

**PENGARUH PEMBERIAN ASAM FOLAT FASE PRENATAL  
TERHADAP PANJANG BADAN DAN FREKUENSI DETAK  
JANTUNG PADA LARVA ZEBRAFISH MODEL STUNTING  
DENGAN INDUKSI ROTENON**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



**OLEH:**

**Chandra Dewi Saraswati**

**155070101111029**

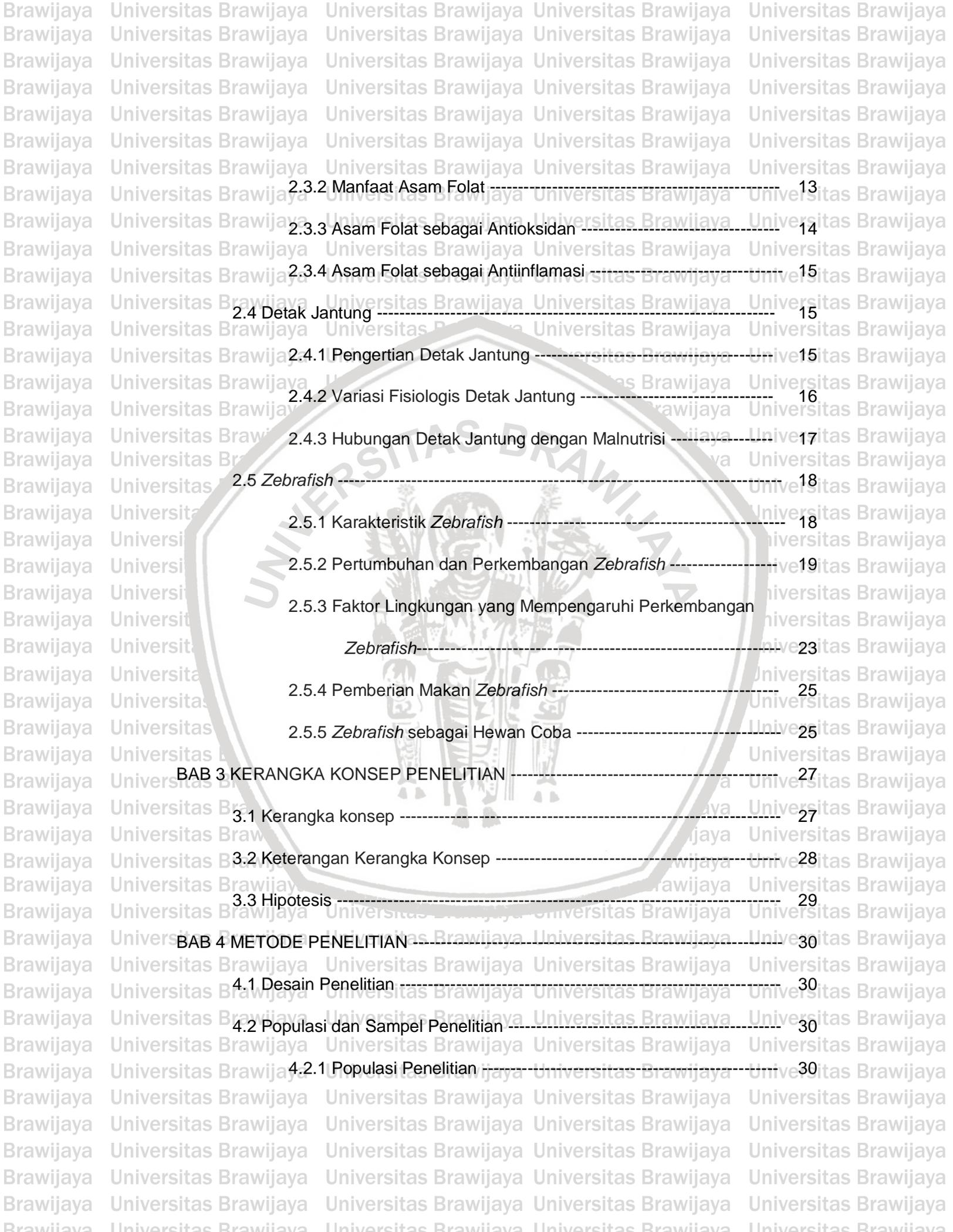
**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

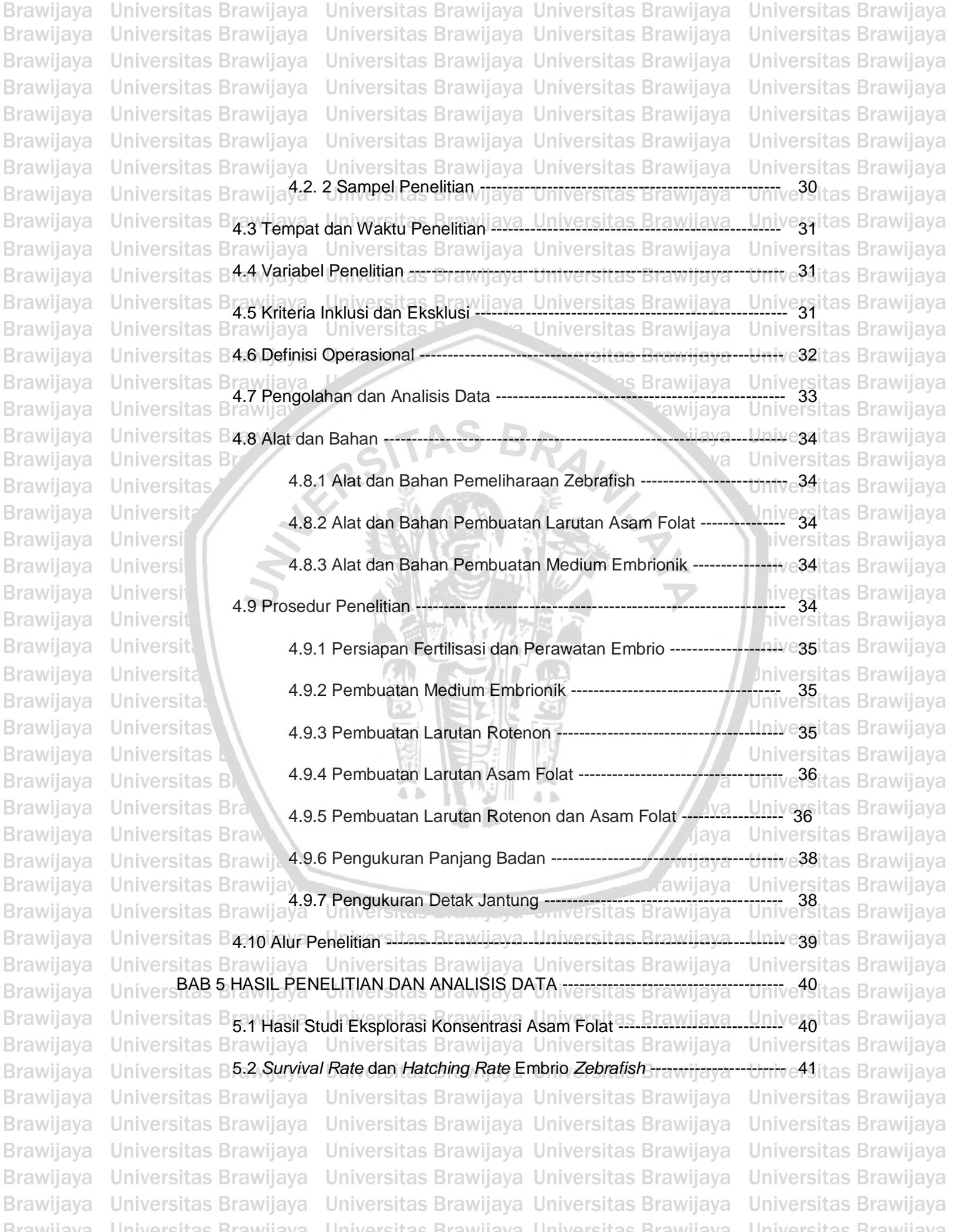
**2018**

## DAFTAR ISI

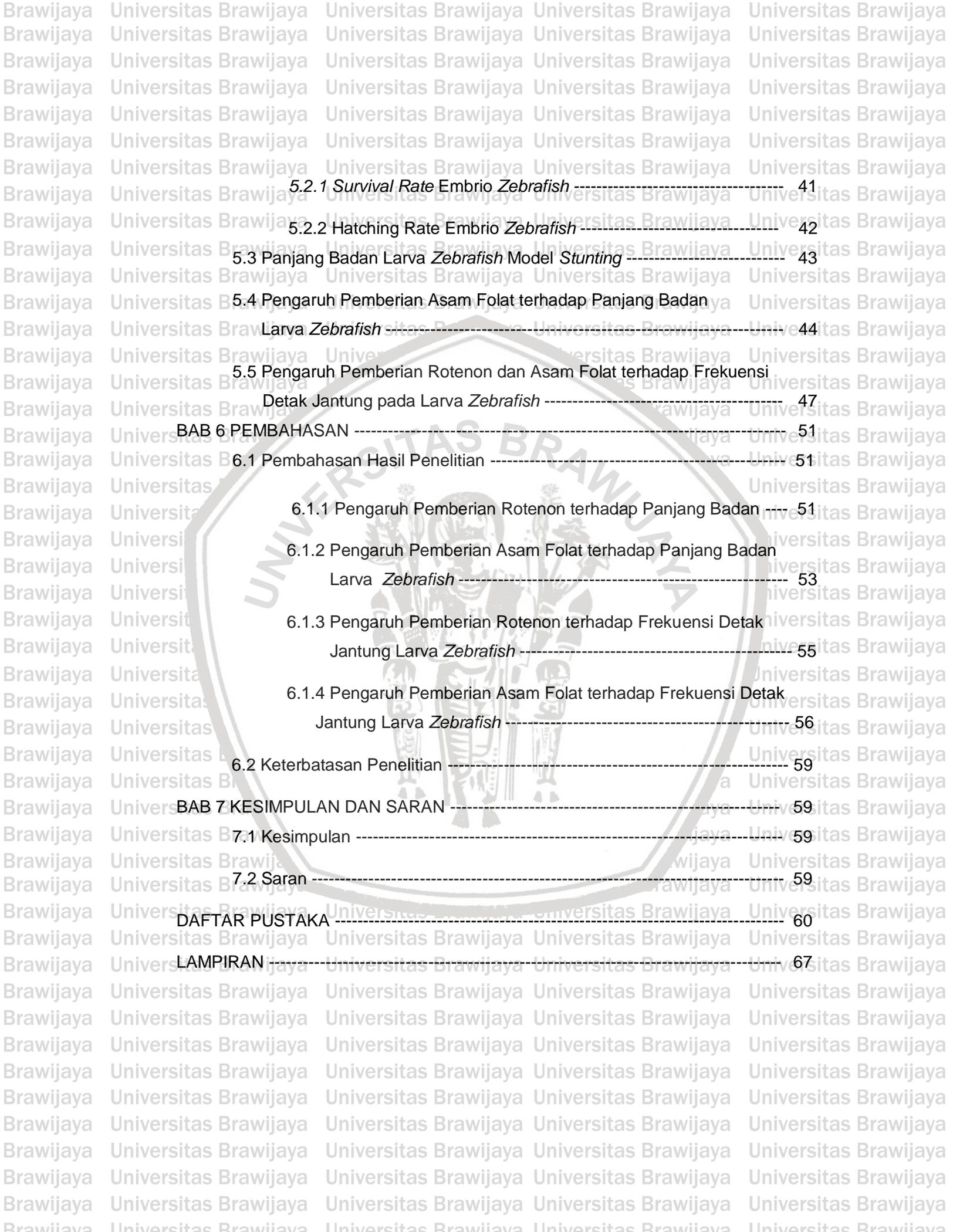
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademik	4
1.4.2 Manfaat Praktik	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	<b>6</b>
2.1 <i>Stunting</i>	6
2.1.1 Pengertian <i>Stunting</i>	6
2.1.2 Faktor Resiko <i>Stunting</i>	6
2.1.3 Mekanisme Terjadinya <i>Stunting</i>	8
2.1.4 Efek Jangka Pendek dan Jangka Panjang	8
2.2 Rotenon	9
2.2.1 Karakteristik Rotenin	9
2.2.2 Efek Toksikologi	10
2.2.3 Mekanisme Kerja Rotenon	11
2.3 Asam Folat	12
2.3.1 Karakteristik Asam Folat	12



2.3.2 Manfaat Asam Folat	13
2.3.3 Asam Folat sebagai Antioksidan	14
2.3.4 Asam Folat sebagai Antiinflamasi	15
2.4 Detak Jantung	15
2.4.1 Pengertian Detak Jantung	15
2.4.2 Variasi Fisiologis Detak Jantung	16
2.4.3 Hubungan Detak Jantung dengan Malnutrisi	17
2.5 Zebrafish	18
2.5.1 Karakteristik Zebrafish	18
2.5.2 Pertumbuhan dan Perkembangan Zebrafish	19
2.5.3 Faktor Lingkungan yang Mempengaruhi Perkembangan Zebrafish	23
2.5.4 Pemberian Makan Zebrafish	25
2.5.5 Zebrafish sebagai Hewan Coba	25
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP PENELITIAN</b>	<b>27</b>
3.1 Kerangka konsep	27
3.2 Keterangan Kerangka Konsep	28
3.3 Hipotesis	29
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b>	<b>30</b>
4.1 Desain Penelitian	30
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian	30
4.2.1 Populasi Penelitian	30



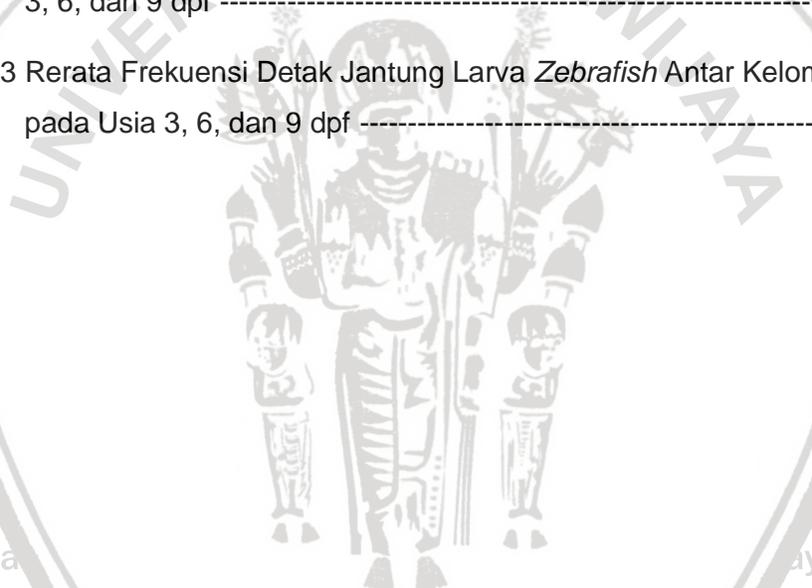
4.2. 2 Sampel Penelitian -----	30
4.3 Tempat dan Waktu Penelitian -----	31
4.4 Variabel Penelitian -----	31
4.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi -----	31
4.6 Definisi Operasional -----	32
4.7 Pengolahan dan Analisis Data -----	33
4.8 Alat dan Bahan -----	34
4.8.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Zebrafish -----	34
4.8.2 Alat dan Bahan Pembuatan Larutan Asam Folat -----	34
4.8.3 Alat dan Bahan Pembuatan Medium Embrionik -----	34
4.9 Prosedur Penelitian -----	34
4.9.1 Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio -----	35
4.9.2 Pembuatan Medium Embrionik -----	35
4.9.3 Pembuatan Larutan Rotenon -----	35
4.9.4 Pembuatan Larutan Asam Folat -----	36
4.9.5 Pembuatan Larutan Rotenon dan Asam Folat -----	36
4.9.6 Pengukuran Panjang Badan -----	38
4.9.7 Pengukuran Detak Jantung -----	38
4.10 Alur Penelitian -----	39
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA -----</b>	<b>40</b>
5.1 Hasil Studi Eksplorasi Konsentrasi Asam Folat -----	40
5.2 <i>Survival Rate</i> dan <i>Hatching Rate</i> Embrio Zebrafish -----	41



