

**PENGARUH PEMBERIAN ASAM FOLAT PADA FASE PRE-NATAL
TERHADAP PANJANG BADAN DAN RASIO PANJANG KEPALA DENGAN
PANJANG BADAN ZEBRAFISH MODEL STUNTING DENGAN INDUKSI
ROTENON**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



**Oleh :
Anindita Nurul Fauziah
NIM 15507010111028**

**PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Akademik.....	5
1.4.2 Manfaat Praktik.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 <i>Stunting</i>	7
2.1.1 Definisi.....	7
2.1.2 Faktor Penyebab <i>Stunting</i>	10
2.1.3 Mekanisme <i>Stunting</i>	12
2.1.4 Dampak <i>Stunting</i>	13
2.1.5 Perbedaan <i>Stunting</i> dengan Kretinisme.....	13
2.2 <i>Zebrafish</i>	14
2.2.1 Karakteristik <i>Zebrafish</i>	14
2.2.2 Tahap Perkembangan <i>Zebrafish</i>	16
2.2.3 Faktor Lingkungan yang Mempengaruhi Perkembangan <i>Zebrafish</i>	19
2.2.4 <i>Zebrafish</i> sebagai Model Penelitian.....	21
2.3 Rotenon.....	22
2.3.1 Karakteristik Rotenon.....	22
2.3.2 Toksisitas.....	23
2.3.4 Mekanisme Kerja.....	23
2.4 Asam Folat.....	24
2.4.1 Karakteristik Asam Folat.....	24
2.4.2 Manfaat Asam Folat.....	25
2.4.3 Mekanisme Kerja Asam Folat.....	26
2.4.4 Efek Antioksidan Asam Folat.....	26
BAB 3 KERANGKA KONSEP PENELITIAN.....	28
3.1 Kerangka Konsep.....	28

3.2	Keterangan Kerangka Konsep Penelitian.....	29
3.3	Hipotesis Penelitian.....	29
BAB 4 METODE PENELITIAN.....		31
4.1	Desain Penelitian.....	31
4.2	Populasi dan Sampel Penelitian.....	31
4.2.1	Populasi Penelitian.....	31
4.2.2	Sampel Penelitian.....	31
4.3	Tempat dan Waktu Penelitian.....	32
4.4	Variabel Penelitian.....	32
4.5	Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	32
4.6	Definisi Operasional.....	32
4.7	Pengolahan dan Analisis Data.....	34
4.8	Alat dan Bahan.....	34
4.8.1	Alat dan Bahan Pembuatan Larutan Asam Folat.....	34
4.8.2	Alat dan Bahan Pembuatan Medium Embrionik (E3).....	34
4.8.3	Alat untuk Pengukuran Panjang Badan dan Rasio Panjang Kepala dengan Panjang Badan.....	35
4.9	Prosedur Penelitian.....	35
4.9.1	Pengambilan dan Perawatan Embrio.....	35
4.9.2	Pembuatan Medium Embrionik.....	35
4.9.3	Pembuatan Larutan Rotenon.....	36
4.9.4	Pembuatan Larutan Asam Folat.....	36
4.9.5	Pemberian Larutan Rotenon dan Asam Folat.....	37
4.9.6	Pengukuran Panjang Badan.....	38
4.9.7	Pengukuran Rasio Panjang Kepala dengan Panjang Badan.....	38
4.10	Alur Penelitian.....	39
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....		40
5.1	Hasil Studi Eksplorasi.....	40
5.1.1	<i>Survival Rate</i> dan <i>Hatching Rate</i>	40
5.1.2	Hasil Pengukuran Rerata Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i>	41
5.2	Hasil Penelitian.....	42
5.2.1	<i>Survival Rate</i> dan <i>Hatching Rate</i>	42
5.2.2	Hasil Pengukuran Rerata Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> antara Kelompok Kontrol dengan Kelompok Rotenon pada Usia 3, 6 dan 9 dpf.....	43
5.2.3	Hasil Pengukuran Rerata Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> antara Kelompok Kontrol dengan Kelompok Rotenon Asam Folat pada Usia 3, 6 dan 9 dpf.....	44
5.2.4	Hasil Pengukuran Rasio Panjang Kepala dengan Panjang Badan.....	47
BAB 6 PEMBAHASAN.....		49
6.1	Pengaruh Pemberian Rotenon terhadap Panjang Badan.....	49
6.2	Pengaruh Pemberian Asam Folat terhadap Panjang Badan.....	51
6.3	Pengaruh Pemberian Rotenon Asam Folat terhadap Rasio Panjang Kepala dengan Panjang Badan.....	53
6.4	Implikasi terhadap Bidang Kedokteran.....	55
6.5	Keterbatasan Penelitian.....	56

BAB 7 KESIMPULAN

57

7.1 Kesimpulan

57

7.2 Saran

57

DAFTAR PUSTAKA

58

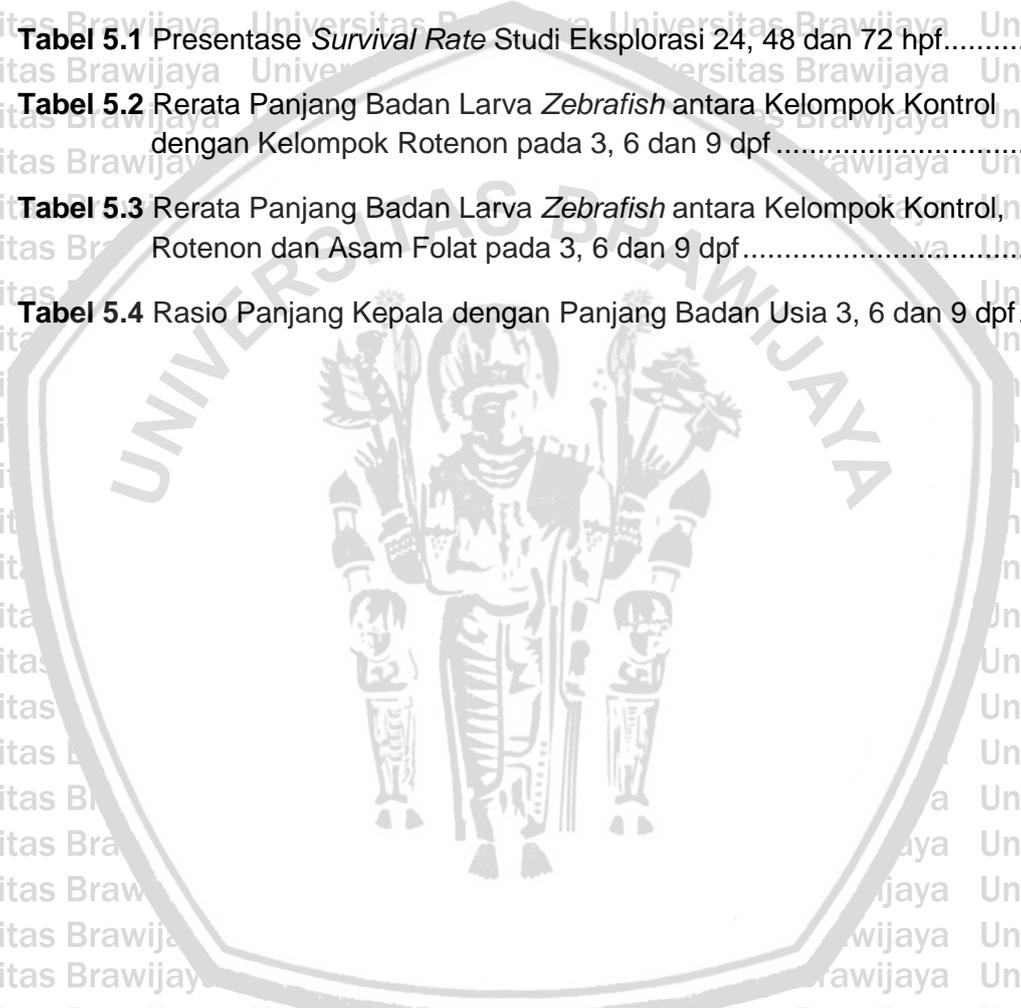
LAMPIRAN

64



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Klasifikasi <i>Zebrafish</i>	14
Tabel 2.2 Perkembangan <i>Zebrafish</i>	17
Tabel 4.1 Konsentrasi Rotenon dan Asam Folat	37
Tabel 5.1 Presentase <i>Survival Rate</i> Studi Eksplorasi 24, 48 dan 72 hpf.....	40
Tabel 5.2 Rerata Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> antara Kelompok Kontrol dengan Kelompok Rotenon pada 3, 6 dan 9 dpf	43
Tabel 5.3 Rerata Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> antara Kelompok Kontrol, Rotenon dan Asam Folat pada 3, 6 dan 9 dpf.....	46
Tabel 5.4 Rasio Panjang Kepala dengan Panjang Badan Usia 3, 6 dan 9 dpf...	47



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Pengukuran Antropometri.....	8
Gambar 2.2 Grafik Pertumbuhan <i>Height-for-Age</i> dan Interpretasi Grafik anak perempuan.....	9
Gambar 2.3 Grafik Pertumbuhan <i>Height-for-Age</i> dan Interpretasi Grafik anak laki-laki.....	10
Gambar 2.4 Peran IGF-1.....	13
Gambar 2.5 Perbedaan <i>Zebrafish</i> Jantan dan Betina.....	15
Gambar 2.6 Anatomi <i>Zebrafish</i>	15
Gambar 2.7 Ciri-ciri <i>Zebrafish</i>	18
Gambar 2.8 Perbandingan Badan (SL) dengan usia (dpf) pada <i>Zebrafish</i>	19
Gambar 2.9 Kurva Pertumbuhan Larva <i>Zebrafish</i>	19
Gambar 2.10 Struktur Molekul Rotenon.....	23
Gambar 2.11 Mekanisme Toksisitas Rotenon.....	24
Gambar 2.12 Struktur Molekul Asam Folat.....	25
Gambar 2.13 Jalur Asam Folat dan Homosistein.....	26
Gambar 5.1 Grafik <i>Hatching Rate</i> Larva <i>Zebrafish</i> pada Studi Eksplorasi.....	41
Gambar 5.2 Grafik <i>Hatching Rate</i> Penelitian.....	42
Gambar 5.3 Grafik Rerata Panjang Badan antara Kelompok Kontrol dengan Kelompok Rotenon.....	44
Gambar 5.4 Grafik Rerata Panjang Badan antara Kelompok Kontrol, Rotenon dan Asam Folat pada Usia 3, 6 dan 9 dpf.....	45

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Keterangan Kelaikan Etik.....	64
Lampiran 2 Surat Keterangan Bebas Plagiasi.....	65
Lampiran 3 <i>Independent Sample T-test</i> Panjang Badan Larva Zebrafish Usia 3, 6 dan 9 dpf.....	66
Lampiran 4 Uji <i>One Way ANOVA</i> Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish antara Kelompok Rotenon dengan Kelompok Asam Folat Usia 3, 6 dan 9 dpf.....	68
Lampiran 5 Cara Mengukur Panjang Badan dan Rasio Panjang Kepala dengan Panjang Badan Menggunakan <i>Software Image Raster</i> versi 3.0	74
Lampiran 6 Dokumentasi Penelitian	75



DAFTAR SINGKATAN

AFB1	: Aflatoxin B1
ATP	: Adenosine Triphosphate
BBLR	: Berat Badan Lahir Rendah
DHF	: dihydrofolate
DHFR	: DHF reductase
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DMT	: Densitas Mineral Tulang
DNA	: Deoxyribo Nucleic Acid
dpf	: days post fertilization
EDCs	: Endocrine Disrupting Compounds
GAKI	: Gangguan Akibat Kekurangan Iodium
GH	: Growth Hormone
GSH	: Glutathion
H ₂ O ₂	: Hydrogen Peroxide
HAZ	: Height-for-Age Z-score
hpf	: hours post fertilization
HPK	: Hari Pertama Kehidupan
HR	: Hatching rate
IGF-1	: Insuline Growth Factor – 1
IL-6	: Interleukin 6
IUGR	: Intra Uterine Growth Retardation
KN	: Kontrol Negatif
KP	: Kontrol Positif
MDA	: malondialdehyde
MGRS	: Multicentre Growth Reference Study
MTHFR	: methylenetetrahydrofolate reductase
NADH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide + Hydrogen

NTD	: Neural Tube Defect
OPG	: Osteoprotegerin
PB	: Panjang Badan
PK	: Panjang Kepala
ppb	: <i>part per billion</i>
PSG	: Pemantauan Status Gizi
RAF	: Rotenon+Asam Folat
RANK	: <i>receptor activator of nuclear kappa beta</i>
RANKL	: <i>receptor activator of nuclear kappa beta ligand</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPJMN	: Rencana Pembangunan Jangka Menengah Nasional
SD	: Standart Deviasi
SL	: <i>Standard Length</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
SR	: <i>Survival Rate</i>
TAC	: <i>Total Antioxidant Capacity</i>
THF	: <i>tetrahydrofolate</i>
TNF α	: <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR-2	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor -2</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH PEMBERIAN ASAM FOLAT PADA FASE PRE-NATAL
TERHADAP PANJANG BADAN DAN RASIO PANJANG KEPALA
DENGAN PANJANG BADAN ZEBRAFISH MODEL STUNTING DENGAN
INDUKSI ROTENON**

Oleh :

Anindita Nurul Fauzlah
155070101111028

Telah diuji pada
Hari : Jum'at
Tanggal : 28 Desember 2018

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji-I,



dr. Ihda Dian Kusuma, M. Blomed
NIK 2011068408082001

Pembimbing-I/Penguji-II,



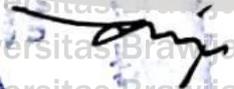
Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M. Kes
NIP 197511252005012001

Pembimbing-II/Penguji-III,



dr. Catur Ari Setianto, Sp.S
NIK 2016098101291001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Kedokteran,



dr. Tri Wahyu Astuti, M.Kes. Sp.P(K)
NIP 196310221996012001

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul "Pengaruh Pemberian Asam Folat Pada Fase Pre-Natal Terhadap Panjang Badan dan Rasio Panjang Kepala dengan Panjang Badan *Zebrafish* Model *Stunting* dengan Induksi Rotenon".

Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi akibat induksi rotenon terhadap terjadinya *stunting* larva *zebrafish* dan efek dari pemberian asam folat pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M. Kes., sebagai pembimbing pertama yang telah dengan sabar telah membimbing penulisan dan analisis data, dan senantiasa memberi semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
2. dr. Catur Ari Setianto, Sp.S., sebagai pembimbing kedua yang dengan sabar telah membimbing penulisan dan analisis data, dan senantiasa memberi semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
3. dr. Ihda Dian Kusuma, M.Biomed., sebagai Ketua Tim Penguji Ujian Tugas Akhir yang telah memberikan masukan untuk menyempurnakan naskah Tugas Akhir.
4. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes., selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
5. dr. Tri Wahyu Astuti, M.Kes., Sp.P(K), sebagai Ketua Program Kedokteran yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di PS Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
6. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB, yang telah membantu melancarkan urusan administrasi, sehingga penulis dapat melaksanakan Tugas Akhir dengan lancar.
7. Ibu Ferrida, sebagai analis di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian ini.
8. Pak Udin, sebagai petugas di Laboratorium Budidaya Ikan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian ini.

9. Yang tercinta Ayah Drs. Edi Sumedi dan Mama Poedji Lestari, S.Pd., serta kakak Nisrina Luthfi Rhosidah atas segala doa, motivasi, pengertian, dan kasih sayangnya.

10. Teman-teman Tim *Stunting zebrafish* (Findie Aminatuzzuhriah, Chandra Dewi Saraswati, Nabila Zerlina Griselda, Geovan Hananto, dan M. Rizal Shidiq) yang telah bersama-sama berjuang sehingga dapat melewati tahap ini dengan baik

11. Teman-teman tersayang Findie, Chandra, Riri, Fania, Latania, Reine, Shelda, dan Rizkilia yang selalu menjadi tempat untuk bercerita segala yang terjadi di kehidupan FK ini.

12. Teman-teman Program Studi Kedokteran Angkatan 2015 (*Medical Division*) yang telah bersama-sama berjuang selama tujuh semester di preklinik ini.

13. Semua keluarga besar Kos KERSENMADU yang sudah menjadi rumah dan keluarga terdekat selama di perantauan.

14. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

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

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

Malang, Desember 2018

Penulis

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anindita Nurul Fauziah

NIM : 155070101111028

Program Studi : Program Studi Kedokteran

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

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

Malang, 28 Desember 2018

Yang membuat pernyataan,

(Anindita Nurul Fauziah)

NIM. 155070101111028

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Stunting merupakan keadaan dimana terjadi ketidaksesuaian panjang badan menurut umur (PB/U) atau tinggi badan menurut umur (TB/U) sehingga terkesan pendek akibat retardasi pertumbuhan linier yang merupakan manifestasi dari masalah gizi yang kronis pada saat prenatal maupun postnatal. *Stunting* menurut standar baku dari WHO-MGRS (*Multicentre Growth Reference Study*) tahun 2005 dibagi menjadi dua kategori, yaitu kategori pendek dengan z-score < -2 SD dan sangat pendek jika z-score < -3 SD (Kemenkes, 2016). Hal ini harus dibedakan dengan kretinisme. Kretinisme adalah gangguan akibat kekurangan yodium (GAKI) maupun adanya abnormalitas kelenjar tiroid yang mengakibatkan pertumbuhan tinggi badan yang sangat terganggu sehingga tubuh menjadi sangat pendek (cebol) dan dismorfik (Salisbury, 2003).

Pada tahun 2016, jumlah balita yang mengalami *stunting* diperkirakan mencapai 22,9% atau 155 juta di seluruh dunia, dan hampir setengah dari jumlah ini ditemukan di Asia, yaitu 87 juta. Dari data Riskesdas tahun 2013 menunjukkan bahwa Indonesia berada di peringkat kelima dunia dimana *stunting* meningkat dari 36,8% menjadi 37,2% yang berarti satu dari tiga anak Indonesia mengalami *stunting*. Berdasarkan Pemantauan Status Gizi (PSG) tahun 2016, presentasi balita pendek di Indonesia sebanyak 29,6% serta khusus di Jawa Timur sebanyak 26,7% (Kemenkes RI, 2017). WHO menargetkan tercapainya pengurangan 40% jumlah balita pendek pada tahun 2025 (Horner, 2013). Sedangkan untuk Indonesia sendiri melalui Rencana Pembangunan Jangka Menengah Nasional (RPJMN) 2015-2019 ditargetkan penurunan prevalensi *stunting* (pendek dan sangat pendek) pada anak baduta (bawah dua tahun) dari 32,9% menjadi 28% pada tahun 2019 (Depkes RI, 2016).

Stunting merupakan akibat dari tidak memadainya nutrisi dan serangan infeksi berulaya pada 1000 hari pertama kehidupan seorang anak. Seribu hari pertama kehidupan (1000 HPK) merupakan masa kritis/periode emas yang dapat menentukan kualitas kehidupan seorang anak di masa depan. Masa ini juga disebut sebagai “*critical window of opportunity*” dikarenakan pada kelompok ini (ibu hamil, menyusui, umur 2 tahun) merupakan masa paling efektif untuk mencegah dan menanggulangi *stunting*. Namun, jika terjadi masalah setelah masa ini pencegahan dan koreksi pertumbuhan ke normal menjadi lebih sulit (Kemenkes, 2016).

Diperkirakan penderita *stunting* dapat kesempatan untuk kembali normal sebesar 3% (Caulfield *et al.*, 2006). *Stunting* dapat memicu berbagai masalah kesehatan baik jangka pendek maupun jangka panjang meliputi gangguan perkembangan otak, pertumbuhan otot dan tulang, gangguan kognitif, kapasitas belajar, kapasitas kerja, imunitas menurun sehingga sering terkena infeksi berulang, meningkatkan risiko terkena penyakit degeneratif, diabetes, penyakit kardiovaskular, stroke, dan kanker (Uauy, 2013; UNICEF, 2013; Oot *et al.*, 2016).

Saat ini pemerintah sudah mengeluarkan berbagai kebijakan untuk mencegah dan mengurangi prevalensi *stunting* di Indonesia. Salah satunya dengan intervensi gizi spesifik, yaitu intervensi gizi secara langsung yang melibatkan Kemenkes melalui perantara Puskesmas dan Posyandu dengan “Gerakan 1000 Hari Pertama Kehidupan”. Sasaran dari program ini mulai dari ibu hamil, ibu menyusui bayi usia 0-6 bulan, serta anak usia 7-23 bulan. Pada salah satu program intervensi terdapat pemberian suplemen besi dan asam folat minimal 90 butir selama kehamilan.

