ini menggunakan embrio yang berumur 5,25 hpf karena pada usia tersebut embrio masih berada pada fase blastula dan belum terjadi organogenesis sehingga paparan zat teratogen akan memberikan efek yang maksimal (Kimmel *et al.*, 1995).

4.7.7 Pembuatan Dan Pemaparan Kafein

Pembuatan sediaan kafein 100 ppm dilakukan dengan cara melarutkan 0,125 mg kafein bubuk murni (Caffeine Anhydrous, BP2016 USP39) kedalam 5 mg aquadest yang kemudian di masukkan ke dalam *falcon* 15 ml. kemudian di letakkan di atas vortex agar larutan homogen, kemudian diambil 200 μ L menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam 5 *falcon* 50 mL yang berisikan medium embrio. Kemudian membuat sediaan ekstrak kulit buah delima 0,14 ppm, 0,28 ppm, 0,42 ppm, 0,56 ppm, 0,70 ppm dari stok 25 mg/mL yang diambil sebanyak masing masing 2,8 μ L, 5,6 μ L, 8,4 μ L, 11,2 μ L, 14 μ L, kemudian dimasukan kedalam 5 *falcon* yang berisikan medium embrio dan kafein 100ppm, lalu di letakkan di atas vortex hingga larutan homogen.

Kafein diberikan pada 5,52 *hpf* hingga 72 *hpf*, dengan pertimbangan bahwa pada usia tersebut embrio masih dalam proses organogenesis sehingga paparan zat teratogen akan memberikan efek maksimal (Kimmel *et al.*, 1995). Pemaparan kafein dilakukan pada lima kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1, perlakuan 2, perlakuan 3, perlakuan 4, dan perlakuan 5. Pemaparan kafein dalam medium embrio dengan konsentrasi 100 ppm. Konsentrasi tersebut didapatkan melalui berdasarkan hasil penelitian Chen (2012), di mana pada konsentrasi tersebut secara signifikan mempengaruhi malformasi dan mortalitas embrio zebrafish.

4.7.8 Pemaparan Vitamin C

Dalam penelitian ini, Vitamin C yang digunakan adalah Vitamin C bubuk murni yang didapatkan dari CV. Duta Jaya Kota Malang. Vitamin C hanya dipaparkan pada kelompok kontrol positif dengan konsentrasi 30 ppm. Konsentrasi Vitamin C didapatkan berdasarkan konversi dari penelitian Reimers *et al.*, (2006) yang menyatakan bahwa pada konsentrasi 250 μM , Vitamin C mampu melindungi zebrafish dari toksisitas etanol akibat ROS.

4.7.9 Proses Ekstraksi Kulit Buah Delima (*Punica granatum L.*)

Bubuk kulit buah delima dan determinasi buah delima (*Punica granatum L.*) diperoleh dari UPT Materia Medika Batu, Jawa Timur untuk memastikan identifikasi buah delima sesuai dengan spesies yang diinginkan. Proses ekstraksi mengacu pada prosedur ekstraksi Laboratorium Farmakologi FKUB Malang. Proses pembuatan ekstrak dimulai dari tahap pengeringan, dimana buah delima dikupas kulitnya

kemudian dicuci bersih kemudian mencincang kecil kulit buah delima dan selanjutnya dimasukkan dalam oven selama 5-7 hari dengan suhu maksimal 50°C, dengan tujuan mendehidrasi komponen air dalam kulit buah delima. Selanjutnya proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Berikutnya diambil lapisan atas yang merupakan campuran pelarut dan zat aktif. Proses perendaman dan pengambilan lapisan atas ini dilakukan sebanyak 3 kali.

Proses ketiga adalah evaporasi, diawali dengan memasukkan cairan hasil perendaman ke labu evaporasi dan dipasang pada evaporator.

Selanjutnya *waterbath* diisi air hingga penuh dan suhu diatur 70° celcius sesuai dengan titik didih ethanol. Proses evaporasi dimulai hingga pelarut terpisah dengan zat aktif. Aliran pelarut dibiarkan sampai berhenti menetes pada labu penampung. Selanjutnya didapatkan hasil proses ekstraksi dalam bentuk pasta kemudian disimpan ke dalam *freezer*.

4.7.10 Pemberian Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum L.*)

Perlakuan pemberian ekstrak kulit buah delima (EKD) murni dilakukan pada 5,52 *hpf* hingga 120 *hpf* hanya pada kelompok perlakuan 1, 2 ,3 ,4 ,5 ,dan kelompok negatif 2. Penentuan konsentrasi didasarkan pada jurnal yang menunjukkan bahwa 50 mg/kgBB kulit buah delima dapat mengurangi diabetes pada tikus yang menjadikan dasar pada peneliti bahwa konsentrasi sudah dapat memberikan efek (Pandey and Rizvi, 2009) Kemudian dilakukan konversi menjadi konsentrasi pada zebrafish yaitu sebanyak 0,14 ppm, 0,28 ppm, 0,42 ppm, 0,56 ppm, dan 0,7 ppm.

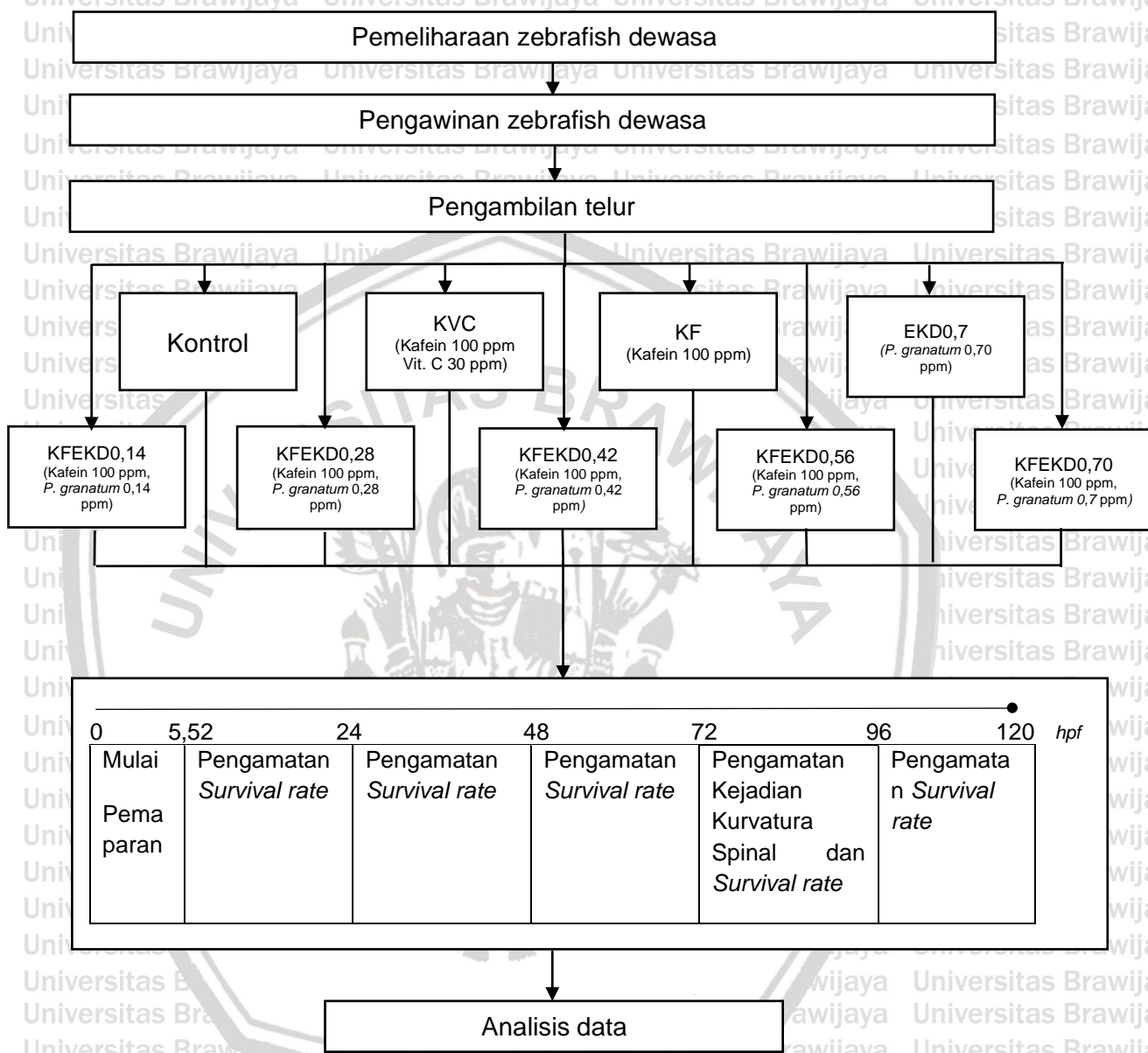
4.7.11 Pengamatan Kejadian Kurvatura Spinal

Perubahan morfologi berupa kejadian kurvatura spinal pada embrio diamati pada kelompok kontrol (Kontrol), kelompok kontrol negatif 1 (KF), kelompok kontrol negatif 2 (EKD 0,70), kelompok kontrol positif (KVC), dan kelompok perlakuan KFEKD 0,14, 0,28, 0,42, 0,56, dan 0,70 pada 72 hpf dikarenakan pada periode waktu tersebut embrio sudah menetas dan aksis tubuh sudah mulai terbentuk (Kimmel *et al.*, 1995).

