

BAB 6

PEMBAHASAN

Pelaksanaan eksplorasi dan penelitian dalam menentukan model *stunting* pada larva *zebrafish*, dengan menggunakan rotenon konsentrasi 12,5 ppb , telah dilaksanakan sesuai dengan standar baku dari WHO yaitu dengan kriteria panjang badan dibandingkan dengan umur dengan nilai Z-Score <-2 SD (Standar Deviasi) (Sudirman, 2008; WHO, 2012; Kemenkes RI, 2016). Kriteria lainnya adalah saat lahir tidak terdapat kelainan kongenital, saat lahir panjang badan normal serta rasio panjang kepala dan badan sama (proporsional) antara kelompok kontrol dengan kelompok larva *zebrafish* stunting, yaitu pada usia 3, 6 dan 9 dpf. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan yang dikemukakan oleh Sorribes et al., 2013 mengenai analogi perbandingan usia *zebrafish* dengan manusia yaitu anak usia 0 hari (bayi baru lahir), 2 tahun dan 8 tahun (Picasso, 2016; Sorribes et al., 2013). Selain itu penelitian ini terkait dengan pengaruh pemberin ekstrak etanol pegagan pada model stunting larva *zebrafish* dengan induksi rotenon melalui ekspresi IGF-1 dan IRS.

1.1. Penentuan Model Stunting Larva *Zebrafish*

Salah satu parameter dari penelitian ini adalah panjang badan, dikarenakan panjang badan merupakan salah satu indikator utama untuk menentukan kondisi *stunting growth*, Terdapat perbedaan kondisi stunting dengan kritinisme. Stunting merupakan retardasi pertumbuhan linier (RPL) pada anak balita, karena malnutrisi jangka panjang, sehingga terjadi hambatan pada pertumbuhan tinggi badan atau panjang badan dibandingkan dengan umur, dengan nilai (z-score) < -2 SD berdasarkan standar baku dari WHO *Child Growth Standart* tahun 2010 (Sudirman, 2008; WHO, 2012; Kemenkes RI, 2016).

Berdasarkan hasil penelitian yang tertera pada table 5.1 dan gambar 5.1 bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,113$) panjang badan antara kelompok rotenon dengan kelompok kontrol pada usia 3 dpf, yang dianalogikan sebagai bayi baru lahir, sedangkan terdapat perbedaan panjang badan ($p=0,000$) antara kelompok kontrol dengan kelompok rotenon pada usia 6 dan 9 dpf, yang dianalogikan sebagai anak usia 2 tahun dan 8 tahun (Sorribes, 2013). Pada usia 6 dpf selisih rata-rata panjang badan kelompok rotenon dengan kelompok kontrol adalah 0.23, dengan standar deviasi 2SD yaitu 0.16, jika dibandingkan $0,23 > 2SD$ (*Stunting*), sehingga dapat disimpulkan bahwa kelompok rotenon memiliki hambatan pertumbuhan panjang badan yang lebih rendah dengan kelompok kontrol.

Hasil penelitian tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa stunting merupakan keadaan awal kelahiran tanpa adanya kelainan kongenital, dan akan baru tampak pada usia 2 tahun (Shrimpton & Kachondham, 2003; Badham *et al.*, 2010; Reinhardt *et al.*, 2014;). Anak dengan stunting memiliki manifestasi jangka panjang saat memasuki usia reproduksi (Prendergast *et al.*, 2014) Mekanisme terjadinya *stunting* berkaitan erat dengan keadaan malnutrisi, gangguan pada hormon pertumbuhan dan inflamasi. Keadaan stunting dapat kembali dalam kondisi normal diperkirakan hanya 3 % saja (Caulfield *et al.*, 2006).

Faktor-faktor terjadinya *stunting* merupakan fenomena yang kompleks dan multikausal. Faktor lingkungan dan faktor genetik dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan anak. Salah satu faktor lingkungan yang terkait adalah penggunaan pestisida yang dapat berdampak negatif pada kesehatan, yaitu dapat menyebabkan penyakit dan gangguan prenatal seperti; bayi lahir dengan BBLR (berat badan lahir rendah), prematur, kecacatan pada bayi,

kematian janin, dan gangguan postnatal seperti; gangguan pertumbuhan dan perkembangan balita dan anak (Costa, 2008; Grandjean *et al.*, 2008; Utami *et al.*, 2013).

