

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

1.1. Hasil Studi Eksplorasi Konsentrasi Rotenon Untuk Memberikan Efek *Stunting*

Pada penelitian sebelumnya yaitu penelitian Ridlayanti dan Wijayanti, 2016 menggunakan konsentrasi rotenon 10 ppb sebagai metode model *stunting* larva *zebrafish* dengan derajat kepercayaan kurang dari 93 %, oleh karena itu diperlukan pelaksanaan eksplorasi kembali untuk memperoleh derajat kepercayaan lebih dari 95 %.

Pada penelitian ini studi eksplorasi dimulai dari bulan September 2016 sampai dengan Januari 2017, untuk memperoleh metode model *stunting* larva *zebrafish*. Eksplorasi dilakukan sebanyak 2 kali dengan menggunakan rotenon sebanyak 3 konsentrasi yaitu : 10 ppb, 12,5 ppb, dan 15 ppb. Parameter yang diamati setiap hari adalah panjang badan yang diukur pada hari ke 3, 6, 9 dan 12 dpf.







Pada eksplorasi 1 dan 2 rerata panjang badan larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon 10 ppb dan 12,5 mengalami penurunan panjang badan yaitu pada usia 6 hingga 12 dpf dibandingkan dengan kontrol. dan keseluruhan larva *zebrafish* dalam keadaan normal.

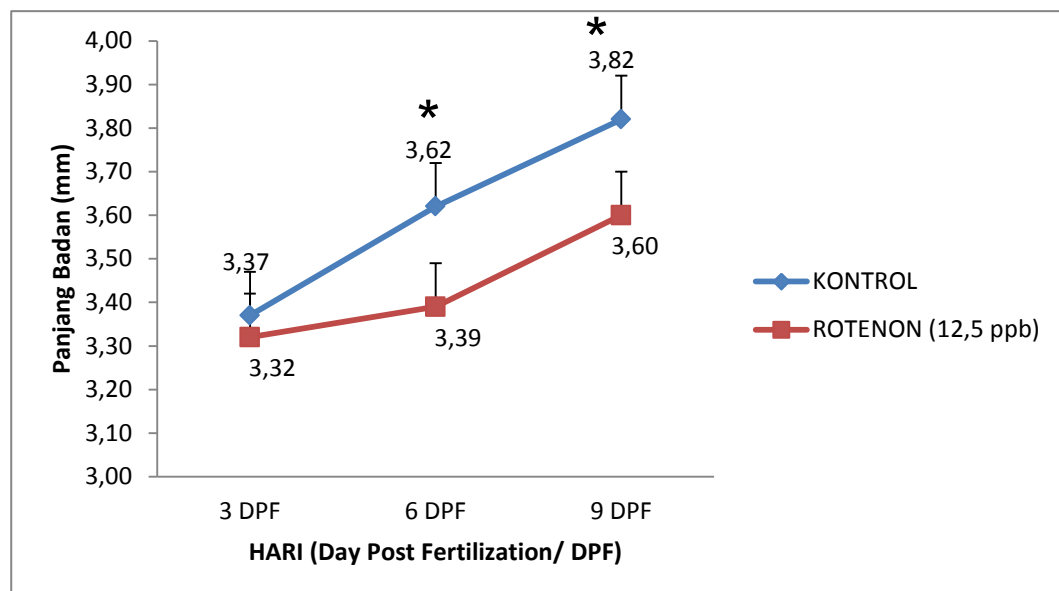
Pada eksplorasi 1 dan 2 rerata panjang badan larva *zebrafish* yang diinduksi rotenone 15 ppb mengalami penurunan mulai usia 6 dpf. Pada eksplorasi 1 terdapat larva *zebrafish* yang mengalami kecacatan yaitu defek miokardium sebanyak 1 larva berbanding 30 sampel (3,3%). Sedangkan pada eksplorasi 2 tidak terdapat larva *zebrafish* yang mengalami kecacatan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa studi eksplorasi yang kami lakukan dengan penggunaan rotenon 12,5 ppb mencapai derajat kepercayaan 98%.