4.7.12 Pengamatan *Survival Rate*

Survival rate merupakan persentase larva zebrafish yang hidup setelah diberi perlakuan. *Survival rate* diamati setiap 24 jam pada kelompok kontrol, kelompok kontrol negatif 1 (KF), kelompok kontrol positif (KVC), Kelompok perlakuan KFEKD 0,14, 0,28, 0,42, 0,56, dan 0,70 selama 120 hpf sejak pemaparan.

4.8 Alur Penelitian



Keterangan : —●: lama pemaparan

4.9 Analisis Statistik

Pengujian statistik yang dilakukan untuk variabel kurvatura spinal tidak dilakukan uji normalitas dan homogenitas dikarenakan data berupa data nominal, sehingga langsung menggunakan uji nonparametrik menggunakan *Kruskall-Wallis* untuk melihat ada tidaknya perbedaan yang signifikan dalam



seluruh kelompok perlakuan. Jika hasil analisis bernilai signifikan maka dilakukan uji lanjut *Mann-Whitney* untuk melihat perbandingan antar dua kelompok (Prastyo, 2017).

Pengujian statistik yang digunakan untuk variabel *survival rate* diawali dengan menggunakan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro wilk*, dan dilakukan uji homogenitas menggunakan *Levene's test*. Jika data berdistribusi normal dan bersifat homogen, pengujian dilanjutkan dengan uji parametrik beda rata-rata yaitu uji *One Way Anova*, dan dilanjutkan dengan uji lanjut Beda Nyata Terkecil (BNT). Jika data tidak memenuhi syarat uji *One Way Anova* maka pengujian dilanjutkan dengan uji *Kruskall-Wallis*, jika hasil analisis bernilai signifikan maka dilakukan uji lanjut *Mann-Whitney* untuk melihat perbandingan antar dua kelompok (Prastyo, 2017).

BAB V
HASIL PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa pemberian ekstrak kulit buah delima (EKD) pada embrio zebrafish yang dipapar kafein dapat menurunkan angka kejadian kurvatura spinal serta meningkatkan *survival rate*.

Parameter kurvatura spinal diamati pada larva zebrafish dalam kelompok Kontrol, KF, EKD0,7, KVC, KFEKD 0,14, KFEKD 0,28, KFEKD 0,42, KFEKD 0,56, dan KFEKD 0,7 pada 72 *hpf*. Parameter *survival rate* larva zebrafish diamati setiap 24 *hpf* selama 120 *hpf*. Setiap 24 jam dilakukan penggantian medium embrio pada masing masing *well* dan melakukan eksklusi pada embrio yang mati.

Tabel 5.1 Kejadian Kurvatura Spinal pada Larva Zebrafish 72 *hpf*

Perlakuan	Kurvatura Spinal								
	n	P*1	n	P2	n	P3	N* = 339	Rata-Rata	SE*
Kontrol	9	0.00	17	0.00	15	0.00	41	0.00	±0.000
KF	11	0.54	16	0.44	13	0.61	40	0.53	±8.500
EKD 0,7	5	0.00	20	0.00	17	0.00	42	0.00	±2.082
KVC	11	0.36	14	0.07	0	NA*	25	0.21	±1.528
KFEKD 0,14	9	0.12	16	0.06	14	0.21	39	0.13	±2.517
KFEKD 0,28	9	0.00	13	0.00	13	0.15	35	0.05	±2.028
KFEKD 0,42	11	0.09	14	0.00	11	0.27	36	0.11	±2.082
KFEKD 0,56	12	0.17	14	0.00	16	0.44	42	0.16	±3.223
KFEKD 0,70	6	0.17	19	0.00	14	0.07	39	0.08	±0.000

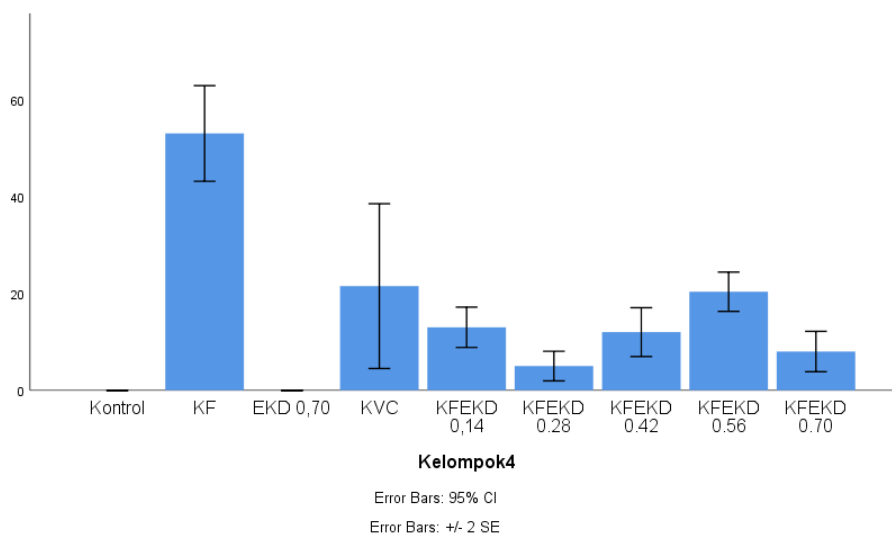
Keterangan : Kontrol: medium embrio tanpa tambahan bahan lain, KF: kafein 100 ppm, EKD 0,7: ekstrak kulit buah delima 0,70 ppm, KVC: kafein 100 ppm dan Vit.C,



KFEKD 0,14: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,14 ppm, KFEKD 0,28: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,28 ppm, KFEKD 0,42: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,48 ppm, KFEKD 0,56: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,56 ppm, KFEKD 0,70: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,70 ppm. NA* : Data tidak tersedia, SE* : *Standard Error*, P* : pengulangan, n* : jumlah sampel.

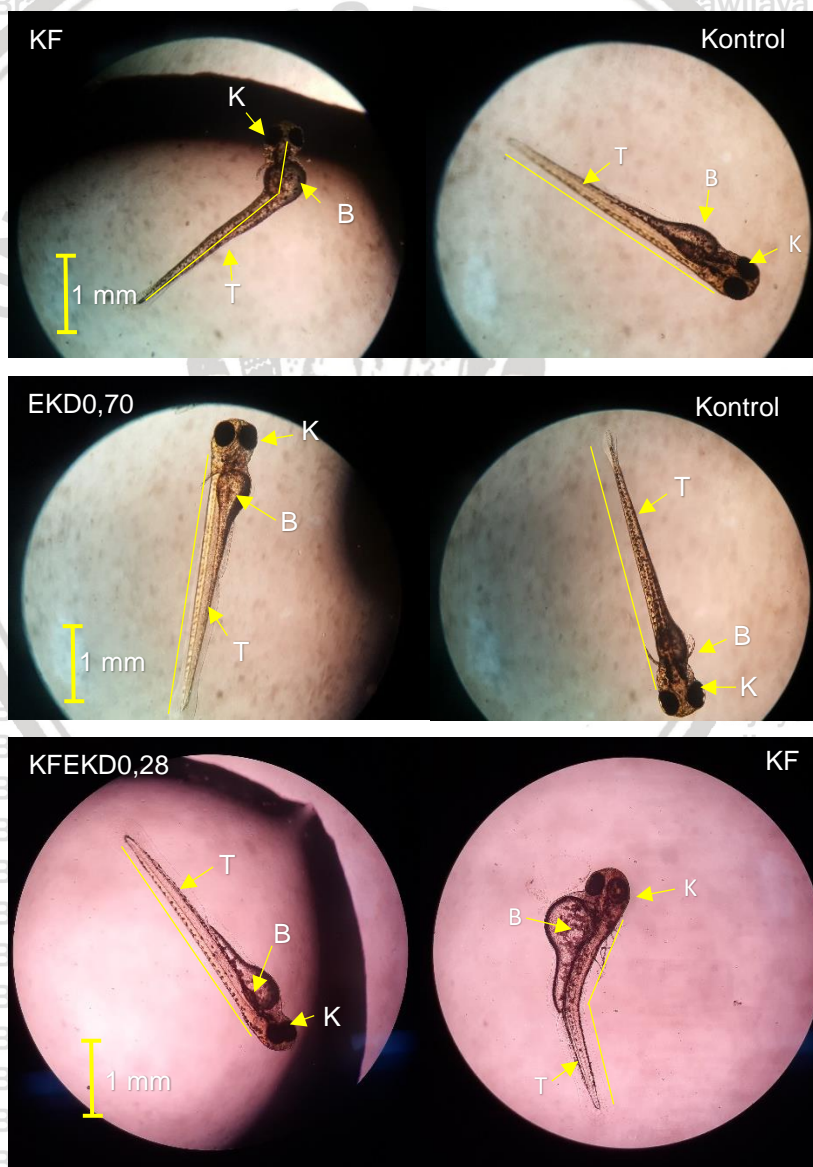
Data kejadian kurvatura spinal tercantum dalam tabel 5.1 dilakukan pengambilan data diambil sebanyak tiga kali pengulangan yang kemudian data tersebut dijadikan satu kemudian dilakukan analisis menggunakan data yang telah digabung. Dari data di atas menunjukkan bahwa pada embrio zebrafish dalam kelompok KVC tidak didapatkan data pengulangan ke-tiga (P3) karena dalam waktu tersebut embrio zebrafish belum menetas dari cangkang telurnya.