Pestisida merupakan bahan toksik yang termasuk *endocrine disrupting chemicals* (EDCs) yaitu bahan kimia yang dapat menyebabkan gangguan proses metabolisme, proses sintesis, transport, sekresi dan kerja hormon-hormon dalam tubuh (Costa, 2008; Grandjean *et al.*, 2008; Utami *et al.*, 2013). Sehingga dapat meningkatkan resiko abnormalitas pada pertumbuhan dan perkembangan embrio. Pada tahun pertama kehidupan salah satu faktor penyebab *linear growth* adalah bahan toksik (Kolsteren, 1996). Salah satu jenis pestisida yaitu rotenon. Rotenon merupakan pestisida alami berasal dari akar tuba (*Derris Elliptica* (*Wellich*) *Benth*), memiliki mekanisme kerja di dalam sel yaitu menghambat kompleks I mitokondria, yang merupakan sumber ROS yang berakibat terjadi kegagalan pembentukan ATP, menimbulkan stres oksidatif dan kematian sel (Sherer *et al.*, 2003). Kegagalan pembentukan ATP tersebut dapat menyebabkan gangguan hormone dan faktor pertumbuhan (IGF-1) berperan penting pada proses pembentukan sel saraf, otot dan tulang yang seharusnya membutuhkan energy yang tinggi dalam pembentukannya, akan tetapi tidak terpenuhi, sehingga memberikan dampak pada pertumbuhan antara lain *stunting*. Induksi rotenon dapat meningkatkan produksi ROS melebihi ambang batas sehingga menyebabkan kerusakan mitokondria (Murphy, 2009), berdasarkan penelitian Wolny (2008), bahwa anak-anak yang mengalami gangguan pada mitokondria menunjukkan perawakan yang pendek (*stunted*) dengan nilai Z score SD-1,97 dengan tingkat kepercayaan 95% (Wolny *et al.*, 2009). Perawakan pendek dapat dikaitkan dengan rendahnya kadar IGF-1 dalam tubuh. Penurunan konsentrasi IGF-1 dapat disebabkan oleh induksi rotenon sebagai bahan toksik yang mampu

menyebabkan kerusakan sel dan gangguan pertumbuhan. Pembatasan protein telah terbukti menurunkan konsentrasi IGF. Stunting merupakan suatu kondisi kekurangan gizi kronis dengan parameter pengukuran tinggi badan atau panjang badan. Gejala malnutrisi kronis adalah kecacatan kognitif, penurunan kemampuan motorik dan fungsi kekebalan tubuh terganggu dan memiliki efek jangka panjang (Reinhardt *et al.*, 2014)

Zebrafish sensitif terhadap paparan bahan-bahan kimia tertentu selama perkembangan awal kehidupan, efek jangka pendek dapat ditimbulkan seperti perubahan detak jantung, gangguan pertumbuhan embrio dan saat *hatching*, sedangkan efek jangka panjang yang dapat ditimbulkan adalah gangguan jantung, endokrin, sistem saraf, sistem imun, menjadi toksisitas kronik, kanker dan kematian (Scholz *et al.*, 2008). Toksikan dalam tubuh *zebrafish* oleh karena paparan bahan kimia, terkait dengan toxicokinetik dalam proses absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi. Dalam hal ini korion *zebrafish* berperan terhadap masuknya molekul atau bahan kimia yang terserap dalam tubuh *zebrafish* (Cheng *et al.*, 2007). Ukuran molekul yang dapat masuk ke dalam korion adalah 3 kDa sedangkan berat molekul dari rotenon adalah 0,394.43 kDa (Creton, 2004; ; Zubairi *et al.*, 2014), sehingga induksi rotenon mempengaruhi pertumbuhan dari *zebrafish* (Dai *et al.*, 2014). Pada penelitian Ridlayanti dan Wijayanti (2016), Induksi rotenon konsentrasi 10 ppb dapat menyebabkan pemendekan panjang pada larva *zebrafish* (Ridlayanti, 2016; Wijayanti, 2016).

6.2 Pengaruh Pemberian Pegagan Terhadap Panjang Badan Larva *Zebrafish*

Berdasarkan hasil penelitian yang tertera pada gambar 5.3 menunjukkan bahwa pegagan dengan konsentrasi kecil dapat meningkatkan panjang badan larva *zebrafish*, berdasarkan uji statistik bahwa konsentrasi pegagan 5 µg/mL menunjukkan efek yang signifikan meningkatkan panjang badan, ditandai dengan

pola garis pertumbuhan pada usia 6 dpf dan 9 dpf mendekati kontrol. Menurut Shrimpton dan Kachondham, 2003 mengemukakan bahwa stunting dapat terlihat pada usia 2 tahun (Shrimpton & Kachondham, 2003).

Berdasarkan Tabel 5.3 membuktikan bahwa rasio panjang kepala dengan panjang badan untuk seluruh kelompok tidak terdapat perbedaan panjang badan dan keseluruhan perbandingan rasio kepala dan panjang badan pada kelompok kontrol dan kelompok rotenone usia 3, 6 dan 9 dpf, bernilai sama yaitu (1:5), yang dapat diartikan bahwa keseluruhan larva dalam kondisi proporsional (tidak kritisisme). kondisi kritisisme merupakan perbandingan postur tubuh antara kepala dengan badan tidak proporsional, dan tinggi badannya kurang dari normal (Syed, 2015), sedangkan stunting merupakan keadaan hambatan pertumbuhan linier pada anak, yang ditandai tinggi badan yang lebih rendah dibandingkan umurnya, dengan keadaan lahir dalam kondisi normal dan akan nampak pada usia 2 tahun (MCA, 2013)

