

**EFEK PEMBERIAN KAFEIN ASLI SELAMA KEHAMILAN TERHADAP
KEJADIAN NEURAL TUBE DEFECTS (NTD) PADA FETUS TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR *SPRAGUE DAWLEY***

(Proposal Skripsi)

**Oleh
VINCHA RAHMA LUQMAN**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

ABSTRAK

EFEK PEMBERIAN KAFEIN ASLI SELAMA KEHAMILAN TERHADAP KEJADIAN NEURAL TUBE DEFECTS (NTD) PADA FETUS TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR SPRAGUE DAWLEY

Oleh

VINCHA RAHMA LUQMAN

Latar Belakang: Kafein merupakan salah satu faktor yang menyebabkan kejadian malformasi kongenital berupa *Neural Tube Defects* (NTD). NTD adalah malformasi kongenital pada sistem saraf pusat akibat kegagalan penutupan tabung saraf. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek kafein pada berbagai dosis pemberian selama kehamilan terhadap kejadian NTD pada fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*.

Metode: Penelitian ini menggunakan 28 ekor tikus putih betina galur Sprague Dawley dengan berat badan 200-250 gram yang dibagi ke dalam empat kelompok, yaitu kontrol negatif (KN) yang tidak diberikan kafein selama kehamilan, perlakuan 1 (P1) yang diberikan kafein dengan dosis 2,55 mg selama kehamilan, perlakuan 2 (P2) yang diberikan kafein dengan dosis 5,125 mg dan perlakuan 3 (P3) yang diberikan kafein dengan dosis 7,7 mg.

Hasil Penelitian: Pada kelompok KN semua fetus normal; pada P1 semua fetus normal; pada P2 semua fetus normal; pada P3 didapatkan empat ekor fetus dengan NTD. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan didapatkan signifikansi $p=0,099$.

Kesimpulan: Tidak terdapat perbedaan efek kafein pada berbagai dosis terhadap kejadian NTD pada fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley*.

Kata kunci: Kafein, kehamilan, *neural tube defects*, tikus putih

ABSTRACT

THE EFFECTS OF ORIGINAL CAFFEINE GIVEN DURING PREGNANCY DUE TO THE INCIDENCES OF NEURAL TUBE DEFECTS (NTD) ON FETAL RATS (*Rattus norvegicus*) STRAINS SPRAGUE DAWLEY

By

VINCHA RAHMA LUQMAN

Background: Caffeine is one of the factors causing the congenital malformation in the form of *Neural Tube Defects* (NTD). NTD is congenital malformation of the central nervous system due to the failure of neural tube closure. This study aims to determine the effects of caffeine on the various doses administered during pregnancy against NTD incidence of fetal rats (*Rattus norvegicus*) strains *Sprague Dawley*.

Methods: This study used 28 white female rats (*Rattus norvegicus*) strains *Sprague Dawley* with 200-250 grams body weight which are divided into four groups: negative control (NC) were not given caffeine during pregnancy, treatment group 1 (P1) were given caffeine with a dose of 2.55 mg during pregnancy, treatment group 2 (P2) were given caffeine with a dose of 5.125 mg and treatment group 3 (P3) given caffeine at a dose of 7.7 mg.

Results: All fetal in NC groups were normal; all fetal in P1 groups were normal; some fetal in P2 groups were normal and some of them were resorption; in P3 groups obtained four fetal rats with NTD. Data were analyzed using Kruskal-Wallis non parametric test and obtained significant value of $p = 0,099$.

Conclusion: There were no differences in the effects of caffeine on the various doses against NTD incidence of fetal rats (*Rattus norvegicus*) strains *Sprague Dawley*.

Keywords: Caffeine, Neural Tube Defects, Pregnancy, Rat

**EFEK PEMBERIAN KAFEIN ASLI SELAMA KEHAMILAN TERHADAP
KEJADIAN NEURAL TUBE DEFECTS (NTD) PADA FETUS TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR SPRAGUE DAWLEY**

Oleh
VINCHA RAHMA LUQMAN

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA KEDOKTERAN
pada
Program Studi Pendidikan Dokter
Fakultas Kedokteran Universitas Lampung**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

Judul Skripsi : EFEK PEMBERIAN KAFEIN ASLI SELAMA KEHAMILAN TERHADAP KEJADIAN NEURAL TUBE DEFECTS (NTD) PADA FETUS TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR SPRAGUE DAWLEY

Nama Mahasiswa : Vincha Rahma Zugman

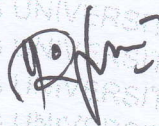
Nomor Pokok Mahasiswa : 1418011218

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Kedokteran

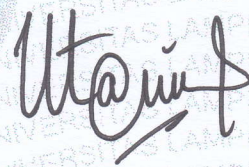
MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing



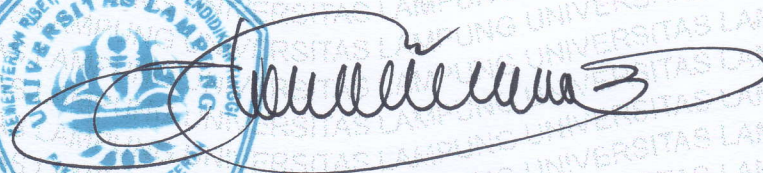
dr. Rodiani, S.Ked., M.Sc., Sp.OG.

NIP 19790419 200312 2 002



dr. Utari Gita Mutiara, S.Ked.

2. Dekan Fakultas Kedokteran



Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M.Kes., Sp.PA.

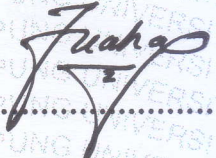
NIP 19701208 200112 1 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : dr. Rodiani, S.Ked., M.Sc., Sp.OG. 

Sekretaris : dr. Utari Gita Mutiara, S.Ked. 

**Penguji
Bukan Pembimbing : dr. Ratna Dewi Puspita S, S.Ked., Sp.OG.** 

2. Dekan Fakultas Kedokteran



Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M.Kes., Sp.PA.
NIP 19701208 200112 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 18 Desember 2017

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

1. Skripsi dengan judul "EFEK PEMBERIAN KAFEIN ASLI SELAMA KEHAMILAN TERHADAP KEJADIAN *NEURAL TUBE DEFECTS* (NTD) PADA FETUS TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR *SPRAGUE DAWLEY*" adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarism.
2. Hak intelektualitas atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

Atas pernyataan ini, apabila di kemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, 18 Desember 2017
Pembuat pernyataan,



Vincha Rahma Luqman

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bandar Lampung pada tanggal 3 November 1996, merupakan anak pertama dari dua bersaudara dari Ayahanda Denny Luqman dan Ibunda Sudarmintawati.

Pendidikan Taman Kanak-kanak diselesaikan di TK Al-Azhar 1 Bandar Lampung pada tahun 2002. Pendidikan Sekolah Dasar (SD) diselesaikan di SD Al-Azhar 1 Bandar Lampung pada tahun 2008. Sekolah Menengah Pertama diselesaikan pada tahun 2011 di SMPN 1 Bandar Lampung. Kemudian, Sekolah Menengah Atas (SMA) diselesaikan di SMAN 2 Bandar Lampung pada tahun 2014.

Pada tahun 2014, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam organisasi FSI IBNU SINA 1436H sebagai anggota. Penulis juga merupakan asisten dosen Patologi Klinik periode 2016-2017. Pada November 2017, penulis mewakili Universitas Lampung sebagai delegasi GIMSCO di Universitas Gadjah Mada.

Bismillahirrohmannirrohim

“Sebuah persembahan sederhana dari anakmu tercinta untukmu. Yang dibesarkan dengan kasih dan sayangmu. Aku bersyukur kepada Allah SWT telah dititipkan kepadamu. Orang tua yang tak pernah berhenti berdoa dan melakukan yang terbaik untuk anak-anaknya. Terimakasih Ayahku, Ibuku.”

“Dan sesungguhnya yang kemudian itu lebih baik bagimu, daripada yang permulaan”
(Q.S. Ad-Duha [93]:4)

SANWACANA

Segala puji hanya untuk Allah *subhannahuwata'ala*, karena atas rahmat dan hidayah-Nya skripsi ini dapat diselesaikan. Sholawat serta salam semoga selalu tercurahkan kepada nabi Muhammad *shalallahualaihiwassalam*.

Skripsi ini berjudul “EFEK PEMBERIAN KAFEIN ASLI SELAMA KEHAMILAN TERHADAP KEJADIAN *NEURAL TUBE DEFECTS* (NTD) PADA FETUS TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR *SPRAGUE DAWLEY*” adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Kedokteran di Universitas Lampung.

Dalam kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Hasriadi Mat Akin, M.P., selaku Rektor Universitas Lampung.
2. Dr. dr. Muhartono, M.Kes., Sp. PA. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
3. dr. Rodiani, M.Sc, Sp.OG selaku Pembimbing Satu yang telah bersedia meluangkan waktu, memberikan bimbingan, kritik, saran dan nasihat yang bermanfaat dalam penelitian skripsi ini;
4. dr. Utari Gita Mutiara, S. Ked selaku Pembimbing Kedua yang telah bersedia meluangkan waktu, memberikan masukan, kritik, saran dan nasihat bermanfaat dalam penyelesaian skripsi ini;

5. dr. Ratna Dewi Puspita Sari, Sp. OG selaku Pembahas skripsi yang bersedia meluangkan waktu dan kesediannya untuk memberikan kritik, saran dan nasihat yang bermanfaat dalam proses penyelesaian skripsi ini;
6. dr. Oktafany, S. Ked, M. Pd. Ked selaku Pembimbing Akademik saya atas waktu dan bimbingannya;
7. Ayahanda Denny Luqman dan ibunda Sudarmintawati terimakasih atas doa, kasih sayang, nasihat serta bimbingan yang telah diberikan untukku, serta selalu mengingatkan untuk selalu mengingat Allah *subhannahuwata'ala*. Semoga Allah *subhannahuwata'ala* selalu melindungi dan member pertolongan;
8. Saudara kandung saya, Dinda Tiara Luqman yang senantiasa memberikan semangat dan doanya untukku dalam mengejar cita-cita;
9. Seluruh Staf Dosen FK Unila atas ilmu yang telah diberikan kepada penulis untuk menambah wawasan yang menjadi landasan untuk mencapai cita – cita;
10. Seluruh Staf Tata Usaha, Administrasi, Akademik, pegawai dan karyawan FK Unila;
11. Dua sahabat saya (Niken Rahmatia dan Vonisya Mutia) yang setia menemani dan selalu membantu saya di saat- saat sulit;
12. Tim Penelitian saya (Muhammad Muhlis Rizky) atas kerjasamanya dalam melakukan penelitian ini;
13. Teman – teman sejawat angkatan 2014 (CRAN14L) yang tidak bias disebutkan satu persatu

Akhir kata, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Akan tetapi, semoga skripsi yang sederhana ini dapat bermanfaat dan berguna bagi kita semua. Aamiin

Bandar Lampung, 18 Desember 2017

Penulis

Vincha Rahma Luqman

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.3.1. Tujuan Umum	5
1.3.2. Tujuan Khusus.....	5
1.4. Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	7
2.1.1. Taksonomi Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	7
2.1.2. Biologi Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	8
2.1.3. Kehamilan Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	9
2.1.4. Embriologi Tikus.....	13
2.1.5. Gambaran NTD pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	16
2.2. Kafein.....	16
2.2.1. Definisi	17
2.2.2. Farmakokinetik.....	17
2.2.3. Farmakodinamik.....	18
2.2.4. Dosis Kafein.....	20
2.2.5. Makanan dan minuman yang mengandung kafein.....	21
2.3. Neural Tube Defects (NTD)	21
2.3.1. Neurulasi	21
2.3.2. Definisi <i>Neural Tube Defects</i> (NTD)	23
2.3.3. Faktor Resiko <i>Neural Tube Defects</i> (NTD)	24