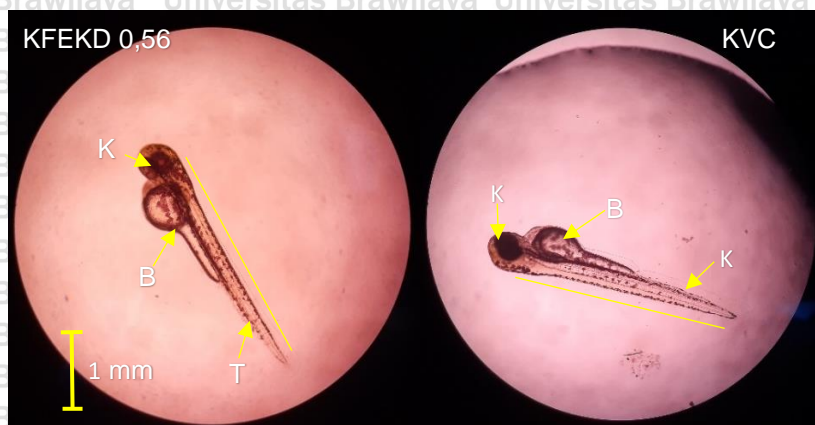
1.1 Kurvatura Spinal



Gambar 5.1 Grafik Persentase Kejadian Kurvatura Spinal pada Larva Zebrafish Keterangan : Kontrol: medium embrio tanpa tambahan bahan lain, KF: kafein 100 ppm, EKD 0,70: ekstrak kulit buah delima 0,70 ppm, KVC: kafein 100 ppm dan Vit.C, KFEKD 0,14: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,14 ppm, KFEKD 0,28: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,28 ppm, KFEKD 0,42: Kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,48 ppm, KFEKD 0,56: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,56 ppm, KFEKD 0,70: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,70 ppm.

Dalam grafik 5.1 dapat dilihat bahwa kejadian kurvatura terbanyak adalah pada larva zebrafish dalam kelompok KF dengan persentase 50%. Pada kelompok perlakuan yang dipapar ekstrak kulit buah delima, kejadian kurvatura spinal paling sedikit terdapat pada larva zebrafish dalam kelompok KFEKD 0,28 dan KFEKD 0,7 dengan persentase 5,71% dan 5,13%. Dalam kelompok kontrol dan kelompok EKD 0,7 tidak didapatkan larva zebrafish yang mengalami kurvatura spinal.





Gambar 5.2 Perbandingan kejadian kurvatura spinal pada larva zebrafish.

Kejadian kurvatura spinal yang ditandai dengan deviasi aksis $>18^\circ$, seperti yang terdapat pada zebrafish kelompok KF, dibandingkan dengan zebrafish kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya binokuler Olympus CX21 dengan perbesaran 40 kali. Gambar diambil dengan menggunakan Kamera Android Samsung Galaxy A8+, Skala bar = 1 mm; keterangan : K: Kepala, B: Badan, T: Ekor. Garis kuning: Aksis tubuh.

Kejadian kurvatura spinal pada larva zebrafish identifikasi dengan cara mengambil gambar di bawah mikroskop Olympus CX21 dengan perbesaran objektif 40x. Kemudian dibuat garis sepanjang aksis tubuh zebrafish menggunakan software ImageJ dan dihitung sudut deviasi dari aksis tubuh larva. Pada kelompok KF didapatkan deviasi aksis tubuh $>18^\circ$ dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak didapatkan deviasi dari aksis tubuh. Pada kelompok EKD 0,70 tidak terdapat deviasi aksis tubuh, sama dengan kelompok Kontrol. Pada kelompok KFEKD 0,28 tidak mengalami deviasi aksis tubuh, jika dibandingkan dengan kelompok KF.

Pada kelompok KFEKD dan KVC tidak terdapat deviasi aksis tubuh.

5.1.1 Uji Normalitas & Homogenitas

Uji normalitas dan homogenitas tidak dilakukan karena data berbentuk nominal.

5.1.2 Uji Nonparametrik

Data penelitian ini bersifat nominal sehingga pengujian dilakukan menggunakan uji nonparametrik.

5.1.2.1 Uji Kruskal-Wallis

Tabel 5.2 Uji Kruskal-Wallis Kurvatura Spinal

Parameter	p- value
Kurvatura Spinal	0.000*

*: Signifikan ($p < 0.05$)

Berdasarkan hasil uji Kruskal Wallis, diperoleh nilai signifikansi yang lebih besar dari α ($0.000 < 0.050$), sehingga disimpulkan terdapat perbedaan yang signifikan dari rata-rata kurvatura spinal antar perlakuan.

5.1.2.2 Uji Mann-Whitney

Tabel 5.3 Uji Lanjut Mann-Whitney Kurvatura Spinal

	Kontrol	KF	EKD 0,7	KVC	KF 0,14	KFEKD 0,28	KFEKD 0,42	KFEKD 0,56	KFEKD 0,70
Kontrol		0.000*	1.000	0.003*	0.019*	0.123	0.014*	0.002*	0.144
KF	0.000*		0.000*	0.010*	0,000*	0.000*	0.000*	0.004*	0.000*
EKD 0,7	1.000	0.000*		0.003*	0.017*	0.119	0.013*	0.002*	0.140*
KVC	0.003*	0.010*	0.003*		0.444	0.092	0.529	0.890	0.065
KFEKD 0,14	0.019*	0.000*	0.017*	0.444		0.300	0.893	0.309	0.238

KFEKD 0,28	0.123	0.000*	0.119	0.092	0.300		0.251	0.051	0.912
KFEKD 0,42	0.014*	0.000*	0.013*	0.529	0.893	0.251		0.390	0.196
KFEKD 0,56	0.002*	0.004*	0.002*	0.890	0.309	0.051	0.390		0.033*
KFEKD 0,70	0.144	0.000*	0.140*	0.065	0.238	0.912	0.196	0.033*	

Keterangan : Kontrol: medium embrio tanpa tambahan bahan lain, KF: kafein 100 ppm, EKD 0,70: ekstrak kulit buah delima 0,70 ppm, KVC: kafein 100 ppm dan Vit.C, KFEKD 0,14: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,14 ppm, KFEKD 0,28: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,28 ppm, KFEKD 0,42: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,48 ppm, KFEKD 0,56: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,56 ppm, KFEKD 0,70: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,70 ppm. *: Signifikan ($p < 0.05$)

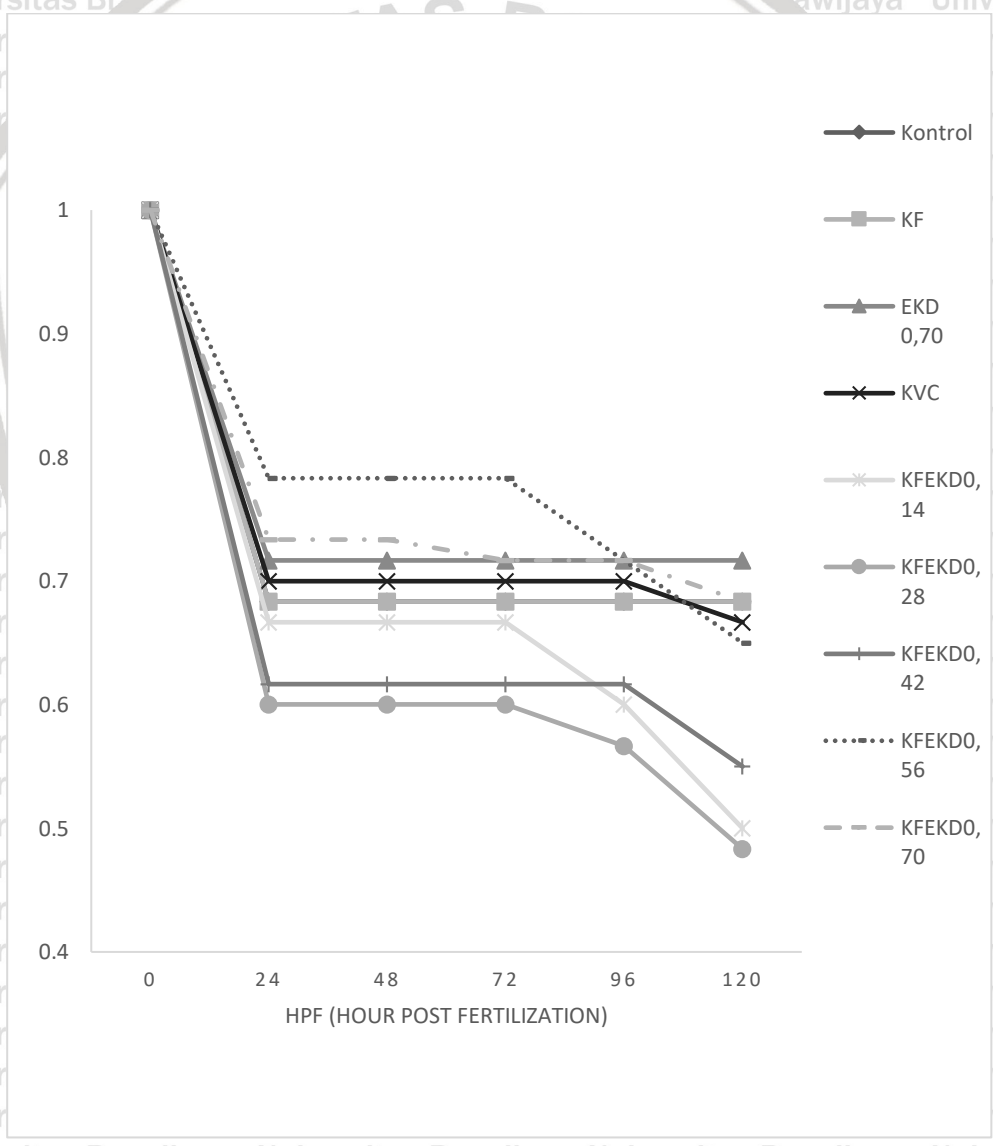
Dari hasil uji lanjut Mann Whitney didapatkan bahwa :

1. terdapat perbedaan nilai rata-rata kelompok kontrol (-) kafein dengan kelompok kontrol dengan nilai signifikansi $p=0,000(P < 0,05)$.
2. Tidak didapatkan perbedaan rata-rata kelompok kontrol (-) delima dengan kelompok kontrol dengan nilai signifikansi $p=1,000 (p < 0,05)$.
3. Terdapat perbedaan rata-rata pada kelompok Kafein+Vit.C dengan kelompok kontrol (-) kafein. dengan nilai signifikansi $p=0,010 (p < 0,05)$.
4. Terdapat perbedaan rata-rata antara kelompok kafein+ ekstrak kulit buah delima 0,14 dengan kelompok kontrol (-) kafein dengan nilai signifikansi $p=0.000 (p < 0,05)$.
5. Terdapat perbedaan rata-rata antara kelompok kafein + ekstrak kulit buah delima 0,28 dengan kelompok kontrol (-) kafein, dengan nilai signifikansi $p=0.000 (p < 0,05)$.