5.2.1	Survival Rate Embrio Zebrafish	41
5.2.2	Hatching Rate Embrio Zebrafish	42
5.3	Panjang Badan Larva Zebrafish Model Stunting	43
5.4	Pengaruh Pemberian Asam Folat terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish	44
5.5	Pengaruh Pemberian Rotenon dan Asam Folat terhadap Frekuensi Detak Jantung pada Larva Zebrafish	47
BAB 6 PEMBAHASAN		51
6.1	Pembahasan Hasil Penelitian	51
6.1.1	Pengaruh Pemberian Rotenon terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish	51
6.1.2	Pengaruh Pemberian Asam Folat terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish	53
6.1.3	Pengaruh Pemberian Rotenon terhadap Frekuensi Detak Jantung Larva Zebrafish	55
6.1.4	Pengaruh Pemberian Asam Folat terhadap Frekuensi Detak Jantung Larva Zebrafish	56
6.2	Keterbatasan Penelitian	59
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN		59
7.1	Kesimpulan	59
7.2	Saran	59
DAFTAR PUSTAKA		60
LAMPIRAN		67

**DAFTAR TABEL**

Tabel 2.1 Pertumbuhan dan Perkembangan <i>Zebrafish</i> .....	21
Tabel 4.1 Konsentrasi Rotenon dan Asam Folat .....	37
Tabel 5.1 Rerata Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> Kelompok Kontrol dan Kelompok Rotenone pada Usia 3, 6, dan 9 dpf .....	43
Tabel 5.2 Rerata Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> Antar Kelompok pada Usia 3, 6, dan 9 dpf .....	45
Tabel 5.3 Rerata Frekuensi Detak Jantung Larva <i>Zebrafish</i> Antar Kelompok pada Usia 3, 6, dan 9 dpf .....	48

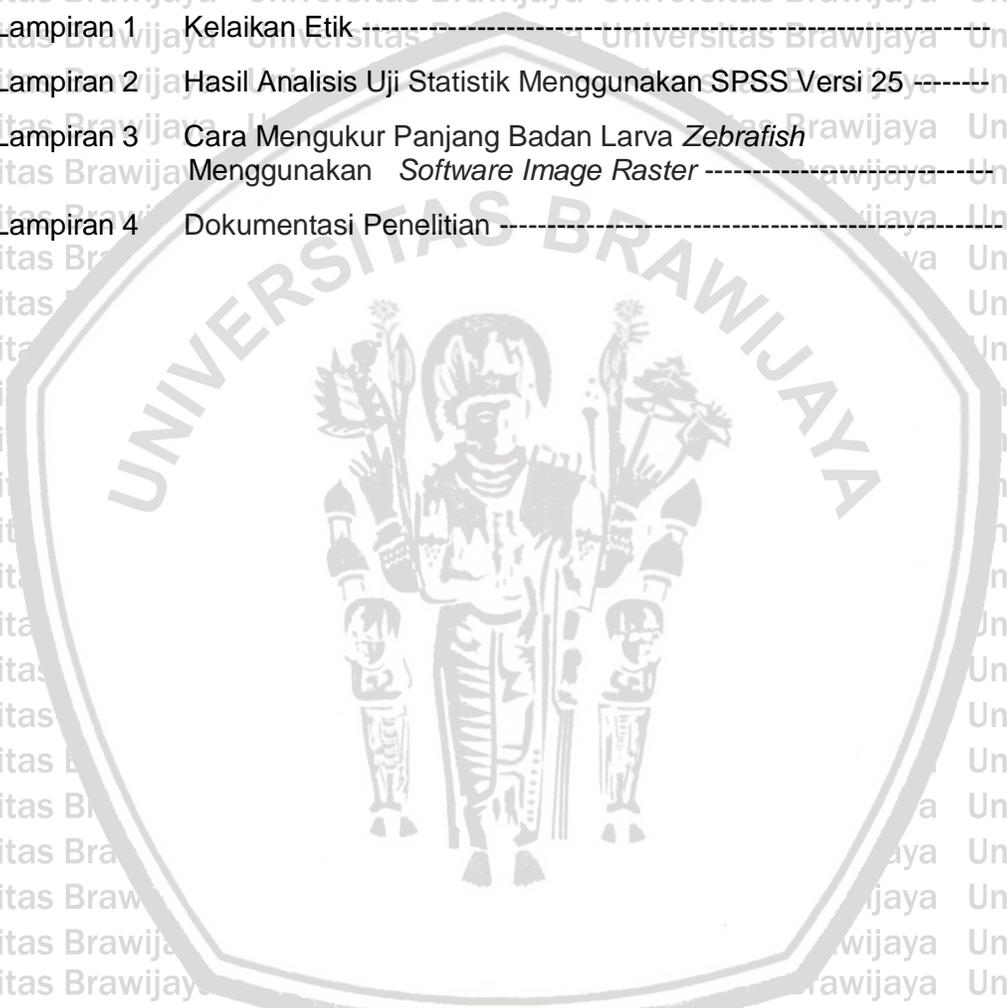


## DAFTAR GAMBAR

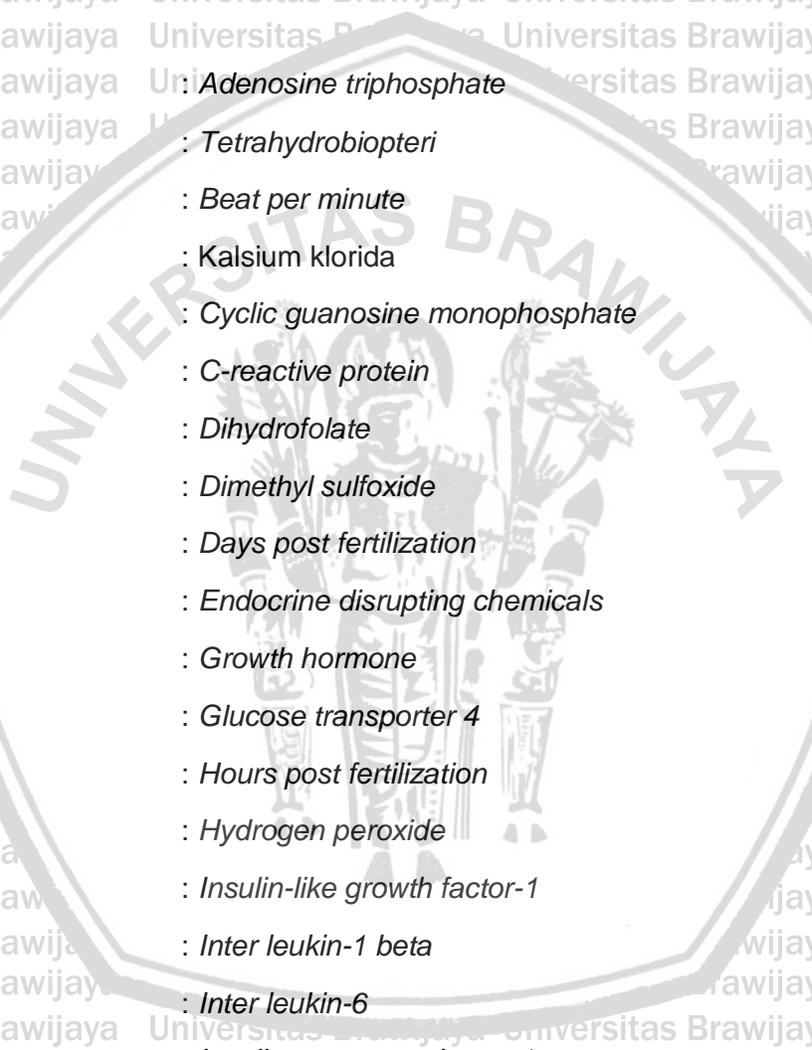
Gambar 2.1 Struktur Molekul Rotenon	10
Gambar 2.2 Mekanisme Kerja Rotenon	12
Gambar 2.3 Struktur Molekul Asam Folat	13
Gambar 2.4 Metabolisme Methionine	15
Gambar 3.1 Kerangka Konsep	27
Gambar 5.1 <i>Hatching Rate</i> Embrio <i>Zebrafish</i> usia 24, 48, dan 72 hpf	42
Gambar 5.2 Rerata Panjang Badan Kelompok Kontrol dan Kelompok Rotenon Usia 3, 6, dan 9 dpf	43
Gambar 5.3 Rerata Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> Antar Kelompok pada Usia 3, 6, dan 9 dpf	46
Gambar 5.4 Rerata Frekuensi Detak Jantung pada Larva <i>Zebrafish</i> Usia 3, 6, dan 9 dpf	49

**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1	Kelaikan Etik	67
Lampiran 2	Hasil Analisis Uji Statistik Menggunakan SPSS Versi 25	68
Lampiran 3	Cara Mengukur Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> Menggunakan <i>Software Image Raster</i>	86
Lampiran 4	Dokumentasi Penelitian	87



## DAFTAR SINGKATAN



ATP	: Adenosine triphosphate
BH <sub>4</sub>	: Tetrahydrobiopterin
bpm	: Beat per minute
CaCl <sub>2</sub>	: Kalsium klorida
cGMP	: Cyclic guanosine monophosphate
CRP	: C-reactive protein
DHF	: Dihydrofolate
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
dpf	: Days post fertilization
EDCs	: Endocrine disrupting chemicals
GH	: Growth hormone
GLUT-4	: Glucose transporter 4
hpf	: Hours post fertilization
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hydrogen peroxide
IGF-1	: Insulin-like growth factor-1
IL-1β	: Interleukin-1 beta
IL-6	: Interleukin-6
IRS-1	: Insulin receptor substrate 1
KCl	: Kalium klorida
MDA	: Malondialdehyde
MCP-1	: Macrophage chemoattractant protein-1
MeTHF	: 5,10-methylenetetrahydrofolate

MgSO <sub>4</sub>	: Magnesium sulfat
MTHFR	: <i>Methylene tetrahydrofolate reductase</i>
NaCl	: Natrium klorida
NAD	: <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADH	: <i>Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen</i>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	: Natrium bikarbonat
NO	: <i>Nitric oxide</i>
NTD	: <i>Neural tube defect</i>
ONOO <sup>-</sup>	: <i>Peroxynitrite</i>
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	: <i>Superoxide</i>
PKG	: Protein kinase G
ppb	: <i>Part per billion</i>
Ppm	: <i>Part per million</i>
PUFA	: <i>Polyunsaturated fatty acid</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
SD	: Standar deviasi
SHMT 1	: <i>Serine hydroxymethyltransferase 1</i>
SOD	: <i>Superoxide dismutase</i>
SNS	: Sistem saraf simpatis
SL	: <i>Standard length</i>
TAC	: <i>Total antioxidant capacity</i>
THF	: <i>Tetrahydrofolate</i>
UMFA	: <i>Unmetabolized folic acid</i>
5-MTHF	: <i>5-Methyl tetrahydrofolate</i>

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PENGARUH PEMBERIAN ASAM FOLAT FASE PRENATAL TERHADAP PANJANG BADAN  
DAN FREKUENSI DETAK JANTUNG PADA LARVA ZEBRAFISH MODEL STUNTING  
DENGAN INDUKSI ROTENON

Oleh:

Chandra Dewi Saraswati  
155070101111029

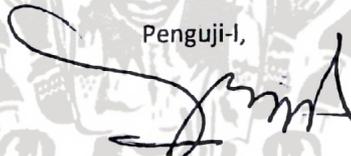
Telah diuji pada

Hari : Rabu

Tanggal : 26 Desember 2018

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I,



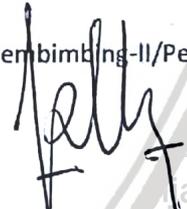
Dr. Bambang Prijadi, MS  
NIP/NIK 195203241984031002

Pembimbing-I/Penguji-II,



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

Pembimbing-II/Penguji-III



dr. Rodhiyan Rakhmatiar, Sp.S  
NIK/NIP 2016098511011001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran,

dr. Triwahju Astuti, M.Kes, SpP(K)

NIK/NIP 196310221996012001



## ABSTRAK

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*. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes dan (2) dr. Rodhiyan Rakhmatiar, Sp.S.

*Stunting* merupakan gangguan pertumbuhan berupa retardasi pertumbuhan linier. Seorang anak dikatakan mengalami *stunting* jika tinggi badan dibanding umur mereka lebih rendah dari -2 standar deviasi (SD) *WHO Child Growth Standard*. Faktor resiko, baik faktor internal maupun faktor eksternal yang terjadi sejak masa kehamilan hingga usia dua tahun sangat mempengaruhi terjadinya *stunting*. Rotenon adalah pestisida alami yang merupakan salah satu faktor resiko eksternal. Mekanisme kerja rotenon yaitu dengan menghambat kompleks I mitokondria sehingga dapat meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang menyebabkan stress oksidatif dan terjadi *stunting*. Asam folat merupakan salah satu mikronutrien yang dibutuhkan dalam pertumbuhan dan diketahui memiliki aktivitas antioksidan melalui penangkalan ROS. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian asam folat terhadap panjang badan dan frekuensi detak jantung pada larva *zebrafish* model *stunting* yang diinduksi rotenon. Konsentrasi asam folat yang digunakan dalam penelitian ini adalah 50, 70, dan 100  $\mu\text{M}$ . Analisa statistik menunjukkan perbedaan panjang badan yang signifikan antara kelompok rotenon dan kelompok asam folat. Kelompok asam folat memiliki rata-rata panjang badan yang lebih tinggi dan pada usia 9 dpf (analog dengan anak usia 8 tahun) mampu mendekati rata-rata panjang badan kelompok kontrol. Frekuensi detak jantung juga berbeda secara signifikan antara kelompok rotenon dan kelompok asam folat. Konsentrasi asam folat 50 dan 70  $\mu\text{M}$  dapat menurunkan dan menormalkan frekuensi detak jantung, sedangkan asam folat 100  $\mu\text{M}$  justru meningkatkan frekuensi detak jantung. Dapat disimpulkan bahwa asam folat mempengaruhi panjang badan dan kontraktilitas jantung secara dose-dependent manner.

**Kata kunci:** *stunting*, rotenon, asam folat, panjang badan, frekuensi detak jantung, *zebrafish*

**ABSTRACT**

Saraswati, Chandra Dewi. 2018. *The Effect of Prenatal Folic Acid Administration on Body Length and Heart Rate in Rotenone-induced Zebrafish Larvae Stunting Model*. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes dan (2) dr. Rodhiyan Rakhmatiar, Sp.S.

Stunting is a growth disorder in the form of linear growth retardation. A child is said to be stunted if his height-for-age is lower than -2 standard deviation (SD) of WHO Child Growth Standard. Internal and external factors that occur during pregnancy to the age of two years greatly influence the occurrence of stunting. Rotenone is a natural pesticide which is one of the external risk factor. The mechanism of action of rotenone is by inhibiting mitochondrial complex I so it can increases the production of reactive oxygen species (ROS) which causes oxidative stress and stunting. Folic acid is one of the micronutrients needed in growth and is known to have antioxidant activity by scavenging the ROS. The purpose of this study was to determine the effect of folic acid on body length and heart rate in zebrafish larvae of rotenon-induced stunting models. The concentration of folic acid used in this study was 50, 70, and 100 µM. Statistical analysis showed a significant difference of body length between the rotenone and folic acid groups. The folic acid groups have higher average body length and at the age of 9 dpf (analog to 8 years old child) it can approach the average body length of control group. The heart rate also differed significantly between the rotenon and folic acid groups. Folic acid concentrations of 50 and 70 µM can reduce and normalize the heart rate, while 100 µM folic acid increases the frequency of heart rate. It can be concluded that folic acid affects body length and cardiac contractility in a dose-dependent manner.

**Keywords:** stunting, rotenone, folic acid, body length, heart rate, zebrafish



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

*Stunting* adalah gangguan pertumbuhan, biasa terjadi pada anak yang mengalami malnutrisi jangka panjang, infeksi yang berulang, dan stimulasi psikososial yang tidak mencukupi sejak masa kehamilan hingga 1000 hari pertama kehidupan (WHO, 2012; MCA, 2013). Menurut WHO, seorang anak dikatakan mengalami *stunting* jika tinggi badan dibanding umur mereka lebih rendah dari -2 standar deviasi (SD) median *WHO Child Growth Standard*. Pada *stunting* terjadi *oxidative stress* karena ketidakseimbangan antara *reactive oxygen species* (ROS) dan *antioxidant* (Aly *et al.*, 2013). *Stunting* tidak hanya memiliki efek jangka pendek, tetapi juga efek jangka menengah dan jangka panjang, meliputi terhambatnya fungsi kognitif, gangguan perilaku, terhambatnya perkembangan fisik, menurunnya produktifitas, dan kondisi kesehatan yang buruk sehingga meningkatkan resiko menderita penyakit kronik pada saat dewasa (Dewey & Begum, 2011; Predergast & Humphrey, 2014). Efek ini jika dibiarkan terjadi dapat menurunkan kualitas generasi muda di masa yang akan datang.