Diperlukannya nutrisi yang adekuat untuk menunjang pertumbuhan dan perkembangan, jika tidak terpenuhi dapat mengakibatkan gangguan pertumbuhan seperti stunting, abnormalitas tulang dan gangguan metabolisme tubuh lainnya (Prentice *et al.*, 2006). Faktor penentu utama dalam pertumbuhan seseorang yaitu dimulai sejak didalam kandungan hingga 2 tahun pertama kehidupan, dengan demikian diperlukannya nutrisi serta suplemen makanan yang dimulai dari masa antenatal hingga postnatal. Berdasarkan penelitian di Ghana, Kongo dan Haiti, bahwa pemberian makanan suplemen lemak (LNS) menunjukkan dampak yang signifikan pada pertumbuhan linear. LNS diberikan pada balita dengan *severe stunting* usia 6 bulan -1 tahun selama > 12 minggu mampu memberikan efek perlindungan pertumbuhan linear selama sampai usia 3 tahun (Prendergast *et al.*, 2014).

Pegagan dalam penelitian ini mampu memberikan proteksi terhadap induksi rotenon pada larva zebrafish. Pegagan mengandung makronutrien, mikronutrien, vitamin, mineral dan fitonutrien yang penting dibutuhkan tubuh, yaitu terdiri dari triterpenoid, karotenoid, glikosida, flavonoid, alkaloid dan minyak atsiri. Pegagan mengandung komponen zat aktif yang terkandung dalam triterpen, karotenoid yaitu antioksidan kuat yang dapat mencegah stress oksidatif, mencegah kanker, meningkatkan sistem imunitas dan penyakit degeneratif lainnya (Chandrika *et al.*, 2015). Nutrisi memiliki peran penting terhadap pertumbuhan linear, melalui beberapa tahapan yaitu: ekspresi gen terkait dengan ligan (faktor transkripsi dan gen lainnya), reseptor hormone dalam mengikat protein, dan sinyal transduksi, serta pertumbuhan sel (Uauy, 2013).

Berdasarkan penelitian Khotimah (2015), *Centella asiatica* mengandung *asiaticoside* yang merupakan senyawa bioaktif sebagai antioksidan dan antiinflamasi, dapat menurunkan ekspresi α -synuclein, motilitas, dan menstabilkan sintesis dopamin pada zebrafish yang dipapar rotenon, dengan mekanisme kerja menghambat caspase karena stress oksidatif (Khotimah *et al.*, 2015).

6.3 Pengaruh Pemberian Rotenone dan Pegagan Terhadap Ekspresi IGF-1 Pada Larva *Zebrafish*

Berdasarkan hasil uji statistik dengan uji *one way anova* dilanjutkan uji *post hoc* Tukey diperoleh hasil bahwa, Terdapat efek yang signifikan ($p=0,000$) antara pemberian ekstrak pegagan terhadap ekspresi IGF-1. Pada gambar 5.4 dan 5.5 terjadi penurunan ekspresi IGF-1 yang diinduksi rotenon, sedangkan efek yang signifikan ditunjukkan pada kelompok perlakuan rotenon dan pegagan konsentrasi 5 $\mu\text{g/mL}$ dengan ekspresi IGF-1, dibandingkan dengan rotenon pegagan dengan konsentrasi kecil. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pegagan dapat meningkatkan ekspresi IGF-1 pada larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon.

IGF-1 berperan penting dalam pertumbuhan linear somatik, pertumbuhan jaringan, berat badan dan diferensiasi. Konsentrasi ambang beredar IGF-1 dibutuhkan dalam pertumbuhan tulang secara normal (Garrone *et al.*, 2002; Yakar *et al.*, 2002; Yanusaga *et al.*, 1998)

Pegagan merupakan salah satu jenis tanaman herbal yang memiliki banyak kandungan makronutrien, mikronutrien, mineral dan fitonutrien. Pegagan memiliki berbagai manfaat salah satunya mengandung triterpenoid yang tinggi, berperan sebagai senyawa antioksidan dan antiinflamasi. Berdasarkan penelitian Salamah dan Farahana (2014), mengenai uji aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol Pegagan dengan metode *fosphomolibdat*, menunjukkan hasil bahwa, ekstrak etanol *Centella asiatica* memiliki aktivitas antioksidan dalam menghambat terjadinya reaksi oksidasi (Salamah dan Farahana., 2014). Selain itu *Centella asiatica* memiliki kandungan bioaktif senyawa anti oksidan yang mampu menagkal radikal bebas dikarenakan induksi dari rotenone, sehingga dengan penambahan anti oksidan tersebut dapat menstabilkan kerja antara IGF-1 sebagai ligan pada reseptornya dan menghasilkan jalur sinyal transduksi lainnya termasuk dalam meningkatkan konsentrasi IGF-1 didalam tubuh (Salamah dan Farahana, 2014). Hal tersebut serupa dengan pernyataan Murphy (2009) bahwa Produksi ROS menimbulkan keadaan patologis dan berdampak pada kerusakan sel, mengakibatkan adanya hambatan reaksi reduksi oksidasi, sehingga menyebabkan gangguan signal dari organel ke sel tubuh terkait (Murphy, 2009).