Asam folat diberikan sebagai suplementasi ibu hamil untuk mencegah kelainan bawaan/NTD. Pada saat hamil terjadi perubahan hemodinamik seperti peningkatan volume darah, massa sel darah merah sejalan dengan perkembangan janin, sehingga kadar folat dalam darah menjadi turun. Hal ini menyebabkan kebutuhan terhadap asam folat meningkat untuk keperluan tumbuh kembang janin (Talaulikar, 2013). Suplementasi asam folat pada awal kehidupan akan memberi dampak positif

terhadap kesehatan tulang, hal ini ditunjukkan dengan adanya peningkatan Densitas Mineral Tulang (DMT) tulang belakang (Kaludjerovic, 2015). Asam folat merupakan *scavenger* radikal bebas yang efektif, karena bisa melindungi biokonstituen seperti membrane sel dan DNA dari kerusakan radikal bebas melalui mekanisme kompetisi. Aktivitas antioksidan inilah yang dimanfaatkan untuk menghambat terjadinya stres oksidatif yang bisa mengakibatkan *stunting* (Joshi, 2001).

Terdapat peran dari berbagai faktor baik internal maupun eksternal bagi pertumbuhan dan perkembangan anak. Salah satu faktor eksternal yaitu dari lingkungan seperti penggunaan pestisida yang merupakan bahan kimia di lingkungan (*xenobiotics/ Hormonally Active Agents, Endocrine Disrupting Chemicals* atau *Endocrine Disrupting Compounds (EDCs)* (Utami *et al*, 2013) yang luas dari penggunaan skala rumah tangga sampai pertanian. Dampak negatif bagi kesehatan seperti; bayi dengan berat badan lahir rendah (BBLR), lahir prematur, keterlambatan pertumbuhan dalam kandungan (IUGR), gangguan proses tumbuh kembang, dsb. (Costa, 2008; Petit *et al*, 2010; Utami *et al*, 2013; Suhartono, 2014).

Salah satu pestisida yang sering ditemukan di Indonesia adalah rotenon. Rotenon merupakan jenis pestisida yang berasal dari akar tuba (*Derris Elliptica*) yang hampir bisa ditemukan di seluruh wilayah Indonesia. Toksisitas rotenon diakibatkan oleh kemampuannya untuk menghambat rantai respirasi mitokondrial dengan cara menghambat transport elektron dari pusat Fe-S pada kompleks enzim penyimpanan energi *NADH-ubiquinon reductase* (komplek 1), sehingga mencegah NADH untuk diubah menjadi energi seluler ATP, akibatnya terjadi peningkatan stres oksidatif karena radikal bebas yang tidak bisa dinetralisasi, dan bisa juga menyebabkan degenerasi selektif neuron dopamin striatal-nigral. Jika proses ini terus berlanjut bisa sampai menimbulkan kematian sel bahkan kematian organisme (Ott, 2008; Gupta, 2014).

Pajanan pestisida rotenon dapat menyebabkan *stunting* melalui beberapa jalur salah satunya akibat penurunan kadar IGF-1 (*Insuline Growth Factor 1*) yang berfungsi sebagai mediator GH (*growth hormone*) yang bekerja mirip seperti insulin dan berperan dalam proses pertumbuhan, mitosis sel kondrosit, osteoblast dan jaringan yang lain. Diketahui bahwa pemberian induksi rotenon pada *zebrafish* dengan konsentrasi 12,5 ppb (*part per billion*) dapat mengakibatkan *stunting*, sedangkan pada induksi 20 ppb sudah menyebabkan kelainan kongenital (Utami *et al.*, 2013; Primaditya, 2017). Selain rotenone zat yang bisa mengakibatkan *stunting* adalah dengan menggunakan induksi aflatoksin. Aflatoksin merupakan senyawa toksik yang berasal dari jamur *Aspergillus flavus*. Induksi *Aflatoxin B1* (AFB1) yang bersifat hepatotoksik akan menekan sinyal hormon pertumbuhan (GH) sehingga menyebabkan *stunting* melalui mekanisme pembentukan hasil metabolisme aflatoksin yang bisa mengganggu fungsi DNA, protein, dan makromolekul lainnya (Knipstein *et al.*, 2015). Namun pada penelitian ini saya memilih menggunakan induksi rotenon untuk membuat model *stunting*.

Model penelitian dengan hewan coba *Zebrafish* (*Danio rerio*) saat ini semakin banyak dilakukan. *Zebrafish* memiliki tingkat homologi yang tinggi dengan genom manusia yaitu mencapai 70% (Belyaeva *et al.*, 2010; Eimon *et al.*, 2010; Howe, 2013; Dai *et al.*, 2014). Sedangkan perbandingan analogi usia *zebrafish* dengan manusia bisa dilihat berdasarkan ontogen siklus bangun-tidur pada *zebrafish* yang menyatakan bahwa *zebrafish* usia 3 dpf, 6 dph, 9 dpf analog dengan anak-anak usia 0 hari (bayi baru lahir), 2 tahun, dan 8 tahun (Sorribes, 2013). Pada penelitian ini, *zebrafish* model *stunting* akan diberikan asam folat pada 1, 2, 3 dpf untuk melihat pengaruhnya pada fase prenatal.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka peneliti ingin mengetahui pengaruh pemberian asam folat pada fase prenatal terhadap panjang badan dan rasio panjang kepala dengan panjang badan pada embrio *zebrafish* model *stunting* dengan induksi rotenon.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian rotenon 12,5 ppb dapat menyebabkan *stunting* pada larva *zebrafish*?
2. Apakah pemberian asam folat pada fase prenatal berpengaruh terhadap peningkatan panjang badan pada larva *zebrafish* model *stunting* dengan induksi rotenon?
3. Apakah pemberian asam folat pada fase prenatal berpengaruh terhadap rasio panjang kepala dengan panjang badan pada larva *zebrafish* model *stunting* dengan induksi rotenon?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Membuktikan bahwa pemberian rotenon 12,5 ppb dapat menyebabkan *stunting* pada larva *zebrafish*
2. Mengetahui pengaruh pemberian asam folat pada fase prenatal terhadap peningkatan panjang badan pada larva *zebrafish* model *stunting* dengan induksi rotenon
3. Mengetahui pengaruh pemberian asam folat pada fase prenatal terhadap rasio panjang kepala dengan panjang badan pada larva *zebrafish* model *stunting* dengan induksi rotenon?

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

1. Penelitian dapat digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian asam folat pada fase prenatal terhadap larva *zebrafish* dengan induksi rotenon sebagai pencegahan dan penatalaksanaan *stunting*.
2. Sebagai tambahan referensi informasi bagi pengembangan dan penelitian berikutnya tentang *stunting*.

1.4.2 Manfaat Praktik

1. Asam folat merupakan suplemen rekomendasi pemerintah bagi ibu hamil untuk mencegah terjadinya kelainan kongenital *Neural Tube Defect* (NTDs).

Namun selain mencegah cacat bawaan asam folat bisa berfungsi sebagai penatalaksanaan untuk mencegah dan mengurangi prevalensi balita pendek

(*stunting*).

2. Dapat dijadikan acuan khususnya bagi tenaga kesehatan untuk lebih mengoptimalkan pemberian suplemen asam folat bagi ibu yang ingin hamil, selama hamil, dan saat menyusui karena memiliki berbagai manfaat bagi tumbuh kembang anak salah satunya mencegah *stunting*. Pemberian asam folat direkomendasikan karena mudah didapatkan dan murah, sehingga semua kalangan bisa menjangkaunya.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Stunting*

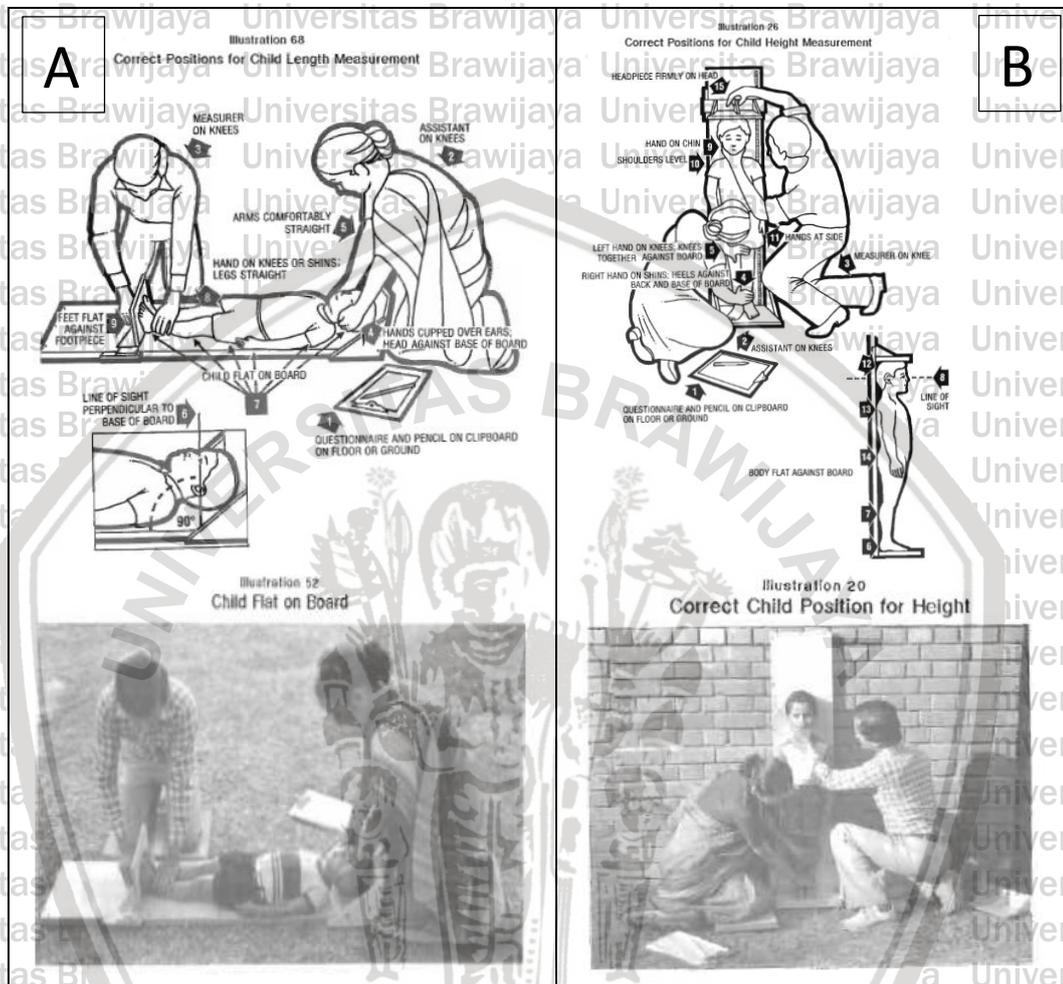
2.1.1 Definisi

Stunting merupakan keadaan status gizi dimana terjadi ketidaksesuaian panjang badan menurut umur (PB/U) atau tinggi badan menurut umur (TB/U) sehingga terkesan pendek akibat retardasi pertumbuhan linier yang merupakan manifestasi dari masalah gizi yang kronis pada saat prenatal maupun postnatal, infeksi yang berulang, dan stimulasi psikososial yang tidak memadai. *Stunting* menurut standar baku dari WHO-MGRS (*Multicentre Growth Reference Study*) tahun 2005 dibagi menjadi dua kategori, yaitu kategori pendek dengan z-score < -2 SD dan sangat pendek jika z-score < -3 SD (Kemenkes, 2016).

Penting untuk membedakan antara dua istilah, panjang (*length*) dan tinggi (*height*) yang terkait: panjang badan mengacu pada pengukuran pada posisi telentang, cara yang disarankan untuk mengukur anak di bawah usia 2 tahun atau kurang dari 85 cm; sedangkan tinggi badan mengacu pada pengukuran ketinggian dengan posisi berdiri.

Pengukuran antropometri pada anak kurang dari 2 tahun menggunakan papan dari kayu (*length board*) yang membutuhkan 2 orang untuk pengukuran, baik sebagai pengukur dan asisten yang membantu memposisikan anak. Anak posisi berbaring terlentang, asisten bertugas memegang kepala anak dengan kedua tangan dan memastikan kepala menyentuh alas papan. Anak harus melihat lurus ke atas (90°) dan kaki anak harus rata terhadap papan di ujung kaki. Sedangkan pengukuran tinggi badan bagi anak usia diatas 2 tahun atau yang sudah bisa berdiri dengan kepala harus berada dalam posisi *Frankfurt* (posisi di mana garis yang melintas dari lubang telinga luar ke tutup mata bagian bawah sejajar dengan lantai) selama pengukuran, dan bahu, pantat dan tumit harus menyentuh dudukan vertikal.

Pengukuran tinggi bisa menggunakan *stadiometer* atau antropometer portable (*microtoise*) (UNICEF, 1986).



Gambar 2.1 Pengukuran Antropometri

Keterangan : Gambar A. Cara mengukur panjang badan (PB) dengan *length board* pada anak usia < 2 tahun atau yang belum bisa berdiri. Gambar B. Cara mengukur tinggi badan pada anak usia >2 tahun, bisa dengan *stadiometer* atau *microtoise* (UNICEF, 1986).

Berdasarkan kriteria *stunting* yang ditentukan oleh WHO, anak-anak disebut mengalami *stunting* jika tinggi badan mereka dibanding umur (*height-for-age/HAZ*) kurang dari -2 SD. Hal ini bisa diperoleh dengan memasukkan hasil pengukuran panjang badan ke dalam grafik pertumbuhan *Height-for-Age* (HAZ) pada perempuan dan laki-laki kemudian hasil diinterpretasikan menggunakan tabel referensi sehingga didapatkan nilai *z-score*.

Length-for-age GIRLS

Birth to 2 years (z-scores)



WHO Child Growth Standards

Length-for-age GIRLS

Birth to 2 years (z-scores)

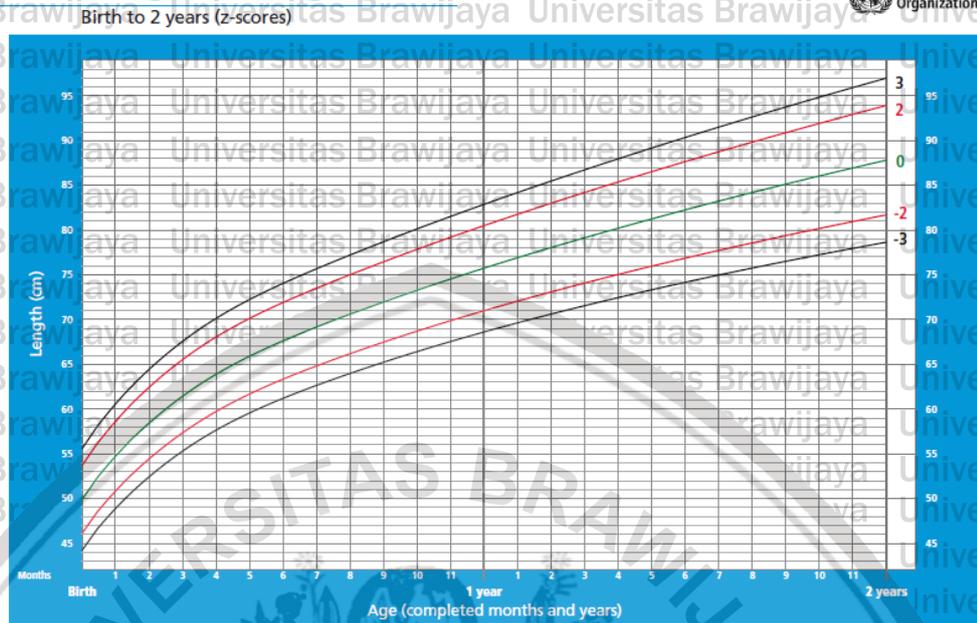


Year: Month	Month	L	M	S	SD	-3 SD	-2 SD	Z-scores (length in cm)	-1 SD	Median	1 SD	2 SD	3 SD
0: 0	0	1	49.1477	0.03790	1.8627	43.6	45.4	47.3	49.1	51.0	52.9	54.7	
0: 1	1	1	53.6872	0.03640	1.9542	47.8	49.8	51.7	53.7	55.6	57.6	59.5	
0: 2	2	1	57.0673	0.03568	2.0362	51.0	53.0	55.0	57.1	59.1	61.1	63.2	
0: 3	3	1	59.8029	0.03520	2.1051	53.5	55.6	57.7	59.8	61.9	64.0	66.1	
0: 4	4	1	62.0899	0.03486	2.1645	55.6	57.8	59.9	62.1	64.3	66.4	68.6	
0: 5	5	1	64.0301	0.03463	2.2174	57.4	59.6	61.8	64.0	66.2	68.5	70.7	
0: 6	6	1	65.7311	0.03448	2.2664	58.9	61.2	63.5	65.7	68.0	70.3	72.5	
0: 7	7	1	67.2873	0.03441	2.3154	60.3	62.7	65.0	67.3	69.6	71.9	74.2	
0: 8	8	1	68.7498	0.03440	2.3650	61.7	64.0	66.4	68.7	71.1	73.5	75.8	
0: 9	9	1	70.1435	0.03444	2.4157	62.9	65.3	67.7	70.1	72.6	75.0	77.4	
0:10	10	1	71.4818	0.03452	2.4676	64.1	66.5	69.0	71.5	73.9	76.4	78.9	
0:11	11	1	72.7710	0.03464	2.5208	65.2	67.7	70.3	72.8	75.3	77.8	80.3	
1: 0	12	1	74.0150	0.03479	2.5750	66.3	68.9	71.4	74.0	76.6	79.2	81.7	
1: 1	13	1	75.2176	0.03496	2.6296	67.3	70.0	72.6	75.2	77.8	80.5	83.1	
1: 2	14	1	76.3817	0.03514	2.6841	68.3	71.0	73.7	76.4	79.1	81.7	84.4	
1: 3	15	1	77.5099	0.03534	2.7392	69.3	72.0	74.8	77.5	80.2	83.0	85.7	
1: 4	16	1	78.6055	0.03555	2.7944	70.2	73.0	75.8	78.6	81.4	84.2	87.0	
1: 5	17	1	79.6710	0.03576	2.8490	71.1	74.0	76.8	79.7	82.5	85.4	88.2	
1: 6	18	1	80.7079	0.03598	2.9039	72.0	74.9	77.8	80.7	83.6	86.5	89.4	
1: 7	19	1	81.7182	0.03620	2.9582	72.8	75.8	78.8	81.7	84.7	87.6	90.6	
1: 8	20	1	82.7036	0.03643	3.0129	73.7	76.7	79.7	82.7	85.7	88.7	91.7	
1: 9	21	1	83.6654	0.03666	3.0672	74.5	77.5	80.6	83.7	86.7	89.8	92.9	
1:10	22	1	84.6040	0.03688	3.1202	75.2	78.4	81.5	84.6	87.7	90.8	94.0	
1:11	23	1	85.5202	0.03711	3.1737	76.0	79.2	82.3	85.5	88.7	91.9	95.0	
2: 0	24	1	86.4153	0.03734	3.2267	76.7	80.0	83.2	86.4	89.6	92.9	96.1	

WHO Child Growth Standards

Gambar 2.2 Grafik Pertumbuhan *Height-for-Age (HAZ)* dan Interpretasi Grafik Standar *Height-for-Age (HAZ)* untuk perempuan (WHO, 2017)

Length-for-age BOYS



Length-for-age BOYS

Birth to 2 years (z-scores)