6. Terdapat perbedaan rata-rata antara kelompok kafein + ekstrak kulit buah delima 0,42 dengan kelompok kontrol (-) kafein, dengan nilai signifikansi $p=0.000$ ($p<0,05$).
7. Terdapat perbedaan rata-rata antara kelompok kafein + ekstrak kulit buah delima 0,56 dengan kelompok kontrol (-) kafein, dengan nilai signifikansi $p=0.004$ ($p<0,05$).
8. Tidak terdapat perbedaan rata-rata antara kelompok kafein + ekstrak kulit buah delima 0,70 dengan kelompok kontrol (-) kafein, dengan nilai signifikansi $p=0.000$ ($p<0,05$).
9. Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antara kelompok kafein + ekstrak kulit buah delima 0,14 dengan kelompok Kafein + Vit.C dengan nilai signifikansi $p=0.444$ ($p<0.05$).
10. Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antara kelompok kafein + ekstrak kulit buah delima 0,28 dengan kelompok kafein + Vit.C dengan nilai signifikansi $p=0.092$ ($p<0.05$).
11. Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antara kelompok kafein + ekstrak kulit buah delima 0,42 dengan kelompok kafein + Vit.C dengan nilai signifikansi $p=0.529$ ($p<0.05$).
12. Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antara kelompok kafein + ekstrak kulit buah delima 0,56 dengan kelompok kafein + Vit.C dengan nilai signifikansi $p=0.890$ ($p<0.05$).

13. Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antara kelompok kafein + ekstrak kulit buah delima 0,70 dengan kelompok kafein + Vit.C dengan nilai signifikansi $p=0.065$ ($p<0.05$).

5.2 Survival Rate



Gambar 5.3 Grafik Survival Rate Larva Zebrafish (*Danio rerio*). Keterangan : Kontrol: medium embrio tanpa tambahan bahan lain, KF: kafein 100 ppm, EKD 0,70: ekstrak kulit buah delima 0,70 ppm, KVC: kafein 100 ppm dan Vit.C, KFEKD 0,14: kafein 100 ppm dan : ekstrak kulit buah delima 0,14 ppm, KFEKD 0,28: kafein 100 ppm dan : ekstrak kulit buah delima 0,28 ppm, KFEKD 0,42: kafein 100 ppm dan : ekstrak kulit buah delima 0,48 ppm, KFEKD 0,56: kafein 100 ppm dan : ekstrak kulit buah delima 0,56 ppm, KFEKD 0,70: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,70 ppm

Survival rate dari embrio zebrafish dalam masing-masing kelompok dapat dilihat pada gambar 5.3. Dalam grafik tersebut dapat diketahui bahwa terjadi penurunan *survival rate* yang cukup tajam pada 24 *hpf*. Dalam waktu tersebut sebagian besar telur yang sebelumnya fertil mengalami *bleaching*.

Tabel 5.4 Survival rate Larva Zebrafish pada 120 *hpf*

Perlakuan	% Survival rate				
	P1	P2	P3	Rata-Rata	SD
Kontrol	0.45	0.85	0.75	0.68	±0.208167
KF	0.55	0.80	0.70	0.68	±0.125831
EKD 0,70	0.25	1.00	0.90	0.71	±0.407226
KVC	0.70	0.65	0.65	0.66	±0.028868
KFEKD 0,14	0.45	0.60	0.45	0.50	±0.086603
KFEKD 0,28	0.45	0.50	0.50	0.48	±0.028868
KFEKD 0,42	0.45	0.70	0.50	0.55	±0.132288
KFEKD 0,56	0.30	0.80	0.85	0.65	±0.304138
KFEKD 0,70	0.35	1.00	0.70	0.68	±0.32532

Keterangan : Kontrol: medium embrio tanpa tambahan bahan lain, KF: kafein 100 ppm, EKD 0,70: ekstrak kulit buah delima 0,70 ppm, KVC: kafein 100 ppm dan Vit.C, KFEKD 0,14: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,14 ppm, KFEKD 0,28: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,28 ppm, KFEKD 0,42: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,48 ppm, KFEKD0,56: kafein



100 ppm, dan ekstrak kulit buah delima 0,56 ppm, KFEKDO,70: kafein 100 ppm dan ekstrak kulit buah delima 0,70 ppm. SD: Standar Deviasi

Data survival rate embrio zebrafish dalam penelitian ini yang digunakan untuk analisis adalah 120 hpf, karena pada usia ini embrio sudah berkembang menjadi larva. Pengambilan data survival rate dilakukan setiap 24 jam, dan dilakukan eksklusi terhadap larva zebrafish yang mati.

5.2.1 Survival rate 120 hpf

5.2.1.1 Uji Normalitas

Tabel 5.5 Uji Normalitas Survival Rate 120 hpf

Parameter	p- value
Survival rate 120 Hpf	0.524*

*: Signinfikan (p > 0.05)

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui kondisi normalitas suatu data dalam kelompok. Sampel yang digunakan untuk dianalisis pada masing masing kelompok perlakuan berjumlah <50 sehingga uji normalitas yang digunakan adalah Shapiro-Wilk. Hasil uji normalitas dengan uji Shapiro wilk menunjukkan nilai signifikansi lebih besar dari α (0.05), maka data terdistribusi normal.

5.2.1.2 Uji Homogenitas

Tabel 5.6 Uji Homogenitas Survival Rate 120 hpf

Parameter	p- value
Survival rate 120 hpf	0.012



Uji homogenitas dilakukan untuk melihat homogenitas variasi populasi pada suatu kelompok data menggunakan *Levene's test*. Nilai signifikansi pada uji homogenitas ragam data yang lebih kecil dari α (0.05) membuktikan ragam data tidak homogen.

5.2.1.3 Uji Nonparametrik

Berdasarkan hasil uji normalitas didapatkan bahwa distribusi data normal. Berdasarkan hasil uji homogenitas didapatkan bahwa data tidak homogen. Karena data tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji anova maka dilakukan uji pengganti nonparametrik *Kruskal-wallis*.

5.2.1.3.1 Uji Kruskall-Wallis

Tabel 5.7 Uji *Kruskall-Wallis Survival Rate 120 hpf*

Parameter	p- value
<i>Survival rate 120 hpf</i>	0.757

Berdasarkan hasil uji Kruskal Wallis, diperoleh nilai signifikansi yang lebih besar dari α ($0.757 > 0.050$) dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang tidak signifikan dari rata-rata angka *survival rate* (120 hpf) antar perlakuan.



BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini ditujukan untuk membuktikan bahwa kemampuan antioksidan dari ekstrak kulit buah delima mampu melawan efek negatif kafein yang dipaparkan pada zebrafish berupa kejadian kurvatura spinal pada tubuh larva zebrafish dan *survival rate* dari zebrafish. Pengamatan pada penelitian ini dilakukan pada larva zebrafish yang dibagi kedalam beberapa kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok KF (kontrol negatif kafein 100ppm), EKD 0,70 (kontrol negatif ekstrak kulit buah delima 0,7 ppm), KVC (kontrol positif Vit.C), KFEKD 0,14 (kafein dan ekstrak kulit buah delima 0,14 ppm). KFEKD 0,28 (kafein dan ekstrak kulit buah delima 0,28 ppm). KFEKD 0,42 (kafein dan ekstrak kulit buah delima 0,42 ppm), KFEKD 0,56 (Kafein dan ekstrak kulit buah delima 0,56 ppm), dan KFEKD 0,70 (kafein dan ekstrak kulit buah delima 0,70 ppm). Pengamatan kurvatura spinal dilakukan pada usia larva 72 *hpf*, dan pengamatan *survival rate* dilakukan selama 120 *hpf*. Setiap 24 jam dilakukan penggantian medium embrio pada setiap *well* dan eksklusi embrio ataupun larva zebrafish yang mati.