Berdasarkan penelitian Ferthernety *et al* (2015), bahwa dengan pemberian selama 7 hari ekstrak gabungan Etanol *Acalypha indica* 200mg/kgBB dan *Centella asiatica* 150mg/kgBB pada Tikus spraque dawley, mampu menghambat stress oksidatif, memperbaiki fungsi hati dan peningkatan aktivitas antioksidan pada hati (Ferthernety *et al.*, 2015).

Berdasarkan penelitian Ridlayanti et al., 2016, diperoleh hasil bahwa *Centella asiatica* yang banyak mengandung anti oksidan dapat mengurangi stress oksidatif pada larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon dan terbukti bahwa proses transkripsi dan translasi mRNA BDNF dapat berlangsung dan ekspresi BDNF sebagai salah satu faktor pertumbuhan dapat meningkat, sehingga proses pertumbuhan tulang dapat berjalan dengan normal (Ridlayanti, 2016). Pernyataan tersebut serupa dengan penelitian Arianti et al (2017) menyatakan pemberian pegagan meningkatkan ekspresi OPG dan menurunkan ekspresi RANKL pada larva *zebrafish*, ekspresi OPG digunakan untuk pembentukan tulang, RANKL sebagai indikator osteoclastogenesis (proses penyerapan tulang) (Arianti et al., 2017), hal tersebut didukung pada penelitian Primihasuti et al (2017) menyatakan bahwa pemberian pegagan dapat meningkatkan osifikasi dalam proses pembentukan tulang keseluruhan (Primihasuti et al., 2017).

Terkait dengan penggunaan *zebrafish* dalam penelitian ini, pemberian rotenon pegagan dapat masuk kedalam tubuh *zebrafish* secara keseluruhan, sehingga mempengaruhi peningkatan IGF-1, hal tersebut sesuai dengan penelitian Perrone (2011) menyatakan bahwa, stabilitas rotenon sebagai bahan toksik tidak terganggu, walupun dengan penambahan ekstrak pegagan pada satu medium yang digunakan untuk paparan *zebrafish*, dengan menunjukkan perubahan $\text{PH} \pm 0,15$ ($< 0,2$ Ph) larutan organik. menurut khotimah (2015), antara ekstrak pegagan dengan medium rotenone tidak terdapat interaksi, dikarenakan kedua bahan tersebut memiliki mekanisme kerja yang berbeda. Ekstrak pegagan merupakan asam lemah dengan sifat hidrofobik artinya larut pada air, sehingga dengan mudah masuk kedalam sel dengan difusi melalui membrane, sedangkan rotenon bersifat lipofilik dan bersifat tidak stabil dalam

kondisi basa, sehingga memerlukan mekanisme khusus untuk dapat masuk ke dalam sel (Khotimah *et al.*, 2015).

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

Hasil penelitian pada gambar 5.6 dan 5.7 menunjukkan nilai integrated density IRS lebih rendah pada kelompok yang diinduksi rotenon dan nampak kecenderungan adanya peningkatan ekspresi IRS yang diberikan ekstrak pegagan, walaupun tidak berbeda signifikan dengan kelompok rotenon. Sedangkan pada konsentrasi ekstrak pegagan 2.5 µg/ml terjadi penurunan ekspresi IRS dibandingkan dengan kelompok rotenon, akan tetapi tidak berbeda signifikan. Penurunan tersebut dapat dikarenakan variasi dari individu, efek pemberian konsentrasi rotenon pegagan dapat berbeda pada setiap individu dan dapat memberikan respons yang berlainan terhadap paparan yang diberikan. Faktor genetik juga dapat berpengaruh terhadap penurunan ekspresi IRS. Selain itu jalur IGF-1 tidak selalu melalui IRS, akan tetapi memungkinkan terjadi *cross talk* yaitu memacu peran jalur lain dalam transduksi sinyal yaitu aktivasi jalur Glut-4, aktivasi PI3Kinase, aktivasi Akt atau aktivasi Raf, keseluruhan jalur tersebut juga berperan dalam proliferasi sel, sel survival dan memediasi pertumbuhan tulang (Kurosu *et al.*, 2005)

IRS merupakan efektor utama bagi reseptor insulin dan merupakan reseptor substrat yang dapat menjalankan fungsinya dengan baik dengan mengadakan fosforilasi tyrosine kinase pada substrat intraseluler, dan mengikat molekul sinyal lainnya, jika ikatan antara ligan dengan reseptornya berjalan dengan optimal (Ozoe *et al.*, 2013). IRS sebagai jalur sinyal transduksi membantu dalam proses metabolisme tubuh, termasuk pada proses sintesis

glikogen, protein, lipid, pertumbuhan, proliferasi sel serta ekspresi gen dan juga berkontribusi dalam proses traslokasi Glut-4 ke membrane sel (Haruta *et al.*, 2000; Bikle *et al.*, 2015)