1.2. Model Stunting Larva Zebrafish

Hasil pengukuran rata-rata panjang badan larva *zebrafish* antara kelompok kontrol dengan kelompok rotenon (12,5 ppb), dengan menggunakan *software image raster* versi 3, pada usia 3, 6 dan 9 dpf, dapat diuraikan pada tabel 5.1:

Tabel 5.1 Perbandingan Rerata Panjang Badan Larva *Zebrafish* usia 3, 6 dan 9 dpf antara kelompok kontrol dengan kelompok rotenon.

DPF	3		6		9	
Kelompok	Kontrol	Rotenon	Kontrol	Rotenon	Kontrol	Rotenon
Gambar						
Mean ± SD	3.37±0.08	3.34±0.10	3.62±0.11	3.39±0.08	3.82±0.11	3.60±0.11



Gambar 5.1 Grafik nilai rerata panjang badan antara kelompok kontrol dan kelompok rotenon

Grafik pertumbuhan panjang badan kelompok kontrol dan kelompok rotenon pada usia 3,6 dan 9 dpf, (Kelompok kontrol bergaris biru, sedangkan kelompok rotenon bergaris merah dan tanda bintang menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada usia 6 dan 9 dpf).

Kelompok rotenon menunjukkan pertambahan panjang badan yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Gambaran perbedaan pertumbuhan panjang badan larva *zebrafish* dapat dilihat pada tabel 5.1 dan gambar 5.1. Pada usia 3 dpf (analog bayi baru lahir) rata-rata panjang badan kelompok rotenon mendekati titik awal pertumbuhan kelompok kontrol dan menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan nilai $p=0,113$ ($p>0,05$), sedangkan pada usia 6 dpf (analog anak usia 2 tahun) garis pertumbuhan kelompok rotenon berada dibawah kelompok kontrol hingga usia 9 dpf (analog anak usia 2 tahun) dan menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan pada usia 6 dan 9 dpf dengan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$). Pada usia 6 dpf kelompok rotenon lebih pendek dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan selisih panjang badan yaitu 0,23 mm (6,35%) dibandingkan kelompok kontrol, pada usia ini larva telah mengalami stunting dikarenakan selisih panjang badan lebih besar dari 2 standar deviasi ($0,23>0,16$). Pada usia 9 dpf terdapat selisih panjang badan antara kedua kelompok yaitu 0,22 mm (5,75%). Pengolahan data nilai rata-rata panjang badan larva *zebrafish* antara kelompok kontrol dan rotenon pada usia 3,6 dan 9 dpf, menggunakan Uji statistik *Independen t-test*.

1.3. Pengaruh Pemberian Pegagan Terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish

Hasil pengukuran rata-rata panjang badan larva *zebrafish* usia 3, 6 dan 9 dpf antara kelompok kontrol, kelompok rotenon (12,5 ppb) dan kelompok perlakuan rotenone dan pegagan dengan konsentrasi (1.25 , 2.5 dan 5 $\mu\text{g/mL}$), dengan menggunakan *software image raster* versi 3, dapat dilihat pada table berikut:

Tabel 5.2 Perbandingan rerata Panjang Badan (mm) Larva *Zebrafish* usia 3, 6 dan 9 dpf, antara kelompok kontrol, kelompok rotenone dan kelompok perlakuan rotenon + pegagan dengan konsentrasi (1.25 , 2.5 dan 5 µg/mL).

DPF	3					6					9				
Kelompok	K	R	RP1.25	RP2.5	RP5	K	R	RP1.25	RP2.5	RP5	K	R	RP1.25	RP2.5	RP5
Mean ± SD	3.37±0.08	3.34±0.10	3.34±0.09	3.35±0.08	3.35±0.07	3.62±0.11	3.39±0.08	3.41±0.09	3.44±0.09	3.49±0.09	3.82±0.11	3.60±0.11	3.62±0.09	3.65±0.12	3.71±0.11

Keterangan :

