



PENGARUH EKSTRAK KULIT BUAH DELIMA (*Punica granatum L.*)

**TERHADAP DENYUT JANTUNG DAN EDEMA PERIKARDIUM EMBRIO IKAN
ZEBRA (*Danio rerio*) YANG TERPAPAR KAFEIN SECARA *IN VITRO***

Tugas Akhir

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan



Intan Wahyu Cahyani

155070607111014

PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

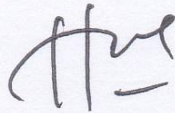
**PENGARUH EKSTRAK KULIT BUAH DELIMA (*Punica granatum L.*)
TERHADAP DENYUT JANTUNG DAN EDEMA PERIKARDIUM EMBRIO IKAN
ZEBRA (*Danio rerio*) YANG TERPAPAR KAFEIN SECARA *IN VITRO***

Oleh :

Intan Wahyu Cahyani
NIM 155070607111014

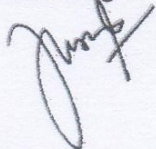
Telah diuji pada
Hari : Selasa
Tanggal : 5 Maret 2019
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji – I



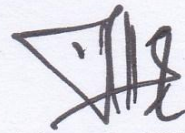
Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes
NIP 197511252005012001

Pembimbing I / Penguji II



dr. Yhusi Karina Rizkawati, M.Sc
NIP. 2014058005122001

Pembimbing II / Penguji III



Miftahul Jannah, SST, M.Keb
NIP 2016118605162001

Mengetahui
Ketua Program Studi Sarjana Kebidanan



Linda Ratnawati, SST, M.Kes
NIP 198409132014042001



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Intan Wahyu Cahyani

NIM : 155070607111014

Program Studi : Program Studi S1 Kebidanan

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

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

Malang, 5 Maret 2019

Yang membuat pernyataan,

(Intan Wahyu Cahyani)

NIM. 155070607111014



KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Pengaruh Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum L.*) terhadap Denyut Jantung dan Edema Perikardium Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*) yang Terpapar Kafein secara *In vitro*”.

Ketertarikan penulis akan topik ini didasari oleh banyaknya konsumsi kafein umumnya pada masyarakat, khususnya pada ibu hamil yang dapat berdampak pada janinnya. Penelitian terdahulu menjelaskan bahwa kafein dapat menyebabkan perubahan pada denyut jantung janin, aktivitas, malformasi atau bahkan kematian janin. Salah satu cara untuk mengurangi efek kafein adalah dengan mengonsumsi antioksidan yang cukup tinggi. Salah satu buah yang memiliki antioksidan tinggi adalah buah delima, terutama pada bagian kulitnya. Antioksidan berfungsi sebagai penangkal radikal bebas yang erat kaitannya dengan banyak penyakit, terutama penyakit kardiovaskuler. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh pemberian ekstrak buah delima (*Punica granatum*) dalam menurunkan efek dari pemberian kafein terhadap denyut jantung janin dan kejadian edema perikardium pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*).

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

1. Jajaran dekanat Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Ibu Linda Ratna Wati, SST, M.Kes sebagai Ketua Program Studi S1 Kebidanan yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di PS S1 Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.



3. dr. Yhusi Karina Riskawati, M.Sc sebagai dosen pembimbing 1 yang senantiasa membimbing dengan sabar, memberikan banyak motivasi dan saran yang membangun, serta memberikan solusi terhadap masalah yang dihadapi penulis selama proses penelitian, sehingga penulis dapat menulis dengan baik dan dapat menyelesaikan proposal Tugas Akhir ini.
4. Ibu Miftahul Jannah, SST, M.Keb sebagai dosen pembimbing 2 yang banyak memberikan saran kepada penulis terutama terkait dengan bidang kebidanan sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal Tugas Akhir ini.
5. Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes selaku penguji utama yang memberikan banyak masukan dan saran untuk menyempurnakan tugas akhir ini.
6. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB, yang telah membantu melancarkan urusan administrasi, sehingga penulis dapat melaksanakan proposal Tugas Akhir dengan lancar.
7. Yang tercinta umi, abi, keluarga dan teman-teman terdekat atas segala pengertian, semangat, motivasi dan kasih sayangnya.
8. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

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

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

Malang, 21 Mei 2018

Penulis



ABSTRAK

Cahyani, Intan Wahyu. 2019. Pengaruh Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum L.*) terhadap Denyut Jantung dan Edema Perikardium Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*) yang Terpapar Kafein secara *In vitro* Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Kebidanan, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Yhusi Karina, M.Sc, (2) Miftahul Jannah, SST, M.Keb.

Upaya mengurangi morbiditas dan mortalitas ibu dan bayi dapat dilakukan dengan memperhatikan konsumsi pada masa kehamilan, salah satunya adalah konsumsi kafein. Kafein dapat menyebabkan gangguan dan kegagalan pembentukan jantung janin. Irama denyut jantung yang tidak normal akibat konsumsi kafein menjadi tanda gangguan fungsi jantung yaitu *fetal distress*. Kafein bersifat antagonis terhadap reseptor adenosine dan vasokonstriktif terhadap pembuluh darah uteroplasenta pada ibu hamil, sehingga menyebabkan hipoksia janin dan stres oksidatif yang menginduksi kerusakan komponen seluler. Kerusakan tersebut dapat diatasi dengan senyawa antioksidan. Salah satu buah yang mengandung antioksidan tinggi adalah buah delima, terutama pada kulitnya. Kulit delima menunjukkan kemampuan menangkal radikal bebas tertinggi dibandingkan dengan buah lain, mengurangi stress oksidatif dan menunjukkan efek cardioprotective. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak kulit delima terhadap denyut jantung dan edema perikardium embrio ikan zebra yang terpapar kafein secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan desain eksperimental post-test only control group. Sampel terbagi menjadi 8 kelompok yaitu kelompok kontrol, kontrol negatif (kafein 100 ppm), kontrol positif (kafein 100 ppm + Vitamin C 30 ppm), ekstrak kulit delima dengan konsentrasi 0,14 ppm, 0,28 ppm, 0,42 ppm, 0,56 ppm dan 0,7 ppm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kulit delima memberikan pengaruh yang signifikan terhadap denyut jantung ($p=0.000$) dengan Uji *One Way ANOVA* dan edema perikardium ($p=0.000$) dengan Uji *Kruskal-Wallis*. Uji regresi dan korelasi menunjukkan bahwa terdapat pengaruh dan hubungan negatif yang signifikan pada pemberian ekstrak kulit delima terhadap denyut jantung dan edema perikardium. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak kulit delima sebagai antioksidan dapat menurunkan denyut jantung dan kejadian edema perikardium yang terpapar kafein.

Kata kunci: **Kulit Delima, Kafein, Denyut Jantung, Edema Perikardium**



ABSTRAK

Cahyani, Intan Wahyu. 2019. Effect of Pomegranate Peel Extract on Heart Rate and Pericardial Edema in Caffeine-exposed Zebrafish Embryo Model. Final Assignment, Midwifery Program, Medical Faculty, University of Brawijaya. Supervisors: (1) dr. Yhusi Karina, M.Sc, (2) Miftahul Jannah, SST, M.Keb.

Efforts to reduce maternal and infant morbidity and mortality can be done by paying attention to consumption during pregnancy, one of them is the caffeine intake. Caffeine can cause interference and failure of fetal heart formation. Abnormal heart rate rhythm due to caffeine consumption is a sign of heart dysfunction on fetus as known as fetal distress. Caffeine is antagonistic to adenosine and vasoconstrictive receptors of utero-placental blood vessels in pregnant women, causing fetal hypoxia and oxidative stress which induces cellular component damage. The damage can be overcome with antioxidant compounds. One of fruit that contains high antioxidants is pomegranates, especially on its peel. Pomegranate peel shows the highest ability to counteract free radicals compared to other fruits, reducing oxidative stress and showing cardioprotective effects. The aim of this study is to determine the effect of pomegranate peel extract to caffeine exposure on heart rate and pericardial edema of zebrafish embryo as animal model. This study used the post-test only control group experimental design. Zebrafish sample was divided into 8 groups: control group (without any exposure), negative control (caffeine 100 ppm), positive control (caffeine 100 ppm + Vitamin C 30 ppm), pomegranate peel extract with various concentrations of 0.14 ppm, 0.28 ppm, 0.42 ppm, 0.56 ppm and 0.7 ppm that was combined with caffeine 100 ppm. The results showed that there were significant differences on both heart rate ($p = 0.000$) by using *One Way ANOVA Test* and pericardium edema ($p = 0.000$) by using the *Kruskal-Wallis Test* among caffeine exposure only group and all pomegranate peel concentration group. Meanwhile, regression and correlations test showed that there were significant effects and negative relationships on the administration of pomegranate peel extracts to heart rate and pericardial edema. It concluded pomegranate skin extract as an antioxidant can reduce heart rate and the incidence of pericardial edema on caffeine-exposed zebrafish.

Keywords: Pomegranate Peel, Caffeine, Heart Rate, Pericardial Edema, Zebrafish Embryo Model



DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	i
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	ii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat	6
1.4.1 Manfaat Akademis	6
1.4.2 Manfaat Praktis	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Kafein	7
2.1.1 Sifat Kimia Kafein	7
2.1.2 Sumber Kafein	7
2.1.3 Metabolisme Kafein	10
2.1.4 Efek Farmakologis Kafein	13
2.2 Stres Oksidatif	18
2.3 Radikal Bebas	19
2.4 Antioksidan	21
2.4.1 Definisi	21
2.4.2 Klasifikasi	23
2.5 Buah Delima	24
2.5.1 Deskripsi Buah Delima	24
2.5.2 Kandungan Kulit Buah Delima	26
2.6 Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>)	33



2.6.1 Klasifikasi	33
2.6.2 Karakteristik.....	35
2.6.3 Pertumbuhan dan Perkembangan Embrio	36
2.6.4 Perkembangan Jantung Ikan Zebra.....	39
2.7 Denyut Jantung.....	43
2.7.1 Proses Terbentuknya Denyut Jantung Manusia.....	43
2.7.2 Denyut Jantung Janin.....	47
2.7.3 Proses Terbentuknya Denyut Jantung Embrio Ikan Zebra.....	50
2.8 Edema perikardium.....	52
BAB III. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	54
3.1 Kerangka Konsep.....	54
3.2 Hipotesis Penelitian.....	58
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	59
4.1 Desain Penelitian	59
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	59
4.3 Populasi dan Sampel Penelitian.....	59
4.4 Variabel Penelitian.....	61
4.4.1 Variabel Bebas	62
4.4.2 Variabel Terikat	62
4.5 Definisi Operasional	62
4.6 Alat dan Bahan Penelitian	63
4.6.1 Bahan.....	63
4.6.2 Alat.....	64
4.7 Prosedur Penelitian	64
4.7.1 Penentuan Konsentrasi Kafein dan Kulit Delima.....	64
4.7.2 Proses Ekstraksi Kulit Buah Delima (<i>Punica granatum L</i>).....	65
4.7.3 Pembuatan Cairan Embrionik.....	66
4.7.4 Pengenceran Ekstrak Kulit Delima.....	66
4.7.5 Pemeliharaan Ikan.....	67
4.7.6 Pengawinan Ikan.....	67
4.7.7 Pengambilan Telur	68
4.7.8 Kultur Embrio.....	68
4.7.9 Pemaparan Kafein.....	68
4.7.10 Pemberian Ekstrak Kulit Buah Delima (<i>Punica granatum L</i>).....	69
4.7.11 Penghitungan Denyut Jantung Embrio Ikan Zebra	70



4.7.12 Pengamatan Perikardium Larva Ikan Zebra	71
4.8 Alur Penelitian	72
BAB V. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....	74
5.1 Denyut Jantung.....	74
5.1.1 Hasil Penelitian Denyut Jantung Ikan Zebra	74
5.1.2 Analisis Data.....	75
5.2 Edema Perikardium.....	80
5.2.1 Hasil Penelitian Edema Perikardium Ikan Zebra	80
5.2.2 Analisis Data.....	84
BAB VI. PEMBAHASAN.....	87
6.1 Pengaruh Perlakuan terhadap Denyut Jantung.....	88
6.2 Pengaruh Perlakuan terhadap Edema Perikardium.....	96
6.3 Keterbatasan Penelitian	105
BAB VII. PENUTUP	106
7.1 Kesimpulan	106
7.2 Saran	107
DAFTAR PUSTAKA	108



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan Kafein dalam beberapa Produk Minuman, Makanan, dan Obat	9
Tabel 2.2 Spesies Oksigen Reaktif (ROS).....	21
Tabel 2.3 Aktivitas Antioksidan pada 28 Buah (mmol/100g w).....	28
Tabel 2.4 Perbandingan Kandungan Antioksidan Ekstrak Daging Buah Delima dengan Ekstrak Kulit Buah Delima.....	29
Tabel 2.5 Pertumbuhan dan Perkembangan Ikan Zebra.....	39
Tabel 4.1 Definisi Operasional.....	62
Tabel 5.1 Rerata Denyut Jantung Embrio Ikan Zebra 72 hpf pada Setiap Kelompok	74
Tabel 5.2 Hasil Pengujian <i>One Way ANOVA</i> pada Pengaruh Ekstrak Kulit Delima terhadap Denyut Jantung	77
Tabel 5.3 Hasil Uji <i>Post Hoc</i> Denyut Jantung pada Berbagai Perlakuan.....	78
Tabel 5.4 Hasil Uji Regresi dan Korelasi Ekstrak Kulit Delima terhadap Denyut Jantung.....	80
Tabel 5.5 Rerata Edema Perikardium Larva Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>) pada 72 hpf	81
Tabel 5.6 Hasil Pengujian Kruskal Wallis Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Delima terhadap Edema Perikardium	84
Tabel 5.7 Hasil Uji <i>Post Hoc</i> Edema Perikardium pada Berbagai Perlakuan	85
Tabel 5.8 Hasil Uji Regresi dan Korelasi Ekstrak Kulit Delima terhadap Kejadian Edema Perikardium	86



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Kimia Kafein	7
Gambar 2.2 Metabolisme Kafein	11
Gambar 2.3 Buah delima (<i>Punica granatum</i>).....	26
Gambar 2.4 Mekanisme Kerja Ellagic Acid.....	32
Gambar 2.5 Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>).....	34
Gambar 2.6 Ilustrasi Perkembangan Embrio Ikan.....	38
Gambar 2.7 Tahap Perkembangan Embrio Ikan Zebra Hingga Dewasa.....	38
Gambar 2.8 Gambaran edema pericardium pada ikan zebra (3 dpf) akibat paparan kafein selama 1 hari.....	53
Gambar 5.1 Grafik Rata-rata Denyut Jantung Embrio Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>) pada 72 hpf.....	75
Gambar 5.2 Grafik Rata-rata Edema Perikardium Larva Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>) pada 72 hpf.....	82
Gambar 5.3 Gambaran Morfologi Embrio Ikan Zebra pada 72 hpf	82



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Rerata Data Denyut Jantung dan Edema Perikardium	123
Lampiran 2. Data Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Denyut Jantung	124
Lampiran 3. Hasil Uji <i>One Way ANOVA</i> Denyut Jantung	125
Lampiran 4. Hasil Uji <i>Post Hoc</i> Denyut Jantung.....	126
Lampiran 5. Hasil Uji Regresi Denyut Jantung.....	127
Lampiran 6. Hasil Uji Korelasi Denyut Jantung	129
Lampiran 7. Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Edema Perikardium	130
Lampiran 8. Hasil Uji Kruskal Wallis Edema Perikardium	131
Lampiran 9. Hasil Uji Regresi dan Korelasi Edema Perikardium.....	132
Lampiran 10. Surat Keterangan Laik Etik.....	133
Lampiran 11. Surat Keterangan Uji Plagiasi	134
Lampiran 12. Dokumentasi Pemeliharaan Ikan dan Perlakuan.....	135



DAFTAR SINGKATAN

AKI: Angka Kematian Ibu

AKB: Angka Kematian Bayi

FHR: Fetal Heart Rate

DJJ: Denyut Jantung Janin

ppm: Part Per Million

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases

ROS: Reactive Oxygen Spesies

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

GABA: Gamma-aminobutyric acid

XO: Xanthine Oxidase

NO: Nitrite Oxide

EFM: *Electrical Fetal Monitoring*

NICHHD: *National Institue of Child Health and Human Development*

CMs: cardiomyocytes

Vegf: *Vascular Endothelial Growth Factor*

MDA: Malondialdehid

AV: *atrioventricular*

AMPK: AMP-activated protein kinase

EA: Ellagic Acid

Nrf2: Nuclear factor-erythroid-2 related factor 2

Keap1: Kelch-like ECH-related protein 1

ECH: Erythroid cell-derived protein with CNC homology

PERK: Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase



SOD: superoksida dismutase

GPx: glutathione peroksidase

GSH: Glutathione

Cul3: cullin-3

PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha)

DMX: Dimethylxanthine

CYP450: cytochrome P450

XO: xanthine oxidoreductase

NAT 2: N -acetyltransferase 2

MX: monomethylxanthines

DMX: dimethylxanthines

TMX: trimethylxanthines

MUA: monomethyluric acids

DMU: dimethyluric acids

TMU: trimethyluric acids

AFMU: 5-acetylamino-6-formylamino- 3-methyluracil)



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Angka kematian bayi (AKB) dan Angka Kematian Ibu (AKI) merupakan salah satu indikator yang mencerminkan derajat kesehatan suatu negara dan menjadi prioritas pembangunan nasional. Angka Kematian Bayi (AKB) di Indonesia mencapai 25,5 kematian per 1.000 kelahiran hidup dan Angka Kematian Ibu (AKI) yaitu 359/100.000 kelahiran hidup (Kemenkes, 2013; Kemenkes, 2015; BPS, 2017; Kemenkes, 2018). Salah satu penyebab kematian bayi yaitu kelainan kongenital akibat paparan teratogen (Christianson, 2006; Feldkamp *et al.*, 2017). Upaya mengurangi morbiditas dan mortalitas bayi dapat dimulai sejak masa kehamilan karena pada masa tersebut terjadi pembentukan dan perkembangan janin di dalam uterus. Sehingga, ibu perlu memerhatikan asupanannya demi pertumbuhan dan perkembangan janin yang optimal. Salah satu zat yang perlu diperhatikan dalam konsumsi ibu hamil adalah kafein.

Kafein (1,3,7-trimethylxanthine) merupakan zat psikoaktif yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat, tidak terkecuali ibu hamil. Sekitar 80% manusia di dunia mengonsumsi kafein (Lara, 2010). Kafein terkandung dalam makanan dan minuman antara lain kopi, teh, coklat, dan *softdrink* (Vasconcelos *et al.*, 2012) dan terkandung dalam berbagai jenis obat-obatan (Morgan, 2013).

Menurut Verster (2017), sumber kafein yaitu berasal dari 64% kopi, 17% *softdrink*, 17% teh dan 1-2% minuman berenergi. Kopi merupakan salah satu sumber kafein terbesar karena setiap 237 ml kopi mengandung 75–150 mg kafein (Staff, 2014). Sedangkan konsumsi kopi orang Indonesia meningkat



setiap tahunnya sekitar 1,15 kg/kap/tahun dan diprediksi akan terus naik setiap tahunnya (AEKI, 2014; Kementerian Pertanian, 2016).

Hasil wawancara dengan 10 ibu hamil di Ponorogo menunjukkan bahwa semua ibu hamil masih minum kopi setiap hari tanpa memperhatikan jumlah yang dikonsumsi. Bahkan beberapa diantaranya mengonsumsi 3 gelas kopi atau lebih per harinya (Yulianti, 2014). Wisborg *et al.* (2003) juga menyatakan bahwa sekitar 57% ibu hamil mengonsumsi kopi dengan rincian 34% mengonsumsi 1-3 cup/hari, 18% 4-7 cup/hari, dan 5% lainnya lebih dari 8 cup/hari.

Kafein memiliki dampak terhadap janin karena dapat menembus cairan ketuban, plasenta, ASI, sawar darah otak dan serta mempengaruhi masa pre-implantasi melalui difusi cairan ke dalam uterus karena sifatnya yang hidrofobik (Nawrot *et al.*, 2003; Yeh *et al.*, 2012). Kadar kafein yang tinggi dapat meningkatkan resiko gangguan pertumbuhan intrauterin dan kelainan kongenital (Yeh *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016). Malformasi kongenital menyebabkan sekitar 3,3 juta kematian/tahun pada anak berusia kurang dari 5 tahun dan terjadi pada 1-6% kehamilan di seluruh dunia (Glinianaia *et al.*, 2017) Sejumlah 303.000 bayi baru lahir meninggal dalam waktu 4 minggu setiap tahunnya akibat malformasi kongenital (World Health Organization (WHO), 2016).

Salah satu organ yang terganggu akibat konsumsi kafein adalah jantung. Kegagalan pembentukan jantung menjadi hal yang sangat berbahaya dan dapat menyebabkan kematian. Gangguan jantung dapat terjadi pada janin di dalam kandungan ibu hamil berpotensi terjadinya *congenital heart defect* (Crawford, 2009; Ito *et al.*, 2010). Selain itu, irama denyut jantung yang

tidak normal menjadi tanda gangguan fungsi jantung. Terjadinya perubahan *fetal heart rate* (FHR) atau denyut jantung janin dapat menjadi salah satu indikator terjadinya *fetal distress* yang berhubungan dengan morbiditas dan mortalitas pada janin.

Efek kafein terhadap jantung berkaitan dengan sifat antagonis terhadap reseptor adenosine sehingga menjadikan kafein bersifat vasokonstriktif terhadap pembuluh darah (Temple, 2009). Vasokonstriksi pembuluh darah uteroplasenta pada ibu hamil dapat menyebabkan hipoksia janin yang kemudian mencetuskan timbulnya stress oksidatif (Gupta *et al.*, 2007). Stress oksidatif merupakan ketidakseimbangan antara radikal bebas (pro-oksidan) dengan antioksidan yang menginduksi kerusakan komponen seluler yang bersifat ireversibel.

Kerusakan tersebut dapat diatasi dengan senyawa antioksidan sebagai perlindungan tubuh dari serangan radikal bebas (Zalukhu *et al.*, 2016). Namun, terkadang sistem antioksidan yang dihasilkan oleh tubuh ibu hamil tidak cukup mampu menangkal radikal bebas. Proses kehamilan dapat meningkatkan metabolisme dan penggunaan antioksidan tubuh yang ditandai dengan penurunan total aktivitas antioksidan (Adiga & Adiga, 2009). Tubuh telah memproduksi antioksidan enzimatik (endogen), namun jika jumlah radikal bebas dan tubuh berlebih, maka antioksidan endogen tidak mampu mengendalikan jumlah radikal bebas sehingga terjadi keadaan stress oksidatif. Oleh karena itu, ibu hamil membutuhkan tambahan asupan antioksidan dalam jumlah yang lebih besar dari luar tubuh (antioksidan eksogen) untuk membantu proses pengendalian radikal bebas.





Banyak jenis tanaman maupun buah-buahan dengan kandungan antioksidan tinggi yang tersebar di berbagai daerah di Indonesia belum dimanfaatkan dan tidak diketahui khasiatnya. Salah satu buah yang populer di Indonesia dan mengandung antioksidan tinggi adalah buah delima. Delima menjadi tanaman binaan menurut Keputusan Menteri Pertanian tahun 2006. Buah delima memiliki aktivitas antioksidan yang paling tinggi diantara 28 buah lainnya. Bahkan, antioksidan buah delima pada kulit jauh lebih tinggi dibandingkan dengan daging buahnya, yaitu 82,11 mmol/100 gr pada kulit dan 3,10 mmol/100 gr pada daging buah delima (Li *et al.*, 2005).

Kulit delima menunjukkan kemampuan menangkal radikal bebas tertinggi dibandingkan dengan buah lain (Xu *et al.*, 2003; Okonogi *et al.*, 2007). Kandungan antioksidan kulit buah delima diketahui dapat mengurangi stress oksidatif dan menunjukkan efek *cardioprotective* (Hassanpour Fard *et al.*, 2011). Namun, kulit buah delima seringkali hanya menjadi sampah dan tidak dimanfaatkan. Padahal kulit delima mengandung senyawa flavonoid, asam fenolat, dan tannin diantaranya galotannin, ellagitannin, anthocianin, asam ellagic, kuersetin, asam galat, katekin yang mempunyai khasiat tinggi sebagai antioksidan (Madrigal-Carballo *et al.*, 2009). Polifenol sebagai antioksidan dalam kulit delima dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron dan memutus reaksi oksidasi berantai, sehingga dapat menetralkan oksidan menjadi bentuk yang tidak toksik (Changpraykal, 2016)

Salah satu model penelitian yang dapat digunakan untuk meneliti embriologi janin dan mengamati kelainan jantung adalah ikan zebra (Tiffany *et al.*, 2017). Ikan zebra digunakan sebagai model penelitian dikarenakan memiliki kesamaan genetik (sekitar 70-75% sekuen DNA) serta memiliki jalur

metabolisme yang sama dengan mamalia (Howe *et al.*, 2013; Aceto *et al.*, 2015).

Oleh karena itu, berdasarkan latar belakang diatas, peneliti tertarik melakukan penelitian dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Delima Merah (*Punica granatum L*) terhadap Denyut Jantung dan Edema Perikardium Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*) yang Terpapar Kafein secara *In vitro*”.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak kulit buah delima (*Punica granatum L*) terhadap denyut jantung dan edema perikardium embrio ikan zebra (*Danio rerio*) yang terpapar kafein?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk menganalisis pengaruh pemberian ekstrak kulit buah delima (*Punica granatum L*) terhadap denyut jantung dan edema perikardium embrio ikan zebra (*Danio rerio*) yang terpapar kafein.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak kulit buah delima (*Punica granatum L*) terhadap denyut jantung dan edema perikardium embrio ikan zebra (*Danio rerio*) yang terpapar kafein.
2. Menganalisis perbandingan antara berbagai konsentrasi kulit buah delima (*Punica granatum L*) terhadap denyut jantung dan edema perikardium embrio ikan zebra (*Danio rerio*) yang terpapar kafein.





1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Akademis

1. Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai dasar penelitian awal berkaitan dengan pengaruh pemberian kulit delima terhadap denyut jantung dan edema perikardium selama masa kehamilan terhadap ibu dan janin, sehingga dapat dilakukan penelitian selanjutnya.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Penelitian ini diharapkan menjadi referensi awal untuk pengembangan penelitian selanjutnya mengenai penggunaan konsentrasi kulit delima dan potensi antioksidannya dalam pencegahan gangguan pada jantung janin.
2. Penelitian ini dapat membuat masyarakat terutama ibu hamil untuk tetap *aware* (waspada) terhadap segala makanan dan minuman yang dikonsumsinya selama hamil serta menjadi dasar dalam pemberian asuhan kehamilan oleh profesi bidan.
3. Penelitian ini dapat memberikan gambaran mengenai potensi limbah organik kulit delima yang saat ini masih belum dimanfaatkan secara maksimal dan hanya terbuang sia-sia.



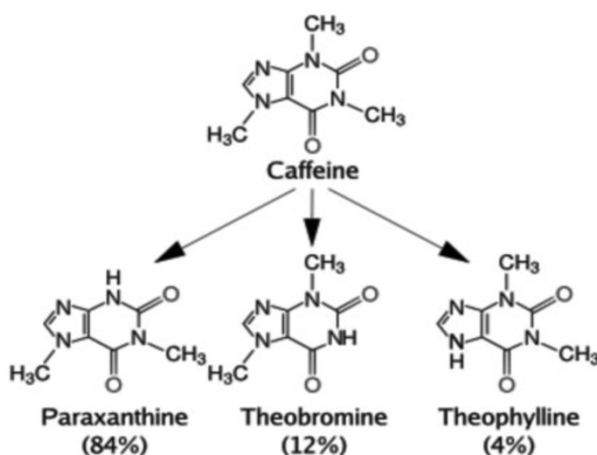
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kafein

2.1.1 Sifat Kimia Kafein

Kafein merupakan senyawa alkaloid golongan xanthine (basa purin) yang berupa kristalin putih. Kafein (1,3,7-trimethylxanthine) merupakan golongan methylxanthine seperti theophylline (1,3-dimethylxanthine) dan theobromine (3,7- dimethylxanthine). Kafein murni berbentuk bubuk putih yang tidak berbau dengan rasa pahit (Bhara, 2009; Heckman *et al.*, 2010) dengan rumus kimianya $C_8H_{10}O_2$. Atom nitrogen pada kafein bentuknya planar karena terletak di orbita hibrid sp. Hal ini menjadikan molekul kafein memiliki sifat aromatic (Weng *et al.*, 2008)



Gambar 2.1 Struktur Kimia Kafein

Kafein dalam tubuh dimetabolisme menjadi Paraxanthine, Theobromine, dan Theophylline (Heckman *et al.*, 2010)

2.1.2 Sumber Kafein

Kafein telah digunakan selama ribuan tahun dan merupakan salah satu bahan makanan aktif yang paling banyak dikonsumsi di seluruh dunia.

Kafein ditemukan dalam minuman umum termasuk kopi, teh dan minuman



ringan, serta produk yang mengandung kakao atau cokelat, dan berbagai obat seperti dalam beberapa formulasi pereda nyeri dan suplemen makanan. Kafein adalah alkaloid alami yang ditemukan dalam jumlah yang bervariasi dalam biji, daun, dan buah-buahan pada lebih dari 60 tanaman. Beberapa sumber kafein umum adalah kacang kola (*Cola acuminata*), biji coklat (*Theobroma cacao*), yerba mate (*Ilex paraguariensis*), dan guarana berry (*Paullinia cupana*). Namun, biji kopi panggang (*Coffea arabica* dan *Coffea robusta*), dan daun teh (*Camellia siniensis*) adalah sumber utama kafein di dunia. Di Amerika Serikat, sebagian besar kafein yang dikonsumsi dikonsumsi dalam bentuk kopi dan teh; cocoa, kacang kola dan kafein sintetis untuk porsi kecil. Tidak ada perbedaan kimia antara kafein sintetis dan kafein alami.

Kafein paling sering dikonsumsi dalam minuman beralkohol seperti kopi (71%), minuman ringan (16%), dan teh (12%). Pasar untuk minuman berkafein telah meningkat dalam dekade terakhir dengan pengenalan minuman fungsional, termasuk kategori minuman energi, serta minuman lainnya seperti minuman olahraga berkafein, jus, dan air (Heckman, Weil dan de Mejia, 2010).

Kafein secara alami ditemukan di biji bijian, daun dan buah pada beberapa tanaman dengan konsentrasi bervariasi. Terdapat 63 spesies tanaman berbeda yang saat ini diketahui mengandung kafein (Tim, 2015). Sumber kafein yang paling sering dijumpai adalah kopi (tanaman kopi, *Coffea* sp.), teh (tanaman teh, *Camellia sinensis*), dan coklat (tanaman kakao, *Theobroma cacao*). Beberapa minuman yang mengandung bahan

tambahan kafein seperti pada minuman cola, minuman berenergi dan beberapa obat psikoaktif banyak dikonsumsi oleh masyarakat dunia.

Tabel 2.1 Kandungan Kafein dalam beberapa Produk Minuman, Makanan, dan Obat (Staff, 2014)

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 sugar-free (237 ml)	71-74
Red Bull, regular atau sugar-free (248 ml)	79-80
Rockstar, regular atau sugar-free (237 ml)	75-80
Obat	
Excedrin Extra Strength 1 tablet	60-65
NoDoz Max Strength 1 tablet	200
Cafergot, Migralam Anquan, 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
Cokleta hitam dilapisi biji kopi 28 buah	336
Energy mints 2 buah	95-200

Kandungan kafein dalam teh setengah kali lebih banyak dari kafein yang dikandung kopi. Beberapa tipe teh seperti teh hitam mengandung lebih banyak kafein dibandingkan jenis teh yang lain. Teh mengandung sedikit theobromine dan sedikit lebih tinggi theophylline dari kopi. Kafein dalam kopi berbeda bergantung jenis pengolahan dan penyaringan kopinya. Kafein juga merupakan bahan yang dipakai untuk minuman nonalkohol seperti cola, yang semula dibuat dari kacang kola. Soft drinks khususnya terdiri dari 10-50 miligram kafein (Yonata *et al.*, 2016). Selain itu, Indonesia menjadi salah satu negara produsen dan eksportir kopi paling besar di dunia (USDA, 2018) dengan jumlah 453 kg/tahun (Smith, 2017). Selain itu, kafein juga ditemukan dalam pengobatan klinis seperti obat diuretic, tablet analgesik, obat NSAID, *muscle relaxants*, obat untuk memperbaiki penyerapan ergotamin pada kasus migrain dan juga digunakan dalam pengobatan pada kelainan otak seperti penyakit Parkinson (Pasaoglu *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2018).