2.3.4. Patogenesis <i>Neural Tube Defects</i> (NTD).....	25
2.3.5. Klasifikasi dan Manifestasi <i>Neural Tube Defects</i> (NTD).....	27
2.3.6. Diagnosis <i>Neural Tube Defects</i> (NTD).....	30
2.3.7. Tatalaksana <i>Neural Tube Defects</i> (NTD).....	31
2.4. Hubungan Kafein dengan NTD	32
2.5. Kerangka Teori	35
2.6. Kerangka Konsep.....	36
2.7. Hipotesis	36
BAB III METODE PENELITIAN	37
3.1. Desain Penelitian	37
3.2. Waktu dan Lokasi Penelitian	37
3.3. Populasi dan Sampel Penelitian	38
3.3.1. Populasi Penelitian	38
3.3.2. Kriteria Inklusi	38
3.3.3. Kriteria Eksklusi.....	38
3.3.4. Besar Sampel Penelitian.....	39
3.3.5. Teknik Sampling	40
3.3.6. Kelompok Perlakuan	40
3.4. Alat dan Bahan Penelitian.....	41
3.4.1. Alat Penelitian	41
3.4.2. Alat untuk Nekropsi	41
3.4.3. Bahan Penelitian.....	42
3.5. Prosedur Penelitian	43
3.5.1. Ethical Clearance.....	43
3.5.2. Pengadaan Hewan Coba.....	43
3.5.3. Prosedur Aklimatisasi dan Pemeliharaan Tikus.....	43
3.5.4. Prosedur Perkawinan Tikus.....	44
3.5.5. Penetapan Dosis Kafein pada hewan coba.....	44
3.5.6. Prosedur Perlakuan.....	47
3.5.7. Terminasi Kehamilan dengan Nekropsi.....	47
3.5.8. Observasi Kelainan	48
3.6. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel.....	48
3.6.1. Identifikasi Variabel.....	48
3.6.2. Definisi Operasional Variabel.....	49
3.7. Pengolahan dan Analisis Data	50
3.7.1. Pengolahan Data.....	50
3.7.2. Analisis Data	50
3.7.3. <i>Dummy Table</i>	51
3.8. Diagram Alur Penelitian	52

BAB IV PEMBAHASAN.....	53
4.1 Hasil Penelitian	53
4.2 Pembahasan.....	55
BAB V SIMPULAN DAN SARAN.....	60
5.1 Simpulan	60
5.2 Saran	60
DAFTAR PUSTAKA	61

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Biologis Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) (Patrick Sharp & Villano, 2012; Smith JB & Mangkoewidjojo S, 1998).....	9
2. Embriologi Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) (Witschi & Dittmer, 1962)	13
3. Total Kafein dalam Makanan dan Minuman (<i>The American College of Obstetricians and Gynecologists</i> , 2010)	21
4. Definisi Operasional Variabel.....	49
5. Rerata Jumlah Fetus Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	51
6. Rerata Jumlah Kejadian NTD Fetus Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	51
7. Rerata Jumlah Fetus Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	53
8. Rerata Jumlah Kejadian NTD Fetus Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Apusan Vagina Setelah Kopulasi (Anggadiredja <i>et al</i> , 2006)	12
2. (3A) Gambaran Tikus Normal; (3B) Gambaran Spina Bifida Aperta pada Tikus (Ma Y <i>et al</i> , 2012)	16
3. Kerangka Teori (Lazareff, 2011; Schmidt <i>et al</i> , 2010; Cavalli <i>et al</i> , 2011; Golalipour <i>et al</i> , 2014)	35
4. Kerangka Konsep	36
5. Diagram Alur Penelitian.....	52

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kafein merupakan zat aktif yang paling sering dikonsumsi di dunia (Kuczkowski, 2009). Indonesia memiliki nilai konsumsi kafein yang masih relatif rendah yaitu sebesar 0,5 kg per kapita, namun Indonesia adalah salah satu negara produsen dan eksportir kopi paling besar di dunia (USDA, 2013). Kafein merupakan *xanthine alkaloid* yang ditemukan di dalam kopi, teh, kakao, minuman energi, beberapa minuman ringan dan obat-obatan (Marceau *et al*, 2015). Kafein merupakan salah satu faktor yang menyebabkan kejadian malformasi kongenital (Grosso *et al*, 2001; Schmidt *et al*, 2009; Ma *et al*, 2014).

Sebagian besar ibu hamil mengkonsumsi kafein setiap hari pada masa kehamilannya. Dari hasil wawancara 10 orang ibu hamil tentang persepsi kopi di Jawa Timur ternyata semua ibu hamil masih mengkonsumsi kopi setiap hari tanpa memperhatikan banyaknya kopi yang dikonsumsi (Wijayanto *et al*, 2007). Kafein diserap oleh saluran pencernaan dan mencapai hampir semua jaringan tubuh dalam waktu 45 menit. Pada wanita dewasa yang sehat, waktu paruh kafein adalah sekitar 2 sampai 6 jam dan

dapat meningkat sampai 11 jam pada mereka yang menggunakan kontrasepsi oral atau pada mereka yang sedang hamil (Marceau *et al*, 2015).

Penurunan klirens kafein pada ibu selama kehamilan menyebabkan kafein melewati barier plasenta (Pei *et al*, 2015). Kafein melewati barier plasenta secara bebas dan janin tidak dapat menginaktivasi zat tersebut sehingga menumpuk di dalam otak janin (Sengpiel *et al*, 2013). Kafein meningkatkan pelepasan katekolamin yang memicu vasokonstriksi janin-plasenta sehingga dapat menyebabkan malformasi kongenital (Okubo H *et al*, 2015).

Malformasi kongenital terjadi pada 1-6% dari kehamilan di seluruh dunia yang menyebabkan sekitar 3,3 juta kematian per tahun pada anak-anak berusia di bawah lima tahun (Glinianaia *et al*, 2017). Setiap tahun diperkirakan 303.000 bayi baru lahir meninggal dalam waktu empat minggu disebabkan karena malformasi kongenital (WHO, 2016). Di Indonesia, 1,4% bayi baru lahir usia 0-6 hari pertama kelahiran dan 18,1% bayi baru lahir usia 7-28 hari meninggal disebabkan karena malformasi kongenital (Risikesdas, 2007).

Malformasi kongenital merupakan gangguan struktural, fungsional dan metabolik yang disebabkan oleh kegagalan atau ketidaksempurnaan dari satu atau lebih proses embryogenesis pada saat kehamilan (Pei *et al*, 2015). Beberapa contoh malformasi kongenital yaitu bibir sumbing, *stenosis pylorus*, spina bifida, defek sekat jantung dan *Neural Tube Defects* (NTD) (Cunningham FG *et al*, 2014).

NTD merupakan malformasi kongenital yang paling umum kedua di dunia setelah malformasi jantung (Cunningham FG *et al*, 2014). NTD terdiri dari beberapa malformasi kongenital yaitu spina bifida, anensefalus dan ensefalokel yang timbul selama proses neurulasi antara minggu ketiga dan keempat kehamilan manusia. NTD disebabkan oleh kegagalan parsial atau lengkap fusi tengkorak dan tulang belakang dari tabung saraf selama embriogenesis awal (Golalipour *et al*, 2014).

Gangguan multifaktorial pada saat neurulasi embrio telah diidentifikasi sebagai penyebab NTD. Faktor yang dapat mengganggu proses neurulasi embrio yaitu kondisi geografis, ras/etnis, jenis kelamin bayi yang baru lahir, diet rendah kalori, konsumsi alkohol, kurangnya suplemen folat pada saat kehamilan, penggunaan kontrasepsi, rokok dan asupan kafein yang tinggi (Golalipour *et al*, 2014). Dalam penelitian De Marco di Italia, asupan tinggi kafein, diet rendah kalori, dan konsumsi buah dan sayuran yang rendah merupakan faktor risiko spina bifida yang utama (De Marco *et al*, 2011).

Pada tahun 1985, Furuhashi *et al*. menemukan hubungan bayi dengan spina bifida dan bayi dengan anensefali pada ibu yang mengkonsumsi kopi atau teh yang berkafein selama kehamilan. Studi case control yang dilakukan oleh Fedrick *et al*. tahun 1974 menunjukkan adanya peningkatan konsumsi teh pada ibu dengan bayi yang mengalami anensefali. (Schmidt *et al*, 2009)

Schmidt *et al*. pada tahun 2009 melakukan investigasi dengan menggunakan data dari *National Birth Defects Prevention Study* (NBDPS) yang merupakan salah satu studi terbesar untuk menginvestigasi hubungan antara konsumsi

kafein dengan NTD. Data NBDPS tersebut menunjukkan *Odds Ratios* (ORs) hubungan antara konsumsi kafein maternal dengan neural tube defects dengan skala konsumsi kafein per hari yaitu tidak ada (0-9 mg), ada (≥ 10 mg), rendah (100 mg), sedang (200 mg), dan tinggi (≥ 300 mg). ORs pada konsumsi kafein rendah, sedang dan tinggi adalah >1 yang berarti konsumsi kafein maternal merupakan faktor risiko terjadinya NTD (Schmidt *et al*, 2009).

Kemudian pada analisis multivariat yang dilakukan de Marco *et al*. pada tahun 2011 menunjukkan *intake* kafein dosis tinggi (≥ 300 mg/hari) atau sama dengan ≥ 3 cangkir kopi per hari berhubungan dengan terjadinya kejadian NTD (De Marco *et al*, 2011).

Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk melihat efek pemberian kafein dengan dosis rendah (100 mg), sedang (200 mg), dan tinggi (300 mg) terhadap kejadian NTD yang akan dilakukan pada hewan percobaan. Hewan percobaan yang akan digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague-Dawley* dengan ciri-ciri berwarna putih, berkepala kecil dan ekornya yang lebih panjang daripada badannya.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka peneliti ingin melakukan penelitian yang bertujuan untuk menjawab masalah yang dirumuskan dalam pertanyaan apakah terdapat efek pemberian kafein dalam berbagai dosis pemberian selama kehamilan terhadap kejadian NTD pada fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui efek kafein pada berbagai dosis pemberian selama kehamilan terhadap kejadian NTD pada fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*.

1.3.2. Tujuan Khusus

Tujuan penelitian ini adalah

1. Mengetahui jenis NTD yang terjadi pada fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diberikan kafein dalam berbagai dosis pemberian selama kehamilan.
2. Mengetahui berapa jumlah dosis kafein selama kehamilan yang dapat menyebabkan NTD pada fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*.

1.4. Manfaat Penelitian

1. Bagi peneliti, hasil penelitian ini dapat bermanfaat untuk menambah pengetahuan tentang efek pemberian kafein dalam berbagai dosis selama kehamilan terhadap kejadian NTD dan membuktikan isu-isu yang terkait dengan pengaruh kafein terhadap kehamilan serta sebagai syarat untuk memperoleh gelar sarjana.
2. Bagi masyarakat, hasil penelitian ini dapat menambah wawasan dan informasi tentang efek konsumsi kafein dalam berbagai dosis selama

kehamilan terhadap kejadian NTD sehingga dapat menurunkan risiko kejadian NTD.

3. Bagi institusi pendidikan, sebagai wujud realisasi Tridharma Perguruan Tinggi dalam melaksanakan fungsinya sebagai lembaga yang menyelenggarakan pendidikan, penelitian dan pengabdian bagi masyarakat.
4. Bagi peneliti selanjutnya, sebagai bahan referensi untuk penelitian yang terkait.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hewan laboratorium atau hewan percobaan adalah hewan yang dipelihara dan ditenakakan untuk digunakan sebagai hewan model untuk mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu. Tikus merupakan hewan laboratorium yang banyak digunakan dalam penelitian dan percobaan untuk mempelajari embriologi, pengaruh obat-obatan, toksisitas, metabolisme serta mempelajari tingkah laku. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) berasal dari Asia Tengah dan penggunaannya sebagai tikus laboratorium telah menyebar luas di seluruh dunia (Patrick Sharp & Villano, 2012).

2.1.1. Taksonomi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Taksonomi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut (Patrick Sharp & Villano, 2012).

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mamalia

Subklas : Theria

Ordo : Rodentia
Subordo : Myomorpha
Superfamili : Muroidea
Famili : Muridae
Subfamili : Murinae
Genus : *Rattus*
Spesies : *norvegicus*

Keutamaan menggunakan tikus putih sebagai hewan percobaan laboratorium dibandingkan tikus lainnya antara lain tikus putih memiliki waktu tumbuh kembang yang cepat, siklus reproduksi yang singkat dan ukuran tubuh yang besar. Terdapat beberapa galur tikus yang sering digunakan dalam penelitian yaitu *Wistar*, *Sprague-Dawley*, *Long Evans* dan *Holdzman*. Dalam penelitian ini digunakan galur *Sprague-Dawley* dengan ciri-ciri berwarna putih, berkepala kecil dan ekornya yang lebih panjang daripada badannya (Patrick Sharp & Villano, 2012).

2.1.2. Biologi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Data biologi tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat dilihat pada Tabel 1 (Patrick Sharp & Villano, 2012; Smith JB & Mangkoewidjojo S, 1998).