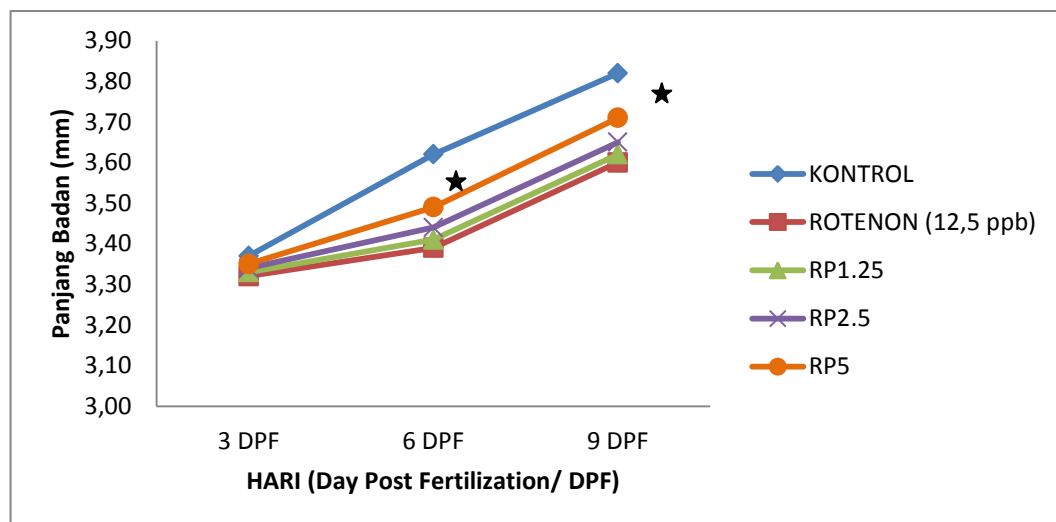
K : Kontrol

R : Rotenon

RP1.25 : Rotenon + Pegagan dengan konsentrasi 1,25 µg/mL

RP2.5 : Rotenon + Pegagan dengan konsentrasi 2,5 µg/mL

RP5 : Rotenon + Pegagan dengan konsentrasi 5 µg/mL



Gambar 5.2. Garfik perbedaan rerata panjang badan larva *zebrafish* pada 3, 6 dan 9 dpf. Garis pertumbuhan rata-rata panjang badan dan kelompok penelitian diatas, menunjukkan adanya perbedaan rata-rata panjang badan larva *zebrafish* pada usia 3,6 dan 9 dpf. Kelompok rotenon menunjukkan rata-rata panjang badan yang lebih pendek dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok ekstrak pegagan. Garis pertumbuhan panjang badan yang ditandai bintang pada kelompok RP5 (rotenon dan pegagan 5µg/mL) lebih mendekati garis pertumbuhan kelompok kontrol dibandingkan kelompok ekstrak pegagan lainnya.

Berdasarkan table 5.2 dan gambar 5.2 diperoleh hasil bahwa pada usia 3 dpf, terdapat perbedaan panjang badan, terutama pada kelompok RP5 memiliki pertambahan panjang badan diatas kelompok kontrol. Pada usia 6 dpf dan 9 dpf kelompok rotenon memiliki pertambahan panjang dibawah kelompok kontrol dan kelompok rotenon pegagan (RP1.25, RP2.5 dan RP5). Secara umum pemberian ekstrak pegagan mampu meningkatkan panjang badan pada larva *zebrafish* model stunting dan hasil yang terbaik pada kelompok perlakuan rotenon dan pegagan (RP5) konsentrasi 5 µg/mL, menunjukkan efek yang signifikan terhadap penambahan panjang badan pada usia 6 dpf dan 9 dpf. Sedangkan kelompok perlakuan rotenon dan pegagan konsentrasi 2,5 µg/mL hanya sedikit dapat meningkatkan panjang badan pada 6 dan 9 dpf.

Tabel 5.3 Rasio Panjang Kepala dan Panjang Badan (PK : PB) Larva *Zebrafish* usia 3, 6 dan 9 dpf, antara kelompok kontrol dengan kelompok rotenon.

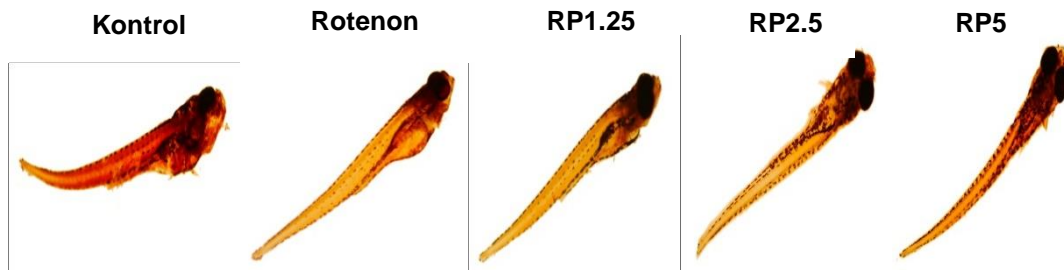
Hari	3 dpf				6 dpf				9 dpf			
	Kontrol		Rotenon		Kontrol		Rotenon		Kontrol		Rotenon	
	PK	PB	PK	PB	PK	PB	PK	PB	PK	PB	PK	PB
Rerata	0.63	3.37	0.61	3.32	0.77	3.62	0.71	3.39	0.81	3.82	0.80	3.60
Rasio	1 : 5		1 : 5		1 : 5		1 : 5		1 : 5		1 : 5	