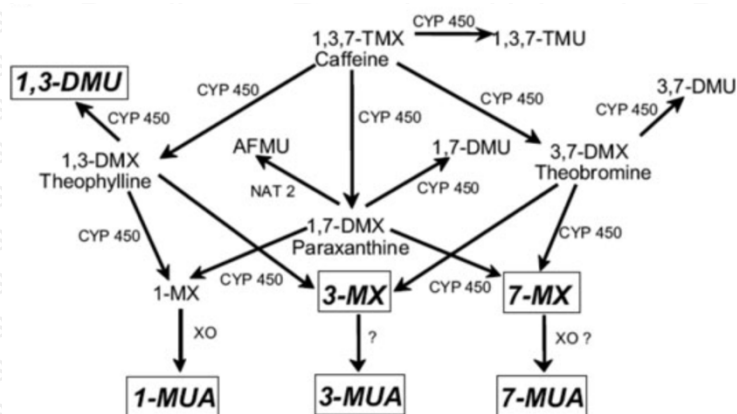
2.1.3 Metabolisme Kafein

Kafein diabsorpsi dengan cepat di saluran pencernaan, mencapai kadar puncak dalam darah selama 30 hingga 45 menit (Sukandar dkk, 2008). Waktu paruh kafein sangat bervariasi antar individu dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti umur, fungsi hati, kehamilan, beberapa obat bersamaan, dan tingkat enzim dalam hati yang dibutuhkan untuk metabolisme kafein. Kafein pada orang dewasa yang sehat mempunyai waktu paruh 4 sampai 5 jam, yang menjadi lebih panjang pada penderita penyakit hati (96 - >100 jam), penggunaan kontrasepsi oral (5-10 jam), bayi dan neonatus (30 jam) atau selama kehamilan (9-11 jam) (Thorn *et al.*, 2012). Waktu paruh kafein pada

wanita hamil 2-3 kali lebih lama karena perubahan hormonal yang terjadi dalam tubuh (Smith, 2002)

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

- Paraxanthine (84%): memiliki efek lipolisis, yang menyebabkan peningkatan gliserol dan bebas kadar asam lemak dalam plasma darah.
- Teofilin (4%): stimulasi sistem saraf pusat, yang digunakan untuk melemaskan otot polos dari saluran pernapasan dan digunakan untuk mengobati asma. Dosis terapi teofilin lebih besar diperoleh dari metabolisme kafein. Memiliki efek diuretic.
- Theobromine (12%): menstimulasi sistem saraf pusat, namun kurang signifikan dibandingkan dengan teofilin.



Gambar 2.2 Metabolisme Kafein

Kafein dimetabolisme oleh CYP450 menjadi Theophylline, Paraxanthine dan Theobromine. Theophylline (1,3 Dimethylxanthine/DMX), Paraxanthine (1,7 Dimethylxanthine/DMX) dan Theobromine (3,7 Dimethylxanthine/DMX). CYP 450 (cytochrome P450); XO (xanthine oxidoreductase); NAT 2 (N -acetyltransferase 2); MX (monomethylxanthines), DMX (dimethylxanthines), dan TMX (trimethylxanthines); MUA (monomethyluric acids), DMU (dimethyluric acids), dan TMU (trimethyluric acids); AFMU (5-acetylamino-6-formylamino- 3-methyluracil) (Heckman, Weil dan de Meija, 2010)



Terdapat 4 mekanisme kafein pada aktifitas seluler dalam keadaan normal yaitu: (1) antagonis terhadap reseptor adenosine, (2) menghambat fosfodiesterase, (3) modulasi reseptor GABA, dan (4) regulasi kalsium intraseluler. Mekanisme utama kafein adalah dengan menghambat reseptor adenosine secara kompetitif pada tingkat sel. Hambatan ini meningkatkan hormone seperti norepinefrin, dopamin dan hormone serotonin. Reseptor adenosine diklasifikasikan berdasarkan kemampuannya untuk meningkatkan atau mengurangi konsentrasi cAMP intraselular. Kafein (methylxanthines) mampu menghambat ke-empat tipe dari reseptor adenosine (A1, A2A, A2B and A3), tapi sebagian besar kerja kafein dimediasi dengan menghambat reseptor adenosine tipe A1 and A2A. Sedangkan teofilin dan paraxanthine memiliki daya afinitas yang tinggi terhadap reseptor A1, A2A, dan A2B namun merupakan antagonis yang lemah bagi reseptor sub tipe A3. Sedangkan theobromine memiliki afinitas yang lebih rendah dibandingkan dengan methylxanthine pada reseptor A1 dan A2 (Monteiro *et al.*, 2016)

Selain itu, kafein juga dapat bersifat kompetitif non-selektif reversibel untuk menghambat enzim fosfodiesterase, terlebih lagi pada fosfodiesterase-4 (PDE4). Hal ini dapat mencegah degradasi siklus cAMP adenosine dan meningkatkan konsentrasi cAMP. cAMP merupakan komponen yang penting pada respon seluler terhadap hormone dan neurotransmitter (Monteiro *et al.*, 2016). Hambatan terhadap enzim fosfodiesterase oleh teofilin dapat menimbulkan dilatasi bronkus yang kemudian digunakan untuk mengobati asma.

Mekanisme yang ketiga yaitu kafein dalam menghambat modulasi terhadap reseptor GABA, sehingga berpengaruh terhadap transportasi ion pada otak. Mekanisme yang keempat yaitu stimulasi pelepasan kalsium intraselular melalui aktivasi reseptor ryanodine yang terdapat pada retikulum endoplasma (Monteiro *et al.*, 2016). Kafein dianggap sebagai agonis penuh dari reseptor ryanodine (RyR2) yang membuat adanya pelepasan kalsium. Selain itu, kafein juga membuat myofilament menjadi sensitive terhadap kalsium dengan mengikat reseptor ryanodine tersebut.

Farmakokinetika dan bioavailabilitas kafein pada bayi prematur menunjukkan bahwa kafein benar-benar terserap setelah pemberian larutan kafein sitrat orogastrik (Charles *et al.*, 2008). Pada manusia sehat, kisaran pengosongan lambung kafein adalah 50 hingga 175 menit; 50% dari dosis dikosongkan dalam 1 hingga 2 jam dan lebih dari 90% dengan 3,5 jam setelah pemberian dosis. Kinetika absorpsi kafein terkait erat dengan pengosongan lambung. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk membandingkan berbagai dosis kafein dengan berbagai bentuk yaitu kapsul, larutan oral, atau permen karet dengan tujuan untuk menentukan yang paling aman, paling dapat diandalkan, dan paling cepat diserap (Heckman, Weil & de Mejia, 2010).

2.1.4 Efek Farmakologis Kafein

Penurunan klirens kafein pada ibu selama kehamilan serta sifat hidrofobik kafein menyebabkan kafein dapat melewati barrier plasenta dan lapisan darah-otak (Yeh *et al.*, 2012; Pei *et al.*, 2015). Kafein yang dapat dengan mudah melewati sawar darah dan plasenta akan menginduksi vasokonstriksi fetal-maternal dan terjadi iskemia sehingga menyebabkan



malformasi (Rashidi *et al.*, 2012). Malformasi kongenital merupakan gangguan fungsional, struktural, dan metabolik yang disebabkan karena ketidaksempurnaan atau kegagalan dari satu atau lebih proses embriogenesis (Pei *et al.*, 2015)

Kafein menunjukkan efek farmakologis dan biologis yang luas (Calvo *et al.*, 2009). 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 intraselular, peredaran darah koronaria, dan angiogenesis (Huang *et al.*, 2005; Yeh *et al.*, 2012)

Kafein meningkatkan pelepasan katekolamin yang memicu vasokonstriksi janin dan plasenta sehingga dapat menyebabkan malformasi kongenital (Okubo *et al.*, 2015). Peningkatan sekresi katekolamin (adrenalin, dopamin dan serotonin) disebabkan adanya penekanan terhadap reseptor adenosine (Temple, 2009). Peningkatan sekresi hormon-hormon tersebut dapat meningkatkan tekanan sistolik dan diastolic pada arteri brakialis dan tekanan darah perifer, vasokonstriksi, takikardi, pengeluaran glukosa dari hepar dan penurunan aliran darah ke organ-organ dalam. Konsumsi kafein yang tinggi akan menyebabkan vasokonstriksi utero placentar yang dapat mengakibatkan malformasi fetus, infertilitas pada ibu, dan keadaan berat badan lahir rendah, kemungkinan hal ini diakibatkan oleh meningkatnya *cycle adenosine monophosphate* (cAMP) yang akan mengganggu perkembangan sel (Bech *et al.*, 2007)

Kafein akan menurunkan aktivitas DNA polimerase dan menghambat aktivitas fosfodiesterase pada tingkat seluler. Kafein dapat





berbahaya bagi ibu hamil jika dikonsumsi dalam jumlah yang berlebih karena mampu menginduksi terjadinya mutasi gamet dengan meningkatkan level sirkulasi katekolamin dan menginduksi mitosis sel-sel mamalia sebelum fase replikasi berakhir (Rashidi *et al.*, 2012)

Sebelum plasenta terbentuk, kafein sebagai zat yang larut dalam lemak memasuki cairan uterus di endometrium (*endometrial fluid*). Zat tersebut kemudian berpenetrasi ke blastocyst yang masih berenang bebas sebelum implantasi. Mekanisme ini dipengaruhi oleh kelarutan lemak dan derajat ionisasi. Blastocyst yang belum berimplantasi memiliki membrane yang *permeable* sehingga mudah dimasuki oleh beberapa senyawa termasuk kafein. Ketika ibu terpapar dengan agen kimia, senyawa tersebut dengan bebas berpindah dari sirkulasi ibu ke dalam cairan luminal uterus dan menembus hasil konsepsi yang berkembang selama tahap praimplantasi.

Volume cairan uterus diatur secara dinamis selama kehamilan awal, sehingga gangguan oleh faktor hormonal atau non hormonal dapat membahayakan perkembangan embrio, lokasi embrio intrauterin, dan implantasi embrio. Paparan yang berasal dari pola konsumsi ibu selama kehamilan dapat mengubah lingkungan intrauterin (cairan uterus), yang dapat mempengaruhi kualitas embrio dan regulasi epigenetik dari ekspresi gen seperti gangguan metabolic (Zhang *et al.*, 2017). Setelah embrio berimplantasi, zat kafein dalam sirkulasi darah ibu dapat masuk melalui sistem trofoblas yang kemudian akan mempengaruhi yolk sac (kantong kuning telur) pada embrio.

Kantung kuning telur (*yolk sac*) adalah kantung bermembran yang melekat pada embrio, dibentuk oleh sel-sel hipoblast dan bersebelahan dengan piringan embrionik (*embryonal disc*). *Yolk sac* sangat penting untuk suplai darah di masa awal embrio untuk ditransfer menuju usus primordial selama minggu keempat perkembangan (Moore *et al.*, 2013). Kantung kuning telur bertindak sebagai jalur utama pertukaran antara embrio manusia dan ibu sebelum sirkulasi plasenta terbentuk. Kantung kuning telur menyediakan fungsi nutrisi, metabolik, endokrin, imunologis, dan hematopoietik selama organogenesis dalam kehidupan embrio (Norton, 2016). *Yolk sac* embrio ikan zebra yang dipapar kafein yang zat aktifnya masuk ke dalam chorion mampu mengganggu proses metabolisme, sehingga nutrisi tidak terserap secara sempurna ke dalam embrio. Metabolisme yang tidak berjalan dengan semestinya pada akhirnya akan menyebabkan pertumbuhan organ menjadi tidak sempurna (Aida, 2015).

Kafein merupakan derivat xanthine yaitu sumber penting dari terjadinya pembentukan radikal bebas (pro-oksidan) yang dapat meningkatkan keadaan stres oksidatif yang dapat menginduksi kerusakan komponen seluler yang bersifat ireversibel dan menyebabkan kematian sel melalui jalur apoptosis intrinsik melalui mitokondria, sehingga memicu kerusakan DNA mitokondria, disfungsi, dan peningkatan apoptosis sel (Zalukhu *et al.*, 2016). Selain itu, stress oksidatif juga berperan dalam penurunan produksi nitrat oksida, sehingga dapat menyebabkan terjadinya vasokonstriksi pembuluh darah (Echeverri *et al.*, 2010)

Meski demikian, kafein memiliki beberapa keuntungan bagi tubuh. Kafein dapat membantu mengatasi stres pekerjaan, dan membantu agar





orang dapat terjaga lebih lama. Konsumsi kafein sebelum pergi bersekolah maupun bekerja dinilai mampu membangun pikiran yang lebih fokus, sehingga individu dapat jauh lebih produktif. Selain itu, kafein juga dapat meningkatkan performa fisik melalui peningkatan kontraksi serta daya tahan otot (Lany, 2017). Pengaruh kafein dosis rendah terhadap mood atau suasana hati juga berhubungan dengan meningkatnya aktivitas fungsi serebral pada daerah regulator mood, saat-saat terjaga, dan tingkat kesejahteraan manusia (Smith, 2002).

Permasalahan utama dalam konsumsi kafein saat kehamilan adalah kemungkinan abortus spontan dan gangguan pertumbuhan janin. Sebuah studi observasional prospektif mengenai asupan kafein ibu dan hubungannya dengan pertumbuhan janin oleh Kelompok Studi CARE (2008) menyimpulkan bahwa asupan kafein sebelum konsepsi dan selama kehamilan harus dikurangi (Konje dan Cade, 2008). Penelitian tersebut menunjukkan hubungan antara asupan kafein ibu dan peningkatan risiko pertumbuhan janin. Tingkat konsumsi kafein yang tinggi dapat memiliki efek buruk pada kesuburan dan rekomendasi untuk wanita yang hamil untuk membatasi kafein menjadi <300 mg/hari. Selain itu, ibu hamil disarankan untuk minum tidak lebih dari 2 cangkir kopi atau 4 cangkir teh per hari (Heckman, Weil dan de Mejia, 2010).

International Food Information Council Foundation (IFIC) menyatakan bahwa batas aman konsumsi kafein perhari adalah 100-150 mg kafein (1-2,5 cangkir kopi) atau sekitar 1,73 mg/kgBB, sedangkan untuk anak-anak yaitu kurang dari 14-22 mg. Tubuh sudah mengalami peningkatan aktivitas yang cukup untuk membuatnya tetap terjaga dalam jumlah tersebut (IFIC,

2007). Konsumsi kafein >600 mg (4-7 cangkir kopi) atau lebih setiap hari menimbulkan overdosis kafein berbahaya dan dapat menyebabkan akibat fatal bahkan kematian (Food and Drug Administration, 2007). Sedangkan asupan harian kafein yang disarankan oleh CDC bagi ibu hamil adalah 144 mg/hari atau 2.4 mg/kgBB/hari (Chen *et al.*, 2008).

2.2 Stres Oksidatif

Stres oksidatif merupakan ketidakseimbangan antara radikal bebas (pro-oksidan) dengan antioksidan yang dipicu oleh dua kondisi umum, yaitu kurangnya antioksidan dan produksi radikal bebas yang berlebihan (Rush *et al.*, 2009). Akibatnya intensitas proses oksidasi sel-sel tubuh normal menjadi semakin tinggi dan dapat menimbulkan kerusakan yang lebih banyak.

Akumulasi radikal oksigen pada sel dan modifikasi oksidatif molekul biologi (lipid, protein, dan asam nukleat) berperan pada penuaan dan kematian sel. *Reactive-Oxygen Species* (ROS) pada kondisi normal berperan sebagai “*redox messenger*” dalam pengaturan jaras interseluler. Stres oksidatif terjadi jika produksi ROS alamiah tidak dapat diseimbangkan oleh kapasitas antioksidan jaringan. ROS berlebihan dapat menginduksi kerusakan komponen seluler yang bersifat ireversibel dan menyebabkan kematian sel melalui jalur apoptosis intrinsik melalui mitokondria, sehingga memicu kerusakan DNA mitokondria, disfungsi, dan peningkatan apoptosis sel (Zalukhu *et al.*, 2016). Akumulasi mutasi DNA mitokondria, gangguan fosforilasi oksidatif, dan ketidakseimbangan ekspresi enzim antioksidan berakhir pada produksi ROS yang berlebihan.

Stress oksidatif juga berperan dalam penurunan produksi nitrat oksida (NO). Nitrat oksida merupakan mediator yang paling penting disintesis oleh sel endotel, yang merupakan vasodilator, anti-platelet, anti-proliferatif, penurun permeabilitas, anti-inflamatori, dan antioksidan. Endotel dalam pembuluh darah terdiri dari monolayer aktif yang berperan penting dalam homeostatis vaskuler. Disfungsi sel endotel berhubungan dengan penurunan ketersediaan NO dalam darah, baik disebabkan oleh tidak adanya produksi NO maupun tidak adanya aktivitas biologis dari NO (Akomolafe *et al.*, 2018).

Penurunan stres oksidatif dapat dicapai melalui 3 tahap, yaitu dengan menurunkan pajanan ke polutan lingkungan yang mengandung oksidan, meningkatkan jumlah antioksidan endogen, dan menurunkan stres oksidatif dengan menstabilkan produksi dan efisiensi energi mitokondria. Stres oksidatif endogen dapat dipengaruhi dengan dua cara, yaitu dengan mencegah formasi ROS atau menghilangkan efek ROS dengan antioksidan (Zalukhu *et al.*, 2016). Antioksidan merupakan zat yang dapat membersihkan radikal bebas dan mencegah radikal bebas merusak sel. Antioksidan memiliki efek protektif dengan menetralkan radikal bebas yang bersifat toksik dengan memproduksi metabolisme sel alami. Tubuh secara alami menghasilkan antioksidan, tapi prosesnya tidak efektif 100% jika dalam keadaan produksi radikal bebas melimpah di udara dan keefektifannya juga menurun karena penuaan (Sen *et al.*, 2010).

2.3 Radikal Bebas

Radikal bebas (*free radical*) merupakan suatu atom, molekul, senyawa atau ion yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada



orbit luarnya. Ini menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan dengan cara menyerang dan mengikat elektron di sekitarnya. Apabila senyawa yang diikat oleh senyawa radikal bebas tersebut merupakan senyawa kovalen maka akan menjadi berbahaya. Senyawa yang memiliki ikatan kovalen adalah molekul-molekul besar (bioakromolekul) seperti lipid, protein, polisakarida, dan DNA. Semakin besar molekul yang mengalami kerusakan, semakin parah akibatnya. Kerusakan sel akan berdampak negatif pada struktur dan fungsi sel tersebut. Radikal bebas dapat diproduksi selama metabolisme aerobik dan dapat memicu kerusakan oksidatif pada biomolekul termasuk lipid, protein, dan DNA (Winarsi, 2011; Zalukhu *et al.*, 2016; SUN, 2017).

Radikal bebas yang mayoritas menyebabkan kerusakan sistem biologi dikenal sebagai *Reactive-Oxygen Species* (ROS). ROS dibentuk oleh sel-sel organisme aerobik yang dapat menginisiasi reaksi autokatalitik. Molekul yang bereaksi dengan ROS akan diubah menjadi radikal bebas, sehingga memperluas rantai sehingga memperluas rantai kerusakan. Radikal bebas yang berlebih menyebabkan antioksidan seluler natural kewalahan, memicu oksidasi, dan berkontribusi terhadap kerusakan fungsional seluler (Zalukhu *et al.*, 2016).

Xanthin merupakan salah satu senyawa yang reaktif apabila terjadi reaksi oksidasi. Xanthin oksidase (XO) secara fisiologis bekerja dengan mengkonversi hipoxanthin menjadi asam uric dan anion superoksideradikal. Pada keadaan stress oksidatif di mana terjadi ketidakseimbangan antara kadar radikal bebas dengan kapasitas antioksidan, xanthin oksidase (XO) akan menghasilkan senyawa radikal bebas (ROS) melalui metabolisme purin.



Keadaan ini dijumpai pada penyakit disfungsi endotel seperti gagal jantung dan diabetes (Feoli, 2014).

Tabel 2.2 Spesies Oksigen Reaktif (ROS)

No	Radikal	
1	O ₂ •	<i>Superoxide</i>
2	HO•	<i>Hydroxyl radical</i>
3	HO ₂	<i>Hydroperoxyl radical</i>
4	LO ₂	<i>Lipid peroxy radical</i>
5	LO•	<i>Lipid alkoxy radical</i>
6	NO ₂	<i>Nitrogen dioxide</i>
7	NO•	<i>Nitric oxide</i>
8	H ₂ O ₂	<i>Hydrogen peroxide</i>
9	¹ O ₂	<i>Singlet oxygen</i>
10	Fe=O	<i>Lipid hydroperoxide</i>
11	HOCl	<i>Iron-oxygen complexes</i>

2.4 Antioksidan

2.4.1 Definisi

Antioksidan dapat diartikan sebagai molekul yang mampu menstabilkan atau menonaktifkan radikal bebas sebelum menyerang sel. Antioksidan dapat menghambat atau menunda oksidasi sebuah substrat. Oksidan endogen dapat dibedakan menjadi antioksidan endogen non-enzimatik (contoh: asam urat, glutathione, bilirubin, tiol, albumin, vitamin dan fenol), dan antioksidan endogen enzimatik (contoh: superoxide dismutase, glutathione peroxidase, dan katalase) (Zalukhu *et al.*, 2016). Pada orang normal, antioksidan endogen akan menyeimbangkan produksi ROS. Sumber terbanyak antioksidan berasal dari nutrisi terutama golongan fenol (Rahman, 2007).

Beberapa mekanisme kerja antioksidan nutrisi antara lain:

1. Menetralkan radikal bebas.
2. Mengurangi konsentrasi peroksida dan memperbaiki membran oksidasi.

3. Mendorong besi untuk menurunkan produksi ROS.
4. Menetralkan ROS melalui metabolisme lipid, asam lemak bebas rantai pendek, dan kolesterol ester.

Manusia memiliki sistem antioksidan kompleks baik enzimatik maupun non-enzimatik yang bekerja sinergis untuk melindungi sel dan sistem organ dari kerusakan akibat radikal bebas (Zalukhu *et al.*, 2016). Antioksidan enzimatik antara lain glutathione peroxidase, catalase, dan superoxide dismutase. Antioksidan non-enzimatik antara lain vitamin E, vitamin C, antioksidan tiol (glutathione, thioredoxin, dan asam lipoik), melatonin, karotenoid, flavonoid alami, dan lain sebagainya. Antioksidan endogen berperan penting menjaga fungsi seluler yang optimal dan kesehatan sistemik secara umum. Pada kondisi tertentu yang dipicu oleh stres oksidatif, antioksidan endogen menjadi berkurang dan memerlukan antioksidan eksogen untuk mempertahankan fungsi seluler yang optimal. (Rahman, 2007). Vitamin C (asam askorbat) merupakan vitamin yang larut dalam air. Konsentrasi vitamin C ibu lebih rendah dibandingkan bayi yang dilahirkan, hal ini disebabkan karena mekanisme permeabilitas plasenta hanya terhadap dehidroaskorbat, yang akan diubah menjadi asam askorbat dan terakumulasi pada janin (Setiawan dkk, 2005).

Suplemen vitamin antioksidan, khususnya vitamin C dan E, dan beberapa komponen sintetik dapat memperpanjang masa hidup pada model hewan. Vitamin C (asam askorbat) adalah antioksidan hidrofilik utama dan inhibitor peroksidasi lemak. Pada membran, molekul ini secara cepat menurunkan radikal α -tocopheroxyl dan LDL untuk regenerasi α -tocopherol dan menghambat propagasi radikal bebas. Vitamin E (α -



tocopherol) merupakan antioksidan hidrofobik utama pada membran sel dan lipoprotein sirkulasi. Fungsi antioksidannya sangat kuat dibantu oleh regenerasi yang dipromosikan oleh vitamin C (Zalukhu *et al.*, 2016).

Adanya radikal bebas yang berlebihan dapat menginduksi keadaan stress oksidatif yang mengarah pada kerusakan sel dan dapat menyebabkan kematian sel. Oleh karena itu, sel mempunyai jaringan antioksidan untuk menghilangkan ROS yang berlebihan tersebut.

Keseimbangan antara ROS dan antioksidan haruslah optimal, apabila keduanya terlalu tinggi, maka keadaan stress oksidatif dan stress antioksidatif juga berbahaya (Polsjak, 2013).

Antioksidan dapat menunda, mencegah, atau menghilangkan kerusakan oksidatif pada molekul target. Seperti yang telah diketahui bahwa reaksi oksidasi dapat menghasilkan radikal bebas yang dapat memulai pembentukan rantai multipel yang dapat menyebabkan kerusakan atau bahkan kematian sel. Antioksidan dapat menghilangkan perantara dari radikal bebas ini melalui oksidasi antioksidan itu sendiri, dan menghambat reaksi oksidasi yang lain, sehingga dapat menghentikan pembentukan rantai yang berbahaya (Shebis, 2013). Selain itu, Santhakumar (2013) juga menjelaskan bahwa antioksidan sendiri mempunyai peranan penting dalam memutus rantai radikal melalui pemberian elektron kepada radikal bebas.

2.4.2 Klasifikasi

Di dalam tubuh, terdapat dua kelompok antioksidan utama, yakni antioksidan enzimatik dan antioksidan non-enzimatik. Dua kelompok tersebut selanjutnya masih terbagi menjadi beberapa sub-grup. Antioksidan



enzimatik terbagi menjadi pertahanan enzimatis primer dan sekunder. Berdasarkan mekanisme kerja, antioksidan diklasifikasikan menjadi antioksidan primer, sekunder, dan tersier.

1) Antioksidan primer

Mencegah terjadinya reaksi inisiasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas dan memutus reaksi berantai oksidasi serta mengubah radikal bebas menjadi produk baru yang lebih stabil, lebih larut air, dan bisa diekskresi tubuh. Contohnya antara lain enzim-2 SOD, katalase.

2) Antioksidan Sekunder

Menangkap R^* dan mencegah reaksi berantai. Contohnya antara lain vitamin C, vitamin E, betakaroten, BHA, BHT, GA

3) Antioksidan Tersier

Memperbaiki kerusakan sel dan jaringan yang rusak akibat R^* . Contohnya antara lain enzim reduktase, kofaktor enzim (Q10), mineral (zinc dan selenium), peptida (glutathion), asam fenolic, asam fenolat, dan senyawa nitrogen (asam urea) (Shebis, 2013).

2.5 Buah Delima

2.5.1 Deskripsi Buah Delima

Delima merupakan tanaman buah yang berasal dari Timur Tengah dipercaya sebagai tanaman obat alami sejak 1550 SM (Hiwale, 2009; Ismail *et al.*, 2012). Buah delima (*Punica granatum*) merupakan tanaman yang berasal dari Iran (Shaygannia *et al.*, 2016). Tumbuhan delima (*Punica granatum*) merupakan tanaman semak atau perdu meranggas yang dapat tumbuh dengan tinggi mencapai 5-8 meter. Batang berkayu, ranting bersegi,



percabangan banyak, lemah, berduri pada ketiak daunnya, cokelat ketika masih muda, dan hijau kotor setelah tua. Daun tunggal, bertangkai pendek, letaknya berkelompok. Helaiian daun bentuknya lonjong, pangkal lancip, ujung tumpul, tepi rata, pertulangan menyirip, permukaan mengkilap dengan panjang daun 1–9 cm, lebar 0,5–2,5 cm, berwarna hijau. Buah delima (*Punica granatum*) dapat dikonsumsi yang mengandung daging buah yang berbentuk pulp (Budka, 2008; Fernandes *et al.*, 2015).

Ukuran diameter buah bervariasi dari 5 cm hingga 12 cm dengan bentuk yang bulat, tebal dengan kulit yang berwarna kemerahan, beratnya kurang lebih 100-300 gram, terdiri dari biji-biji kecil, tersusun tidak beraturan, berwarna putih sampai kemerahan. Kulit buahnya tebal dan warnanya beragam seperti hijau keunguan, putih, coklat kemerahan atau ungu kehitaman. Biasanya terdapat satu sampai lima bunga, warnanya merah, putih atau ungu. Berbunga sepanjang tahun. Bunga tunggal bertangkai pendek, keluar di ujung ranting atau di ketiak daun paling atas. Perbanyakkan dengan stek, tunas akar atau cangkok. Tanaman delima menyukai tanah gembur yang tidak terendam air dan memiliki beberapa varietas (Budka, 2008; Fernandes *et al.*, 2015).

Delima mempunyai banyak kultivar (Tehranifar *et al.*, 2010), Ada tiga jenis buah delima yang tersebar di Indonesia yang diklasifikasikan berdasarkan warna buahnya, yakni delima putih, delima merah, dan delima hitam. Dari ketiga jenis itu yang paling terkenal adalah delima merah. Delima merah memiliki rasa lebih manis dan segar, sedangkan delima putih rasanya lebih sepat dan kesat serta kurang manis. Delima putih dan delima hitam agak sulit ditemukan di pasaran (Astawan, 2008).



Adapun klasifikasi *Punica granatum* berdasarkan hasil determinasi yang dilakukan di UPT Materi Medika, Batu, Jawa Timur adalah sebagai berikut:



Gambar 2.3 Buah Delima (*Punica granatum* L.)

- Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
- Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
- Super Divisi : Spermatophyta (menghasilkan biji)
- Divisi : Magnoliotophyta (tumbuhan berbunga)
- Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua/dikotil)
- Subkelas : Rosidae
- Ordo : Myrtales
- Famili : Lythraceae
- Genus : *Punica*
- Spesies : *Punica granatum* L.

2.5.2 Kandungan Kulit Buah Delima

Pada penelitian Guo (2003), kulit buah delima memiliki aktivitas antioksidan yang paling tinggi dibandingkan dengan 28 jenis buah yang sering dikonsumsi di China dengan menggunakan penilaian FRAP (*ferric reducing anti-oxidant power*). Berikut ini adalah hasil penelitian Guo (2003)

mengenai aktivitas antioksidan pada 28 buah yang sering dikonsumsi oleh masyarakat China. Buah delima memiliki kandungan senyawa polifenol dengan aktivitas antioksidan lebih kuat jika dibandingkan dengan anggur merah, teh hijau, blueberry, dan cranberry (Tyagi *et al.*, 2012).

Kandungan fenol pada ekstrak kulit buah delima (*Punica granatum*) hampir 10 kali lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak daging buah delima (*Punica granatum*) itu sendiri. Tingginya kandungan fenol pada ekstrak kulit buah delima ini menandakan bahwa ekstrak kulit buah delima mengandung antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak daging buahnya (Li *et al.*, 2005).

Kulit buah delima merah kaya akan senyawa flavonoid dan tannin, yang merupakan golongan polifenol (Madrigal-Carballo *et al.*, 2009). Analisis dari kulit buah delima menunjukkan terdapat kandungan tannin yang dapat terhidrolisis dan memiliki 92% aktivitas antioksidan. Tannin dibedakan menjadi dua jenis yaitu hydrolyzable dan condensed tannin. Tannin yang dapat terhidrolisis diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang dominan. Termasuk dalam *hydrolyzable tannin* adalah punicalin, ellagic acid, gallic acid, dan punicalagin. Di antara senyawa tersebut, punicalagin memiliki kapasitas terbesar dalam menangkal radikal bebas (Shabtay *et al.*, 2008; Pathak *et al.*, 2017).



Tabel 2.3 Aktivitas Antioksidan pada 28 Buah (mmol/100g w)

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	-	-
Strawberry	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 rasa Apel	0.80 ± 0.05	3.24 ± 0.39	0.84 ± 0.09
Nanas	0.80 ± 0.08	2.01 ± 0.03	-
Pisang	0.73 ± 0.11	3.16 ± 0.16	-
Manggis	0.71 ± 0.01	8.09 ± 0.55	0.65 ± 0.06
Leci	0.59 ± 0.11	2.86 ± 0.12	22.36 ± 0.97
Kumquat	0.50 ± 0.05	0.25 ± 0.05	0.66 ± 0.03
Anggur	0.49 ± 0.04	11.02 ± 1.83	55.54 ± 1.62
Pomelo	0.39 ± 0.03	1.84 ± 0.04	-
Mangga	0.38 ± 0.08	10.13 ± 0.37	14.59 ± 0.55
Peach	0.38 ± 0.03	0.95 ± 0.08	1.17 ± 0.03
Aprikot	0.34 ± 0.07	0.79 ± 0.07	0.72 ± 0.09
Melon	0.24 ± 0.06	0.52 ± 0.07	0.31 ± 0.13
Pear	0.22 ± 0.03	0.89 ± 0.08	2.06 ± 0.09
Jingxin	0.16 ± 0.01	0.42 ± 0.11	10.1 ± 0.07
Persimon	0.14 ± 0.03	0.62 ± 0.01	1.48 ± 0.08

(Sumber: Guo et al., 2003)

Tannin yang dapat terhidrolisis tersebut mengandung isomer punicalagin yang bertanggung jawab terhadap setengah dari total kapasitas antioksidan, selain ellagic acid, gallagic acid, dan punicalin. Ellagic acid, punicalin, and punicalagin memiliki aktivitas antioksidan yang kuat secara *in vitro*, namun memiliki kemampuan berbeda dalam menangkalkan radikal bebas yang bervariasi. Ellagic acid lebih efektif dibandingkan punicalagin dan punicalin dalam menangkalkan kerusakan oksidatif secara *in vivo*. Kandungan polifenol yang banyak dalam kulit delima menunjukkan aktivitas antioksidan superior dibandingkan dengan satu kandungan polifenol yang diisolasi

dalam melawan radikal bebas *in vitro* (SUN, 2017). Jika ellagic acid berikatan dengan karbohidrat, akan terbentuk ellagitannin. Kandungan ellagitannin yang tinggi dalam kulit delima memiliki aktivitas antioksidan (Zahin *et al.*, 2010).