Tabel 1. Biologis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Patrick Sharp & Villano, 2012; Smith JB & Mangkoewidjojo S, 1998)

Parameter	Nilai
Lama Hidup	2,5-3,5 th
Berat badan dewasa	
• Jantan	450-520 g
• Betina	250-300 g
Luas Permukaan tubuh (cm ²)	10,5
Suhu tubuh	35,9-37,5°C
Asupan Makanan (g/ 100 g BB/ hari)	5-6
Asupan Minuman (ml/ 100 g BB/ hari)	10-12
Volume Urin (ml/ 100 g BB/ hari)	5,5
Total cairan tubuh (ml)* /250 g BB	167
Cairan intraseluler (ml)* /250 g BB	74,2
Cairan ekstraseluler (ml)* /250 g BB	92,8
Perkawinan kelompok	3 betina : 1 jantan
Siklus birahi	4-5 hari
Lama bunting	20-22 hari
Jumlah anak	6-12 ekor
Umur disapih	21 hari
Umur dewasa	40-60 hari
Umur dikawinkan	
• Jantan	10 minggu
• Betina	10 minggu

2.1.3. Kehamilan Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Pada sebagian mamalia siklus reproduksi disebut dengan siklus estrus. Estrus atau birahi adalah suatu periode secara psikologis dan fisiologis yang bersedia menerima penjatan untuk berkopulasi. Periode dari permulaan periode birahi ke periode birahi berikutnya disebut dengan siklus estrus. Siklus estrus adalah siklus seksual pada mamalia bukan primata yang tidak menstruasi. Siklus estrus berkaitan dengan aktivitas hipotalamus, hipofisis dan ovarium. Terjadi berbagai perubahan pada organ reproduksi dan tingkah laku selama siklus estrus (Akbar B, 2010; Patrick Sharp & Villano, 2012).

Siklus estrus terdiri dari lima fase yaitu proestrus, estrus, metestrus I, metestrus II dan diestrus. Siklus estrus pada tikus terjadi dalam enam hari. Apus vagina merupakan salah satu cara yang dapat digunakan untuk mengetahui kegiatan fungsional ovarium. Dengan menggunakan apusan vagina, kita dapat mempelajari berbagai tingkat diferensiasi sel epitel vagina yang mencerminkan perubahan fungsional ovarium (Akbar B, 2010; Patrick Sharp & Villano, 2012).

Fase proestrus adalah fase sebelum estrus dimana masa ketika folikel ovarium tumbuh menjadi folikel *de graaf* dalam pengaruh *Follicle Stimulating Hormone* (FSH). Fase ini berlangsung selama 12 jam. Setiap folikel mengalami pertumbuhan yang cepat selama 2-3 hari sebelum estrus. Sehingga sekresi hormon estrogen dalam darah meningkat dan menimbulkan perubahan fisiologis dan psikologis pada tikus betina (Akbar B, 2010; Patrick Sharp & Villano, 2012).

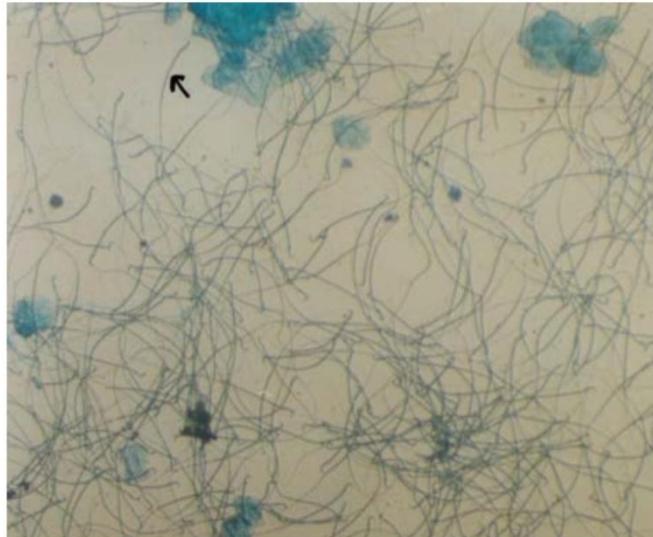
Perubahan fisiologis tersebut yaitu pertumbuhan folikel, peningkatan vaskularisasi dan keratinisasi epitel vagina serta pertumbuhan endometrium. Pada apusan vagina akan didapatkan peningkatan jumlah sel epitel berinti dan penurunan jumlah sel darah putih yang digantikan dengan sel epitel bertanduk serta terdapat peningkatan jumlah lendir (Akbar B, 2010; Patrick Sharp & Villano, 2012).

Fase estrus adalah fase yang ditandai dengan penerimaan hewan jantan oleh hewan betina untuk berkopulasi. Fase ini juga berlangsung selama 12 jam. Folikel *de graaf* membesar dan matang serta ovum mengalami kematangan. Kadar hormon estrogen meningkat dan menyebabkan peningkatan aktivitas hewan yang ditandai dengan telinga yang bergerak-gerak serta punggung lordosis. Ovulasi terjadi pada akhir siklus estrus dan hanya terjadi pada fase ini. Pada preparat apus vagina terdapat epitel bertanduk dengan bentuk tidak beraturan dan besar tanpa adanya leukosit dan epitel berinti (Akbar B, 2010).

Fase metestrus adalah fase setelah estrus. Pada fase ini korpus luteum tumbuh dari sel folikel granulosa yang telah pecah akibat pengaruh *Luteinizing Hormone* (LH). Fase metestrus dipengaruhi oleh hormon progesteron yang dihasilkan oleh korpus luteum. Pada fase ini, uterus melakukan persiapan untuk memberi dan menerima makanan pada embrio. Pada akhir fase metestrus, uterus menjadi lunak karena relaksasi dari otot uterus. Fase ini berlangsung selama 21 jam. Apusan vagina memperlihatkan epitel berinti dengan leukosit dan epitel bertanduk yang sangat sedikit (Akbar B, 2010).

Fase yang terakhir yaitu diestrus merupakan siklus terpanjang diantara siklus estrus lainnya. Fase ini berlangsung selama 48 jam. Korpus luteum menjadi lebih matang, endometrium menebal, serviks menutup, dan lendir vagina banyak dan lengket. Pada fase ini terjadi perkembangan folikel-folikel primer dan sekunder yang akan kembali

ke proestrus. Apusan vagina menunjukkan sel darah putih dan epitel berinti yang tersebar dan homogen. Tampilan apusan vagina di setiap fase estrus dapat dilihat pada Gambar 1 (Akbar B, 2010).



Gambar 1. Apusan Vagina Setelah Kopulasi
(Anggadiredja *et al*, 2006)

Kopulasi pada tikus putih ditandai dengan adanya sumbat vagina (*vagina plug*) pada liang vagina. Sumbat vagina merupakan air mani yang menggumpal dari sekret kelenjar prostat tikus jantan selama 16 sampai 48 jam. Kopulasi berlangsung pada tahap proestrus akhir. Fertilisasi adalah suatu proses penyatuan atau peleburan gamet jantan dan gamet betina sehingga terbentuk zigot (Akbar B, 2010).

Fertilisasi pada tikus akan terjadi pada 7-10 jam setelah kopulasi. Blastula akan terbentuk dalam waktu 3-4 hari. Implantasi adalah proses tertanamnya embrio mamalia pada tahap blastosis akhir di dalam endometrium uterus induk. Pada tikus, organogenesis terjadi

pada usia kehamilan 7-15 hari. Lama kehamilan tikus adalah sekitar 21-23 hari (Akbar B, 2010).

Pada keadaan stres yang ditandai dengan kerontokan bulu, penurunan berat badan, tingkah laku abnormal (agresif) dan keluar cairan dari tubuh dapat terjadi akibat faktor makanan dan minuman yang dikonsumsi, faktor genetik dan faktor lingkungan misalnya kandang yang kotor. Tikus hamil yang stres dapat mengalami perubahan hormon dan perubahan metabolisme tubuhnya (Dewi *et al*, 2016).

Pada masa kehamilan, tikus hamil akan mengalami peningkatan volume darah dan plasma serta terjadi penurunan produksi albumin. Sehingga pada tikus hamil terjadi peningkatan kadar obat dalam tubuh induk dan fetus (Dewi *et al*, 2016).

2.1.4. Embriologi Tikus

Tahapan embriologi tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat dilihat pada Tabel 2 (Witschi & Dittmer, 1962).

Tabel 2. Embriologi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Witschi & Dittmer, 1962)

Standar Tahapan (Witschi)	Usia (hari)	Ukuran (mm)	Identifikasi Tahapan
Pembelahan Blastula			
1	1	0,07	1 sel (dalam saluran telur)
2	2	0,08 x 0,06	2 sel (dalam saluran telur)
3	3	0,08 x 0,05	4 sel (dalam saluran telur)
4	3,5		8-12 sel (dalam saluran telur)
5	3,25	0,08 x 0,04	Morula (dalam rahim)
6	4	0,08 x 0,03	Blastokista awal (dalam rahim)
7	5	0,12 x 0,05	Blastokista bebas (dalam rahim)

Standar Tahapan (Witschi)	Usia (hari)	Ukuran (mm)	Identifikasi Tahapan
Gastrula			
8	6	0,28 x 0,07	Implantasi blastokista, dengan sel trofoblas dan masa sel dalam; hasil dari endoderm (hypoblast)
9	6,75		Diplo-trophoblast; massa sel dalam ditutup dengan endoderm
10	7,25	0,3 x 0,1	Menuju implantasi lengkap; mudigah berdiferensiasi ke dalam dan ke luar embrio
11	7,25	0,5 x 0,1	Implantasi komplit; terbentuk kista amnion primer; terbentuk kerucut ectoplacental
Garis Primitif			
12	8,5	1,04 x 0,26	Adanya hubungan antara rongga amnion dan ektokorionik; hilangnya lipatan amnion; muncul garis primitif; awal pembentukan 3 lapisan mudigah; lempeng jantung dan perikardium
Neurulasi			
13	9	10	Presomite neurula; fusi-lipatan dan tangkai korio-amnion; terbentuk lempeng saraf dan tunas tangkai alantois
14	9,5	1,5	Presomite neurula; fusi-lipatan dan tangkai korio-amnion; terbentuk lempeng saraf dan tunas tangkai alantois
15	10	2	Somites 5-12 (cervical); Terbentuk lengkung visceral ke-1; kista ectochorionic menyatu dengan ectoplacenta dan dengan tangkai allantoic; regresi perifer (distal) kuning telur dan trofektoderm (diplo-trophoblast); muncul membran Reichert; gonias dalam endoderm
16	10,5	2,4	Somites 13-20 (upper thoracic), terbentuk lengkungan visceral ke-2; terbentuk cakram dan kantung plasenta kuning; terbentuk lipatan apendikularis
17	11	3,3	Somites 21-25 (lower thoracic); tangkai kuning telur menutup pada tingkat somite 15; gonias utama dalam mesentrium; garis primitif

Standar Tahapan (Witschi)	Usia (hari)	Ukuran (mm)	Identifikasi Tahapan
			menghilang; kuncup ekor terlihat; kuncup lengan dan kaki tampak
Kuncup Ekor Embrio			
18	11,5	3,8	Somites 26-28 (upper lumbar), terbentuk lengkung visceral ke-3; kuncup lengan terlihat
19	11,75	4,2	Somites 29-31 (lower lumbar); muncul lengkung visceral ke-1 sampai 4, adanya lipatan cervical, lipatan apendikularis
20	11,875	5	Somites 32-33 (upper sacral)
21	12	5,1	Somites 34-35 (lower sacral); terbentuk sinus cervical dalam
22	12,125	5,2	Somites 36 (1st caudal); terbentuknya lubang hidung
23	12,25	5,6	Somites 37-38 (caudal); awal herniasi umbilikal
24	12,375	6	Somites 39-40 (caudal)
Embrio Lengkap			
25	12,5	6,2	Somites 41-42 (caudal); penyebebaran oksipital somites; lengkungan visceral ke-4 jelas; tunas lengan pada tingkat somites 8-14 sama panjang dengan tunas kaki di tingkat somites 28-31, namun lebih kecil; wajah kiri berada pada kantung kuning, sedangkan sisi kanan berbalik ke arah plasenta; ekor dan tangkai alantois terangkat ke arah plasenta
Janin			
34	17-18	16-20	Tahap janin ke-1; pertumbuhan cepat kelopak mata (mata tertutup sepenuhnya sampai akhir hari ke-18); langit-langit tertutup sempurna; pinna melapisi saluran telinga; hernia umbilikal menghilang
35 Antenatal	19-22	20-40	Tahap janin ke-2; kelopak mata tertutup; membran janin dan plasenta mencapai puncak pertumbuhan; ekor tumbuh hingga 10mm
35 Postnatal	1-16 Postpartum	4-101	Kelahiran terjadi (tikus dalam 22 hari, mencit dalam 19 hari) Setelah lahir, janin bernapas dan menyusu pada ibunya

Standar Tahapan (Witschi)	Usia (hari)	Ukuran (mm)	Identifikasi Tahapan
36 Postnatal	17 + Postpartum	100+1	selama 16 hari pertama, kelopak mata tetap tertutup dan saluran telinga eksternal tertutup dengan sekat periderm. Sekat periderm telinga dan kelopak mata lenyap; makan aktif dimulai dalam waktu berikutnya 3 hari dan menyapihnya setelah 1 minggu (total usia penyapihan, 45-48 hari untuk tikus dan mencit)

2.1.5. Gambaran NTD pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)



Gambar 2. (3A) Gambaran Tikus Normal; (3B) Gambaran Spina Bifida Aperta pada Tikus (Ma Y *et al*, 2012)

2.2. Kafein

Kafein merupakan *xanthine alkaloid* yang ditemukan di dalam kopi, teh, kakao, minuman energi, beberapa minuman ringan dan obat-obatan (Marceau *et al*, 2015). Kafein merupakan salah satu faktor yang menyebabkan kejadian malformasi kongenital (Grosso *et al*, 2001; Schmidt *et al*, 2009; Ma *et al*, 2014).