Year: Month	Month	L	M	S	SD	-3 SD	-2 SD	-1 SD	Median	1 SD	2 SD	3 SD
0: 0	0	1	49.8842	0.03795	1.8931	44.2	46.1	48.0	49.9	51.8	53.7	55.6
0: 1	1	1	54.7244	0.03557	1.9465	48.9	50.8	52.8	54.7	56.7	58.6	60.6
0: 2	2	1	58.4249	0.03424	2.0005	52.4	54.4	56.4	58.4	60.4	62.4	64.4
0: 3	3	1	61.4292	0.03328	2.0444	55.3	57.3	59.4	61.4	63.5	65.5	67.6
0: 4	4	1	63.8860	0.03257	2.0808	57.6	59.7	61.8	63.9	66.0	68.0	70.1
0: 5	5	1	65.9026	0.03204	2.1115	59.6	61.7	63.8	65.9	68.0	70.1	72.2
0: 6	6	1	67.6236	0.03165	2.1403	61.2	63.3	65.5	67.6	69.8	71.9	74.0
0: 7	7	1	69.1645	0.03139	2.1711	62.7	64.8	67.0	69.2	71.3	73.5	75.7
0: 8	8	1	70.5994	0.03124	2.2055	64.0	66.2	68.4	70.6	72.8	75.0	77.2
0: 9	9	1	71.9687	0.03117	2.2433	65.2	67.5	69.7	72.0	74.2	76.5	78.7
0:10	10	1	73.2812	0.03118	2.2849	66.4	68.7	71.0	73.3	75.6	77.9	80.1
0:11	11	1	74.5388	0.03125	2.3293	67.6	69.9	72.2	74.5	76.9	79.2	81.5
1: 0	12	1	75.7488	0.03137	2.3762	68.6	71.0	73.4	75.7	78.1	80.5	82.9
1: 1	13	1	76.9186	0.03154	2.4260	69.6	72.1	74.5	76.9	79.3	81.8	84.2
1: 2	14	1	78.0497	0.03174	2.4773	70.6	73.1	75.6	78.0	80.5	83.0	85.5
1: 3	15	1	79.1458	0.03197	2.5303	71.6	74.1	76.6	79.1	81.7	84.2	86.7
1: 4	16	1	80.2113	0.03222	2.5844	72.5	75.0	77.6	80.2	82.8	85.4	88.0
1: 5	17	1	81.2487	0.03250	2.6406	73.3	76.0	78.6	81.2	83.9	86.5	89.2
1: 6	18	1	82.2587	0.03279	2.6973	74.2	76.9	79.6	82.3	85.0	87.7	90.4
1: 7	19	1	83.2418	0.03310	2.7553	75.0	77.7	80.5	83.2	86.0	88.8	91.5
1: 8	20	1	84.1996	0.03342	2.8140	75.8	78.6	81.4	84.2	87.0	89.8	92.6
1: 9	21	1	85.1348	0.03376	2.8742	76.5	79.4	82.3	85.1	88.0	90.9	93.8
1:10	22	1	86.0477	0.03410	2.9342	77.2	80.2	83.1	86.0	89.0	91.9	94.9
1:11	23	1	86.9410	0.03445	2.9951	78.0	81.0	83.9	86.9	89.9	92.9	95.9
2: 0	24	1	87.8161	0.03479	3.0551	78.7	81.7	84.8	87.8	90.9	93.9	97.0

WHO Child Growth Standards

Gambar 2.3 Grafik Pertumbuhan Height-for-Age (HAZ) dan Interpretasi Grafik Standar Height-for-Age (HAZ) untuk anak laki-laki (WHO, 2017)

2.1.2 Faktor Penyebab Stunting

Stunting merupakan akibat dari tidak memadainya nutrisi dan serangan infeksi berulang pada 1000 hari pertama kehidupan seorang anak. Seribu hari pertama meliputi masa prenatal yaitu kondisi ibu hamil, janin dan masa post natal semasa bayi/balita, termasuk penyakit yang diderita di masa awal pertumbuhan.

Seribu hari pertama kehidupan (1000 HPK) merupakan masa kritis/periode emas yang dapat menentukan kualitas kehidupan seorang anak di masa depan. Masa ini juga disebut sebagai "*critical window of opportunity*" dikarenakan pada kelompok ini (ibu hamil, menyusui, umur 2 tahun) merupakan masa paling efektif untuk mencegah dan menanggulangi *stunting*. Namun, jika terjadi masalah setelah masa ini pencegahan dan koreksi pertumbuhan ke normal menjadi lebih sulit (Kemenkes, 2016).

Sejak masa kehamilan hingga usia dua tahun, ada banyak faktor yang dapat menyebabkan terjadinya *stunting*. Faktor-faktor tersebut di antaranya malnutrisi dalam jangka waktu panjang, infeksi yang berulang, hygiene dan sanitasi yang buruk. Status gizi dan infeksi yang berulang merupakan faktor penyebab utama terjadinya gangguan pertumbuhan dan perkembangan pada anak, termasuk *stunting*. Kedua faktor tersebut erat kaitannya dengan keadaan sosioekonomi keluarga. Asupan gizi, baik makronutrien dan mikronutrien sangat diperlukan untuk pertumbuhan anak, sehingga kekurangan salah satu atau keduanya dapat mengganggu pertumbuhan anak dan dapat menyebabkan *stunting*. Sedangkan penyakit infeksi yang disebabkan karena lingkungan yang kurang memadai dapat memperberat atau bahkan menjadi penyebab utama dari terjadinya malnutrisi (Kartini, 2016).

Proses terjadinya *stunting* dapat dimulai sejak dalam kandungan, sehingga asupan gizi ibu saat hamil sangat berperan dalam kejadian *stunting*. Status gizi ibu saat hamil mempengaruhi berat dan panjang lahir bayi. Bayi yang lahir dengan berat lahir rendah (<2500 gram) atau panjang lahir rendah (< 48 cm) beresiko lebih besar mengalami *stunting*. Dengan kata lain, berat dan panjang lahir dapat dijadikan prediktor untuk pertumbuhan anak dan jika diikuti dengan faktor-faktor penghambat pertumbuhan lainnya seperti asupan gizi yang tidak mencukupi dapat menyebabkan *stunting* pada anak. (Meilyasari dan Isnawati, 2014; Ni'mah dan Nadhiroh, 2016).

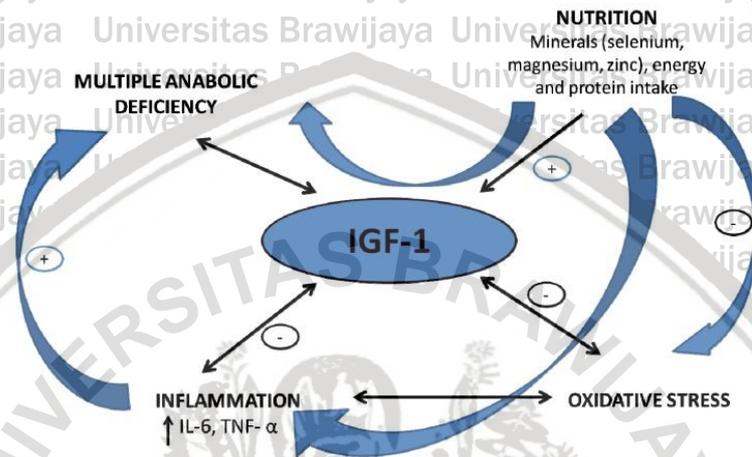
Menurut penelitian di Nepal pada anak usia 6-59 bulan, terdapat faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan anak dan menjadi faktor resiko stunting, yaitu dapur tanpa ventilasi dan paparan pestisida (Paudel, 2013). Pestisida merupakan *endocrine disrupting chemicals* (EDCs), yaitu bahan yang dapat mengganggu kerja hormone endokrin (Utami *et al*, 2013). Hormon tiroid bersama dengan insulin, hormon pertumbuhan, glukokortikoid, dan faktor pertumbuhan seperti *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) berperan pada proses pertumbuhan dan perkembangan anak, sehingga jika terjadi gangguan fungsi hormon-hormon tersebut dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan dan perkembangan (Tarim, 2011).

2.1.3 Mekanisme Stunting

Mekanisme terjadinya *stunting* dapat dimulai sejak masa kehamilan hingga usia awal kehidupan. Kejadian *stunting* terkait dengan banyak faktor yang dapat mengganggu pertumbuhan dan perkembangan selama 1000 hari pertama kehidupan. Saat kehamilan, nutrisi ibu sangat penting untuk pertumbuhan janinnya. Jika sejak masa kehamilan janin sudah mengalami malnutrisi baik mikronutrien dan makronutrien dan setelah lahir tetap tidak mendapat asupan gizi yang baik, anak akan mengalami pertumbuhan yang lambat dan menyebabkan terjadinya stunting.

Selain faktor nutrisi, *stunting* juga berkaitan dengan kejadian inflamasi kronik. Hal ini dapat terjadi sejak masa kehamilan hingga *postnatal* pada lingkungan dengan hygiene dan sanitasi yang buruk, sehingga anak rentan mengalami infeksi *feco-oral* bakteri yang berulang, misalnya diare. Sitokin pro-inflamasi, *inter leukin-6* (IL-6) pada anak yang mengalami infeksi berulang akan meningkat. IL-6 ini akan menghambat produksi IGF-1 (Predergast *et al.*, 2014). IGF-1 memiliki peran penting pada pertumbuhan *postnatal*. IGF-1 berperan dalam pertumbuhan dengan memediasi efek *growth hormone* (GH) pada beberapa organ, seperti otot dan tulang. Hormon pertumbuhan merupakan pengatur utama pada somatis terutama pertumbuhan rangka. GH merangsang terbentuknya somatomedin yang kemudian

berefek pada tulang rawan. Sedangkan IGF-1 merupakan somatomedin yang bekerja sebagai mediator GH dan bekerja mirip dengan insulin. Selain sebagai *growth promoting factor*, IGF-1 juga memiliki efek mitogenik terhadap kondrosit, osteoblast dan jaringan lainnya (Soetjingsih, 1995).



Gambar 2.4 Peran IGF

Kadar IGF-1 berbalik terbalik dengan penanda inflamasi dan stres oksidatif dan diatur secara positif oleh nutrisi spesifik seperti selenium, seng, magnesium, dan asupan energi dan protein (Maggio *et al.*, 2013)

2.1.4 Dampak Stunting

Dampak negatif jangka pendek meliputi gangguan perkembangan otak, pertumbuhan otot dan tulang (Berat Badan/BB dan Tinggi Badan/TB), komposisi tubuh, gangguan metabolisme (karbohidrat, protein, lemak) dan hormon.

Sedangkan dampak jangka panjang meliputi gangguan kognitif, sosio-emosional, kapasitas belajar, kapasitas kerja, imunitas menurun sehingga sering terkena infeksi berulang, meningkatkan risiko terkena penyakit degeneratif, diabetes, penyakit kardiovaskular, stroke, dan kanker (Uauy, 2010; UNICEF, 2013; Oot *et al.*, 2016).

2.1.5 Perbedaan Stunting dengan Kretinisme

Hal ini harus dibedakan dengan kretinisme. Kretinisme adalah gangguan akibat kekurangan yodium (GAKI) maupun adanya abnormalitas kelenjar tiroid yang mengakibatkan pertumbuhan tinggi badan yang sangat terganggu sehingga tubuh menjadi sangat pendek (cebol) (Salisbury, 2003). Hipotiroidisme menyebabkan kegagalan pertumbuhan, perawakan pendek, kurangnya BA, rasio atas/bawah

(*upper/lower ratio*) lebih besar, apatis, gerakan lambat, konstipasi, bradikardi, wajah dan wambut kasar, suara serak dan terlambatnya perkembangan pubertas (FKUI, 2014). Pada stunting proporsi tubuh tetap dan baik, sedangkan pada kretinisme terjadi abnormalitas proporsi tubuh yang mencolok.

2.2 Zebrafish

2.2.1 Karakteristik Zebrafish

Zebrafish adalah jenis ikan tropis berukuran kecil, yang banyak ditemukan di India dan Asia Selatan. Ikan yang memiliki nama ilmiah *Danio rerio* ini, memiliki kurang lebih 45 spesies di dunia. (Yuniarto, *et al.*, 2017). Panjang badan *zebrafish* rata-rata mencapai 25 mm, dengan bentuk badan *fusiform laterally compressed* dan kepala yang pendek. Ciri khas *zebrafish* yang mencolok adalah adanya garis-garis horizontal pada tubuhnya yang terdiri dari beberapa tipe pigmen, yaitu melanophores dan iridophorides untuk warna biru-hitam serta xanthophores dan iridophorides untuk warna kuning-silver. Garis-garis ini berfungsi untuk adaptasi terhadap lingkungan melalui kamuflase. *Zebrafish* memiliki siklus reproduksi yang cepat, dimana *zebrafish* betina dapat bertelur setiap 2-3 hari, dan sekali bertelur bisa menghasilkan ratusan telur (Nusslein dan Dahm, 2002; Spence *et al.*, 2008).

Berikut ini adalah taksonomi dari *zebrafish*:

**Tabel 2.1 Klasifikasi Zebrafish
(Hamilton, 1822)**

Kingdom	:	<i>Animalia</i>
Phylum	:	<i>Chordata</i>
Subphylum	:	<i>Vertebrata</i>
Class	:	<i>Teleostei/Actinopteryqii</i>
Order	:	<i>Cypriniformes</i>
Family	:	<i>Cyprinidae</i>
Genus	:	<i>Danio</i>
Species	:	<i>Danio rerio</i> (<i>International Taxonomic Information System</i>)

Pada *zebrafish* bisa dibedakan antara jantan dan betina dilihat dari ukuran tubuh. Pada jantan tubuh lebih, ramping, dan lebih gelap sedangkan pada betina

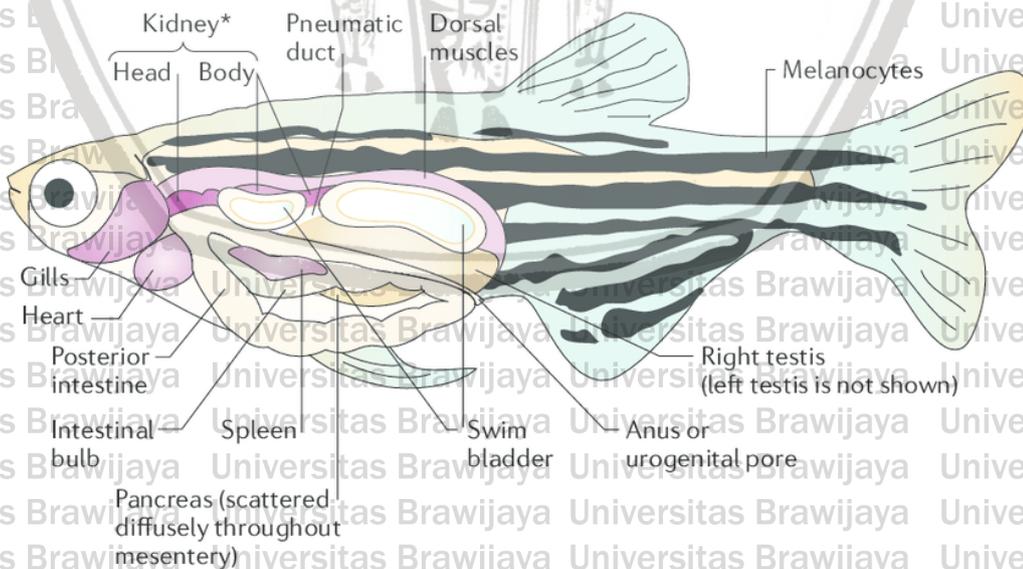
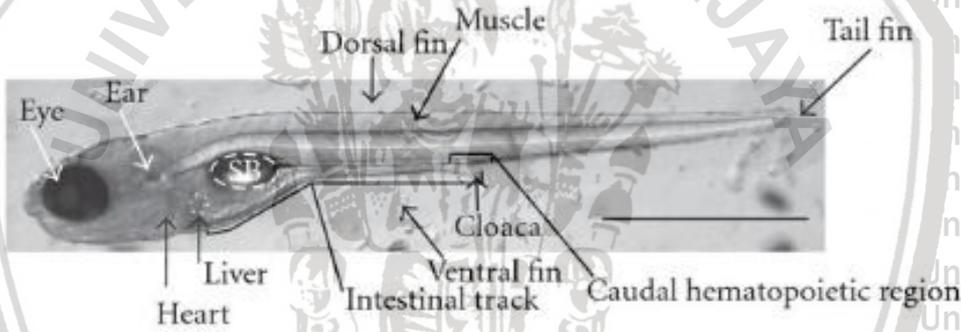
terdapat *underbelly* yang lebih besar dan corak biru keperakan di bagian lateral tubuh (Avdesh, 2012).



Gambar 2.5 Perbedaan Jantan dan Betina

Keterangan : Gambar A. Zebrafish jantan; B. Zebrafish betina (Avdesh, 2012)

Pada zebrafish juga sudah ditemukan berbagai macam organ yang menunjang kehidupannya.



Gambar 2.6 Anatomi Zebrafish

Keterangan : atas Zebrafish usia 6 dpf; bawah zebrafish dewasa (Goldsmith & Joobin, 2012)

2.2.2 Tahap Perkembangan Zebrafish

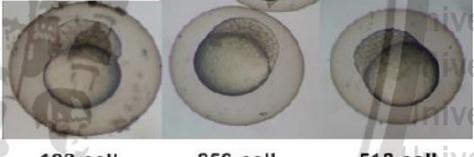
Secara sederhana, perkembangan zebrafish dibagi menjadi beberapa fase, yaitu fase embrio, larva, juvenile, dan dewasa. Dengan penjabaran sebagai berikut:

1. Fase embrio, dimulai sejak fertilisasi hingga telur menetas (0-72 hpf). Fase ini dimulai dari telur terfertilisasi menjadi zigot dan kemudian memasuki fase pembelahan. Pada 24 hpf, embrio sudah aktif dan sudah memiliki detak jantung. Akhir fase embrio ditandai dengan fase penonjolan mulut.
2. Fase larva, dimulai sejak telur menetas hingga 29 dpf. Pada 5 dpf, terjadi perkembangan organ untuk berenang, yaitu *swim bladder* untuk mengontrol daya apung dan setelah 7 dpf larva sudah aktif dan mulai mencari makan sendiri. Pada tahap ini selanjutnya terjadi perubahan morfologi pada sirip, pola pigmentasi, dan morfologi secara keseluruhan.
3. Fase juvenile, yaitu fase dimana sebagian besar karakteristik organisme dewasa sudah tampak (menyerupai dewasa), *larval fin fold* menghilang. Tetapi belum terjadi kematangan seksual.
4. Fase dewasa, yaitu fase dimana sudah terjadi kematangan seksual yang ditunjukkan dengan diproduksinya gamet. Pada fase ini organisme telah siap untuk *breeding*. Fase ini terjadi 3 bulan setelah menetas (90 dpf) (Parichy *et al.*, 2009).

Pertumbuhan zebrafish paling cepat terjadi selama tiga bulan pertama setelah menetas, setelah itu mulai menurun, mendekati nol sekitar 18 bulan.

Pertumbuhan dan perkembangan zebrafish dipengaruhi oleh faktor genetik dan juga faktor lingkungan. Di laboratorium atau penangkaran, zebrafish memiliki usia harapan hidup sekitar 2-3 tahun dan dapat bertahan sampai usia 5,5 tahun (Spence *et al.*, 2008).