*Stunting* masih menjadi masalah yang cukup serius di Indonesia. Hal ini dapat dilihat dari hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2018, yang mengatakan bahwa prevalensi *stunting* di Indonesia sebesar 30,8 persen. Prevalensi tahun 2018 ini sudah menurun jika dibandingkan dengan tahun 2013, yaitu sebesar 37,2 persen (Riskesdas, 2013), namun menurut WHO angka ini masih masuk ke dalam kategori prevalensi tinggi *stunting* (WHO, 2010). Indonesia sendiri menempati peringkat kelima dunia dengan jumlah balita *stunting* terbanyak.

Oleh sebab itu, *stunting* menjadi salah satu fokus perhatian pemerintah dan organisasi kesehatan baik di tingkat nasional maupun internasional. Penurunan

prevalensi balita yang mengalami *stunting* hingga menjadi 28 persen merupakan salah satu sasaran pembangunan kesehatan dalam rangka meningkatkan status kesehatan dan gizi masyarakat yang disusun dalam Rencana Pembangunan Jangka Menengah Nasional 2015-2019. Selain itu, dalam *World Health Assembly Global Nutrition Target 2025*, *stunting* juga menjadi salah satu fokus perhatian, yaitu dengan target menurunkan jumlah balita yang mengalami *stunting* sebanyak 40 persen.

Adanya faktor resiko yang terjadi sejak masa kehamilan hingga usia dua tahun sangat mempengaruhi terjadinya *stunting* pada anak. Salah satu faktor resiko penyebab *stunting* berasal dari lingkungan. Di Indonesia, faktor lingkungan yang sering ditemukan pada kehidupan sehari-hari adalah penggunaan pestisida yang tidak rasional dalam bidang pertanian. Penggunaan pestisida ini dapat mempengaruhi pertumbuhan janin dalam kandungan, sehingga meningkatkan insidens bayi lahir dengan berat badan rendah dan prematur. Salah satu pestisida yang dapat ditemukan di Indonesia adalah rotenon. Rotenon adalah pestisida yang berasal dari bahan alami yaitu akar tuba (*Derris elliptica*). Rotenon sangat toksik bagi ikan. Toksisitas rotenon ini berhubungan dengan kemampuannya untuk mengganggu transport elektron mitokondria sehingga penggunaan oksigen untuk respirasi terganggu, dan dapat menyebabkan kematian jika dosisnya cukup tinggi (Ott, 2006).

Anak yang mengalami *stunting*, kira-kira hanya memiliki kesempatan untuk mencapai tinggi normal kurang dari tiga persen. (Caulfield *et al.*, 2006). Namun tidak menutup kemungkinan, terjadi keberhasilan koreksi pertumbuhan pada anak *stunting*. *Windows of opportunity* untuk intervensi *stunting* tidak berhenti pada usia dua tahun. Balita yang mengalami *stunting* dapat mengalami tumbuh kejar untuk

tinggi badannya antara usia dua tahun sampai usia anak pertengahan serta pada masa remaja bahkan tanpa mendapat intervensi nutrisi ekstra apapun (Prentice *et al.*, 2013).

Asupan zat gizi, baik makronutrien dan mikronutrien sangat dibutuhkan dalam pertumbuhan anak. Keadaan malnutrisi dapat menimbulkan efek buruk pada berbagai sistem organ dalam tubuh, salah satunya pada sistem saraf autonom, dimana sistem saraf autonom memiliki peran dalam mengatur sistem kardiovaskular. Pada keadaan malnutrisi ditemukan peningkatan aktivitas sistem saraf simpatis yang dapat mengakibatkan peningkatan detak jantung (Penitente *et al.*, 2007).

Asam folat merupakan salah satu mikronutrien yang dibutuhkan oleh tubuh. Menurut Pedoman Gizi Seimbang, ibu hamil dan menyusui sangat memerlukan asupan pangan yang memenuhi kebutuhan zat gizi mikro yang salah satunya adalah asam folat. Asam folat ini berperan dalam pembentukan sel dan sistem saraf termasuk sel darah merah (Kemenkes, 2014). Oleh karena itu, pemberian tablet zat besi-asam folat atau multivitamin pada ibu hamil dan menyusui serta pemberian zat penambah gizi mikro pada anak menjadi salah satu intervensi gizi dalam program pemerintah untuk mencegah dan menanggulangi *stunting* (MCA, 2013). Asam folat merupakan kofaktor dalam sintesis purin dan timidilat, serta sintesis asam nukelat, sehingga dibutuhkan untuk pembelahan sel dan pertumbuhan. Asam folat memiliki efek sebagai penangkal radikal bebas dan antioksidan (Joshi *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2008)

*Zebrafish* saat ini sering dijadikan model dalam penelitian, terutama penelitian pertumbuhan dan perkembangan karena embrio dan larvanya yang transparan dan siklus perkembangannya yang cepat dan terjadi di luar. Usia

*zebrafish* dapat dianalogikan dengan usia manusia dengan perbandingan usia *zebrafish* 3, 6, dan 9 dpf (*day post fertilization*) analog dengan usia 0 hari, 2 tahun, dan 8 tahun (Sorribes *et al.*, 2013). Walaupun ukurannya kecil, sangat dimungkinkan untuk mengamati dan menganalisa fisiologi dasar baik dalam tingkat jaringan, organ, hingga organisme utuh (Dooley, 2000; Hernandez, 2008). *Zebrafish* memiliki kemiripan genomik dan molekuler yang cukup tinggi dengan vertebra lainnya, termasuk manusia (Veldman & Lin, 2008). Sehingga penemuan penting dari hasil penelitian dengan menggunakan *zebrafish* dapat diterapkan pada manusia.

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti tertarik untuk mengetahui pengaruh pemberian asam folat terhadap panjang badan dan frekuensi detak jantung pada *zebrafish* model *stunting* dengan induksi rotenon.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian asam folat dapat mengoreksi panjang badan dan menurunkan frekuensi detak jantung pada *zebrafish* model *stunting* dengan induksi rotenon?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Membuktikan bahwa pemberian asam folat dapat mengoreksi panjang badan dan menurunkan frekuensi detak jantung pada *zebrafish* model *stunting* dengan induksi rotenon.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Akademik

1. Penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai mekanisme *stunting* pada *zebrafish* dengan induksi rotenon.

2. Penelitian ini dapat digunakan untuk menjelaskan pengaruh pemberian asam folat sebagai alternatif untuk mengoreksi panjang badan dan frekuensi detak jantung pada *zebrafish* model *stunting*.
3. Penelitian ini dapat digunakan sebagai sumber referensi untuk pengembangan dan penelitian berikutnya tentang *stunting*.

#### 1.4.2 Manfaat Praktik

1. Dapat menjadi pertimbangan masyarakat untuk lebih memperhatikan asupan dan suplementasi asam folat karena asam folat merupakan salah satu mikronutrien yang penting untuk tubuh.
2. Dapat meningkatkan kepedulian masyarakat untuk menciptakan lingkungan yang optimal serta bebas dari faktor-faktor resiko yang dapat menimbulkan gangguan pertumbuhan (*stunting*) pada anak.
3. Dapat meningkatkan kesadaran tenaga kesehatan dan masyarakat untuk memantau pertumbuhan dan perkembangan anak sejak dari dalam kandungan hingga usia dua tahun untuk mendeteksi terjadinya *stunting*.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Stunting

##### 2.1.1 Pengertian Stunting

*Stunting* adalah bentuk kekurangan gizi yang paling umum terjadi pada anak, ditandai dengan beberapa perubahan patologis berupa retardasi pertumbuhan linier pada kehidupan awal dikaitkan dengan peningkatan morbiditas dan mortalitas, penurunan kapasitas fisik, perkembangan saraf, dan ekonomi, serta peningkatan resiko penyakit metabolik saat dewasa. Indikator seorang anak mengalami *stunting* adalah jika tinggi badan atau panjang badan menurut umur berada di bawah -2 standar deviasi median *WHO Child Growth Chart* (WHO, 2012; Predergast & Humphrey 2014).

Proses terjadinya stunting bisa dimulai sejak masa kehamilan (*in utero*) karena adanya faktor resiko, tetapi gejala *stunting* pada seorang anak baru dapat diamati sejak usia dua tahun. Di masyarakat, *stunting* sering kali terlambat dikenali karena kurangnya kesadaran untuk melakukan pemeriksaan rutin pertumbuhan linier di fasilitas layanan kesehatan primer atau karena anggapan bahwa anak yang bertubuh pendek merupakan sesuatu yang normal (Dewey & Begum, 2011; MCA, 2013)

##### 2.1.2 Faktor Resiko Stunting

Sejak masa kehamilan hingga usia dua tahun, ada banyak faktor yang dapat menyebabkan terjadinya *stunting*. Faktor-faktor tersebut di antaranya manutrisi dalam jangka waktu panjang, infeksi yang berulang, higenitas, 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, 2015)

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 & Isnawati, 2014; Rahayu *et al.*, 2015; Ni'mah & 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, 2012). Pestisida merupakan *endocrine disrupting chemicals* (EDCs), yaitu bahan yang dapat mengganggu kerja hormon endokrin, salah satunya hormon tiroid (Diamanti-Kandarakis, 2009). 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 Terjadinya 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 higienitas dan sanitasi yang buruk, sehingga anak rentan mengalami infeksi *feco-oral* bakteri yang berulang, misalnya diare. Sitokin pro-inflamasi, *interleukin-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 (Beneditte *et al.*, 1997).

**2.1.4. Efek Jangka Pendek dan Jangka Panjang Stunting**

Dalam jangka pendek, *stunting* berkaitan dengan meningkatnya morbiditas dan mortalitas karena infeksi, seperti pneumonia dan diare. Hal ini disebabkan karena

baik imunitas *innate* maupun *adaptive* terganggu dalam keadaan kurang gizi. Dalam jangka menengah, *stunting* dapat mempengaruhi komponen kognitif, pendidikan, dan perilaku anak. Keadaan kurang gizi mempengaruhi bagian otak yang berperan dalam kognitif, daya ingat, dan skill lokomotor. Anak dengan *stunting* cenderung bersikap apatis, kurang bereksplorasi, dan menurut penelitian di Jamaica, anak menjadi lebih mudah cemas dan gelisah dengan harga diri yang rendah. Dan untuk efek jangka panjangnya, anak yang mengalami *stunting* beresiko besar untuk memiliki kesehatan dan keadaan sosio-ekonomi yang buruk sepanjang hidupnya. Saat dewasa, anak yang mengalami *stunting* akan cenderung menderita penyakit metabolik, seperti hipertensi, penyakit kardiovaskular, dan diabetes mellitus tipe 2, dan dapat diperparah dengan peningkatan berat badan secara mendadak setelah usia 2 tahun (Predergast & Humphrey, 2014).

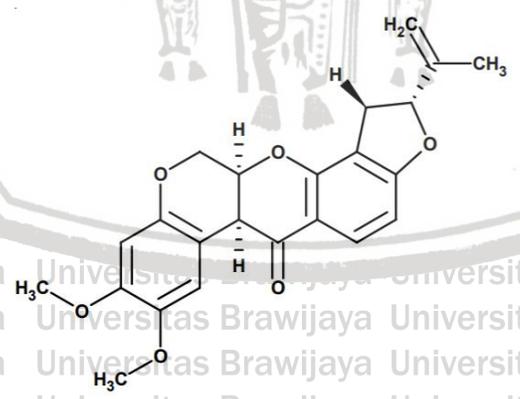
**2.2 Rotenon**

**2.2.1 Karakteristik Rotenon**

Rotenon adalah insektisida alami yang banyak terdapat pada tumbuhan spesies *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia*, dan *Mundulea*. Rotenon merupakan insektisida, pestisida, dan akarisida yang bersifat spektrum luas. Rotenon termasuk dalam kelompok isoflavon. Sediaan rotenon dapat berupa kristalin (kira-kira 95%), larutan yang dapat diemulsi (kira-kira 50%), dan serbuk (0.75%). Rotenon bersifat racun baik bagi manusia maupun hewan. Berdasarkan klasifikasi WHO, rotenon termasuk dalam insektisida kelas II, yaitu insektisida dengan tingkat bahaya menengah (Gupta & Milatovic, 2014; PubChem, 2017)

Karakteristik fisiokimia rotenon:

- Rumus empiris : C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>
- Berat molekul : 392.42 g/mol
- Densitas : 1.27 g/cm<sup>3</sup> pada 20 °C
- Bau : Tidak berbau
- Titik leleh : 165-166 °C
- Titik didih : 210-220 °C
- Kelarutan : Mudah larut dalam acetone, carbon disulfide, ethyl acetate, dan chloroform. Kurang larut dalam diethyl ether, alcohol, petroleum, ether, dan carbon tetrachloride.
- Tekanan penguapan : <0.00004 mmHg pada 20°C
- Deskripsi fisik : Kristal tak berwarna sampai kecokelatan atau serbuk kristalin putih sampai putih kecokelatan.



**Gambar 2.1 Struktur Molekul Rotenon (Ling, 2003)**

**2.2.2 Efek Toksikologi**

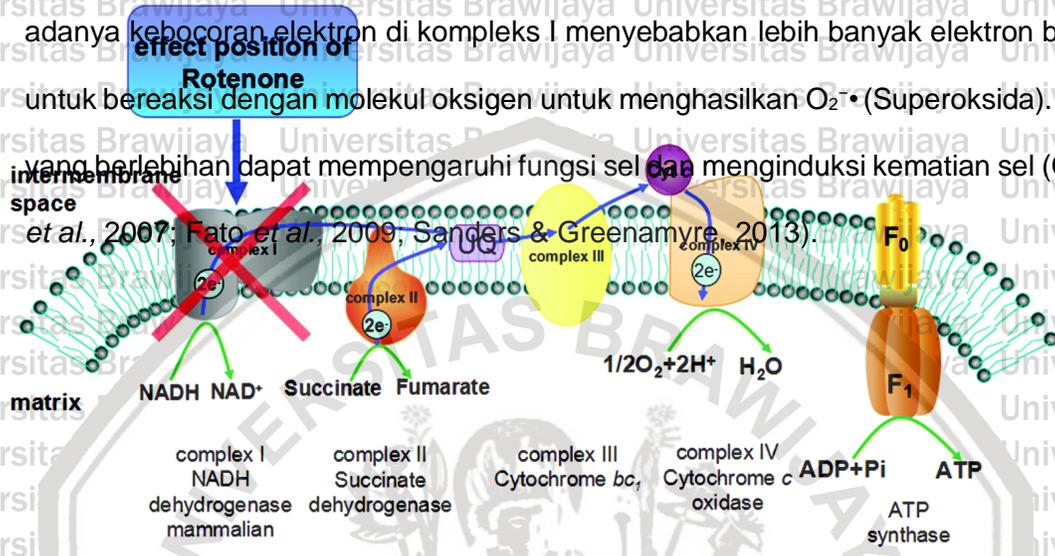
Rotenon tidak begitu toksik bagi manusia, mamalia, dan burung jika terpapar melalui oral, karena banyak senyawa yang diuraikan saat pencernaan sehingga hanya sedikit yang sampai ke sirkulasi. Tetapi bagi ikan, rotenon sangat toksik karena respirasi pada ikan langsung berhubungan dengan air melalui insang sehingga rotenon dapat langsung masuk ke sirkulasi. Toksisitas rotenon berkaitan dengan kemampuannya mengganggu transport elektron mitokondria yang menghambat penggunaan oksigen untuk respirasi, menyebabkan kematian sel, dan dalam dosis tinggi menyebabkan kematian organisme (Ott, 2006).