2.2.1. Definisi

Kafein (*1,3,7-trimethylxanthine*) merupakan alkaloid alami yang ditemukan pada biji kopi, daun teh, biji coklat, kacang dan tumbuhan lainnya. Kafein merupakan zat aktif yang paling banyak dikonsumsi di dunia, yang dapat ditemukan pada minuman seperti kopi, teh, minuman bersoda, minuman berenergi, dan coklat (Loomans *et al*, 2012; New Zealand Government, 2012).

2.2.2. Farmakokinetik

Kafein diabsorpsi secara cepat dari saluran pencernaan ke dalam aliran darah. Konsentrasi kafein dalam darah mencapai puncak pada 1-1,5 jam setelah dikonsumsi. Kafein dapat melewati sawar darah otak, barrier plasenta, dan kelenjar susu (Nawrot *et al*, 2003; *The American College of Obstetricians and Gynecologists*, 2010).

Hati merupakan tempat metabolisme kafein yang utama. Kafein dimetabolisme oleh enzim sitokrom P4501A2 (CYP1A2) pada reaksi aktivasi fase satu dan dimetabolisme oleh enzim *N-acetyltransferase 2* (NAT2) pada fase dua. Pada dewasa, kafein dimetabolisme menjadi *1-methylxanthine* dan *1-methyloric acid* dari *paraxanthine intermediate* (Schmidt *et al*, 2009).

Sebesar 1-5% kadar kafein ditemukan dalam urin. Eliminasi waktu paruh kafein berkisar antara 3-7 jam yang dapat dipengaruhi oleh

berbagai faktor yaitu jenis kelamin, usia, pemakaian kontrasepsi, kehamilan, dan rokok. Waktu paruh kafein 20-30% lebih lambat pada wanita dibanding pria. Waktu paruh kafein pada bayi baru lahir sekitar 50-100 jam. Selama kehamilan, waktu paruh kafein meningkat menjadi 11 jam (Nawrot *et al*, 2003; *The American College of Obstetricians and Gynecologists*, 2010).

2.2.3. Farmakodinamik

Mekanisme kafein yang paling penting adalah antagonis reseptor adenosin. Adenosin melepaskan purin yang berperan pada reseptor yang berbeda dan dapat menurunkan/meningkatkan konsentrasi *cyclic Adenosine Monophosphate* (cAMP). Kafein memiliki beberapa efek terhadap kesehatan. Berikut ini merupakan efek kafein terhadap kesehatan. (Nawrot *et al*, 2003; Yokota *et al*, 2013; Burke *et al*, 2015; Marceau *et al*, 2015).

a. Efek kardiovaskular

Kafein meningkatkan tekanan darah sistolik sebesar 5-15 mmhg dan atau tekanan darah diastolik 5-10 mmhg pada dosis >250 mg. Kafein dapat menyebabkan penyakit jantung koroner bila dikonsumsi >1000 mg/hari.

b. Efek pada tulang dan keseimbangan kalsium

Konsumsi kafein sebesar 150-300 mg setelah 10 jam meningkatkan ekskresi kalsium dalam urin 2-3 jam. Konsumsi

kafein sebesar 175 mg/hari meningkatkan ekskresi kalsium pada urin setelah 24 jam.

c. Efek pada fertilitas dan konsepsi

Konsumsi kafein berhubungan dengan perubahan kadar hormon, endometriosis, dan penurunan fertilisasi ovum. Pada penelitian epidemiologi tentang hubungan kafein dengan lama konsepsi didapatkan tidak terdapatnya hubungan keterlambatan konsepsi pada wanita yang mengonsumsi kafein >700 mg/hari, namun Christianson *et al.* pada penelitiannya menyatakan konsumsi kafein berhubungan dengan kesulitan wanita untuk hamil.

d. Aborsi spontan

Pada studi meta-analisis yang dilakukan oleh Fernandes *et al.* terhadap 42.988 kehamilan, menunjukkan hubungan antara aborsi spontan dengan konsumsi kafein >150 mg/hari.

e. Efek pada perkembangan dan pertumbuhan fetus

Beberapa penelitian menyatakan bahwa ibu yang mengonsumsi kafein selama kehamilan sebesar 400, 500 dan >800 mg/hari berisiko melahirkan bayi dengan berat badan rendah.

f. Malformasi kongenital

Johansen *et al.* (2009) menyatakan bahwa terdapat hubungan antara konsumsi kafein pada trimester pertama kehamilan dengan kejadian malformitas kongenital yaitu bibir sumbing. Kemudian Marceau *et al.* (2015) menyatakan pada penelitiannya terdapat

hubungan antara konsumsi kafein selama kehamilan dengan kejadian *Limb Deficiencies* (LD).

2.2.4. Dosis Kafein

Dosis rata-rata kafein yang dapat dikonsumsi oleh manusia adalah sekitar 250 mg/hari. Sedangkan selama kehamilan *World Health Organization* (WHO) merekomendasikan asupan kafein di bawah 300 mg/hari. *The American College of Obstetricians and Gynecologists and the Norwegian Food Safety Authority* dan *Nordic Nutrition Recommendations* (NNR) merekomendasikan asupan kafein maksimum adalah 200 mg/hari selama kehamilan. Dosis letal kafein pada manusia adalah 10 g/hari. Kematian telah dilaporkan akibat konsumsi 6,5 g kafein namun konsumsi 24 g kafein dilaporkan tidak menimbulkan kematian (Nawrot *et al*, 2003; Marceau *et al*, 2015).

Toksisitas kafein pada dewasa dapat menimbulkan gejala yaitu insomnia, gangguan sensoris, diuresis, aritmia, takikardi, gangguan pernapasan dan pencernaan. Toksisitas kafein pada anak dapat menimbulkan gejala emesis, takikardi dan diuresis berkepanjangan. Konsumsi kafein berkepanjangan dapat menimbulkan gangguan sistem pencernaan, ginjal dan otot. Konsumsi kafein >500-600 mg dapat menyebabkan kafeinisme. Kafeinisme merupakan sindrom yang berupa tremor, insomnia, diuresis, tinitus, takikardi, aritmia, dan diare. Konsumsi kafein >400 mg dapat menyebabkan ketidakstabilan otot detrusor pada wanita (Nawrot *et al*, 2003).

2.2.5. Makanan dan minuman yang mengandung kafein

Kandungan kafein pada beberapa makanan dan minuman dapat dilihat pada Tabel 3 (*The American College of Obstetricians and Gynecologists*, 2010).

Tabel 3. Total Kafein dalam Makanan dan Minuman (*The American College of Obstetricians and Gynecologists*, 2010)

Makanan dan Minuman	Total Kafein (mg)
Kopi (224 gr)	
• Seduhan	137
• Instan	76
Teh (224 gr)	
• Seduhan	48
• Instan	26-36
Minuman berkafein (336 gr)	37
Coklat panas (336 gr)	8-12
Coklat susu (224 gr)	5-8

2.3. Neural Tube Defects (NTD)

NTD merupakan malformasi kongenital yang terdiri dari spina bifida, anensefalus, dan ensefalokel yang timbul selama proses neurulasi antara minggu ketiga dan keempat kehamilan manusia (De Marco *et al*, 2011).

2.3.1. Neurulasi

Neurulasi adalah proses terbentuknya tabung saraf oleh lempeng saraf. Neurulasi memiliki dua tahap yaitu neurulasi primer dan sekunder. Neurulasi primer merupakan proses pembentukan otak dan sumsum tulang belakang sampai tingkat sakral bagian atas. Neurulasi primer dibagi menjadi empat tahap yaitu pembentukan lempeng saraf, terbentuknya lempeng saraf, pelipatan lempeng saraf, dan penutupan

garis saraf. Pada neurulasi sekunder terbentuk segmen yang lebih rendah yaitu sakral dan segmen *coccygeal* (Sadler, 2012; Lazareff, 2011).

Pada akhir minggu ketiga, tepi lateral lempeng saraf membentuk lipatan saraf (*neural fold*) dan regio tengah yang cekung membentuk alur saraf (*neural groove*). Lipatan saraf secara bertahap mendekati satu sama lain di garis tengah dimana lipatan saraf menyatu. Penyatuan lipatan saraf dimulai dari regio servikal dan berlanjut ke kranial dan kaudal. Penyatuan tersebut membentuk tabung saraf (Sadler, 2012; Lazareff, 2011).

Ujung sefalik dan kaudal tabung saraf berhubungan dengan rongga amnion melalui neuroporus anterior (kranial) dan neuroporus posterior (kaudal). Penutupan neuroporus kranial terjadi pada hari ke-25, sedangkan neuroporus kaudal menutup pada hari ke-28. Setelah proses neurulasi selesai, sistem saraf memiliki struktur tubular tertutup dengan bagian kaudal yang menyempit, korda spinalis, dan vesikel otak (Sadler, 2012; Lazareff, 2011).

NTD terjadi akibat kegagalan penutupan tabung saraf. Jika tabung saraf gagal menutup di regio kranial maka sebagian besar otak gagal terbentuk, kejadian ini disebut dengan anensefali. Kegagalan penutupan tabung yang terjadi pada region servikal dan kaudal disebut spina bifida. Spina bifida paling sering terjadi pada region

lumbosakral, yang berarti penutupan regio ini lebih rentan terhadap faktor genetik dan/atau lingkungan (Sadler, 2012).

2.3.2. Definisi *Neural Tube Defects* (NTD)

NTD adalah malformasi kongenital pada sistem saraf pusat akibat kegagalan penutupan tabung saraf. NTD merupakan malformasi kongenital yang paling umum terjadi. Tiga ratus ribu bayi baru lahir disertai NTD setiap tahunnya. Tabung saraf merupakan struktur primordial dari sistem saraf pusat. Otak dan sumsum tulang belakang berkembang dari tabung saraf yang dipengaruhi oleh gen dan lingkungan (Lazareff, 2011).

Kegagalan penutupan tabung saraf biasanya terjadi pada hari ke-18 dan ke-28 pada masa konsepsi. Hal ini dapat terjadi di sepanjang struktur sesuai dengan lokasi pembukaan. Jika tabung saraf gagal menutup di regio kranial maka sebagian besar otak gagal terbentuk, kejadian ini disebut dengan anensefalus. Kegagalan penutupan tabung yang terjadi pada region servikal dan kaudal disebut spina bifida. Spina bifida paling sering terjadi pada region lumbosakral yang berarti penutupan regio ini lebih rentan terhadap faktor genetik dan/atau lingkungan (Lazareff, 2011).

2.3.3. Faktor Resiko *Neural Tube Defects* (NTD)

Faktor yang dapat mengganggu proses pembentukan tabung saraf pada masa embriologi yaitu defisiensi asam folat, diabetes maternal, obat antiepilepsi, dan faktor risiko maternal. Asam folat diubah menjadi *tetrahydrofolate* (THF) dan kemudian menjadi *5-methyltetrahydrofolate* (5-MeTHF) *glutamate* yang dibawa ke aliran darah (Lazareff, 2011).

Di dalam sel, folat merupakan akseptor dan donor dari satu unit karbon dan terlibat dalam metilasi DNA, protein dan lipid. Jika terjadi defisiensi 5-MeTHF dan vitamin B12 maka homosistein akan terakumulasi di dalam sel. Hal ini akan mengakibatkan peningkatan *S-adenosylhomocysteine* yang akan menyebabkan disregulasi ekspresi gen untuk metabolisme lemak dan protein. Metabolisme lemak dan protein yang terganggu akan mengakibatkan terganggunya fungsi sel dan meningkatkan risiko NTD (Lazareff, 2011).

Diabetes maternal menjadi penyebab kedua terjadinya NTD setelah defisiensi asam folat. Beberapa penelitian menunjukkan hubungan yang kuat antara diabetes dengan kejadian NTD. Terdapat juga peningkatan risiko kelainan kongenital termasuk NTD pada bayi dari ibu yang mengonsumsi obat antiepilepsi seperti valproat dan carbamazepine (Lazareff, 2011).