Tabel 2.4 Perbandingan Kandungan Antioksidan Ekstrak Daging Buah Delima dengan Ekstrak Kulit Buah Delima

Ekstrak	Hasil (%)	Fenol (mg/g)	Flavonoid (mg/g)	Proanthocyanidins (mg.g)	Asam Askorbat (mg/g)	Air (%)
Daging buah	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 ±	249.4 ± 17.2	59.1 ± 4.8	10.9 ± 0.5	0.99 ± 0.02	8.0 ± 0.8

(Sumber : Li *et al.*, 2005)

Selain senyawa tannin, kulit buah delima merah juga mengandung senyawa alkaloid palletierene, granatin, betulic acid, ursolic acid, isoquercitin, resin, triterpenoid, kalsium oksalat, dan pati, beta sitosterol, casuariin, casuarinin, casuarinin, D-mannitol, isopelletierine, friedelin, methyl isopelletierine, methyl pelletierine, pseudopalletierine, puniacorteins dan punigluconin (Duke, 2017). Buah delima kaya akan fitosterol. Fitosterol merupakan komponen biokimia dengan fungsi berlawanan dengan kolesterol bila dikonsumsi manusia. Selain itu, fitosterol juga tahan terhadap oksidasi, sehingga dapat digolongkan antioksidan pangan (Duke, 2017).

Kulit buah delima merah juga mengandung antosianin yang memberikan warna merah pada buahnya (Jaiswal *et al.*, 2010). Kulit delima kering terbukti mengandung anthocyanin 3 kali lebih tinggi dibandingkan pada bagian daging dan bijinya yaitu sebesar 51,02 ± 10,33 mg/g (Elfalleh *et al.*, 2012). Antosianin yang dapat diidentifikasi pada buah delima merah antara lain delphinidin 3-glucoside dan 3,5 diglucoside, cyanidin 3-

glucoside dan 3,5- diglucoside, pelargonidin 3-glucoside dan 3,5 diglucoside (Zhang *et al.*, 2009).

Kulit delima mempunyai total polifenol, antosianin, tannin, flavonoid yang berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan (Orak *et al.*, 2012; Neyrinck *et al.*, 2013). Aktivitas antioksidan kulit dengan kisaran 225,17-705,50 (mmol/100 g) (Akbarpour *et al.*, 2009). Berbagai kandungan antioksidan dalam kulit delima tersebut memiliki potensi sebagai anti inflamasi dan antioksidan sehingga mampu mengurangi kerusakan sel tubuh akibat stres oksidatif (Shaygannia *et al.*, 2016; Duke, 2017).

Kulit buah delima juga memiliki aktivitas antiangiogenik dan antikarsinogenik, inhibisi aktivitas siklooksigenase, produksi nitric oxide, aktivitas antimutagenik. Kulit delima menunjukkan aktivitas antioksidan dari total fenol dan flavonoid dalam melawan stress oksidatif (SOD and GPx) dan merubah profil lipid (TC, HDL, and LDL) pada tikus yang diinduksi methotrexate (Doostan *et al.*, 2017).

Ekstrak kulit buah delima lebih berpotensi dalam menurunkan profil lipid dibandingkan dengan ekstrak daging buahnya karena mengandung aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan daging buahnya (Li *et al.*, 2005). Ekstrak buah delima telah terbukti melindungi dari radikal bebas akibat peroksidasi lipid dan kerusakan DNA (EI-Wakf *et al.*, 2018). Berdasarkan penelitian di Mesir yang dilakukan pada tikus dengan pemberian kulit delima dosis 250 mg/kg berat badan tikus selama 4 minggu dapat menurunkan kadar kolesterol total yaitu 26,49 mg/dl (Osman *et al.*, 2012).

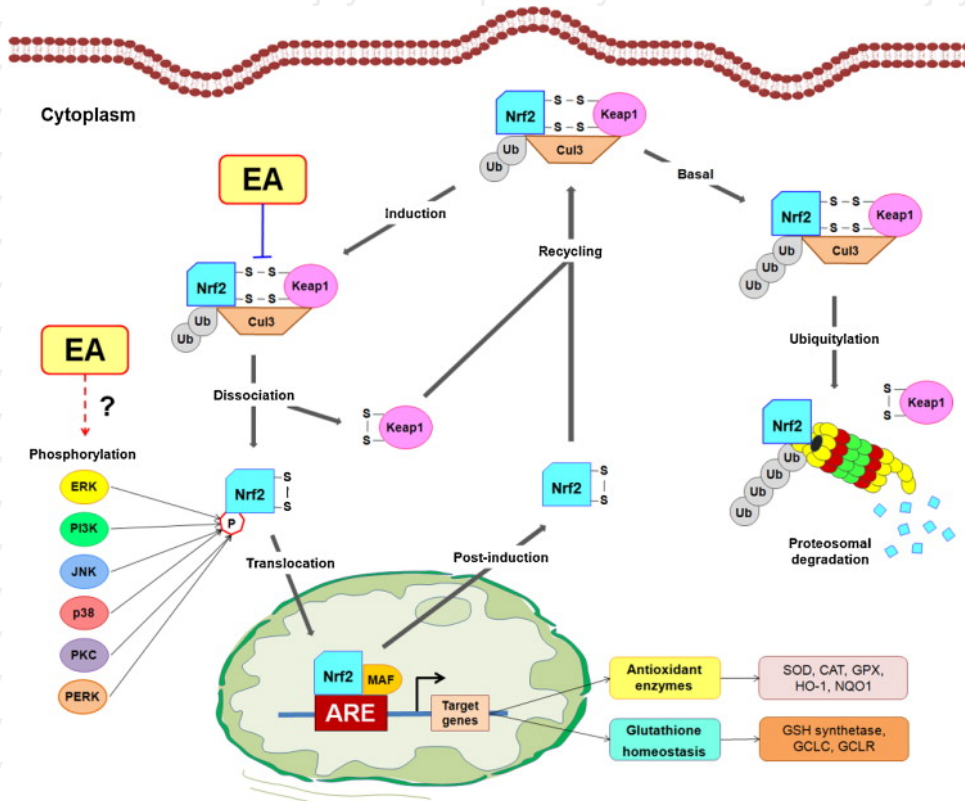


Kandungan antioksidan kulit buah delima berpotensi menjadi agen kardioprotektif (Hassanpour Fard *et al.*, 2011; El-Wakf *et al.*, 2018). Polifenol dalam kulit buah delima melindungi tubuh melawan peroksidasi lipid dalam serum. Semua kandungan antioksidan dalam kulit buah delima telah terbukti secara *in vivo* menangkal radikal bebas dan memberi manfaat untuk kesehatan jantung (Aviram & Rosenblat, 2013).

Ellagic Acid dapat membentuk antioksidan primer yang menghambat produk oksidatif memasuki system sirkulasi darah dan jaringan lain (SUN, 2017). Ellagic acid mengaktivasi respon antioksidan melalui Nrf2 (Nuclear erythroid 2-related factor 2). EA telah terbukti memiliki aktivitas yang menangkal berbagai ROS. Empat gugus fungsi hidroksil dan dua lakton bertindak sebagai akseptor ikatan hydrogen dan donor, memungkinkan EA untuk menangkal $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , H_2O_2 dan $ONOO^{\bullet}$ (García-Niño dan Zazueta, 2015).

Di sisi lain, EA secara tidak langsung melakukan fungsi protektif melawan stress oksidatif dengan meningkatkan regulasi (*upregulation*) Nrf2 dan menurunkan regulasi (*downregulation*) pada Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) yang memodulasi induksi fase 1 dan 2 enzim detoksifikasi. Nrf2 adalah factor transkripsi yang sensitive terhadap redox dan merupakan regulator respon antioksidan dalam sel. EA menginduksi fosforilasi Nrf2 melalui peningkatan P13k/Akt dan MAPK (García-Niño dan Zazueta, 2015).





Gambar 2.22 Mekanisme Keap1-Elektrofilik Acid

Asas elektrolit (EA) meningkatkan ekspresi antioksidan melalui aktivasi transkripsional erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). Nrf2 adalah kondisi disosiasi ketika kepreses ke dalam E3 ubiquitin ligase (Keap1) di sitoplasma. Keap1 berfungsi sebagai protein adaptora untuk Nrf2 dan kompleks ubiquitin (Ub) yang mengikat ke ubiquitin di Nrf2 dan degradasi melalui proteasom. Berinteraksi dengan sistem sinyal yang terkandung dalam keap1 dapat mengganggu agnitasinya terhadap Nrf2. Di sisi lain, EA dapat menginduksi fosforilasi Nrf2 oleh ERK, JNK, p38, PKC, dan PERK, sehingga meningkatkan translokasi Nrf2 ke dalam nukleus. Nrf2 berinteraksi dengan elemen esensial antioksidan yang mengatur ekspresi gen yang mengkode enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), dan enzim yang terlibat dalam homeostatis glutathione (GSH) seperti GSH synthetase (GSH synthetase) (Gardina dan Zaccaro, 2015).

Zat aktif lain yang terkandung dalam kulit buah delima adalah punicalagin. Punicalagin merupakan antioksidan yang bekerja pada AMPK. AMPK (AMP-activated protein kinase) adalah regulator biogenesis mitokondrial. AMPK memodulasi stress oksidatif melalui NF-E2 related factor (Nrf2) mediated phase II antioxidant enzymes. AMPK mengkoordinasi biogenesis mitokondrial yang dimediasi oleh peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1α) dan enzim fase II yang dimediasi Nrf2 untuk mengurangi stress oksidatif. Gangguan pada jalur AMPK-PGC-1α/Nrf2 menyebabkan gangguan jantung akibat stress

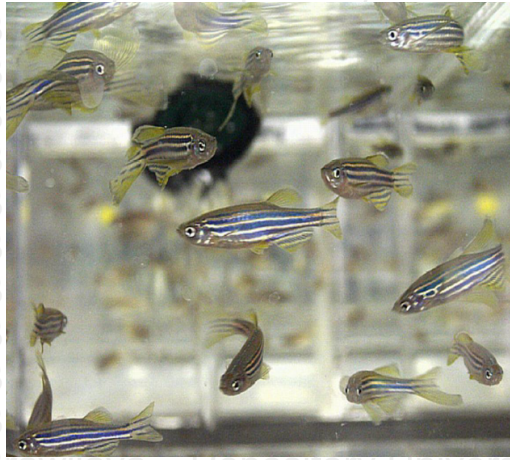
oksidatif. Punicallagin mengaktifasi jalur activated protein kinase (AMPK) terutama di cardiomyocytes (Cao *et al.*, 2015).

2.6 Ikan Zebra (*Danio rerio*)

2.6.1 Klasifikasi

Ikan zebra (*Danio rerio*) merupakan ikan yang berukuran kecil, habitat spesiesnya di air segar dan aquarium. Ikan zebra atau *zebrafish* (*Danio rerio*) termasuk dalam kelompok famili ikan air tawar Cyprinidae dan kelas Actinopterygii, dan subkelas Teleostei (Carpio dan Estrada, 2006). Saat ini terdapat 44 spesies danionim yang tersebar sampai dengan timur laut India, Bangladesh, dan Myanmar (Spence, 2008). Berikut ini merupakan taksonomi ikan zebra:

Kingdom	: Animalia
Subkingdom	: Bilateria
Subfilum	: Vertebra
Filum	: Chordata
Superkelas	: Actinopterygii
Kelas	: Teleostei
Super ordo	: Ostariophysii
Ordo	: Cypriniformes
Super famili	: Cyprinoidea
Famili	: Cyprinidae
Genus	: <i>Danio</i>
Spesies	: <i>Danio rerio</i>



Gambar 2.5 Ikan Zebra (*Danio rerio*)
(Reed dan Jennings, 2011)

Ikan zebra (*Danio rerio*) memiliki beberapa keuntungan untuk dijadikan sebuah subyek penelitian. Keuntungan yang dimiliki ikan zebra (*Danio rerio*) untuk dijadikan sebagai subyek penelitian adalah ikan zebra memiliki fekunditas yang tinggi (Austin-Tse *et al.*, 2013; Stewart, *et al.*, 2014), pertumbuhan *ex utero* yang cepat, mudah diteliti tanpa adanya obstruksi, sifat transparan dari korion memudahkan dalam pengamatan proses internal, telur ikan zebra memiliki permeabilitas terhadap molekul yang kecil, sehingga zat yang diberikan dapat menembus cangkang telur (Scholz *et al.*, 2008; McGrath, 2012), serta dari segi ekonomi ikan zebra (*Danio rerio*) tidak membutuhkan banyak biaya (Selderslaghs, 2009; Reed & Jennings, 2011; Jeanray, 2015).

Penghitungan usia pada ikan zebra (*Danio rerio*) dimulai sejak 1 jam setelah pengambilan embrio atau setelah lampu dinyalakan yang kemudian disebut dengan 0 hpf (*hours post fertilization*). Ikan zebra (*Danio rerio*) memiliki siklus hidup 14 jam terang dan 10 jam gelap yang disesuaikan dengan sistem kerja kardiovaskularnya. Suhu optimal untuk perkembangan ikan zebra (*Danio rerio*) adalah pada suhu 28,5 derajat celcius (Reed &

Jennings). Dalam pertumbuhannya, ikan zebra (*Danio rerio*) dibagi menjadi 7 periode pada tahap embriogenesisnya yang terjadi dalam waktu 3 hari yaitu; zigot, *cleavage*, blastula, gastrula, *segmentation*, pharyngula, dan periode menetas (Spirita Sharmili & Angelin, 2015).

2.6.2 Karakteristik

Secara morfologi, ikan zebra 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 menconet 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, xanthofofor emas, dan iridofofor (Spence, 2008).

Ikan 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, 2008).

2.6.3 Pertumbuhan dan Perkembangan Embrio

Pada tahap zygote, ikan zebra (*Danio rerio*) terhitung pada 0 – ¾ hpf. Kemudian tahap *cleavage* (¾ hpf), mulai terbentuk 2-7 sel yang terjadi secara cepat dan tersinkronisasi antar individu. Pada tahap blastula (2¼ 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, hipoblast serta axis embrionik. Pada tahap segmentasi (10 hpf) terjadi organogenesis primer, munculnya neuromere, ekor dan segmen-segmen tubuh. Pada tahap *pharyngula* (24 hpf), axis tubuh ikan zebra 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 ikan zebra (*Danio rerio*) yang terjadi secara asinkronis. Waktu menetas ikan zebra terjadi secara asinkronis, karena cepat atau lambatnya waktu menetas tidak menentukan kecepatan perkembangan ikan zebra (*Danio rerio*) tersebut (Kimmel *et al.*, 1995).

Telur ikan zebra (*Danio rerio*) juga tampak transparan sejak fertilisasi hingga tahap *pharyngula* pada saat jaringan mulai padat dan mulai adanya pigmentasi. Hal ini menjadikan ikan zebra (*Danio rerio*) mudah untuk diobservasi tanpa adanya obstruksi yang perlu dilakukan (Selderslaghs, 2009). Ikan zebra (*Danio rerio*) juga sensitif terhadap paparan senyawa kimia sehingga menjadikan ikan zebra cocok untuk dijadikan model untuk dilakukan suatu penelitian. Ikan zebra juga telah digunakan dalam berbagai

model dalam penelitian untuk melihat mekanisme dan menilai toksisitas suatu senyawa kimia (Selderslaghs, 2009).

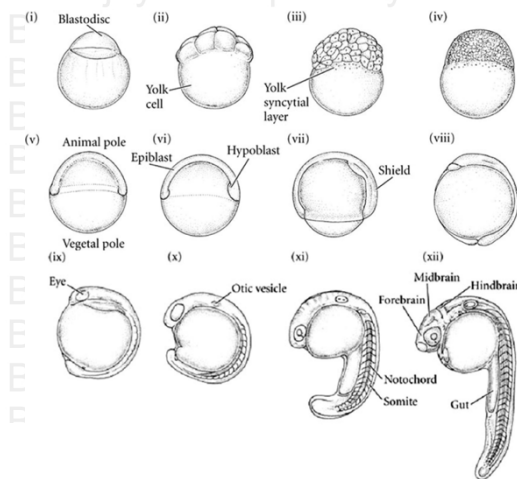
Sekitar 75% sekuen DNA ikan zebra memiliki kemiripan dengan manusia (Chakraborty *et al.*, 2009). Ikan zebra juga memiliki kesamaan struktur otak (Klee *et al.*, 2012) dan neurochemistry (Gerlai, 2009) dengan mamalia. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa zebrafish memiliki respon yang menyerupai manusia ketika dipapar dengan senyawa farmakologi (Kalueff, 2014; Abreu *et al.*, 2016). Embrio ikan Zebra (*Danio rerio*) dipilih sebagai hewan coba pada penelitian ini karena memiliki jantung dan sistem vaskularisasi sama dengan manusia (Bakkers, 2011). Beberapa penelitian menunjukkan zat kimia maupun obat mempunyai kesamaan efek toksik antara embrio ikan zebra dengan manusia (Wang, 2010). Ikan zebra merupakan organisme yang ideal dalam menggambarkan patologi pada manusia (Babin, 2014).

Ikan zebra memiliki telur 200-300 butir/minggu, perkembangan embrio tidak membutuhkan waktu yang lama sehingga menghemat waktu dalam penelitian, ikan zebra memiliki beberapa kekurangan jika digunakan sebagai model untuk hewan mamalia, diantaranya tidak memiliki beberapa organ yang dimiliki oleh hewan mamalia seperti paru-paru (Santoriello dan Zon, 2012).

Periode menetas dari ikan zebra yaitu 48-72 hpf (*hours post fertilization*), namun tidak dimasukkan kedalam index tahap perkembangan karena setiap individu yang berada didalam telur menetas secara sporadic dalam waktu 3 hari perkembangan (dalam suhu standar). Meskipun embrio belum menetas, terdapat kemajuan dalam perkembangan, dari jam ke jam,

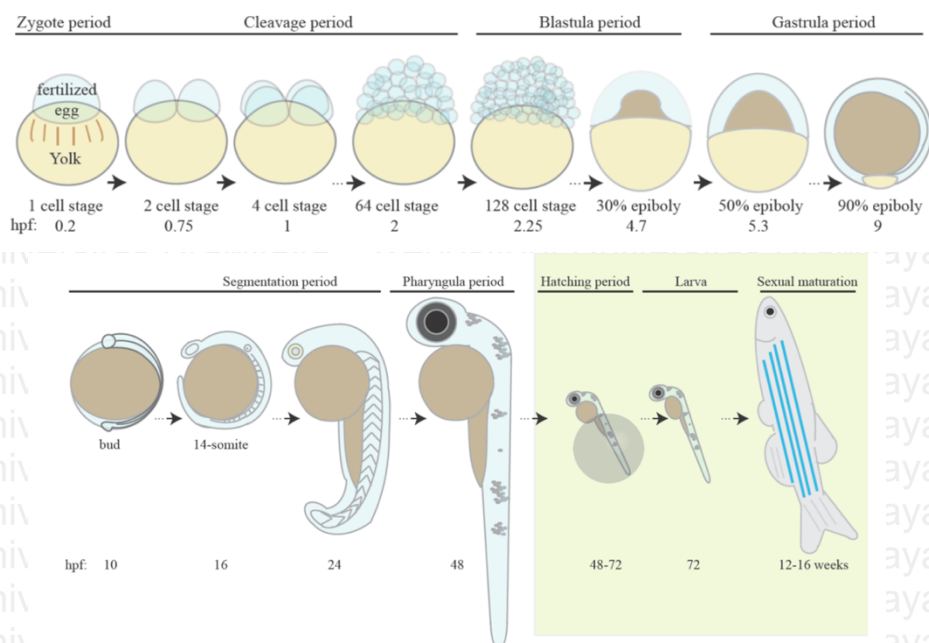


dan secara umum individu yang mempunyai kemampuan menetas secara spontan lebih dahulu tidak menentukan bahwa perkembangannya lebih cepat dibanding yang masih berada di dalam korion.



Gambar 2.6 Ilustrasi Perkembangan Embrio Ikan Zebra

Perkembangan embrio ikan zebra diawali dengan tahap *blastodisc* dan selanjutnya melakukan pembelahan hingga terbentuk organ-organ lain yang lebih kompleks (Park *et al.*, 2012).



Gambar 2.7 Tahap Perkembangan Embrio Ikan Zebra Hingga Dewasa

Pembelahan embrio ikan zebra diawali dengan 1 sel (zigot) kemudian berlanjut hingga 2, 4, 8, 16, 32 sampai 64 sel. Setelah pembelahan, embrio memasuki tahap 128 sel (blastula) mulai 2.25 hpf, dilanjutkan dengan tahap gastrula (50% epiboly) hingga periode segmentasi dan pharyngula. Embrio kemudian memasuki tahap hatching (penetasan) hingga larva awal (72 hpf) dan maturase seksual (12-16 minggu) (Eckhardt, 2011).

Tabel 2.5 Tabel pertumbuhan dan perkembangan ikan zebra
(Kimmel *et al.*, 1995; Hosen *et al.*, 2013)

Tahap	Waktu	Keterangan
Zigot (1 sel)	0 – ¾ jam	Telur yang baru difertilisasi berkembang menjadi zigot, sitoplasma menuju kutub untuk membentuk blastodisk
Pembelahan (2 – 64 sel)	¾ - 2,25 jam	Sel membelah menjadi 2,4,8,16, 32 sampai 64 sel
Blastula	2 ¼ - 5 ¼ jam	Embrio memasuki transisi midblastula, pembentukan yolk syncytial layer (YSL) dari epiboly. Diawali dengan terbentuknya kubah dan perubahan blastodisk menjadi blastoderm
Gastrula	5 ¼ - 10 jam	Epiboly sudah terbentuk secara sempurna, tail bud, aksis embrionik, dan primary germ layer telah terbentuk
Segmentasi	10 – 24 jam	Organogenesis awal dimulai. Diawali dengan neuron dan ginjal, telinga mulai nampak, ekor anterior memanjang, terjadi kontraksi miotom spontan.
Pharyngula	24 – 48 jam	Aksis tubuh mulai lurus ditandai dengan kepala yang memendek dan mulai lurus. Dimulainya pembentukan sirip. Jantung mulai berdenyut, serta mulai muncul sensitivitas terhadap rangsang taktil
Penetasan	48 – 72 jam	Perkembangan melambat Morfogenesis telah sempurna dan terjadi penetasan secara spontan menjadi larva. Mulai aktif berenang dan mulai timbul refleks menghindar pada rangsang taktil.
Larva awal	> 72 jam	Disebut sebagai larva, mulai berenang secara aktif untuk mengeksplorasi lingkungannya serta mencari makanan.

Tahap perkembangan ikan zebra dalam tabel mendeskripsikan gambar 2.7 (tahap 1 sel (zigot) hingga tahap larva awal yang dimulai pada 72 hpf)

2.6.4 Perkembangan Jantung Ikan Zebra

Fakta bahwa bahwa terdapat kemudahan dalam mengakses organ-organ internal ikan zebra termasuk juga jantung, darah, dan pembuluh darah membuat ikan zebra menjadi salah satu kandidat sebagai model organisme dalam mempelajari penyakit-penyakit kardiovaskuler. Diantara parameter

fungsi jantung yang dapat diteliti pada ikan zebra adalah denyut jantung yang sangat penting dikarenakan parameter tersebut juga mengalami perubahan seperti yang terjadi pada kardio-toksik pada manusia. Embrio ikan zebra sangat berguna dalam menjelaskan efek kardio-toksik dan neuro-toksik dari senyawa farmakologi yang dapat ditemukan dalam obat-obatan (De Luca, 2014). Jantung merupakan organ pertama yang terbentuk pada ikan zebra dan berfungsi pada perkembangan awal embrio pada vertebrata (De Luca, 2014; Brown *et al.*, 2016).

Embriogenesis ikan zebra tidak tergantung pada sirkulasi darah karena embrio dapat menerima oksigen yang cukup dari medium eksternal melalui difusi pasif. Tidak seperti kebanyakan model mamalia pada umumnya, banyak ikan zebra mutan dengan kelainan kardiovaskuler yang parah masih dapat bertahan sampai akhir dari organogenesis, sehingga dapat menyajikan penelitian yang belum pernah terjadi sebelumnya pada perkembangan jantung.

Jantung adalah organ yang pertama kali berkembang dan berfungsi. Perkembangan jantung membutuhkan mekanisme yang terkoordinasi dan terkombinasi yang bergantung pada banyak *pathway* perkembangan. Jantung embrio ikan zebra berasal dari prekursor kardiogenik yang telah muncul pada fase akhir blastula yang terlibat dalam perkembangan awal gastrula kemudian bermigrasi ke *lateral plate mesoderm* (LPM) di dekat batas otak tengah-otak belakang. Populasi bilateral prekursor kardiogenik dari *lateral plate mesoderm* (LPM) sudah terdiri dari prekursor miokard (yang akan membentuk lapisan miokardium luar jantung) dan prekursor endokard (yang akan membentuk lapisan endocardium dalam), keduanya



mengekspresikan penanda spesifik. Keduanya akan bermigrasi ke garis tengah pada 19 hpf dan bergabung membentuk tabung jantung linier. Saat bermigrasi, prekursor miokard mengakhiri diferensiasi dengan mengekspresikan gen spesifik yang memberikan aktivitas kontraktile. Tabung jantung linier kemudian mengalami banyak perubahan morfogenetik yang akan membentuknya sebagai organ multi-bilik (Samarut *et al.*, 2015). Tabung jantung ikan zebra mulai terbentuk pada 18 hpf (Perry *et al.*, 2010).

Detak jantung embrio ikan zebra dimulai pada 22 hpf dan terdapat aliran darah pada 24 hpf. Kontraksi otot Sel jantung pada embrio ikan zebra memulai kontraksi pada usia 24 hpf (Brown *et al.*, 2016). Tabung jantung secara berangsur-angsur berubah menjadi organ 2 bilik pada 24-48 hpf. Atrium dan ventrikel dipisahkan oleh penyempitan kanal atrium-ventrikel. Posisi tabung jantung ikan zebra pada awalnya adalah ujung ventrikel ke sisi kanan embrio dan ujung atriumnya ke sisi kiri embrio. Pada 36 hpf, asimetri jantung kiri-kanan dipertahankan sebagai *loop* tabung untuk membuat struktur berbentuk S. Ventrikel secara jelas dipindahkan ke sisi kanan atrium dan muncul di kanal atrioventrikuler (AV) dan *cardiac looping* berlangsung (Scott & Yelon, 2010).

Perkembangan jantung pada ikan zebra diregulasi oleh faktor molekuler, seluler, dan lingkungan. Secara anatomis, jantung ikan zebra berbeda dengan anatomi jantung manusia. Jantung manusia terdiri dari empat ruang yang dipisahkan oleh septum dan katup, sedangkan jantung ikan zebra hanya memiliki atrium tunggal dan ventrikel tunggal yang dipisahkan oleh katup atrioventrikular. Namun, walaupun demikian, ikan





zebra dianggap sebagai vertebrata yang berharga sebagai model organisme dalam penelitian kardiovaskuler (Sarmah & Marrs, 2016).

Komponen seluler jantung ikan zebra dapat dibandingkan dengan jantung mamalia. Jantung mamalia dikembangkan dari kontribusi dari bidang jantung pertama (FHF), bidang jantung kedua (SHF), dan sel-sel krista neural kardiak. Studi terbaru menunjukkan bahwa jantung ikan zebra juga terbentuk dari kontribusi FHF, SHF, dan sel-sel krista neural kardiak. Banyak gen dan jaringan pengaturan yang penting untuk kardiogenesis pada ikan zebra juga penting untuk kardiogenesis mamalia. Berbeda dengan tikus dan ayam, embrio ikan zebra dapat bertahan hidup dalam 7 hari pertama perkembangan tanpa sistem kardiovaskular fungsional, menerima oksigen melalui difusi pasif melalui kulit. Selain itu, fisiologi kardiovaskular manusia lebih menyerupai ikan zebra daripada hewan pengerat. Sifat elektrik jantung ikan zebra mirip dengan sifat listrik dari jantung manusia (Sarmah & Marrs, 2016).

Peristiwa morfologi awal jantung awal antara dua spesies ini, termasuk pembentukan progenitor jantung, plat miokard (*myocardial plate*), pembentukan tabung jantung, *cardiac looping* dan pembentukan katup sangat mirip. Pembentukan progenitor jantung ikan zebra dimulai sekitar 5 jam pasca pembuahan (hpf) diikuti dengan perkembangan jantung lainnya yang mengarah pada inisiasi pembentukan katup yang dimulai sekitar 48 hpf. Sedangkan progenitor jantung manusia terbentuk sekitar hari ke 15 – 16 perkembangan embrio. Pembentukan *cardiac cushion*, prekursor katup dan septa terbentuk sekitar hari ke 28 (Sarmah & Marrs, 2016).

Selanjutnya, dari segi fisiologi, jantung ikan zebra memiliki kemiripan yang lebih dengan manusia dibandingkan jantung hewan pengerat (*rodent*). Banyak sifat elektrik jantung ikan zebra yang serupa dengan manusia. Denyut jantung ikan zebra adalah 140 – 180 kali per menit yang lebih mendekati denyut jantung janin pada manusia apabila dibandingkan dengan denyut jantung tikus, yaitu 300 – 600 kali/menit (Sarmah & Marrs, 2016).

Adanya zat yang mempengaruhi perkembangan jantung akan menyebabkan gangguan berupa kontraksi jantung dan aritmia (Browne, 2006). Peningkatan denyut jantung atau berhentinya denyut jantung dapat mengindikasikan adanya gangguan fungsi jantung dan pertumbuhan ikan zebra (Rubinstein, 2006). Hewan ini digunakan sebagai hewan coba pada penelitian mengenai penyakit kardiovaskular, *congenital heart disease*, genetik, mutagenesis, toksisitas zat dan lain sebagainya (Brown *et al.*, 2016).

Jantung ikan zebra juga digunakan untuk mengamati kardiotoxikisitas suatu zat (Brown *et al.*, 2016). Adanya zat yang mempengaruhi denyut jantung dapat mengindikasikan gangguan fungsi jantung, pertumbuhan dan perkembangan embrio ikan zebra. Zat yang dapat menyebabkan pemanjangan interval QT jantung atau aritmia pada manusia atau bahan yang bersifat toksik pada embrio ikan zebra dapat menyebabkan penurunan denyut jantung embrio ikan zebra, sedangkan senyawa adrenalin dapat meningkatkan denyut jantung (Rubinstein, 2006).

2.7 Denyut Jantung

2.7.1 Proses Terbentuknya Denyut Jantung Manusia

Adanya aksi potensial pada otot jantung diakibatkan terbukanya dua kanal, yakni kanal cepat natrium dan kanal kalsium-natrium (kanal kalsium



tipe L). Kanal kedua, yakni kanal kalsium-natrium ini membuka lebih lambat dan akan terbuka lebih lama dibandingkan kanal cepat natrium. Selama tahap ini, ion kalsium dan natrium dalam jumlah yang banyak akan mengalir melewati kanal ini kedalam serabut otot jantung, sehingga aktivitas ini akan menyebabkan perpanjangan dari periode depolarisasi. Ion kalsium yang masuk dalam fase plateau akan menyebabkan otot berkontraksi.