Rotenon telah terbukti sebagai *neurotoxicant* pada semua spesies yang telah diuji. Pada mamalia, termasuk manusia, paparan akut terhadap rotenon dapat menimbulkan muntah, inkoordinasi, kejang konvulsi, dan tremor pada otot. Rotenon juga berefek pada sistem kardiovaskuler, berupa takikardi, hipotensi, dan gangguan kontraktilitas miokard. Paparan rotenon juga dapat mengakibatkan kematian karena kegagalan pada sistem kardio-respirasi. Paparan kronik rotenon dapat menyebabkan penyakit seperti Parkinson pada hewan coba. (Gupta & Milatovic, 2014)

### **2.2.3 Mekanisme Kerja Rotenon**

Karena sifat lipofiliknya, rotenon dapat dengan mudah melintasi membran sel, termasuk membran mitokondria (Khotimah *et al.*, 2015). Rantai respirasi mitokondria (kompleks I-IV) adalah tempat utama penghasil *adenosine triphosphate* (ATP) pada eukariot. Rotenon menghambat respirasi mitokondria pada kompleks I dengan penghambatan oksidasi *nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen* (NADH) menjadi *nicotinamide adenine dinucleotide* (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  $O_2^{\bullet-}$  (Superoksida). ROS yang berlebihan dapat mempengaruhi fungsi sel dan menginduksi kematian sel (Chen *et al.*, 2007; Fato *et al.*, 2009; Sanders & Greenamyre, 2013).



**Gambar 2.2 Mekanisme Kerja Rotenon**

Keterangan: Rotenon bekerja dengan menghambat rantai transpor elektron pada kompleks 1 mitokondria (Xu *et al.*, 2013)

**2.3 Asam Folat**

**2.3.1 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; PubChem, 2017).

Karakteristik fisiokimia Asam Folat:

Rumus empiris : C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>

Berat molekul : 441.404 g/mol

Densitas : 1.27 g/cm<sup>3</sup> pada 20 °C

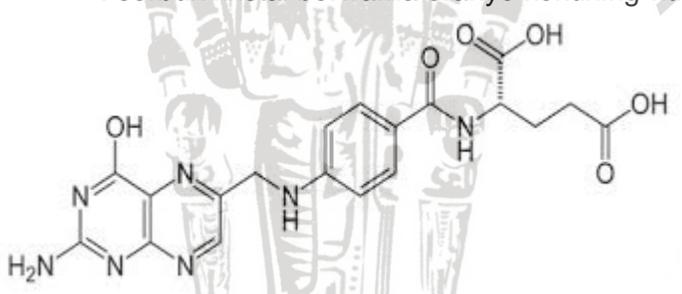
Bau : Tidak berbau

Titik leleh : 250 °C

Kelarutan : 0.0016 mg/mL pada 25°C

Tekanan penguapan : 6.2 x 10<sup>-20</sup> mmHg pada 25°C

Deskripsi fisik : serbuk kristal berwarna oranye kekuning-kuningan



Gambar 2.3 Struktur Molekul Asam Folat (PubChem, 2017)

2.3. Manfaat Asam Folat

Asupan asam folat sangat penting karena asam folat memiliki beberapa peran dalam tubuh manusia. *The National Institute of Health – Office of Dietary Supplements* di UK merekomendasikan asupan asam folat harian untuk dewasa sebanyak 400 µg, dan kebutuhan ini akan meningkat menjadi 600 µg saat kehamilan. Asam folat berperan dalam pembentukan sel darah merah dan sel darah putih, dimana

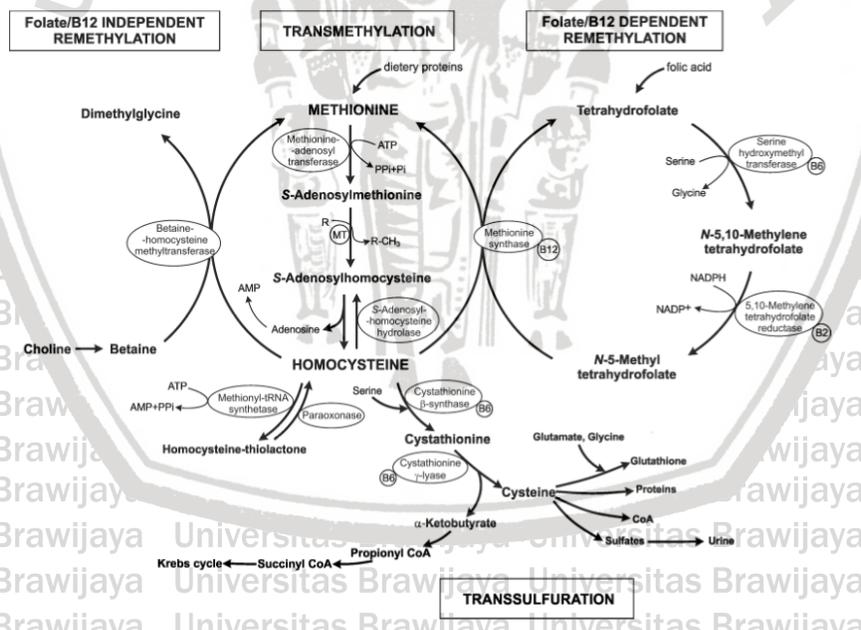
kekurangan asam folat dapat menyebabkan anemia megaloblastik. Asam folat sangat diperlukan selama masa kehamilan karena asam folat berperan dalam perkembangan janin, dimana kekurangan asam folat dapat menyebabkan *neural tube defect* (NTD), yaitu malformasi sistem saraf pusat kongenital. Selain itu, asam folat juga memegang peran penting dalam metabolisme homosistein, dimana asam folat dapat menurunkan homosistein dalam tubuh. Homosistein menginduksi homosisteinilasi, yang dapat bersifat sitotoksik; meningkatkan produksi ROS; sebagai neurotoksin, dimana homosistein adalah agonis pada dua kelompok reseptor glutamat, metabotropik dan ionotropik. (Gatt *et al.*, 2016; Skovierova *et al.*, 2016).

### **2.3.3 Asam Folat sebagai Antioksidan**

Asam folat dapat dengan efektif menangkalkan 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 menangkalkan radikal bebas, asam folat termasuk vitamin yang dapat dijadikan antioksidan (Joshi *et al.*, 2001).

Asam folat sudah terbukti memiliki kemampuan sebagai antioksidan. 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 membran lipid dari oksidasi (Cano *et al.*, 2001).

Asam folat berperan sebagai antioksidan melalui kemampuannya dalam menginduksi metabolisme *methionine*, dimana *methylltetrahydrofolate* 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mempengaruhi sistem 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)



**Gambar 2.4 Metabolisme Methionine**

Keterangan: Folat berperan penting dalam metabolisme metionin. 5-Methyltetrahydrofolate (5-MTHF) dan homosistein (Hcy) adalah substrat untuk metionin sintase untuk menghasilkan metabolisme endogen yang merupakan prekursor S-adeonosylmethionine (Lee *et al.*, 2011)

**2.3.4 Asam Folat sebagai Anti Inflamasi**

Suplementasi asam folat jangka pendek (3 bulan) pada subjek dengan berat badan lebih, dapat menurunkan beberapa kadar protein inflamasi fase akut di sirkulasi, seperti *C-reactive protein* (CRP), *interleukin-8* (IL-8), dan *macrophage chemoattractant protein-1* (MCP-1). CRP adalah protein pada inflamasi fase akut yang produksinya diinduksi oleh IL-6, sedangkan MCP-1 adalah sitokin proinflamasi yang berfungsi untuk menarik leukosit menuju tempat inflamasi. IL-8 berfungsi untuk memicu adhesi yang kuat dari monosit ke endotel pembuluh darah dalam aliran yang lambat (Solini *et al.*, 2006)

**2.4 Detak Jantung**

**2.4.1 Pengertian Detak Jantung**

Detak jantung adalah jumlah kontraksi ventrikel jantung dalam satu menit. Frekuensi detak jantung sangat bervariasi, dipengaruhi oleh level kebugaran dan tingkat olahraga, serta dipengaruhi oleh usia. Pada usia dewasa, detak jantung normal manusia berapa pada kisaran 60-100 *beat per minute* (bpm). Pada keadaan abnormal, detak jantung dapat di bawah 60 bpm, yang disebut bradikardi. Bradikardi secara fisiologis dapat terjadi saat tidur, *vagal tone* yang tinggi pada atlet, dan lain-lain. Bradikardi secara patologis contohnya terjadi saat myxoedema dan penghambatan jantung. Sedangkan keadaan dimana detak jantung di atas 100 bpm disebut takikardi. Takikardi terjadi secara fisiologi saat kegembiraan, latihan, dan lain-lain. Secara patologis, takikardi terjadi karena demam, tirotoksikosis, dan lain-lain (Pramanik, 2007)

**2.4.2 Variasi Fisiologis Detak Jantung**

### **Respirasi**

Detak jantung akan meningkat saat inspirasi dan akan menurun saat ekspirasi.

Perbedaan detak jantung saat inspirasi dan ekspirasi ini disebut sinus aritmia.

Ketidakteraturan irama jantung ini terjadi karena fluktuasi pada aktivitas saraf vagus.

### **Usia**

Pada saat baru lahir, detak jantung akan sangat tinggi hingga mencapai 130-140 bpm dan akan menurun sampai dewasa muda dan kemudian berangsur-angsur meningkat lagi seiring bertambahnya usia. Seiring bertambahnya usia, kemampuan untuk menghasilkan detak jantung maksimal akan menurun.

### **Jenis Kelamin**

Perempuan relatif memiliki detak jantung lebih tinggi dibanding laki-laki. Detak jantung pada perempuan hamil akan menjadi lebih tinggi.

### **Latihan fisik**

Pada saat melakukan latihan fisik, kebutuhan oksigen akan meningkat. Oleh karena itu, jantung akan berkerja lebih keras untuk memenuhi kebutuhan tersebut dengan meningkatkan detaknya.

### **Emosi**

Beberapa bentuk emosi dapat meningkatkan detak jantung, seperti marah, cemas, dan kegembiraan. Hal ini diperantai oleh respon "*fight or flight*" karena aktivasi sistem saraf simpatis, dimana aktivasi saraf simpatis dapat meningkatkan detak jantung.

### **Makan**

Saat proses makan dan menelan, sistem saraf simpatis lebih dominan.

Sehingga pada saat makan dan sesaat setelah makan, detak jantung akan meningkat

karena kerja dari saraf simpatis. Sedangkan sistem saraf parasimpatis akan mengambil alih peran simpatis saat proses pencernaan dimulai, sehingga detak jantung akan menurun.

### **Postur Tubuh**

Pada saat keadaan berdiri, detak jantung akan lebih tinggi dibandingkan saat pada keadaan berbaring. Hal ini berkaitan dengan efek gravitasi yang rendah terhadap tubuh dalam posisi berbaring, sehingga jantung lebih mudah untuk memompa darah ke seluruh tubuh (Pramanik, 2007)

### **2.4.3 Hubungan Detak Jantung dengan Malnutrisi**

Berdasarkan beberapa penelitian yang sudah dilakukan mengenai efek malnutrisi terhadap sistem kardiovaskular, dikatakan bahwa pada keadaan malnutrisi terjadi perubahan fungsi sistem saraf autonom, dimana sistem saraf autonom berperan dalam regulasi banyak organ, termasuk regulasi jantung. Dimana perubahan fungsi sistem saraf autonom ini berpengaruh pada mekanisme sentral dari baroreseptor dan kemoreseptor yang menyebabkan peningkatan aktivitas sistem saraf simpatis. Peningkatan aktivitas sistem saraf simpatis yang terjadi pada keadaan malnutrisi ini akan menyebabkan efek yang merusak sistem kardiovaskular, salah satunya ditandai dengan peningkatan detak jantung (Penitente *et al.*, 2007; Barreto *et al.*, 2016).

*Stunting* merupakan salah satu bentuk dari status gizi yang buruk pada awal kehidupan. Anak yang mengalami *stunting* akan mengalami perubahan struktural vaskular pada usia dini sehingga *arterial compliance* yang merupakan indikator fungsi kardiovaskular menjadi lebih rendah, yang akan dikompensasi dengan adanya peningkatan frekuensi detak jantung. Hal ini dapat meningkatkan resiko menderita penyakit tidak menular, salah satunya hipertensi pada saat dewasa (Rooyen *et al.*, 2005).

## 2.5 Zebrafish (*Danio rerio*)

### 2.5.1 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 sel 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 & Dahm, 2002; Spence *et al.*, 2008).

Berikut ini adalah taksonomi dari *zebrafish*:

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Subphylum : Vertebrata

Class : Teleostei

Order : Cypriniformes

Family : Cyprinidae

Genus : Danio

Species : *Danio rerio* (Integrated Taxonomic Information System, 2017)

### 2.5.2 Pertumbuhan dan 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.

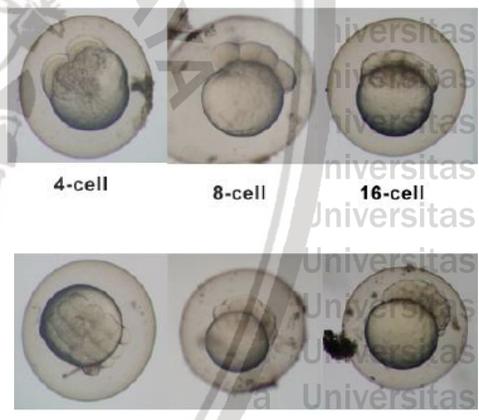
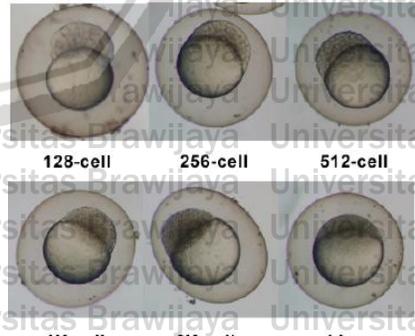
4. Fase dewasa, yaitu fase dimana sudah terjadi kematangan seksual yang ditunjukkan dengan diproduksi gamet. Pada fase ini organisme telah siap untuk *breeding*. Fase ini terjadi 3 bulan setelah menetas (90 dpf) (Parichy *et al.*, 2009)

Pertumbuhan *zebrafish* paling cepat terjadi selama tiga bulan pertama setelah menetas, setelah itu mulai menurun, mendekati nol sekitar 18 bulan (Spence *et al.*, 2008). Pertumbuhan dan perkembangan *zebrafish* dipengaruhi oleh faktor genetik dan juga faktor lingkungan.

Cara sederhana untuk menentukan maturasi *zebrafish*, dapat dilakukan pengukuran *Standard Length* (SL), yaitu dari ujung monjong sampai dasar ekor.

Karena, ukuran *zebrafish* dapat dipengaruhi oleh genetik dan faktor lainnya, untuk menentukan maturasi yang paling tepat dapat melalui pengamatan empat karakteristik eksternal lainnya yang mudah diamati, yaitu *pigmentation pattern*, *tail fin morphology*, *anal fin morphology*, and *dorsal fin morphology* (Singleman & Holtzman, 2014).

Tabel 2.1 Pertumbuhan dan Perkembangan Zebrafish (Parichy et al., 2009)

Periode	Waktu	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 metasynchronous ; epiboly dimulai	 <p>128-cell      256-cell      512-cell</p> <p>1K-cell      2K-cell      oblong</p>

Periode	Waktu	Perkembangan	Gambar
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 tubuh mulai melurus; sirkulasi, pigmentasi, dan sirip mulai berkembang	 <p>prim-5    prim-11</p>
Hatching	48-72 hpf	Penyelesaian morfogenesis sistem organ primer; perkembangan tulang rawan di kepala dan <i>pectoral fin</i> ; penetasan terjadi asynchronous	 <p>48-hour    72-hour</p>

Periode	Waktu	Perkembangan	Gambar
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	

### 2.5.3 Faktor Lingkungan yang Mempengaruhi Perkembangan *Zebrafish*

#### 1. Pencahayaan

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 & Jennings, 2010). Pengaturan ini dapat dilakukan dengan pemasangan lampu di akuarium yang telah diatur sesuai dengan siklus gelap terang.

#### 2. Temperatur

*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. Densitas Populasi**

Keadaan yang padat dapat mempengaruhi kesejahteraan *zebrafish*, *zebrafish* dewasa yang diletakan 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 akuarium yang memiliki filter dan biofilter yang baik, umumnya ditempatkan 5 ikan per liter. Sedangkan untuk akuarium 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) (Matthew *et al*, 2002) 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.