6.1 Kejadian Kurvatura Spina

Hasil penelitian menunjukkan pemberian kafein dengan konsentrasi 100 ppm terbukti dapat menyebabkan terjadinya kelainan morfologi pada larva zebrafish yang berusia 72 *hpf* berupa kejadian kurvatura spinal jika dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p=0.000^*$). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Yeh *et al.*, (2012) dimana pada konsentrasi tersebut kafein memberikan efek toksik yang menyebabkan terganggunya proses organogenesis dari embrio zebrafish sehingga menyebabkan

terganggunya pertumbuhan dari tulang belakang embrio yang berujung pada deviasi dari aksis tubuh larva zebrafish. Kafein dan produk metabolitnya akan di oksidasi oleh enzim Xanthine Oxidase yang akan menghasilkan produk sampingan berupa radikal bebas. Radikal bebas tersebut dapat menyebabkan terjadinya proses stress oksidatif pada sel tubuh (Azam *et al.*, (2003). Radikal bebas memiliki elektron bebas yang dapat berikatan dengan lipid, protein, polisakarida, dan DNA (Winarsi, *et al.*, 2011). Radikal bebas merusak sel dengan memulai rantai reaksi stress oksidatif melalui tiga cara utama yaitu mengoksidasi DNA di dalam sel, peroksidase lipid pada membran sel, dan berikatan dengan protein (Winarsi, *et al.*, 2011). *Malondialdehyde* (MDA) adalah produk akhir dari reaksi peroksidase lipid yang bersifat mutagen pada DNA. Mutasi pada DNA akan berpengaruh terhadap proses organogenesis (Marnett, 1999). Proses stress oksidatif yang berlangsung pada saat fase organogenesis embrio dapat menyebabkan terjadinya gangguan pembentukan organ dari embrio (Boix *et al.*, 2013). Kafein dapat memberikan efek teratogenik yang menyebabkan gangguan pembentukan neural tube pada embrio ayam yang menyebabkan terjadinya gangguan organogenesis (Ma *et al.*, (2012). Pemaparan kafein pada embrio zebrafish mengalami retardasi pertumbuhan dan mengalami deformitas. Deformitas pada embrio zebrafish akan mempengaruhi kemampuan zebrafish untuk bertahan hidup dan berkompetisi dengan zebrafish lain, sehingga jika terdapat deformitas dimungkinkan bahwa ikan tersebut tidak akan bertahan hidup lama (Lantz-Mcpeak *et al.*, (2015).

Kafein dan produk metabolitnya dapat menyebabkan pelepasan kalsium akibat sintesis dari nitriot oksida (NO) pada ikatan dengan reseptor

ryanodine, pelepasan kalsium akibat aktivasi reseptor ryanodine akan menghambat proses osteogenesis (Umemura *et al.*, 2006).

Kafein dan produk metabolitnya, akan di oksidasi oleh xanthine oksidase menjadi asam urat, dengan produk sampingan radikal bebas yang bersifat sangat reaktif (Yamaoka-Yano and Mazzafera, 1999). Radikal bebas tersebut akan menyebabkan terjadinya proses stress oksidatif. Stress oksidatif dapat mempengaruhi proses osteogenesis pada embrio melalui dua mekanisme utama yaitu melalui keseimbangan antara osteoclast-osteoblast, dan angiogenesis (Grosso *et al.*, 2017). Stress oksidatif akan menyebabkan peningkatan dari difrensiasi osteoclast yang menyebabkan terjadinya peningkatan resorpsi tulang. Stress oksidatif menyebabkan peningkatan apoptosis dari osteoblast dan osteosit (Domazetovic, 2017).

Insulin-like growth factor (IGF-1) merupakan salah satu mediator penting dalam pertumbuhan otot dan tulang. Kafein dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan tulang salah satunya melalui mekanisme inhibisi dari IGF-1 (Locatelli dan Bianchi, 2014; Shangguan *et al.*, 2018). Paparan kafein juga dapat menyebabkan penurunan ekspresi gen col1A1 col2A1 dan aggrecan yang merupakan gen spesifik pada proses ossifikasi endochondral yang diakibatkan oleh hilangnya protein intraseluler. Proses ossifikasi endokntral berperan penting dalam pertumbuhan tulang axial tubuh termasuk didalamnya tulang belakang (Tan *et al.*, 2012).

Hasil penelitan menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah delima dengan konsentrasi 0,7 ppm yang digunakan sebagai kontrol negatif kedua diberikan pada embrio zebrafish dalam kelompok N2 dalam penelitian ini juga terbukti tidak menyebabkan adanya kelainan morfologi pada embrio zebrafish

dibandingkan dengan kelompok kontrol ($P=1.000$). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Mena *et al.*, (2011) bahwa pada kulit buah delima didapatkan senyawa antioksidan yang dapat melawan stress oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas. Wibowo *et al.*, (2018) dalam penelitiannya juga membuktikan bahwa kandungan ekstrak kulit buah delima bersifat aman dan memiliki tingkat toksisitas yang rendah pada zebrafish.

Ekstrak kulit buah delima dalam 5 konsentrasi yaitu 0,14 ppm, 0,28 ppm, 0,42 ppm, 0,56 ppm dan 0,70 ppm pada embrio zebrafish yang dipaparkan pada kafein murni dengan konsentrasi 100 ppm dalam kelompok perlakuan KFEKD 0,14, KFEKD 0,28, KFEKD 0,42, KFEKD 0,56, dan KFEKD 0,70 terbukti dapat menurunkan angka kejadian kurvatura spinal jika dibandingkan dengan kelompok N1 dengan nilai $p<0.05$. Pada penelitian yang dilakukan oleh Kumar *et al.*, (2013) menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah delima dapat memberikan proteksi terhadap reaksi stress oksidatif pada tikus wistar yang diinduksi dengan mengukukan merkuri klorida. Pemberian ekstrak kulit buah delima pada embrio zebrafish yang dipaparkan kafein secara invitro tidak seratus persen menghilangkan angka kejadian kurvatura spinal maupun kelainan morfologi lainnya. Kelainan morfologi yang disebabkan zat teratogen dapat terjadi melalui mekanisme stress oksidatif dapat dilawan menggunakan antioksidan endogen dalam tubuh seperti enzim antioksidan, maupun Vitamin C dan Vitamin E pada embrio dan *yolk sac*. Selain itu stress oksidatif juga dapat dilawan dengan antioksidan eksogen termasuk didalamnya Vitamin C, Vitamin E, asam folat, dan produk antioksidan sintesis (Ornoy, 2007). Pada ekstrak kulit buah delima terdapat banyak kandungan senyawa polifenol (anthocyanins, asam ellagic dan

ellagitannins, asam gallic dan gallotannins, flavanolol, dan proanthocyanidins), Vitamin C dan Vitamin E, dan Komponen antimicrobial yang berguna dalam melawan reaksi stress oksidatif yang disebabkan oleh ROS (*Reactive Oxygen Species*) melalui mekanisme antioksidan (Mena *et al.*, 2011).

Pemberian ekstrak kulit delima dapat menurunkan kejadian kurvatura spinal yang diinduksi oleh rantai stress oksidatif yang diperankan oleh senyawa punicalagin dan *ellagic acid*. Kedua zat tersebut merupakan senyawa antimutagen dan antikarsinogen, dengan cara menghambat proliferasi sel, transduksi, berikatan dengan radikal bebas, induksi enzim untuk detoksifikasi dan mencegah apoptosis sel (Wu *et al.*, 2011). Punicalagin yang terhidrolisa akan melepaskan *ellagic acid* yang akan memproteksi DNA dengan mengikat radikal bebas dengan ikatan kovalen (Wu *et al.*, 2011). Pemberian ekstrak kulit buah delima dapat meningkatkan aktivitas osteoblast dengan adanya peningkatan ALP, col1a1, col2a1, dan DDR2. Selain itu pemberian ekstrak kulit buah delima dapat mengurangi aktivitas osteoclast, keseimbangan antara osteoblast dan osteoclast berperan penting terhadap proses osteogenesis (Bahtiar *et al.*, 2014; Spilmont *et al.*, 2015).

Kandungan polifenol pada ekstrak kulit buah delima dapat memberikan proteksi terhadap stress oksidatif dengan berikatan dengan ROS (*Reactive Oxygen Species*), meningkatkan sistem antioksidan dalam tubuh, dan meningkatkan sistem imun. Secara *in vitro*, pada konsentrasi tinggi atau pada kondisi dengan peningkatan stress oksidatif, suplementasi senyawa polifenol dapat menyebabkan efek oksidatif stress menjadi lebih

buruk melalui mekanisme prooksidan, secara *in vivo* masih diperlukan berbagai penelitian lanjutan mengenai efek prooksidan dari ekstrak kulit buah delima (Danesi *et al.*, 2014).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah delima dengan konsentrasi 0,28 ppm menunjukkan aktivitas antioksidan yang paling baik jika dibandingkan dengan konsentrasi 0,42 ppm dan 0,56 ppm hal ini sesuai dengan karakteristik dari antioksidan yaitu pada konsentrasi tinggi dapat berubah menjadi prooksidan, seperti Vitamin C dan Vitamin E yang kehilangan kemampuan antioksidan pada dosis tinggi dan berubah menjadi senyawa prooksidan (Young dan Lowe, 2001). Namun jika dilihat dari gambar 5.1 diketahui bahwa terdapat penyimpangan tren pada konsentrasi 0,7 ppm sehingga diduga bahwa proses organogenesis pada embrio zebrafish tidak secara keseluruhan diperankan oleh aktivitas oksidan dan antioksidan, tetapi terdapat faktor faktor lain yang juga dapat mempengaruhi proses organogenesis, salah satunya adalah faktor internal dari masing masing individu, seperti kualitas telur, laju metabolisme, dan sistim imun dari masing masing individu (Reed and Jennings, 2011).