Tabel 5.3 Menunjukkan hasil pengukuran rasio panjang kepala dengan panjang badan antara kelompok kontrol dengan kelompok rotenon, bahwa hasil proporsi pertumbuhan yang sama pada usia 3, 6 dan 9 dpf yaitu dengan perbandingan 1 : 5, hal tersebut sesuai dengan kriteria stunting.

1.4. Pengaruh Pemberian Rotenon dan Pegagan Terhadap Ekspresi IGF-1 pada Larva *Zebrafish*

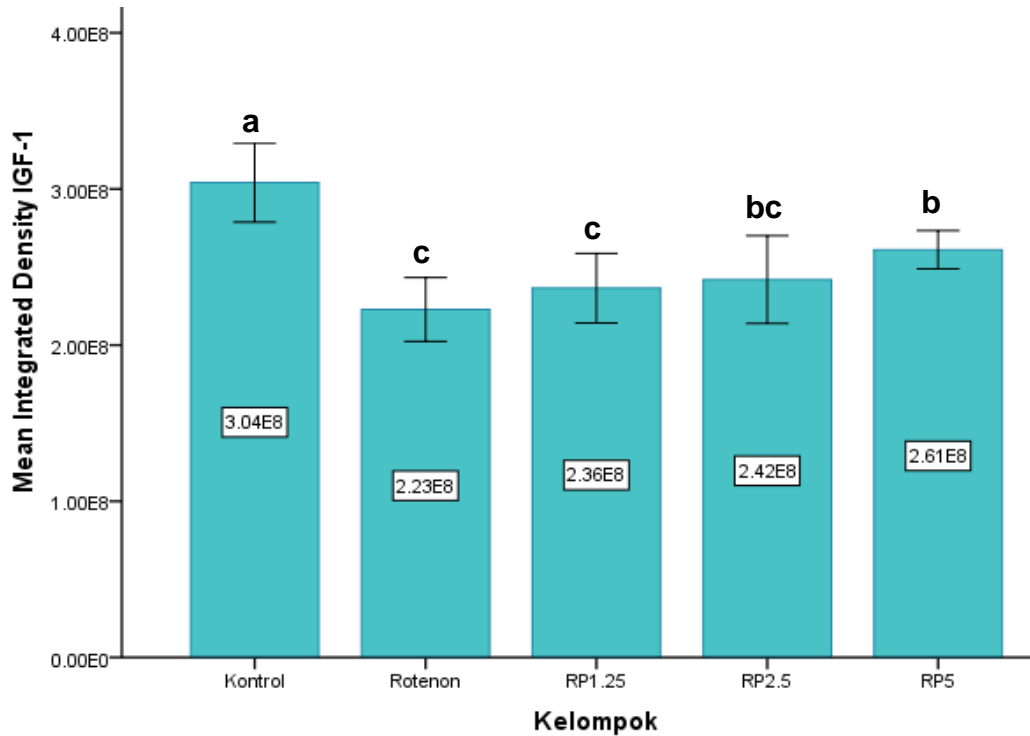
Ekspresi IGF-1 pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode pengecatan IHC *wholemout* pada larva *zebrafish*, dengan pewarnaan DAB sehingga menimbulkan warna coklat kekuningan dan diamati gambarnya dengan mikroskop Olympus LED CX-22, serta pengambilan gambar dengan

menggunakan camera digital (Panasonic DMC G6 Lumix) perbesaran 40 x, selanjutnya dilakukan penilaian *integrated density* menggunakan *software image J* versi 1.50. dengan scale x=0,5, scale y=0,5, lebar 2296 pixels dan tinggi 1032 pixels. Perbedaan ekspresi tersebut dapat dilihat pada gambar 5.3 dibawah ini:



Gambar 5.3 Perbedaan ekspresi IGF-1 pada larva *zebrafish* usia 9 DPF yang diinduksi rotenon dan ekstrak pegagan dengan berbagai konsentrasi. Gambar kuning kecoklatan merupakan hasil IHC *Wholmount* dengan pewarnaan DAB, semakin coklat warna larva *zebrafish* maka semakin terekspresi IGF-1. Pada gambar tampak kelompok kontrol dan kelompok rotenon pegagan yang lebih terekspresi dibandingkan dengan kelompok rotenon. Ekspresi IGF-1 berada pada seluruh sel somatik.

Gambar 5.3 menunjukkan hasil kuantifikasi perbedaan densitas warna coklat pada larva *zebrafish* usia 9 dpf antara kelompok rotenon dengan kelompok ekstrak pegagan dengan berbagai konsentrasi, dengan menggunakan *software Image J*. Densitas warna coklat yang lebih tinggi terlihat pada gambar kelompok ekstrak pegagan (RP1.25, RP2.5 dan RP5) dibandingkan dengan kelompok Rotenon. Sehingga dapat disimpulkan bahwa, ada peningkatan ekspresi IGF-1 pada larva *zebrafish* usia 9 dpf yang diberikan ekstrak pegagan dibandingkan dengan kelompok rotenon. RP5 rotenon pegagan dengan konsentrasi 5 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan gambaran ekspresi IGF-1 yang tinggi, dikarenakan densitas warna coklat yang lebih gelap dan hasil dari pengukuran *integrated density* menunjukkan nilai yang lebih tinggi.

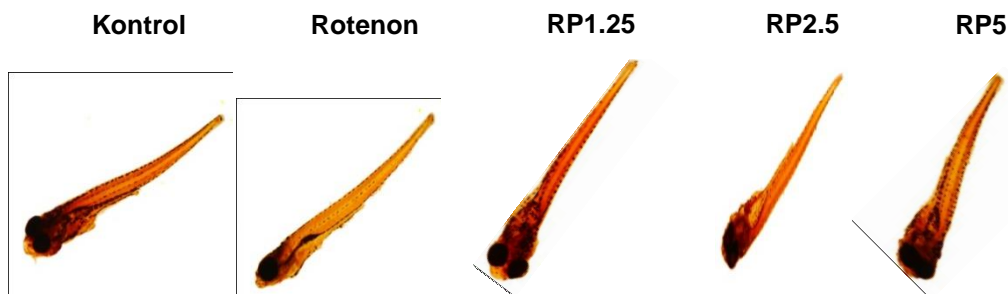


Gambar 5.4 Histogram perbandingan Ekspresi IGF-1 dengan metode IHC *Wholemout* pada larva *zebrafish* usia 9 DPF antara kelompok kontrol, kelompok rotenon dan kelompok ekstrak pegagan. Diikuti dengan hasil uji analisis statistik, Ekspresi IGF-1 lebih signifikan ($p=0,000$) ditunjukkan oleh RP5 ($5 \mu\text{g/mL}$) dengan $p\text{-value} < 0.05$, dengan nilai *integrated density* lebih tinggi dibandingkan kelompok rotenon dan pegagan lainnya. Notasi berbeda menunjukkan perbedaan signifikan.

Histogram pada gambar 5.4 diatas menjelaskan bahwa kelompok rotenon memiliki nilai *Integrated density* lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok ekstrak pegagan. Kelompok RP5 rotenon pegagan dengan konsentrasi $5 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan *Integrated density* lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok rotenon dan kelompok perlakuan rotenon dan pegagan lainnya (RP1.25 dan RP2.5). Sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat efek yang signifikan penambahan rotenon pegagan konsentrasi $5 \mu\text{g/mL}$ dengan ekspresi IGF-1 dan penambahan panjang badan larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon.