Faktor risiko maternal yang meningkatkan kejadian NTD yaitu usia ibu, paritas, obesitas, teratogen, hipertermia dan pekerjaan. Kejadian NTD meningkat pada bayi dari ibu dengan tiga paritas atau lebih. NTD juga lebih sering terjadi pada bayi dari ibu yang memiliki Indeks Masa Tubuh (IMT) > 29. Risiko NTD meningkat dua kali lipat pada ibu dengan berat 80-89 kg, empat kali lipat pada ibu dengan berat 110 kg dibandingkan ibu dengan berat 50-59 kg (Lazareff 2011; Kondo *et al*, 2009).

Konsumsi alkohol, kafein dan rokok berpotensi sebagai teratogen yang berpotensi meningkatkan kejadian NTD (Lazareff, 2011). Beberapa penelitian menyatakan bahwa hipertermia memiliki efek teratogen pada embrio. Peningkatan suhu tubuh mengganggu proliferasi sel, migrasi, diferensiasi dan apoptosis. Beberapa eksperimen yang dilakukan pada embrio mencit, tikus, dan babi mengindikasikan bahwa NTD sensitif terhadap stres panas. Pekerjaan ibu yang menjadi faktor risiko terjadinya NTD adalah tenaga medis, petani, tukang las dan pekerjaan yang berhubungan dengan kerja fisik berat misalnya pengangkut beban berat (Mohd-Zin *et al*, 2016; Lazareff, 2011).

2.3.4. Patogenesis *Neural Tube Defects* (NTD)

NTD disebabkan oleh kegagalan penutupan tabung saraf pada proses neurulasi. Neurulasi atau pembentukan tabung saraf dibagi menjadi dua fase yaitu fase primer dan sekunder. Pada neurulasi primer terjadi

penutupan tabung saraf sedangkan neurulasi sekunder terjadi proses kanalisasi saraf. NTD dapat terjadi akibat kegagalan penutupan tabung saraf pada proses neurulasi primer. Neurulasi sekunder terjadi setelah neurulasi primer selesai (Copp *et al*, 2013)

Pada awal neurulasi, embrio mengalami pemanjangan dan penyempitan lempeng saraf yang dipengaruhi oleh perpindahan sel yang disebut gerakan sel ekstensi konvergen. Pergerakan ini diatur oleh gen polaritas sel planar (PCP) yang diduga memiliki keterlibatan dengan NTD. Mutasi pada gen PCP dengan protein transmembran *Vangl2*, *Celsr1*, *Ptk7* dan *Fzd3* menyebabkan kegagalan penutupan tabung saraf beserta sebagian sumbu tubuh (Copp *et al*, 2013).

Pada neurulasi sekunder terjadi pembentukan tabung saraf pada regio sakral dan *coccygeal*. Bagian kaudal embrio terdiri dari kuncup ekor yang mengandung sel induk yang dapat memperbarui diri. Bagian tabung saraf yang paling dorsal mengalami kanalisasi sehingga tabung saraf menjadi berongga. Hal ini menyebabkan peningkatan populasi sel stem yang dapat memperbarui diri dan meningkatkan pertumbuhan semua jaringan *non-epidermal* yaitu pada tabung saraf dan vertebra. Akibatnya, malformasi dan tumor pada regio sakral dan *coccygeal* terdiri dari beberapa jenis jaringan (Copp *et al*, 2013).

2.3.5. Klasifikasi dan Manifestasi *Neural Tube Defects* (NTD)

NTD merupakan salah satu bentuk dari disrafisme sistem saraf, yaitu kelainan akibat gangguan penutupan tabung saraf. Pada (Satyanegara, 2010; Sjamsuhidajat R & Jong W de, 2010), NTD digolongkan menjadi dua golongan yaitu:

1. Disrafia kranial

Disrafia kranial terdiri dari meningokel dan ensefalokel. Meningokel merupakan benjolan yang berisi selaput meninges dan cairan serebrospinal, sedangkan ensefalokel merupakan benjolan yang berisi jaringan otak. Meningokel dan ensefalokel sering ditemui di negara Asia Tenggara, seperti Indonesia, Malaysia, Thailand, dan Birma. Di negara Barat, disrafia kranial jenis lumbosakral lebih sering terjadi. Sedangkan di Indonesia, disrafia kranial yang paling sering terjadi adalah jenis sinsipital (Satyanegara, 2010; Sjamsuhidajat R & Jong W de, 2010).

Meningokel atau ensefalokel sinsipital di daerah naso fronto etmoidal akan mempengaruhi pertumbuhan tengkorak sehingga jarak antara orbita melebar. Kelainan bawaan lain yang sering menyertai meningokel dan ensefalokel adalah hidrosefalus. Jaringan otak yang ada di dalam ensefalokel mengalami gliosis sehingga tidak berfungsi lagi. Namun pada defek yang lebih besar, jaringan otak tersebut mungkin masih dapat berfungsi (Satyanegara, 2010; Sjamsuhidajat R & Jong W de, 2010).

Manifestasi klinis pada disrafia kranial yaitu terdapat benjolan sejak lahir yang terletak di garis tengah dan ukurannya semakin membesar. Konsistensi defek bergantung pada isinya yaitu jika terdapat banyak cairan maka benjolan teraba padat dan berdungkul. Benjolan berubungan dengan rongga intrakranial sehingga teraba kempes apabila ditekan dan tegang apabila bayi menangis. Meningo-ensefalokel sissnipital harus dibedakan dengan benjolan pada pangkal hidung atau sisi medial orbita, seperti kista aterom, kista dermoid, lipoma, atau kista lakrimal (Satyanegara, 2010; Sjamsuhidajat R & Jong W de, 2010).

2. Disrafia spinal

Disrafia spinal merupakan salah satu kelainan kongenital yang terjadi pada saat pembentukan sistem saraf pada trimester pertama kehamilan. Disrafia yang terjadi pada tulang belakang atau medula spinalis disebut sebagai spina bifida. Berdasarkan (Satyanegara, 2010), spina bifida terbagi atas:

a. Spina bifida aperta

Aperta berarti terbuka. Defek pada kulit, tulang, selaput otak dan jaringan saraf bersifat terbuka sehingga lesi terpapar secara langsung dengan dunia luar. Bentuk kelainan yang paling umum dijumpai adalah mielomeningokel atau spina bifida sistika. Spina bifida sistika merupakan spina bifida aperta yang memiliki selaput tipis. Spina bifida sistika ditandai dengan menonjolnya meninges melalui lengkung vertebra dan kulit

sehingga membentuk sebuah kantong mirip kista. Spina bifida sistika terletak di daerah lumbosakral dan mengakibatkan gangguan neurologis, tetapi biasanya tidak disertai dengan keterbelakangan mental.

b. Spina bifida okulta

Spina bifida okulta merupakan defek vertebra tertutup tanpa adanya hubungan kelainan meninges dengan dunia luar. Spina bifida okulta merupakan defek yang lengkung vertebranya tidak mengenai jaringan saraf di bawahnya dan terjadi di daerah lumbosakral (L4-S1). Defek tersebut tertutup oleh stuktur kulit yang intak. Spina bifida okulta jenis simpel merupakan kegagalan terbentuknya prosesus spinosus dan lamina. Manifestasi klinis dari defek ini adalah ditemukannya sejumput rambut pada kutaneus pada saat dipalpasi dan angioma kapiler.

Lipomielomeningoel, fibrolipoma filum terminale, kista inklusi (dermoid dan epidermoid), sinus dermal, dan *split cord malformation*, lipomma spinal, diastematomielia, dan meningoel sakral anterior merupakan spina bifida okulta. Lesi ini dapat ditemukan pada saat baru lahir atau beberapa tahun setelah lahir akibat *tethered cord syndrome* yaitu sindrom medula spinalis terlambat (Satyanegara, 2010).

Manifestasi klinis pada spina bifida dapat berupa kelainan kulit, ortopedi, neurologi dan urologi. Kelainan kulit dapat berupa

lipoma, hemangioma, dimple dan hipertrikosis. Kelainan ortopedi dapat berupa kifosis, skoliosis, deformitas panggul dan kaki. Kelainan neurologis yaitu kelemahan hingga kelumpuhan tungkai bawah dan gangguan sensoris atau perabaan (Satyanegara, 2010; Sjamsuhidajat R & Jong W de, 2010).

Manifestasi gangguan urologi yaitu berupa retensi urin, inkontinensia, infeksi saluran kemih. Retensi urin tersebut bila berlanjut dapat menyebabkan hidroureter, nefrosis dan gagal ginjal (Satyanegara, 2010; Sjamsuhidajat R & Jong W de, 2010).

2.3.6. Diagnosis *Neural Tube Defects* (NTD)

NTD dapat dideteksi dengan pemeriksaan *Alfa Feto Protein* (AFP) pada cairan amnion atau AFP yang diperiksa dari darah ibu hamil. AFP merupakan protein serum utama yang terdapat pada awal kehidupan embrio. AFP mencegah rejeksi oleh imun fetal. AFP terdapat pada yolk sac dan sistem gastrointestinal serta ada hepar fetus (Ernawati, 2011).

AFP didistribusikan melalui sirkulasi darah fetus menuju traktus urinarius kemudian diekskresikan ke dalam cairan amnion. AFP dapat bocor ke dalam cairan amnion bila terdapat NTD. NTD menyebabkan sirkulasi darah fetus berhubungan langsung dengan cairan amnion.

Pemeriksaan serum AFP pada ibu hamil yaitu antara minggu ke-15 dan ke-18 kehamilan (Ernawati, 2011).

Seseorang dikatakan berisiko didasarkan pada perbandingan usia kehamilan dan kadar AFP. Konsentrasi AFP serum ibu hamil pada usia kehamilan 20 minggu lebih dari 1000 ng/mL mempunyai indikasi terjadinya NTD. Kadar AFP serum normal pada ibu hamil lebih rendah dari 500 ng/mL. Kadar AFP mempunyai hubungan dengan usia kehamilan dan dapat meningkat pada kehamilan 12-15 minggu sehingga penentuan ketepatan usia kehamilan sangat penting (Ernawati, 2011).

Pemeriksaan AFP melalui cairan amnion merupakan pemeriksaan yang akurat, terutama pada usia kehamilan 15-20 minggu dan dapat mendeteksi kurang lebih 98% pada semua NTD yang terbuka. NTD juga dapat dideteksi dengan pemeriksaan penunjang lainnya yaitu USG, CT *scan*, dan biopsi histopatologi (Ernawati, 2011).

2.3.7. Tatalaksana *Neural Tube Defects* (NTD)

Tatalaksana pada disrafia kranial yaitu dilakukan pembedahan kosmetik sebagai upaya untuk mencegah infeksi pada meningokel-ensefalokel yang mudah pecah atau yang sudah pecah. Pembedahan dapat dilakukan dengan cara ekstrakranial dan transkranial. Pembedahan ekstrakranial lebih mudah dikerjakan dibandingkan cara

transkraniial. Pembedahan dapat dilakukan sedini mungkin untuk mencegah pecahnya meningokel semakin membesar (Sjamsuhidajat R & Jong W de, 2010).

Pada disrafia spinal, tindakan pertama yang dilakukan adalah memperbaiki keadaan umum dan mencegah pecahnya meningomielokel. Apabila mielomeningokel pecah maka penutupan defek harus segera dilakukan. Pembedahan dapat ditunda sampai 5-6 bulan pada defek yang masih utuh atau belum pecah. Perawatan keadaan umum bayi dilakukan untuk mencegah trauma dan kontaminasi pada benjolan. Bayi dapat ditelungkupkan dan benjolan ditutup dengan menggunakan kasa steril yang dibasahi dengan larutan garam fisiologis (Sjamsuhidajat R & Jong W de, 2010).

2.4. Hubungan Kafein dengan NTD

Kafein merupakan zat aktif yang paling banyak dikonsumsi di dunia. Kafein ditemukan pada kopi, teh, soda, minuman berenergi dan coklat. Kafein diabsorpsi di saluran pencernaan dan mencapai ke semua jaringan tubuh dalam 45 menit. Pada ibu hamil, waktu paruh kafein meningkat yaitu menjadi 11 jam. Kafein dapat melewati barrier plasenta dan tidak terdapat enzim yang memetabolisme kafein pada fetus (Marceau *et al*, 2015).

Pada penelitian De Marco di Italia menyatakan bahwa konsumsi kafein yang tinggi, diet rendah kalori, kurangnya konsumsi buah dan sayuran merupakan faktor terjadinya spina bifida. Kemudian Golalipour *et al*. pada tahun 2014

menyatakan dalam penelitiannya bahwa kejadian NTD dipengaruhi oleh kondisi geografis, ras/etnik, jenis kelamin, konsumsi kafein yang tinggi, konsumsi alkohol, rendahnya suplementasi folat, dan penggunaan kontrasepsi (Golalipour *et al*, 2014).