### 2.5.4 Pemberian Makanan Zebrafish

Pada usia 1 bulan, *zebrafish* dapat diberi makan berupa bubuk makanan kering. Pemberian makanan pada *zebrafish* dewasa dapat dilakukan sebanyak 2 kali sehari. Saat pemberian makanan, perlu dipastikan bahwa jumlah makanan yang diberikan sesuai dengan jumlah ikan yang ada sehingga tidak berlebihan. Pemberiaan makanan yang terlalu banyak dapat mencemari air dan nantinya akan menjadi tempat pertumbuhan bakteri.

Makanan kering saja tidak cukup untuk membuat *zebrafish* dalam keadaan *breeding* yang baik. Sehingga perlu diberikan juga makanan tambahan dengan makanan beku seperti larva *Drosophila* atau makanan dari makhluk hidup, seperti *Artemia nauplia*. Makanan tambahan ini perlu diberikan minimal 2 kali dalam seminggu untuk membuat *zebrafish* memiliki kemampuan *breeding* yang baik.

(Nusslein et al, 2002).

### 2.5.5 Zebrafish sebagai Hewan Coba

*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:

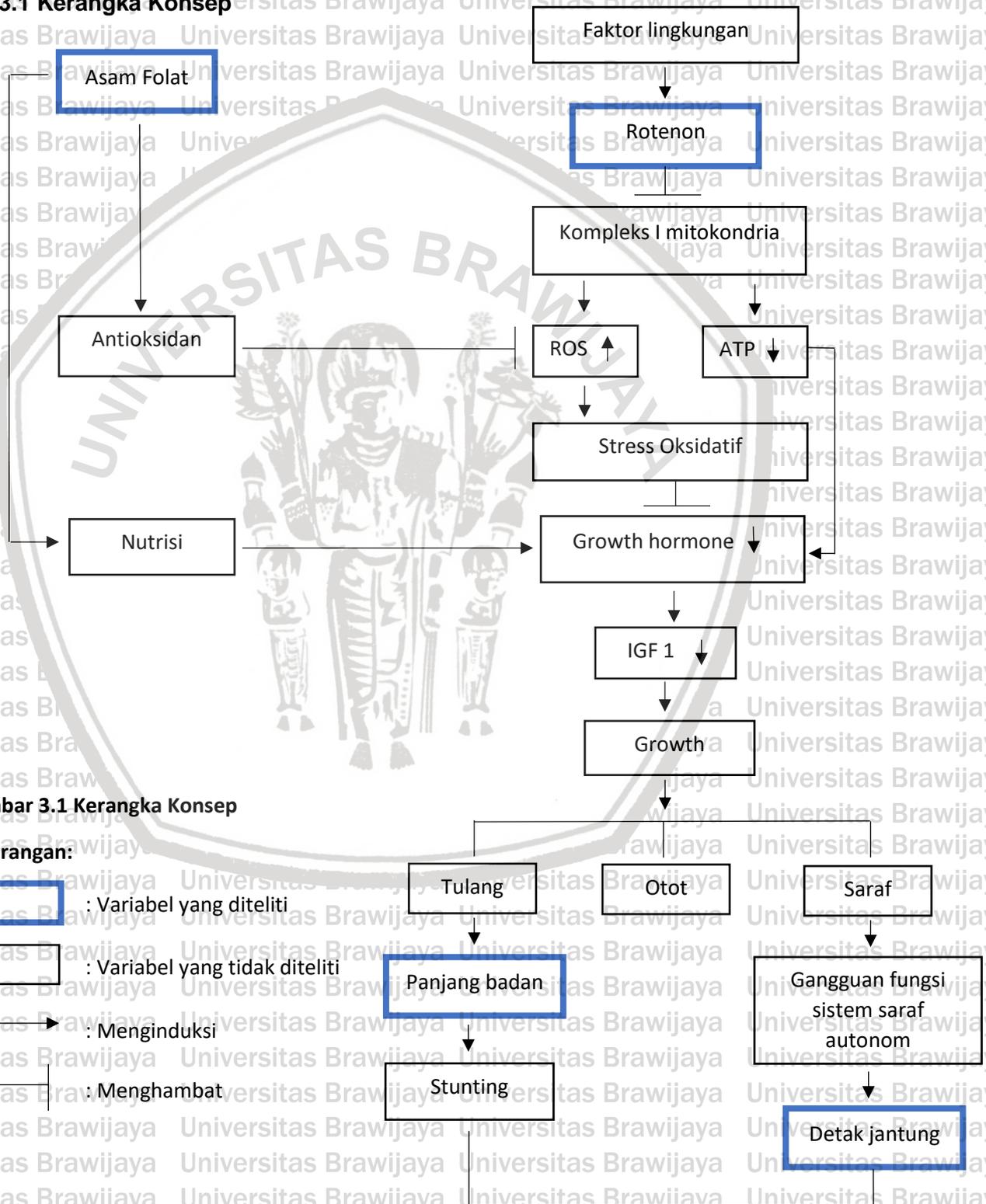
1. *Zebrafish* memiliki kemiripan genom dan molekular yang tinggi dengan vertebrata lainnya, termasuk manusia. Sehingga, temuan yang didapatkan dapat diterapkan pada manusia.
2. Perkembangan *zebrafish* yang terjadi di luar tubuh induk, yaitu berupa embrio yang dibungkus dengan chorion berwarna transparan membuat perkembangannya mudah diamati sejak fertilisasi hingga menjadi larva.
3. Embrio *zebrafish* berkembang dengan sangat cepat, dimana jantung, pancreas, 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 & Lin, 2008; Garcia *et al.*, 2016).

Salah satu penelitian tumbuh kembang yang menggunakan *zebrafish* sebagai model penelitian adalah penelitian tentang *stunting*. Sebelumnya dilakukan studi eksplorasi untuk menemukan konsentrasi rotenon yang dapat menginduksi terjadinya *stunting*. Paparan 12,5 ppb diberikan pada embrio *zebrafish* hingga usia 72 hpf untuk menginduksi terjadinya *stunting* (Cory'ah, 2017; Darwitri *et al.*, 2017).

## BAB 3

### KERANGKA KONSEP PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konsep



### 3.2 Keterangan Kerangka Konsep

Paparan rotenon dapat menghambat kompleks I mitokondria, sehingga menyebabkan peningkatan produksi ROS dan penurunan produksi ATP di mitokondria. Jumlah ROS yang meningkat ini akan menyebabkan stress oksidatif dan akan menghambat *growth hormone* (GH) dan *insulin-like growth factor- 1* (IGF-1) yang sangat berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan awal anak. Kadar GH dan IGF-1 menurun, dapat menghambat pertumbuhan anak, hal ini akan semakin memburuk jika ditambah dengan asupan nutrisi yang tidak mencukupi. Tulang, otot, dan saraf adalah organ-organ yang sangat cepat tumbuh dan berkembang pada masa awal kehidupan anak. Jika kadar GH dan IGF-1 menurun, dapat mempengaruhi pertumbuhan tulang pada anak sehingga dapat menyebabkan tinggi badan anak menurut usianya kurang dari rata-rata anak lainnya (*stunting*). Sedangkan pada sistem saraf, dapat terjadi gangguan fungsi sistem saraf autonom, dimana terjadi aktivasi sistem saraf simpatis yang meningkat. Salah satu peran sistem saraf simpatis pada kardiovaskular adalah meningkatkan detak jantung.

Pemberian asam folat sebagai salah satu mikronutrien yang penting untuk tubuh, diharapkan dapat memperbaiki asupan nutrisi pada anak sehingga dapat memperbaiki pertumbuhan. Selain itu, asam folat dapat berperan sebagai antioksidan sehingga asam folat diharapkan dapat menangkap radikal bebas yang dihasilkan oleh rotenon melalui penghambatan kompleks I mitokondria sehingga mekanisme terjadinya *stunting* bisa dihambat.

### 3.3 Hipotesis

1. Pemberian asam folat fase prenatal dapat mengoreksi panjang badan pada *zebrafish* model *stunting* dengan induksi rotenon
2. Pemberian asam folat fase prenatal dapat menurunkan frekuensi detak jantung pada *zebrafish* model *stunting* dengan induksi rotenon



## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental laboratoric* dengan desain penelitian *randomize posttest only control group design*.

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah embrio *zebrafish* (*Danio rerio*) hasil fertilisasi induk jantan dan betina jenis *wild type* yang diperoleh dari Laboratorium Budidaya Ikan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

##### 4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah embrio *zebrafish* (*Danio rerio*) usia 0-2 hpf dengan jumlah keseluruhan 450 embrio. Dimana pada penelitian ini dilakukan 3 kali ulangan, dengan 5 kelompok (masing-masing 30 embrio) setiap ulangannya.

Penentuan jumlah embrio yang digunakan pada penelitian ini mempertimbangkan *survival rate* setiap well (Lucitt *et al.*, 2008). Kelima kelompok tersebut adalah:

1. Kontrol negatif (KN) adalah sampel yang tidak diberikan paparan rotenon dan asam folat.
2. Kontrol positif rotenon (KP) adalah sampel yang hanya diberikan paparan rotenon 12,5 ppb.
3. Perlakuan rotenon + asam folat 1 (RAF 50) adalah sampel yang diberikan paparan rotenon 12,5 ppb dan konsentrasi asam folat 50  $\mu\text{M}$
4. Perlakuan rotenon + asam folat 2 (RAF 70) adalah sampel yang diberikan paparan rotenon 12,5 ppb dan konsentrasi asam folat 70  $\mu\text{M}$

5. Perlakuan rotenon + asam folat 3 (RAF 100) adalah sampel yang diberikan paparan rotenon 12,5 ppb dan konsentrasi asam folat 100  $\mu\text{M}$

#### 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

##### Tempat Penelitian:

Penelitian yang meliputi pemeliharaan embrio hingga larva *zebrafish*, pembuatan embrionik medium, pembuatan larutan rotenon, pelarutan asam folat, pengukuran panjang badan, dan pengukuran frekuensi detak jantung sampel dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

**Waktu Penelitian:** Pada bulan Agustus-September 2018

#### 4.4 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Konsentrasi asam folat
2. Variabel tergantung : Panjang badan dan frekuensi detak jantung larva *zebrafish*
3. Variabel kendali : Konsentrasi induksi rotenon, medium embrionik, suhu incubator  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , kebersihan plate/well dan incubator, pakan larva (tetramin), dan air filtrasi.

#### 4.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

##### 1. Kriteria Inklusi

Keseluruhan embrio yang berwarna transparan, berusia 0-2 hpf, tidak berwarna putih dan tidak ada serabut putih atau jamur saat diamati di bawah mikroskop mikroskop stereo (Olympus SZ61).

## 2. Kriteria Eksklusi

Embrio *zebrafish* yang berwarna putih, tidak terbuahi, lengket dengan embrio lainnya, tidak bulat, ada serabut putih atau jamur, serta embrio yang mati atau cacat sebelum penelitian selesai dilakukan.

### 4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional penelitian adalah sebagai berikut:

#### 1. Kriteria *Stunting*

Kriteria *stunting* ditentukan berdasarkan tinggi badan dibanding umur yang bernilai lebih rendah dari -2 standar deviasi (SD) *WHO Child Growth Standard*.

#### 2. Ukuran Panjang Badan Larva *Zebrafish*

Pengukuran panjang badan dilakukan dengan mengukur *standard length* (SL), yaitu pengukuran dari *tip of the snout* (ujung hidung) hingga *base of the tail* (pangkal ekor) dengan satuan millimeter (Singleman & Holtzman, 2014).

Untuk melakukan pengukuran, larva *zebrafish* dipindahkan ke *object glass* dengan air minimal dalam *object glass*, ikan dalam keadaan diam, tidak bergerak, dan lurus. Larva *zebrafish* diamati dengan mikroskop stereo (Olympus SZ61), lalu dilakukan pengambilan gambar dengan Optilab versi 2.0 dan dilakukan pengukuran panjang badan dengan *Software Image Raster* Versi 3 yang sudah dikalibrasi sebelumnya. Pengukuran dilakukan pada hari ke 3, 6, dan 9 dpf (Cory'ah, 2017).

#### 3. Ukuran Frekuensi Detak Jantung

Perhitungan frekuensi detak jantung dilakukan selama satu menit. Perhitungan frekuensi detak jantung dilakukan dengan merekam detak jantung larva *zebrafish* menggunakan kamera digital (Panasonic DC-GF79K

Lumix) perbesaran 40x. Selanjutnya penghitungan detak jantung dilakukan dengan menggunakan *digital counter* selama satu menit. Satuan hasil pengukuran adalah *beat per minute* (bpm).

#### 4. Embrio *zebrafish*

Embrio yang digunakan adalah hasil fertilisasi induk jantan dan betina jenis *wildtype* yang didapat dari Laboratorium Budidaya Ikan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya. Embrio berwarna transparan, tidak ada serabut putih (jamur), berbentuk bulat, berusia 0-2 hpf (Cory'ah, 2017)

#### 5. Rotenon

Rotenon diperoleh dari Sigma (R8875) dengan kemurnian  $\geq 95\%$  dengan konsentrasi 12,5 ppb berdasarkan studi eksplorasi yang telah dilakukan sebelumnya (Cory'ah, 2017)

#### 6. Asam Folat

Larutan asam folat didapatkan dari serbuk asam folat Sigma F7876 yang sebelumnya dilarutkan dengan natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) dan ditambahkan akuades dengan konsentrasi akhir 50  $\mu\text{M}$ , 70  $\mu\text{M}$ , dan 100  $\mu\text{M}$ .

#### 4.7 Pengolahan dan Analisis Data

Dalam penelitian ini digunakan beberapa analisis data statistik, yaitu:

1. Menguji perbedaan panjang badan antara kelompok kontrol, kelompok rotenon, dan kelompok perlakuan dengan menggunakan uji *one way ANOVA* dan uji *Post Hoc Tukey*.
2. Menguji perbedaan frekuensi detak jantung antara kelompok kontrol, kelompok rotenon, dan kelompok perlakuan dengan menggunakan uji *one way ANOVA* dan uji *Post Hoc Tukey*.

## **4.8 Alat dan Bahan**

### **4.8.1 Alat dan Bahan Pembuatan Larutan Asam Folat**

Pembuatan larutan asam folat membutuhkan alat-alat berupa falcon 15 ml, timbangan digital (Mettler Toledo), dan sendok pengaduk, mortar dan stamper.

Selain itu, dibutuhkan bahan berupa serbuk asam folat Sigma F7876, serbuk  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sebagai pelarut, dan akuades.

### **4.8.2 Alat dan Bahan Pembuatan Medium Embrionik (E3)**

Untuk pembuatan medium embrionik dibutuhkan alat berupa tabung reaksi 500 ml, timbangan digital (Mettler Toledo), sendok pengaduk, dan kertas saring.

Sedangkan bahan yang digunakan adalah  $\text{CaCl}_2$  0,08 g,  $\text{KCl}$  0,06 g,  $\text{MgSO}_4$  3,2 g,  $\text{NaCl}$  2 g, dan air filtrasi 200 ml

## **4.9 Prosedur Penelitian**

### **4.9.1 Pengambilan dan Perawatan Embrio**

Embrio yang akan digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Budidaya Ikan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Fertilisasi dilakukan dengan mengikuti siklus gelap terang, yaitu periode gelap selama 10 jam dan periode terang selama 14 jam. Pencahayaan yang optimal ini diperlukan untuk mempengaruhi keberhasilan fertilisasi, yaitu periode gelap penting untuk *zebrafish* istirahat dan periode terang akan memicu *zebrafish* untuk berkembang biak (Vargesson, 2007).

Satu jam setelah lampu dinyalakan, kemudian trap yang berisi embrio hasil fertilisasi diambil dan dipindahkan ke gelas beker. Selanjutnya embrio dengan cepat (tidak lebih dari 2 hpf) dibersihkan dengan akuades hingga bersih dari kotoran dan jamur. Untuk perawatan selanjutnya, embrio yang memenuhi kriteria inklusi dipindahkan pada well plate 6 sumuran dengan memberikan embrionik medium yang sudah dicampur dengan larutan rotenon dan asam folat sesuai

dengan perlakuan masing-masing kelompok. Pemberian perlakuan dilakukan hingga usia 72 hpf. Kemudian embrio dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 28°C. (Cory'ah, 2017).