1.5. Pengaruh Pemberian Rotenon dan Pegagan Terhadap Ekspresi IRS Pada Larva *Zebrafish*

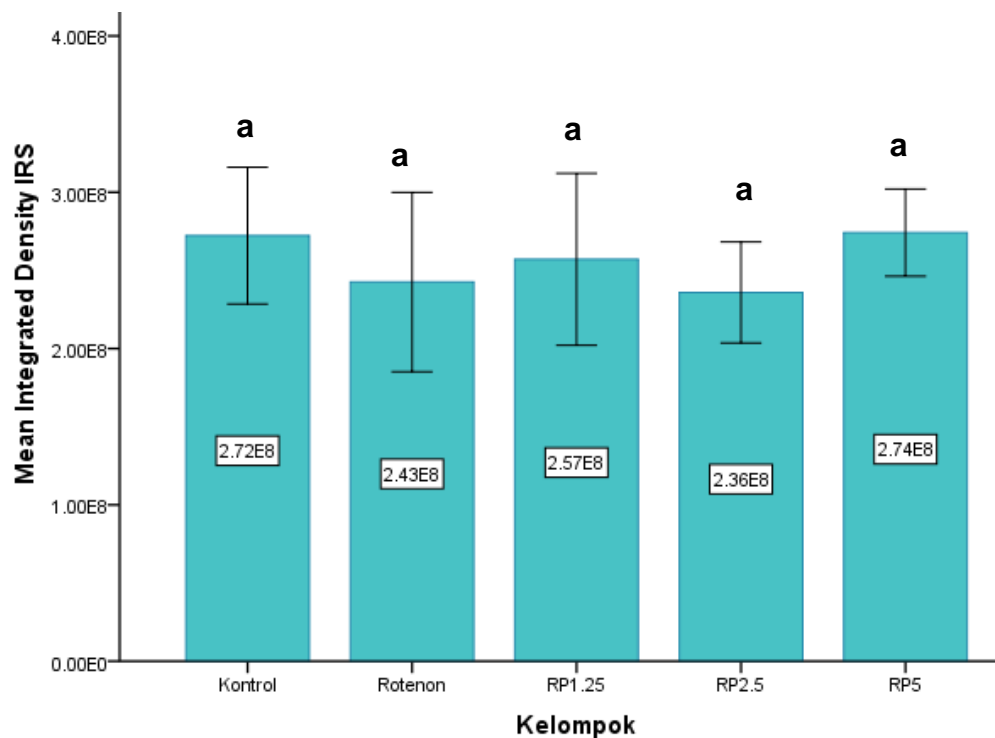
Gambaran Visualisasi perbedaan ekspresi IRS pada kelompok kontrol, Kelompok rotenon dan kelompok perlakuan rotenon pegagan (RP1.25, RP2.5 dan RP5), diperoleh dari hasil pengecatan IHC *Wholemout* pada larva *zebrafish* usia 9 dpf, menggunakan pewarnaan DAB dan diamati gambarnya dengan mikroskop Olympus LED CX-22, serta diambil gambarnya dengan menggunakan camera digital (Panasonic DMC G6 Lumix) perbesaran 40 x. selanjutnya dilakukan penilaian *integrated density* menggunakan *software image J* versi 1.50. dengan scale x=0,5, scale y=0,5, lebar 2296 pixels dan tinggi 1032 pixels. Perbedaan ekspresi tersebut dapat dilihat pada gambar 5.5:



Gambar 5.5 Perbedaan Ekspresi IRS antara kelompok rotenone dengan kelompok perlakuan rotenon dan ekstrak pegagan dengan berbagai konsentrasi, pada larva *zebrafish* usia 9 DPF. Gambar kuning kecoklatan merupakan hasil IHC *Wholemout* dengan pewarnaan DAB, semakin coklat warna larva *zebrafish* maka semakin terekspresi IRS. Pada gambar tampak kelompok kontrol dan kelompok perlakuan rotenon dan pegagan yang lebih terekspresi dibandingkan dengan kelompok rotenon.

Hasil kuantifikasi perbedaan densitas warna yang ditunjukkan dengan warna coklat yang lebih tinggi, yaitu terlihat pada kelompok ekstrak pegagan. Kelompok rotenon pegagan (RP5) dengan konsentrasi konsentrasi 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ menunjukkan densitas warna coklat yang lebih gelap dibandingkan dengan kelompok rotenone pegagan lainnya (RP1.25 dan RP2.5). Berdasarkan gambar diatas dapat disimpulkan bahwa adanya peningkatan ekspresi IRS pada larva

zebrafish yang diberi rotenon dan pegagan dibandingkan dengan kelompok rotenon.