Vitamin C pada embrio zebrafish dalam kelompok KVC diketahui dapat menurunkan angka kejadian kurvatura spinal dibandingkan dengan embrio zebrafish dalam kelompok N1 ($p < 0.05$). Vitamin C merupakan salah satu senyawa antioksidan yang dapat bekerja dengan berikatan dengan radikal bebas turunan oksigen ataupun nitrogen. Vitamin C dapat berikatan dengan radikal bebas dengan mendonasikan elektron bebas berenergi tinggi kepada radikal bebas, sehingga keberadaan Vitamin C dapat mencegah proses stress oksidatif yang disebabkan oleh adanya radikal bebas. Vitamin

C dapat meningkatkan kemampuan aktivitas antioksidan dari Vitamin E melalui proses regenerasi dari bentuk oksidan Vitamin E (tocopherxyl radical) menjadi senyawa antioksidan (tocopherol). Selain memiliki komponen antioksidan, Vitamin C juga memiliki efek prooksidan dengan meningkatkan absorpsi besi melalui reduksi dari ion Fe^{3+} menjadi ion Fe^{2+} dari sumber selain heme. *Redox-active* ion (besi dan tembaga) membuat Vitamin C bertindak sebagai prooksidan yang berkontribusi dalam pembentukan *hydroxyl radical* yang menyebabkan oksidasi dari lipid, DNA, dan protein (Pehlivan, 2017). Vitamin C mampu memberikan efek protektif terhadap toksisitas butachlor secara signifikan menurunkan mortalitas dan malformasi pada embrio zebrafish (Xiang *et al.*, 2017). Dalam penelitian ini, pada kelompok Vitamin C dapat menurunkan kejadian kurvatura spinal namun tidak secara menyeluruh, diduga terdapat banyak faktor lain yang berperan dalam organogenesis dari embrio zebrafish.

Aktivitas antioksidan dari Vitamin C pada embrio zebrafish dalam kelompok KVC tidak lebih baik dari ekstrak kulit buah delima pada embrio zebrafish dalam kelompok KFEKD 0,14, KFEKD 0,28, KFEKD 0,42, dan KFEKD 0,70 ($p > 0.05$) dalam menurunkan angka kejadian kurvatura spinal terlihat pada gambar 5.3 bahwa jumlah embrio yang mengalami kurvatura spinal pada pada kelompok KVC memiliki jumlah embrio yang mengalami kurvatura spinal lebih banyak jika dibandingkan dengan kelompok KFEKD0,14, KFEKD0,28, KFEKD0,42, dan KFEKD0,70 Kulit buah delima mengandung flavonoid, Vitamin C dan Vitamin E, serta komponen antimikrobal (Opara, *et al.*, 2009). Diduga kemampuan antioksidan ekstrak kulit buah delima lebih unggul dibanding Vitamin C dikarenakan pada ekstrak

kulit buah delima terdapat banyak senyawa antioksidan selain Vitamin C, yaitu komponen flavonoid (anthocyanins, asam ellagic dan ellagitannins, asam gallic dan gallotannins, flavanolol, dan proanthocyanidins), Vitamin C dan Vitamin E, dan komponen antimikrobal (Mena *et al.*, 2011).

6.2 Survival Rate

Survival rate embrio zebrafish pada seluruh kelompok perlakuan tidak menunjukkan hasil yang signifikan ($p > 0.05$), dimana terjadi kematian embrio zebrafish yang masih dalam bentuk telur yang banyak dengan pola yang acak pada waktu 24 *hpf*. Kematian yang terjadi berpola acak dan tidak menentu. Setelah 24 *hpf* embrio yang masih hidup mayoritas dapat hidup hingga penelitian ini berakhir yaitu pada 120 *hpf* dapat dilihat pada gambar 5.2, Pada kelompok kontrol *survival rate* juga berada dibawah 80% sehingga terdapat faktor-faktor lain yang tidak diamati menyebabkan kematian pada embrio diluar dari perlakuan yang diberikan.

Survival rate kelompok KF terlihat lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan, meskipun demikian dapat diketahui bahwa pada kelompok KF terdapat kelainan morfologis yang cukup signifikan salah satu contohnya adalah adanya kurvatura spinal. Diduga jika waktu pengamatan diperpanjang kelompok KF yang memiliki kelainan morfologis akan mengalami kematian dalam jumlah besar karena ketidakmampuan untuk bersaing dengan ikan yang memiliki morfologi normal. Pada penelitian yang dilakukan oleh Lantz-Mcpeak *et al.*, (2015) embrio zebrafish yang mengalami malformasi tetapi tidak dilaporkan mengalami kematian, namun diperkirakan bahwa embrio yang mengalami malformasi tidak akan bertahan hidup lama.

Stress pada embrio zebrafish berperan terhadap kematian. Stress pada embrio zebrafish dapat berupa stress fisik yaitu penanganan ikan, pemindahan, dan berbagai gangguan fisik lainnya. Stress juga dapat berupa stress sosial yaitu isolasi dan pengelompokan embrio. Stressor juga dapat bersal dari lingkungan, seperti kualitas air, komponen oksigen dan nitrogen, pH, suhu, dan salinitas dan termasuk zat-zat terlarut lain. Infeksi dari pathogen juga dapat bertindak sebagai stressor, stress yang berlangsung lama dapat menyebabkan penurunan dari kekebalan tubuh ikan sehingga rentan terhadap infeksi (Clark, et al., 2011).

Pan *et al.*, (2011) melakukan penelitian menggunakan hewan coba zebrafish dengan memberikan pemaparan dan eksklusi embrio zebrafish pada saat fase 64 *Cell stage*. Pada penelitian ini dimungkinkan kematian pada 24 jam pertama terjadi karena tidak dilakukan eksklusi telur pada fase pembelahan 64 sel, diduga kematian embrio dalam telur berada pada fase ini. Sawant, Zhang dan Li, (2001) mengamati pengaruh salinitas air pada telur zebrafish yang berada pada fase pembelahan. Ditemukan bahwa abnormalitas atau kegagalan dalam fase pembelahan akan menyebabkan embrio dalam telur mati, dan pada fase ini telur lebih sensitif dan sering mengalami gagal dalam pembelahan jika dibandingkan dengan fase gastrulasi. *Survival rate* dari embrio zebrafish dalam penelitian yang dilakukan oleh Pan *et al.*, (2011) tidak mengalami penurunan yang signifikan. Berbeda dengan penelitian ini dimana terjadi penurunan yang signifikan pada 24 *hpf* mengacu pada gambar 5.2

Terdapat beberapa faktor yang dimungkinkan berperan dalam kejadian kematian yang cukup banyak di 24 jam pertama. Jumlah embrio

yang ideal dalam 100 ml air dengan kedalaman kurang lebih 3 cm dari permukaan adalah 20 embrio, atau 20-25 embrio pada cawan petri dengan ukuran 35mm dengan penggantian medium secara berkala (Westerfield, 2007). Dalam penelitian ini satu *well* dalam *wellplate* berkapasitas 8 mL, dan dalam satu *well* berisikan 20 embrio. Setiap 24 jam dilakukan penggantian medium embrio, sehingga penggunaan metode 20 embrio dalam 1 *well* tidak menjadi salah satu penyebab kematian dari embrio zebrafish. Temperatur ideal untuk embrio zebrafish dapat berkembang dengan baik adalah 28,5°C (Matthews, *et al.*, 2002). Dalam penelitian ini dilakukan monitoring suhu setiap harinya menggunakan termometer alkohol, dan didapatkan bahwa suhu berfluktuasi antara 27°C - 29°C. Telur dengan kualitas yang baik adalah telur fertil yang melalui fase pembelahan awal dan tetap tumbuh dengan normal hingga fase gastrulasi. Telur yang sehat adalah telur yang bersifat translusen dan berwarna sedikit kekuningan (Reed dan Jennings, 2011). Dalam penelitian ini telur yang dipilih sudah sesuai dengan kriteria telur sehat dan diamati di bawah mikroskop, namun pada pengamatan di bawah mikroskop sebagian telur masih berada pada fase pembelahan dan fase blastula, dan tidak dilakukan pengamatan lanjutan hingga fase gastrula. Sehingga dimungkinkan bahwa embrio zebrafish yang masih berada dalam telur yang rawan terkena infeksi bakteri, fungi, maupun virus karena sistem imun dalam tubuh embrio belum terbentuk (Rosowski *et al.*, 2018). Dalam penelitian ini tidak dapat dilakukan pengontrolan terhadap infeksi sehingga dapat dimungkinkan bahwa penyebab kematian salah satunya adalah infeksi. Telur yang terinfeksi jamur akan memberikan gambaran hifa seperti kapas di bagian dinding telur jika diamati

menggunakan mikroskop (Chen *et al.*, 2015). Medium embryo dapat diberikan methylene blue untuk mengurangi resiko infeksi jamur. Dalam medium embryo yang digunakan dalam penelitian ini tidak mengandung methylene blue sehingga diduga menjadi salah satu penyebab kematian (Westerfield, 2007).