#### 4.9.2 Pembuatan Medium Embrionik

Pembuatan 200 ml medium embrionik adalah dengan memasukan kertas pengalasan pada timbangan digital dan timbangan dinolkan, kemudian seluruh bahan yaitu, CaCl 0,08 g, KCl 0,06 g, NaCl 2 g, MgSO<sub>4</sub> 3,2 g ditimbang, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air filtrasi sampai 200 ml. Kemudian digoyangkan hingga bahan-bahan tersebut larut. Bagian stok disimpan dalam botol, ditutup rapat dan disimpan dalam lemari es dengan suhu 2-8°C. Saat akan digunakan, medium embrionik ditambahkan air filtrasi dengan perbandingan medium dengan air sebesar 1:9 (Cory'ah, 2017).

#### 4.9.3 Pembuatan Larutan Rotenon

Rotenon yang digunakan berasal dari sigma (R8875) kemurnian ≥ 95%.

Serbuk rotenon dilarutkan pada DMSO (*Dimethyl sulfoxide* 1%). Dari pelarutan itu diperoleh konsentrasi 2 x 10<sup>3</sup> µg/l sebagai stok (Cory'ah, 2017). Untuk pembuatan rotenone 12,5 ppb dengan volume sebanyak 15 ml (5 ml x 3 sumuran), maka larutan dapat dibuat dengan mengambil stok konsentrasi 2 x 10<sup>3</sup> µg/l dengan rumus:

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 2 \times 10^3 \mu\text{g/l} = 15 \text{ ml} \times 12,5 \mu\text{g/l}$$

$$V_1 = \frac{15 \text{ ml} \times 12,5 \mu\text{g/l}}{2 \times 10^3 \mu\text{g/l}}$$

$$V_1 = \frac{187,5}{2 \times 10^3}$$

$$V_1 = 93,75 \times 10^{-3} \text{ ml}$$

Keterangan:

V<sub>1</sub> = Volume awal

N<sub>1</sub> = Konsentrasi dari stock

V<sub>2</sub> = Volume yang diinginkan

N<sub>2</sub> = Konsentrasi akhir yang diinginkan

Untuk membuat rotenon konsentrasi 12,5 ppb, ambil stok rotenon sebanyak  $93,75 \times 10^{-3}$  mL menggunakan mikropipet kemudian ditambahkan air filtrasi sampai 15 ml.

#### 4.9.4 Pembuatan Larutan Asam Folat

Pembuatan larutan asam folat pada penelitian ini, dilakukan dengan melarutkan serbuk asam folat Sigma F7876 pada  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan ditambahkan akuades. Dari pelarutan itu, didapatkan stok larutan asam folat dengan konsentrasi 5  $\mu\text{M}$ . Untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan, maka stok dilarutkan kembali dengan rumus:

$V_1 \times N_1$	=	$V_2 \times N_2$
$V_1 \times 5000 \mu\text{M}$	=	$15 \text{ ml} \times 50 \mu\text{M}$
$V_1$	=	$\frac{15 \text{ ml} \times 50 \mu\text{M}}{5000 \mu\text{M}}$
$V_1$	=	0,15 ml

Keterangan:

- $V_1$  = Volume awal
- $N_1$  = Konsentrasi dari stock
- $V_2$  = Volume yang diinginkan
- $N_2$  = Konsentrasi akhir yang Diinginkan

Berdasarkan perhitungan di atas, didapatkan volume yang dibutuhkan untuk konsentrasi 50  $\mu\text{M}$  sebanyak 0,15 ml, 70  $\mu\text{M}$  sebanyak 0,21 ml, dan 100  $\mu\text{M}$  sebanyak 0,30 ml. kemudian masing-masing ditambahkan air filtrasi hingga 15 ml.

#### 4.9.5 Pemberian Larutan Rotenon dan Asam Folat

Hasil eksplorasi telah didapatkan konsentrasi rotenon yang dapat menyebabkan *stunting* yaitu 12,5 ppb (Cory'ah, 2017) dan larutan asam folat yang digunakan untuk perlakuan adalah dengan konsentrasi 50  $\mu\text{M}$ , 70  $\mu\text{M}$ , dan 100  $\mu\text{M}$ . Pencampuran kedua larutan ini dilakukan bersamaan, dengan pemberian larutan rotenon terlebih dahulu, kemudian larutan asam folat.

1. Kontrol Positif (KP)

Dengan menggunakan mikropipet stok rotenon diambil sebanyak 93,75 ml kemudian ditambahkan embrionik medium sampai 15 ml dan dibagi ke masing-masing sebanyak 5 ml.

2. Rotenon dan asam folat I (RAF 50), II (RAF 70), III (RAF 100)

Pengenceran rotenon dengan larutan asam folat diperoleh beberapa konsentrasi berdasarkan rumus  $V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$ , dijelaskan pada table berikut:

Tabel 4.1 Konsentrasi Rotenon dan Asam Folat

Nama	Konsentrasi yang diminta		Volume yang dibutuhkan		Air Filtrasi (ml)	Jumlah Well	Tiap Well (ml)
	Rotenon (µg/l)	Asam Folat (µM)	Stok Rotenon (ml)	Stok Asam Folat (ml)			
RAF 50	12,5	50	$93,75 \times 10^{-3}$	0,15	15	3	5
RAF 70	12,5	70	$93,75 \times 10^{-3}$	0,21	15	3	5
RAF 100	12,5	100	$93,75 \times 10^{-3}$	0,30	15	3	5

Pemberian paparan dilakukan pada usia embrio 0-72 hpf, yang dianalogikan dengan masa kandungan (*intrauterine*). Setelah 72 hpf, embrio dibilas dengan medium embrionik hingga bersih dari paparan. Setelah itu, diberikan lagi medium embrionik saja. Larva yang menetas kemudian dipindahkan dari well plate isi 6 sumuran ke well plate isi 24 sumuran dan sisanya sebagai stok diukur panjang badan dan frekuensi detak jantungnya di 3, 6, 9 dpf.

#### 4.9.6 Pengukuran Panjang Badan

Pada usia 3, 6, dan 9 dpf, dilakukan pengukuran panjang badan.

Pengukuran dimulai dengan memindahkan larva *zebrafish* ke *object glass* dengan sedikit air pada *object glass*. Posisi ikan diam, dan harus dalam posisi lurus.

Dilakukan pengukuran panjang badan, yaitu *standard length* (SL) yang diukur dari ujung hidung sampai pangkal *caudal fin*. Hasil pengukuran ditulis dalam satuan

millimeter (mm) (Singleman & Holtzman, 2014). Larva diamati dibawah mikroskop stereo (Olympus SZ61) dan dilakukan pengambilan gambar menggunakan Optilab

versi 2.0. Pengukuran panjang badan menggunakan *Software Image Raster*

Versi 3 yang sebelum digunakan sudah harus dikalibrasi terlebih dulu (Cory'ah, 2017).

#### 4.9.7 Pengukuran Frekuensi Detak Jantung

Pengukuran detak jantung dilakukan pada larva usia 3, 6, dan 9 dpf.

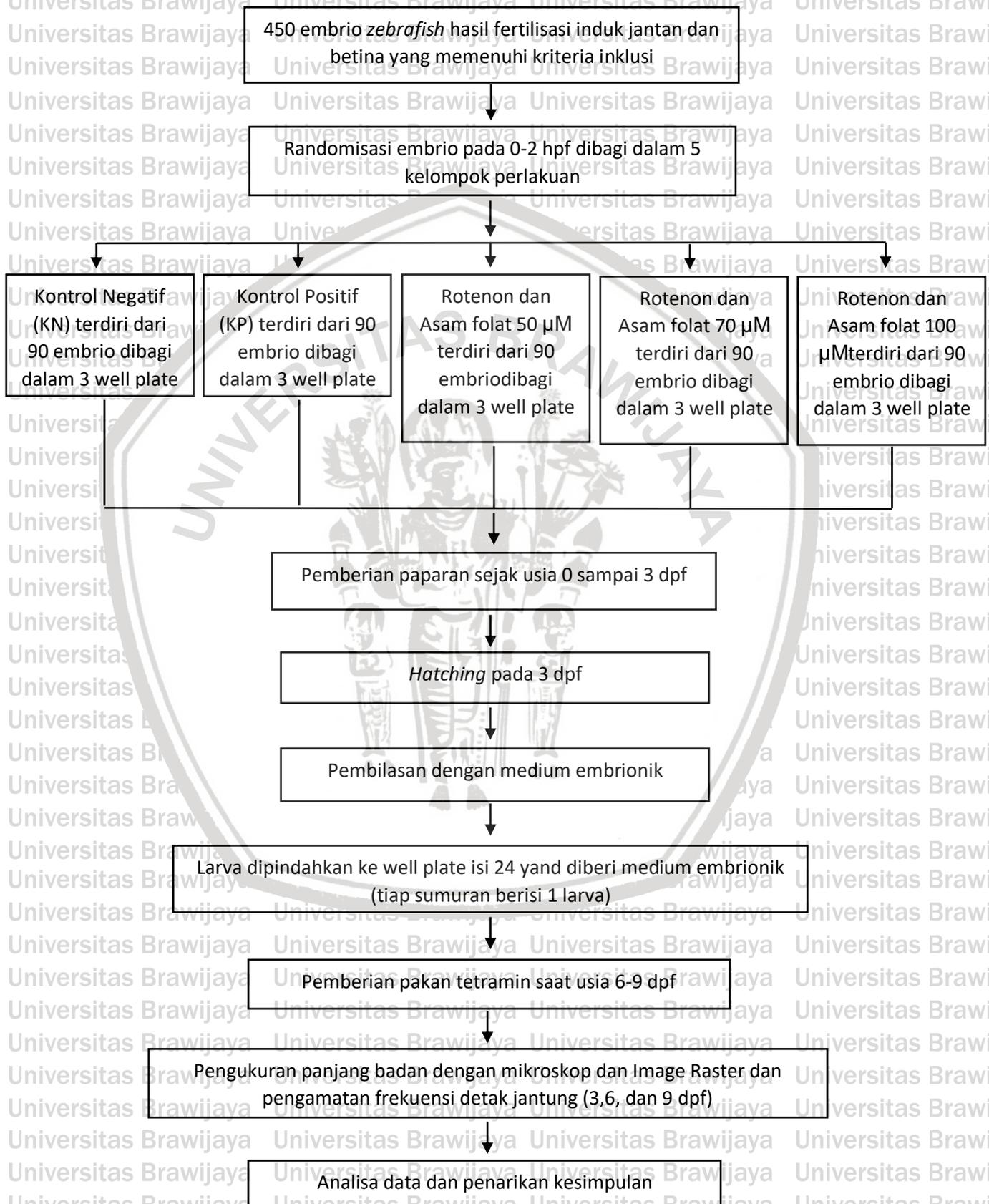
Pengukuran dimulai dengan memindahkan larva *zebrafish* ke *object glass* dengan sedikit air pada *object glass*. Posisi ikan diam dan detak jantung terlihat.

Pengukuran detak jantung dilakukan dengan mengamati dan merekam video berdurasi 1 menit untuk masing-masing larva di bawah mikroskop stereo (Olympus

SZ61) dengan menggunakan kamera digital (Panasonic DC-GF79K Lumix) perbesaran 40x. Selanjutnya penghitungan detak jantung dilakukan dengan

menggunakan *digital counter*.

#### 4.10 Alur Penelitian





## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

#### 5.1 Hasil Studi Eksplorasi Konsentrasi Asam Folat

Penelitian menggunakan asam folat pada *zebrafish* sudah pernah dilakukan sebelumnya. Pada penelitian tersebut, konsentrasi asam folat yang digunakan adalah 50 dan 75  $\mu\text{M}$  yang diberikan pada usia 2 sampai 48 hpf (*hours post fertilization*) pada *zebrafish* yang diinduksi ethanol untuk memperbaiki panjang badan. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi 50  $\mu\text{M}$  memiliki efek yang tidak signifikan, sedangkan konsentrasi 75  $\mu\text{M}$  memiliki efek yang signifikan untuk memperbaiki panjang badan pada *zebrafish* yang diinduksi ethanol (Sarmah & Marss, 2013). Berdasarkan pada penelitian ini, peneliti melakukan studi eksplorasi untuk mendapatkan konsentrasi asam folat dengan efek koreksi terbaik terhadap panjang badan larva *zebrafish* model *stunting*.

Model *stunting* dibuat dengan menginduksi embrio *zebrafish* dengan rotenon 12,5 ppb. Paparan yang diberikan baik rotenon maupun asam folat dilakukan pada fase embrionik, yaitu 2-72 hpf yang dapat dianalogikan dengan keadaan intrauterin (Darwitri, 2018). Konsentrasi asam folat dengan yang digunakan pada studi eksplorasi ini, yaitu 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100  $\mu\text{M}$ . Parameter yang diamati adalah panjang badan larva *zebrafish* yang diukur pada usia 3, 6, dan 9 dpf (*days post fertilization*). Rata-rata panjang badan larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon 12,5 ppb mengalami penurunan panjang badan > 2 standar deviasi (SD) jika dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Hasil pengukuran panjang badan larva *zebrafish* menunjukkan rata-rata panjang badan kelompok yang diberi asam folat konsentrasi 25, 30, dan 40  $\mu\text{M}$  tidak

berbeda jika dibandingkan dengan kelompok rotenon. Sehingga konsentrasi terendah yang dipilih untuk memberikan efek koreksi pada penelitian adalah 50  $\mu\text{M}$  karena konsentrasi ini memberikan efek yang cukup baik dalam meningkatkan panjang badan. Konsentrasi 70  $\mu\text{M}$  dipilih karena konsentrasi ini memberikan efek koreksi hingga mampu mendekati rata-rata panjang badan kelompok kontrol. Konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  dipilih untuk membuktikan apakah pada asam folat konsentrasi tinggi memberikan efek koreksi yang lebih rendah jika dibandingkan dengan konsentrasi 70  $\mu\text{M}$ .

Keseluruhan larva *zebrafish* pada studi eksplorasi dalam keadaan normal, tidak ada larva yang mengalami kecacatan, dan *survival rate* pada usia 24-72 hpf dari semua konsentrasi tersebut >80%. Sehingga, dapat disimpulkan bahwa keseluruhan konsentrasi asam folat tidak memberikan efek teratogenik pada larva *zebrafish*. Dari hasil tersebut, pada penelitian ini konsentrasi asam folat yang digunakan untuk memberikan koreksi pada larva *zebrafish* model *stunting* yang diinduksi rotenon 12,5 ppb adalah 50, 70, dan 100  $\mu\text{M}$ .

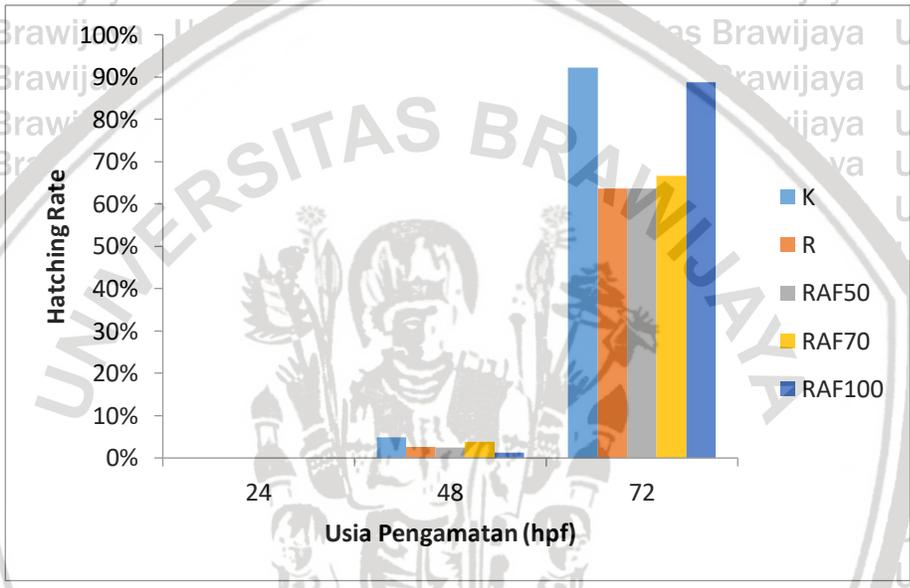
## **5.2 Survival Rate dan Hatching Rate Embrio Zebrafish**

### **5.2.1 Survival Rate Embrio Zebrafish**

*Survival rate* menggambarkan tingkat kelangsungan hidup pada suatu populasi yang merupakan syarat suatu penelitian dapat dilakukan atau tidak. Penghitungan *survival rate* menunjukkan bahwa pada usia 24, 48, dan 72 hpf keseluruhan kelompok memiliki *survival rate* yang tinggi, yaitu >80%. Kematian embrio pada usia 24, 48, dan 72 hpf menggambarkan kualitas embrio. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian rotenon 12,5 ppb tidak menimbulkan efek toksisitas akut berupa kematian, serta tidak menimbulkan efek teratogenik, sehingga embrio *zebrafish* ini dapat digunakan untuk penelitian.