Gambar 5.6 Histogram perbandingan Ekspresi IRS dengan metode IHC Wholemount pada larva zebrafish usia 9 DPF antara kelompok kontrol, rotenon dan kelompok ekstrak pegagan. Dari grafik diatas Nampak kecendrungan adanya peningkatan ekspresi IRS yang diberikan ekstrak pegagan, walaupun tidak berbeda signifikan dengan kelompok rotenon. Pada konsentrasi ekstrak pegagan 2.5 $\mu\text{g/ml}$ terjadi penurunan ekspresi IRS disbanding dengan kelompok rotenon, akan tetapi tidak berbeda signifikan. Notasi sama menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan.

Pada gambar 5.6 menjelaskan bahwa pemberian rotenon mampu menurunkan ekspresi IRS dibandingkan dengan kelompok kontrol, akan tetapi tidak memberikan perbedaan yang signifikan. Secara umum ekstrak pegagan mampu meningkatkan ekspresi IRS meskipun tidak berbeda signifikan dengan rotenon.

1.6. Hubungan antara Panjang Badan dengan pemberian pegagan pada larva zebrafish

Hasil analisis statistik hubungan antara Panjang Badan dengan pemberian pegagan, menggunakan uji *Pearson Correlation*, dapat dijelaskan pada table berikut:

Tabel 5.4 Hasil analisis statistic uji Pearson Correlation Panjang Badan dengan konsentrasi pegagan (RP1.25, RP2.5 dan RP5) dengan Pada larva zebrafish usia 9 dpf.

Hubungan	Person Correlation	Nilai Sig.	Kesimpulan
Panjang Badan dengan pegagan	0,465	0,081	Ada hubungan yang sedang

Tabel 5.4 Menjelaskan bahwa, berdasarkan derajat hubungan Nilai Pearson Correlation diketahui bahwa Nilai Pearson Correlation yaitu 0,465 termasuk dalam korelasi yang sedang (Nilai Pearson Correlation 0,4 s/d <0,6 = Korelasi sedang). Kesimpulannya adalah terdapat hubungan yang sedang antara panjang badan larva zebrafish usia 9 dpf dengan konsentrasi pegagan yang diberikan. Sehingga dapat diartikan semakin tinggi konsentrasi pegagan yang diberikan, maka dapat meningkatkan panjang badan secara tidak signifikan pada larva zebrafish usia 9 dpf.

1.7. Hubungan antara IGF-1 dan IRS dengan Panjang Badan, Hubungan antara Pegagan dengan IGF-1 dan IRS, Serta Hubungan antara IGF-1 dengan IRS pada Larva *Zebrafish*

1.7.1. Hubungan antara IGF-1 dengan Panjang badan

Hasil analisis statistik hubungan antara IGF-1 dengan Panjang badan menggunakan uji Pearson Correlation, dapat dijelaskan pada table berikut:

Tabel 5.5 Hasil analisis statistic uji Pearson Correlation IGF-1 dengan Panjang badan pada larva zebrafish usia 9 dpf.

Hubungan	Person Correlation	Nilai Sig.	Kesimpulan
IGF-1 dengan Panjang badan	0.887**	0.000	Terdapat hubungan sangat kuat

Tabel 5.5 Menjelaskan bahwa berdasarkan derajat hubungan Nilai Pearson Correlation diketahui bahwa Nilai Pearson Correlation yaitu 0,887 termasuk dalam korelasi sangat kuat (Nilai Pearson Correlation 0,8 s/d 1 = Korelasi sangat kuat). Kesimpulannya adalah terdapat hubungan yang sangat kuat antara ekspresi IGF-1 dengan panjang badan, dapat diartikan semakin meningkat ekspresi IGF-1 maka dapat meningkatkan panjang badan secara signifikan pada larva zebrafish usia 9 dpf.

1.7.2. Hubungan antara IRS dengan Panjang badan

Hasil analisis statistik hubungan antara IRS dengan Panjang badan menggunakan uji Pearson Correlation, dapat dijelaskan pada table berikut:

Tabel 5.6 Hasil analisis statistic uji Pearson Correlation IRS dengan Panjang badan pada larva zebrafish usia 9 dpf.