Gangguan pertumbuhan dapat menyebabkan kecacatan pada signal dari reseptor, sehingga dapat menghambat proses fosforilasi IRS-1 untuk dapat membentuk jalur signal transduksi dan terjadi ketidakpekaan hormon pertumbuhan serta mutasi gen STAT5b yang berakibat pertumbuhan tidak normal pada fase postnatal serta rendahnya konsentrasi IGF-1, IGFBP-3 dan IRS(Kofoed *et al.*,2003). Gangguan pertumbuhan tersebut dapat dikarenakan bahan toksik seperti rotenon, yang bekerja dalam menghambat kompleks I mitochondria sehingga menimbulkan stress oksidatif dengan ditandai produksi ROS melebihi anti oksidan, menyebabkan kadar ATP menurun, sehingga terjadi kerusakan sel, kerusakan mitochondria dan kerusakan DNA (Li, Nianyu *et al.*, 2003; Xu *et al.*,2016; Zima *et al.*,2001). Kurangnya kadar ATP, menyebabkan kebutuhan energy dalam proses metabolisme dan mitogenik terhambat. Hambatan tersebut dapat menyebabkan konsentrasi IRS-1 berkurang dan ditunjukkan adanya gangguan pertumbuhan dan penurunan berat badan (Gual *et al.*, 2005).

Penambahan ekstrak pegagan mampu memberikan proteksi terhadap kerusakan yang diakibatkan oleh ROS. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Rahman *et al* (2013) bahwa fraksi air dan etanol pegagan mampu menghambat oksidasi (Rahman *et al.*,2013).

6.5 Hubungan antara Panjang Badan dengan Pemberian Rotenon dan pegagan pada larva *zebrafish*

Berdasarkan hasil penelitian pada Tabel 5.4 menyatakan bahwa terdapat hubungan antara pertambahan panjang badan dengan pemberian pegagan pada larva *zebrafish*.

Peran gizi sangat dibutuhkan dalam pertumbuhan dan perkembangan anak. Permasalahan kekurangan gizi dapat berakibat pada kegagalan pertumbuhan linier (*stunting*), retardasi pertumbuhan, gangguan pertumbuhan fisik, gangguan perkembangan saraf, penyakit metabolik yang berlanjut hingga dewasa dan terhambat memperoleh keturunan pada perempuan. Intervensi yang tepat dilakukan untuk menghindari terjadinya kegagalan pertumbuhan linier (*stunting*) dapat dimulai dari awal periode konsepsi. Pemenuhan nutrisi yang baik akan dapat menstabilkan pola pertumbuhan linier dan massa tubuh anak. (Prendergast *et al.*, 2014)

Pegagan salah satu tanaman herbal yang memiliki toksisitas rendah dan memiliki kandungan nutrisi lengkap yaitu makronutrien karbohidrat, dan protein, Mikronutrien seperti vitamin dan mineral, serta fitonutrien (flavonoid, triterpen, karotenoid, alkaloid dan glikosida). Pegagan memiliki manfaat salah satunya mengandung triterpenoid yang tinggi, dan *asiaticoside* senyawa bioaktif sebagai antioksidan dan antiinflamasi mampu menghambat terjadinya reaksi oksidasi akibat paparan rotenon (Chippada *et al.*, 2011; Hashim, 2011).

Dengan pemberian nutrisi yang baik maka dapat memberikan efek yang baik terhadap sistem didalam tubuh baik, termasuk hormone dan faktor pertumbuhan (IGF-1). IGF-1 (*Insulin Like Growth Factor*), memiliki peran penting dalam regulasi perkembangan dan pertumbuhan somatik dari vertebrata saat prenatal dan postnatal, serta sigal IGF berperan terhadap proliferasi sel, diferensiasi, migrasi, menghambat apoptosis, kelangsungan hidup sel, dan mengaktifkan gen dalam siklus sel (Moriyama *et al.*, 2000). Aktivitas IGF-1 tidak terlepas peran dari IRS, dalam pengaturan metabolisme, umur dan ukuran organisme. Akan tetapi IGF dan IGF-1R memiliki peran utama dalam pertumbuhan saat prenatal dan postnatal, termasuk pada otot, tulang rawan, dan

diferensiasi tulang lainnya (Chitnis *et al.*, 2008). IRS memiliki peran sebagai efektor dalam sinyal transduksi dalam membentuk berbagai jalur kompleks. Jika terjadi gangguan seperti paparan bahan toksik dalam hal ini rotenon akan dapat menghambat jalur sinyal yang lain, kecacatan dari signal, reseptor dan mutasi gen, maka dapat mengganggu ekspresi IRS (Kofoed *et al.*, 2003).

6.6 Hubungan antara Ekspresi 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* usia 9 dpf.

Berdasarkan hasil penelitian bahwa terdapat hubungan yang kuat antara ekspresi IGF-1 dengan panjang badan pada larva zebrafish usia 9 dpf, semakin meningkat ekspresi IGF-1 dapat meningkatkan panjang badan secara signifikan. Hal tersebut dikarenakan IGF-1 secara langsung memiliki peran dalam memediasi pertumbuhan dan perkembangan sel somatik, termasuk pada otot dan tulang, saat prenatal dan postnatal (Wood *et al.*, 2005). Signaling IGF-1 juga berperan dalam menentukan pola skeletal termasuk bentuk dan ukuran tulang (Yanusaga *et al.*, 1998; Garrone *et al.*, 2002; Bikle *et al.*, 2015). Terkait dengan penggunaan *zebrafish* sebagai hewan coba pada penelitian ini, menurut Wood *et al.* (2005) menyatakan bahwa konsentrasi IGF-1 pada *zebrafish*, menunjukkan peningkatan drastis di fase larva dibandingkan fase embrio, karena tahap larva telah terjadi pertumbuhan anterior kepala (Wood *et al.* 2005). Sehingga pada pengamatan hasil IHC menggunakan *Image J* pada penelitian ini, bagian kepala larva terlihat lebih kuat ekspresi IGF-1.