Tabel 2.2 Perkembangan Zebrafish
(Kimml *et al.*, 1995)

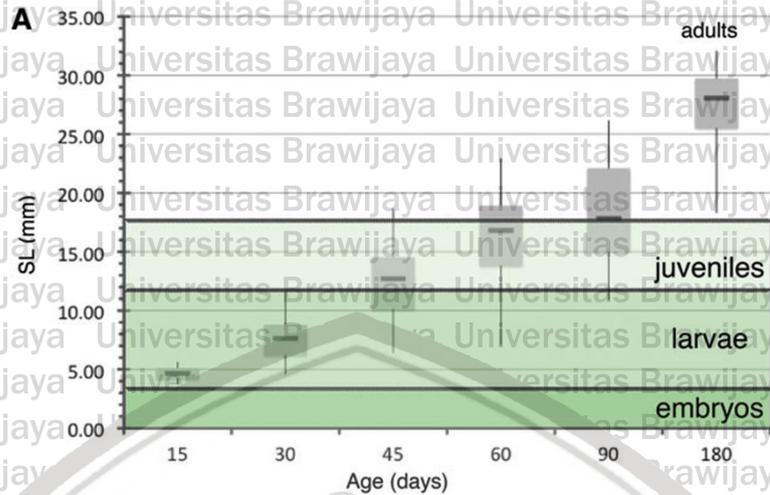
Periode	Usia	Perkembangan	Gambar
Zigot	0-0,7 5 hpf	Sel telur terfertilisasi, sitoplasma bergerak menuju salah satu kutub membentuk blastodisc	 <p>zygote 1-cell 2-cell</p>
Cleavage	0,75- 2,25 hpf	Blastodisc terbagi untuk membentuk blastomere, yang terus mengalami pembelahan sel yang cepat dan selaras tanpa pertumbuhan sel	 <p>4-cell 8-cell 16-cell</p>  <p>16-cell 32-cell 64-cell</p>
Blastula	2,25- 5,25 hpf	Siklus sel yang cepat dan metasynchronou s ; epiboly dimulai	 <p>128-cell 256-cell 512-cell</p>  <p>1K-cell 2K-cell oblong</p>
Gastrula	5.25- 10.33 hpf	Gerakan morfogenetik dari involusi, konvergensi, dan bentuk ekstensi epiblast, hipoblas, dan sumbu embrio; sampai akhir epiboly	 <p>80% epiboly 90% epiboly tailbud 2-somite</p>
Segmentation	10.33 -24 hpf	Somites, primordia lengkung faring, dan neuromeres berkembang; organogenesis primer; gerakan pertama; muncul ekor	 <p>5-somite 10-somite 12-somite 14-somite</p>  <p>17-somite 18-somite 20-somite</p>

Pharyngula	24-48 hpf	Embrio tahap phylotypic; sumbu mulai melurus; sirkulasi, pigmentasi, dan sirip mulai berkembang	
Hatching	48-72 hpf	Penyelesaian morfogenesis sistem organ primer; perkembangan tulang rawan di kepala dan <i>pectoral fin</i> ; penetasan terjadi asynchronous	
Larva	4-29 dpf	Protruding mouth; perkembangan organ untuk berenang, yaitu <i>swim bladder</i>	
Juvenile	30-89 dpf	Ditandai dengan squamasi (pola sisik) yang lengkap dan hilangnya <i>larval fin fold</i>	
Adult	90 dpf	Produksi gamet yang layak dan munculnya karakteristik seksual sekunder	



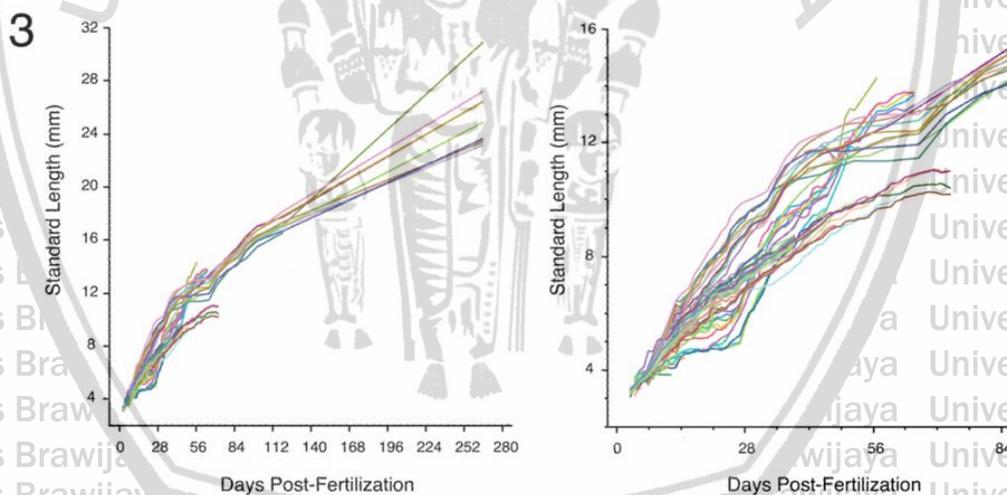
Gambar 2.7 Ciri-ciri Zebrafish

Keterangan : Ciri-ciri ikan zebra post embrionik yang berpotensi berguna untuk melihat perkembangan. SL, *standart length*; HAA, *height at anterior anal fin*; FL, *flexion angle of notochord*; aSB, *swim bladder anterior lobe*. pSB, *swim bladder posterior lobe*. Fins: A, anal; C, caudal; D, dorsal; P, pelvic. Skala, 1 mm (Parichy et al., 2009).



Gambar 2.8 Perbandingan Badan (SL) dengan usia (dpf) pada Zebrafish

Keterangan : *Zebrafish* tumbuh terus-menerus dari waktu ke waktu pada tingkat yang bervariasi sehingga pada usia berapa pun, ukurannya sangat bervariasi. (A) *Box plot* membandingkan panjang standar (SL) dengan usia. *Central bar* adalah median sedangkan kotak mewakili kuartil bagian dalam, area di mana sebagian besar data terkondensasi, dan ekstensi vertikal menunjukkan tingkat ukuran panjang badan ikan ekstrim atas dan bawah (Singleman dan Holtzman, 2014).



Gambar 2.9 Kurva Pertumbuhan Larva Zebrafish

Keterangan : Pertumbuhan sangat bervariasi di antara larva. Setiap kurva pertumbuhan menunjukkan SL berukuran untuk ikan tunggal yang dipelihara secara individual ($N = 54$) dalam tiga kelompok berbeda. Kiri, lintasan antara 3–280 dpf secara pertumbuhan yang sama diperluas untuk menunjukkan 3-84 dpf (Parichy *et al.*, 2009).

2.2.3 Faktor Lingkungan yang Mempengaruhi Perkembangan Zebrafish

1. Kebutuhan Cahaya

Cahaya dapat memicu zebrafish untuk breeding, sedangkan kondisi gelap penting untuk zebrafish istirahat. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengaturan

pencahayaan dengan siklus gelap terang yang sesuai yaitu, 14 jam siklus terang dan 10 jam siklus gelap (Vargesson, 2007; Reed dan Jennings, 2010). Pengaturan ini dapat dilakukan dengan pemasangan lampu di aquarium yang telah diatur sesuai dengan siklus gelap terang.

2. Suhu

Zebrafish diklasifikasikan sebagai eurythermal, yang berarti dapat menoleransi suhu dalam rentang yang jauh. Di habitat aslinya, zebrafish dapat bertahan pada suhu 6°C saat musim dingin dan 38°C saat musim panas (Spence *et al*, 2008). Namun, untuk breeding, dibutuhkan suhu optimal 27°C-28,5°C. Suhu di bawah atau di atas suhu optimal dapat mempengaruhi kecepatan dan kemampuan breeding serta jumlah telur yang dihasilkan (Vargesson, 2007).

3. Kepadatan Populasi

Keadaan yang padat dapat mempengaruhi kesejahteraan *zebrafish*, dimana *zebrafish* dewasa yang diletakkan di tempat dengan densitas padat menunjukkan respon stress berupa kadar kortisol yang empat kali lebih tinggi dan penurunan produksi telur (Ramsay *et al*, 2006). Keadaan yang padat juga dapat memperlambat pertumbuhan dan perkembangan. Untuk aquarium yang memiliki filter dan biofilter yang baik, umumnya ditempatkan 5 ikan per liter. Sedangkan untuk aquarium yang tidak memiliki filter dan biofilter sebaiknya hanya 2 ikan per liter (Vargesson, 2007).

4. Kualitas Air

Kualitas air adalah faktor terpenting yang dapat mempengaruhi kesehatan dan kesejahteraan *zebrafish*. Air yang baik untuk pertumbuhan *zebrafish* mengandung oksigen terlarut sebanyak 6,0 ppm (mg/L) dengan pH berkisar antara 6,5-8,5 (Vargesson, 2007). Selain itu, ada beberapa kontaminan yang kadarnya harus dikontrol, seperti ammonia, nitrit, nitrat, dan chlorin. Jika kadar dari kontaminan meningkat dalam air dapat membahayakan ikan, seperti misalnya nitrit jika terserap melalui insang akan dapat mempengaruhi kemampuan ikan untuk menyerap oksigen sehingga dapat menyebabkan kematian. Untuk menjaga kualitas

air tetap baik dan mencegah penumpukan kontaminan, perlu dilakukan beberapa hal seperti penggantian air, mengangkat sisa-sisa makanan yang ada, dan memastikan biofilter bekerja dengan baik.

2.2.4 Zebrafish sebagai Model Penelitian

Zebrafish sudah banyak digunakan hewan coba dalam berbagai penelitian, terutama penelitian tumbuh kembang. Hal ini dikarenakan, zebrafish memberikan beberapa keuntungan jika digunakan sebagai hewan coba, diantaranya adalah:

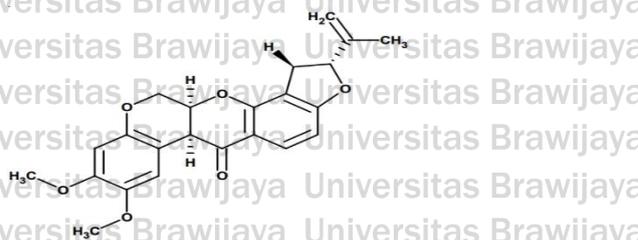
1. *Zebrafish* memiliki kemiripan genom dan molecular yang tinggi dengan vertebrae lainnya, termasuk manusia. Sehingga, temuan yang didapatkan dapat diterapkan pada manusia.
2. Perkembangan *zebrafish* yang terjadi di luar tubuh induk, yaitu berupa embrio yang dibungkus dengan chorion berwarna transparan membuat perkembangannya mudah diamati sejak fertilisasi hingga menjadi larva.
3. Embrio *zebrafish* berkembang dengan sangat cepat, dimana jantung, pankreas, hati, otak, dan organ lainnya berkembang pada 5 dpf. Hal ini dapat mempersingkat waktu yang dibutuhkan untuk menyelesaikan penelitian.
4. *Zebrafish* betina dapat bertelur sepanjang tahun dengan jumlah telur ratusan sekali bertelur sangat menguntungkan jika digunakan untuk penelitian yang membutuhkan jumlah sampel yang besar.
5. *Zebrafish* lebih mudah dipelihara dan membutuhkan biaya pemeliharaan yang lebih murah dibanding hewan coba lainnya. Selain itu, karena ukuran *zebrafish* yang kecil, memelihara *zebrafish* dalam jumlah yang banyak tidak membutuhkan ruang yang terlalu besar (Veldman dan Lin, 2008; Garcia *et al*, 2016).

2.3 Rotenon

2.3.1 Karakteristik Rotenon

Rotenon merupakan jenis pestisida yang berasal pada akar tuba (*Derris Eliptica*) yang hampir bisa ditemukan di seluruh wilayah Indonesia. Rotenon selain sebagai pestisida juga merupakan insektisida alami yang banyak terdapat pada tumbuhan spesies *Lonchocarpus*, *Tephrosia*, dan *Mundulea*. Rotenon termasuk dalam kelompok isoflavan. Rotenon bersifat racun baik bagi manusia maupun hewan. Berdasarkan klasifikasi WHO, rotenone termasuk dalam insektisida kelas II, yaitu insektisida dengan tingkat bahaya menengah (Ott, 2006). Berikut adalah karakteristik rotenone (Ling, 2003):

Nama Umum	: Rotenon
Nama Lain	: Cube, Tubatoxin
Rumus empiris	: $C_{23}H_{22}O_6$
Berat molekul	: 394.43 g/mol
Densitas	: 1.27 g/cm ³ pada 20 °C
Bau	: Tidak berbau
Titik leleh	: ~ 163 °C
Titik didih	: ~ 220 °C
Tekanan Penguapan	: < 1 mPa @20°C
Kelarutan	: Sedikit larut dalam air, mudah larut dalam acetone, karbon Karbon disulfide dan kloroform, karbon tetrachlorid, alkohol
Deskripsi umum	: Kristal tak berwarna sampai kecokelatan atau serbuk kristalin putih sampai putih kecokelatan



Gambar 2.10 Struktur Molekul Rotenon (Ling, 2003)

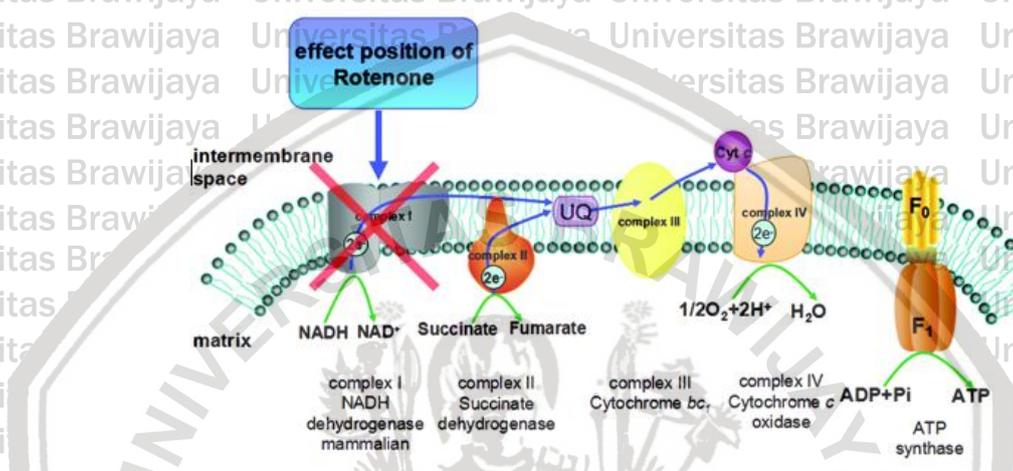
2.3.2 Toksisitas

Toksisitas rotenon diakibatkan oleh kemampuannya untuk menghambat rantai respirasi mitokondrial dengan cara menghambat transport elektron dari pusat Fe-S pada kompleks enzim penyimpanan energi *NADH-ubiquinon reductase* (komplek 1), sehingga mencegah NADH untuk diubah menjadi energi seluler ATP, akibatnya terjadi peningkatan stres oksidatif karena radikal bebas yang tidak bisa dinetralisasi, dan bisa juga menyebabkan degenerasi selektif neuron dopamin striatal-nigral. Jika proses ini terus berlanjut bisa sampai menimbulkan kematian sel bahkan kematian organisme (Ott, 2008; Gupta, 2014).

2.3.3 Mekanisme Kerja

Rotenon merupakan racun metabolisme yang spesifik bekerja pada mitokondria. Mitokondria sendiri merupakan dapur sel untuk menghasilkan energi dalam bentuk ATP yang nantinya akan digunakan untuk berbagai fungsi tubuh. Karena sifat lipofiliknya, rotenone dapat dengan mudah melintasi membrane sel, termasuk membran mitokondria). Rantai respirasi mitokondria (kompleks I-IV) adalah tempat utama penghasil ATP pada eukariot. ATP diperoleh dari hasil konversi NADH melalui proses transport elektron dan fosforilasi oksidatif. Rotenon menghambat respirasi mitokondria pada kompleks I dengan penghambatan oksidasi NADH menjadi NAD, selanjutnya menghambat transfer elektron dari Fe-S menuju ubiquinon sehingga jumlah ATP yang dihasilkan akan menurun. Selain peran redoksnya yang terkenal dalam rantai transpor elektron, kompleks I juga dianggap sebagai salah satu tempat utama produksi reactive oxygen species (ROS); adanya kebocoran elektron di kompleks I menyebabkan lebih banyak

elektron bebas untuk bereaksi dengan molekul oksigen untuk menghasilkan O₂⁻ (Superoksida). ROS yang berlebihan dapat mempengaruhi fungsi sel dan menginduksi kematian sel (Chen *et al.*, 2007; Fato *et al.*, 2009; Sanders dan Greenamyre, 2013).



Gambar 2.11 Mekanisme toksisitas rotenone (Xu *et al.*, 2015)

2.4 Asam Folat

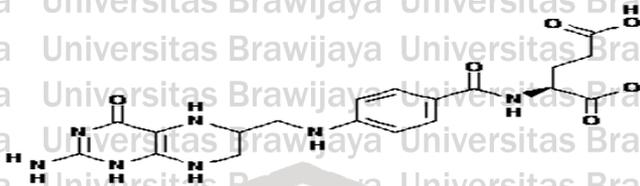
2.4.1 Karakteristik Asam Folat

Asam folat adalah bentuk sintetis dari folat, yaitu salah satu vitamin B yang merupakan koenzim untuk sintesis purin dan pirimidin. Asam folat adalah vitamin yang larut dalam air, karena sifatnya yang larut air, asam folat mudah diekskresikan dan tidak disimpan dalam tubuh. Asam folat memiliki sifat mudah rusak karena cahaya matahari, riboflavin, panas, dan estrogen (Gatt *et al.*, 2016).

Karakteristik fisiokimia Asam Folat:

- Rumus empiris : C₁₉H₁₉N₇O₆
- Berat molekul : 441.404 g/mol
- Densitas : 1.27 g/cm³ pada 20 °C
- Bau : Tidak berbau
- Titik leleh : 250 °C
- Kelarutan : 0.0016 mg/mL pada 25°C
- Tekanan penguapan : 6.2 x 10⁻²⁰ mmHg pada 25°C

Deskripsi fisik : serbuk kristal berwarna oranye kekuning-kuningan



Gambar 2.12 Struktur Molekul Asam Folat (PubChem, 2017)

2.4.2 Manfaat Asam Folat

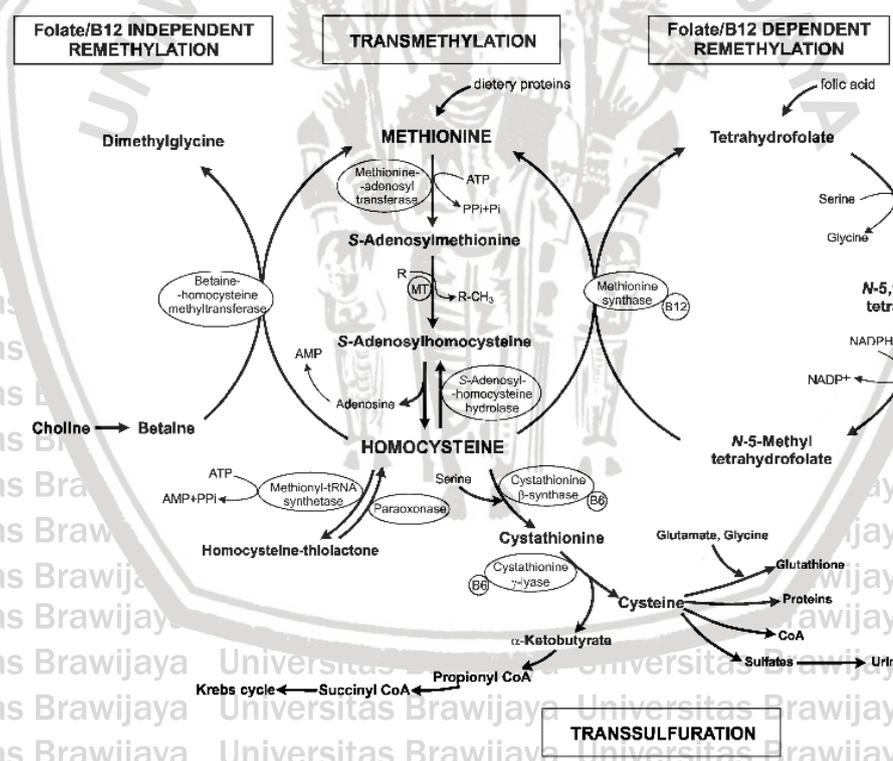
Penatalaksanaan *stunting* baik dari pencegahan maupun koreksi *stunting* masih belum jelas, sehingga dalam penelitian ini, digunakan asam folat (FA).

Penggunaan asam folat didasari oleh beberapa alasan, yaitu murah, mudah didapat, dan memang sudah dianjurkan untuk diberikan sebagai suplementasi ibu hamil untuk mencegah kelainan bawaan. Asam folat adalah vitamin B9 larut air yang merupakan nutrisi penting yang dibutuhkan untuk replikasi DNA dan sebagai substrat untuk berbagai reaksi enzimatik yang melibatkan sintesis asam amino dan metabolisme vitamin. Pada saat hamil terjadi perubahan hemodinamik seperti peningkatan volume darah, massa sel darah merah sejalan dengan perkembangan janin, sehingga kadar folat dalam darah menjadi turun. Hal ini menyebabkan kebutuhan terhadap asam folat meningkat untuk keperluan tumbuh kembang janin (Taulikar, 2013). Oleh karena itu suplementasi asam folat biasanya diberikan mulai sebelum hamil, selama hamil, dan saat menyusui. Asam folat berperan dalam produksi sel darah merah, perkembangan sistem saraf, otak, pertumbuhan linier dan pertumbuhan sumsum tulang belakang. Suplementasi asam folat pada awal kehidupan akan memberi dampak positif terhadap kesehatan tulang, hal ini ditunjukkan dengan adanya peningkatan Densitas Mineral Tulang (DMT), jaringan ikat trabekular, dan resistensi terhadap fraktur pada femur dan tulang belakang (Kaludjerovic, 2015). Konsumsi asam folat 5 mg sebelum hamil pada ibu yang memiliki risiko NTD sebelumnya, 400-600 mcg selama kehamilan, dan 500 mcg

selama menyusui dapat mencegah bayi lahir prematur, lahir cacat (*Neural Tube Defect/NTD*), berat bayi lahir rendah (BBLR), *Intra Uterin Growth Retardation* (IUGR), dan risiko keguguran .