Hubungan	Person Correlation	Nilai Sig.	Kesimpulan
IRS dengan Panjang badan	0.382	0.060	Terdapat hubungan yang lemah

Tabel 5.6 Menjelaskan bahwa berdasarkan derajat hubungan Nilai Pearson Correlation diketahui bahwa Nilai Pearson Correlation yaitu 0,382 termasuk dalam korelasi yang lemah (Nilai Pearson Correlation 0,2 s/d <0.4 =

Korelasi lemah). Kesimpulannya adalah terdapat hubungan yang lemah antara ekspresi IRS dengan panjang badan, dapat diartikan semakin meningkat ekspresi IRS maka dapat meningkatkan panjang badan secara tidak signifikan pada larva zebrafish usia 9 dpf.

1.7.3. Hubungan antara pegagan dengan Ekspresi IGF-1

Hasil analisis statistik hubungan antara pegagan dengan Ekspresi IGF-1 menggunakan uji Pearson Correlation, dapat dijelaskan pada table berikut:

Tabel 5.7 Hasil analisis statistic uji Pearson Correlation konsentrasi pegagan (RP1.25, RP2.5 dan RP5) dengan ekspresi IGF-1 pada larva zebrafish usia 9 dpf.

Hubungan	Person Correlation	Nilai Sig.	Kesimpulan
pegagan dengan IGF-1	0,728**	0,002	Terdapat hubungan yang kuat

Tabel 5.5 Menjelaskan bahwa berdasarkan derajat hubungan Nilai Pearson Correlation diketahui bahwa Nilai Pearson Correlation yaitu 0,728 termasuk dalam korelasi yang sangat kuat (Nilai Pearson Correlation 0,6 s/d 0,79 = Korelasi kuat). Kesimpulannya adalah terdapat hubungan yang signifikan antara pegagan dengan ekspresi IGF-1, dapat diartikan semakin meningkat pemberian konsentrasi pegagan dapat meningkatkan ekspresi IGF-1 yang semakin tinggi.

1.7.4. Hubungan antara pegagan dengan Ekspresi IRS

Hasil analisis statistik hubungan antara pegagan dengan Ekspresi IRS menggunakan uji Pearson Correlation, dapat dijelaskan pada table berikut :

Tabel 5.8 Hasil analisis statistic uji Pearson Correlation konsentrasi pegagan (RP1.25, RP2.5 dan RP5) dengan ekspresi IRS Pada larva zebrafish usia 9 dpf.

Hubungan	Person Correlation	Nilai Sig.	Kesimpulan
pegagan IRS	0,397	0,142	Ada hubungan yang lemah

Tabel 5.6 Menjelaskan bahwa berdasarkan nilai Pearson Correlation yaitu 0,397 termasuk dalam korelasi lemah (Nilai Pearson Correlation 0,2 s/d <0,4 = Korelasi lemah). Kesimpulannya adalah terdapat hubungan yang lemah antara pegagan dengan ekspresi IRS, dapat diartikan semakin meningkat pemberian konsentrasi pegagan dapat meningkatkan ekspresi IRS secara tidak signifikan.

1.7.5. Hubungan Ekspresi IGF-1 dengan Ekspresi IRS pada larva *zebrafish* usia 9 dpf yang diinduksi rotenon dan ekstrak pegagan.

Hasil analisis statistik hubungan antara Ekspresi IGF-1 dengan Ekspresi IRS menggunakan uji Pearson Correlation, dapat dijelaskan pada table berikut :

Tabel 5.9 Hasil analisis statistic uji Pearson Correlation ekspresi IGF-1 dengan IRS Pada larva *zebrafish* usia 9 dpf.

Ekspresi	Person Correlation	Nilai Sig.	Kesimpulan
IGF-1 dengan IRS	0,527*	0,044	Terdapat hubungan yang sedang

Berdasarkan table 5.7 diatas dapat dijelaskan bahwa berdasarkan derajat hubungan Nilai Pearson Correlation diketahui bahwa Nilai Pearson Correlation yaitu 0,527 termasuk dalam korelasi sedang (Nilai Pearson Correlation 0,4 s/d 0,60 = Korelasi sedang). Kesimpulannya adalah terdapat hubungan sedang antara IGF-1 dengan IRS, dapat diartikan semakin meningkat ekspresi IGF-1 dapat meningkatkan ekspresi IRS secara signifikan.