Berdasarkan hasil penelitian bahwa terdapat hubungan yang lemah antara ekspresi IRS dengan panjang badan larva *zebrafish*, dapat diartikan bahwa peningkatan ekspresi IRS diikuti dengan peningkatan panjang badan secara tidak signifikan. Secara Biologis IRS yang terfosforilasi dengan tirosin kinase akan mengaktifkan berbagai jalur signal seperti Pi3K berfungsi dalam

transporter glukosa/ Glut-4 dalam pemenuhan nutrisi pertumbuhan pembuluh darah, tulang, otak dan jaringan lainnya. Jalur Ras/MAPK secara umum berfungsi dalam proses pertumbuhan dan proliferasi sel dan Jalur Cbl/CAP terkait dengan peran Glut-4 pada proses translokasi ke membrane sel (Haruta *et al.*, 2000; Bikle *et al.*, 2015). Oleh karena itu, IRS secara tidak signifikan meningkatkan panjang badan, karena tidak secara langsung berperan sebagai mediator dalam pertumbuhan seperti yang diperankan oleh IGF-1, akan tetapi melalui proses ikatan antara ligan (IGF-1) dengan reseptor (IGF-1R) terlebih dahulu sehingga IRS dapat teraktivasi dan membentuk berbagai jalur sinyal transduksi. IGF-1R berbentuk dimer berhubungan dengan ikatan sulfide, jika bagian sub unit β yang berada menembus membrane mengalami autofosforilasi akan memicu aktivitas reseptor membentuk jalur signal yaitu jalur Shc dan Jalur IRS (Laron, 2001). Selain itu terdapat faktor lain yang dapat mempengaruhi ekspresi IRS, salah satunya paparan bahan toksik (rotenon) mengurangi aktivitas IR kinase (*Down-regulation*), mengakibatkan penurunan signal, serta aktifitas reseptor dan ligan menurun, sehingga mengganggu proses pertumbuhan dan perkembangan sel (Papaconstantinou, 2009). Untuk meningkatkan regulasi reseptor maka jalur lain yang akan berperan, seperti jalur Raf/ Akt (Conti *et al.*, 2011).

Berdasarkan hasil penelitian bahwa penambahan ekstrak pegagan mampu meningkatkan ekspresi IGF-1 dan IRS yang diinduksi rotenon pada lava *zebrafish* usia 9 dpf. Semakin tinggi pemberian konsentrasi ekstrak pegagan RP5 (rotenon dan pegagan konsentrasi 5 $\mu\text{g/mL}$) dapat meningkatkan ekspresi IGF-1 dan IRS pada lava *zebrafish* usia 9 dpf. Pemberian pegagan dengan kandungan antioksidan seperti flavonoid, vitamin C, Vitamin E dan lain sebagainya mampu menetralsir efek ROS, dengan menyeimbangkan antara prooksidan dan

antioksidan, sehingga kerusakan sel akibat ROS yang disebabkan oleh induksi rotenon dapat dihindari. (Bender *et al.*, 2009; Kefer *et al.*, 2009; Makker *et al.*, 2009; Milczarek *et al.*, 2010). Rotenon merupakan bahan toksik bekerja menghambat kompleks 1 mitokondria sehingga produksi ROS meningkat dan menimbulkan stress oksidatif (Murphy, 2009). Peningkatan ROS dan terjadinya stress oksidatif dalam jangka waktu lama dengan konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan signal *downregulation* dengan menurunkan respon insulin, sehingga terjadi gangguan proses diferensiasi, proliferasi dan jalur siklus sel. Gangguan tersebut yang dapat menghambat modulasi pertumbuhan termasuk pada otot rangka dan tulang (Papaconstantinou, 2009; Bikle *et al.*, 2015). Peningkatan ROS mampu menghambat proses signaling, gangguan stimulus pertumbuhan, survival sel dan gangguan homeostasis (Izyumov *et al.*, 2010).