2.4.3 Mekanisme Kerja Asam Folat

Untuk bisa bekerja asam folat harus direduksi terlebih dahulu menjadi *dihydrofolate* (DHF) dan kemudian *tetrahydrofolate* (THF) oleh enzim *DHF reductase* (DHFR). THF kemudian diubah menjadi *L-methylfolate* oleh enzyme *methylenetetrahydrofolate reductase* (MTHFR) yang dibutuhkan untuk transfer karbon selama proses penyusunan DNA, RNA, metilasi DNA, dan metabolisme homosistein (Greenberg *et al*, 2011; Strand *et al*, 2015).



Gambar 2.13 Jalur Asam Folat dan Homosistein (Škovierová, 2016)

2.4.4 Efek Antioksidan Asam Folat

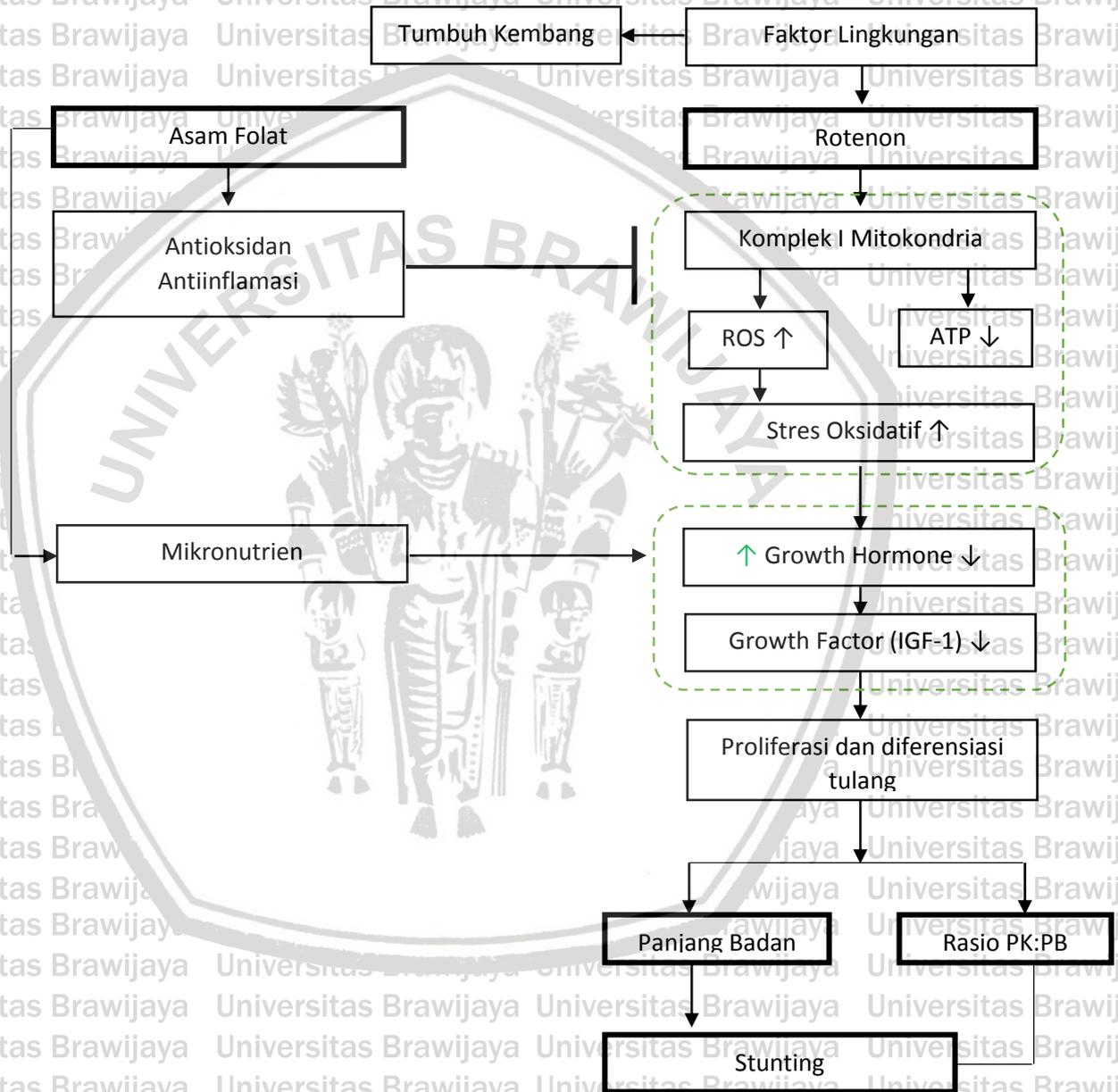
Efek antioksidan dari asam folat diteliti pada penelitian dengan model tikus hamil yang diberi paparan kronik alkohol, kapasitas asam folat dibandingkan dengan kapasitas trolox (analog vitamin E) sebagai antioksidan, asam folat memiliki

kapasitas yang tinggi sebagai antioksidan dan sedikit lebih baik dari kapasitas trolox. Efek antioksidan asam folat ini karena asam folat dapat bereaksi dan menghilangkan ROS, serta melindungi protein dan membrane lipid dari oksidasi (Cano *et al.*, 2001). Asam folat dapat dengan efektif menangkal radikal bebas, dimana jika dibiarkan radikal bebas ini akan menyebabkan stres oksidatif. Selain itu, karena sifatnya yang larut air, asam folat juga dapat menghambat peroksidasi lemak. Karena kemampuannya untuk menangkal radikal bebas, asam folat termasuk vitamin yang dapat dijadikan antioksidan (Joshi *et al.*, 2001).

Mekanisme asam folat sebagai antioksidan diperoleh dari proses menginduksi metabolisme *methionine*, dimana *methyltetrahydrofolate* dan homosistein sebagai substratnya, sehingga dapat menjaga kadar homosistein tubuh tetap dalam nilai normal. Kadar homosistein yang tinggi dapat meningkatkan kerusakan oksidatif melalui peningkatan produksi H_2O_2 , mempengaruhi system pertahanan antioksidan, dan menginduksi kerusakan DNA. Stress oksidatif terjadi saat oksidasi kelompok *thiol* bebas dari homosistein yang berikatan dengan protein plasma melalui ikatan disulfide. (Lee *et al.*, 2011).

BAB 3 KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :



: Yang diteliti



: Mempengaruhi/menginduksi



: Menghambat

3.2.1 Keterangan Kerangka Konsep Penelitian

Pertumbuhan dipengaruhi oleh dua faktor internal misalnya genetik dan eksternal dari faktor lingkungan. Salah satu faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi stunting yaitu bahan xenobiotic dari luar seperti pestisida yang dikenal sebagai *Hormonally Active Agents*, *Endocrine Disrupting Chemicals* atau *Endocrine Disrupting Compounds (EDCs)* yang dapat mengganggu proses sintesis, transport, pengikatan, metabolisme, sekresi, dan regulasi hormon yang berfungsi untuk menjaga keseimbangan atau homeostasis tubuh. Pestisida yang akan digunakan yaitu rotenon. Rotenon bekerja dengan menghambat kompleks 1 mitokondria yang dapat menyebabkan peningkatan reaksi oksigen spesies (ROS) dan terhambatnya pembentukan ATP karena NADH tidak bisa diubah menjadi ATP karena terganggunya proses fosforilasi oksidatif. ROS yang meningkat pada stunting terutama jenis superoksida (OH^-) akan meningkatkan stres oksidatif dan menyebabkan sel mengalami hipoksia, peningkatan suhu dan stres oksidatif. Terjadinya stress oksidatif dan penurunan ATP akan mengakibatkan penghambatan faktor pertumbuhan seperti IGF-1. IGF-1 adalah hormon yang mengatur pertumbuhan termasuk pada sel otot dan tulang pada proses osteogenesis. Karena osteogenesis terganggu maka akan menyebabkan stunting.

Asam folat sebagai sebagai suplemen bagi ibu hamil mengandung antioksidan dan anti inflamasi berperan sebagai *scavenger* dari ROS untuk menurunkan stress oksidatif dan juga menurunkan beberapa protein pro-inflamasi.

Asam folat juga merupakan mikronutrien yang dibutuhkan oleh tubuh sehingga jika kadarnya lebih banyak akan mencegah terjadinya *stunting*.

3.3 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian rotenon 12,5 ppb dapat menyebabkan *stunting* pada larva *zebrafish*
2. Pemberian asam folat pada fase prenatal berpengaruh terhadap peningkatan panjang badan pada *zebrafish* model *stunting*

3. Pemberian asam folat pada fase prenatal tidak mengubah rasio panjang kepala dengan panjang badan pada zebrafish model *stunting*.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental*) di laboratorium, dengan desain penelitian *randomized control group post test only design* atau post tes kelompok kontrol dengan alokasi random, dimana penentuan sampel ke masing-masing kelompok dilakukan secara acak.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah embrio *zebrafish* yang didapatkan dari hasil fertilisasi induk jantan dan betina *zebrafish* jenis *wild type* yang memiliki strip horizontal berwarna biru tua kehitaman dengan dasar warna perak, yang diperoleh dari Laboratorium Budidaya Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK) Universitas Brawijaya.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah embrio *zebrafish* (*Danio rerio*) usia 0-2 *hour post fertilization* (hpf), yang dibagi dalam 5 kelompok sehingga dibutuhkan 30 embrio x 5 kelompok = 150 embrio. Keseluruhan kelompok dilakukan ulangan sebanyak 3 kali (*triplicate*) sehingga jumlah keseluruhan embrio yang dibutuhkan adalah 450 embrio. Kelima kelompok tersebut adalah :

1. Kontrol negatif (KN) yaitu sampel yang tidak diberikan paparan rotenon dan asam folat, hanya medium embrionik
2. Kontrol positif rotenon (KP) yaitu sampel yang hanya diberikan paparan rotenon 12,5 ppb dan medium embrionik
3. Perlakuan rotenone + asam folat 1 (RAF50) yaitu sampel yang diberikan paparan rotenone 12,5 ppb dan asam folat 50 μM

4. Perlakuan rotenon + asam folat 2 (RAF70) yaitu sampel yang diberikan paparan rotenon 12,5 ppb dan asam folat 70 μM

5. Perlakuan rotenon + asam folat 3 (RAF100) yaitu sampel yang diberikan paparan rotenone 12,5 ppb dan asam folat 100 μM

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat Penelitian :

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB) Malang.

Waktu Penelitian : Pada bulan Agustus - September 2018

4.4 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Konsentrasi asam folat (50, 70 dan 100 μM)
2. Variabel terikat : Panjang Badan (PB), Rasio Panjang Kepala dengan Panjang Badan (PK:PB)
3. Variabel kendali : medium embrionik (E3), konsentrasi rotenon, suhu inkubator $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, pakan larva (TetraMin®), air filtrasi, kebersihan plate/well dan inkubator,

4.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi

Embrio yang berusia 0-2 hpf, bulat, berwarna transparan, tidak berjamur saat dilihat dengan mikroskop OptiLab stereo.

2. Kriteria Eksklusi

Embrio *zebrafish* yang tidak bulat, menempel dengan embrio lain, berwarna putih, kosong (tidak terbuahi), berjamur, cacat, *premature hatching*.

4.6 Definisi Operasional

1. Kriteria *Stunting*

Stunting adalah gangguan pertumbuhan di mana panjang badan menurut (PB/U) $< -2\text{SD}$ berdasarkan grafik pertumbuhan WHO. Anak *stunting* diketahui

memiliki panjang badan normal saat lahir, tidak ada kelainan bawaan dan memiliki proporsi tubuh yang sama dengan anak normal (Darwitri, 2018).

2. Ukuran Panjang Badan Larva *Zebrafish*

Pengukuran panjang badan dilakukan dengan mengukur *Standard Length* (SL) yang diukur dari ujung hidung (*tip of the snout*) sampai dengan vertebra terakhir/pangkal sirip ekor (*caudal (tail) fin*) atau biasa disingkat sebagai '*snout-fin*', dengan menggunakan satuan millimeter (μM). Teknik pengukuran dilakukan dengan cara memindahkan larva *zebrafish* ke dalam *object glass* dengan sedikit air, ikan dalam posisi diam dan lurus. Larva *zebrafish* kemudian diamati dengan mikroskop stereo (Olympus SZ61) dan dilakukan pengambilan gambar menggunakan OptiLab Viewer v2.2. Pengukuran panjang badan (SL/PB) dilakukan menggunakan *software Image Raster v3.0* yang sudah dikalibrasi terlebih dahulu. Kriteria larva *zebrafish* dikatakan *stunting* jika panjang badan (SL) $< -2\text{SD}$ dibanding kelompok kontrol. Pengukuran panjang badan dilakukan pada hari ke 3, 6 dan 9 dpf (Darwitri, 2018).

3. Ukuran Rasio Panjang Kepala Larva *Zebrafish*

Panjang kepala (PK) diukur mulai dari *snout* sampai ke operculum (*Gill cover*), kemudian dibandingkan dengan panjang badan (PB/SL) yaitu dari *snout* ke *caudal fin*. Hal ini dilakukan untuk melihat proporsi PK:PB pada larva usia 3,6 dan 9 dpf.

4. Embrio *zebrafish* (*Danio rerio*)

Embrio yang digunakan adalah embrio yang sehat, usia 0-2 hpf, bentuk bulat, warna transparan (tidak berwarna putih/keruh), tidak berjamur, dan tidak saling menempel. Embrio diperoleh dari hasil fertilisasi induk jantan dan betina *zebrafish* jenis *wild type* dari Laboratorium Budidaya Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan.

5. Rotenon

Rotenon yang digunakan diperoleh dari Sigma (R8875) dengan kemurnian \geq 95% dengan konsentrasi 12,5 ppb (Darwitri, 2018).

6. Asam Folat

Asam folat diperoleh dari Sigma (F7876) dengan kemurnian 97% yang dilarutkan dengan natrium karbonat (Na_2CO_3) ditambahkan air sampai konsentrasi akhir 50, 70 dan 100 μM .

4.7 Pengolahan dan Analisis Data

Analisis data statistik :

1. Menguji perbedaan panjang badan kelompok kontrol dengan kelompok rotenon (KN dan KP), menggunakan uji *Independent t-test*.
2. Menguji perbedaan panjang badan kelompok kontrol, kelompok rotenon dan kelompok asam folat dengan uji One Way Anova dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc Tukey*.
3. Mengetahui rasio panjang kepala dengan panjang badan pada kelompok kontrol, kelompok rotenon dan kelompok asam folat dengan *Microsoft Excel* 2013.

4.8 Alat dan Bahan

4.8.1 Alat dan Bahan Pembuatan Larutan Asam Folat

Alat :

falcon 15 mL, timbangan digital (Mettler Toledo), sendok pengaduk, mortar dan stamper, mikropipet.

Bahan :

Serbuk asam folat (sigma F7876), serbuk natrium karbonat (Na_2CO_3) sebagai pelarut, akuades, aluminium foil.

4.8.2 Alat dan Bahan Pembuatan Medium Embrionik (E3)

Alat :

timbangan digital (Mettler Toledo); tabung reaksi 500 mL; sendok pengaduk; kertas saring.

Bahan :

MgSO₄ 3,2 g; NaCl 2 g; CaCl₂ 0,08 g; KCl 0,06 g; Air Filtrasi 200 mL

4.8.3 Alat untuk Pengukuran Panjang Badan dan Rasio Panjang Kepala dengan Panjang Badan

Laptop yang telah terpasang *software* Optilab 2.2 dan Image Raster 3.0, kamera digital, mikroskop, pipet, gelas objek.

4.9 Prosedur Penelitian

4.9.1 Pengambilan dan Perawatan Embrio

Zebrafish diberi makan dan dibiarkan terlebih dahulu selama ± 1 jam, kemudian dilakukan pemasangan tempat penangkaran telur hasil fertilisasi dan bisa dilanjutkan dengan memulai siklus gelap terang (gelap 10 jam : terang 14 jam).

Pengaturan siklus gelap terang dilakukan sesuai keinginan peneliti. Pada penelitian

ini siklus gelap 10 jam dimulai pukul 16.00 s/d 02.00 WIB. Kemudian siklus terang

selama 14 jam dimulai 02.00 s/d 16.00 WIB. Setelah lampu dinyalakan selama 20-

30 menit untuk memberikan kesempatan fertilisasi dan meletakkan telur, trap yang

berisi embrio segera diangkat dan dipindahkan gelas beker, dan dibersihkan

dengan air filtrasi sebanyak 3 kali. Proses pembersihan tidak boleh melebihi 2 hpf

agar diperoleh embrio yang berkualitas baik dan tidak berjamur. Setelah bersih,

embrio dipindahkan ke dalam well plate 6 sumuran yang sudah diberi medium

embrionik (E3), rotenon dan asam folat sesuai perlakuan kelompok masing-masing

30 ekor/well. Embrio selanjutnya dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu

28°C. Pemberian perlakuan dilakukan sampai 3 dpf. Selama disimpan di dalam

inkubator medium embrionik harus diganti setiap hari, dan larva sudah bisa diberi

makan di usia 6 dpf.

4.9.2 Pembuatan Medium Embrionik (E3)

Pembuatan medium embrionik 200 mL dilakukan sesuai dengan prosedur dari (Avdesh et al.,2012). Semua bahan ($MgSO_4$ 3,2 g; $NaCl$ 2 g; $CaCl_2$ 0,08 g; KCl 0,06 g) ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 200 mL air filtrasi. Untuk memastikan semua sudah terlarut bisa dengan mengaduk dengan sendok atau cukup dengan menggoyangkan tabung reaksi. Stok dimasukkan ke dalam botol, ditutup rapat dan disimpan di lemari es dengan suhu $2-8^{\circ}C$. Jika ingin menggunakan cukup mengambil medium embrionik secukupnya dan ditambahkan air filtrasi dengan perbandingan 1:9.

4.9.3 Pembuatan Larutan Rotenon

Rotenon (sigma R8875) yang berbentuk serbuk dilarutkan dengan DMSO (*dimethyl sulfoxide* 1%). Kemudian diperoleh konsentrasi $2 \times 10^3 \mu g/L$ sebagai stok. Untuk membuat konsentrasi rotenon 12,5 ppb, dan volume yang dibutuhkan sebanyak 15 mL (5 mL x 3 sumuran), maka larutan dibuat dengan menggunakan rumus :

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 2 \times 10^3 &= 15 \text{ mL} \times 12,5 \\ V_1 &= \frac{187,5}{2 \times 10^3} \\ V_1 &= 93,75 \times 10^{-3} \text{ mL} = 93,75 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Keterangan :

V_1 : volume awal

M_1 : konsentrasi stok

V_2 : volume yang diinginkan

M_2 : konsentrasi yang diinginkan

Langkah selanjutnya yaitu mengambil rotenon 93,75 μL dengan mikropipet, kemudian ditambahkan air filtrasi sebanyak 15 mL sehingga diperoleh rotenon konsentrasi 12,5 ppb.

4.9.4 Pembuatan Larutan Asam Folat

Larutan asam folat stok 5mM (5000 μM) dibuat dengan melarutkan serbuk asam folat sebanyak 22.07 mg pada Na_2CO_3 7 mg ditambahkan akuades 10 mL. Untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan, dapat menggunakan rumus :

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 5000 \mu\text{M} &= 15 \text{ mL} \times 50 \mu\text{M} \\ V_1 &= 0.15 \text{ mL} \end{aligned}$$

Keterangan :

V_1 : volume awal

M_1 : konsentrasi stok

V_2 : volume yang diinginkan

M_2 : konsentrasi yang diinginkan

Berdasarkan perhitungan tersebut, diperoleh volume yang dibutuhkan untuk konsentrasi 50 μM sebanyak 0,15 mL, 70 μM sebanyak 0,21 mL dan 100 μM sebanyak 0,30 mL kemudian masing-masing ditambahkan air filtrasi sebanyak 15 mL.

4.9.5 Pemberian Larutan Rotenon dan Asam Folat

Pemberian larutan rotenone 12,5 ppb dan asam folat konsentrasi 50, 70 dan 100 μM dilakukan secara konsisten dan dalam waktu yang sama.