### 5.2.2 Hatching Rate Embrio Zebrafish

*Hatching rate* merupakan daya tetas telur yang menggambarkan persentase jumlah embrio yang menetas disbanding jumlah embrio yang terfertilisasi. *Hatching rate* pada kelompok kontrol, kelompok rotenon, serta kelompok RAF (rotenon asam folat) 50, 70, dan 100 pada usia 24, 48, dan 72 hpf dapat dilihat pada gambar berikut:



**Gambar 5.1 Hatching Rate Embrio Zebrafish** usia 24, 48, dan 72 hpf (K: kontrol; R: rotenon 12,5 ppb; RAF50: rotenon 12,5 ppb + asam folat 50 µM; RAF70: rotenon 12,5 ppb + asam folat 70 µM; RAF100: rotenon 12,5 ppb + asam folat 100 µM)

Gambar 5.1 menunjukkan bahwa *hatching rate* pada 24 hpf sebesar 0% yang berarti tidak ada embrio yang menetas pada usia 24 hpf. Sedangkan pada usia 48 hpf, beberapa embrio sudah mulai menetas, namun jumlahnya tidak mencapai 10%.

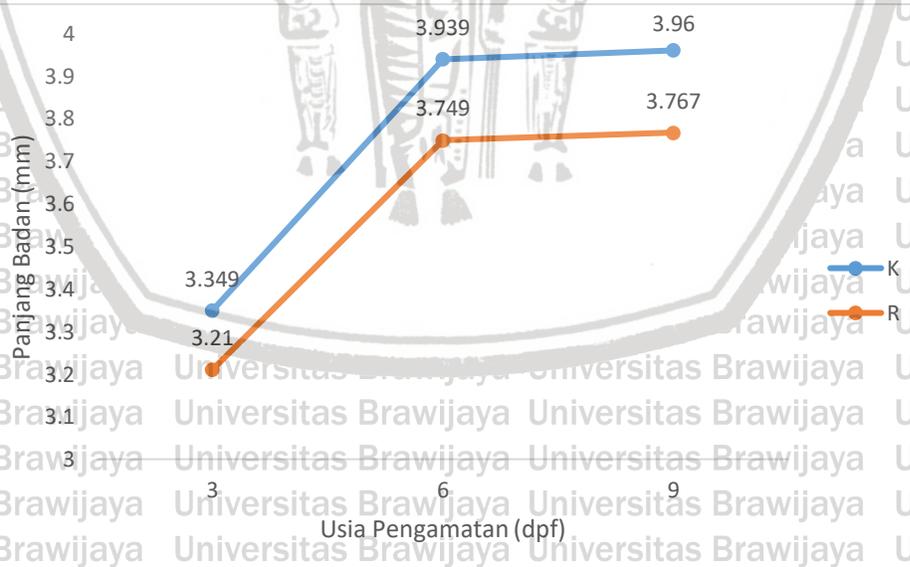
Sebagian besar telur menetas pada usia 72 hpf, sesuai dengan teori pertumbuhan dan perkembangan *zebrafish* yang mengatakan bahwa embrio akan menetas pada usia 48-72 hpf (Parichy *et al.*, 2009).

### 5.3 Panjang Badan Larva Zebrafish Model Stunting

Rata-rata hasil pengukuran panjang badan pada larva zebrafish antara kelompok kontrol dan kelompok rotenon yang dilakukan dengan menggunakan software image raster versi 3 pada usia 3, 6, dan 9 dpf disajikan pada tabel 5.1

**Tabel 5.1** Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish Kelompok Kontrol dan Kelompok Rotenone pada Usia 3, 6, dan 9 dpf

Usia	3 dpf		6 dpf		9 dpf	
Kelompok	Kontrol	Rotenon	Kontrol	Rotenon	Kontrol	Rotenon
<b>Gambar</b>						
<b>Mean (mm)</b>	3.349	3.210	3.939	3.749	3.960	3.767
<b>± SD</b>	± 0.072	± 0.064	± 0.093	± 0.106	± 0.087	± 0.123



**Gambar 5.2** Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish Kelompok Kontrol dan Kelompok Rotenone pada Usia 3, 6, dan 9 dpf

Gambaran perbedaan pertumbuhan panjang badan larva *zebrafish* dapat dilihat pada tabel 5.1 dan gambar 5.2. Secara keseluruhan, garis pertumbuhan kelompok rotenon berada di bawah kelompok kontrol. Pada usia 3 dpf yang analog dengan bayi baru lahir (Sorribes *et al.*, 2013), rata-rata panjang badan kelompok rotenon berbeda signifikan dengan kelompok kontrol (sig. 0.00; p=0,05) tetapi perbedaan rata-rata panjang badan tidak mencapai > 2 standar deviasi (0.072). Sedangkan pada usia 6 dpf yang analog dengan anak usia 2 tahun dan usia 9 dpf yang analog dengan anak usia 8 tahun (Sorribes *et al.*, 2013), rata-rata panjang badan antara kelompok rotenon dan kelompok kontrol berbeda signifikan (sig. 0.00; p=0.05) dan perbedaan rata-rata panjang badan mencapai > 2 standar deviasi (0.093 dan 0.087).

#### 5.4 Pengaruh Pemberian Asam Folat terhadap Panjang Badan Larva *Zebrafish*

Pengukuran panjang badan larva *zebrafish* menggunakan *software image raster* versi 3. Rata-rata hasil pengukuran panjang badan larva *zebrafish* usia 3, 6, dan 9 dpf kelompok kontrol, kelompok rotenon, dan kelompok rotenon dan asam folat (RAF 50, 70, dan 100) dapat dilihat pada tabel berikut

**Tabel 5.2 Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish Antar Kelompok pada Usia 3, 6, dan 9 dpf**

Usia	3 dpf					6 dpf					9 dpf				
Kelompok	K	R	RAF50	RAF70	RAF100	K	R	RAF50	RAF70	RAF100	K	R	RAF50	RAF70	RAF100
Gambar															
Mean (mm)	3.349	3.210	3.318	3.324	3.291	3.939	3.749	3.843	3.846	3.859	3.960	3.767	3.875	3.887	3.893
± 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:

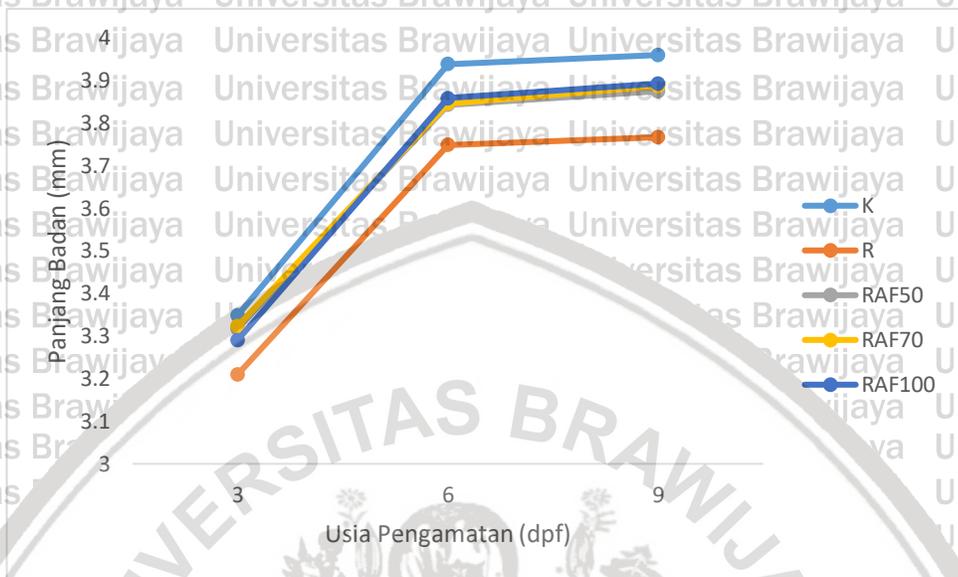
K : Kontrol

R : Rotenon 12,5 ppb

RAF 50 : Rotenon 12,5 ppb + asam folat 50 µM

RAF 70 : Rotenon 12,5 ppb + asam folat 70 µM

RAF 100 : Rotenon 12,5 ppb + asam folat 100 µM



**Gambar 5.3 Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish Antar Kelompok pada Usia 3, 6, dan 9 dpf**

Tabel 5.2 dan gambar 5.3 menunjukkan bahwa pada usia 3, 6, dan 9 dpf kelompok rotenon memiliki pertumbuhan panjang badan dibawah kelompok kontrol. Kelompok RAF 50, 70, dan 100 memiliki panjang badan yang lebih baik dari kelompok rotenon, sehingga dapat dikatakan bahwa secara umum pemberian asam folat dapat mengoreksi panjang badan pada larva zebrafish model *stunting* pada usia 6 dan 9 dpf. Hasil pengolahan data menggunakan uji statistik menunjukkan panjang badan kelompok RAF 50, 70, dan 100 berbeda signifikan terhadap panjang badan kelompok rotenon pada usia 3, 6, dan 9 dpf (sig 0.00; p=0.05). Pada usia 6 dan 9 dpf, hasil terbaik terdapat pada kelompok RAF 100, namun kelompok RAF 100 ini juga tidak berbeda signifikan dengan kelompok RF 50 dan 70 (sig. >0.05; p=0.05). Panjang badan kelompok RAF 50, 70, dan 100 mampu mendekati panjang badan kelompok kontrol pada usia 9 dpf tetapi belum dapat mencapai panjang badan kelompok kontrol.

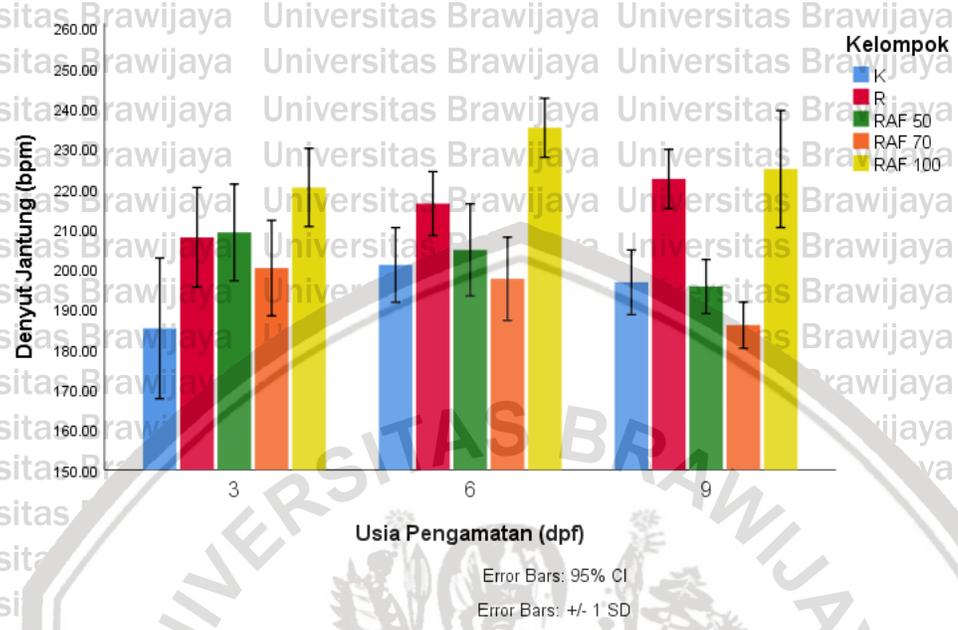
## 5.5 Pengaruh Pemberian Rotenon dan Asam Folat terhadap Frekuensi Detak Jantung pada Larva Zebrafish

Frekuensi detak jantung pada kelompok kontrol, kelompok rotenon, dan kelompok perlakuan rotenon asam folat (RAF 50, 70, dan 100) diperoleh dengan merekam detak jantung larva zebrafish menggunakan kamera digital (Panasonic DC-GF79K Lumix) perbesaran 40x. Selanjutnya penghitungan detak jantung dilakukan dengan menggunakan *digital counter* selama 1 menit.



**Tabel 5.3 Rerata Frekuensi Detak Jantung Larva Zebrafish Antar Kelompok pada Usia 3, 6, dan 9 dpf**

Usia	3 dpf					6 dpf					9 dpf				
	Kawijaya	R	RAF50	RAF70	RAF100	K	R	RAF50	RAF70	RAF100	K	R	RAF50	RAF70	RAF100
<b>Mean (bpm)</b>	185.2	207.86	209.06	200.2	220.26	201	216.26	204.73	197.53	235.13	196.66	222.4	195.6	186	224.86
<b>±</b>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
<b>SD</b>	17.51	12.39	12.02	11.86	9.72	9.28	7.94	11.44	10.37	7.34	8.04	7.36	6.71	5.75	14.55



**Gambar 5.4** Rerata Frekuensi Detak Jantung pada Larva *Zebrafish* Usia 3, 6, dan 9 dpf

Tabel 5.3 dan histogram pada gambar 5.4 menunjukkan perbedaan rata-rata frekuensi detak jantung antara kelompok kontrol, kelompok rotenon, dan kelompok rotenon asam folat (RAF50, RAF70, RAF100). Hasil menunjukkan bahwa pada usia 3 dpf, 6 dpf, dan 9 dpf, frekuensi detak jantung pada kelompok rotenon secara signifikan lebih tinggi daripada kelompok kontrol (sig. 0.00;  $p=0.05$ ). Pada kelompok RAF 50 dan RAF 70, pemberian asam folat mampu menurunkan frekuensi detak jantung pada larva *zebrafish*, dan hasil terbaik ada pada kelompok RAF 70 dengan konsentrasi asam folat 70  $\mu\text{M}$ . Hasil uji statistik menunjukkan kelompok RAF 50 dan RAF 70 berbeda signifikan dengan kelompok rotenon pada usia 6 dan 9 dpf (sig.  $<0.05$ ;  $p=0.05$ ). Pada kelompok RAF 50 dan RAF 70, frekuensi detak jantung menurun sampai mencapai rata-rata frekuensi detak jantung kelompok kontrol pada usia 6 dan

9 dpf. Sedangkan pada kelompok RAF 100, pemberian asam folat 100  $\mu\text{M}$  meningkatkan frekuensi detak jantung. Rata-rata frekuensi detak jantung pada kelompok RAF 100 pada larva zebrafish usia 3, 6, dan 9 dpf ini lebih tinggi dari kelompok rotenon. Dengan demikian, dapat dikatakan pemberian asam folat konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  tidak memberikan efek koreksi untuk menurunkan frekuensi detak jantung melainkan meningkatkan frekuensi detak jantung.



## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

##### 6.1.1 Pengaruh Pemberian Rotenon terhadap Panjang Badan

Panjang badan merupakan parameter yang digunakan untuk penentuan larva *zebrafish* model *stunting* pada penelitian ini. Pengukuran panjang badan pada penelitian ini dilakukan pada larva usia 3, 6, dan 9 dpf. Berdasarkan hasil penelitian pada tabel 5.1 dan gambar 5.2, panjang badan kelompok rotenon larva *zebrafish* usia 3 dpf yang analog dengan bayi baru lahir (Sorribes *et al.*, 2013) memiliki perbedaan yang signifikan (sig. 0.00;  $p=0.05$ ) dengan kelompok kontrol tetapi perbedaan rata-rata panjang badan tidak mencapai > 2 standar deviasi. Sedangkan pada kelompok rotenon usia 6 dan 9 dpf yang analog dengan anak usia 2 dan 8 tahun (Sorribes *et al.*, 2013), terdapat perbedaan yang signifikan (sig. 0.00;  $p=0.05$ ) dan perbedaan rata-rata panjang badan mencapai > 2 standar deviasi. Hasil tersebut sesuai dengan teori *stunting* yang menyebutkan bahwa anak yang mengalami *stunting* akan lahir dengan keadaan normal dan pertumbuhan terhambat baru tampak pada usia 2 tahun yang menggambarkan kegagalan dalam mencapai tinggi badan potensial (Badham & Sweet, 2010). Data hasil penelitian lain menunjukkan bahwa induksi rotenon 12,5 ppb pada embrio *zebrafish* tidak mengubah rasio panjang kepala dan panjang badan. Dapat dikatakan bahwa keseluruhan larva dalam keadaan proporsional dengan rasio panjang badan dibanding panjang kepala 1:5 (Fauziah, 2018). Keadaan ini dapat membedakan *stunting* dengan kretinisme, yaitu pada *stunting* proporsi tubuh tidak mengalami perubahan, sedangkan pada keadaan kretinisme proporsi tubuh mengalami perubahan sehingga tubuh tidak proporsional (Syed, 2015).