Berdasarkan hasil penelitian terdapat hubungan antar ekspresi IGF-1 dengan IRS yang diinduksi rotenon pada lava *zebrafish* usia 9 dpf. Interaksi antara IGF-1 dengan IRS memodulasi pertumbuhan tulang. Pertumbuhan linier (panjang badan/ tinggi badan) dipengaruhi dengan kadar IGF-1, jika konsentrasi IGF-1 kurang didalam tubuh maka akan mengakibatkan gangguan pertumbuhan contohnya yaitu *stunting*. Demikian pula dengan IRS, IRS merupakan efektor utama dalam melaksanakan transduksi sinyal, proses tersebut terkait dengan peranan IGF-1 dengan IGFR-1 yang kemudian terfosforilasi dengan IRS1 selanjutnya mengaktifkan jalur signalling yaitu Jalur PI3-K (*Phosphatidylinositol 3 kinase*), kemudian mengaktifkan Akt, selanjutnya mengaktifkan GLUT-4 dan GLUT-1. Jalur ini memiliki fungsi sebagai transporter glukosa termasuk GLUT-1 dari sitoplasma menuju membran sel, translokasi GLUT-4 dan memfasilitasi transport glukosa masuk ke dalam sel, serta berperan dalam sintesis protein, glikogen dan lipid. Pada penelitian Primaditya *et al* (2017) dan Yuningsih *et al*

(2017), Menyatakan bahwa terdapat hubungan antara ekspresi Glut-4 dengan Osteocalcin serta hubungan antara ekspresi Glut-1 dengan Osteocalcin pada larva zebrafish usia 9 dpf (Primaditya *et al* 2017; Yuningsih *et al* 2017). Fosforilasi IRS-1 mengaktifkan jalur signal transduksi menuju Raf, menuju Jalur MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) mengaktifkan ERK yang memiliki peran penting dalam menentukan hasil signal ekstraseluler ke dalam sel, ERK $\frac{1}{2}$ dan Ki67 pada nucleus terkait dengan proses transkripsi mRNA pada ribosom, jalur kompleks tersebut berperan sebagai anti apoptosis, proliferasi sel dan diferensiasi sel. Protein Ki67 berada pada fase aktif dari siklus sel yaitu fase (G1,S,G2 dan mitosis) dan tidak terdapat pada fase G0 (fase istirahat) (Scholzen & Gedes). Pada penelitian Zakiah *et al* (2007) terdapat hubungan antara ekspresi ERK $\frac{1}{2}$ dan Ki67, peningkatan ekspresi menunjukkan proliferasi yang tinggi (Zakiah *et al*, 2007). IGF-1 dengan IGF-1R berperan dalam menstimulasi Ikatan OPG dan RANKL terhadap osteoblast memproduksi osteocalcin yang berperan dalam formasi dan osifikasi tulang. Ikatan OPG dan RANKL menghambat ikatan antara RANKL dengan RANK, sehingga tidak terjadi pembentukan osteoklas (resorpsi tulang), keseimbangan antara proses formasi dan reasorpsi dapat meningkatkan pertumbuhan tulang yang normal. Berdasarkan hasil penelitian Arianti *et al* (2017) dan Primihastuti *et al* (2017), Terdapat hubungan antara ekspresi OPG dan RANKL serta hubungan osifikasi tulang dengan osteoclastogenesis pada larva *zebrafish* usia 9 dpf.

Faktor pertumbuhan lain yang terkait dengan proses pertumbuhan adalah VEGF berperan dalam vaskulogenesis dan angiogenesis pertumbuhan pembuluh darah embrio. VEGF berikatan dengan reseptornya VEGFR-2 mengaktifkan reseptor tirosin kinase dalam memperkuat sinyal autofosforilasi. Pada penelitian

Wardani *et al* (2017) terdapat hubungan ekspresi VEGF dengan ekspresi VEGFR-2 pada larva zebrafish usia 9 dpf (Wardani *et al.*, 2017).

Interaksi antara IGF-1 dengan IRS, dapat dikaitkan dengan *up regulation*, yaitu adanya peningkatan efek secara biologis, diperantarai adanya peningkatan jumlah reseptor, dengan demikian dapat berjalan dengan optimal ikatan antara ligan dan reseptor, seperti peran dari IGF-1 efektif mengikat IGF-1R sub unit dalam melaksanakan jalur signal dengan bantuan posporilasi dari IRS (LeRoith *et al.*, 2003). Sehingga jalur signal mediator pertumbuhan lainnya dapat berjalan dengan lancar dan ditandai dengan meningkatkan ekspresi dari IGF-1, IRS, VEGF, VEGFR-2, Glut-4, Glut-1, ERK $\frac{1}{2}$, Ki67, Osteocalcin, osteopotegrin (OPG), RANKL dan Osifikasi tulang.

6.7 Implikasi Asuhan Kebidanan Berdasarkan Hasil Penelitian.

Pemantauan pertumbuhan dan perkembangan anak sedang dini menentukan kualitas setiap individu dimasa depan. Kualitas anak ditentukan mulai dari prenatal, natal dan postnatal, termasuk pertumbuhan dan perkembangan anak pada masa balita. Faktor penentu utama dalam pertumbuhan seseorang yaitu dimulai sejak didalam kandungan hingga 2 tahun pertama kehidupan. Periode tersebut merupakan periode kritis dan proses pertumbuhan berjalan dengan cepat, baik pertumbuhan otak dan organ tubuh lainnya. Pada periode tersebut gangguan pertumbuhan sering terjadi akibat kekurangan nutrisi, sehingga menyebabkan penurunan potensi tinggi anak, yang terkait dengan *stunting* (Prendergast *et al.*, 2014).