1. Kontrol positif (KP)

Larutan rotenon konsentrasi 12,5 ppb dibuat dengan mengambil rotenon sebanyak 93,75 μL kemudian ditambahkan air filtrasi sebanyak 15 mL ke dalam falcon. Larutan kemudian dibagi ke masing-masing sumuran sebanyak 5 mL.

2. Rotenon dan Asam Folat Konsentrasi (RAF50, RAF70, RAF100)

Tabel 4.1 Konsentrasi Rotenon dan Asam Folat

Nama	Konsentrasi yang diminta		Stok Rotenon μL	Stok Asam Folat mL	Air Filtrasi mL	Jumlah Well	Tiap Well mL
	Rotenon $\mu\text{g/L}$	Asam Folat μM					
RAF50	12,5	50	93,75	0,15	15	3	5
RAF70	12,5	70	93,75	0,21	15	3	5
RAF100	12,5	100	93,75	0,30	15	3	5

3. Waktu pemberian paparan, penggantian medium dan pakan larva

Pemberian paparan dilakukan sebanyak 3 kali yaitu 2 hpf, 24 hpf, dan 48 hpf. Hal analog dengan bayi saat masih dalam kandungan (*intrauterine*).

Setelah *hatching* pada usia 72 hpf embrio bisa dibilas dengan medium embrionik sebanyak 3 kali sampai paparan hilang. Larva kemudian diamati dengan mikroskop, diambil gambarnya, kemudian diukur panjang badan serta rasio panjang kepala dengan panjang badan pada 3 dpf, 6 dpf, dan 9 dpf. Untuk menghindari kontaminasi medium embrionik harus diganti setiap hari. Larva yang sudah berusia 6 dpf harus sudah diberi pakan dari luar yaitu tetramin

granule untuk menjaga kelangsungan hidup. Pada larva usia 5 dpf kebawah tidak memerlukan nutrisi dari luar karena masih mendapat nutrisi dari *yolk sac*.

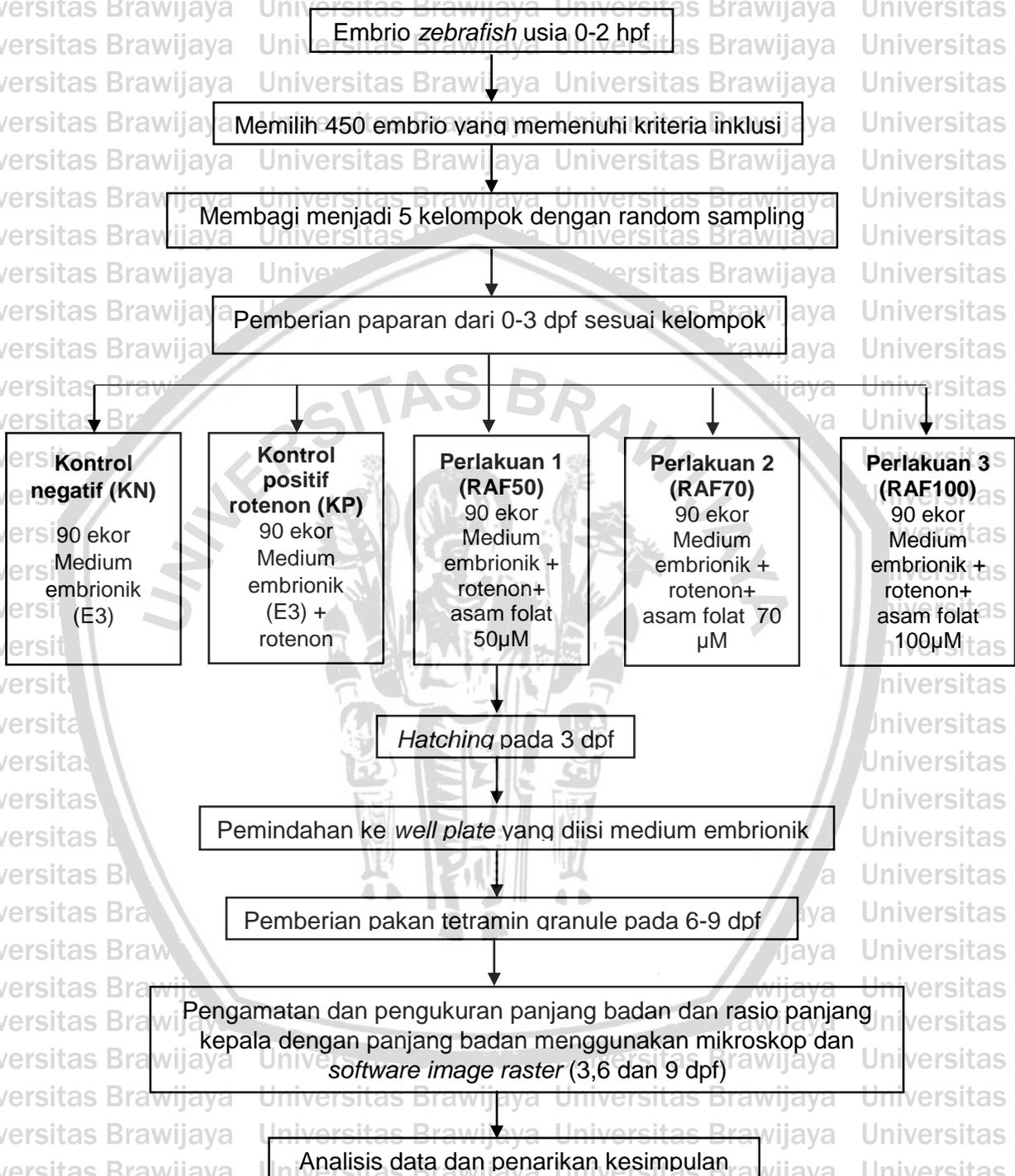
4.9.6 Pengukuran Panjang Badan

Pengukuran panjang badan dilakukan dengan mengukur *Standard Length* (SL) yang diukur dari ujung hidung (*tip of the snout*) sampai dengan vertebra terakhir/pangkal sirip ekor (*caudal (tail) fin*) atau biasa disingkat sebagai '*snout-fin*', dengan menggunakan satuan mikrometer (μm). Teknik pengukuran dilakukan dengan cara memindahkan larva *zebrafish* ke dalam object glass dengan sedikit air, ikan dalam posisi diam dan lurus. Larva *zebrafish* kemudian diamati dengan mikroskop stereo (Olympus SZ61) dan dilakukan pengambilan gambar menggunakan OptiLab versi 2.2. Pengukuran panjang badan (SL) dilakukan menggunakan *software Image Raster versi 3.0* yang sudah dikalibrasi terlebih dahulu. Pengukuran PB dilakukan pada hari ke 3, 6 dan 9 dpf.

4.9.7 Pengukuran Rasio Panjang Kepala dengan Panjang Badan

Panjang kepala (PK) diukur mulai dari *snout* sampai ke operculum (*Gill cover*), kemudian dibandingkan dengan panjang badan (PB/SL) yaitu dari *snout* ke *caudal fin*. Hal ini dilakukan untuk melihat proporsi PK:PB pada larva usia 3,6 dan 9 dpf.

4.10 Alur Penelitian



BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Studi Eksplorasi

Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Darwitri (2018) diketahui bahwa konsentrasi rotenon 12,5 ppb dapat digunakan untuk membuat model stunting larva *zebrafish* dengan derajat kepercayaan 95%.

Studi eksplorasi dilakukan untuk memperoleh konsentrasi asam folat yang bisa memberikan efek pencegahan atau koreksi pada larva *zebrafish* model stunting.

Studi eksplorasi ini dilakukan pada bulan Agustus 2018. Studi eksplorasi dilakukan dengan cara embrio *zebrafish* yang dibagi dalam beberapa kelompok perlakuan antara lain: kelompok kontrol [KN], kelompok rotenon konsentrasi 12,5 ppb [KP], kelompok rotenon asam folat dengan 9 konsentrasi [RAF 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μM]. Embrio *zebrafish* mulai diberi paparan pada usia 2 hpf (*hour post fertilization*) sampai 72 hpf atau selama 3 dpf (*day post fertilization*), kemudian diikuti dan dicatat pertumbuhannya pada 3, 6 dan 9 dpf.

5.1.1 Survival Rate dan Hatching Rate

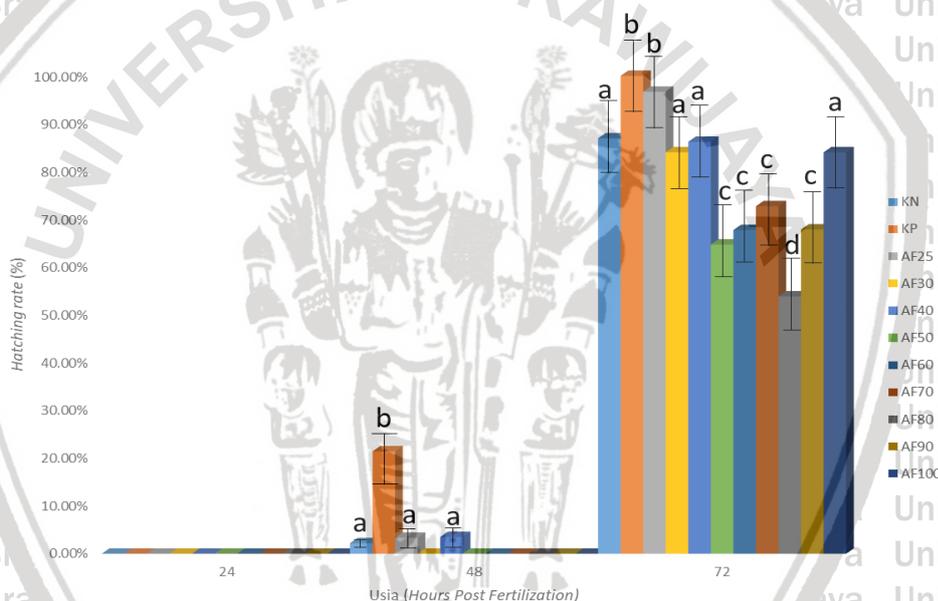
Survival Rate (SR) dihitung bertujuan untuk mengetahui apakah penelitian ini telah memenuhi syarat *survival rate* embrio > 80%. *Survival rate* dilihat pada usia 24, 48 dan 72 hpf. Sedangkan, *Hatching Rate* (HR) digunakan untuk mengetahui laju penetasan embrio *zebrafish* apakah normal atau tidak.

Tabel 5.1 Tabel Presentase Survival Rate Studi Eksplorasi pada 24, 48 dan 72 hpf

	KN	KP	RAF25 μM	RAF30 μM	RAF40 μM	RAF50 μM	RAF60 μM	RAF70 μM	RAF80 μM	RAF90 μM	RAF100 μM
24hpf	93.10%	89.65%	100.00%	83.33%	96.67%	100.00%	93.39%	95.65%	92.85%	93.33%	83.33%
48dpf	91.67%	85.24%	100.00%	77.27%	86.20%	97.05%	91.30%	96.23%	92.59%	80.00%	83.33%
72dpf	68.42%	81.89%	85.71%	65.00%	74.07%	93.75%	85.71%	75.00%	77.78%	54.54%	38.46%

Studi eksplorasi Tabel 5.1 *survival rate* penelitian ini sudah memenuhi syarat yaitu >80% sampai pada 72 hpf. Sehingga penelitian ini bisa dilanjutkan ke tahap selanjutnya. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada toksisitas akut dari asam folat terhadap larva *zebrafish* pada konsentrasi yang digunakan. Rata-rata *survival rate* tertinggi yaitu pada pada 24 hpf dan mulai menurun pada 72 hpf.

Gambar 5.1 *Hatching rate* dari studi eksplorasi menunjukkan bahwa umumnya telur akan mulai menetas pada 48 hpf pada beberapa kelompok dan pada 72 hpf sudah menetas pada semua kelompok.



Gambar 5.1 Grafik *Hatching Rate* Larva *Zebrafish* pada Studi Eksplorasi

5.1.2 Hasil Pengukuran Rerata Panjang Badan Larva *Zebrafish*

Hasil pengukuran rerata panjang badan larva *zebrafish* antara kelompok kontrol, kelompok rotenon, dan rotenon asam folat konsentrasi 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μM pada usia 3, 6 dan 9 dpf menunjukkan bahwa terjadi peningkatan panjang badan pada kelompok asam folat dibandingkan dengan kelompok rotenon.

Perbedaan rerata panjang badan pada kelompok kontrol dengan kelompok rotenon belum terlihat pada usia 3 dpf. Sedangkan pada usia 6 dan 9 dpf pada kelompok rotenon panjang badan lebih pendek dari kelompok kontrol. Pada

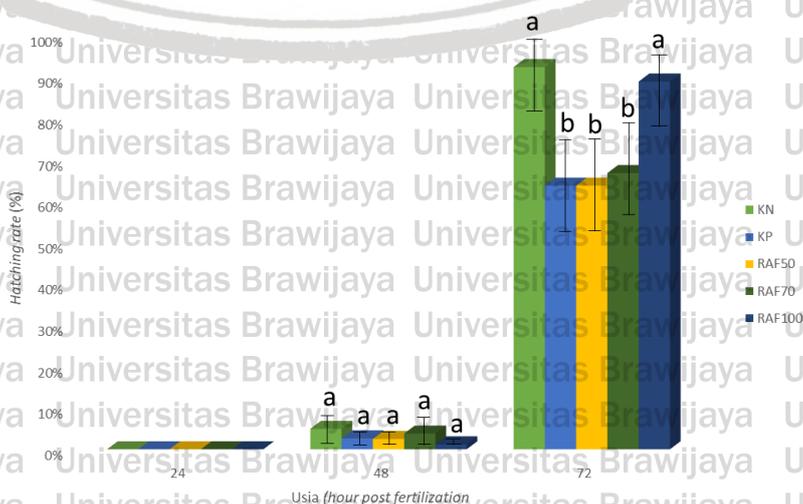
kelompok rotenon dengan kelompok perlakuan dengan asam folat menunjukkan bahwa kelompok perlakuan memiliki rerata panjang badan lebih baik dari kelompok rotenon di usia 3, 6 dan 9 dpf. Sedangkan jika membandingkan antara kelompok kontrol dengan perlakuan asam folat ditemukan bahwa kelompok perlakuan mengalami penambahan panjang badan yang baik dan hampir bisa menyamai kelompok kontrol. Berdasarkan studi eksplorasi ini akhirnya dipilih 3 konsentrasi asam folat yaitu 50, 70 dan 100 μM . Hal ini dikarenakan pada ketiga konsentrasi tersebut terjadi peningkatan panjang badan yang konsisten dan juga ingin melihat efek asam folat pada konsentrasi rendah, *cut-off point* dan pada konsentrasi tinggi.

5.2 Hasil Penelitian

Tiga konsentrasi asam folat yang telah didapatkan dari hasil studi eksplorasi akan diuji efektivitasnya untuk pencegahan dan koreksi model *stunting* larva *zebrafish*, yaitu konsentrasi asam folat 50, 70 dan 100 μM . Sama seperti pada saat studi eksplorasi embrio mulai diberi paparan pada 2 hpf hingga 3 dpf, dengan mengganti medium embrionik setiap hari dan kemudian diamati pertumbuhannya setiap 3, 6 dan 9 dpf.

5.2.1 Survival Rate dan Hatching Rate

Survival rate larva *zebrafish* pada 24, 48 dan 72 hpf semua kelompok mencapai >80%.



Gambar 5.2 Grafik Hatching Rate Larva Zebrafish pada 24, 48 dan 72 hpf

Hatching rate pada 24 hpf belum ada telur yang menetas (0%). Pada 48 hpf ada beberapa kelompok yang mulai menetas yaitu dengan *hatching rate* tertinggi pada kelompok kontrol, baik usia 48 maupun 72 hpf. Dan *hatching rate* terendah ditemukan pada kelompok rotenon.

5.2.2 Hasil Pengukuran Rerata Panjang Badan Larva *Zebrafish* antara Kelompok Kontrol dengan Kelompok Rotenon [12,5 ppb] pada Usia 3, 6 dan 9 dpf

Larva *zebrafish* difoto dengan menggunakan software *Optilab Viewer 2.2*, dan pengukuran panjang badan dengan software *Image Raster 3.0*. Berikut adalah perbandingan rerata panjang badan dan tampilan larva *zebrafish* antara kelompok kontrol dan rotenon usia 3, 6 dan 9 dpf.

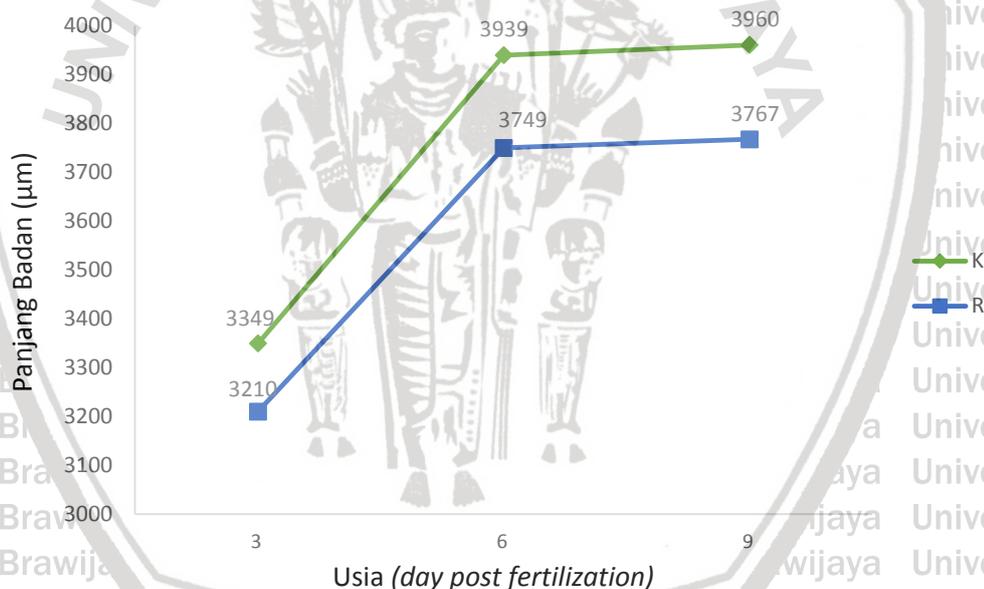
Tabel 5.2 Tabel Rerata Panjang Badan Larva *Zebrafish* antara Kelompok Kontrol dengan Kelompok Rotenon

Usia (dpf)	3		6		9	
Kelompok	Kontrol	Rotenon	Kontrol	Rotenon	Kontrol	Rotenon
						
Gambar (perbesaran 4.5x)						
Mean (μm)	3349 \pm	3210 \pm	3939 \pm	3749 \pm	3960 \pm	3767 \pm
\pm SD	0,072	0,064	0,093	0,106	0,087	0,123
p-value	0,000		0,000		0,000	
Kesimpulan	beda bermakna		beda bermakna		beda bermakna	

Tabel 5.2 menunjukkan pertumbuhan panjang badan larva *zebrafish* pada kelompok kontrol dan rotenon. Rerata panjang badan larva *zebrafish* pada usia 3, 6 dan 9dpf terdapat perbedaan antara kelompok kontrol dan rotenon. Usia 3 dpf kelompok rotenon memiliki rerata panjang badan yang lebih rendah dari kontrol

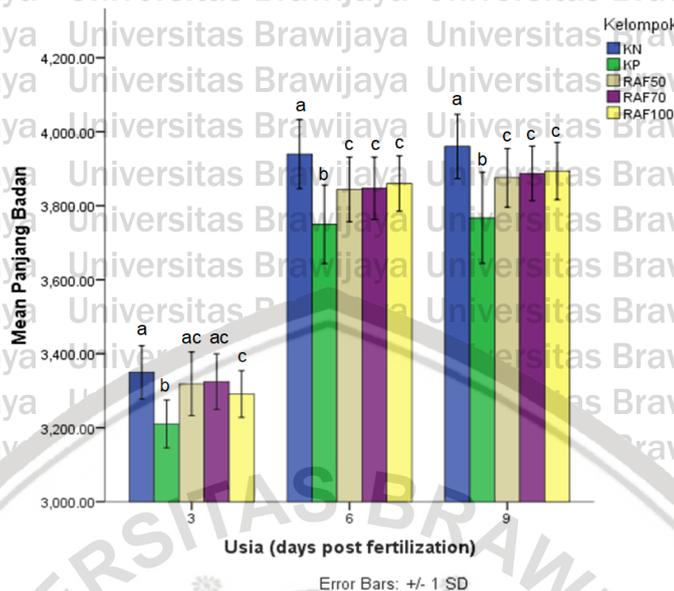
dengan selisih 139,36 μm . Rerata panjang badan kelompok rotenon pada usia 3 dpf walaupun terdapat beda signifikan tetapi belum ada yang lebih pendek dari -2SD jika dibandingkan dengan kontrol. Sedangkan pada usia 6 dan 9 dpf rerata panjang badan kelompok rotenon $<-2\text{SD}$ dengan perbedaan 189,92 μm pada 6 dpf dan 192,92 μm pada 9 dpf.