Pada tahun 1985, Furuhashi *et al*. menemukan hubungan bayi dengan spina bifida dan bayi dengan anensefali pada ibu yang mengkonsumsi kopi atau teh yang berkafein selama kehamilan. Studi case control yang dilakukan oleh Fedrick *et al*. tahun 1974 menunjukkan adanya peningkatan konsumsi teh pada ibu dengan bayi yang mengalami anensefali. (Schmidt *et al*, 2009)

Schmidt *et al*. pada tahun 2009 melakukan investigasi dengan menggunakan data dari *National Birth Defects Prevention Study* (NBDPS) yang merupakan salah satu studi terbesar untuk menginvestigasi hubungan antara konsumsi kafein dengan NTD. Data NBDPS tersebut menunjukkan *Odds Ratios* (ORs) hubungan antara konsumsi kafein maternal dengan neural tube defects dengan skala konsumsi kafein per hari yaitu tidak ada (0-9 mg), ada (≥ 10 mg), rendah (100 mg), sedang (200 mg), dan tinggi (≥ 300 mg). ORs pada konsumsi kafein rendah, sedang dan tinggi adalah >1 yang berarti konsumsi kafein maternal merupakan faktor risiko terjadinya NTD (Schmidt *et al*, 2009).

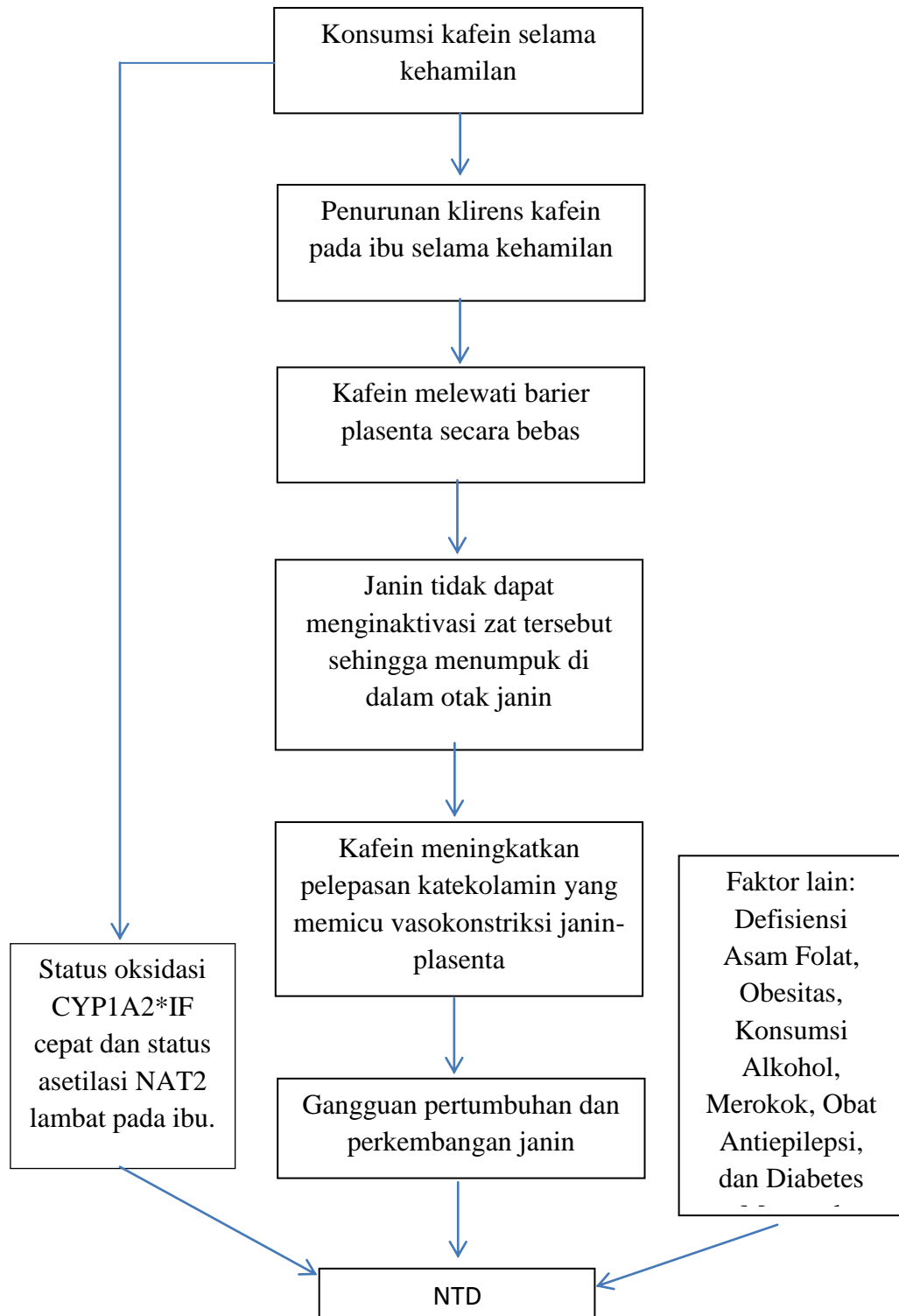
Kemudian pada analisis multivariat yang dilakukan De Marco *et al*. pada tahun 2011 menunjukkan *intake* kafein dosis tinggi (≥ 300 mg/hari) atau sama dengan ≥ 3 cangkir kopi per hari berhubungan dengan terjadinya kejadian NTD (De Marco *et al*, 2011).

Mekanisme kafein dalam kejadian NTD belum dapat dipastikan. Namun, pada beberapa penelitian telah menjelaskan bagaimana kafein menyebabkan NTD. Kafein dimetabolisme oleh enzim sitokrom P4501A2 (CYP1A2) pada reaksi aktivasi fase 1 dan dimetabolisme oleh enzim N-acetyltransferase 2 (NAT2) pada fase 2. Berdasarkan hasil penelitian (Schmidt et al. 2010) didapatkan peningkatan kejadian NTD pada ibu dengan status oksidasi CYP1A2*1F cepat dan dengan status asetilasi NAT2 lambat. CYP1A2*1F dan CYP1A2*1C merupakan polimorfisme yang mengatur CYP1A2. (Schmidt *et al*, 2010).

Penurunan klirens kafein pada ibu selama kehamilan menyebabkan kafein melewati barrier plasenta. Kafein melewati barrier plasenta secara bebas dan janin tidak dapat menginaktivasi zat tersebut sehingga menumpuk di dalam otak janin. Kafein mampu menghambat enzim fosfodiesterase yang menghambat hidrolisis cAMP sehingga konsentrasi cAMP seluler meningkat. Hal ini menyebabkan penurunan mitosis sel yang menghambat pertumbuhan janin (Sengpiel *et al*, 2013; Pei *et al*, 2015).

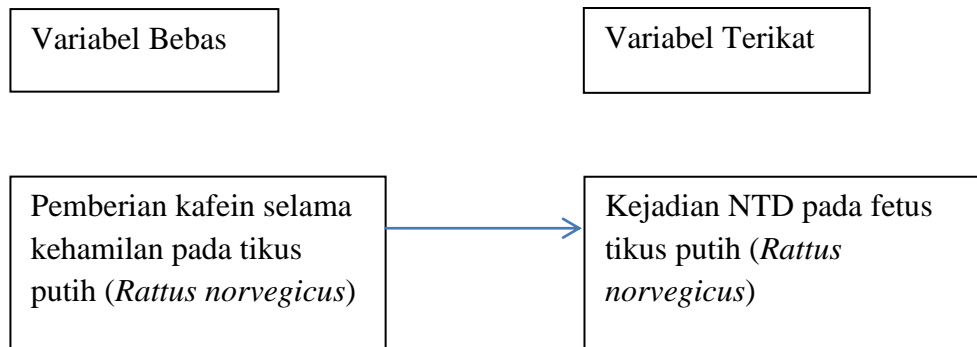
Kafein meningkatkan pelepasan katekolamin yang memicu vasokonstriksi janin-plasenta sehingga dapat menyebabkan malformasi kongenital, salah satunya adalah NTD (Okubo H *et al*, 2015; Sengpiel *et al*, 2013; Pei *et al*, 2015).

2.5. Kerangka Teori



Gambar 3. Kerangka Teori
(Lazareff, 2011; Schmidt *et al.*, 2010; Cavalli *et al.*, 2011; Golalipour *et al.*, 2014)

2.6. Kerangka Konsep



Gambar 4. Kerangka Konsep

2.7. Hipotesis

H0: Tidak terdapat perbedaan efek kafein dalam berbagai dosis pemberian selama kehamilan terhadap kejadian NTD pada fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*.

H1: Terdapat perbedaan efek kafein dalam berbagai dosis pemberian selama kehamilan terhadap kejadian NTD pada fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan pendekatan *post test only control group design*. Pengambilan data dilakukan pada akhir penelitian saat perlakuan selesai. Desain penelitian ini dipilih karena peneliti ingin mengetahui perbedaan efek pemberian kafein asli pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkannya dengan kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan. Subjek pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina hamil galuur *Sprague dawley* berumur 10-16 minggu yang dipilih secara *random* dan dikelompokkan menjadi empat kelompok.

3.2. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama tiga bulan yaitu mulai dari bulan September hingga November 2017. Penelitian ini dilaksanakan pada:

1. Animal House Fakultas Kedokteran Universitas Lampung sebagai tempat pemeliharaan dan perlakuan.
2. Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung sebagai tempat untuk proses nekropsi dan observasi hasil penelitian.

3.3. Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dewasa hamil galur *Sprague dawley* berumur sekitar 10-16 minggu dengan berat sekitar 200-250 gram yang didapatkan dari Balai Besar Penelitian Veteriner (BBALITVET) Bogor.

3.3.2. Kriteria Inklusi

1. Sehat (mata bersinar, rambut tidak berdiri, kusam dan rontok, tingkah laku normal)
2. Jenis kelamin betina
3. Berat badan sekitar 200-250 gram
4. Berusia sekitar 10-16 minggu
5. Siap kawin

3.3.3. Kriteria Eksklusi

1. Tikus dengan rambut kusam, rontok, atau botak, tingkah laku tidak normal atau tidak aktif, keluar eksudat yang tidak normal dari mata, mulut, anus dan genital pada sebelum atau saat mendapat perlakuan.
2. Tikus dengan kriteria *drop out* (mati sebelum atau saat diberi perlakuan).

3.3.4. Besar Sampel Penelitian

Sampel penelitian dihitung berdasarkan rumus Frederer untuk penentuan sampel uji eksperimen.

Rumus Frederer (Suprastiwi *et al*, 2015):

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

Keterangan:

n = jumlah sampel tiap kelompok

t = jumlah kelompok perlakuan

Penelitian ini dibagi menjadi empat kelompok percobaan sehingga perhitungan sampel adalah sebagai berikut:

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

$$(n-1)(4-1) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Jadi, sampel yang digunakan untuk setiap kelompok percobaan adalah sebanyak 6 ekor. Jumlah kelompok yang akan digunakan adalah empat kelompok sehingga penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus putih. Kemudian dilakukan koreksi dengan menambahkan 10% dari jumlah anggota tiap kelompok untuk mengantisipasi adanya *drop out*.

$$\begin{aligned}\text{Drop out} &= 10\% \times 6 \\ &= 0,6 \text{ per kelompok perlakuan}\end{aligned}$$

Jadi, jumlah tikus yang dibutuhkan untuk *drop out* adalah sebanyak satu ekor per kelompok perlakuan. Sehingga penelitian ini menggunakan 28 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dewasa hamil yang dibagi menjadi empat kelompok.

3.3.5. Teknik Sampling

Teknik yang digunakan ada penelitian ini adalah teknik simple random sampling yaitu dengan memilih secara acak sampel yang akan digunakannya kemudian mengelompokkannya. Pada penelitian ini 28 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dewasa hamil dikelompokkan secara acak.

3.3.6. Kelompok Perlakuan

Dalam penelitian ini digunakan 28 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dewasa hamil yang dibagi menjadi empat kelompok, yaitu:

1. Kelompok kontrol negatif (KN), yaitu tikus yang tidak diberikan kafein selama kehamilan.
2. Kelompok perlakuan satu (P1), yaitu tikus yang diberikan kafein dengan dosis sebesar 2,55 mg/hari.

3. Kelompok perlakuan dua (P2), yaitu tikus yang diberikan kafein dengan dosis sebesar 5,125 mg/hari.
4. Kelompok perlakuan dua (P3), yaitu tikus yang diberikan kafein dengan dosis sebesar 7,7 mg/hari.