Perbedaan yang mencolok diantara otot jantung dan otot skeletal adalah adanya aksi potensial yang memanjang serta adanya plateau pada otot jantung. Segera setelah onset dari aksi potensial, permeabilitas dari membran otot jantung pada ion kalium menurun sekitar lima kali lipat. Penurunan permeabilitas tersebut dapat dikarenakan influks yang berlebihan dari kalsium yang melewati kanal kalsium. Selanjutnya, berdasarkan peristiwa tersebut, penurunan permeabilitas kalium menyebabkan outfluks dari ion kalium selama fase plateau aksi potensial dan mencegah terjadinya penurunan voltase aksi potensial ke dalam level istirahat. Fase mekanisme terjadinya aksi potensial dijelaskan sebagai berikut:

- a) Fase 0 (depolarisasi), kanal cepat natrium terbuka. Ketika sel jantung terstimulasi dan mengalami depolarisasi, potensial membran menjadi lebih positif. Kanal cepat natrium terbuka dan membuat natrium mengalir ke sel dan mendepolarisasinya.
- b) Fase 1 (inisial repolarisasi), kanal cepat natrium tertutup. Ketika kanal cepat natrium tertutup, kemudian sel mulai untuk repolarisasi, ion kalium meninggalkan sel melalui kanal kalium yang terbuka



- c) Fase 2 (plateu), kanal kalsium terbuka dan kanal cepat natrium tertutup, kanal kalium tertutup. Secara ringkas terjadinya inisial repolarisasi, aksi potensial, dan plateau karena adanya peningkatan permeabilitas ion kalsium dan menurunnya permeabilitas ion kalium.
- d) Fase 3 (rapid repolarisasi) kanal kalsium tertutup, dan kanal lambat kalium terbuka. Menutupnya kanal kalsium menyebabkan peningkatan permeabilitas kanal lambat kalium, sehingga membuat ion kalium meninggalkan sel dan mengakhiri fase plateau, kemudian akan mengembalikan membran potensial ke dalam level istirahat
- e) Fase 4 (fase istirahat membran potensial)

Istilah *excitation-contraction coupling* atau gabungan eksitasi-kontraksi mengarah pada mekanisme dimana aksi potensial dapat menyebabkan miofibril pada otot berkontraksi. Ketika aksi potensial melewati membran otot jantung, aksi potensial tersebut akan menyebar kedalam serabut otot jantung melewati tubulus transversa (T). Aksi potensial pada tubulus T tersebut berperan dalam membran pada tubulus sarkoplasma transversa yang dapat mengakibatkan pelepasan ion kalsium pada otot sarkoplasma dari retikulum sarkoplasma. Beberapa detik kemudian, ion kalsium tersebut menyebar pada miofibril dan mengkatalisa reaksi kimia yang dapat menyebabkan pergeseran filamen aktin dan miosin satu sama lain, yang menyebabkan ketergantungan pada kanal kalsium dalam membran tubulus T. Kalsium memasuki sel dan kemudian akan mengaktifasi kanal pelepasan kalsium atau yang biasa disebut sebagai kanal reseptor ryanodine pada membran sarkoplasma yang memicu pelepasan kalsium pada sarkoplasma.



Ion kalsium selanjutnya berinteraksi dengan troponin untuk membentuk jembatan silang dan menghasilkan kontraksi (Hall, 2015)

Selanjutnya, pada akhir dari periode plateau, influks dari ion kalsium pada serabut otot dihentikan secara tiba-tiba, dan ion kalsium di sarkoplasma dipompa kembali ke retikulum sarkoplasma dan ruang ekstraseluler dari tubulus T. Transpor dari kalsium yang kembali menuju retikulum sarkoplasma dibantu oleh pompa kalsium-adenosin trifosfatase (ATPase). Ion kalsium juga dihilangkan dari sel melalui natrium-kalsium *exchanger*. Natrium yang memasuki sel pada periode pergantian ini kemudian ditranspor ke luar sel melalui pompa natrium-kalium ATPase. Hasilnya, kontraksi akan berhenti sampai muncul aksi potensial yang baru (Hall, 2015).

Siklus jantung atau *cardiac cycle* merupakan istilah yang digunakan dalam menggambarkan setiap aktivitas jantung yang dimulai dari denyut jantung satu ke yang lainnya. Setiap siklus tersebut diinisiasi oleh aksi potensial di sinus node (Hall, 2015). SA node yang terletak di atrium, AV node, bundle of His mempunyai aktivitas pacemaker yang berbeda. SA node mempunyai tingkat depolarisasi spontan yang paling tinggi. Depolarisasi menyebar melalui AV node ke bundle of His di septum intraventrikuler. Bundle tersebut terbagi ke kanan dan kiri dimana cabang bundle (*bundle branches*) kiri terbagi menjadi dua divisi, yakni anterior dan posterior. Dari cabang bundle, impuls disalurkan menuju otot ventrikular melalui penghubung serabut Purkinje (*Purkinje fibers*). Sistem konduksi ini membuat apeks ventrikel berkontraksi terlebih dahulu daripada daerah basal, yang mendorong darah keluar dari bilik (Pinnell, 2007).



2.7.2 Denyut Jantung Janin

Denyut jantung janin (DJJ) atau *Fetal Heart Rate* (FHR) dapat digunakan untuk memperkirakan keadaan umum janin. Adanya denyut jantung janin menunjukkan bahwa janin yang terkandung didalam uterus dalam keadaan hidup. Selain itu, dengan memantau denyut jantung janin juga dapat digunakan dalam menggambarkan bahwa janin tersebut teroksigenasi dengan baik.

Pemantauan denyut jantung janin dapat dilakukan baik secara eksternal maupun internal. Pemantauan dengan cara eksternal paling banyak menggunakan alat yang dinamakan Doppler yang dilengkapi dengan sistem komputer untuk menginterpretasikan serta menghitung sinyal Doppler tersebut. Sedangkan pemantauan denyut jantung janin secara internal dilakukan dengan menggunakan fetal elektroda, yakni sejenis kawat spiral yang diletakkan secara langsung pada kepala janin atau bagian lain yang representatif (*American College of Obstetrician and Gynecologist*, 2009). Von Steinburg (2013) menjelaskan bahwa rentang denyut jantung normal adalah 120 – 160 kali/menit. Kemudian banyak pedoman internasional yang mendefinisikan denyut jantung janin normal dalam rentang 110 – 160 kali/menit yang terlihat lebih aman untuk digunakan dalam praktik sehari-hari.

Banyak sistem untuk menginterpretasikan EFM atau *Electrical Fetal Monitoring* yang telah digunakan di Amerika Serikat dan di belahan dunia yang lainnya (*American College of Obstetricians and Gynecologist*, 2009). *National Institute of Child Health and Human Development* (NICHD) membuat rekomendasi lain untuk mendefinisikan karakteristik denyut



jantung janin dengan maksud untuk meningkatkan nilai prediktif dari *Electrical Fetal Monitoring* (EFM) dan memfasilitasi adanya manajemen klinik berbasis *evidence* dari *fetal compromise*. Definisi dari denyut jantung janin tersebut dimaksudkan untuk mengevaluasi dari pola-pola intrapartum tetapi dapat pula digunakan saat antepartum (Ashmead, 2011). Berdasarkan review yang diteliti sebelumnya, penggunaan sistem 3 tingkatan untuk mengategorikan pola denyut jantung janin sangat direkomendasikan. Selain itu, penting juga untuk diketahui bahwa pola denyut jantung janin hanya menyediakan informasi pada status keasaman saat ini. Tiga kategori tersebut adalah sebagai berikut:

- a) Denyut Jantung Janin kategori 1 (normal), catatan denyut jantung janin kategori satu ini diprediksikan normal pada tingkat keasaman pada saat observasi dilakukan. Pada kategori ini, denyut jantung janin dapat dipantau secara rutin dan tidak membutuhkan tindakan yang spesifik.

Ciri-ciri dari kategori ini adalah,

1. Rentang: 110 – 160 kali per menit
2. Variabilitas Baseline: sedang
3. *Late* atau *variable deceleration*: tidak ada
4. *Early deceleration*: ada atau tidak ada
5. Akselerasi: ada atau tidak ada

- b) Denyut Jantung Janin Kategori 2 (*Indeterminate*). Kategori 2 tidak menunjukkan status abnormal janin, hanya saja tidak adekuat untuk diklasifikasikan sebagai kategori 1 ataupun kategori 3. Kategori 2 membutuhkan evaluasi, pengawasan lebih lanjut, reevaluasi, dan pertimbangan terhadap hal-hal buruk yang akan terjadi. Pada keadaan



buruk, baik penilaian tambahan untuk menilai kesejahteraan janin ataupun perhitungan intrauterin resusitatif mungkin diperlukan pada kategori ini. Berikut adalah ciri-ciri DJJ kategori 2,

1. Rentang baseline: bradikardia yang tidak disertai tidak adanya variabilitas baseline; takikardia.
 2. Variabilitas baseline: variabilitas baseline minimal, tidak adanya variabilitas baseline dengan deselerasi yang berulang, *marked baseline variability*.
 3. Akselerasi: tidak adanya rangsangan akselerasi setelah stimulasi pada janin; variable deceleration berulang yang ditandai dengan variabilitas baseline minimal maupun sedang; deselerasi memanjang lebih dari 2 menit namun kurang dari 10 menit; late deceleration berulang dengan variabilitas baseline sedang; variable deceleration dengan karakteristik lain.
- c) Denyut Jantung Janin Kategori 3 (abnormal), Kategori 3 dihubungkan dengan adanya ketidaknormalan janin pada tingkat keasaman saat pemantauan dilakukan. Kategori ini membutuhkan evaluasi yang cepat. Bergantung pada situasi klinis, usaha untuk penanganan yang cepat untuk mengembalikan denyut jantung janin kembali normal tetapi tidak hanya terbatas pada oksigen maternal, pengubahan posisi maternal, penghentian stimulasi persalinan, penanganan hipotensi maternal, dan penanganan takisistol dengan perubahan denyut jantung janin. Apabila kategori ini tidak terselesaikan dengan beberapa cara tersebut, maka persalinan harus segera dilakukan. Berikut ciri-ciri pada DJJ kategori 3,



1. Tidak adanya variabilitas baseline dan beberapa dari hal ini, late deceleration berulang, variable deceleration berulang, bardikardi.
2. Pola sinusoidal.

(*American College of Obstetricians and Gynecologists*, 2009).

2.7.3 Proses Terbentuknya Denyut Jantung Embrio Ikan Zebra

Perkembangan jantung ikan zebra dimulai pada awal periode gastrulasi. Jantung embrio ikan zebra mulai berdetak pada 22 hpf dan mulai terdapat sirkulasi pada usia 24 hpf (Scott & Yelon, 2010). Secara fisiologis, regulasi denyut jantung ikan zebra pada masa embrionik berbeda dengan usia dewasa.

Denyut jantung mulai dapat diamati pada 72 hpf. Jantung ikan ini berkembang cepat dan memiliki karakteristik perkembangan awal yang mirip dengan mamalia (Hoage *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2016). Jumlah heart rate embrio ikan zebra berusia 3 hari rata rata mencapai 140 hingga 180 per menit (Sarmah & Marrs, 2016). Organ yang pertama terbentuk dan berfungsi pada perkembangan embrio vertebrata adalah jantung. Jantung pada embrio zebrafish memulai kontraksi pada usia 24 hpf dengan tiga tipe sel yaitu *atrial cardiomyocytes* (CMs), *ventricular* CMs, dan *endocardial cells*. Proses diferensiasi lanjutan membentuk *Second Heart Field* (SHF) dan terjadi *looping*. Proses ini selesai pada usia 48 hpf dengan terbaginya dua ruangan oleh konstriksi dari *atrioventricular* (AV) canal. Pada usia 72 hpf, sel proepicardium berkembang dan tumbuh melingkupi permukaan myocard sehingga terbentuk epicardium. Selain itu, pada usia ini terjadi perkembangan trabekula yang berfungsi memperluas area oksigenasi darah (Browne, 2006).

Pembentukan katup yang mencegah aliran darah balik terjadi pada usia 76 hpf. Katup ini terbentuk dari remodeling endocardial cushion yang terbentuk



dari transisi sel AV endocardial cells. Pematangan jantung terus berlanjut hingga dewasa sehingga terbentuk ventrikel yang lebih bulat dan adanya arteri koroner untuk memberi vaskularisasi *myocardium* dibawahnya (Brown *et al.*, 2016). Proses perkembangan jantung akan terganggu jika terjadi apoptosis pada sel atrial cardiomyocytes (CMs), ventricular CMs dan endocardial cells. Ketiga sel ini sangat berperan dalam kontraktilitas jantung zebrafish. Selain itu proses apoptosis yang abnormal akan mengganggu looping dan mengubah struktur morfologis normal jantung (Brown, *et al.*, 2016).

Jantung embrio ikan zebra terdiri dari 2 ruang yaitu atrium yang menerima aliran darah dan ventrikel yang memompa darah ke seluruh tubuh. Ikan zebra merupakan system model hewan yang cocok untuk mempelajari perkembangan kardiovaskular, genetika, dan cardiotoxicitas. Transparansi ikan zebra memungkinkan penilaian visual untuk sirkulasi dan morfologi. Ikan zebra memiliki system sirkulasi loop tunggal. Jantung mamalia dan ikan zebra sama-sama memiliki katup, endocardium dan pengaturan ritme. Aliran darah dari atrium, kemudian darah bergerak ke ventrikel dan dikirim ke aorta.

Denyut jantung embrio ikan zebra (140-180 denyut per menit; bpm) jauh lebih dekat dengan denyut jantung janin normal (130-170 bpm), yang sangat berbeda dari denyut jantung tikus (300-600 bpm). Dalam beberapa tahun terakhir, ikan zebra telah mendapatkan popularitas untuk penelitian kardiovaskular karena kapasitasnya untuk regenerasi jantung, yang memberikan peluang menarik untuk menemukan terapi baru untuk cedera jantung (Sarmah & Marrs, 2016).



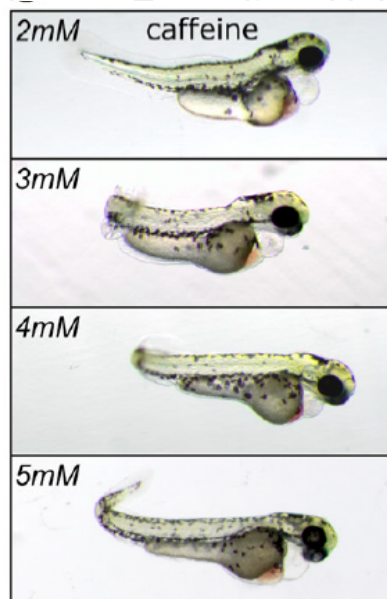
2.8 Edema Perikardium

Perikardium didefinisikan sebagai suatu struktur kantung yang melapisi seluruh jantung. Terdapat sekitar 5-10 cc cairan serous di dalam kantung yang berguna memberi ruang gerak bagi otot jantung. Lapisan perikardium mamalia terdiri dari membran serosa, terdiri dari lapisan mesothelial dan lapisan fibrosa pada bagian luar. Terdapat beberapa bagian pada perikardium yaitu perikardium visceral dan perikardium parietal. Perikardium visceral adalah bagian kantung yang menempel pada epikardial jantung yang memiliki sifat tipis dan fleksibel, sehingga memudahkan jantung untuk bergerak. Sedangkan perikardium parietal adalah bagian kantung yang tidak menempel dengan jantung yaitu berada di posisi luar, bersifat keras dan tebal dan berfungsi menahan volume jantung ketika darah dalam jantung berlebihan serta melindungi jantung dari benturan luar. Ketebalan perikardium manusia bisa mencapai 3 mm, namun rata-rata ketebalannya yaitu 1.7 mm (rentang 1.5 – 2 mm). Perikardium merupakan bagian jantung yang memiliki fungsi yang penting dan ketika ada gangguan, maka akan mengancam kehidupan (Shabetai, 2012).

Perikardium pada ikan zebra terbentuk pada periode segmentasi (10h) yaitu saat terjadi organogenesis primer. Usia embrio 36 hpf belum menunjukkan perbesaran pada perikardium. Sedangkan pada usia 42h pericardium sudah mengalami penonjolan sebagai tempat untuk jantung, terdapat pembuluh darah pada segmen-segmen tubuh ikan zebra (*Danio rerio*) pada pericardium ini juga kantung tetas yang mengandung enzim yang digunakan pada periode menetap. Kantung tetas ini muncul pada periode pharyngula karena adanya refraksidari granula sitoplasma (Kimmel *et al.*,



1995). Paparan kafein akan merusak angiogenesis serta terjadinya vasokonstriksi pembuluh darah yang dapat mengganggu proses morfogenesis pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*). Selain itu pelepasan radikal bebas serta terbentuknya MDA dapat memicu terjadinya malformasi berupa edema pericardium pada pertumbuhan ikan zebra (*Danio rerio*) (Jeanray *et al.*, 2015).



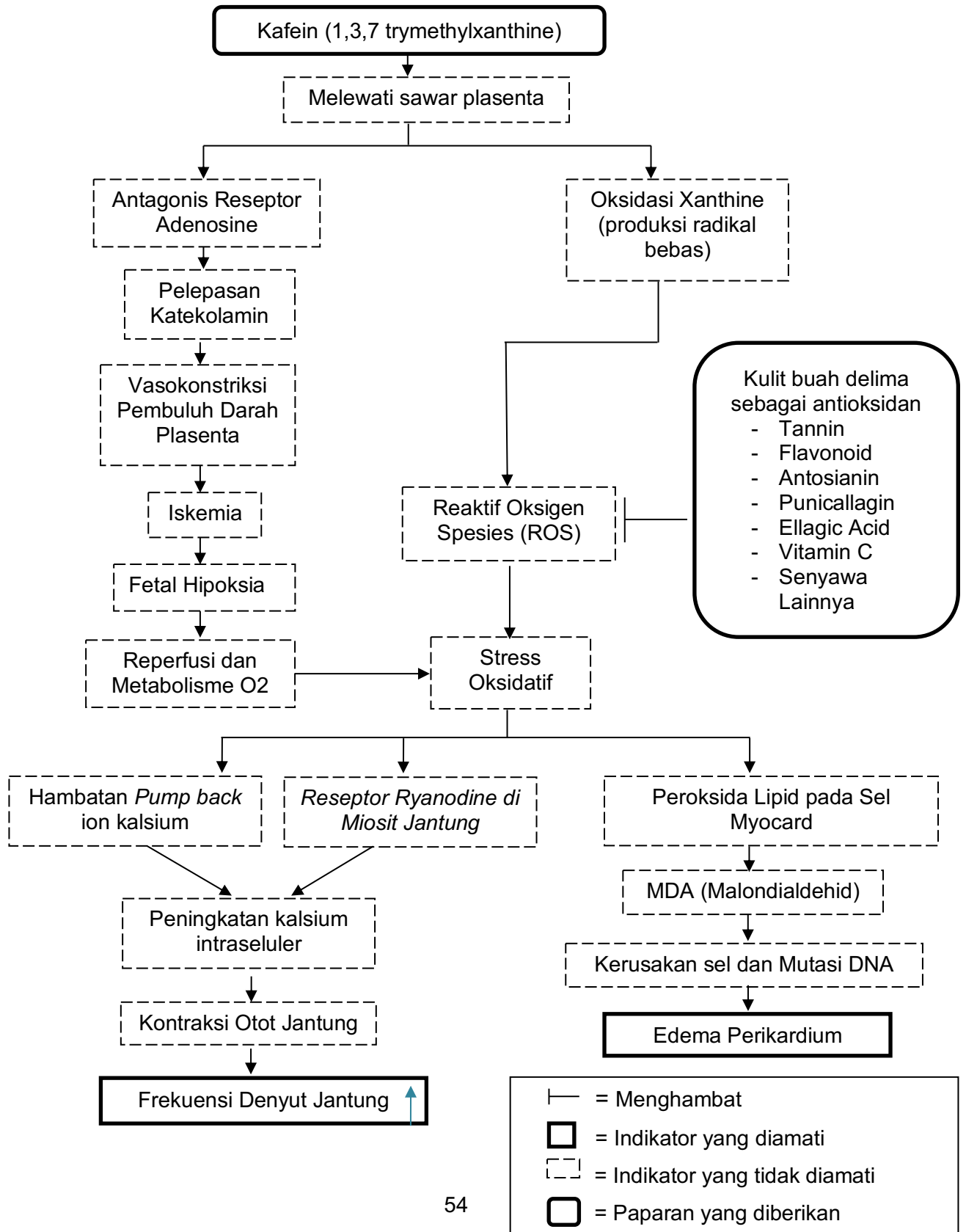
Gambar 2.8 Gambaran edema pericardium pada ikan zebra (3 dpf) akibat paparan kafein selama 1 hari.

Anak panah biru menunjukkan adanya edema perikardium ikan zebra (Pruvot *et al.*, 2012)

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Kafein yang bersifat hidrofobik dapat melewati sawar plasenta, kemudian kafein akan bersifat antagonis terhadap reseptor adenosine yang menyebabkan katekolamin meningkat. Pelepasan katekolamin dapat menginduksi stres kimiawi pada tubuh (Yang, 2010) yang membuat pembuluh darah menjadi vasokonstriksi. Vasokonstriksi pembuluh darah uteroplasental menyebabkan terjadinya 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 (Gupta *et al.*, 2007). Kerusakan oksidatif tersebut dimediasi oleh senyawa-senyawa ROS (*reactive oxygen species*). Selain itu, katekolamin juga dapat memicu senyawa-senyawa ROS (*reactive oxygen species*) pada miosit jantung pada keadaan stress oksidatif dengan mengaktivasi kanal kalsium tipe L dan menyebabkan influks ion kalsium (Johnstone *et al.*, 2014).

Selain itu, salah satu target dari stress oksidatif yang lainnya adalah reseptor ryanodine yang berada di miosit jantung. Aktivitas agonis pada reseptor ryanodine memaksa Ca^{2+} *transient fluxes* dan menginduksi kelebihan Ca^{2+} intraseluler (Monteiro *et al.*, 2016). Aktivasi reseptor ryanodine untuk melepaskan Ca^{2+} dapat menyebabkan perubahan denyut jantung (Chen, 2008; Porta, 2011). Mutasi yang terjadi pada reseptor ryanodine akan menyebabkan kebocoran ion kalsium di intraseluler (Xie *et al.*, 2015). Kemudian, Tappia *et al* (2001) juga menjelaskan bahwa stress oksidatif juga dapat menekan pompa kalsium dan aktivitas dari natrium-kalsium *exchanger*, sehingga menyebabkan penurunan proses pengeluaran ion kalsium dari sel jantung yang mengarah pada peningkatan ion kalsium pada intraseluler. Ion kalsium didalam sitosol tersebut akan berikatan

dengan troponin-tropomiosin dan menginisiasi *cross-bridge formation* dan kontraksi (Sherwood, 2015; Hall, 2015). Kontraksi otot jantung akan meningkatkan frekuensi denyut jantung.

Selain bersifat antagonis terhadap reseptor adenosine, kafein yang melewati sawar plasenta akan menginduksi oksidasi xanthine yang akan meningkatkan produksi radikal bebas yaitu *Reactive-Oxygen Species* (ROS) (Rashidi *et al.*, 2012). Radikal bebas merupakan molekul yang memiliki elektron tak berpasangan pada orbital luarnya sehingga bersifat sangat reaktif (Winarsi, 2011) yang dapat menghasilkan stres oksidatif. Stress oksidatif yang disebabkan oleh ROS dapat secara langsung menyebabkan kerusakan sel (Li *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018).

Stres oksidatif dapat menginduksi disfungsi mitokondria, mutasi genetik, serta menyebabkan kematian sel. ROS yang berikatan dengan lipid pada membran sel (peroksidasi lipid) akan menyebabkan terbentuknya Malondialdehid (MDA). MDA bersifat merugikan yang disebut sebagai sel mutagen pada sel mamalia dan bersifat karsinogenik. MDA akan menghasilkan aldehid dan keton yang bersifat toksik terhadap sel. Aldehid dan keton akan merusak sel serta struktur DNA. Peningkatan MDA menginduksi stress oksidatif

ROS berlebihan dapat menginduksi kerusakan komponen seluler yang bersifat ireversibel dan menyebabkan kematian sel melalui jalur apoptosis intrinsik melalui mitokondria, sehingga memicu kerusakan DNA mitokondria, disfungsi, dan peningkatan apoptosis sel (Zalukhu *et al.*, 2016). Pada tingkat seluler, kafein akan menurunkan aktivitas DNA polimerase dan menghambat aktivitas fosfodiesterase, sehingga menyebabkan malformasi janin berupa edema perikardium.

Beberapa gen yang dibutuhkan dalam perkembangan jantung selama embryogenesis ikan zebra dapat terganggu akibat stress oksidatif, diantaranya faktor transkripsi seperti *gata* dan *hand 2* yang berperan penting dalam diferensiasi myocardium awal dan morfogenesis. Faktor transkripsi *gata* merupakan determinan penting pada siklus hidup sel selama hematopoiesis. *Vegf* (*Vascular Endothelial Growth Factor*) lebih rendah pada paparan kafein (Chakraborty, 2011) adalah faktor utama yang mengontrol onset dan pemeliharaan kontraktilitas ventricular (Chen *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017). Edema perikardium dapat disebabkan oleh peningkatan regulasi (*up regulation*) *Vegf* dan *gata1* (Chen *et al.*, 2015). Ekspresi gen berlebih pada *hand2* dapat mengaugmentasi proliferasi regeneratif pada *cardiomyocytes* yang menyebabkan pembesaran jantung (Schindler *et al.*, 2014).

Stres oksidatif dapat dicegah dengan dua cara, yaitu dengan mencegah formasi ROS atau menghilangkan efek ROS dengan antioksidan (Zalukhu *et al.*, 2016). 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 (Madrigal-Carballo *et al.*, 2009). 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.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian ekstrak kulit buah delima (*Punica garantum L*) menurunkan frekuensi denyut jantung dan penurunan malformasi berupa edema perikardium embrio ikan zebra (*Danio rerio*) yang terpapar kafein.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

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

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik pada hewan coba berupa embrio ikan zebra (*Danio rerio*) yang secara acak dibagi ke dalam delapan kelompok dengan jumlah sampel untuk masing-masing kelompok adalah 20 embrio.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba selama penelitian dan lokasi dilakukannya penelitian dilaksanakan di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli – September 2018.

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian ini adalah embrio ikan zebra dari ikan zebra dewasa yang didapatkan dari laboratorium FPIK Universitas Brawijaya. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 20 embrio ikan zebra (*Danio rerio*) pada setiap *well plate*. Kelompok perlakuan diletakkan pada 24 *well plate*. Penelitian ini menggunakan 60 sampel pada masing-masing kelompok perlakuan. Penelitian ini terdiri dari 8 kelompok perlakuan, sehingga jumlah total sampel yang digunakan sebanyak 480 embrio. Hal tersebut dikarenakan jumlah tersebut sudah mewakili dan representatif untuk dilakukannya penelitian.

Perhitungan jumlah sampel minimal dilakukan dengan rumus federer (Dahlan, 2011):

$$(n - 1) (t - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) (8 - 1) \geq 15$$

$$n - 1 \geq 15/7$$

$$n \geq 3,1 \approx 3$$

Berdasarkan rumus tersebut, t adalah jumlah perlakuan dan n adalah jumlah sampel dalam setiap kelompok. Jumlah sampel minimal yang dapat digunakan adalah tiga embrio ikan zebra setiap kelompok. Selanjutnya untuk menilai apakah jumlah tersebut sudah adekuat untuk penelitian ini, digunakan metode Equation (E) (Charan & Kantharia, 2013; Festing, 2018), sebagai berikut:

$$E = \text{total hewan coba} - \text{total kelompok penelitian}$$

$$E = (3 \times 6) - 8$$

$$E = 24 - 8$$

$$E = 16$$

Melalui metode equation didapatkan hasil 16 yang artinya jumlah sampel hewan coba yang diinginkan berdasarkan rumus federer telah adekuat untuk penelitian ini. Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *Simple Random Sampling*.

Penelitian ini membagi sampel menjadi delapan kelompok perlakuan. Kedelapan kelompok tersebut yaitu:

1. Kelompok kontrol: sampel tidak diberikan paparan kafein maupun ekstrak kulit buah delima.
2. Kelompok kontrol negatif: sampel diberikan kafein konsentrasi 100 ppm

3. Kelompok kontrol positif: sampel diberikan kafein konsentrasi 100 ppm dan vitamin C konsentrasi 30 ppm
4. Kelompok Perlakuan 1: sampel diberikan kafein konsentrasi 100 ppm dan diberikan ekstrak kulit buah delima (*Punica granatum L*) konsentrasi 1 yaitu 0,14 ppm
5. Kelompok Perlakuan 2: sampel diberikan kafein konsentrasi 100 ppm dan diberikan ekstrak kulit buah delima (*Punica granatum L*) konsentrasi 2 yaitu 0,28 ppm
6. Kelompok Perlakuan 3: sampel diberikan kafein konsentrasi 100 ppm dan diberikan ekstrak buah delima (*Punica granatum L*) konsentrasi 3 yaitu 0,42 ppm.
7. Kelompok Perlakuan 3: sampel diberikan kafein konsentrasi 100 ppm dan diberikan ekstrak buah delima (*Punica granatum L*) konsentrasi 4 yaitu 0,56 ppm.
8. Kelompok Perlakuan 3: sampel diberikan kafein konsentrasi 100 ppm dan diberikan ekstrak buah delima (*Punica granatum L*) konsentrasi 5 yaitu 0,7 ppm.

4.4 Variabel Penelitian

Penelitian dilakukan untuk mengamati denyut jantung dan edema perikardium pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*) setelah pemaparan kafein dan ekstrak kulit buah delima (*Punica granatum L*) untuk melihat pengaruh aktivitas antioksidan dalam menangkal radikal bebas akibat pemberian kafein.

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan adalah pemberian kafein dengan konsentrasi tetap yaitu 100 ppm serta pemberian ekstrak kulit buah delima (*Punica granatum L*) dengan konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi 1 (0,14 ppm), konsentrasi 2 (0,28 ppm), dan konsentrasi 3 (0,42 ppm), konsentrasi 4 (0,56 ppm), konsentrasi 5 (0,7 ppm).

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah frekuensi denyut jantung dan edema perikardium.

4.5 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Satuan	Skala	Instrumen
1	Kafein	Kafein dalam penelitian ini adalah berupa kafein murni (PA) dalam bentuk bubuk yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi FKUB	mg/L	Rasio	Neraca
2	Ekstrak Kulit Buah Delima	Ekstrak kulit buah delima merupakan kulit buah delima yang telah melalui proses ekstraksi dengan etanol dan menghasilkan ekstrak kulit buah delima murni (PA). Buah delima diperoleh dan dideterminasi di UPT Materi Medika, Batu, Malang kemudian proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB.	mg/L	Rasio	Neraca
3	Denyut Jantung	Denyut jantung embrio ikan zebra adalah kontraksi dari atrium dan ventrikel secara bergantian. Denyut jantung dihitung selama 15 detik dalam bentuk video, kemudian dikali dengan empat untuk mengetahui perkiraan jumlah denyut jantung ikan zebra selama 1 menit (Rana <i>et al.</i> ,	kali/ menit	Rasio	Mikroskop cahaya stopwatch, kamera, aplikasi hand tally counter.

		2010). Hasil rata-rata denyut jantung yang dihitung selama satu menit dilakukan pada 72 hpf setelah proses pemaparan berakhir.			
4	Edema pericardium	Pericardium merupakan bagian dari <i>coelemic cavity</i> yang tampak sebagai ruangan mengelilingi jantung dan memisahkannya dengan dinding tubuh. <i>Coelemic cavity</i> merupakan ruangan berisi cairan yang memisahkan organ dalam (Kimmel <i>et al.</i> , 1995). Ikan zebra dapat dikatakan mengalami edema perikardium jika terdapat perbesaran pada pericardium ketika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Ketebalan pericardium embrio diamati dibawah mikroskop Olympus C31 dengan perbesaran obyektif 40x. Embrio diposisikan lateral sehingga diperoleh gambaran sisi lateral embrio. Pengukuran dilakukan pada 72 hpf.	-	Nominal	Mikroskop, kamera.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Bahan

1. Ikan zebra dewasa (*Danio rerio*) strain wild type
2. Medium embrio yang terdiri dari 0,04% CaCl₂, 1,63% MgSO₄, 1% NaCl dan 0,03% KCl dalam 100 mL Aqua Destilata.
3. Kafein bubuk murni yang telah dilarutkan dalam air terdestilasi (100 ppm)
4. Ekstrak kulit buah delima 0,14 ppm, 0,28 ppm, 0,42 ppm, 0,56 ppm, dan 0,7 ppm

5. Vitamin C bubuk murni yang dilarutkan dalam aquadest sebanyak 30 ppm

4.6.2 Alat

1. Aquarium dengan kapasitas 60 liter
2. Inkubator
3. Lampu Philip 10 watt
4. Mikroskop stereo merk Olympus C31
5. Cawan petri
6. Tabung falcon
7. Piring kultur 6 sumur (*well plate*)
8. Mikropipet dan tip, pipet plastik
9. Kamera HP iPhone 7
10. Kresek atau kertas asturo berwarna hitam

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 jantung (Basnet *et al.*, 2017). Penelitian oleh Chen (2008) menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut secara signifikan memengaruhi malformasi dan mortalitas embrio ikan zebra.