Perbedaan rerata panjang badan larva *zebrafish* antara kelompok kontrol dengan kelompok rotenon dianalisis menggunakan uji statistik *independent t test*. Hasil uji statistik pada 3, 6 dan 9 dpf memiliki nilai signifikansi 0,000 ($p\text{-value} < 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan panjang badan yang bermakna antara kelompok kontrol dan rotenon.



Gambar 5.3 Grafik Rerata Panjang Badan antara Kelompok Kontrol dengan Kelompok Rotenon pada Usia 3, 6 dan 9 dpf

5.2.3 Hasil Pengukuran Rerata Panjang Badan Larva *Zebrafish* antara Kelompok Rotenon [12,5 ppb] dengan Kelompok Rotenon Asam Folat [RAF 50, 70, 100 μM] pada Usia 3, 6, 9 dpf



Gambar 5.4 Grafik Rerata Panjang Badan antara Kelompok Kontrol, Rotenon dengan Kelompok Perlakuan Asam Folat pada Usia 3, 6 dan 9 dpf

Perbedaan panjang badan antar kelompok pada usia 3, 6 dan 9 dpf dianalisis menggunakan uji statistik *One Way Anova* untuk mengetahui apakah ada efek pemberian asam folat dengan berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan larva *zebrafish* model *stunting* yang diinduksi rotenon. Gambar 5.4 rerata panjang badan larva *zebrafish* pada usia 3 dpf menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok rotenon dan RAF100µM, tetapi tidak signifikan pada kelompok 50 dan 70µM. Rerata panjang badan pada 100 µM lebih pendek dari kelompok 50 dan 70µM. Rerata panjang badan larva *zebrafish* usia 6 dan 9 dpf menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol, rotenon dan kelompok asam folat walaupun perbedaan antara kelompok 50,70 dan 100 µM tidak signifikan. Berdasarkan grafik rerata panjang badan larva *zebrafish* meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi asam folat yaitu dari konsentrasi 50, 70 dan 100 µM yang terlihat konsisten pada usia 6 dan 9 dpf.

Tabel 5.3 Rerata Panjang Badan Larva *Zebrafish* antara Kelompok Kontrol, Kelompok Rotenon dengan Kelompok Rotenon Asam Folat pada 3, 6 dan 9 dpf

Usia (dpf)	3					6					9				
Kelompok	KN	KP	RAF50	RAF70	RAF100	KN	KP	RAF50	RAF70	RAF100	KN	KP	RAF50	RAF70	RAF100
															
PB (µm)	3349±	3210±	3318±	3324±	3291±	3939±	3749±	3843±	3846±	3859±	3960±	3767±	3875±	3887±	3893±
Mean ± SD	0,072	0,064	0,085	0,075	0,063	0,093	0,106	0,087	0,084	0,074	0,087	0,123	0,079	0,073	0,077

Keterangan :

KN : Kontrol Negatif

KP : Kontrol Positif (Rotenon)

RAF50 : Rotenon dengan konsentrasi Asam Folat 50µM

RAF70 : Rotenon dengan konsentrasi Asam Folat 70µM

RAF100 : Rotenon dengan konsentrasi Asam Folat 100µM

5.2.4 Hasil Pengukuran Rasio Panjang Kepala dengan Panjang Badan pada Larva Zebrafish Model Stunting dengan Induksi Rotenon pada Usia 3, 6 dan 9 dpf

Tabel 5.4 Rasio Panjang Kepala dengan Panjang Badan pada Larva Zebrafish Model Stunting dengan Induksi Rotenon pada Usia 3, 6 dan 9 dpf

Usia (dpf)	3					6					9				
	KN	KP	AF50	AF70	AF100	KN	KP	AF50	AF70	AF100	KN	KP	AF50	AF70	AF100
Rata-rata PK (mm)	0,671	0,650	0,665	0,672	0,662	0,783	0,757	0,770	0,773	0,776	0,794	0,760	0,778	0,780	0,787
Rata-rata PB (mm)	3,351	3,212	3,320	3,327	3,298	3,942	3,751	3,846	3,850	3,863	3,960	3,769	3,878	3,888	3,899
Rasio PK:PB	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5

Keterangan :

KN : Kontrol Negatif

KP : Kontrol Positif (Rotenon)

RAF50 : Rotenon dengan konsentrasi Asam Folat 50 μ M

RAF70 : Rotenon dengan konsentrasi Asam Folat 70 μ M

RAF100 : Rotenon dengan konsentrasi Asam Folat 100 μ M

Tabel 5.4 merupakan pengukuran panjang kepala dan panjang badan digunakan untuk mengetahui proporsi antara kepala dan badan dalam bentuk rasio. Hasil pengukuran rasio rerata panjang kepala dan badan antara kelompok kontrol (KN) dan rotenon (KP) usia 3, 6 dan 9 memiliki perbandingan yang sama, yaitu 1 : 5. Sedangkan pada kelompok yang diberi perlakuan rotenon dan asam folat pada konsentrasi 50, 70 dan 100 μ M juga memiliki perbandingan PK : PB yang sama, yaitu 1 : 5. Perbandingan yang sama antar menunjukkan adanya proporsi pertumbuhan yang sama dan normal. Hal ini membuktikan bahwa pemberian asam folat pada larva *zebrafish* model *stunting* dapat mempengaruhi pertumbuhan panjang tetapi tidak mempengaruhi rasio pertumbuhan panjang kepala dengan panjang badan.



BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Pemberian Rotenon terhadap Panjang Badan

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa induksi rotenon 12,5 ppb akan menyebabkan *stunting* pada larva *zebrafish* dengan derajat kepercayaan 98% pada pemberian perlakuan selama 2-72 hpf (*hours post fertilization*) (Cory'ah, 2017).

Pada penelitian ini larva *zebrafish* sudah memenuhi kriteria *stunting* dimana terdapat z-score (tinggi badan menurut umur) $< -2SD$, pada saat lahir normal, tidak ada kelainan kongenital, dan rasio panjang kepala dengan panjang badan antara kelompok kontrol dengan kontrol rotenon sama. Pada penelitian ini pertumbuhan panjang badan diukur pada usia 3, 6 dan 9 dpf dengan perbandingan analogi usia *zebrafish* dengan manusia bisa dilihat berdasarkan ontogen siklus bangun-tidur pada *zebrafish* yang menyatakan bahwa *zebrafish* usia 3, 6, 9 dpf analog dengan anak-anak usia 0 hari (bayi baru lahir), 2 tahun, dan 8 tahun (Sorribes, 2013).

Survival rate larva *zebrafish* pada 24,48 dan 72 hpf pada semua kelompok mencapai $>80\%$. Hal ini menunjukkan bahwa kualitas telur untuk penelitian ini baik, karena bisa bertahan sampai pada usia 3 dpf. Embrio *zebrafish* normal akan menetas pada usia 72 hpf. Hal ini menunjukkan bahwa embrio yang dipakai untuk penelitian sudah memenuhi syarat usia yaitu 2-4 hpf.

Tabel 5.2 menunjukkan perbedaan rerata pertumbuhan panjang badan larva *zebrafish* pada kelompok perlakuan kontrol dengan kelompok rotenon. Pada kelompok rotenon rerata pertumbuhan panjang badan lebih rendah daripada kelompok kontrol. Pada 3 dpf terjadi perbedaan bermakna panjang pada kelompok rotenon namun masih dalam batas normal (belum mencapai $< -2SD$). Pada kelompok rotenon 6 dan 9 dpf rerata panjang badan larva *zebrafish* $< -2SD$ dengan perbedaan 189,92 μ m pada 6 dpf dan 192,92 μ m pada 9 dpf. Berdasarkan hasil uji statistik dengan *independent t-test* pada 6, 9 dpf memiliki nilai signifikansi 0,000 (p -

value <0,5) yang berarti terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok rotenon. Sehingga kriteria *stunting* pada penelitian ini terpenuhi, yaitu terdapat selisih panjang badan <-2SD yang mulai terlihat pada usia 6 dpf (setara 2 tahun). *Stunting* mulai terlihat pada usia 2 tahun.

Rotenon sebagai zat yang menginduksi terjadinya *stunting* pada larva *zebrafish* bekerja sebagai *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDCs) yang dapat mengganggu homeostasis dengan menurunkan produksi ATP dan meningkatkan ROS (Radad, 2006). Rotenon menghambat respirasi mitokondria pada kompleks I dengan penghambatan oksidasi NADH menjadi NAD, selanjutnya menghambat transfer elektron dari Fe-S menuju ubiquinon sehingga jumlah ATP yang dihasilkan akan menurun. Adanya kebocoran elektron di kompleks I menyebabkan lebih banyak elektron bebas untuk bereaksi dengan molekul oksigen untuk menghasilkan O_2^- (Superoksida). Superoksida akan dikonversi menjadi H_2O_2 dan O_2 oleh SOD sebagai antioksidan endogen. H_2O_2 sendiri bersifat tidak reaktif, tetapi jika bereaksi dengan Fe^{2+}/Cu^{2+} akan membentuk *highly reactive hydroxyl* (OH^-) yang radikal. Hidroksil radikal bisa menyerang *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) dengan proses peroksidasi lemak membentuk hidroperoksida. Salah satu aldehid sekunder yang dihasilkan dari reaksi ini adalah *malondialdehyde* (MDA) yang mampu menginaktivasi berbagai protein seluler (Birben, 2012; Ayala, 2014).

Pada penelitian pada anak *stunting* sebelumnya menunjukkan bahwa terjadi peningkatan MDA dan penurunan antioksidan endogen seperti katalase, SOD dan GSH (Picasso, 2016). Sedangkan pada penelitian dengan rotenon 30 mg/kg selama 60 hari yang diinduksi pada tikus juga mengakibatkan peningkatan signifikan MDA dan penurunan antioksidan GSH (Zou *et al.*, 2016).

Paparan rotenon yang lama menyebabkan peningkatan ROS sehingga terjadi stress oksidatif dan akan menyebabkan gangguan pada *Insulin Growth Factor 1* (IGF-1) karena kegagalan pembentukan ATP. Inhibisi pada jalur IGF-1 yang bertanggungjawab memediasi tumbuh kembang sel somatik termasuk otot

dan tulang selama fase prenatal dan post natal akan berakibat terganggunya proses tumbuh kembang yang normal (Wood, 2005). *Stunting* merupakan salah satu dampak dari terjadinya gangguan hormon dan faktor pertumbuhan IGF-1. Kadar ATP yang berkurang juga akan mengakibatkan terhambatnya proses metabolisme dan mitogenik. Hambatan proses metabolisme ini juga dapat mempengaruhi konsentrasi IRS-1 sebagai efektor utama reseptor insulin menjadi berkurang yang ditunjukkan dengan adanya gangguan pertumbuhan (Gual *et al*, 2005).

Peningkatan ROS juga akan mengganggu proses osifikasi dan pertumbuhan tulang melalui proses induksi RANKL (*receptor activator of nuclear kappa beta ligand*) yang akan berinteraksi dengan RANK dan akan mengaktifasi jalur RANK sehingga mengakibatkan terjadinya ketidakseimbangan dalam proses pembentukan dan resorpsi tulang (Ha, 2014). Pada penelitian yang dilakukan oleh Ariyati (2017) dibuktikan bahwa pada keadaan *stunting* terjadi penurunan ekspresi osteoprotegerin (OPG) yang merupakan reseptor yang dapat menghambat osteoklastogenesis dengan cara berkompetisi dengan RANKL untuk bisa terikat pada RANK sehingga bisa melindungi perkembangan tulang. Sedangkan RANKL merupakan sitokin yang berfungsi dalam meregulasi pembentukan dan aktivasi osteoklast dan resorpsi tulang. Keseimbangan antara OPG dan RANKL berperan penting dalam homeostasis tulang dengan mempengaruhi regulasi osteoklastogenesis (Hosseini-nezhad, 2011). Mekanisme inilah yang menyebabkan pertumbuhan tulang pada *stunting* menjadi terhambat jika terdapat RANKL lebih banyak daripada OPG.

6.2 Pengaruh Pemberian Asam Folat terhadap Panjang Badan

Gambar 5.5 rerata panjang badan larva *zebrafish* pada usia 3 dpf menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok rotenon dan RAF100µM, tetapi tidak signifikan pada kelompok 50 dan 70µM. Rerata panjang badan pada 100 µM lebih pendek dari kelompok 50 dan 70µM. Rerata panjang badan larva *zebrafish* usia 6 dan 9 dpf menunjukkan bahwa terdapat

perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol, rotenon dan kelompok perlakuan walaupun perbedaan antara kelompok 50,70 dan 100 μM tidak signifikan.

Berdasarkan grafik rerata panjang badan larva *zebrafish* meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi asam folat yaitu dari konsentrasi 50, 70 dan 100 μM yang terlihat konsisten pada usia 6 dan 9 dpf. Dengan rerata panjang badan tertinggi mendekati kontrol yaitu pada kelompok asam folat konsentrasi 100 μM . Karena tidak adanya perbedaan panjang badan yang signifikan antara ketiga konsentrasi asam folat, untuk itu bisa disimpulkan konsentrasi terbaik untuk panjang badan yaitu 50 μM . Hal ini dikarenakan pada konsentrasi 50 μM sudah terjadi peningkatan panjang badan yang signifikan dan dengan konsentrasinya yang rendah efek samping yang muncul juga diharapkan lebih sedikit.

Asam folat adalah vitamin B9 larut air yang merupakan nutrisi penting yang dibutuhkan untuk replikasi DNA dan sebagai substrat untuk berbagai reaksi enzimatik yang melibatkan sintesis asam amino dan metabolisme vitamin. Mekanisme asam folat dalam pencegahan dan koreksi stunting bisa melalui efek antioksidan dan antiinflamasi yang dimiliki. Efek antioksidan asam folat dikarenakan asam folat dapat bereaksi dan menghilangkan ROS, serta melindungi protein dan membrane lipid dari oksidasi (Cano *et al*, 2001). Penelitian sebelumnya pada pasien diabetes tipe 2 yang mendapat terapi metformin, dengan suplementasi asam folat selama 8 minggu dapat meningkatkan *total antioxidant capacity* (TAC), dan menurunkan *malondialdehyde* (MDA). Cara kerja asam folat yaitu dengan meningkatkan kapasitas pertahanan antioksidatif dan mencegah terjadinya proses peroksidasi lemak (ditandai dengan menurunnya level MDA) (Aghamohammadi, 2011). Seperti yang disebutkan sebelumnya, pada *stunting* terjadi peningkatan MDA dari hasil proses peroksidasi lemak dan karena sifatnya yang larut air, asam folat dapat menghambat peroksidasi lemak, sehingga terjadi peningkatan antioksidan dan bisa menurunkan MDA. Dengan penurunan MDA diharapkan bisa menghambat terjadinya kerusakan sel.

IGF-1 memiliki peran yang penting dalam meningkatkan panjang badan karena IGF-1 secara langsung berperan dalam memediasi pertumbuhan dan perkembangan sel somatik, termasuk pada otot dan tulang baik saat prenatal dan postnatal (Wood *et al*, 2005). Pemberian asam folat dengan kandungan antioksidan dan mikronutrien di dalamnya mampu menetralkan efek ROS dengan menyeimbangkan antara peroksidan dan antioksidan sehingga kerusakan akibat ROS dapat dihindari (Cano *et al*, 2001).

Asam folat dapat berperan dalam meregulasi rasio OPG/RANKL. Keseimbangan antara proses formasi dan resorpsi dapat meningkatkan pertumbuhan tulang yang normal. Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa suplementasi asam folat dosis tinggi dapat menurunkan biomarker resorpsi tulang dengan cara meningkatkan level OPG, dan menurunkan level RANKL dan TNF α sehingga akan terjadi keseimbangan dan pertumbuhan tulang berjalan normal (Maroufi *et al*, 2017).

6.3 Pengaruh Pemberian Rotenon dan Asam Folat terhadap Rasio Panjang Kepala dengan Panjang Badan

Pengukuran rasio panjang kepala dengan panjang badan larva *zebrafish* digunakan untuk memastikan bahwa proporsi badan dalam keadaan normal dan tidak terjadi kecacatan kongenital. Hasil pengukuran rasio panjang kepala dengan panjang badan yang ditampilkan pada tabel 5.3 menunjukkan bahwa pada masing-masing kelompok perlakuan di usia 3, 6 dan 9 dpf adalah 1:5. Hal ini menunjukkan bahwa panjang kepala dan panjang badan antara kelompok kontrol, rotenon maupun kelompok asam folat pada usia 3, 6 dan 9 dpf memiliki proporsi yang sama.

Anak dengan kondisi *stunting* memiliki ukuran tubuh yang proporsional, namun terlihat lebih pendek dibandingkan dengan anak lain seusianya yang normal. Hal inilah yang membedakan antara *stunting* dengan kretinisme dimana pada *stunting* proporsi tubuh anak sama dengan anak normal, sedangkan pada kretinisme tidak. Anak yang mengalami kretinisme memiliki ciri-ciri panjang badan

sudah lebih rendah dari normal sejak lahir dan memiliki proporsi tubuh yang berbeda dengan anak normal (Syed, 2015). Rasio 1:5 pada kelompok rotenon dan kontrol menunjukkan bahwa pada anak *stunting* tetap terjadi peningkatan panjang kepala seiring dengan penambahan panjang badan larva *zebrafish*, sehingga terjadi kesesuaian diantara keduanya.

IGF-1 juga berperan dalam menstimulasi ikatan OPG dan RANKL yang dapat mencegah pembentukan osteoklast sehingga tidak terjadi resorpsi tulang dan pertumbuhan tulang menjadi normal (Cory'ah, 2017). Selain IGF-1, faktor pertumbuhan lain yaitu VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) dan VEGFR-2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2*) juga berperan dalam proses pertumbuhan tulang melalui peningkatan angiogenesis dan vaskulogenesis sehingga bisa memproteksi larva *zebrafish* dari *stunting* (Wardani, 2017). Tulang merupakan organ yang mempunyai vaskularisasi tinggi dan angiogenesis berperan penting dalam proses osteogenesis. VEGF berperan dalam pertumbuhan tulang bisa melalui proses neovaskularisasi atau secara langsung mempengaruhi sel-sel tulang. VEGF bisa mempengaruhi proses osifikasi melalui dua jalur yaitu osifikasi endokondral (yang berperan adalah kondrosit) dan osifikasi intramembran (yang berperan yaitu osteoblast) (Yang *et al*, 2012).

Hasil pengukuran kelompok perlakuan rotenon asam folat juga menunjukkan proporsi yang sama, yaitu 1:5. Hal ini membuktikan bahwa pemberian asam folat pada larva *zebrafish* model *stunting* dapat mempengaruhi pertumbuhan panjang badan tetapi tidak mempengaruhi rasio pertumbuhan panjang kepala dengan panjang badan.

Pengaruh rotenon selain terhadap panjang badan dan rasio panjang kepala dengan panjang badan juga mempengaruhi frekuensi detak jantung, hipertrofi jantung dan motilitas dari larva *zebrafish*. Pada usia 3, 6 dan 9 dpf frekuensi detak jantung pada kelompok rotenon secara signifikan lebih tinggi daripada kelompok kontrol ($p < 0,05\%$), dan dengan pemberian asam folat $70 \mu\text{M}$ dapat menurunkan

frekuensi detak jantung terbaik dibandingkan konsentrasi yang lain (Saraswati, 2018).

Rotenon juga menyebabkan terjadinya hipertrofi jantung pada 3, 6 dan 9 dpf

dibandingkan dengan kelompok kontrol, dengan pemberian asam folat 50 μM dapat

menurunkan hipertrofi jantung hampir mendekati kontrol (Griselda, 2018). Motilitas

larva *zebrafish* pada 3 dpf mengalami penurunan dibandingkan dengan kelompok

kontrol, dengan pemberian asam folat 70 μM dapat memperbaiki motilitas hampir

mendekati kelompok kontrol (Aminatuzzuhriah, 2018).