6.3 Keterbatasan Penelitian

Dalam penelitian ini terdapat beberapa keterbatasan penelitian antara lain sebagai berikut

1. Dalam penelitian ini ekstrak kulit buah delima yang digunakan berupa ekstrak kasar (*crude extract*) sehingga tidak dapat diidentifikasi untuk pengaruh dari masing-masing komponen dari ekstrak kulit buah delima terhadap kemampuan antioksidan dalam melawan reaksi stress oksidatif yang diinduksi oleh kafein. Penelitian ini merupakan penelitian awal yang melihat kemampuan dari ekstrak kulit buah delima terhadap kafein
2. *Survival rate* dari kelompok kontrol kurang dari 80% sehingga hasil dari penelitian yang didapat tidak murni dari pengaruh efek kafein dan ekstrak kulit buah delima namun terdapat faktor faktor lain yang berperan, faktor eksternal dari lingkungan, dan faktor internal dari masing masing embryo. Pelaksanaan penelitian dilakukan di lingkungan yang terkontrol dan dilakukan pembersihan medium setiap harinya

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak kulit buah delima berpengaruh dalam menurunkan kejadian kurvatura spinal pada larva zebrafish pada usia 72 *hpf* yang dipapar kafein dengan persentase 16,67% (KFEKD 0,56 ppm), 12,82% (KFEKD 0,14 ppm), 11,11% (KFEKD 0,42 ppm), 5,13% (KFEKD 0,70 ppm) dan 5,71% (KFEKD 0,28 ppm) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dengan persentase 52.50% ($p < 0.05$).
2. Pemberian ekstrak kulit buah delima tidak berpengaruh terhadap peningkatan *survival rate* larva zebrafish yang dipapar kafein dengan persentase tertinggi terendah berturut-turut dengan 68% (KFEKD 0,70 ppm); 65% (KFEKD 0,56 ppm); 55% (KFEKD 0,42 ppm) ; 50% (KFEKD 0,14 ppm); 48% (KFEKD 0,28 ppm) demikian juga dengan pemberian Vitamin C 30 ppm dengan persentase 66%, yang dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif kafein dengan persentase 68% dengan nilai ($p > 0.05$).

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan pengamatan yang lebih sering pada embrio zebrafish pada fase kritis yaitu 24 *hpf*.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme antioksidan ekstrak kulit buah delima pada tingkat molekuler berupa aktivitas enzimatik dan kadar ROS pada embrio zebrafish dalam proses organogenesis.

3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui kemampuan antioksidan dari masing masing komponen polifenol dari ekstrak delima terhadap reaksi stress oksidatif.
4. Perlu dilakukan penelitian lanjutan menggunakan masing masing komponen polifenol yang diisolasi dari ekstrak kulit buah delima untuk melihat komponen polifenol manakah yang berperan penting terhadap kemampuan antioksidan ekstrak kulit buah delima pada embrio zebrafish yang dipapar dengan kafein.



Daftar Pustaka

- Agyemang-yeboah, F. and Oppong, S. Y. (2013) '3 . Caffeine : The wonder compound , chemistry and properties', *Topical Series in Health Science 1 (TSHS-1)*.
- Arnaud, M. J. (1993) 'Metabolism of Caffeine and Other Components of Coffee', *Caffeine, Coffee and Health*.
- Avdesh, A. *et al.* (2012) 'Regular care and maintenance of a Zebrafish (Danio rerio) laboratory: An introduction', *Journal of Visualized Experiments*. doi: 10.3791/4196.
- Azam, S. *et al.* (2003) 'Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine', *Medical Science Monitor*.
- Bahtiar, A. *et al.* (2014) 'Polar Fraction of Punica granatum L: peel extract increased osteoblast number on ovariectomized rat bone', ~ 65 ~ *International Journal of Herbal Medicine*.
- Basnet, R. M. *et al.* (2017) 'Methylxanthines induce structural and functional alterations of the cardiac system in zebrafish embryos', *BMC Pharmacology and Toxicology*. doi: 10.1186/s40360-017-0179-9.
- Boix, N. *et al.* (2013) 'The zebrafish embryo as a model for studying oxidative stress effects during embryonic development', *Reproductive Toxicology*. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.06.044.
- Buchan, J. G. *et al.* (2014) 'Kinesin family member 6 (kif6) is necessary for spine development in zebrafish', *Developmental Dynamics*. doi: 10.1002/dvdy.24208.
- Chen, C., Pearson, A. M. and Gray, J. I. (1992) 'Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds', *Food Chemistry*. doi: 10.1016/0308-8146(92)90170-7.
- Chen, Y. H. *et al.* (2008) 'Movement disorder and neuromuscular change in zebrafish embryos after exposure to caffeine', *Neurotoxicology and Teratology*. doi: 10.1016/j.ntt.2008.04.003.
- Chen, Y. Z. *et al.* (2015) 'Zebrafish egg infection model for studying *Candida albicans* adhesion factors', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0143048.
- Clark, K. J., Boczek, N. J. and Ekker, S. C. (2011) 'Stressing zebrafish for behavioral genetics', *Reviews in the Neurosciences*. doi: 10.1515/RNS.2011.007.
- Danesi, F. *et al.* (2014) 'Mixed pro-and anti-oxidative effects of pomegranate polyphenols in cultured cells', *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms151119458.
- Devi Rajeswari, V. (2016) 'Nutritive value and biological properties of indian plant

Punica granatum – A perspective review', *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*.

Domazetovic, V. (2017) 'Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants', *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. doi: 10.11138/ccmbm/2017.14.1.209.

Figuroa-Méndez, R. and Rivas-Arancibia, S. (2015) 'Vitamin C in health and disease: Its role in the metabolism of cells and redox state in the brain', *Frontiers in Physiology*. doi: 10.3389/fphys.2015.00397.

Van Gennip, J. L. M., Boswell, C. W. and Ciruna, B. (2018) 'Neuroinflammatory signals drive spinal curve formation in zebrafish models of idiopathic scoliosis', *Science Advances*. doi: 10.1126/sciadv.aav1781.

Gerhard, G. S. *et al.* (2002) 'Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*)', *Experimental Gerontology*. doi: 10.1016/S0531-5565(02)00088-8.

Grosso, A. *et al.* (2017) 'It takes two to tango: Coupling of angiogenesis and osteogenesis for bone regeneration', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. doi: 10.3389/fbioe.2017.00068.

Guo, C. *et al.* (2003) 'Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay', *Nutrition Research*. doi: 10.1016/j.nutres.2003.08.005.

Gutiérrez-Lovera, C. *et al.* (2017) 'The potential of zebrafish as a model organism for improving the translation of genetic anticancer nanomedicines', *Genes*. doi: 10.3390/genes8120349.

Hayes, A. J. *et al.* (2013) 'Spinal Deformity in Aged Zebrafish Is Accompanied by Degenerative Changes to Their Vertebrae that Resemble Osteoarthritis', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0075787.

Held, P. (2012) 'An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Cells', *BioTek Instruments*.

Holtzman, N. G. *et al.* (2016) 'Learning to fish with genetics: A primer on the vertebrate model *Danio rerio*', *Genetics*. doi: 10.1534/genetics.116.190843.

Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research (2002) 'Caffeine for the Sustainment of Mental Task Performance: Formulations for Military Operations', *Nutrition Today*. doi: 10.1097/00017285-200201000-00009.

ITIS.gov (no date) '*Danio rerio*'.

Kementrian Kesehatan Republik (2017) 'Profile Kesehatan Indonesia 2017', *Ministry of Health Indonesia*. doi: 10.1002/qj.

Kim, Y. W. and Byzova, T. V. (2014) 'Oxidative stress in angiogenesis and vascular

- disease', *Blood*. doi: 10.1182/blood-2013-09-512749.
- Kimmel, C. B. *et al.* (1995) 'Stages of embryonic development of the zebrafish', *Developmental Dynamics*. doi: 10.1002/aja.1002030302.
- Kumar, D. *et al.* (2013) 'Pomegranate (*Punica granatum*) peel extract provides protection against mercuric chloride-induced oxidative stress in Wistar strain rats', *Pharmaceutical Biology*. doi: 10.3109/13880209.2012.738333.
- Laforgia, N. *et al.* (2018) 'The role of oxidative stress in the pathomechanism of congenital malformations', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2018/7404082.
- Lantz-Mcpeak, S. *et al.* (2015) 'Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos', *Journal of Applied Toxicology*. doi: 10.1002/jat.3029.
- Li, Y. *et al.* (2006) 'Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract', *Food Chemistry*. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.02.033.
- Lipton, R. B. *et al.* (2017) 'Caffeine in the management of patients with headache', *Journal of Headache and Pain*. doi: 10.1186/s10194-017-0806-2.
- Locatelli, V. and Bianchi, V. E. (2014) 'Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis', *International Journal of Endocrinology*. doi: 10.1155/2014/235060.
- Lucitt, M. B. *et al.* (2008) 'Analysis of the zebrafish proteome during embryonic development', *Molecular and Cellular Proteomics*. doi: 10.1074/mcp.M700382-MCP200.
- Lykkesfeldt, J., Michels, A. J. and Frei, B. (2014) 'Vitamin C', *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*. American Society for Nutrition, 5(1), pp. 16–18. doi: 10.3945/an.113.005157.
- Ma, Z. lai *et al.* (2012) 'Exploring the caffeine-induced teratogenicity on neurodevelopment using early chick embryo', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0034278.
- Ma, Z. lai *et al.* (2014) 'Excess caffeine exposure impairs eye development during chick embryogenesis', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. doi: 10.1111/jcmm.12260.
- Marnett, L. J. (1999) 'Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde', *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. doi: 10.1016/S0027-5107(99)00010-X.
- Matthews, M., Trevarrow, B. and Matthews, J. (2002) 'A virtual tour of the Guide for zebrafish users', *Lab Animal*. doi: 10.1038/5000140.
- Mayo Clinic Staff (2017) 'Nutrition and healthy eating : Caffeine content for coffee, tea, soda and more', *Mayo Clinic*.

de Mejia, E. G. and Ramirez-Mares, M. V. (2014) 'Impact of caffeine and coffee on our health', *Trends in Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1016/j.tem.2014.07.003.

Mena, P. *et al.* (2011) 'Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain', *Journal of the Science of Food and Agriculture*. doi: 10.1002/jsfa.4411.

Meyers, J. R. (2018) 'Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism', *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*. doi: 10.1002/cpet.19.

Mohamad, T. and Khalil, A. (2015) 'Effect of Agriculture Waste: Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruits Peel on Some Important Phytopathogenic Fungi and Control of Tomato Damping-off', *Journal of Applied Life Sciences International*. doi: 10.9734/jalsi/2015/16362.