Konsentrasi kulit delima yang digunakan berdasarkan dari penelitian sebelumnya adalah 50 mg/kgBB/hari pada tikus yang diketahui dapat menangkal stress oksidatif (Pandey *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2013). Kemudian dilakukan konversi dengan membandingkan berat rata rata tikus terhadap berat rata rata ikan zebra. 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 ikan zebra pada 72 hpf.

$$\frac{150 \text{ (berat rata-rata tikus)}}{50 \text{ mg/kg (dosis di tikus)}} = \frac{0,42 \text{ (berat rata-rata ikan zebra)}}{x}$$

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

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= 0,7 mg/L = 0,7 ppm

4.7.2 Proses Ekstraksi Kulit Buah Delima (*Punica granatum L*)

Buah delima diperoleh dari UPT Materia Medika. Sebelumnya dilakukan determinasi buah delima (*Punica granatum L*) di UPT Materia Medika, Batu, Jawa Timur untuk memastikan identifikasi buah delima sesuai dengan spesies yang diinginkan. Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Proses pembuatan ekstrak dimulai dari tahap pengeringan, 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. Selanjutnya proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 95%. Buah delima kering dihaluskan dengan blender dan ditimbang

sebanyak 100 gram kemudian direndam dalam 1 L pelarut etanol 95% selama 1 malam sampai mengendap. 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 mengisi *heating bath* dengan air hingga penuh dan mengatur suhu. 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*.

4.7.3 Pembuatan Cairan Embrionik

Alat dan bahan yang digunakan untuk pembuatan cairan embrionik diantaranya 0,04% CaCl_2 , MgSO_4 1,63%, NaCl 1% dan KCl 0,03% yang dilarutkan dalam Aquades 100 ml (Jati, 2017), tabung erlemeyer, spatula dan timbangan digital Dhaus Pioneer PA214210.

4.7.4 Pengenceran Ekstrak Kulit Delima, Kafein dan Vitamin C

Pengenceran dilakukan di Laboratorium Faal FK UB dengan prosedur:

1. Menimbang ekstrak sesuai konsentrasi dengan menggunakan timbangan analitik
2. Menyiapkan tiga falcon berisi 50 ml aquadest
3. Memasukkan hasil timbangan ekstrak kulit delima, kafein dan vitamin C ke masing masing falcon
4. Menghomogenkan larutan dengan vortex 1500 rpm

4.7.5 Pemeliharaan Ikan

Pemeliharaan ikan zebra dewasa dilakukan dalam kotak air dilengkapi dengan sistem resirkulasi yang berkelanjutan. Ikan dipelihara dalam tanki dengan kapasitas 60 L. Suhu air dijaga pada suhu 28,5⁰ C dan pH antara 7,9 – 8,3, kadar oksigen > 95%. Ikan zebra diberi makan sebanyak tiga kali setiap hari dengan Tetramin dan cacing blok. Akuarium tempat pemeliharaan berukuran 60 cm x 40 cm x 40 cm dengan diberikan jaring di bawahnya agar telur ikan zebra dapat tertampung dan menghindari ikan dewasa memangsa telurnya. Perawatan ikan zebra dilakukan dengan memperhatikan siklus gelap dan terang dengan perbandingan 14 : 10 jam. Periode terang selama 14 jam dimulai dari pukul 08.00 pagi (Reed & Jennings, 2011).

4.7.6 Pengawinan Ikan

Pengawinan dilakukan dengan meletakkan ikan jantan dan ikan betina dengan perbandingan 2:1 kedalam akuarium pengawinan dengan ukuran 40 x 32 x 32 cm suhu air tetap dijaga pada suhu 28,5⁰ C dan pH antara 7,9 – 8,3, kadar oksigen > 95%, dan ikan dewasa tetap diberi makan 3 kali sehari. Didalam akuarium telah diletakkan jala pemisah dibagian dasar untuk memisahkan antara telur dengan ikan dewasa dan menghindari telur dimakan kembali oleh ikan dewasa. Selain itu, didalam akuarium telah diletakkan pula tanaman air untuk merangsang perkawinan. Proses pengawinan dilakukan pada sore hari yakni pukul 16.00 sehari sebelum proses panen dimulai.

4.7.7 Pengambilan Embrio

Pengambilan embrio ikan zebra dilakukan dengan memasukkan keranjang berjala dalam kotak air ikan zebra setelah pemberian makan terakhir. Embrio diambil dalam rentang waktu 15-20 menit setelah periode terang dimulai. Setelah itu, embrio dimasukkan ke dalam medium embrio untuk dibersihkan dari debris.

4.7.8 Kultur Embrio

Embrio yang telah dibersihkan diletakkan di cawan petri lalu diamati dibawah mikroskop untuk menentukan apakah embrio tersebut telah terfertilisasi atau belum. Embrio yang telah terfertilisasi pada bagian cangkang terdapat bulatan yang berwarna lebih keruh dari tengahnya. Pengamatan tidak lebih dari dua jam. Embrio diletakkan dalam piring kultur dan diinkubasi pada suhu 28.5⁰ C. Medium embrio diganti setiap hari dan ikan dirawat sampai 72 hpf.

Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *simple random sampling*. Alat dan bahan pengambilan dan pemeriksaan embrio ikan zebra yaitu aquades, inkubator dengan suhu 28 derajat C, *disposable pipette*, cawan petri, well-plate (24 well), handscoon, asturo warna hitam, mikroskop stereo merk olympus, dan larutan embrionik (disimpan dalam refrigator 4-8°C) stok 10x.

4.7.9 Pemaparan Kafein

Pemaparan kafein dilakukan pada tujuh kelompok, kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1, perlakuan 2, perlakuan 3, perlakuan 4, dan perlakuan 5. Pemaparan kafein dalam medium embrio diberikan dengan konsentrasi 100 mg/L. Penelitian ini menggunakan embrio

yang berumur 5,25 jam pasca fertilisasi dikarenakan pada usia tersebut sama dengan periode implantasi pada mamalia (Berghmans *et al.*, 2005). Kafein diberikan pada 5,25 hpf hingga 72 hpf. Paparan dilakukan sejak pembelahan 32 hingga 64 sel dengan dekorionisasi alami.

Namun, konsentrasi setiap paparan diduga tidak sama pada masing-masing embrio selama masih ada korion, sehingga dekorionisasi sebaiknya dilakukan. Harapannya adalah konsentrasi paparan dapat diabsorpsi secara lengkap dan merata oleh ikan zebra (Capiotti *et al.*, 2011). Paparan dalam penelitian ikan zebra pada periode awal kehidupan yaitu dengan melarutkan kafein dalam air dikarenakan ikan zebra belum dapat mengonsumsi makanan sampai usia 7 dpf (Chen, 2008; Capiotti *et al.*, 2011).

4.7.10 Pemberian Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum L*) dan Vitamin C

Perlakuan pemberian ekstrak kulit buah delima murni dilakukan pada 5,25 hpf hingga 72 hpf hanya pada kelompok perlakuan 1, 2, 3, 4, dan 5. Penentuan konsentrasi didasarkan pada penelitian sebelumnya pada tikus. Sehingga konsentrasi kulit buah delima hasil konversi dalam berat badan ikan zebra yang memberikan efek antioksidan adalah 0,14 ppm. Konsentrasi yang diberikan masing-masing kelompok perlakuan adalah 0,14 ppm; 0,28 ppm; 0,42 ppm; 0,56 ppm; dan 0,7 ppm.

Vitamin C yang digunakan dalam penelitian ini adalah vitamin C murni. Konsentrasi vitamin C yang diberikan adalah 30 ppm. Konsentrasi vitamin C tersebut didasarkan pada eksplorasi penelitian

pendahuluan dengan mempertimbangkan penelitian terdahulu oleh Reimer (2006) dimana vitamin C dengan dosis 250 μM secara signifikan mampu menurunkan toksisitas akibat ROS pada embrio ikan zebra.

Vitamin C tersebut dijadikan sebagai kontrol positif dan diberikan dengan kafein pada di dalam medium embrio. Asam askorbat, atau yang lebih dikenal dengan nama vitamin C merupakan senyawa vitamin yang larut dalam air. Vitamin C memiliki rumusan kimia $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ dan memiliki peran penting, seperti sintesis kolagen dan sintesis neurotransmitter. Vitamin C juga diketahui memiliki aktifitas antioksidan yang melindungi karbohidrat, lemak, protein, dan asam nukleat dari kerusakan akibat radikal bebas (Murray *et al.*, 2010).

4.7.11 Penghitungan Denyut Jantung Embrio Ikan Zebra

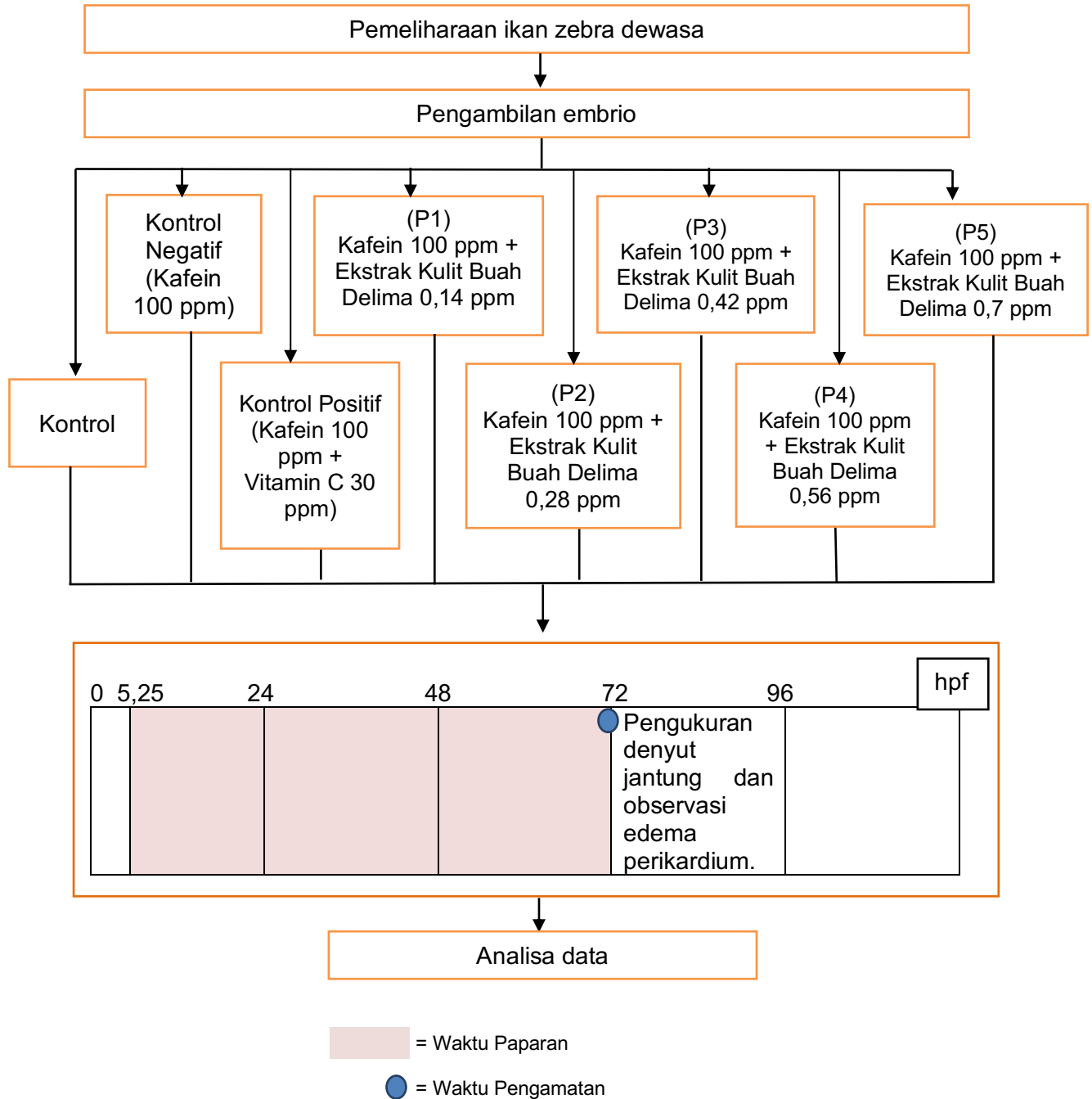
Perhitungan denyut jantung dilakukan pada embrio usia 72 hpf. Embrio ikan zebra dipindahkan dari *well plate* ke slide mikroskop menggunakan pipet plastic dan diberi sedikit air. Setelah itu, slide yang berisi embrio ikan zebra 72 hpf diletakkan di bawah mikroskop stereo (SZ-PT Olympus) dengan perbesaran 40x. Gambaran denyut jantung ikan zebra direkam menggunakan kamera, kemudian denyut jantung dihitung selama satu menit dengan bantuan *stopwatch* dan *counter*. Sebelumnya, terlebih dahulu. Penghitungan denyut jantung dilakukan dengan menghitung kontraksi salah satu dari kedua ruang jantung (atrium atau ventrikel). Hasil akhir jumlah denyut jantung embrio ikan zebra dikali dengan dua untuk mengetahui perkiraan jumlah denyut jantung per menitnya. Penghitungan denyut jantung dilakukan sebanyak

tiga kali tiap sampel untuk mengurangi subyektivitas peneliti kemudian dihitung rata-rata.

4.7.12 Pengamatan Perikardium Larva Ikan Zebra

Embrio diposisikan lateral sehingga diperoleh gambaran sisi lateral embrio (sisi jantung dan yolk sac) (Antkiewicz *et al.*, 2005). Pericardium larva ikan zebra diamati dengan menggunakan mikroskop, yaitu mengambil larva pada 72 hpf menggunakan pipet dan meletakkan di *object glass*. Apabila larva terlalu banyak bergerak, larutan metil selulosa 3% dapat diberikan. Kemudian, pericardium larva ikan zebra diamati dengan menggunakan perbesaran 40 kali.

4.8 Alur Penelitian



4.9. Analisa Statistik

Pengukuran signifikansi statistik antar kelompok dianalisis menggunakan program SPSS dengan tingkat signifikansi ($p < 0,05$) dan taraf

kepercayaan 95%. Kemudian dikomparatif dengan analisis one way variance (ANOVA). One way variance (ANOVA) merupakan salah satu bentuk dari uji parametrik. Secara umum, untuk menggunakan uji ANOVA, maka diperlukan syarat berikut:

- Data bersifat numerik dan data harus terdistribusi normal (Suwarjana, 2016)
- Varians data harus sama (Dahlan, 2011)

Jika syarat tersebut terpenuhi, maka dipilih uji one way ANOVA, tetapi apabila syarat tersebut tidak terpenuhi, maka diupayakan untuk melakukan transformasi data supaya distribusi menjadi normal dan varians menjadi sama. Namun apabila variabel hasil transformasi tidak berdistribusi normal atau varians tetap tidak sama, maka alternatif yang dapat digunakan adalah uji Kruskal-Wallis. Selanjutnya, apabila pada uji ANOVA maupun Kruskal-Wallis didapatkan $p < 0.05$, maka dapat dilanjutkan dengan analisis Post Hoc (Dahlan, 2011). Uji *Post Hoc* dilakukan untuk menilai pada kelompok mana rata-rata yang berbeda. Selanjutnya dilakukan uji regresi dan korelasi untuk menentukan pengaruh dan arah hubungan antara variabel bebas dan terikat.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Denyut Jantung

5.1.1 Hasil Penelitian Denyut Jantung Ikan Zebra

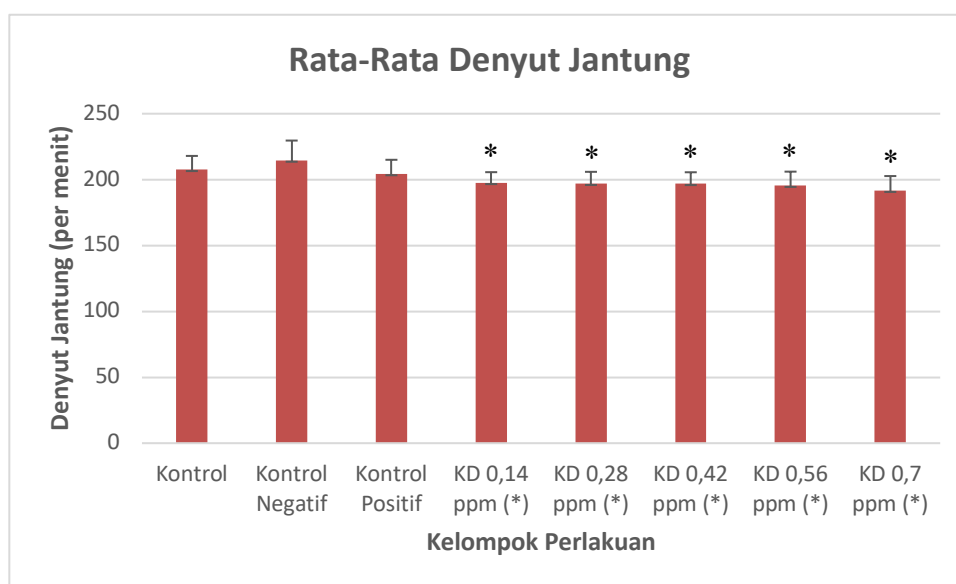
Denyut jantung ikan zebra diamati dan direkam pada 72 hpf setelah mendapat pemaparan kafein dan kulit delima dengan menggunakan mikroskop Olympus perbesaran 40x. Penghitungan denyut jantung ikan zebra dilakukan setelah pengambilan video selama 15 detik. Denyut jantung dihitung menggunakan aplikasi digital *hand tally counter* sebanyak 3 kali dan dirata-rata, kemudian dikonversikan menjadi denyut jantung per menit. Hasil rata-rata denyut jantung menunjukkan adanya peningkatan pada kelompok kontrol negatif terhadap kelompok kontrol, yaitu 207,47/menit menjadi 214,56/menit. Secara lebih rinci, hasil rata-rata denyut jantung embrio ikan zebra pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada table berikut:

Tabel 5.1 Rerata Denyut Jantung Embrio Ikan Zebra 72 hpf pada Setiap Kelompok

Kelompok Perlakuan	Denyut Jantung		
	Mean	SD	N
Kontrol	207,47	± 10,49	45
Kontrol Negatif (Kafein 100 ppm)	214,56	± 15,06	12
Kontrol Positif (Kafein 100 ppm + Vit. C 30 ppm)	204,28	± 10,75	24
P1 (Kafein 100 ppm + KD 0,14 ppm)	197,57	± 8,06	17
P2 (Kafein 100 ppm + KD 0,28 ppm)	196,91	± 8,98	19
P3 (Kafein 100 ppm + KD 0,42 ppm)	196,85	± 8,72	30
P4 (Kafein 100 ppm + KD 0,56 ppm)	195,44	± 10,59	26
P5 (Kafein 100 ppm + KD 0,7 ppm)	191,65	± 11,04	30

Keterangan: KD: Kulit Delima; SD: Standar Deviasi,
N: Jumlah Sampel

Berdasarkan Tabel 5.1, terdapat penurunan denyut jantung pada kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 1, 2, 3, 4, dan 5, yaitu 204,28/menit, 197,57/menit, 196,91/menit, 196,85/menit, 195,44/menit dan 191,65/menit secara berurutan. Rata-rata denyut jantung terendah yaitu kelompok perlakuan 5 (kafein 100 ppm + kulit buah delima 0,7 ppm) dibandingkan dengan kelompok lain.



Gambar 5.1 Grafik Rerata Denyut Jantung Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*) 72 hpf

Keterangan: KD: Kulit Delima dengan berbagai konsentrasi; Kontrol Negatif: Kafein 100 ppm; Kontrol Positif: Kafein 100 ppm + Vit.C 30 ppm. Pemberian ekstrak kulit delima dengan berbagai konsentrasi dapat menurunkan denyut jantung embrio ikan zebra yang terpapar kafein. Tanda (*) menunjukkan nilai yang signifikan pada kelompok paparan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dengan CI 0.05

5.1.2 Analisis Data

Analisis data denyut jantung menggunakan program SPSS versi 25.0.

Uji statistik yang digunakan dalam analisis data denyut jantung ini adalah Uji *One Way ANOVA*. Namun, jika data tidak memenuhi persyaratan uji parametrik *One Way ANOVA* yaitu data harus terdistribusi normal dan memiliki varian yang homogen. Selanjutnya dilakukan upaya deteksi *outliers* atau transformasi data untuk membuat data menjadi normal, namun jika

dengan upaya tersebut data tetap tidak normal maka uji statistik yang digunakan adalah Uji Non Parametrik *Kruskal-Wallis*.

5.1.2.1 Uji Normalitas Distribusi Data

Uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro Wilk*. Data menunjukkan nilai signifikansi 0,219 ($p < 0,05$). Data dikatakan memenuhi asumsi normalitas apabila *p-value* $> 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa data kelompok tersebut memiliki distribusi yang normal.

5.1.2.2 Homogenitas Ragam Data

Homogenitas data dapat diketahui dengan menggunakan Uji Levene (Levene Test). Uji homogenitas ragam data menunjukkan nilai signifikansi 0,066 ($p < 0,05$), sedangkan data dikatakan memenuhi homogenitas ragam apabila *p-value* $> 0,05$. Sehingga data denyut jantung dalam penelitian ini menunjukkan persebaran yang homogen.

5.1.2.3 Uji *One Way ANOVA*

Data denyut jantung pada penelitian ini telah menunjukkan persebaran normal dan homogen, sehingga memenuhi syarat dilakukan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui pengaruh ekstrak kulit delima terhadap penurunan denyut jantung embrio ikan zebra yang terpapar kafein secara *in vitro*. Hasil pengujian dapat dilihat pada tabel 5.2 berikut:

Tabel 5.2 Hasil Pengujian *One Way ANOVA* pada Pengaruh Ekstrak Kulit Delima terhadap Denyut Jantung

Perlakuan	Denyut Jantung	
	Mean \pm SD	p-value
Kontrol	207,74 \pm 10,49 ^a	0.000*
Kontrol Negatif	214,56 \pm 15,06 ^b	
Kontrol Positif	204,28 \pm 10,75 ^a	
Perlakuan 1	197,57 \pm 8,06 ^c	
Perlakuan 2	196,91 \pm 8,98 ^c	
Perlakuan 3	196,84 \pm 8,72 ^c	
Perlakuan 4	195,44 \pm 10,59 ^c	
Perlakuan 5	191,64 \pm 11,04 ^c	

Keterangan: Tanda (*) menunjukkan nilai yang signifikan dengan CI 0.05. Notasi (a, b, c, d, e) yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) setelah uji *Post Hoc*

Setelah dilakukan uji *One Way ANOVA*, didapatkan nilai signifikansi denyut jantung sebesar 0,000 ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa H_0 ditolak, sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak kulit delima (*Punica granatum L*) memberikan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan denyut jantung embrio ikan zebra (*Danio rerio*) yang terpapar kafein secara *in vitro*.

5.1.2.4 Uji *Post Hoc*

Uji *post hoc* perlu dilakukan untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan rata-rata denyut jantung. Data denyut jantung memiliki distribusi yang tidak normal serta memiliki sebaran yang homogen, sehingga dilakukan uji *post hoc* menggunakan uji *LSD (Least Square Differences)* dengan hasil pada tabel 9 sebagai berikut:

Tabel 5.3 Hasil Uji *Post Hoc* Denyut Jantung pada Berbagai Perlakuan

Perbandingan		Beda Rerata	p-value
Kontrol	Kontrol Negatif	-7.082	0.037*
	Kontrol Positif	3.196	0.225
	P1 (0,14 ppm)	9.905	0.001
	P2 (0,28 ppm)	10.562	0.000*
	P3 (0,42 ppm)	10.629	0.000*
	P4 (0,56 ppm)	12.037	0.000*
Kontrol Negatif	P5 (0,7 ppm)	15.829	0.000*
	Kontrol Positif	10.277	0.006*
	P1 (0,14 ppm)	16.986	0.000*
	P2 (0,28 ppm)	17.644	0.000*
	P3 (0,42 ppm)	17.711	0.000*
	P4 (0,56 ppm)	19.119	0.000*
Kontrol Positif	P5 (0,7 ppm)	22.911	0.000*
	P1 (0,14 ppm)	6.709	0.043*
	P2 (0,28 ppm)	7.366	0.022*
	P3 (0,42 ppm)	7.433	0.010*
	P4 (0,56 ppm)	8.841	0.003*
P1 (0,14 ppm)	P5 (0,7 ppm)	12.633	0.000*
	P2 (0,28 ppm)	0.657	0.850
	P3 (0,42 ppm)	0.724	0.818
	P4 (0,56 ppm)	2.132	0.511
	P5 (0,7 ppm)	5.924	0.062
P2 (0,28 ppm)	P3 (0,42 ppm)	0.067	0.982
	P4 (0,56 ppm)	1.475	0.638
	P5 (0,7 ppm)	5.267	0.085
P3 (0,42 ppm)	P4 (0,56 ppm)	1.407	0.613
	P5 (0,7 ppm)	5.200	0.054
P4 (0,56 ppm)	P5 (0,7 ppm)	3.792	0.174

Tanda (*) menunjukkan nilai yang signifikan dengan CI 0.05

Setelah mendapatkan hasil yang sangat signifikan pada uji *One Way Anova*, kemudian dilakukan uji *post hoc* yaitu uji *LSD* untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki perbedaan yang berarti.

- a. Kelompok kontrol negatif (kafein 100 ppm) memiliki perbedaan yang berarti dengan rata-rata semua kelompok perlakuan dengan p value 0.000. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit delima dengan berbagai konsentrasi pada kelompok perlakuan

berpengaruh signifikan terhadap penurunan denyut jantung. Kelompok kontrol negatif dan kontrol positif menunjukkan p-value sebesar 0.000 ($p < 0.05$) sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian vitamin C mampu menurunkan denyut jantung akibat paparan kafein secara optimal.

- b. Kelompok kontrol positif memiliki perbedaan berarti dengan semua kelompok perlakuan, namun tidak berbeda secara berarti dengan kelompok kontrol.
- c. Kelompok perlakuan 1 (0,14 ppm), perlakuan 2 (0,28 ppm), perlakuan 3 (0,42 ppm), perlakuan 4 (0,56 ppm), dan perlakuan 5 (0,7 ppm) tidak memiliki perbedaan bermakna satu sama lain.
- d. Kelompok perlakuan 1 (0,14 ppm) tidak memiliki perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol, namun kelompok perlakuan 2 (0,28 ppm), 3 (0,42 ppm), perlakuan 4 (0,56 ppm) maupun perlakuan 5 (0,7 ppm) memiliki perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol.

5.1.2.5 Uji Regresi dan Korelasi

Uji regresi yang digunakan adalah uji regresi linear untuk mengetahui pengaruh pemberian paparan terhadap variabel denyut jantung. Selanjutnya, dilakukan uji korelasi pearson untuk mengetahui hubungan penurunan denyut jantung dengan peningkatan konsentrasi ekstrak kulit buah delima. Hasil uji regresi dan korelasi dapat diketahui melalui tabel 10 berikut:

Tabel 5.4 Hasil Uji Regresi dan Korelasi Ekstrak Kulit Delima terhadap Denyut Jantung

	Korelasi		Regresi	
	Nilai Korelasi	Signifikansi	R ²	Signifikansi
Denyut Jantung	-0.500	0.000*	0.250	0.000*

Berdasarkan hasil uji regresi di atas, didapatkan nilai R-square sebesar 0.250 (25%) yang berarti bahwa penurunan denyut jantung pada penelitian ini disebabkan oleh pemaparan ekstrak kulit delima, sedangkan sisanya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diteliti.

Berdasarkan hasil uji korelasi, didapatkan nilai korelasi sebesar -0.500, menunjukkan hubungan negatif yang kuat. Hasil signifikansi korelasi menunjukkan nilai 0.000 ($p < 0.05$), sehingga hal ini menunjukkan bahwa peningkatan pemberian konsentrasi ekstrak buah kulit buah delima secara signifikan diikuti dengan penurunan denyut jantung.

5.2 Edema Perikardium

5.2.1 Hasil Penelitian Edema Perikardium Ikan Zebra

Penelitian ini dilakukan guna mengetahui ada atau tidaknya pengaruh ekstrak kulit buah delima (*Punica granatum L*) terhadap edema pericardium larva ikan zebra berusia 72 hpf yang terpapar kafein secara *in vitro*. Edema pericardium larva ikan zebra diamati dengan mikroskop merk Olympus dengan perbesaran 40x untuk mendapatkan proporsi ukuran dengan kepala dan bagian *yolk sac* ikan zebra. Larva ikan zebra diposisikan semi lateral untuk mengetahui secara jelas besar ukuran pericardium jantung. Penelitian

menggunakan 60 sampel masing-masing kelompok dan diamati 3 kali untuk memastikan ulang ada atau tidaknya edema perikardium.

Rata-rata edema perikardium larva ikan zebra ditunjukkan pada tabel 11 berikut ini:

Tabel 5.5 Rerata Edema Perikardium Larva Ikan Zebra (*Danio rerio*) pada 72 hpf

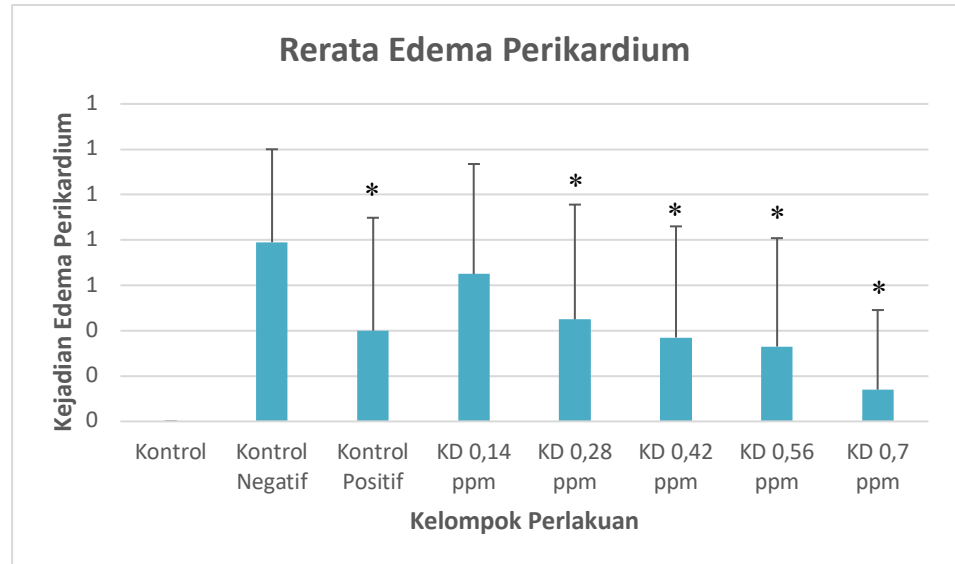
Kelompok Perlakuan	Edema Perikardium \pm SD	
	Mean	SD
Kontrol	0	\pm 0
Kontrol Negatif (Kafein 100 ppm)	0,79	\pm 0,42
Kontrol Positif (Kafein 100 ppm + Vit. C 30 ppm)	0,4	\pm 0,50
P1 (Kafein 100 ppm + KD 0,14 ppm)	0,65	\pm 0,49
P2 (Kafein 100 ppm + KD 0,28 ppm)	0,45	\pm 0,51
P3 (Kafein 100 ppm + KD 0,42 ppm)	0,37	\pm 0,49
P4 (Kafein 100 ppm + KD 0,56 ppm)	0,33	\pm 0,48
P5 (Kafein 100 ppm + KD 0,7 ppm)	0,14	\pm 0,35

Keterangan: SD: Standar Deviasi; KD: Kulit Delima; 0: Tidak ada edema sama sekali; 1: Terdapat edema di seluruh populasi

Berdasarkan Tabel 5.5 di atas, terjadi penurunan rata-rata pada kelompok perlakuan 1, 2, 3, 4, dan 5 terhadap kelompok kontrol negatif. Kejadian edema perikardium pada kelompok kontrol positif lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Kelompok perlakuan 1 (P1) konsentrasi 0,14 ppm memiliki kejadian edema perikardium lebih tinggi dibanding kelompok perlakuan 2,3,4 dan 5. Kejadian edema perikardium terendah dapat ditemukan pada P5 dengan konsentrasi kulit delima 0,7 ppm. Hasil rata-rata 0.00 pada kelompok kontrol menunjukkan tidak adanya satupun embrio ikan zebra yang mengalami edema perikardium pada kelompok tersebut.