6.4 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran

Jumlah balita yang mengalami *stunting* diperkirakan mencapai 155 juta di

seluruh dunia, dan hampir setengah dari jumlah ini ditemukan di Asia. Dari data

terakhir menunjukkan bahwa Indonesia berada di peringkat kelima dunia dimana

stunting meningkat dari 36,8% menjadi 37,2%. *Stunting* merupakan akibat dari tidak

memadainya nutrisi dan serangan infeksi berulang pada 1000 hari pertama

kehidupan seorang anak. Seribu hari pertama kehidupan (1000 HPK) merupakan

masa kritis/periode emas yang dapat menentukan kualitas kehidupan seorang anak

di masa depan. Penatalaksanaan pada *stunting* saat ini masih belum terlalu jelas.

Namun, saat ini pemerintah sudah mengeluarkan berbagai kebijakan untuk

mencegah dan mengurangi prevalensi *stunting* di Indonesia. Salah satunya dengan

intervensi gizi spesifik, yaitu intervensi gizi secara langsung yang melibatkan

Kemendes melalui perantara Puskesmas dan Posyandu dengan “Gerakan 1000

Hari Pertama Kehidupan”. Sasaran dari program ini mulai dari ibu hamil, ibu

menyusui bayi usia 0-6 bulan, serta anak usia 7-23 bulan. Pada salah satu program

intervensi terdapat pemberian suplemen besi dan asam folat minimal 90 butir

selama kehamilan.

Hasil penelitian ini dapat dijadikan acuan khususnya bagi tenaga kesehatan

untuk lebih mengoptimalkan pemberian suplemen asam folat bagi ibu yang ingin

hamil, selama hamil, dan saat menyusui karena memiliki berbagai manfaat bagi

tumbuh kembang anak salah satunya mencegah *stunting*. Pemberian asam folat

direkomendasikan karena mudah didapatkan dan murah, sehingga semua kalangan bisa menjangkaunya.

Keadaan *stunting* dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya genetik dan lingkungan. Salah satu faktor lingkungan yaitu adanya paparan toksin/pestisida.

Oleh karena itu tenaga kesehatan juga bisa memberikan penyuluhan dan edukasi kesehatan kepada ibu, keluarga dan masyarakat mengenai pola hidup bersih dan sehat seperti mencuci dan mengolah bahan makanan dengan baik dan benar, meningkatkan *personal hygiene* dengan mencuci tangan sebelum dan sesudah beraktifitas, serta untuk mencegah terjadinya malnutrisi kronik dilakukan pemenuhan nutrisi yang adekuat sesuai usia perkembangan.

6.5 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini hanya membahas sebagian kecil efek dari rotenon dan asam folat yang diamati hingga 9 dpf (analog dengan anak usia 8 tahun), sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme molekuler asam folat yang bisa mencegah terjadinya *stunting* dan patomekanisme *stunting* yang kemungkinan dapat diamati hingga usia dewasa.

BAB 7 KESIMPULAN

7.1 Kesimpulan

1. Rotenon 12,5 ppb dapat menginduksi terjadinya *stunting* pada larva *zebrafish*.
2. Asam folat dapat meningkatkan panjang badan pada larva *zebrafish* model *stunting* usia 3, 6 dan 9 dpf.
3. Asam folat tidak berpengaruh terhadap rasio panjang kepala dengan panjang badan, yaitu 1:5.

7.2 Saran

1. Perlu adanya penelitian lanjut tentang tumbuh kembang larva *zebrafish* model *stunting* setelah usia diatas 9 dpf atau sampai dewasa.
2. Perlu penelitian lebih lanjut terhadap efek pemberian asam folat dengan paparan yang diperpanjang.
3. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai efek negatif yang mungkin timbul dari pemberian asam folat dosis yang lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aghamohammadi khiavi V, Pourghassem Gargari B, Aliasgharzadeh A. 2011. Effect of Folic Acid Supplementation on Indices of Glycemic Control, Insulin Resistance and Lipid Profile in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Iran J EndocrinolMetab.*13(4):424–31.
- Aminatuzzuhriah, Findie. 2018. Pengaruh Pemberian Asam Folat Fase Prenatal Terhadap Panjang Badan dan Motilitas Pada Zebrafish Model Stunting Dengan Induksi Rotenon. Malang : Universitas Brawijaya. [Tugas Akhir].
- Ariyati L.I.P, Ali M, and Kalsum, U. 2017. Pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap terhadap ekspresi Osteoprotegri (OPG) dan Receptor Activator Nuclear Kappa- β Ligan (RANKL) pada stunting larva zebrafish (*Danio rerio*) yang diinduksi rotenon. Univerititas Brawijaya, Indonesia.
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M.T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., Groth, D.M., Verdile, G., Martins, R.N. 2012. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *Journal of visualized experiments: JoVE* e4196. doi:10.3791/4196
- Ayala A, Munoz M.F, and Arguelles S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanism of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.*, 2014: 1-31.
- Belyaeva, N.F., Kashirtseva, V.N., Medvedeva, N.V., Khudoklinova, I.I., Ipatova, O.M., Archakov, A.I. 2010. [Zebrafish as a model organism for biomedical studies]. *Biomeditsinskaia Khimiia* 56, 120–131. doi:10.1134/S1990750809040039
- Birben E, Murat U, Sahiner M.D, Sackesen C, Erzurum S, and Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO Journal.*, 5: 9-19.
- Cano, M.J., Ayala, A., Murillo, M.L. and Carreras, O. 2001. Protective effect of folic acid against oxidative stress produced in 21-day postpartum rats by maternal-ethanol chronic consumption during pregnancy and lactation period. *Free radical research*, 34(1), pp.1-8.
- Caulfield, L.E., Richard, S. a, Rivera, J. a, Musgrove, P., Black, R.E. 2006. Stunting, Wasting, and Micronutrient Deficiency Disorders, in: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, et al (Ed.), *Disease Control Priorities in Developing Countries*. Oxford University Press, New York, pp. 551–567. doi:10.1093/ije/dyq085
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S.J. and Gibson, S.B. 2007. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *Journal of cell science*, 120(23), pp.4155-4166.
- Coryah, F. A. N. 2017. Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Panjang Badan, Ekspresi Insulin Like Groeth Factor-1 (IGF-1) dan Insulin Reseptor Substrat (IRS) pada Larva Zebrafish (*Danio rerio*) Model Stunting dengan Induksi Rotenon. Universitas Brawijaya

Costa, L.G. 2008. Toxic effects of pesticides, in: Klaassen, C.D., Casarett, L.J. (Eds.), Casarett E Doull's - Toxicology: The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill Education, New York, pp. 107–128. doi:10.1036/0071470514

Dai, Y.-J., Jia, Y.-F., Chen, N., Bian, W.-P., Li, Q.-K., Ma, Y.-B., Chen, Y.-L., Pei, D.-S. 2014. Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 11–17. doi:10.1002/etc.2406

Darwiti et al. 2018. 'Centella Asiatica Increased the Body Length Through the Modulation of Antioxidant in Rotenone-Induced Zebrafish Larvae', *Biomedical & Pharmacology Journal*, 11(June), pp. 827–833.

Depkes RI. 2016. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia 7, 2016. doi:351.077

Eimon, P.M., Ashkenazi, A. 2010. The zebrafish as a model organism for the study of apoptosis. *Apoptosis*. doi:10.1007/s10495-009-0432-9

Fato, R., Bergamini, C., Bortolus, M., Maniero, A.L., Leoni, S., Ohnishi, T. and Lenaz, G. 2009. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(5), pp.384-392.

Garcia, G.R., Noyes, P.D. and Tanguay, R.L. 2016. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. *Pharmacology & therapeutics*, 161, pp.11-21.

Gatt, M., Baron, Y.M., Lautier, E.C. and Calleja, N. 2016. Folic Acid-Prevention of birth defects. *Malta Medical Journal*, 28(4).

Goldsmith, J., & Jobin, C. 2012. Think Small : Zebrafish as a Model System of Human Pathology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.

Greenberg, J.A., Bell, S.J., Guan, Y. and Yu, Y.H. 2011. Folic acid supplementation and pregnancy: more than just neural tube defect prevention. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*, 4(2), p.52.

Griselda, Nabila Zerlina. 2018. Pengaruh Pemberian Asam Folat Fase Prenatal Terhadap Panjang Badan dan Hipertrofi Jantung Pada Zebrafish Model Stunting Dengan Induksi Rotenon. Malang : Universitas Brawijaya. [Tugas Akhir].

Gual P., Le Marchand-Brustel Y. & Tanti J. F., 2005. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation, *Biochimie*, 87(1): pp. 99-109.

Gupta, R.C., Milatovic, D. 2014. Insecticides, in: Biomarkers in Toxicology. Elsevier Inc., pp. 389–407. doi:10.1016/B978-0-12-404630-6.00023-3

Horner, L., Kite, G. 2013. Getting to Zero | How we can be the generation that ends poverty [WWW Document]. Save the Children.

Hossein-nezhad A, Mirzaei K, Maghbooli Z, Najmafshar A, Larijani B .2011. The influence of folic acid supplementation on maternal and fetal bone turnover. *J Bone Miner Metab*, 29:186-192.

Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, et al. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503. doi:10.1038/nature12111

Joshi, R., Adhikari, S., Patro, B. S., Chattopadhyay, S., & Mukherjee, T. 2001. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(12), 1390–9. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00543-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00543-3)

Kaludjerovic, J., Ward, W.E. 2015. Bone-specific gene expression patterns and whole bone tissue of female mice are programmed by early life exposure to soy isoflavones and folic acid. *Journal of Nutritional Biochemistry* 26, 1068–1076. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.04.013

Kartini, A., et al. 2016. Kejadian *Stunting* dan Kematangan Usia Tulang Pada Anak Usia Sekolah Dasar Di Daerah Pertanian Kabupaten Brebes. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. doi: 10.15294/kemas.v11i1.3521

Kementrian Kesehatan RI. 2016. Info. Situasi Balita Pendek 2442–7659

_____. 2017. Buku Saku Pemantauan Status Gizi Tahun 2017. *Biro Komunikasi dan Pelayanan Masyarakat*.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203(3), pp.253-310.

Knipstein, B., Huang, J., Barr, E., Sossenheimer, P., Dietzen, D., Egner, P.A., Groopman, J.D. and Rudnick, D.A. 2015. Dietary aflatoxin-induced stunting in a novel rat model: evidence for toxin-induced liver injury and hepatic growth hormone resistance. *Pediatric research*, 78(2), pp.120-127.

Lee, J.E., Willett, W.C., Fuchs, C.S., Smith-Warner, S.A., Wu, K., Ma, J. and Giovannucci, E. 2011. Folate intake and risk of colorectal cancer and adenoma: modification by time. *The American journal of clinical nutrition*, pp.ajcn-007781.

Ling, N. 2003. Rotenone: Review of its toxicity and use for fisheries management. New Zealand Department of Conservation, *Science for Conservation*, 211.

Maggio, M., De Vita, F., Lauretani, F., Buttò, V., Bondi, G., Cattabiani, C., ... Ceda, G. P. 2013. IGF-1, the Cross Road of the Nutritional, Inflammatory and Hormonal Pathways to Frailty. *Nutrients*, 5(10), 4184–4205. <http://doi.org/10.3390/nu5104184>

Maroufi NF, Ghorbanhaghjo A, Sayyah M, Amirkhiz N, Rashtchizadeh N. 2017. Effects of High and Low Doses of Folic Acid on the Soluble Receptor Activator of Nuclear Factor-kappa B Ligand / Osteoprotegerin Ratio during Pregnancy. 46(4):517–24.

Meilyasari, F. and Isnawati, M. 2014. Faktor risiko kejadian stunting pada balita usia 12 bulan di Desa Purwokerto Kecamatan Patebon, Kabupaten Kendal (Doctoral dissertation, Diponegoro University).

Ni'mah, K. and Nadhiroh, S.R. 2016. Faktor yang Berhubungan Dengan Kejadian Stunting Pada Balita. *Media Gizi Indonesia*, 10(1), pp.13-19.

Normal Reference Lab Ranges in Pregnant Women. 2012. Wolters Kluwer. 81137.

- Nüsslein-Volhard, C. and Dahm, R. 2002. Zebrafish: a practical approach. New York: Oxford University Press. :303p.
- Oot, L., Sommerfelt, A.E., Sethuraman, K., Ross, J. 2016. The Effect of Chronic Malnutrition (Stunting) on Learning Ability, a Measure of Human Capital: A Model in PROFILES for Country-Level Advocacy. Food and Nutrition Technical Assistance III Project 1–8.
- Ott, K.C. 2008. Rotenone. A Brief Review of its Chemistry, Environmental Fate, and the Toxicity of Rotenone Formulations. Kevin C. Ott, Ph.D. New Mexico Council of Trout Unlimited.
- Parichy, D.M., Elizondo, M.R., Mills, M.G., Gordon, T.N. and Engeszer, R.E. 2009. Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental dynamics*, 238(12), pp.2975-3015.
- Paudel, R., Pradhan, B., Wagle, R.R., Pahari, D.P. and Onta, S.R. 2013. Risk factors for stunting among children: a community based case control study in Nepal. *Kathmandu University Medical Journal*, 10(3), pp.18-24.
- Petit, C., Chevrier, C., Durand, G., Monfort, C., Rouget, F., Garlantezec, R., Cordier, S. 2010. Impact on fetal growth of prenatal exposure to pesticides due to agricultural activities: a prospective cohort study in Brittany, France. *Environmental health: a global access science source* 9, 71. doi:10.1186/1476-069X-9-71
- Picasso, B.C. 2016. A Public Health Approach to Undernutrition In Children Under Five And Infants In Ethiopia: An Overview.
- Prendergast, A.J. and Humphrey, J.H. 2014. The stunting syndrome in developing countries. *Paediatrics and international child health*, 34(4), pp.250-265.
- Primaditya, V. 2017. Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Cantella asiatica*) pada Stunting Larva Zebrafish (*Danio rerio*) Akibat Induksi Rotenon melalui Peningkatan Ekspresi Glukosa Tansporter 4 (GLUT 4) dan Osteocalcin. Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Radad K, Rausch W.D, and Gille G. 2006. Rotenon induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. *Neurochemistry International*, 49(4): 379-386.
- Ramsay, J.M., Feist, G.W., Varga, Z.M., Westerfield, M., Kent, M.L. and Schreck, C.B. 2006. Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture*, 258(1), pp.565-574.
- Reed, B. and Jennings, M., 2010. Guidance on the housing and care of Zebrafish *Danio Rerio*. Research Animals Department. *Science Group, RSPCA*.
- Salisbury, S. 2003. Retinism: The past, present and future of diagnosis and cure. *Paediatrics and Child Health*.
- Sanders, L.H. and Greenamyre, J.T. 2013. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, pp.111-120.
- Saraswati, Chandra Dewi. 2018. Pengaruh Pemberian Asam Folat Fase Prenatal Terhadap Panjang Badan dan Frekuensi Detak Jantung Pada larva

Zebrafish Model Stunting Dengan Induksi Rotenon. Malang : Universitas Brawijaya. [Tugas Akhir].

- Singleman, C., & Holtzman, N. G. 2014. Growth and maturation in the zebrafish, *Danio rerio*: a staging tool for teaching and research. *Zebrafish*, 11(4), 396-406.
- Škovierová, H., Vidomanová, E., Mahmood, S., Sopková, J., Drgová, A., Červeňová, T., Halašová, E. and Lehotský, J. 2016. The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. *International journal of molecular sciences*, 17(10), p.1733.
- Soetjningsih. 1995. Tumbuh Kembang Anak. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. 38-41, 211-7.
- Solini, A., Santini, E. and Ferrannini, E. 2006. Effect of short-term folic acid supplementation on insulin sensitivity and inflammatory markers in overweight subjects. *International journal of obesity*, 30(8), pp.1197-1202.
- Sorribes, A. 2013. The ontogeny of sleep-wake cycles in zebrafish: a comparison to humans. *Frontiers in Neural Circuits* 7, 178. doi:10.3389/fncir.2013.00178
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. and Smith, C., 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), pp.13-34.
- Strand, T.A., Taneja, S., Kumar, T., Manger, M.S., Refsum, H., Yajnik, C.S. and Bhandari, N., 2015. Vitamin B-12, folic acid, and growth in 6-to 30-month-old children: A randomized controlled trial. *Pediatrics*, 135(4), pp.e918-e926.
- Suhartono. 2014. Dampak pestisida terhadap kesehatan. Prosiding Seminar Nasional Pertanian Organik, 15–23.
- Syed S. 2015. Iodine and the “Near” Eradication of Cretinism. *Pediatrics* . 135(4):594–6.
- Talaulikar, V., Arulkumaran, S. 2013. Folic acid in pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine*. doi:10.1016/j.ogrm.2013.06.007
- Tarım, Ö. 2011. Thyroid Hormones and Growth in Health and Disease. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 3(2), 51–55. <http://doi.org/10.4274/jcrpe.v3i2.11>
- Uauy, R. 2013. Linear Growth Retardation (Stunting) and Nutrition. INTA University of Chile and London School of Hygiene and Tropical Medicine
- UNICEF. 2013. (Online) <http://unicef.in/Whatwedo/10/Stunting>, diakses 26 Oktober 2017
- _____. 1986. How to weight and measure children-Assessing the Nutritional Status of Young Children in Household Surveys. UNICEF.
- Utami, R.P., Suhartono, Nurjazuli, Kartini, A., Rasipin. 2013. Faktor Lingkungan dan Perilaku yang Berhubungan dengan Kejadian Stunting pada Siswa SD di Wilayah Pertanian (Penelitian di Kecamatan Bulakamba Kabupaten Brebes) Environmental and Behaviour Factors Associated to The Incidence of Stunting In Elementary. *Jurnal Kesehatan Lingkungan Indonesia* 12, 127–131.
- Vargesson, N.A., 2007. Zebrafish in Manual of Animal Technology.

Veldman, M.B. and Lin, S. 2008. Zebrafish as a developmental model organism for pediatric research. *Pediatric research*, 64(5), pp.470-476.

Wardani, Dyah Woro Kartiko Kusumo (2017) *Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (Centella Asiatica) Terhadap Ekspresi Vascular Endotelial Growth Factor Dan Vascular Endotelial Growth Factor Receptor – 2 Pada Larva Zebrafish (Danio Rerio) Model Stunting Akibat Induksi Rotenon*. Magister thesis, Universitas Brawijaya.

WHO. 2010. Global Database on Child Growth and Malnutrition. *Chemistry & ...* 2, 2–3. doi:10.1093/tandt/11.7.180

_____. 2017. http://www.who.int/childgrowth/standards/height_for_age/en/

Wood A.W., Duan C. & Bern H.A., 2005. Insulin-like growth factor signalling in fish. *International disease, Acta Paediatrica*, 98(3): pp. 553-554.

Xu, H.D., Guan, J.J., Hou, Y.S., Gu, J.H., Zhen, X.C. and Qin, Z.H. 2015. Rotenone impairs autophagic flux and lysosomal functions in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 284, pp.900-911.

Yang YQ, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK, Rabie ABM. 2012. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci*. 4(2):64–8.

Yuniarto, A., Sukandar, E., Fidrianny, I., & Adnyana, I. 2017. Aplikasi Zebrafish (Danio rerio) pada Beberapa Model Penyakit Eksperimental. *Media Pharmaceutica Indonesiana (MPI)*, 1(3), 116-126. doi:10.24123/mpi.v1i3.215

Zhao, M., Chen, Y.H., Dong, X.T., Zhou, J., Chen, X., Wang, H., Wu, S.X., Xia, M.Z., Zhang, C. and Xu, D.X. 2013. Folic acid protects against lipopolysaccharide-induced preterm delivery and intrauterine growth restriction through its anti-inflammatory effect in mice. *PLOS one*, 8(12), p.e82713.

Zou Q, Chen B, Wang X, Wu L, Yang Y, Cheng X, Hu Z, Cai X, Yang J, Sun X, Lu W, Yan H, Chen J, Ye J, Yang J, Sun X, Lu W, Yan H, Chen J, Ye J, Shen J, and Cao P. 2016. Sulforaphane protects against rotenone-induced neurotoxicity in vivo: Involvement of the mTOR, Nrf2, and autophagy pathways. *Scientific Reports.*, 6(32206): 1-12.