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Kandang tikus beserta tempat makan dan minum tikus
2. Gelas ukur
3. Sonde lambung untuk mencekoki kafein
4. *Handschoen*, kapas dan alkohol

3.4.2. Alat untuk Nekropsi

1. Papan bedah
2. Gunting dan pisau bedah

Gunting dan pisau bedah digunakan untuk membuat insisi atau sayatan pada otot.

3. *Needlle* (jarum)

Jarum digunakan menstabilkan posisi hewan coba atau tidak berpindah posisi.

4. *Forceps*

Forceps digunakan untuk memegang organ dalam untuk memeriksa

5. *Fume hood*

Fume hood berfungsi untuk melindungi operator dari bahan pengawet atau material yang berasal dari hewan (rambut dan debu).

6. *Sput disposable* (3 cc dan 5 cc)

7. Pinset

8. *Handsoen*

3.4.3. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Kafein asli sediaan tablet 200 mg
2. Pakan hewan berupa pelet dan minum
3. Etanol 70% untuk membasahi bulu dan membersihkan peralatan setelah dipakai
4. Aquadest sebagai plasebo
5. Larutan garam fisiologis NaCl untuk mencuci atau menghilangkan darah dan sisa-sisa jaringan
6. *Chloroform*

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Ethical Clearance

Skripsi ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor 3676/UN26.8/DL/2017 untuk melakukan penelitian dengan menggunakan 28 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dewasa hamil galur *Sprague dawley*.

3.5.2. 3.5.2. Pengadaan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan 28 tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dan 7 tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang didapatkan dari Balai Besar Penelitian Veteriner (BBALITVET) Bogor.

3.5.3. Prosedur Aklimatisasi dan Pemeliharaan Tikus

Hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari sebelum diberi perlakuan untuk adaptasi dengan lingkungan baru. Kandang tikus terbuat dari kawat dan beralaskan serbuk kayu yang diganti setiap harinya untuk mencegah terjadinya infeksi akibat kotorannya. Kandang tikus dijaga kelembaban, suhu, dan pencahayaannya. Tikus putih diberi makanan dan minuman air secukupnya setiap hari pada wadah yang terpisah.

3.5.4. Prosedur Perkawinan Tikus

Tikus putih betina dewasa dikawinkan dengan tikus putih jantan dewasa dengan sistem poligami (tiga ekor tikus betina dengan satu ekor tikur jantan). Perkawinan dapat diketahui dengan didapatkannya sumbat vagina dan apusan vagina. Sumbat vagina merupakan air mani yang menggumpal pada vagina sedangkan pada apusan vagina terdapat sejumlah sperma yang dapat dilihat pada keesokan harinya. Fertilisasi terjadi pada 7-10 jam setelah kopulasi.

3.5.5. Penetapan Dosis Kafein pada hewan coba

Kafein yang digunakan pada penelitian ini dalam sediaan serbuk. Dosis yang diberikan kepada tikus putih dikonversikan dengan menggunakan konversi BSA (*Body Surface Area*). Pada penelitian ini dosis kafein yang akan digunakan adalah sebesar 100 mg/hari, 200 mg/hari, dan 300 mg/hari. Dosis tersebut dikonversikan menjadi dosis hewan coba yaitu dengan perhitungan sebagai berikut (Reagan-Shaw *et al*, 2007):

$$\text{HED} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \text{dosis hewan coba} \times \frac{\text{Km hewan coba}}{\text{Km manusia}}$$

HED (*Human Equivalent Dose*) adalah dosis pada manusia dengan satuan mg/kg. Dosis kafein dikonversi dalam bentuk mg/kgBB. Berat badan rata-rata manusia yang akan digunakan sebagai pembagi adalah sebesar 60 kg. HED didapatkan dari dosis kafein dibagi dengan berat

badan rata-rata sehingga didapatkan nilai HED kafein yaitu sebesar 1,67 mg/kgBB, 3,33 mg/kgBB, dan 5 mg/kgBB.

Km atau faktor konstanta dalam rumus konversi adalah berat badan (kg) dibagi dengan BSA dalam satuan m^2 . Nilai konstanta (*Km*) manusia dewasa normal adalah sebesar 37 dan tikus sebesar 6 (*Reagan-Shaw et al, 2007*). Sehingga didapatkan dosis hewan coba tikus sebagai berikut:

$$\text{Dosis hewan coba} = \text{HED} \left(\frac{mg}{kg} \right) \times \frac{Km \text{ manusia}}{Km \text{ hewan coba}}$$

$$\text{Dosis hewan coba (P1)} = 1,67 \left(\frac{mg}{kgBB} \right) \times \frac{37}{6} = 10,3 \text{ mg/kgBB setiap hari}$$

$$\text{Dosis hewan coba (P2)} = 3,33 \left(\frac{mg}{kgBB} \right) \times \frac{37}{6} = 20,6 \text{ mg/kgBB setiap hari}$$

$$\text{Dosis hewan coba (P3)} = 5,00 \left(\frac{mg}{kgBB} \right) \times \frac{37}{6} = 30,8 \text{ mg/kgBB setiap hari}$$

Berdasarkan perhitungan diatas didapatkan dosis hewan coba pada kelompok perlakuan satu sebesar 10,3 mg/kgBB, kelompok perlakuan dua sebesar 20,6 mg/kgBB, dan kelompok perlakuan tiga sebesar 30,8 mg/kgBB setiap harinya. Dengan asumsi berat badan tikus adalah sebesar 250 mg didapatkan dosis sebesar 2,55 mg pada kelompok perlakuan satu, 5,125 mg pada kelompok perlakuan dua, dan 7,7 mg pada kelompok perlakuan tiga. Penelitian ini menggunakan sediaan kafein sebesar 200 mg sehingga pengenceran dengan aquadest didapatkan dari perhitungan di bawah ini (*Clayden et al, 2012*):

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Kelompok P1:

$$200 \text{ mg} \times 1 \text{ ml} = 2,55 \text{ mg} \times V_2$$

$$V_2 = 77,8 \text{ ml}$$

Kelompok P2:

$$200 \text{ mg} \times 1 \text{ ml} = 5,125 \text{ mg} \times V_2$$

$$V_2 = 38,8 \text{ ml}$$

Kelompok P3:

$$200 \text{ mg} \times 1 \text{ ml} = 7,7 \text{ mg} \times V_2$$

$$V_2 = 26 \text{ ml}$$

Keterangan:

V_1 = volume larutan yang diencerkan

V_2 = volume larutan pengenceran

C_1 = konsentrasi larutan yang dianjurkan

C_2 = konsentrasi larutan pengenceran

Jadi, tikus pada kelompok perlakuan satu diberikan kafein sebanyak 1 ml yang mengandung 2,55 mg yang berasal dari pengenceran kafein 200 mg menggunakan 77,8 ml aquadest. Tikus pada kelompok perlakuan dua diberikan kafein sebanyak 1 ml yang mengandung 5,125 mg yang berasal dari pengenceran kafein 200 mg menggunakan 38,8 ml aquadest. Tikus pada kelompok perlakuan tiga diberikan kafein sebanyak 1 ml yang mengandung 7,7 mg yang berasal dari pengenceran kafein 200 mg menggunakan 26 ml aquadest.

3.5.6. Prosedur Perlakuan

Tikus betina dewasa yang hamil dikelompokkan ke dalam empat kelompok. Kelompok kontrol negatif (KN) diberi minum dan makan pelet setiap hari. Kelompok perlakuan satu diberi minum dan makan pelet serta diberi kafein dengan dosis 2,55 mg. Kelompok perlakuan dua (P2) diberi minum dan makan pelet serta diberi kafein dengan dosis 5,125 mg. Kelompok perlakuan tiga (P3) diberi minum dan makan pelet serta diberi kafein dengan dosis 7,7 mg.

3.5.7. Terminasi Kehamilan dengan Nekropsi

Menjelang hari ke-20 kehamilan, tikus dieutanasi dengan *chloroform* untuk mencegah kanibalisasi induk tikus terhadap fetus tikus pasca melahirkan. Nekropsi dilakukan dengan laparotomi pada perut dan uterus tempat fetus akan dibedah. Berikut ini merupakan langkah nekropsi hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1. Hewan yang telah dieutanasi diletakkan pada papan bedah dengan posisi perut menghadap ke atas dan kepala hewan menjauhi operator.
2. Permukaan tubuh hewan dibasahi dengan menggunakan etanol 70% atau air agar rambut hewan tidak rontok dan mengotori organ dan fetus yang akan diambil.
3. Angkatlah kulit abdomen menggunakan forceps dan buatlah irisan sepanjang ventral midline dengan gunting pada daerah subkutan.

4. Jika sudah terlihat lapisan tipis otot di bawah kulit, maka buatlah irisan pada otot abdomen. Kemudian singkirkan otot ke samping dengan gunting sehingga organ abdomen dapat terlihat.
5. Tentukan letak uterus dengan fetus yang ada di dalamnya dan tarik sedikit ke arah luar kemudian keluarkan fetus dari uterus tikus.
6. Setelah fetus keluar dari uterus, bersihkan lendir, darah, dan sisa jaringan yang terdapat pada tubuh fetus dengan larutan garam fisiologis NaCl.

3.5.8. Observasi Kelainan

1. Bersihkan fetus dari darah dan lendir serta sisa selaput maupun jaringan yang ada dengan larutan garam fisiologis NaCl.
2. Amati morfologi fetus tikus pada bagian otak dan sumsum tulang untuk mengidentifikasi adanya NTD berupa anensefali, meningokel, ensefalokel, spina bifida aperta dan spina bifida okulta.
3. Hitung kejadian NTD yang ada pada setiap kelompok dan bandingkan tiap kelompoknya.

3.6. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

3.6.1. Identifikasi Variabel

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian kafein pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kejadian NTD pada fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*.

3.6.2. Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Pemberian kafein	Kafein diberikan pada tiga kelompok perlakuan dengan dosis yang berbeda, yaitu: <ol style="list-style-type: none"> Dosis kafein sebesar 2,55 mg pada kelompok P1 Dosis kafein sebesar 5,125 mg pada kelompok P2 Dosis kafein sebesar 7,7 mg pada kelompok P3 			Kategorik
Kejadian <i>Neural Tube Defects</i> (NTD)	<i>Neural Tube Defects</i> (NTD) merupakan malformasi kongenital yang dapat disebabkan oleh konsumsi kafein selama kehamilan. Kejadian NTD dinilai berdasarkan adanya anensefali, meningokel, ensefalokel, spina bifida aperta dan spina bifida okulta. (De Marco <i>et al</i> , 2011; Schmidt <i>et al</i> , 2009; Cavalli <i>et al</i> , 2011)	Hitung Angka Kejadian	Kejadian n NTD	Numerik

3.7. Pengolahan dan Analisis Data

3.7.1. Pengolahan Data

Data yang diperoleh dari proses pengumpulan data diubah dalam bentuk tabel, kemudian data diproses dengan menggunakan program SPSS. Pengolahan data menggunakan SPSS terdiri dari beberapa langkah yaitu sebagai berikut:

1. Koding

Data yang telah dikumpulkan selama penelitian diterjemahkan ke dalam simbol yang dapat dianalisis.

2. Entry data

Data penelitian dimasukkan ke dalam program komputer.

3. Verifikasi

Data pemeriksaan dimasukkan ke dalam data yang telah dimasukkan ke dalam komputer.

4. Output

Merupakan hasil yang telah dianalisis oleh komputer.

3.7.2. Analisis Data

Penelitian ini menggunakan program analisis data SPSS untuk analisis statistik. Jumlah sampel yang digunakan <50 sehingga digunakan uji *Saphiro-Wilk* untuk normalitas dan homogenitas data. Jika memenuhi syarat, maka analisis data untuk mengetahui perbedaan efek pemberian kafein akan menggunakan uji parametrik *One Way ANOVA*

dan dilanjutkan dengan analisis *post-hoc Bonferroni* untuk menilai kebermaknaan antar kelompok. Jika tidak memenuhi syarat uji parametrik, maka digunakan analisis non parametrik *Kruskal-Wallis*.