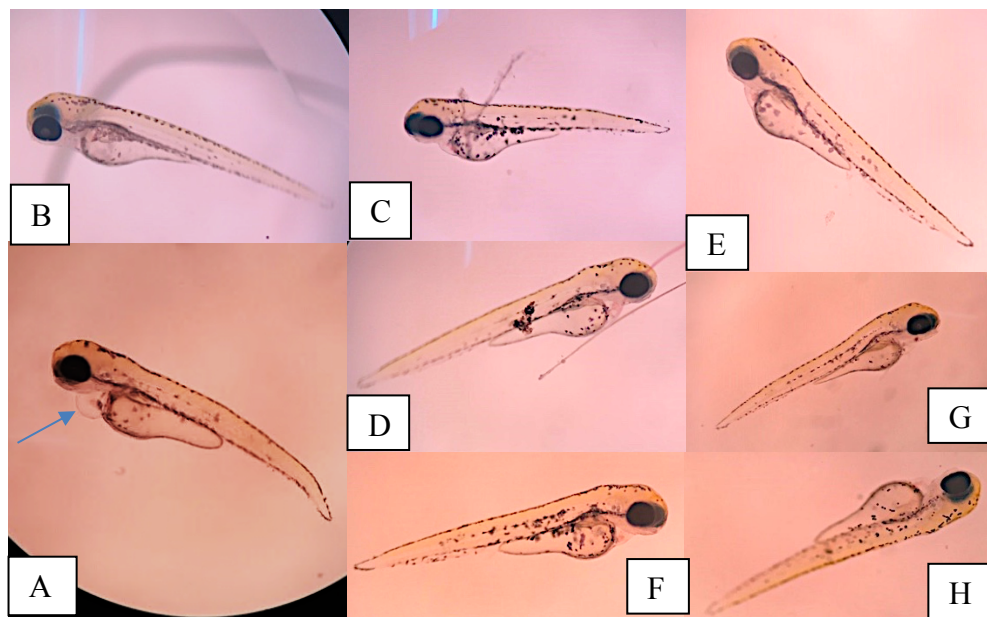
Hasil rerata edema perikardium dapat diketahui melalui Gambar 5.2

berikut:



Gambar 5.2 Grafik Rata-rata Edema Perikardium Larva Ikan Zebra (*Danio rerio*) pada 72 hpf

Keterangan: KD: Kulit Delima; Pemberian ekstrak kulit delima dengan berbagai konsentrasi (0,14; 0,28; 0,42; 0,56; 0,7) menurunkan kejadian edema perikardium pada embrio yang terpapar kafein. Tanda (*) menunjukkan adanya perbedaan signifikan dengan kelompok kontrol negatif (kafein 100 ppm)



Gambar 5.3 Gambaran Morfologi Embrio Ikan Zebra pada 72 hpf

(A) Embrio dengan edema perikardium pada kelompok kontrol negatif (ditunjukkan dengan anak panah), (B) Embrio normal pada kelompok kontrol, (C) P1, (D) P3, (F) P2, (E) P4, (G) P5, (H) Kontrol Positif (Vit. C)

5.2.2 Analisis Data

Data edema perikardium pada penelitian ini dianalisis dengan program analisis SPSS versi 25.0. Uji yang digunakan adalah *One-Way ANOVA* apabila data tersebut parametrik, Jika data tidak memenuhi persyaratan, maka uji statistic yang digunakan dalah Kruskal-Wallis.

5.2.2.1 Uji Normalitas Distribusi Data

Uji normalitas yang digunakan adalah uji Kolmogrof-Smirnov. Didapatkan nilai signifikansi 0,00 ($p < 0,05$), sehingga menunjukkan bahwa data edema perikardium memiliki persebaran yang tidak normal.

5.2.2.2 Uji Homogenitas Ragam Data

Uji *Levene (Levene Test)* digunakan untuk mengetahui homogenitas ragam data. Hasil uji homogenitas menunjukkan nilai signifikansi 0.00 ($p < 0.05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa data edema perikardium tidak homogen.

5.2.2.3 Uji *Kruskal-Wallis*

Data edema perikardium diketahui tidak terdistribusi normal serta tidak homogen, sehingga tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji parametrik. Uji pengganti yang dapat dilakukan adalah uji Kruskal-Wallis. Setelah dilakukan uji Kruskal-Wallis, didapatkan H_0 ditolak dengan nilai signifikansi 0.000 ($p < 0.05$). Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak kulit delima (*Punica granatum L.*) memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kejadian edema perikardium embrio ikan zebra yang terpapar kafein.

Tabel 5.6 Hasil Pengujian Kruskal Wallis Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Delima terhadap Edema Perikardium

Perlakuan	Edema Perikardium	
	Mean \pm SD	p-value
Kontrol	0.00 \pm 0.00 ^a	0.000*
Kontrol Negatif	0.79 \pm 0.41 ^b	
Kontrol Positif	0.40 \pm 0.50 ^{c,d}	
Perlakuan 1	0.65 \pm 0.49 ^{b,c}	
Perlakuan 2	0.45 \pm 0.51 ^{c,d}	
Perlakuan 3	0.37 \pm 0.49 ^{c,d}	
Perlakuan 4	0.33 \pm 0.48 ^{c,d}	
Perlakuan 5	0.14 \pm 0.35 ^{a,d}	

Keterangan: Tanda (*) menunjukkan nilai yang signifikan dengan CI 0.05. Notasi (a, b, c, d, e) yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) setelah uji *Post Hoc*

5.2.2.4 Uji Kolmogorof-Smirnov

Uji *post hoc* perlu dilakukan untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan rata-rata kejadian edema perikardium antar kelompok. Data dianalisis menggunakan uji *Kolmogorof-Smirnov* karena sebaran data yang tidak homogen sehingga tidak memenuhi asumsi pada uji *Mann-Whitney*. Uji ini dilakukan terhadap masing-masing 2 kelompok untuk mengetahui perbedaan yang bermakna yang kemudian dilihat nilai signifikansinya.

- a. Kelompok kontrol negatif (kafein 100 ppm) memiliki perbedaan yang berarti dengan rata-rata edema perikardium semua kelompok perlakuan. Namun tidak memiliki perbedaan bermakna dengan kelompok P1 (0,14 ppm).
- b. Kelompok kontrol positif tidak memiliki perbedaan berarti dengan semua perlakuan kulit delima.
- c. Kelompok perlakuan 1 (0,14 ppm) hanya memiliki perbedaan berarti dengan perlakuan 5 (0,7 ppm).

d. Kelompok perlakuan 2 (0,28 ppm), perlakuan 3 (0,42 ppm), perlakuan 4 (0,56 ppm) dan perlakuan 5 (0,7 ppm) tidak memiliki perbedaan bermakna. Hasil pengujian dapat dilihat pada tabel 5.7 berikut:

Tabel 5.7 Hasil Uji Kolmogrof-Smirnov Edema Perikardium pada berbagai Perlakuan

Perbandingan		Beda	p-value
Kontrol	Kontrol Negatif	0.792	0.000*
	Kontrol Positif	0.400	0.005*
	P1 (0,14 ppm)	0.654	0.000*
	P2 (0,28 ppm)	0.452	0.001*
	P3 (0,42 ppm)	0.375	0.004*
	P4 (0,56 ppm)	0.333	0.018*
Kontrol Negatif	P5 (0,7 ppm)	0.139	0.810
	Kontrol Positif	-0.392	0.007*
	P1 (0,14 ppm)	-0.138	0.906
	P2 (0,28 ppm)	-0.340	0.026*
	P3 (0,42 ppm)	-0.417	0.001*
	P4 (0,56 ppm)	-0.458	0.000*
Kontrol Positif	P5 (0,7 ppm)	-0.653	0.000*
	P1 (0,14 ppm)	0.254	0.331
	P2 (0,28 ppm)	-0.052	1.000
	P3 (0,42 ppm)	0.025	1.000
	P4 (0,56 ppm)	0.067	1.000
P1 (0,14 ppm)	P5 (0,7 ppm)	0.261	0.215
	P2 (0,28 ppm)	0.202	0.610
	P3 (0,42 ppm)	0.279	0.172
	P4 (0,56 ppm)	0.321	0.090
	P5 (0,7 ppm)	0.515	0.001*
P2 (0,28 ppm)	P3 (0,42 ppm)	0.077	1.000
	P4 (0,56 ppm)	0.118	0.974
	P5 (0,7 ppm)	0.313	0.077
P3 (0,42 ppm)	P4 (0,56 ppm)	-0.042	1.000
	P5 (0,7 ppm)	-0.236	0.241
P4 (0,56 ppm)	P5 (0,7 ppm)	-0.194	0.504

Tanda (*) menunjukkan nilai yang signifikan dengan CI 0.05

5.2.2.5 Uji Regresi dan Korelasi

Uji regresi dan korelasi yang digunakan adalah uji regresi logistik dan uji korelasi spearman. Uji regresi digunakan untuk

mengetahui pengaruh paparan terhadap kejadian edema perikardium, sedangkan uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan paparan dengan penurunan kejadian edema perikardium. Hasil uji korelasi dapat diketahui melalui tabel 5.8 berikut:

Tabel 5.8 Hasil Uji Korelasi Ekstrak Kulit Delima terhadap Kejadian Edema Perikardium

	Korelasi		Regresi	
	Nilai Korelasi	Signifikansi	R ²	Signifikansi
Edema Perikardium	-0.032	0.288	0.395	0.000*

Berdasarkan hasil uji regresi menunjukkan R-square sebesar 0,395 (39,5%) yang berarti bahwa penurunan kejadian edema perikardium pada penelitian ini dipengaruhi oleh pemaparan ekstrak kulit delima sebesar 39,5%, sedangkan sisanya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diteliti.

Sedangkan hasil uji korelasi di atas, didapatkan nilai korelasi sebesar -0.032, menunjukkan hubungan negatif antara kejadian edema perikardium dan konsentrasi ekstrak kulit delima. Namun, nilai signifikansinya yaitu 0.288 ($p > 0.05$), sehingga dapat diketahui bahwa peningkatan/penambahan konsentrasi ekstrak kulit buah delima pada penelitian ini tidak diikuti dengan penurunan kejadian edema perikardium secara signifikan.

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan beberapa uji statistik, yaitu uji *One Way ANOVA*, Uji *Kruskal-Wallis*, Uji *Post Hoc*, Uji Regresi dan Korelasi. Hasil uji *One Way ANOVA* untuk denyut jantung menunjukkan signifikansi sebesar 0.000* ($p < 0.05$) dan nilai signifikansi Uji *Kruskal-Wallis* untuk edema perikardium adalah sebesar 0.000* ($p < 0.05$). Hal ini menunjukkan konsentrasi kafein dan konsentrasi ekstrak kulit buah delima mempunyai pengaruh yang cukup besar terhadap denyut jantung dan edema perikardium embrio ikan zebra.

Berdasarkan uji *Post Hoc* pada variabel denyut jantung, didapatkan perbedaan signifikan antara kelompok negatif dengan kelompok kontrol positif (vitamin C 30 ppm) serta kelompok kontrol negatif dengan berbagai kelompok perlakuan ekstrak kulit buah delima konsentrasi 0,14 ppm; 0,28 ppm; 0,42 ppm; 0,56 ppm; dan 0,7 ppm. Variabel edema perikardium juga menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan kulit delima dengan $p = 0.000$ ($p < 0.05$).

Hasil uji regresi menunjukkan nilai R-square 0,250 pada variabel denyut jantung dan 0,395 pada variabel edema perikardium. Hal ini dapat diartikan bahwa pengaruh paparan terhadap denyut jantung dan kejadian edema perikardium yaitu sebesar 25% dan 39,5% secara berurutan, sedangkan sisanya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diteliti. Uji Korelasi pada kedua variabel menunjukkan koefisien korelasi negatif yaitu -0,500 dan -0,032 secara berurutan, sehingga pemberian konsentrasi ekstrak kulit delima berhubungan negatif atau dapat menurunkan denyut jantung dan kejadian edema perikardium.

6.1 Pengaruh Perlakuan terhadap Denyut Jantung

Hasil uji *One Way ANOVA* untuk denyut jantung menunjukkan signifikansi sebesar 0.000 ($p < 0.05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit delima dapat menurunkan denyut jantung embrio ikan zebra yang dipapar kafein dengan signifikan (Tabel 5.2). Hasil penghitungan rata-rata denyut jantung kelompok kontrol negatif adalah $214,56 \pm 15,06$ bpm, sedangkan rata-rata jumlah denyut jantung pada kelompok kontrol adalah $207,47 \pm 10,49$. Hal ini menunjukkan adanya peningkatan denyut jantung pada kelompok kontrol negatif dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Denyut jantung pada kelompok kontrol dalam penelitian ini senilai dengan penelitian oleh Lin *et al* (2014) yang menyatakan bahwa denyut jantung bervariasi dengan rentang nilai yang luas, kurang lebih mulai dari 50 bpm sampai 200 bpm, serta sejalan dengan penelitian oleh Jati (2017) yang menunjukkan rata-rata denyut jantung kurang lebih 205 sampai 231 bpm. Namun, denyut jantung kelompok kontrol dalam penelitian ini sedikit melebihi rentang denyut jantung normal oleh Sarmah & Marrs (2016) yang menyatakan bahwa denyut jantung ikan zebra normal adalah 140-180 bpm (Sarmah & Marrs, 2016), sedangkan De Luca (2014) menjelaskan bahwa denyut jantung normal yaitu 120-180 bpm pada 72 hpf.

Variasi rentang normal denyut jantung ini diduga akibat pengaruh perbedaan jenis dan strain ikan zebra yang digunakan. Selain itu, denyut jantung juga dipengaruhi oleh kondisi genetik, kadar oksigen, ketebalan miokardium, penyimpanan kalsium dan pelepasan kalsium (Warren *et al.*, 2011), serta suhu (Genge *et al.*, 2016). Suhu yang lebih tinggi memungkinkan penelitian ini sejalan dengan banyak studi eksperimental sejenis, yaitu

mayoritas paparan kafein memberikan efek pada peningkatan denyut jantung (Bunsawat *et al.*, 2015; Turnbull *et al.*, 2017).

Peningkatan denyut jantung pada kelompok kontrol negatif akibat paparan kafein diduga terjadi karena kafein menginduksi stres oksidatif sehingga menyebabkan kerusakan pada jantung ikan zebra. Kafein merupakan senyawa bioaktif yang dapat bersifat sitotoksik dan menginduksi stress oksidatif (Abdelkader *et al.*, 2013).

Peningkatan denyut jantung pada penelitian ini diduga akibat terjadinya stress oksidatif. Stress oksidatif merupakan hasil dari ketidakseimbangan antara pro-oksidan dan antioksidan, yang menghasilkan dominasi pada oksidan. Kafein merupakan derivat xanthine yaitu sumber penting dari terjadinya pembentukan radikal bebas (pro-oksidan) yang dapat meningkatkan keadaan stres oksidatif (Echeverri *et al.*, 2010). Xanthin merupakan salah satu senyawa yang reaktif apabila terjadi reaksi oksidasi (Feoli, 2014). Induksi oksidasi xanthine akan meningkatkan produksi radikal bebas yaitu *Reactive-Oxygen Species* (ROS) (Rashidi *et al.*, 2012).

Kafein (methylxanthine) dimetabolisme oleh hati yang membentuk beberapa derivat metabolit utama, salah satunya adalah teofilin. Teofilin dapat menginduksi pembentukan radikal bebas (ROS) dalam sistem biologis melalui jaras/sistem xanthine-xanthine oksidase (Shamsuzzaman *et al.*, 2016). Xanthine dimetabolisme (>90%) oleh beberapa enzim oksidase dan xanthine oksidase (Brown *et al.*, 2018). Peningkatan aktivitas enzim xanthin oksidase maupun substratnya (hypoxanthine), dalam plasma disebabkan karena hipoksia (terjadi peningkatan hypoxanthine plasma yang merupakan penanda penting kejadian asfiksia). Peningkatan aktivitas xanthine oksidase akan

meningkatkan pembentukan radikal superoksida ($-O_2$) dan hidrogen peroksida (H_2O_2) sehingga berpotensi muncul kerusakan sel dan jaringan (Setiawan dkk, 2005). Oleh karena itu, kemungkinan bahwa peningkatan produksi ROS selama metabolisme kafein dosis tinggi menghasilkan ketidakseimbangan oksidan-antioksidan dan menyebabkan kardiotoxicitas (Shamsuzzaman *et al.*, 2016). Adanya zat yang mempengaruhi denyut jantung dapat mengindikasikan gangguan fungsi jantung, pertumbuhan dan perkembangan embrio ikan zebra.

Stress oksidatif dalam penelitian ini juga diduga akibat aktivitas kafein dalam peningkatan sekresi katekolamin (hormone seperti norepinefrin, dopamine, dan serotonin) melalui inhibisi reseptor adenosine (*adenosine receptor blocker*/bertindak sebagai antagonis reseptor adenosine). Reseptor adenosine diklasifikasikan berdasarkan kemampuannya dalam menurunkan atau meningkatkan konsentrasi cAMP intraseluler. Semua subtype reseptor adenosine (A1, A2A, A2B, dan A3) terhambat (Monteiro *et al.*, 2016; Borea *et al.*, 2018).

Selain itu, peningkatan katekolamin juga dapat menginduksi agonis beta 2-adrenergik dan beta 1-adrenergik. Katekolamin menghasilkan peningkatan kadar siklik adenosin monofosfat (cAMP) melalui aktivasi adenilat siklase dan meningkat akibat penghambatan enzim fosfodiesterase yang bertanggung jawab untuk degradasi cAMP (Hoffman *et al.*, 2014; Richards *et al.*, 2016; Willson, 2018). Peningkatan sekresi katekolamin tersebut memiliki dampak stress oksidatif pada sistem kardiovaskuler yaitu stimulasi miokardium yang menyebabkan peningkatan *cardiac output*, takikardia, peningkatan tekanan sistol diastol pada arteri brakialis, dan vasokonstriksi

(Puteri, 2010; Brown *et al.*, 2018). Katekolamin memicu senyawa ROS pada miosit jantung dengan mengaktivasi kanal kalsium tipe L dan menyebabkan influks ion kalsium (Johnstone *et al.*, 2014).

Salah satu target dari stress oksidatif yang lainnya adalah reseptor ryanodine yang berada di miosit jantung. Aktivitas agonis pada reseptor ryanodine memaksa Ca^{2+} *transient fluxes* dan menginduksi kelebihan Ca^{2+} intraseluler (Monteiro *et al.*, 2016). Aktivasi reseptor ryanodine untuk melepaskan Ca^{2+} dapat menyebabkan perubahan denyut jantung (Chen *et al.*, 2008; Porta *et al.*, 2011). Mutasi yang terjadi pada reseptor ryanodine akan menyebabkan kebocoran ion kalsium di intraseluler (Xie *et al.*, 2015).

Peningkatan denyut jantung juga dikaitkan dengan pelepasan kalsium intraseluler dari otot skeletal, otot jantung dan jaringan saraf dikarenakan adanya pengikatan dan pengaktifan saluran pelepasan kalsium (reseptor ryanodine atau RyRs) (Zulli *et al.*, 2016; Santulli *et al.*, 2018). Kemudian, Tappia *et al* (2001) juga menjelaskan bahwa stress oksidatif juga dapat menekan pompa kalsium dan aktivitas dari natrium-kalsium *exchanger*, sehingga menyebabkan penurunan proses pengeluaran ion kalsium dari sel jantung yang mengarah pada peningkatan ion kalsium pada intraseluler. Ion kalsium didalam sitosol tersebut akan berikatan dengan troponin-tropomiosin dan menginisiasi *cross-bridge formation* dan kontraksi (Sherwood, 2015; Hall, 2015). Kontraksi otot jantung akan meningkatkan frekuensi denyut jantung.

Keadaan stress oksidatif ini akan berperan dalam penurunan inhibisi NOS (*Nitric Oxide Synthase*) yang akan memberikan dampak peningkatan denyut jantung (Zhao *et al.*, 2015). Nitrat oksida merupakan mediator yang paling penting disintesis oleh sel endotel, yang merupakan anti-platelet, anti-

proliferatif, penurun permeabilitas, dan anti-inflamatori (Akomolafe *et al.*, 2018). Senyawa nitrit oksida (NO) memiliki peran dalam pengaturan denyut jantung di masa embrionik. NO diketahui memiliki efek kronotropik positif sehingga dapat meningkatkan denyut jantung (Rastaldo *et al.*, 2007). Pemberian kafein dosis tinggi pada penelitian ini diduga menurunkan efek inhibisi NO dan menyebabkan stress oksidatif.

Selain itu, peningkatan denyut jantung akibat stress oksidatif juga berhubungan dengan penekanan kadar glutathione (GSH) pada jaringan jantung. GSH adalah marker efektif untuk mengetahui status anti-oksidan dari organisme dan berfungsi mencegah kerusakan tubuh akibat radikal bebas. Selain itu, GSH juga merupakan substrat untuk Glutathione Peroxidase (GSH-Px) yang dapat mengubah H_2O_2 menjadi air dan organic peroxide dan menjadi alkohol stabil. Glutathione berperan penting dalam mengubah radikal superoksida menjadi produk yang lebih tidak berbahaya (Boadi *et al.*, 2015; Shamsuzzaman *et al.*, 2016). Sehingga, penurunan level status GSH (antioksidan) ini pada akhirnya menginduksi kardiotoxicitas.

Berdasarkan uji *Post Hoc* LSD (*Least Significance Different*), pada variabel denyut jantung didapatkan perbedaan signifikan antara kelompok kontrol positif (vitamin C 30 ppm) dengan kelompok kontrol negatif. Kelompok kontrol positif menunjukkan adanya penurunan denyut jantung dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa vitamin C dengan konsentrasi tersebut bekerja sebagai antioksidan secara optimal. Vitamin C dapat bertindak sebagai antioksidan dengan kontribusinya dalam menangkal ROS. Vitamin C adalah antioksidan non enzimatis yang berperan penting menjaga fungsi seluler yang optimal dan

kesehatan sistemik secara umum. Vitamin C (asam askorbat) adalah antioksidan hidrofilik utama dan inhibitor peroksidasi lemak. Molekul ini secara cepat menurunkan radikal α -tocopheroxyl dan LDL untuk regenerasi α -tocopherol dan menghambat propagasi radikal bebas pada membran (Zalukhu *et al.*, 2016). Penggunaan vitamin C pada penelitian ini juga mempertimbangkan sifatnya yang larut dalam air.

Rata-rata semua kelompok perlakuan kulit delima memiliki denyut jantung yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol positif (vitamin C 30 ppm). Hal ini diduga karena kulit delima memiliki kandungan lain selain vitamin C yang berperan sebagai antioksidan, sehingga memperbesar efek terhadap penurunan denyut jantung. Denyut jantung pada kelompok perlakuan menurun seiring dengan bertambahnya konsentrasi kulit delima, meskipun tidak memiliki perbedaan yang signifikan antar kelompok. Denyut jantung terendah terdapat pada kelompok perlakuan 5 dengan konsentrasi ekstrak kulit delima 0,7 ppm. Ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka akan menurunkan denyut jantung ikan zebra pada 72 hpf.

Semua kelompok perlakuan kulit delima yaitu kelompok perlakuan 1 (0,14 ppm), perlakuan 2 (0,28 ppm), perlakuan 3 (0,42 ppm), perlakuan 4 (0,56 ppm) dan perlakuan 5 (0,7 ppm) menunjukkan penurunan denyut jantung terhadap kelompok paparan kafein 100 ppm (kontrol negatif) secara signifikan. Pemberian konsentrasi ekstrak secara bersamaan dengan kafein 100 ppm diasumsikan menyebabkan adanya interaksi antara kafein dan senyawa di dalam kulit delima sehingga memicu penurunan denyut jantung. Konsentrasi ekstrak kulit delima dengan berbagai konsentrasi yang

pemberiannya bersamaan dengan kafein diduga bekerja sebagai antioksidan yang menangkal stress oksidatif yang disebabkan oleh kafein.

Uji regresi menunjukkan bahwa pemaparan ekstrak kulit delima memiliki pengaruh terhadap penurunan denyut jantung. Uji korelasi antar kelompok perlakuan menunjukkan nilai koefisien korelasi sebesar -0.500. Hal ini menunjukkan hubungan negatif yaitu peningkatan konsentrasi kulit delima terbukti diikuti dengan penurunan denyut jantung.

Fakta yang diperoleh pada penelitian ini disertai dengan kajian teori menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit delima dapat menurunkan denyut jantung. Semua kelompok perlakuan dengan konsentrasi ekstrak kulit delima menunjukkan pengaruh penurunan denyut jantung. Hal ini diduga merupakan akibat dari aktivitas antioksidan kuat dalam kulit delima. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian oleh Sun *et al* (2016) yang menunjukkan bahwa delima dapat menurunkan denyut jantung secara signifikan setelah mengalami stress oksidatif.

Berbagai kandungan antioksidan dalam kulit delima tersebut memiliki potensi sebagai antioksidan sehingga mampu mengurangi kerusakan sel tubuh akibat stres oksidatif (Shaygannia *et al.*, 2016; Duke, 2017). Antioksidan kulit delima dapat mencegah stress oksidatif dengan mencegah formasi ROS atau menghilangkan efek ROS (Zalukhu *et al.*, 2016). Kulit delima mengandung senyawa flavonoid, asam fenolat, dan tannin diantaranya gallotannin, ellagitannin, anthocianin, asam ellagic, kuersetin, asam galat, katekin yang mempunyai khasiat sebagai antioksidan (Madrigal-Carballo *et al.*, 2009).

Kandungan antioksidan kulit buah delima berpotensi menjadi agen kardioprotektif (Hassanpour Fard *et al.*, 2011; El-Wakf *et al.*, 2018). Semua kandungan antioksidan dalam kulit buah delima telah terbukti secara *in vivo* menangkal radikal bebas dan memberi manfaat untuk kesehatan jantung (Aviram & Rosenblat, 2013). Penelitian oleh Doostan *et al* (2017) menunjukkan bahwa kulit delima memiliki aktivitas antioksidan dari total fenol dan flavonoid dalam melawan stress oksidatif (SOD and GPx) dan merubah profil lipid (TC, HDL, and LDL) pada tikus yang diinduksi methotrexate (Doostan *et al.*, 2017). Kulit buah delima kaya akan tannin yang disebutkan dalam penelitian oleh Zagloul *et al* (2017) yaitu tannin pada kulit delima akan menurunkan absorpsi Ca pada tikus. Tannin merupakan salah satu golongan polifenol.

Kandungan polifenol dan flavonoid pada kulit delima menunjukkan aktivitas biologik yang penting antara lain mengeliminasi dan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan memutus reaksi oksidasi berantai pembentukan radikal bebas, sehingga reaktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat, sehingga penurunan risiko penyakit kardiovaskuler.

Selain itu, kulit delima juga diketahui dapat meningkatkan efek inhibisi NO (Wang *et al.*, 2018) dan berdampak pada penurunan denyut jantung. Potensi kulit delima yang lain yaitu dapat memperbaiki level SOD dan GSH yang menunjukkan kemampuan menangkal stress oksidatif (Hassanpour Fard *et al.*, 2011). Peningkatan GSH atau aktivitas SOD pada organ memberikan manfaat pada saat radikal bebas meningkat.

Salah satu kandungan kulit delima yang memberikan efek positif pada denyut jantung adalah *ellagic acid*. Kandungan asam ellagic menstimulasi vasorelaksasi pada aorta tikus melalui mekanisme endothelial dan inhibisi influks kalsium (Yilmaz & Usta, 2013).

6.2 Pengaruh Perlakuan terhadap Edema Perikardium

Adanya edema perikardium diketahui melalui pengamatan dengan membandingkan ukuran perikardium kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Edema perikardium dikatakan positif apabila ukuran perikardium melebihi ukuran kelompok kontrol. Kelainan edema perikardium ditandai dengan adanya penambahan ketebalan pada perikardium dan dihitung jumlah ikan zebra yang memiliki perbedaan besar dengan kelompok kontrol. Edema perikardium mengacu pada abnormalitas volume cairan di ruang yang mengelilingi jantung (McGrath, 2012) yang dapat dengan mudah divisualisasikan pada embrio ikan zebra yang transparan.

Edema perikardium merupakan salah satu kelainan morfologi pada larva ikan zebra. Ketebalan perikardium diamati pada embrio usia 72 hpf. Hasil analisis edema perikardium menunjukkan signifikansi sebesar 0.000 ($p < 0.05$) yang berarti bahwa perlakuan kulit buah delima memberikan pengaruh signifikan terhadap kejadian edema perikardium. Sedangkan uji korelasi antar kelompok perlakuan menunjukkan nilai koefisien korelasi negatif. Hal ini menunjukkan hubungan negatif yaitu peningkatan konsentrasi kulit delima terbukti diikuti dengan penurunan kejadian edema perikardium.

Perlakuan pada kelompok kontrol positif (vitamin C 30 ppm) menunjukkan adanya penurunan edema perikardium dibandingkan dengan

kelompok kontrol negatif (kafein) secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa vitamin C dengan konsentrasi tersebut telah menunjukkan efeknya sebagai antioksidan dalam menangkal stress oksidatif yang ditimbulkan oleh paparan kafein konsentrasi tinggi.

Rata-rata kejadian edema perikardium pada kelompok kontrol positif (vitamin C) lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 (0,14 ppm) dan 2 (0,28 ppm), namun lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan 3 (0,42 ppm), 4 (0,56 ppm) dan 5 (0,7 ppm). Hal ini dapat menunjukkan efek kulit delima lebih kuat dalam menurunkan kejadian edema perikardium jika dibandingkan dengan vitamin C pada konsentrasi ekstrak kulit delima 0,42 ppm, 0,56 ppm dan 0,7 ppm.

Namun, tidak ada perbedaan signifikan antara kejadian edema perikardium pada kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan yang berarti bahwa kulit delima telah memberikan efek yang setara dengan antioksidan vitamin C. Penurunan rata-rata pada kelompok perlakuan 3 (0,42 ppm), 4 (0,56 ppm), dan 5 (0,7 ppm) yang lebih rendah dibandingkan kontrol positif tersebut diduga akibat kandungan-kandungan lain dalam kulit delima selain vitamin C yang turut berperan sebagai antioksidan sehingga memperkuat kemampuan kulit delima dalam menangkal radikal bebas.

Penelitian ini menunjukkan hasil yang signifikan pada semua kelompok perlakuan 2 (0,28 ppm), kelompok perlakuan 3 (0,42 ppm), kelompok perlakuan 4 (0,56 ppm), serta kelompok perlakuan 5 (0,7 ppm) terhadap kelompok kontrol negatif (kafein 100 ppm). Namun kelompok perlakuan 1 (kafein 100 ppm + konsentrasi 0,14 ppm) tidak memiliki perbedaan signifikan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi kulit

delima 0,14 ppm belum dapat bekerja secara optimal dalam menurunkan kejadian edema perikardium akibat paparan kafein, sedangkan konsentrasi 0,28 ppm, 0,42 ppm, 0,56 ppm dan 0,7 ppm telah optimal dalam memberikan efek penurunan edema perikardium. Diduga konsentrasi ekstrak kulit buah delima mampu bekerja sebagai antioksidan dalam konsentrasi 0,28, 0,42 ppm, 0,56 ppm dan 0,7 ppm.

Hal ini menunjukkan adanya potensi kulit delima dalam menormalkan kondisi kelainan jantung yang dialami akibat stress oksidatif dengan peningkatan konsentrasi. Tingkat penurunan edema perikardium sejalan dengan peningkatan konsentrasi. Konsentrasi yang paling signifikan dalam menurunkan kejadian edema perikardium adalah 0,7 ppm ($p= 0.000$) dengan rata-rata kejadian edema perikardium terendah dibandingkan kelompok perlakuan lainnya.

Edema perikardium yang terjadi pada kelompok kontrol negatif dalam penelitian ini disebabkan akibat adanya paparan kafein sejumlah 100 ppm yang diduga menimbulkan stress oksidatif. Stress oksidatif berhubungan dengan spesies oksigen reaktif yang tidak stabil (ROS) yang bereaksi cepat dan destruktif dengan biomolekul seperti protein, lipid, DNA dan RNA dalam tubuh. Edema perikardium yang diinduksi kafein juga salah satunya diasumsikan terjadi akibat dari kerusakan DNA. Kafein dapat menginduksi stress oksidatif di tingkat sel dan menyebabkan kerusakan DNA. Toksisitas pada penelitian ini kemungkinan disebabkan oleh adanya paparan kafein dalam dosis tinggi yang menyebabkan hambatan atau perubahan pada metabolisme CYP1A (Brown *et al.*, 2015).

Stress oksidatif akibat paparan kafein 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; modifikasi protein teroksidasi karena terbentuknya *cross linking* protein melalui mediator sulfidril atas beberapa asam amino labil seperti sistein, metionin, lisin, dan histidine (Winarsi, 2011). Stres oksidatif dapat menginduksi disfungsi mitokondria, mutasi genetik, serta menyebabkan kematian sel. Terganggunya fungsi mitokondria meningkatkan stress oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan organ (Sun *et al.*, 2016).

Pemberian kafein pada masa perkembangan ikan zebra menyebabkan peningkatan kadar *acetaldehyde* dan radikal bebas lain yaitu hidrogen peroksida dan superoksida. Senyawa-senyawa tersebut dapat menimbulkan efek teratogenik dan mutasi pada ikan zebra. Adanya radikal bebas aktif yang melebihi kapasitas buffering antioksidan yang tersedia pada jaringan akan menghasilkan stres oksidatif.