Stunting merupakan gangguan pertumbuhan linier pada balita akibat malnutrisi dalam jangka waktu lama (Kemenkes RI, 2016). Memiliki efek jangka pendek terhadap peningkatan angka kesakitan, kecacatan fisik maupun psikologis, bahkan kematian anak. Sedangkan efek jangka panjang yaitu

perawakan pendek saat dewasa, resiko obesitas, gangguan metabolik, penyakit kardiovaskuler, penurunan kognitif, intelektual dan produktivitas, serta gangguan kesehatan reproduksi (Badham *et al.*,2010; Prendergast *et al.*, 2014). Kondisi stunting dapat dimulai dari 1000 hari pertama kehidupan yaitu dari fase konsepsi sampai dengan anak usia 2 tahun dan jika tidak tertangani dengan baik maka dapat berlanjut hingga kegenerasi berikutnya (Prendergast *et al.*, 2014). Berbagai faktor yang dapat menyebabkan *stunting*, yaitu faktor genetik, faktor maternal seperti; nutrisi yang tidak adekuat selama kehamilan, pemberian ASI tidak eksklusif, jarak kelahiran yang terlalu dekat dan lain sebagainya, faktor lingkungan terkait dengan bahan toksik (rotenon) dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan (Badam & Sweet, 2010).

Hasil penelitain eksperimental ini terkait dengan induksi rotenon dapat membuat model *stunting* pada larva *zebrafish* dan ekstrak pegagan mampu meningkatkan ekspresi faktor pertumbuhan IGF-1 dan IRS pada larva *zebrafish*. Pada dasarnya penentuan phatomekanisme terjadinya *stunting* multifaktor, oleh karena itu diperlukan pengembangan penelitian lanjutan terkait faktor penyebab stunting lainnya, baik secara invitro, sampai ke tingkat hewan coba yang lebih tinggi.

Strategi Intervensi *stunting* dari WHO , yaitu mencanangkan pendekatan aksi nutrisi essensial (*The Essential Nutrition Actions/ENAs*) dengan tujuan menurunkan angka kematian bayi dan balita, peningkatan pertumbuhan dan perkembangan fisik dan mental dan peningkatan produktivitas. Sebagai target intervensi yaitu pada Bayi usia 0-5 bulan, Bayi dan anak usia 6 sampai 23 bulan, wanita usia reproduktif, wanita hamil dan intervensi secara global. Melalui pemberian ASI eksklusif selama 6 bulan sampai dengan 2 tahun, pemberian makanan tambahan mulai dari 6 bulan, pemberian nutrisi yang tepat pada anak

dengan kondisi sakit dan malnutrisi pada anak, pemberian vitamin A dan Zat besi yang cukup pada wanita dan anak-anak, dan pemberian yodium yang cukup pada seluruh anggota keluarga (WHO,2013).

Intervensi *stunting* tersebut sebagian besar telah dilaksanakan dalam lingkup pelayanan kebidanan di Indonesia. Bidan sebagai ujung tombak pelayanan kesehatan ibu dan anak, memiliki peran dalam penurunan prevalensi balita *stunting*. Upaya yang dapat dilakukan bidan dalam optimalisasi asuhan kebidanan melalui pemberian pelayanan kesehatan primer langsung kepada masyarakat. Strategi pertama yaitu persiapan konsepsi, pemantauan asupan nutrisi diperlukan sebelum kehamilan. Fase prenatal, diperlukan nutrisi yang adekuat untuk pertumbuhan janin, sehingga bayi yang dilahirkan dalam keadaan normal dan pemberian mikronutrien, suplemen yang cukup untuk mencegah anemia defisiensi besi selama prenatal serta pemberian konseling, pada fase menyusui (Pemberian ASI secara eksklusif 0-6 bulan dan dilanjutkan hingga 2 tahun serta pemberian makanan tambahan pada usia 6 bulan). Bidan lebih berperan dalam melakukan monitoring dan evaluasi pertumbuhan dan perkembangan balita secara rutin dan berkesinambungan. Selama ini aplikasi dipelayanan kebidanan untuk tumbuh kembang masih terfokus hanya pada penimbangan berat badan saja, oleh karena itu diperlukan pengukuran tinggi atau panjang badan dengan tepat pada bayi dan balita, untuk mengetahui gangguan pertumbuhan secara dini. Teknik pengukura tinggi badan yang benar yaitu, untuk anak usia 0-2 tahun dilakukan pengukuran dengan posisi tidur terlentang dan pada anak usia > 2 tahun pengukuran dilakukan dengan posisi berdiri. Selanjutnya dilakukan penilaian dan pemantauan panjang badan sesuai dengan usia, menggunakan kurva pertumbuhan dari WHO, untuk mendeteksi secara dini apakah anak dalam kondisi *stunting* atau tidak (WHO,2009; IDAI,

2017). Selain itu diperlukan stimulasi dini perkembangan anak, ditujukan untuk mendeteksi dini gangguan pertumbuhan dan perkembangan anak (Kognitif, motorik kasar dan halus).