3.7.3. Dummy Table

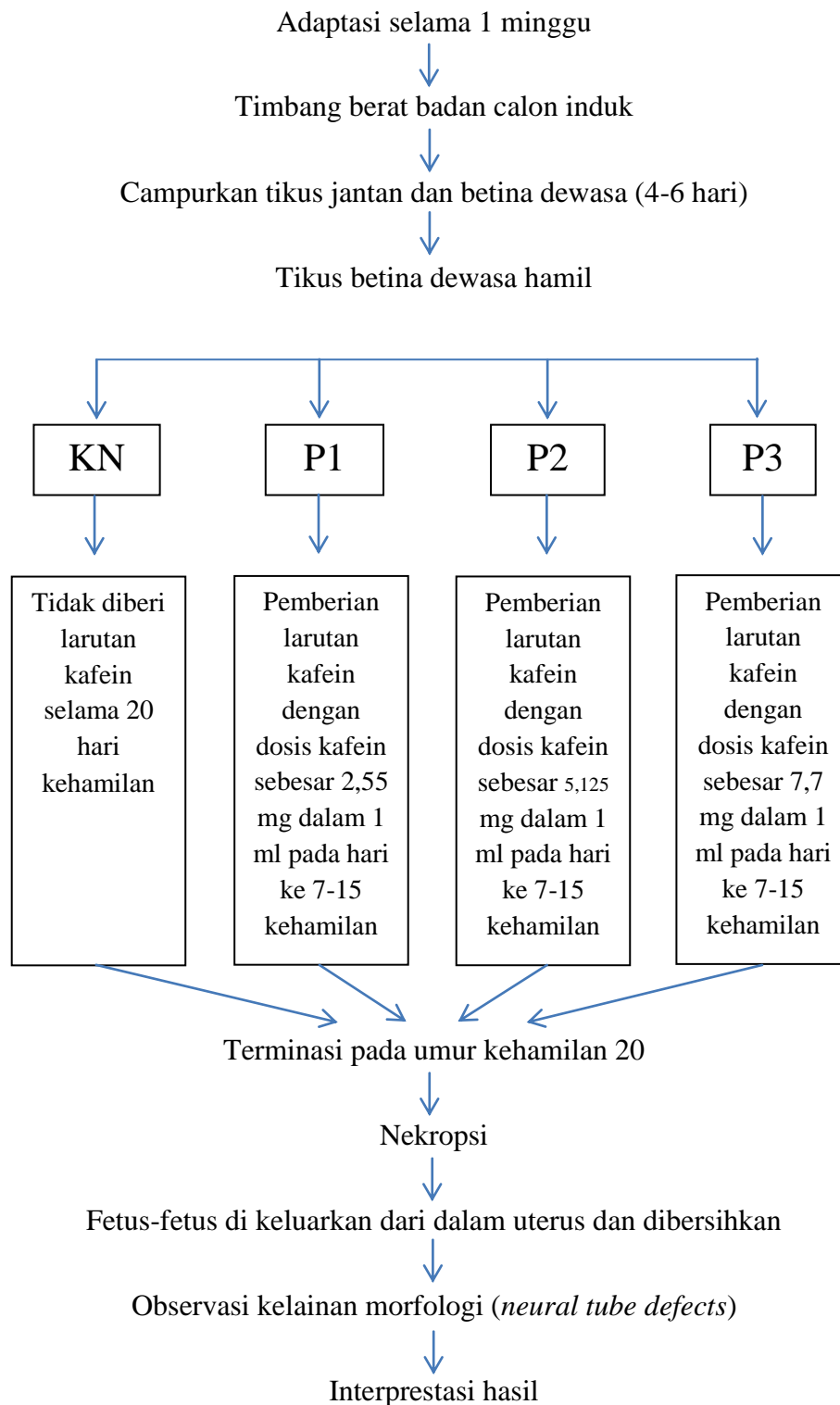
Tabel 5. Rerata Jumlah Fetus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Kelompok	Jumlah Induk	Jumlah Fetus	Rata-rata±Standar Deviasi
KN			
P1			
P2			
P3			

Tabel 6. Rerata Jumlah Kejadian NTD Fetus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Kelompok	Jumlah Induk	Jumlah NTD	Median (Min-Max)
KN			
P1			
P2			
P3			

3.8. Diagram Alur Penelitian



Gambar 5. Diagram Alur Penelitian

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Adapun simpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Tidak terdapat perbedaan efek kafein pada berbagai dosis terhadap kejadian NTD pada fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley*.
2. Terdapat perbedaan efek kafein pada berbagai dosis terhadap jumlah fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley*.

5.2 Saran

Adapun saran yang disampaikan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Peneliti lain disarankan untuk mengidentifikasi kejadian NTD secara mikroskopis, sehingga angka kejadian NTD dapat teridentifikasi secara rinci dan bermakna secara statistik.
2. Peneliti lain disarankan untuk mengidentifikasi efek pemberian kafein terhadap karakteristik fetus lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar B. 2010. Tumbuhan dengan kandungan senyawa yang berpotensi sebagai bahan antifertilitas. Edisi ke-1. Jakarta: Adabia Press. hlm 10-23.
- Anggadiredja K, Sukandar EY & Santosa, S. 2006. Studi efek teratogenik ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) pada tikus wistar putih. JKM. 5(2): hlm 72–80.
- Benedum CM, Yazdy MM, Mitchell AA & Werler MM. 2013. Risk of spina bifida and maternal cigarette, alcohol, and coffee use during the first month of pregnancy. IJERPH. 10(8):3263–3281.
- Burke TM, Markwald RR, McHill AW, Chinoy ED, Snider JA, Bessman SC, Jung CM, O'Neill JS & Wright KP. 2015. Effects of caffeine on the human circadian clock in vivo and in vitro. SCI TRANSL MED, 7(305):1-16.
- Cavalli P, Cavallari U, Unfer V & Tonni G. 2011. Caffeine intake and risk of neural tube defects. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 91(1):1-2.
- Clayden J, Greeves N & Warren S. 2012. Organic Chemistry. Edisi ke-2. England: Oxford University Press. hlm 200-201.
- Copp AJ, Stainer P & Greene NDE. 2013. Neural tube defects - recent advances, unsolved questions and controversies. Lancet Neurol. 12(8):799–810.
- Cunningham FG, Levano KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ & Spong CY. 2014. Diagnosis Pranal dan Terapi Janin. Obstetri Williams. Edisi ke-23. Jakarta: EGC. hlm 302–303.
- De Marco P, Merello E, Calevo MG, Mascelli S, Pastorino D, Crocetti L, De Biasio P, Piatelli G, Cama A & Capra V. 2011. Maternal periconceptional factors affect the risk of spina bifida-affected pregnancies: An Italian case-control study. Child's Nerv Syst. 27(7):1073–1081.
- Ernawati. 2011. Spina bifida. Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. 1(2):1-6.

- Feng Y, Yu D, Yang L, Da M, Wang Z, Lin Y, Ni B, Wang S & Mo X. 2014. Maternal lifestyle factors in pregnancy and congenital heart defects in offspring: review of the current evidence. *Ital J Pediatr.* 40(1):85.
- Glinianaia SV, Tennant PWG & Rankin J. 2017. Risk estimates of recurrent congenital anomalies in the UK: a population-based register study. *BMC Medicine.* 15(1):20.
- Golalipour MJ, Qorbani M, Mirfazeli A & Mobasheri E. 2014. Risk factors of neural tube defects in northern Iran. *Iran Red Crescent Med J.* 16(6):1-5.
- Grosso LM, Rosenberg KD, Belanger K, Saftlas AF, Leaderer B & Bracken MB. 2001. Maternal caffeine intake and intrauterine growth retardation. *Epidemiology.* 12(4):447-455.
- Johansen AMW, Wilcox AJ, Lie RT, Andersen LF & Drevon CA. 2009. Maternal consumption of coffee and caffeine-containing beverages and oral clefts: A population-based case-control study in Norway. *AJE.* 169(10):1216-1222.
- Kementrian Kesehatan RI. 2007. Profil kesehatan Indonesia 2007. Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kondo A, Kamihira O & Ozawa H. 2009. Neural tube defects: Prevalence, etiology and prevention. *Int J Urol.* 16(1):49-57.
- Krinke GJ. 2000. *The handbook of experimental animals: the laboratory rat.* London: Academic Press.
- Kuczkowski KM. 2009. Caffeine in pregnancy. *Archives of Gynecology and Obstetrics.* 280(5):695-698.
- Lazareff JA. 2011. Neural tube defects. USA: World Scientific Publishing. hlm 1-27.
- Loomans EM, Hofland L, Van der stelt O, Van der wal MF, Koot HM, Van den bergh BRH & Vrijkotte TGM. 2012. Caffeine intake during pregnancy and risk of problem behavior in 5- to 6-year-old children. *Pediatrics.* 130(2):305-313.
- Ma ZL, Wang G, Cheng X, Chuai M, Kurihara H, Lee KKH & Yang X. 2014. Excess caffeine exposure impairs eye development during chick embryogenesis. *J Cell Mol Med.* 18(6):1134-1143.
- Ma Y, Bao Y, Li C, Jiao F, Xin H & Yuan Z. 2012. Correlation between spina bifida manifesta in fetal rats and c-jun N-terminal kinase signaling. *Neural Regen Res.* 7(32):2485-2491.

- Marceau K, Ruttle PL, Shirtcliff EA, Essex MJ & Susman EJ. 2015. Maternal caffeine consumption and risk of congenital limb deficiencies. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 57(6):742–768.
- Mohd-Zin SW, Marwan AI, Chaar MKA, Ahmad-Annuar A & Abdul-Aziz NM. 2016. Spina bifida: Pathogenesis, mechanisms, and genes in mice and human. *Scientifica.* 2017:1-29.
- Mongraw-chaffin ML, Cohn BA, Cohen RD & Roberta E. 2013. Maternal smoking, alcohol consumption, and caffeine consumption during pregnancy in relation to a son's risk of persistent cryptorchidism: A prospective study in the child health and development studies cohort, 1959–1967. *Am J Epidemiol.* 167(3):1–9.
- Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A & Feeley M. 2003. Effects of caffeine on human health. *Food Additives and Contaminants.* 20(1):1–30.
- New Zealand Government. 2012. Caffeine. *MPI.* 1(11):1-4.
- 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. *Nutr Res.* 35(4):309–316.
- Patrick S & Villano J. 2012. *The Laboratory Rat.* Edisi ke-2. New York: CRC Press. hlm 1-28.
- 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):1–13.
- Reagan-Shaw S, Nihal M & Ahmad N. 2007. Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB.* 22(3): hlm 659-661.
- Sadler, 2012. *Langman's Medical Embryology.* Edisi ke-12. Jakarta: EGC. hlm 117-128.
- Sadler, 2012. *Langman's Medical Embryology.* Edisi ke-12. Jakarta: EGC. hlm 287-315.
- Satyanegara. 2010. *Ilmu bedah saraf* Edisi ke-4. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama. hlm 334-339.
- Schmidt RJ, Romitti PA, Burns TL, Murray JC, Browne ML, Druschel CM & Olney RS. 2009. Maternal caffeine consumption and risk of neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 85(11):879–889.

- Schmidt RJ, Romitti PA, Burns TL, Murray JC, Browne ML, Druschel CM & Olney RS. 2010. Caffeine, selected metabolic gene variants, and risk for neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 88(7):560–569.
- Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, & Francis-West PH. 2015. *Larsen's Human- Embryology*. Edisi ke-5. Philadelphia: Elsevier Saunders. hlm 23-27.
- Sengpiel V, Elind E, Bacelis J, Nilsson S, Grove J, Myhre R, Haugen M, Meltzer HM, Alexander J, Jacobsson B & Brantsaeter AL. 2013. Maternal caffeine intake during pregnancy is associated with birth weight but not with gestational length: results from a large prospective observational cohort study. *BMC Medicine.* 11(1):1-42.
- Sjamsuhidajat R & Jong W de. 2010. *Buku ajar ilmu bedah*. Edisi ke-3. Jakarta: EGC. hlm 937-939.
- Smith JB & Mangkoewidjojo S. 1998. *Pemeliharaan, pembiakan dan penggunaan hewan percobaan di daerah tropis*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Suprastiwi E, Risanti I & Djauharie NK. 2015. Comparison of two methods of chlohexidine application of shear bond strength degradation between composite resin and dentin. *OJST.* 5(8):211–216.
- The American College of Obstetricians and Gynecologists. 2010. Moderate caffeine consumption during pregnancy. *Obstetrics & Gynecology.* 118(507):767–770.
- United States Departement of Agriculture. 2013. *Tropical Product : World Markets and Trade USA*: United States Departement of Agriculture.
- World Health Organization. 2016. *Congenital Anomalies*. USA: World Health Organization.
- Wijayanto H, Pangestinarsih TW & Rahmi E. 2007. Pengaruh pemberian kafein pada masa organogenesis terhadap berat lahir fetus tikus putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Kedokteran Hewan.* 1(2):53-59.
- Witschi, A., & Dittmer. 1962. *Growth*. Washington: FASEB. hlm 306.
- Yokota H, Yokota Y, Yokota M, Araki Y & Araki Y. 2013. Effect of long-term caffeine administration to mice on in vitro fertilization and embryo development using oocytes. *RMB.* 12(4):167–171.