Spesies oksigen reaktif (ROS) dapat merusak DNA, protein, lipid, dan karbohidrat yang mengganggu struktur atau fungsi sel dan jaringan. Kerusakan jaringan dan penyakit kronis dapat terjadi setelah reaksi biokimia enzim dan non-enzim yang termediasi yang kemudian menghasilkan radikal bebas. Radikal bebas merupakan senyawa antara yang sangat reaktif yang dikaitkan dengan lipid dan peroksidasi protein, sehingga dapat mengakibatkan kerusakan struktural sel, cedera jaringan atau mutasi gen.

ROS yang berikatan dengan lipid pada membran sel (peroksidasi lipid) akan menyebabkan terbentuknya Malondialdehid (MDA). MDA tersebut akan menghasilkan aldehid dan keton yang bersifat toksik terhadap sel. Aldehid dan keton akan merusak sel serta struktur DNA. MDA bersifat merugikan yang disebut sebagai sel mutagen pada sel mamalia dan bersifat karsinogenik. Peningkatan MDA menginduksi stress oksidatif (Shamsuzzaman *et al.*, 2016). Selain itu, diduga terdapat penurunan aktivitas DNA polimerase dan hambatan aktivitas fosfodiesterase, sehingga menyebabkan malformasi berupa edema perikardium (Geethavani *et al.*, 2014).

Stress oksidatif yang diinduksi oleh kafein dapat mengganggu beberapa gen yang dibutuhkan dalam perkembangan jantung selama embryogenesis ikan zebra diantaranya faktor transkripsi seperti *gata* dan *hand 2* yang berperan penting dalam diferensiasi myocardium awal dan morfogenesis. Faktor transkripsi *gata* merupakan determinan penting pada siklus hidup sel selama hematopoiesis. *Vegf* (*Vascular Endothelial Growth Factor*) adalah faktor utama yang mengontrol onset dan pemeliharaan kontraktilitas ventrikuler (Chen *et al.*; 2015; Li *et al.*, 2017). Edema perikardium dapat disebabkan oleh peningkatan regulasi (*up regulation*) *Vegf* dan *gata1* (Chen *et al.*, 2015). Ekspresi gen berlebih pada *hand2* dapat mengaugmentasi proliferasi regeneratif pada *cardiomyocytes* yang menyebabkan pembesaran jantung (Schindler *et al.*, 2014).

Pemberian kafein pada penelitian sebelumnya telah terbukti meningkatkan kerusakan sel melalui mekanisme stress oksidatif yang ditandai dengan *up regulating* HSP70 sebagai biomarker molekuler terhadap stress tingkat seluler serta adanya peningkatan rasio dan regulasi Bax dan Bcl2

yang mengindikasikan terjadinya apoptosis dan kerusakan DNA (Abdelkader *et al.*, 2013).

JNK merupakan salah satu jalur kaskade MAPK yang berperan dalam berbagai peristiwa dan berbagai respon patologis pada manusia (Xiao *et al.*, 2013). Selain itu, JNK menjadi aktif ketika sel terpapar stress, sinyal pertumbuhan, atau berdiferensiasi. JNK ini sangat berperan dalam proses organogenesis (Valesio *et al.*, 2013). JNK terdiri dari 3 subtipe, yaitu JNK1, JNK2 dan JNK3. Gen JNK1 pada manusia memiliki konsistensi yang sama dengan gen JNK1 ikan zebra. JNK1 pada ikan zebra banyak diekspresikan pada organ jantung, otot, dan organ-organ lain (Xiao *et al.*, 2013). Sehingga ikan zebra cocok untuk digunakan dalam mengamati JNK1 (Chyrstal, 2015). Namun, dalam penelitian ini, tidak dapat diketahui mekanisme pasti regulasi jalur kaskade tersebut. JNK1-3 terlibat dalam kejadian malformasi jantung kongenital.

Edema perikardium yang terjadi pada penelitian ini juga dapat dikaitkan dengan peningkatan tekanan hidrostatis yang salah satunya yaitu disebabkan oleh kegagalan jantung (McGrath, 2012; Hanke *et al.*, 2013). Penumpukan cairan dalam perikardium dapat menyebabkan tekanan yang begitu tinggi pada jantung, sehingga membuat fungsi jantung menurun dan membahayakan nyawa.

Paparan yang diharapkan dapat memberikan efek antioksidan dalam penelitian ini adalah kulit buah delima. Penelitian ini lebih lanjut menguji kulit delima yang kaya akan sumber antioksidan dan pengaruhnya dalam mengurangi masalah yang berhubungan dengan jantung. Aktivitas antioksidan pada kulit delima dapat menanggulangi spesies reaktif,

memodulasi enzim dengan mengubah *cell-signaling*, dan berfungsi sebagai penstabil oksidatif (Gouda *et al.*, 2016). Penelitian ini menunjukkan bahwa ada potensi yang besar pada kulit delima yang saat ini hanya menjadi produk sampingan dari pengolahan jus buah delima dan pengolahan makanan fungsional dengan bahan delima.

Banyak penelitian yang telah mendukung adanya antioksidan yang tinggi pada kulit buah delima (Akhtar *et al.*, 2015; Arun *et al.*, 2017) dan telah terbukti melindungi dari radikal bebas akibat peroksidasi lipid dan kerusakan DNA (El-Wakf *et al.*, 2018). Penelitian terbaru menunjukkan pemberian ekstrak kulit delima secara signifikan mengurangi produksi anion superoksida pada mitokondria (Sun *et al.*, 2016), berperan dalam mengatur gen yang terkait dengan mitosis, replikasi DNA, perbaikan DNA, organisasi kromosom, pengolahan RNA dan berkaitan dengan gen yang terlibat dalam apoptosis dan proliferasi sel (Shirode *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2018).

Kandungan antioksidan kulit delima yang diduga berhubungan dengan penurunan kejadian edema perikardium adalah seperti vitamin (A, B6, C, E, folat), kalium, asam oxalic, asam hidroksil cinnamic, polifenol (tannin, asam galat, kaempferol, catechin, galocatechol, *ellagic acid*, punicalagin, quercetin, antosianin dan lain-lain (Al-Rawahi *et al.*, 2014; Rom O *et al.*, 2016; Arun *et al.*, 2017). Polifenol dalam kulit buah delima melindungi tubuh melawan peroksidasi lipid dalam serum (Aviram & Rosenblat, 2013). Salah satu kandungan kulit delima yang bertanggung jawab terhadap anti-mutagenik dan kandidat antioksidan kuat adalah ellagitannin (Wang *et al.*, 2015; Doostan *et al.*, 2017). Penelitian lain menyatakan bahwa asam galat (*gallic acid*) merupakan kandungan fenolik yang utama, sementara kaempferol-3-O-

glucoside adalah yang paling mewakili kandungan flavonoid pada kulit delima (Ambigaipalan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018).

Kandungan *Ellagic Acid* yang merupakan salah satu jenis polifenol pada kulit delima dapat membentuk antioksidan primer yang menghambat produk oksidatif memasuki sistem sirkulasi darah dan jaringan lain (SUN, 2017). *Ellagic acid* mengaktifasi respon antioksidan melalui Nrf2 (Nuclear erythroid 2-related factor 2). EA telah terbukti memiliki aktivitas yang menangkal berbagai ROS. Empat gugus fungsi hidroksil dan dua lakton bertindak sebagai akseptor ikatan hydrogen dan donor, memungkinkan EA untuk menangkal $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , H_2O_2 dan $ONOO^{\bullet}$. Di sisi lain, EA secara tidak langsung melakukan fungsi protektif melawan stress oksidatif dengan meningkatkan regulasi (*upregulation*) Nrf2. Nrf2 adalah factor transkripsi yang sensitive terhadap redox dan merupakan regulator respon antioksidan dalam sel. EA menginduksi fosforilasi Nrf2 melalui peningkatan P13k/Akt dan MAPK (García-Niño dan Zazueta, 2015).

Kandungan lain pada kulit delima yang memberikan efek antioksidan yaitu punicalagin. Punicalagin dapat menghalangi kerusakan DNA melalui penekanan caspases dan sitokin proinflamasi. Punicalagin secara signifikan dapat menormalkan fungsi Bcl-2 dan Bax (El-Missiry *et al.*, 2015) sehingga melindungi embrio ikan zebra dari kematian sel jantung. Punicalagin telah dibuktikan dapat menurunkan MDA (malondiadehyde) dan ROS pada mitokondria, serta meningkatkan enzim yang melindungi dari stress oksidatif (Aqil *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2016). Punicalagin mempromosikan ekspresi protein Nrf2 dan translokasi nuclear yang diikuti oleh induksi enzim antioksidatif termasuk hemeoxygenas (Sun *et al.*, 2016).

Punicalagin menunjukkan efek anti-apoptosis dan melindungi DNA dengan sifat antioksidannya. Punicalagin secara efektif menurunkan dan mengatur P53 serta menaikkan kadar Bcl-2 dan intraseluler GSH pada tikus. Bcl-2 menunjukkan pengaruh anti-apoptosis dan anti-nekrotik melalui efek antioksidan pada ROS intraseluler (Amin *et al.*, 2015). Bcl-2 dapat menurunkan peroksidasi lipid dengan meningkatkan resistensi sel terhadap ROS dan menghambat produksi ROS. Punicalagin yang terkandung dalam kulit delima memegang peranan penting dalam perlindungan melawan stress oksidatif dengan IC50 yang rendah (Giamogante *et al.*, 2018).

Kulit delima (*Punica granatum L. Punicaceae*) diketahui memiliki potensi melawan penyakit kardiovaskuler (Orgil *et al.*, 2014; Sreeja *et al.*, 2014; Arun *et al.*, 2017). Konsentrasi ekstrak kulit delima pada penelitian ini yang pemberiannya bersamaan dengan kafein diduga bekerja sebagai antioksidan yang menangkal terjadinya stress oksidatif yang disebabkan oleh kafein. Pemberian ekstrak kulit delima dengan konsentrasi 0,7 ppm dapat bertindak sebagai antioksidan dengan baik saat diberikan pada awal perkembangan karena terbukti dapat mengembalikan fungsi jantung embrio ikan zebra pada 72 hpf.

Berdasarkan klasifikasi toksisitas akuatik oleh *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), ekstrak etanol kulit buah delima tergolong aman serta tidak ada senyawa yang berpotensi menyebabkan masalah pada organ reproduksi, jantung, dan hormon androgen (Wibowo *et al.*, 2018).

6.3 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan diantaranya yaitu tidak dilakukannya dekontaminasi, ekstrak belum diisolasi, edema perikardium yang belum diukur menggunakan suatu alat ukur otomatis dan terstandarisasi. Namun, hingga saat ini pun belum ada alat ukur yang dapat mengukur ketebalan edema perikardium dengan tepat karena gambaran objek sangat kecil yang membutuhkan tingkat ketelitian hingga 0,01 mm. Pengukuran edema perikardium yang tepat adalah menggunakan metode alat ukur yang *reliable* karena dapat menunjukkan ketebalan edema yang sesungguhnya. Selain itu, penelitian ini belum dapat menjelaskan mengenai mekanisme ekstrak kulit delima dalam menurunkan denyut jantung dan edema perikardium.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Pemberian ekstrak kulit delima sebagai antioksidan dapat memberikan pengaruh pada penurunan denyut jantung dan kejadian edema perikardium embrio ikan zebra yang terpapar kafein. Kafein dapat meningkatkan denyut jantung dengan konsentrasi 100 ppm melalui aktivitasnya sebagai pro-oksidan yang diduga menyebabkan stress oksidatif dan merusak DNA. Pemaparan ekstrak kulit delima (*Punica granatum L.*) dengan konsentrasi 0,14 ppm, 0,28 ppm, 0,42 ppm, 0,56 ppm, dan 0,7 ppm bertindak sebagai antioksidan terhadap embrio ikan zebra yang terpapar kafein. Hal ini dibuktikan dengan adanya penurunan denyut jantung dan kejadian edema perikardium secara signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan.

7.2 Saran

Setelah penelitian ini dilakukan dengan segala keterbatasan yang ada, maka perlu diperhatikan beberapa hal yang diuraikan sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan mengeksplorasi konsentrasi kulit delima yang lebih tinggi karena konsentrasi kecil kulit delima dalam penelitian ini telah membuktikan pengaruhnya terhadap penurunan denyut jantung dan kejadian edema perikardium.

2. Uji klinik dan penelitian pada hewan lain (seperti tikus, mencit, dan lain-lain) diperlukan untuk menilai efektivitas dan keamanan kulit delima selama kehamilan sebelum rekomendasi dibuat.
3. Perlu dilakukan dekontaminasi pada embrio ikan zebra dengan kemampuan dan alat yang memadai untuk mengoptimalkan pemaparan. Namun diharapkan tidak mengurangi *survival rate* pada embrio akibat dekontaminasi.
4. Penggunaan alat yang otomatis dan terstandarisasi sangat disarankan dalam mengukur edema perikardium, sehingga akan memudahkan pengamat dalam memberikan hasil yang lebih objektif.
5. Tahap perkembangan ikan zebra perlu diamati hingga dewasa untuk mengetahui apakah pengaruh tersebut memberikan gangguan kecacatan/perubahan morfologis yang permanen pada ikan dewasa.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelkader, T. S., Chang, S. N., Kim, T. H., Song, J., Kim, D. S., & Park, J. H. (2013). Exposure time to caffeine affects heartbeat and cell damage-related gene expression of zebrafish *Danio rerio* embryos at early developmental stages. *Journal of Applied Toxicology*, 33(11): 1277-1283.
- Abreu, M. S., Giacomini, A. C. V., Gusso, D., Rosa, J. G., Koakoski, G., Kalichak, F., *et al.* (2016). Acute exposure to waterborne psychoactive drugs attract zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 179, 37-43.
- Aceto, J., Nourizadeh-Lillabadi, R., Marée, R., Dardenne, N., Jeanray, N., Wehenkel, L., *et al.* (2015). Zebrafish bone and general physiology are differently affected by hormones or changes in gravity. *PloS one*, 10(6), e0126928.
- Adiga, U. S., & Adiga, M. N. S. (2009). Total antioxidant activity in normal pregnancy. *Online Journal of Health and Allied Sciences*, 8(2).
- AEKI (Asosiasi Eksportir dan Industri Kopi Indonesia). (2014). Perkembangan Pasar Kopi Indonesia Pameran Kopi Nusantara, Kementerian Perindustrian. www.aeki-aice.org/, diakses pada 23 Juli 2018.
- Aida, S. (2015) *Efek Toksik Dekokta Centella asiatica terhadap Daya tetas dan Malformasi organ embrio Danio rerio*. Universitas Islam Malang.
- Akhtar, S., Ismail, T., Fraterbnale, D. dan Sestili, P. (2015). Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chem*. 174, 417–425.
- Akomolafe, S. F., Akinyemi, A. J., Oboh, G., Oyeleye, S. I., Ajayi, O. B., Omonisi, A. E., *et al.* (2018). Co-administration of caffeine and caffeic acid alters some key enzymes linked with reproductive function in male rats. *Andrologia*, 50(2), e12839.
- Al-Rawahi, A. S., Edwards, G., Al-Sibani, M., Al-Thani, G., Al-Harrasi, A. S., & Rahman, M. S. (2014). Phenolic constituents of pomegranate peels (*Punica granatum* L.) cultivated in Oman. *European Journal of Medicinal Plants*, 4(3), 315-331.
- Ambigaipalan, P., De Camargo, A. C., and Shahidi, F. (2016). Phenolic compounds of pomegranate byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. *J. Agric. Food Chem*. 64, 6584–6604.
- American College of Obstetrian and Gynecologyst. (2009). ACOG practice bulletin No. 106: Intrapartum fetal heart rate monitoring, nomenclature, interpretation, and general management principles. *Obstetrics and gynecology*, 114,1: 192.
- Amin, A.H., El-Missiry, M.A., Othman, Al. (2015). Melatonin ameliorates metabolic risk factors, modulates apoptotic proteins, and protects the rat heart against diabetes-induced apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2015;747:166–73.

- Antkiewicz, D. S., Burns, C. G., Carney, S. A., Peterson, R. E., & Heideman, W. (2005). Heart malformation is an early response to TCDD in embryonic zebrafish. *Toxicological Sciences*, *84*(2), 368-377.
- Aqil, F., Munagala, R., Vadhanam, M. V., Kausar, H., Jeyabalan, J., Schultz, D. J., & Gupta, R. C. (2012). Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. *Food Research International*, *49*(1), 345-353.
- Arun, K. B., Jayamurthy, P., Anusha, C. V., Mahesh, S. K., & Nisha, P. (2017). Studies on activity guided fractionation of pomegranate peel extracts and its effect on antidiabetic and cardiovascular protection properties. *Journal of Food Processing and Preservation*, *41*(1), e13108.
- Ashmead, Graham Gaylord M.D. (2011). Fetal heart rate monitoring update: the good, the bad, and the atypical. *Female Patient*, *36*, 14-22.
- Astawan, Made. (2008). Sehat dengan Buah. Jakarta: Dian Rakyat.
- Austin-Tse, C., Halbritter, J., Zariwala, M. A., Gilberti, R. M., Gee, H. Y., Hellman, N., *et al.* (2013). Zebrafish ciliopathy screen plus human mutational analysis identifies C21orf59 and CCDC65 defects as causing primary ciliary dyskinesia. *The American Journal of Human Genetics*, *93*(4), 672-686.
- Aviram, M. & Rosenblat, M. (2013). Pomegranate for Your Cardiovascular Health. *Rambam Maimonides Medical Journal*, *4*(2), hal. e0013. doi: 10.5041/rmmj.10113.
- Babin, Patrick J. (2014). Zebrafish models of human motor neuron diseases: Advantages and limitations. *Progress in Neurobiology* *118*: 36 – 58.
- Bakkers, J. (2011). Zebrafish as a Model to Study Cardiac Development and Human Cardiac Disease. Hubrecht Institute-KNAW & University Medical Center Utrecht and Interuniversity Cardiologi Institute of The Netherlands.
- Basnet, R.M., Guarienti, M., & Memo, M. (2017). Zebrafish embryo as an in vivo model for behavioral and pharmacological characterization of Methylxanthine drugs. *International journal of molecular sciences*, *18*(3), 596.
- Bech, B. H., Obel, C., Henriksen, T. B., & Olsen, J. (2007). Effect of reducing caffeine intake on birth weight and length of gestation: randomised controlled trial. *bmj*, *334*(7590), 409.
- Berghmans, S., Jette, C., Langenaue, D., Hsu, K., Stewart, R., Look, T., kanki, P. (2005). Making waves in cancer research: new model in the zebrafish. *Biotechniques*. *39*(2):227-237.
- Bhara, M. (2009) *Pengaruh Pemberian Kopi Dosis Bertingkat Per Oral 30 Hari Terhadap Gambaran Histologi*. Diponegoro University.
- Boadi, William Y. (2015). Abstract A46: Exposure of quercetin, kaempferol and exogenous glutathione on the expression levels of phospho-and total-Akt in 3T3-L1 preadipocytes: A46-A46.

- Borea, P. A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F., & Varani, K. (2018). Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiological reviews*, 98(3), 1591-1625.
- BPS (2017) *Survei Demografi dan Kesehatan*. Jakarta.
- Brown, D. R., Samsa L. A., Qian L., Liu J. (2016). Advances in the study of heart development and disease using zebrafish. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 3, 13.
- Brown, D. R., Clark, B. W., Garner, L. V., & Di Giulio, R. T. (2015). Zebrafish cardiotoxicity: the effects of CYP1A inhibition and AHR2 knockdown following exposure to weak aryl hydrocarbon receptor agonists. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11), 8329-8338.
- Brown, M., Sharma, P., Mir, F. dan Bennett, P. N. (2018) "Clinical Pharmacology, International Edition. Elsevier Health Science 12th Edition."
- Browne, M. (2006). Maternal exposure to caeine and risk of congenital anomalies: a systematic review. *Epidemiology* 17:324–331.
- Budka, D. (2008). Active ingredients, their bioavailability and the health benefit of *Punica granatum Linn* (pomegranate). MSML Research Unit, London.
- Bunsawat, K., White, D.W., Kappus, R.M., Baynard, T. (2015). Caffeine delays auto- nomic recovery following acute exercise. *Eur. J. Prev. Cardiol.* 22 (11).
- Calvo, I. A., Gabrielli, N., Iglesias-Baena, I., García-Santamarina, S., Hoe, K. L., Kim, D. U., *et al.* (2009). Genome-wide screen of genes required for caffeine tolerance in fission yeast. *PloS one*, 4(8), e6619.
- Cao, K., Xu, J., Pu, W., Dong, Z., Sun, L., Zang, W., *et al.* (2015). Punicalagin, an active component in pomegranate, ameliorates cardiac mitochondrial impairment in obese rats via AMPK activation. *Scientific reports*, 5, 14014.
- Capiotti, K. M., Menezes, F. P., Nazario, L. R., Pohlmann, J. B., de Oliveira, G. M., Fazenda, L., *et al.* (2011). Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and teratology*, 33(6), 680-685.
- Carpio, Yamita dan Estrada, Mario Pablo. (2006). *Zebrafish as a Genetic Model Organism*. *Biotecnología Aplicada*. 23:265-270.
- Chakraborty, C., Hsu, C. H., Wen, Z. H., Lin, C. S., & Agoramoorthy, G. (2009). Zebrafish: a complete animal model for in vivo drug discovery and development. *Current drug metabolism*, 10(2), 116-124.
- Changpraykal, S. (2016) *Antioxidant Activity of Selected Commercial Fruit Juices After In vitro Digestion*. Burapha University.
- Charan, J., & Kantharia, N. D. (2013). How to calculate sample size in animal studies?. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, 4(4), 303.

- Charles, B. G., Townsend, S. R., Steer, P. A., Flenady, V. J., Gray, P. H., & Shearman, A. (2008). Caffeine citrate treatment for extremely premature infants with apnea: population pharmacokinetics, absolute bioavailability, and implications for therapeutic drug monitoring. *Therapeutic drug monitoring*, 30(6), 709-716.
- Chen, L. W., Wu, Y., Neelakantan, N., Chong, M. F. F., Pan, A., & van Dam, R. M. (2014). Maternal caffeine intake during pregnancy is associated with risk of low birth weight: a systematic review and dose-response meta-analysis. *BMC medicine*, 12(1), 174.
- Chen, L. W., Wu, Y., Neelakantan, N., Chong, M. F. F., Pan, A., & van Dam, R. M. (2016). Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of pregnancy loss: a categorical and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Public health nutrition*, 19(7), 1233-1244.
- Chen, Y. H., Huang, Y. H., Wen, C. C., Wang, Y. H., Chen, W. L., Chen, L. C., & Tsay, H. J. (2008). Movement disorder and neuromuscular change in zebrafish embryos after exposure to caffeine. *Neurotoxicology and teratology*, 30(5), 440-447.
- Chen, M., Chen, S., Du, M., Tang, S., Chen, M., Wang, W., et al. (2015). Toxic effect of palladium on embryonic development of zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 159, 208-216.
- Christianson, A., Howson, C.P., Modell M. (2006). March of Dimes Global Report on Birth Defects: The Hidden Toll of Dying and Disabled Children. March of Dimes Birth Defects Foundation. Viewed July 25, 2018.
- Chrystal, P. W. (2015). The role of jnk1 during zebrafish development, Newcastle University, <https://theses.ncl.ac.uk/dspace/handle/10443/3035>, diakses pada 10 Oktober 2018.
- Crawford, M. H. (2009) *Cardiology 3rd Edition: Current Diagnosis and Treatment*. USA: McGraw Hill.
- Dahlan, M. S. (2011). *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Penerbit Salemba.
- De Luca, E., Zaccaria, G. M., Hadhoud, M., Rizzo, G., Ponzini, R., Morbiducci, U., & Santoro, M. M. (2014). ZebraBeat: a flexible platform for the analysis of the cardiac rate in zebrafish embryos. *Scientific Reports*, 4, 4898.
- Doostan, F., Vafafar, R., Zakeri-Milani, P., Pouri, A., Afshar, R. A., & Abbasi, M. M. (2017). Effects of Pomegranate (*Punica Granatum L.*) Seed and Peel Methanolic Extracts on Oxidative Stress and Lipid Profile Changes Induced by Methotrexate in Rats. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 7(2), 269.
- Duke, J.A. (2017). *Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economical plants: Herbal Reference Library*. Routledge.
- Echeverri, D., Montes, F. R., Cabrera, M., Galán, A., & Prieto, A. (2010). Caffeine's vascular mechanisms of action. *International journal of vascular medicine*, 2010.

- Eckhardt, S. (2011). *Le complexe MILI/mHEN1 et études fonctionnelles des protéines DrTDRD1 et DrMOV10L* (Doctoral dissertation, Grenoble).
- El-Missiry, M. A., Amer, M. A., Hemieda, F. A., Othman, A. I., Sakr, D. A., & Abdulhadi, H. L. (2015). Cardioameliorative effect of punicalagin against streptozotocin-induced apoptosis, redox imbalance, metabolic changes and inflammation. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(4), 247-260.
- Elfalleh, W., Hannachi, H., Tlili, N., Yahia, Y., Nasri, N., & Ferchichi, A. (2012). Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(32), 4724-4730.
- Feldkamp, M. L., Carey, J. C., Byrne, J. L., Krikov, S., & Botto, L. D. (2017). Etiology and clinical presentation of birth defects: population based study. *bmj*, 357, j2249.
- Feoli, Ana Maria Pandolfo. (2014). Clinical Study Xanthine Oxidase Activity Is Associated with Risk Factors for Cardiovascular Disease and Inflammatory and Oxidative Status Markers in Metabolic Syndrome: Effects of a Single Exercise Session. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Fernandes, L., Pereira, J. A., Lopez-Cortes, I., Salazar, D.M., Ramalhosa, E. C. (2015). Physicochemical Change and Antioxidant Activity of Juice, Skin, Pellicle, and Seed of Pomegranate at Different Stage of Ripening. *Food Technology and Biotechnology* 53 (4): 397-406.
- Festing, M. F. (2018). On determining sample size in experiments involving laboratory animals. *Laboratory animals*, 52(4), 341-350.
- Food and Drug Administration, F. (2007) *Medicines in my home: caffeine and your body*. Tersedia pada: <http://www.fda.gov>.
- García-Niño, W. R. dan Zazueta, C. (2015). Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection., *Pharmacological Research*, 97, hal. 84–103. doi: 10.1016/j.phrs.2015.04.008.
- Geethavani, G., Rameswarudu, M., & Reddy, R. R. (2014). Effect of caffeine on heart rate and blood pressure. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4(2), 234.
- Genge, C. E., Lin, E., Lee, L., Sheng, X., Rayani, K., Gunawan, M., ... & Hove-Madsen, L. (2016). The zebrafish heart as a model of mammalian cardiac function. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 171 (pp. 99-136). Springer, Cham.
- Gerlai, R., Chatterjee, D., Pereira, T., Sawashima, T., Krishnannair, R. (2009). Acute and chronic alcohol dose: Population differences in behavior and neurochemistry of zebrafish. *Genes, Brain, and Behavior*. 8(6):586–599.
- Giamogante, F., Marrocco, I., Cervoni, L., Eufemi, M., Chichiarelli, S., & Altieri, F. (2018). Punicalagin, an active pomegranate component, is a new inhibitor of PDIA3 reductase activity. *Biochimie*, 147, 122-129.

- Glinianaia, S. V, Tennant, P. W. G. dan Rankin, J. (2017). Risk estimates of recurrent congenital anomalies in the UK: a population-based register study. *BMC Medicine*. BMC Medicine, hal. 1–14. doi: 10.1186/s12916-017-0789-5.
- Gouda, M., Moustafa, A., Hussein, L., Hamza, M. (2016). Three week dietary intervention using apricots, pomegranate juice or/and fermented sour sobya and impact on biomarkers of antioxidative activity, oxidative stress and erythrocytic glutathione transferase activity among adults. *Nutr J*;15(1):52.
- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., & Jiang, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition research*, 23(12), 1719-1726.
- Gupta, S., Agarwal, A., Banerjee, J., & Alvarez, J. G. (2007). The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstetrical & gynecological survey*, 62(5), 335-347.
- Hall, John E. (2015). *Guyton and Hall textbook of medical physiology* e-Book. Elsevier Health Sciences.
- Hanke, N., Staggs, L., Schroder, P., Litteral, J., Fleig, S., Kaufeld, J., *et al.* (2013). “Zebrafishing” for novel genes relevant to the glomerular filtration barrier. *BioMed research international*, 2013.
- Hassanpour Fard, M., Ghule, A. E., Bodhankar, S. L., & Dikshit, M. (2011). Cardioprotective effect of whole fruit extract of pomegranate on doxorubicin-induced toxicity in rat. *Pharmaceutical biology*, 49(4), 377-382.
- Heckman, M. A., Weil, J. dan de Mejia, E. G. (2010) “Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: A comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters,” *Journal of Food Science*, 75(3), hal. 77–87. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01561.x.
- Hiwale, S.S. (2009). *The Pomegranate*. India: New India Publishing Agency.
- Hoage T., Ding Y., Xu X. (2012). Quantifying cardiac functions in embryonic and adult zebrafish. *Methods in Molecular Biology*. 843: 11-20.
- Hoffman, R. Howland, N. Lewin, L.S. Nelson, L.R. (2014). Goldfrank, Goldfrank’s Toxicologic Emergencies, New York, NY: McGraw-Hill.
- Hosen, M. J., Vanakker, O. M., Willaert, A., Huysseune, A., Coucke, P., & De Paepe, A. (2013). Zebrafish models for ectopic mineralization disorders: practical issues from morpholino design to post-injection observations. *Frontiers in genetics*, 4, 74.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... & McLaren, S. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498.
- Huang, Z. L., Qu, W. M., Eguchi, N., Chen, J. F., Schwarzschild, M. A., Fredholm, B. B., *et al.* (2005). Adenosine A_{2A}, but not A₁, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nature neuroscience*, 8(7), 858.

- Huang, D., Li, H., He, Q., Yuan, W., Chen, Z., & Yang, H. (2018). Developmental Toxicity of Diethylnitrosamine in Zebrafish Embryos/Juveniles Related to Excessive Oxidative Stress. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229(3), 81.
- Ismail, T., Sestili, P., Akhtar, S. (2012). Pomegranate Peel and Fruit Extracts: A Review of Potential Anti-inflammatory and Anti-infective effects. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 143(2). pp 397-405.
- Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., *et al.* (2010). Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *science*, 327(5971), 1345-1350.
- Jati, Stepanus Sinung W. 2017. *Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (Moringa oleifera) terhadap Denyut Jantung Embrio dan Perikardium Larva Ikan Zebra (Danio rerio) yang dipapar dengan Etanol*. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Jeanray, N., Marée, R., Pruvot, B., Stern, O., Geurts, P., Wehenkel, L., & Muller, M. (2015). Phenotype classification of zebrafish embryos by supervised learning. *PloS one*, 10(1), e0116989.
- Johnstone., Victoria, P.A., Livia, C., Hool. (2014). *Gluthionylation of the L-type Ca²⁺ Channel in Oxidative Stress-Induces Pathology of the Heart*. *International Journal of Molecular Sciences*. 15: 19203-19225.
- Kalueff, A.V., Stewart, A.M., & Gerlai, R. (2014). Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in pharmacological sciences*, 35(2), 63-75.
- Kemenkes. (2013). Riset Kesehatan Dasar Kementerian RI, *Proceedings, Annual Meeting - Air Pollution Control Association*, 6. doi: 1 Desember 2013.
- Kemenkes. (2015). Rencana Strategis 2015-2019.
- Kemenkes. (2018). *Data dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia 2017*. doi: 10.1037/0022-3514.51.6.1173.
- Kementerian Pertanian. (2016). Outlook Kopi, Komoditas pertanian, Subsektor perkebunan: Pusat Data Dan System Informasi Pertanian, Sekretariat Jendral, ISSN: 1907-1507
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203(3), 253-310.
- Klee, E. W., Schneider, H., Clark, K. J., Cousin, M. A., Ebbert, J. O., Hooten, W. M., *et al.* (2012). Zebrafish: a model for the study of addiction genetics. *Human genetics*, 131(6), 977-1008.
- Konje, J. C. & Cade, J. E. (2008) "Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of fetal growth restriction: A large prospective observational study," *Bmj*, 337(7682), hal. 1334–1338. doi: 10.1136/bmj.a2332.
- Kumar, D., Singh, S., Singh, A. K., & Rizvi, S. I. (2013). Pomegranate (*Punica granatum*) peel extract provides protection against mercuric chloride-induced oxidative stress in Wistar strain rats. *Pharmaceutical*

biology, 51(4), 441-446.