Monteiro, J. P. *et al.* (2016) 'Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: Trying to make sense of all the promises and the drawbacks', *Molecules*. doi: 10.3390/molecules21080974.

Nair, A. and Jacob, S. (2016) 'A simple practice guide for dose conversion between animals and human', *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*. doi: 10.4103/0976-0105.177703.

Nasiadka, A. and Clark, M. D. (2012) 'Zebrafish breeding in the laboratory environment', *ILAR Journal*. doi: 10.1093/ilar.53.2.161.

Nge, S. T., Martosupono, M. and Karwur, F. F. (2015) 'The Polyphenolics and Health Effects of Pomegranate', *Sains Medika*. doi: 10.26532/sainsmed.v6i1.342.

Opara, L. U., Al-Ani, M. R. and Al-Shuaibi, Y. S. (2009) 'Physico-chemical properties, vitamin C content, and antimicrobial properties of pomegranate fruit (*punica granatum* L.)', *Food and Bioprocess Technology*. doi: 10.1007/s11947-008-0095-5.

Ornoy, A. (2007) 'Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy', *Reproductive Toxicology*. doi: 10.1016/j.reprotox.2007.04.004.

Padayatty, S. J. *et al.* (2003) 'Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention', *Journal of the American College of Nutrition*. doi: 10.1080/07315724.2003.10719272.

Pan, H. *et al.* (2011) 'Aquatic toxicity assessment of single-walled carbon nanotubes using zebrafish embryos', *Journal of Physics: Conference Series*, 304, p. 12026. doi: 10.1088/1742-6596/304/1/012026.

Pandey, K. B. and Rizvi, S. I. (2009) 'Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.4161/oxim.2.5.9498.

- Pehlivan, F. E. (2017) 'Vitamin C: An Antioxidant Agent', in *Vitamin C*. doi: 10.5772/intechopen.69660.
- Prastyo, H. (2017) *Statistik Dasar: Sebuah Panduan untuk Peneliti Pemula*.
- Reed, B. and Jennings, M. (2011) 'Guidance on the housing and care of Zebrafish *Danio rerio*', *Research Animals Department, Science Group, RSPCA*.
- Reimers, M. J. *et al.* (2006) 'Ethanol-dependent toxicity in zebrafish is partially attenuated by antioxidants', *Neurotoxicology and Teratology*. doi: 10.1016/j.ntt.2006.05.007.
- Retni, R., Margawati, A. and Widjanarko, B. (2017) 'Pengaruh status gizi & asupan gizi ibu terhadap berat bayi lahir rendah pada kehamilan usia remaja', *JURNAL GIZI INDONESIA*. doi: 10.14710/jgi.5.1.14-19.
- Rogers, P. J. *et al.* (2008) 'Time for tea: Mood, blood pressure and cognitive performance effects of caffeine and theanine administered alone and together', *Psychopharmacology*. doi: 10.1007/s00213-007-0938-1.
- Rohman, A. *et al.* (2010) 'Antioxidant activity, total phenolic, and total flavonoid of extracts and fractions of red fruit (*Pandanus conoideus* Lam)', *International Food Research Journal*.
- Rosowski, E. E. *et al.* (2018) 'The Zebrafish as a Model Host for Invasive Fungal Infections', *Journal of Fungi*. doi: 10.3390/jof4040136.
- Sawant, M. S., Zhang, S. and Li, L. (2001) 'Effect of salinity on development of zebrafish, *Brachydanio rerio*', *Current Science*.
- Shangguan, Y. *et al.* (2018) 'Intrauterine Programming of Glucocorticoid–Insulin-Like Growth Factor-1 Axis–Mediated Developmental Origin of Osteoporosis Susceptibility in Female Offspring Rats with Prenatal Caffeine Exposure', *American Journal of Pathology*. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.08.008.
- Shebis, Y. *et al.* (2013) 'Natural Antioxidants: Function and Sources', *Food and Nutrition Sciences*, 04, pp. 643–649. doi: 10.4236/fns.2013.46083.
- Souza, A. C. de *et al.* (2016) 'CAFFEINE TERATOGENICITY IN RATS: MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION AND HYPOTHESIZED MECHANISMS', *Clinical & Biomedical Research*. doi: 10.4322/2357-9730.68287.
- Souza, M. A. *et al.* (2013) 'Antioxidant activity elicited by low dose of caffeine attenuates pentylene-tetrazol-induced seizures and oxidative damage in rats', *Neurochemistry International*. doi: 10.1016/j.neuint.2013.02.021.
- Spence, R. *et al.* (2007) 'Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh', *Journal of Fish Biology*. doi: 10.1111/j.1095-8649.2007.01492.x.
- Spence, R. *et al.* (2008) 'The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*'

- Biological Reviews*. doi: 10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x.
- Spilmont, M. *et al.* (2015) 'Pomegranate peel extract prevents bone loss in a preclinical model of osteoporosis and stimulates osteoblastic differentiation in vitro', *Nutrients*. doi: 10.3390/nu7115465.
- Stein, L., Kamas, J. and Nesbitt, M. (2015) 'Texas Fruit and Nut Production', pp. 1–6.
- Tan, Y. *et al.* (2012) 'Caffeine-induced fetal rat over-exposure to maternal glucocorticoid and histone methylation of liver IGF-1 might cause skeletal growth retardation', *Toxicology Letters*. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.09.007.
- Temple, J. L. (2009) 'Caffeine use in children: What we know, what we have left to learn, and why we should worry', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.01.001.
- Temple, J. L. *et al.* (2017) 'The Safety of Ingested Caffeine: A Comprehensive Review', *Frontiers in Psychiatry*. doi: 10.3389/fpsy.2017.00080.
- Thisse, B. *et al.* (2004) *The Zebrafish: Genetics, Genomics, and Informatics, Methods in Cell Biology*. doi: 10.1016/S0091-679X(04)77027-2.
- Tomasiewicz, H. *et al.* (2014) 'A line of zebrafish with development of abnormal spinal curvatures', *Scoliosis*. doi: 10.1186/1748-7161-9-s1-o44.
- Tzulker, R. *et al.* (2007) 'Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi: 10.1021/jf071413n.
- Umemura, T. *et al.* (2006) 'Effects of Acute Administration of Caffeine on Vascular Function', *American Journal of Cardiology*. doi: 10.1016/j.amjcard.2006.06.058.
- USDA (2019) 'Classification for Kingdom Plantae Down to Species *Punica Granatum L.*'
- Utari, H., Utomo, W. and Dewi, W. N. (2018) 'Studi Fenomenologi: Pengalaman Penderita Gangguan Muskuloskeletal Yang Menjalani Terapi Yoga', *JOM Fkp*, 5(2), pp. 400–409.
- Vinson, R. K. and Hales, B. F. (2001) 'Nucleotide excision repair gene expression in the rat conceptus during organogenesis', *Mutation Research - DNA Repair*. doi: 10.1016/S0921-8777(01)00087-8.
- Westerfield, M. (2007) 'The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 5th Edition', *University of Oregon Press, Eugene (Book)*.
- Wibowo, I. *et al.* (2018) 'Ethanol extract of pomegranate (*Punica granatum L*) peel: Acute toxicity tests on zebrafish (*Danio rerio*) embryos and its toxicity prediction by in silico', *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. doi:

10.7324/JAPS.2018.8611.

Wierzejska, R. *et al.* (2014) 'Comparison of maternal and fetal blood levels of caffeine and its metabolite. A pilot study', *Ginekologia Polska*. doi: 10.17772/gp/1760.

Winarsi, H., Wijayanti, S. P. M. and Purwanto, A. (2011) 'Profil Lipid, Peroksidasi Lipid, dan Status Inflamatif Wanita Penderita Sindrom Metabolik', *Kesmas: National Public Health Journal*. doi: 10.21109/kesmas.v5i5.129.

Wu, M. *et al.* (2011) 'Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol A, nonylphenol, and their mixture', *Environmental Toxicology and Chemistry*. doi: 10.1002/etc.634.

Xiang, Q. *et al.* (2017) 'Oxidative Stress Response Induced by Butachlor in Zebrafish Embryo/Larvae: The Protective Effect of Vitamin C', *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100. doi: 10.1007/s00128-017-2245-9.

Yamaoka-Yano, D. M. and Mazzafera, P. (1999) 'Catabolism of caffeine and purification of a xanthine oxidase responsible for methyluric acids production in *Pseudomonas putida* L', *Revista de Microbiologia*. doi: 10.1590/S0001-37141999000100013.

Yeh, C. H. *et al.* (2012) 'Caffeine treatment disturbs the angiogenesis of zebrafish embryos', *Drug and Chemical Toxicology*. doi: 10.3109/01480545.2011.627864.

Yoshikawa, T. and Naito, Y. (2002) 'What is oxidative stress?', *Jpn Med Assoc J*, 45, pp. 271–276.

Young, A. J. and Lowe, G. M. (2001) 'Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids', *Archives of Biochemistry and Biophysics*. doi: 10.1006/abbi.2000.2149.

Yussif, N. (2018) 'Vitamin C', in. doi: 10.5772/intechopen.81783.

Zalukhu, M.L., Pyma, A.R., Pinzon, R. T. (2016) 'Proses Menua, Stres Oksidatif', *CDK Journal*, 43(10), pp. 733–736.

Zhao, Z. (2016) 'Reevaluation of Antioxidative Strategies for Birth Defect Prevention in Diabetic Pregnancies', *Journal of Biomolecular Research & Therapeutics*. doi: 10.4172/2167-7956.1000145.