- Lany, A. (2017) *Hubungan Konsumsi Kafein terhadap Kualitas Tidur dan Tekanan Darah pada Karyawan Restoran Cepat Saji di Kota Padang*. Universitas Andalas.
- Lara, Diogo. (2010). *Caffeine, Mental Health, and Psychiatric Disorder: Journal of Alzheimer's Disease* 20. 239-248.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food chemistry*, 96(2), 254-260.
- Li, K., Wu, J. Q., Jiang, L. L., Shen, L. Z., Li, J. Y., He, Z. H., *et al.* (2017). Developmental toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. *Chemosphere*, 171, 40-48.
- Lin, E., Ribeiro, A., Ding, W., Hove-Madsen, L., Sarunic, M. V., Beg, M. F., & Tibbits, G. F. (2014). Optical mapping of the electrical activity of isolated adult zebrafish hearts: acute effects of temperature. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 306(11), R823-R836.
- Madrigal-Carballo, S., Rodriguez, G., Krueger, C. G., Dreher, M., & Reed, J. D. (2009). Pomegranate (*Punica granatum*) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenol composition. *Journal of Functional Foods*, 1(3), 324-329.
- McGrath, Patricia. (2012). *Zebrafish: Methods for Assessing Drug Safety and Toxicity*. Hoboken: John Wiley and Sons Inc.
- Monteiro, J., Alves, M., Oliveira, P., & Silva, B. (2016). Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: Trying to make sense of all the promises and the drawbacks. *Molecules*, 21(8), 974.
- Moore, K.L., Dalley, A.F. and Agur, A. M. (2013) "Clinically oriented anatomy. Lippincott Williams & Wilkins."
- Murray, R. K., Granner, D. K., & Rodwell, U. W. (2010). *Harper's Biochemistry, Biokimia Harper*. EGC, Jakarta, Indonesia.
- Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., & Feeley, M. (2003). Effects of caffeine on human health. *Food Additives & Contaminants*, 20(1), 1-30.
- Norton, M. E. (2016) *Callen's Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology 6th Edition*. Elsevier Health Sciences.
- Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S., & Chowwanapoonpohn, S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, 103(3), 839-846.
- Okubo, H., Miyake, Y., Tanaka, K., Sasaki, S., & Hirota, Y. (2015). Maternal total caffeine intake, mainly from Japanese and Chinese tea, during pregnancy was associated with risk of preterm birth: the Osaka Maternal and Child Health Study. *Nutrition Research*, 35(4), 309-316.

- Orak, Hakime Hulya, Hulya Yagar, and Sebnem Selen Isbilir. (2012). Comparison of antioxidant of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punica granatum L.*) and inter-relationships with total phenolic, tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. *Food Science and Biotechnology*, 21(2), 373-387.
- Orgil, O., Schwartz, E., Baruch, I., Matityahu, I., Mahajna, J. And Amir, R. (2014). The antioxidative and antiproliferative potential of non-edible organs of the pomegranate fruit and tree. *LWT Food Sci. Technol.* 58, 571–577.
- Osman, H.F, Eshak , M.G., El-Sherbiny, E.M., Bayoumi, M.M. (2012). Biochemical and genetical evaluation of pomegranate impact on diabetes mellitus induced by alloxan in female rats. Radioisotopes Departement, Nuclear Research Center. *Sci J*;9(3):1543-1553.
- Pandey., Bhooshan, Kanti., & Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278.
- Park, J., Lee, J., Lau, S. T., Lee, C., Huang, Y., Lien, C. L., & Shung, K. K. (2012). Acoustic radiation force impulse (ARFI) imaging of zebrafish embryo by high-frequency coded excitation sequence. *Annals of biomedical engineering*, 40(4), 907-915.
- Paşaoğlu, H., Demir, F. E. O., Yılmaz-Demirtaş, C. A. N. A. N., Hussein, A., & Paşaoğlu, Ö. T. (2011). The effect of caffeine on oxidative stress in liver and heart tissues of rats. *Turkish Journal Of Medical Sciences*, 41(4), 665-671.
- Pathak, P. D., Mandavgane, S.A & Kulkarni, B.D. (2017). Valorization of Pomegranate Peels: A biorefinery approach: *Waste and Biomass Valorization*, 8(4), 1127–1137.
- Pei, L., Kang, Y., Cheng, Y., & Yan, H. (2015). The association of maternal lifestyle with birth defects in Shaanxi Province, Northwest China. *PloS one*, 10(9), e0139452.
- Perry, S. F., Ekker, M., Farrell, A. P., & Brauner, C. J. (2010). *Fish Physiology: Zebrafish* (Vol. 29). Academic Press.
- Pinnell, Jeremy., Simon Turner., & Simon Howell. (2007). Cardiac muscle physiology. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & pain*, 7(3), 85-88.
- Polsjak, B., Dusan, S., Irina, M. (2013). *Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants*. *Oxidative Medicine and Celluler Longevity*. Vol 2013: 1-11.
- Porta, M., Zima, A. V., Nani, A., Diaz-Sylvester, P. L., Copello, J. A., Ramos-Franco, J., *et al.* (2011). Single ryanodine receptor channel basis of caffeine's action on Ca²⁺ sparks. *Biophysical journal*, 100(4), 931-938.
- Pruvot, B., Quiroz, Y., Voncken, A., Jeanray, N., Piot, A., Martial, J. A., & Muller, M. (2012). A panel of biological tests reveals developmental effects of pharmaceutical pollutants on late stage zebrafish embryos. *Reproductive toxicology*, 34(4), 568-583.

- Puteri, P. F. C. H. (2010). *Pengaruh Kafein Terhadap Tekanan Darah Sistol dan Denyut Jantung Pada Laki-Laki Dewasa* (Doctoral dissertation, Universitas Kristen Maranatha).
- Rahman, K. (2007). Studies on Free Radicals, Antioxidants, and Co-Factors. *Clinical Review in Aging*, 2(2): 219-236.
- Rashidi, F., Khaksary-Mahabady, M., Ranjbar, R., & Najafzadeh-Varzi, H. (2014). The effects of essential oil of galbanum on caffeine induced-cleft palate in rat Embryos. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(2), 37-41.
- Rastaldo, R., Pagliaro, P., Cappello, S., Penna, C., Mancardi, D., Westerhof, N., & Losano, G. (2007). Nitric oxide and cardiac function. *Life sciences*, 81(10), 779-793.
- Reed, B & Jennings M. (2011). Guidance on the housing and care of Zebrafish *Danio rerio*. *Research Animal Department. Science Group*.
- Reimers, M.J., La Du, J.K., Periera, C.B., Giovanini, J., Tanguay, R.L. (2006). Ethanol-dependent toxicity in zebrafish is partially attenuated by antioxidants. *Neurotoxicol Teratol*; 28:497–508.
- Richards, J. R., E. A. Ramoska, and I. C. Sand. (2016). Beta-blocker treatment of caffeine-induced tachydysrhythmias. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)* 54.5: 466.
- Rom, O., Volkova, N., Nandi, S., Jelinek, R., Aviram, M. (2016). Pomegranate juice polyphenols induce macrophage death via apoptosis as opposed to necrosis induced by free radical generation: A central role for oxidative stress. *J Cardiovasc Pharmacol*;68(2):106-14.
- Rubinstein, AL. (2006). Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert Opinion of Drug Metabolism and Toxicology*, 2(2): 231-240.
- Rush, J. W. E., Denniss, S. G. dan Graham, D. A. (2009) "Vascular Nitric Oxide and Oxidative Stress: Determinants of Endothelial Adaptations to Cardiovascular Disease and to Physical Activity," *Canadian Journal of Applied Physiology*, 30(4), hal. 442–474. doi: 10.1139/h05-133.
- Samarut, E., Fraher, D., Laudet, V., & Gibert, Y. (2015). ZebRA: An overview of retinoic acid signaling during zebrafish development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(2), 73-83.
- Santhakumar, A.B, A.C Bulmer, I. Singh. (2013). *A Review of the Mechanism and Effectiveness of Dietary Polyphenols in Reducing Oxidative Stress and Thrombotic Risk*. *Journal of Human Nutrition and Dieterics*. 1-21.
- Santoriello, C., & Zon, L. I. (2012). Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *The Journal of clinical investigation*, 122(7), 2337-2343.
- Santulli, G., Lewis, D., des Georges, A., Marks, A. R., & Frank, J. (2018). Ryanodine receptor structure and function in health and disease. In *Membrane Protein Complexes: Structure and Function* (pp. 329-352). Springer, Singapore.

- Sarmah, S & Marrs, J. A. (2016). Zebrafish as a Vertebrate Model System to Evaluate Effects of Environmental Toxicants on Cardiac Development and Function. *International Journal of Molecular Science*, 17, 2123.
- Scott, I. C., & Yelon, D. (2010). Cardiac development in the zebrafish. In *Heart development and regeneration* (pp. 103-120). Academic Press.
- Schindler, Y. L., Garske, K. M., Wang, J., Firulli, B. A., Firulli, A. B., Poss, K. D., & Yelon, D. (2014). Hand2 elevates cardiomyocyte production during zebrafish heart development and regeneration. *Development*, 141(16), 3112-3122.
- Scholz, S., Fischer, S., Gundel, U, Kuster, E., Luckenbach, T., Voelker, D. (2008). The Zebrafish Embryo Model in Environmental Risk Assessment, Applications Beyond Acute Toxicity Testing in Henner Hollert (Ed). *Environmental Science and Pollution Research*, 15(5), 394–404.
- Selderslaghs, I. W., Van Rompay, A. R., De Coen, W., & Witters, H. E. (2009). Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reproductive toxicology*, 28(3), 308-320.
- Sen, S., R. Chakraborti, C. Sridhar, Y. S.R. Reddy, B., D. (2010). Free Radicals, Antioxidants, Disease and Phytomedicines! Current Status and Future Prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 3(6): 91-100.
- Setiawan, B., Suhartono, E., & Mashuri, M. (2005). Kajian Stress Oksidatif Pada Bayi Prematur. *Mutiara Medika: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, 5(1), 27-35.
- Shabetai, Ralph. (2012). *The pericardium*. Vol. 249. Springer Science & Business Media.
- Shabtay, A., Eitam, H., Tadmor, Y., Orlov, A., Meir, A., Weinberg, P., ... & Kerem, Z. (2008). Nutritive and antioxidative potential of fresh and stored pomegranate industrial byproduct as a novel beef cattle feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10063-10070.
- Shamsuzzaman, M.D, Gulati, K., Ray, A. (2016). Methylxanthine induced cardiotoxicity and its mechanisms: An experimental study. *Manipal Journal of Medical Sciences*.
- Shaygannia, E., Bahmani, M., Zamanzad, B., & Rafieian-Kopaei, M. (2016). A review study on Punica granatum L. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 21(3), 221-227.
- Shebis, Y., Iluz, D., Kinel-Tahan, Y., Dubinsky, Z., & Yehoshua, Y. (2013). Natural antioxidants: function and sources. *Food and Nutrition Sciences*, 4(06), 643.
- Sherwood, Lauralee. (2015). *Human Physiology: From Cells to System*. USA: Cengage Learning.

- Shirode, A. B., Kovvuru, P., Chittur, S. V., Henning, S. M., Heber, D., & Reliene, R. (2014). Antiproliferative effects of pomegranate extract in MCF- 7 breast cancer cells are associated with reduced DNA repair gene expression and induction of double strand breaks. *Molecular carcinogenesis*, 53(6), 458-470.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2018). Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum L.*) peel: A review. *Food chemistry*, 261, 75-86.
- Smith. (2002). Effects of caffeine on human behavior, *Food and Chemical Toxicology*, 40(9), hal. 1243–1255. doi: 10.1016/S0278-6915(02)00096-0.
- Smith, O. (2017) *Mapped: The Countries That Drink The Most Coffee. The Telegraphs. United Kingdom*. Tersedia pada: <https://www.telegraph.co.uk>.
- Song, F., Jia, W., Yao, Y., Hu, Y., Lei, L., Lin, J., *et al.* (2007). Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)*;112:599–606.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews*, 83(1), 13-34.
- Spirita Sharmili, V., & Angelin, A. (2015). Stages of embryonic development of the Zebrafish *Danio rerio* (Hamilton). *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 6, 6-11.
- Sreeja, S., Hima, S., Parvathy, M., Juberiya, M. A. (2014). Pomegranate fruit as a rich source of biologically active compounds. *Biomed Res. Int.*
- Staff, M. C. (2014) *Healthy Lifestyle: Nutrition and healthy eating, USA: Mayo Foundation for Medical Education and Research*. Tersedia pada: <http://www.mayoclinic.org/>.
- Stewart, A. M., Nguyen, M., Wong, K., Poudel, M. K., & Kalueff, A. V. (2014). Developing zebrafish models of autism spectrum disorder (ASD). *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 50, 27-36.
- Sun, W., Yan, C., Frost, B., Wang, X., Hou, C., Zeng, M., ... & Liu, J. (2016). Pomegranate extract decreases oxidative stress and alleviates mitochondrial impairment by activating AMPK-Nrf2 in hypothalamic paraventricular nucleus of spontaneously hypertensive rats. *Scientific reports*, 6, 34246.
- SUN, Y. Q., Xin, T., MEN, X. M., XU, Z. W., & Tian, W. (2017). In vitro and in vivo antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: Ellagic acid, punicalin, and punicalagin. *Journal of integrative agriculture*, 16(8), 1808-1818.
- Tappia, P. S., Hata, T., Hozaima, L., Sandhu, M. S., Panagia, V., & Dhalla, N. S. (2001). Role of oxidative stress in catecholamine-induced changes in cardiac sarcolemmal Ca²⁺ transport. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 387(1), 85-92.

- Tehranifar, A., Zarei, M., Nemati, Z., Esfandiyari, B., & Vazifeshenas, M. R. (2010). Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 126(2), 180-185.
- 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*, 33(6), hal. 793–806. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.01.001.
- Thorn, C. F., Aklillu, E., McDonagh, E. M., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2012). PharmGKB summary: caffeine pathway. *Pharmacogenetics and genomics*, 22(5), 389.
- Tiffany, H., Yonghe, D. dan Xiaolei, X. (2017) "Cardiovascular Development," *Comprehensive Toxicology: Third Edition*, 13–15, hal. 1–28. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.02014-6.
- Tim. (2015). *Outlook Kopi: Komoditas Pertanian Subsektor Perkebunan*. Jakarta: Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jenderal - Kementerian Pertanian 2015.
- Yeh, C. H., Liao, Y. F., Chang, C. Y., Tsai, J. N., Wang, Y. H., Cheng, C. C., ... & Chen, Y. H. (2012). Caffeine treatment disturbs the angiogenesis of zebrafish embryos. *Drug and chemical toxicology*, 35(4), 361-365.
- Turnbull, D., Rodricks, J. V., Mariano, G. F., & Chowdhury, F. (2017). Caffeine and cardiovascular health. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 89, 165-185.
- Tyagi, S., Sing, A., Bhardwaj, P., Sahu, S., Yadau, A. P., Kori, M.L. (2012). Punicalagin-A Large Poliphenol Compounds Found in Pomegranates; A Therapeutic Review. *Journal of Plant Science*; 5(2): 45-49.
- United States Department of Agriculture (USDA). (2018). Indonesia Coffee Annual Report 2018. Global Agriculture Information Network. www.fas.usda.gov.
- Valesio, Eric G., Honghong Zhang, and Chunbo Zhang. (2013). Exposure to the JNK inhibitor SP600125 (anthrapyrazolone) during early zebrafish development results in morphological defects." *Journal of Applied Toxicology* 33.1: 32-40.
- Vasconcelos, A.C., Ramoz, S.E., Ferreira, M.R., Veras, C.G., Solis, L.D. (2012). Toxicological Analysis of Caffeine Using Embryos of *Danio rerio* as an Experimental Model. *First International Conference on Environmental Bioinorganic and Toxicology*. Lavras, Brazil.
- Verster, J.C & Juergen, Koenig. (2017). *Caffeine intake and its sources: a review of national representative studies*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition.
- Von Steinburg, S. P., Boulesteix, A. L., Lederer, C., Grunow, S., Schiermeier, S., Hatzmann, W., et al. (2013). What is the "normal" fetal heart rate?. *PeerJ*, 1, e82.

- Wang, Dongdong, *et al.* (2018). Vasculoprotective Effects of Pomegranate (*Punica granatum L.*). *Frontiers in pharmacology* 9.
- Wang, D., Özen, C., Abu-Reidah, I. M., Chigurupati, S., Patra, J. K., Horbanczuk, J. O., *et al.* (2018). Vasculoprotective effects of pomegranate (*punica granatum l.*). *Frontiers in pharmacology*, 9.
- Wang, S., Liu, K., Wang, X. (2010). Toxic effects of celastrol on embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Drug Chem Toxicol.* 34(1): 61-65.
- Warren, Kerri S., Keith Baker, and Mark C. Fishman. (2011). The slow mo mutation reduces pacemaker current and heart rate in adult zebrafish. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 281.4: H1711-H1719.
- El-Wakf, A. M., El-Habibi, E. S. M., Barakat, N. M., Attia, A. M., Hussein, A. M., & Ali, I. I. (2018). Cardiovascular toxic effects of chlorpyrifos: A possible protective role for pomegranate extracts. *J. Clin. Toxicol*, 8, 10-4172.
- Weng, X., Odouli, R. dan Li, D. K. (2008) "Maternal caffeine consumption during pregnancy and the risk of miscarriage: a prospective cohort study," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 198(3), hal. 279.e1-279.e8. doi: 10.1016/j.ajog.2007.10.803.
- Wibowo, I., Permadi, K., Hartati, R., & Damayanti, S. (2018). Ethanolic 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*, 8(06), 082-086.
- Willson, Cyril. (2018). The clinical toxicology of caffeine: A review and case study. *Toxicology Reports*.
- Winarsi, Hery. (2011). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Cetakan ke-5*. Yogyakarta : Kanisius.
- Wisborg, K., Kesmodel, U., Bech, B. H., Hedegaard, M., & Henriksen, T. B. (2003). Maternal consumption of coffee during pregnancy and stillbirth and infant death in first year of life: prospective study. *Bmj*, 326(7386), 420.
- World Health Organization (WHO) (2016) *Congenital Anomalies*. Tersedia pada: www.who.int (Diakses: 25 Juni 2018).
- Xiao, Y., Zhou, Y., Xiong, Z., Zou, L., Jiang, M., Luo, Z., ... & Li, W. (2013). Involvement of JNK in the embryonic development and organogenesis in zebrafish. *Marine biotechnology*, 15(6), 716-725.
- Xie, W., Santulli, G., Reiken, S. R., Yuan, Q., Osborne, B. W., Chen, B. X., & Marks, A. R. (2015). Mitochondrial oxidative stress promotes atrial fibrillation. *Scientific reports*, 5, 11427.
- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., & Jiang, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition research*, 23(12), 1719-1726.

- Yang, A., & Abraham, A.P. (2010). Genetics of caffeine consumption and responses to caffeine. *Psychopharmacology* 211(3): 245 – 257.
- Yonata, A., & Saragih, D. G. P. (2016). Pengaruh Konsumsi Kafein pada Sistem Kardiovaskular. *Jurnal Majority*, 5(3), 43-49.
- Yulianti, Riska Agustina. (2014). Gambaran Persepsi Ibu Hamil tentang Dampak Mengonsumsi Kopi dalam Kehamilan. Thesis. Ponorogo: Universitas Muhammadiyah Ponorogo.
- Zaglool, Nahed F., Shahenaz MH Hassan, and Sanaa A. El-shamy. (2017). Effect of Aqueous Extract of Punica granatum Peel on the Oxidative Damage Induced by Lead Intoxication in Rats. *Zagazig Veterinary Journal (Zag. Vet. J.)* 45.2.
- Zahin, M., Farrukh, A., & Iqbal, A. (2010). Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of Punica granatum L, peel extracts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 703(2), 99-107.
- Zalukhu, M. L., Pyma, A. R. dan Pinzon, R. T. (2016) "Proses Menua, Stres Oksidatif, dan Peran Antioksidan," *CDK Journal*, 43(10), hal. 733–736.
- Zhang, Y., Krueger, D., Durst, R., Lee, R., Wang, D., Seeram, N., & Heber, D. (2009). International multidimensional authenticity specification (IMAS) algorithm for detection of commercial pomegranate juice adulteration. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(6), 2550-2557.
- Zhang, Y., Wang, Q., Wang, H., & Duan, E. (2017). Uterine fluid in pregnancy: a biological and clinical outlook. *Trends in molecular medicine*, 23(7), 604-614.
- Zhao, Y., Paul M. V., & Susan W.S.L. (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of pharmacological sciences* 129.2: 83-94.
- Zulli, A., Smith, R. M., Kubatka, P., Novak, J., Uehara, Y., Loftus, H., *et al.* (2016). Caffeine and cardiovascular diseases: critical review of current research. *European journal of nutrition*, 55(4), 1331-1343.

Lampiran 1. Hasil Rata-Rata Data Denyut Jantung dan Edema Perikardium

Report

HR

Group	Mean	N	Std. Deviation
Kontrol	219.4627	49	12.53763
KN	231.6669	16	19.84457
KP	216.2779	24	10.74596
P1	201.6419	26	13.59923
P2	200.5327	30	14.10939
P3	209.1768	34	14.25130
P4	210.6279	34	13.47553
P5	203.5003	32	12.14362
Total	211.0002	245	15.97440

Report

Edema_Perikardium

Group	Mean	N	Std. Deviation
Kontrol	.00	51	.000
Kontrol Negatif	.79	48	.410
Kontrol Positif	.40	30	.498
KD 0,14 ppm	.65	26	.485
KD 0,28 ppm	.45	31	.506
KD 0,42 ppm	.37	40	.490
KD 0,56 ppm	.33	36	.478
KD 0,7 ppm	.14	36	.351
Total	.38	298	.486

Lampiran 2. Data Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Denyut Jantung

Tests of Normality

Group	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Heart_Rate Kontrol	.076	45	.200 [*]	.966	45	.211
KN	.174	12	.200 [*]	.915	12	.250
KP	.143	24	.200 [*]	.961	24	.456
KD 0,14	.111	17	.200 [*]	.964	17	.706
KD 0,28	.155	19	.200 [*]	.948	19	.362
KD 0,42	.101	30	.200 [*]	.982	30	.873
KD 0,56	.137	26	.200 [*]	.927	26	.067
KD 0,7	.116	30	.200 [*]	.963	30	.367

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality

Heart_Rate	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Heart_Rate	.065	203	.038	.991	203	.219

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Heart_Rate		Levene	df1	df2	Sig.
		Statistic			
Heart_Rate	Based on Mean	1.935	7	195	.066
	Based on Median	1.725	7	195	.105
	Based on Median and with adjusted df	1.725	7	184.784	.106
	Based on trimmed mean	1.907	7	195	.070

Lampiran 3. Hasil Uji *One Way ANOVA* Denyut Jantung**ANOVA**

Heart_Rate	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8699.228	7	1242.747	11.526	.000
Within Groups	21024.505	195	107.818		
Total	29723.732	202			

Lampiran 4. Uji *Post Hoc* Denyut Jantung

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Heart_Rate

LSD

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	KN	-7.08183*	3.37354	.037	-13.7351	-.4285
	KP	3.19608	2.62457	.225	-1.9801	8.3723
	KD 0,14	9.90459*	2.95604	.001	4.0747	15.7345
	KD 0,28	10.56189*	2.84088	.000	4.9591	16.1647
	KD 0,42	10.62933*	2.44742	.000	5.8025	15.4562
	KD 0,56	12.03708*	2.55789	.000	6.9924	17.0818
	KD 0,7	15.82933*	2.44742	.000	11.0025	20.6562
KN	Kontrol	7.08183*	3.37354	.037	.4285	13.7351
	KP	10.27792*	3.67114	.006	3.0377	17.5181
	KD 0,14	16.98642*	3.91498	.000	9.2653	24.7076
	KD 0,28	17.64373*	3.82877	.000	10.0926	25.1948
	KD 0,42	17.71117*	3.54666	.000	10.7164	24.7059
	KD 0,56	19.11891*	3.62377	.000	11.9721	26.2657
	KD 0,7	22.91117*	3.54666	.000	15.9164	29.9059
KP	Kontrol	-3.19608	2.62457	.225	-8.3723	1.9801
	KN	-10.27792*	3.67114	.006	-17.5181	-3.0377
	KD 0,14	6.70850*	3.29160	.043	.2168	13.2002
	KD 0,28	7.36581*	3.18858	.022	1.0773	13.6543
	KD 0,42	7.43325*	2.84365	.010	1.8250	13.0415
	KD 0,56	8.84099*	2.93926	.003	3.0442	14.6378
	KD 0,7	12.63325*	2.84365	.000	7.0250	18.2415
KD 0,14	Kontrol	-9.90459*	2.95604	.001	-15.7345	-4.0747
	KN	-16.98642*	3.91498	.000	-24.7076	-9.2653
	KP	-6.70850*	3.29160	.043	-13.2002	-.2168
	KD 0,28	.65731	3.46653	.850	-6.1794	7.4940
	KD 0,42	.72475	3.15217	.818	-5.4920	6.9415
	KD 0,56	2.13249	3.23868	.511	-4.2549	8.5198
	KD 0,7	5.92475	3.15217	.062	-.2920	12.1415
KD 0,28	Kontrol	-10.56189*	2.84088	.000	-16.1647	-4.9591
	KN	-17.64373*	3.82877	.000	-25.1948	-10.0926
	KP	-7.36581*	3.18858	.022	-13.6543	-1.0773
	KD 0,14	-.65731	3.46653	.850	-7.4940	6.1794
	KD 0,42	.06744	3.04443	.982	-5.9368	6.0717
	KD 0,56	1.47518	3.13392	.638	-4.7056	7.6559
	KD 0,7	5.26744	3.04443	.085	-.7368	11.2717

KD 0,42	Kontrol	-10.62933*	2.44742	.000	-15.4562	-5.8025
	KN	-17.71117*	3.54666	.000	-24.7059	-10.7164
	KP	-7.43325*	2.84365	.010	-13.0415	-1.8250
	KD 0,14	-.72475	3.15217	.818	-6.9415	5.4920
	KD 0,28	-.06744	3.04443	.982	-6.0717	5.9368
	KD 0,56	1.40774	2.78223	.613	-4.0794	6.8949
	KD 0,7	5.20000	2.68102	.054	-.0875	10.4875
KD 0,56	Kontrol	-12.03708*	2.55789	.000	-17.0818	-6.9924
	KN	-19.11891*	3.62377	.000	-26.2657	-11.9721
	KP	-8.84099*	2.93926	.003	-14.6378	-3.0442
	KD 0,14	-2.13249	3.23868	.511	-8.5198	4.2549
	KD 0,28	-1.47518	3.13392	.638	-7.6559	4.7056
	KD 0,42	-1.40774	2.78223	.613	-6.8949	4.0794
	KD 0,7	3.79226	2.78223	.174	-1.6949	9.2794
KD 0,7	Kontrol	-15.82933*	2.44742	.000	-20.6562	-11.0025
	KN	-22.91117*	3.54666	.000	-29.9059	-15.9164
	KP	-12.63325*	2.84365	.000	-18.2415	-7.0250
	KD 0,14	-5.92475	3.15217	.062	-12.1415	.2920
	KD 0,28	-5.26744	3.04443	.085	-11.2717	.7368
	KD 0,42	-5.20000	2.68102	.054	-10.4875	.0875
	KD 0,56	-3.79226	2.78223	.174	-9.2794	1.6949

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 5. Hasil Uji Regresi Denyut Jantung

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.500 ^a	.250	.246	10.53283

a. Predictors: (Constant), Group

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	7424.674	1	7424.674	66.925	.000 ^b
	Residual	22299.059	201	110.941		
	Total	29723.732	202			

a. Dependent Variable: Heart_Rate

b. Predictors: (Constant), Group

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	208.564	1.257		165.887	.000
	Group	-2.402	.294	-.500	-8.181	.000

a. Dependent Variable: Heart_Rate

Lampiran 6. Hasil Uji Korelasi Denyut Jantung

Correlations

		Group	Heart_Rate
Group	Pearson Correlation	1	-.500**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	203	203
Heart_Rate	Pearson Correlation	-.500**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	203	203

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 7. Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Edema Perikardium

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Edema_Perikardium	.403	298	.000	.615	298	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Edema_Perikardium	Based on Mean	50.782	7	290	.000
	Based on Median	5.549	7	290	.000
	Based on Median and with adjusted df	5.549	7	228.828	.000
	Based on trimmed mean	41.639	7	290	.000

Lampiran 8. Hasil Uji *Kruskal Wallis* Edema Perikardium

Kruskal–Wallis Test

Ranks			
	Group	N	Mean Rank
Edema_Perikardium	Kontrol	51	93.00
	Kontrol Negatif	48	210.96
	Kontrol Positif	30	152.60
	KD 0,14 ppm	26	190.42
	KD 0,28 ppm	31	160.29
	KD 0,42 ppm	40	148.88
	KD 0,56 ppm	36	142.67
	KD 0,7 ppm	36	113.69
	Total	298	

Test Statistics^{a,b}

Edema_Perikardium	
Kruskal–Wallis H	83.793
df	7
Asymp. Sig.	.000

- a. Kruskal Wallis Test
 b. Grouping Variable:
 Group

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Edema_Perikardium is the same across categories of Group.	Independent-Samples Kruskal–Wallis Test	.000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Lampiran 9. Hasil Uji Regresi dan Korelasi Edema Perikardium

- Uji Regresi Logistik

Omnibus Tests of Model Coefficients

		Chi-square	df	Sig.
Step 1	Step	102.047	7	.000
	Block	102.047	7	.000
	Model	102.047	7	.000

Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	293.500 ^a	.290	.395

a. Estimation terminated at iteration number 20 because maximum iterations has been reached. Final solution cannot be found.

- Uji Korelasi Spearman

➔ Nonparametric Correlations

Correlations

		Group	Edema_Perikardium	
Spearman's rho	Group	Correlation Coefficient	1.000	
		Sig. (2-tailed)	.	
		N	298	
	Edema_Perikardium	Correlation Coefficient	-.032	1.000
		Sig. (2-tailed)	.577	.
		N	298	298

Lampiran 10. Surat Keterangan Laik Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 67 / EC / KEPK / 03 / 2018

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

- JUDUL** : Pengaruh Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum*) terhadap Malformasi, Aktifitas Motorik, Denyut Jantung, dan Mortalitas Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*) yang Terpapar Kafein secara *In Vitro*.
- PENELITI UTAMA** : dr. Yhusi Karina Riskawati, M.Sc
- ANGGOTA** : Aswaty Nur, S.Si, M.Kes
Intan Wahyu Cahyani
Naila Zahra Madina
- UNIT / LEMBAGA** : Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang.
- TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Ilmu Faal, Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang,
Ketua



Prof. Dr. dr. Moch. Istiadid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr.H.
NIK. 160746683

Catatan :

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)

Lampiran 11. Surat Keterangan Uji Plagiasi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

SURAT KETERANGAN

Nomor : 64 /UN10.F08.08/PN/2019

Berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal (BPJ) Fakultas Kedokteran menyatakan bahwa Artikel Ilmiah berikut :

Judul : Pengaruh Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum L*) Terhadap Denyut Jantung Dan Edema Perikardium Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*) Yang Terpapar Kafein Secara In Vitro

Penulis : Intan Wahyu Cahyani

NIM : 155070607111014

Jumlah Halaman : 12

Jenis Artikel : Tugas Akhir (Program Studi Sarjana Kebidanan)

Kemiripan : 5 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.



15 FEB 2019

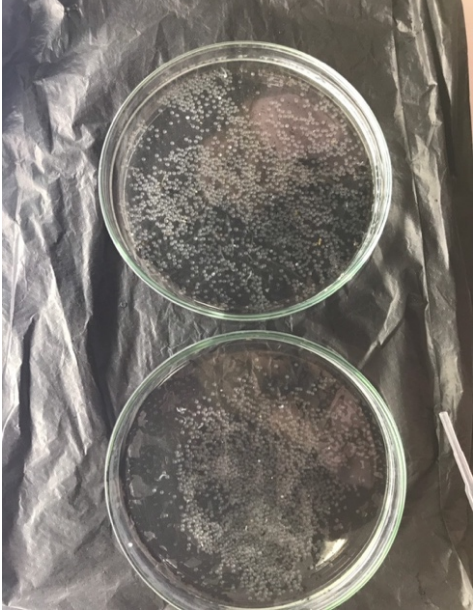
Ketua Badan Penerbitan Jurnal,



Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes
NIP. 19751125 200501 2 001

Lampiran 12. Dokumentasi Pemeliharaan Ikan dan Perlakuan

No	Nama Kegiatan	Dokumentasi
1	Pemeliharaan Ikan Zebra dan Pengawinan Ikan	
2	Pengambilan Telur	

3	Pembersihan Embrio dari Debris	
4	Pemaparan	