Secara umum, *stunting* dapat terjadi karena kondisi malnutrisi dan inflamasi kronik pada awal kehidupan (Predergast *et al.*, 2014). Rotenon merupakan salah satu pestisida alami yang mekanisme kerjanya menyebabkan penghambatan respirasi mitokondria pada kompleks 1 dan dapat meningkatkan produksi ROS (*reactive oxygen species*) (Li *et al.*, 2003). ROS merupakan *signaling molecule* yang berperan penting dalam perkembangan inflamasi. Selain sebagai *signaling molecule*, ROS juga berperan sebagai mediator inflamasi. ROS yang berasal dari mitokondria ini terlibat dalam terjadinya inflamasi kronis (Mittal *et al.*, 2014). ROS yang terbentuk dapat berinteraksi dengan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid yang salah satu hasil akhirnya adalah *Malondialdehyde* (MDA). MDA merupakan penanda terjadinya stress oksidatif yang mampu menonaktifkan banyak protein seluler. Berdasarkan penelitian Darwitri *et al* (2018), paparan rotenon 12,5 ppb dapat meningkatkan kadar MDA dan menurunkan antioksidan endogen seperti katalase dan *superoxide dismutase* (SOD) secara signifikan.

Penghambatan respirasi mitokondria pada kompleks 1 juga dapat menurunkan produksi ATP (Li *et al.*, 2003). Penurunan produksi ATP yang terjadi dapat mengganggu pelepasan *growth hormone* oleh hipofisis anterior (Vidal & Farquhar, 2013). *Growth hormone* berperan pada pertumbuhan, terutama melalui regulasi sistem *insulin-like growth factor* (IGF). IGF (IGF-1 dan IGF-2) adalah faktor pertumbuhan yang dihasilkan di sebagian besar organ dan jaringan tubuh yang memiliki aktivitas autokrin, parakrin, dan endokrin pada proses metabolisme, proliferasi, pertumbuhan, dan diferensiasi sel (Martinelli *et al.*, 2008). IGF-1 berperan penting untuk menstimulasi fosforilasi *insulin reseptor substrat 1* (IRS-1) yang berfungsi untuk

translokasi *glucose transporter 4* (GLUT-4) dari sitoplasma ke membrane sel yang kemudian akan memfasilitasi transport glukosa ke dalam sel. Pada paparan rotenon, ekspresi IGF-1 dan IRS-1 akan menurun, sehingga translokasi GLUT-4 juga akan berkurang, sehingga transport glukosa akan terganggu (Primaditya, 2017).

Perbedaan rata-rata panjang badan larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon dengan kelompok kontrol serta hasil penelitian sebelumnya mengenai efek rotenone berupa peningkatan ROS, penurunan ATP, *growth hormone*, IGF-1, IRS-1, dan GLUT-4 di atas, dapat dikatakan bahwa pemberian rotenon 12,5 ppb pada embrio *zebrafish* dapat menjadikan larva *zebrafish* sebagai model *stunting* melalui mekanisme malnutrisi dan inflamasi kronik.

**6.1.2 Pengaruh Pemberian Asam Folat terhadap Panjang Badan Larva *Zebrafish***

Hasil pengukuran rata-rata panjang badan yang terdapat pada tabel 5.2 dan gambar 5.3 menunjukkan bahwa pemberian asam folat dapat memperbaiki panjang badan larva *zebrafish* model *stunting*. Berdasarkan uji statistik, pada usia 3, 6, dan 9 dpf kelompok asam folat dengan konsentrasi 50, 70, dan 100 µM memiliki panjang badan yang lebih tinggi dan berbeda secara signifikan jika dibandingkan dengan kelompok rotenon. Secara umum, dapat dikatakan bahwa pemberian asam folat dapat memperbaiki panjang badan larva *zebrafish* model *stunting*.

Asam folat merupakan salah satu mikronutrien yang dibutuhkan oleh tubuh. Asam folat diperlukan untuk replikasi DNA dan sebagai substrat untuk berbagai reaksi enzimatik dalam sintesis asam amino dan metabolisme vitamin. Kebutuhan asam folat akan meningkat selama kehamilan karena diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan janin (Greenberg *et al.*, 2011). Kekurangan asam folat dapat

berkontribusi dalam terjadinya pertumbuhan yang kurang optimal dan peningkatan morbiditas (Lifshitz, 2009; Christian & Stewart, 2010)

Beberapa penelitian membuktikan bahwa asam folat memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan dapat menangkal radikal bebas. Aktivitas antioksidan terjadi karena asam folat mampu bereaksi dengan ROS yang dihasilkan oleh tubuh dan melindungi membrane lipid dari oksidasi (Cano *et al.*, 2000; Joshi *et al.*, 2000; Swiglo, 2007).

Penelitian Aghamohammadi *et al* (2011) mengatakan bahwa pemberian suplementasi asam folat pada pasien diabetes tipe 2 mampu meningkatkan serum *total antioxidant capacity* (TAC) dan menurunkan MDA yang merupakan penanda adanya stress oksidatif. Asam folat juga berperan penting dalam mengontrol kadar homosistein dalam tubuh, jika terjadi metabolisme homosistein yang abnormal dan kadar homosistein meningkat akan terjadinya kerusakan oksidatif dan meningkatkan produksi *hydrogen peroxide* (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), serta mempengaruhi sistem pertahanan antioksidan (Lee *et al.*, 2011). Aktivitas asam folat ini yang kemungkinan berperan dalam memperbaiki panjang badan pada larva *zebrafish* model *stunting* yang diinduksi rotenon.

Kelompok yang diinduksi rotenon mengalami peningkatan produksi ROS karena adanya penghambatan pada kompleks I mitokondria. Dengan pemberian asam folat, ROS yang diproduksi dapat ditangkal sehingga kerusakan yang dihasilkan oleh ROS dapat berkurang. Pada konsentrasi asam folat 50, 70, dan 100 µM, rata-rata panjang badan larva pada usia 9 dpf mampu mendekati rata-rata kelompok kontrol. Dengan kata lain, pemberian asam folat konsentrasi 50, 70, dan 100 µM belum mampu menormalkan dan mencapai rata-rata tinggi badan kelompok kontrol.

### 6.1.3 Pengaruh Pemberian Rotenon terhadap Frekuensi Detak Jantung Larva Zebrafish

Hasil penelitian pada tabel 5.3 dan gambar 5.5 menunjukkan rata-rata frekuensi detak jantung kelompok rotenon lebih tinggi dari kelompok kontrol. Uji statistik mengatakan bahwa pemberian rotenon dapat meningkatkan frekuensi detak jantung secara signifikan ( $p=0,00$ ) pada usia 3, 6, dan 9 dpf. Rotenon merupakan pestisida alami yang mekanisme kerjanya melalui penghambatan kompleks I mitokondria yang akan meningkatkan produksi ROS yang akan menimbulkan berbagai efek dalam tubuh. Pada sistem saraf autonom, ROS dapat menstimulasi sistem saraf simpatis (SNS) sentral dan perifer. Stimulasi SNS ini dikarenakan kadar ROS yang meningkat akan meningkatkan oksidasi atau inaktivasi *nitric oxide* (NO) yang berperan dalam memberikan penghambatan aktivitas SNS sentral (Campese *et al.*, 2003). NO dihasilkan oleh sel endotel vaskular dan akan berdifusi ke dalam sel otot polos untuk mengaktifkan guanylyl cyclase dan mengkatalisis defosforilasi guanosine-5'-triphosphate (GTP) menjadi cyclic guanosine monophosphate (cGMP). cGMP merupakan *second messenger* untuk memberi sinyal relaksasi otot polos melalui aktivasi protein kinase G (PKG) yang akan menghambat masuknya kalsium ke dalam sel, sehingga konsentrasi kalsium intraseluler berkurang. Berkurangnya kalsium intraseluler akan menyebabkan relaksasi otot polos (Klabunde, 2012)

ROS berupa *superoxide* ( $O_2^{\cdot-}$ ) akan bereaksi dengan NO menghasilkan *peroxynitrite* (ONOO<sup>-</sup>). Pada keadaan biologis, reaksi ini tetap terjadi bahkan dengan adanya SOD karena reaksi ini terjadi sangat cepat. Secara normal *peroxynitrite* ini akan dimodulasi oleh mekanisme antioksidan endogen dan dinetralkan oleh senyawa sintesis dengan kapasitas menangkal *peroxynitrite*. Jika produksi *peroxynitrite* ini

berlebihan hingga tidak mampu dimodulasi dan dinetralkan, *peroxynitrite* dapat menginduksi kerusakan oksidatif pada DNA, lipid, dan protein dalam sel vaskular dan menghasilkan disfungsi endothelial (Radi, 2013). Oleh karena itu, oksidasi NO oleh  $O_2\cdot$  menyebabkan berkurangnya ketersediaan NO dapat mengurangi penghambatan aktivitas SNS sehingga menyebabkan aktivasi SNS (Danson & Paterson, 2006). Stimulasi SNS akan menyebabkan berbagai perubahan pada organ-organ tubuh, salah satunya jantung. Aktivasi SNS akan menyebabkan peningkatan frekuensi detak jantung (Gordan *et al.*, 2015).

**6.1.4 Pengaruh Pemberian Asam Folat terhadap Frekuensi Detak Jantung Larva *Zebrafish***

Tabel 5.3 dan gambar 5.5 menunjukkan bahwa kelompok yang diberi asam folat konsentrasi 50 dan 70  $\mu$ m memiliki rata-rata frekuensi detak jantung yang lebih rendah dan berbeda secara signifikan jika dibandingkan dengan kelompok rotenon pada usia 3, 6, dan 9 dpf. Sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian asam folat konsentrasi 50 dan 70  $\mu$ m dapat menurunkan frekuensi detak jantung pada larva *zebrafish* model *stunting* yang diinduksi rotenon.

Asam folat yang berasal dari suplementasi saat masuk ke dalam tubuh akan mengalami metabolisme yang produk akhirnya berupa *5-Methyl tetrahydrofolate* (5-MTHF). 5-MTHF berkontribusi dalam meningkatkan fungsi endotel dengan meningkatkan bioavailabilitas NO di dalam endotelium vaskular. Terdapat dua kemungkinan mekanisme 5-MTHF dalam meningkatkan bioavailabilitas NO, yaitu (1) menstabilisasi *tetrahydrobiopteri* ( $BH_4$ ) yang merupakan kofaktor *nitric oxide synthase* (NOS) sehingga NOS tetap dalam konformasi berpasangan dan dapat mensintesis NO, (2) secara langsung menangkal ROS sehingga ROS tidak bereaksi dengan NO

dan menghasilkan peroxynitrite, dengan begitu ketersediaan NO tetap terjaga (Stanhewicz & Kenney, 2017). Terjaganya ketersediaan NO dapat menyebabkan hambatan pada aktivitas sistem saraf simpatis melalui aktivasi cGMP yang merupakan *second messenger* untuk sinyal relaksasi otot polos dengan menghambat masuknya kalsium ke dalam sel (Klabunde, 2012)

Penghambatan aktivitas sistem saraf simpatis menimbulkan beberapa efek pada organ tubuh, salah satunya jantung. Hambatan pada sistem saraf simpatis dapat menurunkan frekuensi detak jantung (Gordan *et al.*, 2015). Keadaan yang seimbang antara aktivitas sistem saraf simpatis dan parasimpatis dapat menghasilkan frekuensi detak jantung yang normal, dalam hal ini pemberian asam folat 50 dan 70  $\mu\text{M}$  dapat menurunkan dan menormalkan frekuensi detak jantung larva *zebrafish* model *stunting* yang diinduksi rotenon.

Menurut Swiglo (2007), bentuk tereduksi dari asam folat, yaitu *dihydrofolate* (DHF), *tetrahydrofolate* (THF), dan 5-MTHF memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan asam folat yang belum dimetabolisme. THF dan 5-MTHF merupakan yang paling efektif dalam menangkal peroxynitrite, sedangkan THF juga efektif dalam menghambat terjadinya lipid peroksidasi. Aktivitas ini akan mencegah terjadinya kerusakan oksidatif dan disfungsi endotel yang disebabkan oleh peroxynitrite yang merupakan hasil oksidasi NO dengan  $\text{O}_2^-$ .

Kelompok yang diberi asam folat konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  memiliki rata-rata frekuensi detak jantung yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok rotenon pada usia 3, 6, dan 9 dpf. Di dalam tubuh, asam folat diubah oleh enzim dihydrofolate reductase menjadi DHF yang kemudian akan diubah lagi oleh enzim yang sama

menjadi THF. THF akan mengalami metabolisme oleh enzim *serine hydroxymethyltransferase 1* (SHMT1) menjadi *5,10-methylenetetrahydrofolate* (MeTHF), selanjutnya MeTHF dimetabolisme kembali oleh enzim *methylene tetrahydrofolate reductase* (MTHFR) menjadi bentuk *5-methyltetrahydrofolate* (5-MTHF). Pada manusia, proses tersebut jenuh pada suplementasi asam folat 200-400 µg per hari. Suplementasi di atas batas jenuh ini, menyebabkan enzim-enzim tersebut tidak mampu mereduksi asam folat menjadi bentuk akhir metabolisme asam folat, yaitu 5-MTHF, sehingga *unmetabolized folic acid* (UMFA) akan muncul dalam sirkulasi (Ware, 2008).

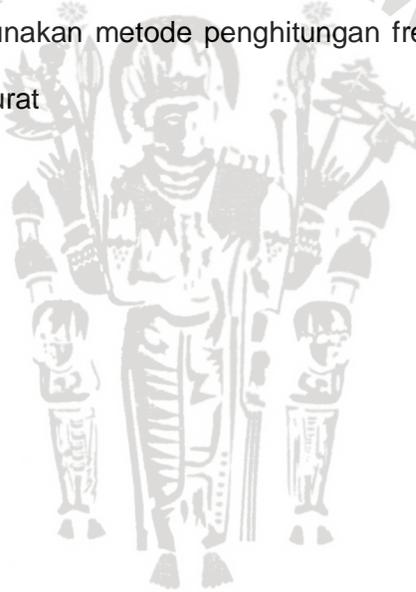
Berdasarkan penelitian Smith *et al* (2017), UMFA yang muncul dalam plasma setelah suplementasi asam folat dapat mengganggu penyerapan 5-MTHF yang merupakan bentuk bioaktif dari folat, di *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC). Mekanisme UMFA dalam menghambat penyerapan 5-MTHF kemungkinan karena inhibisi kompetitif oleh UMFA melalui *proton-coupled folate transporter* (PCFT) yang merupakan reseptor yang memediasi penyerapan 5-MTHF. Penyerapan 5-MTHF yang terganggu dapat menimbulkan efek merusak yang serius termasuk kesalahan penyatuan urasil (misal *deoxyuridine triphosphate*) menjadi DNA serta penghambatan berbagai reaksi metilasi dari DNA, RNA, protein, dan intermediet metabolik. Pada sel endotel, fungsi endotel dan produksi superoksida vaskular dapat terganggu oleh defisiensi 5-MTHF.

Terjadinya *stunting* pada anak dapat meningkatkan resiko seorang anak terkena penyakit metabolik pada saat dewasa, seperti hipertensi, penyakit kardiovaskular, dan diabetes mellitus tipe 2 (Predergast & Humphrey, 2014).

Peningkatan frekuensi detak jantung juga dapat meningkatkan resiko seseorang terkena hipertensi dan penyakit kardiovaskular lainnya (Mishra & Rath, 2011). Oleh karena itu, pemberian asam folat selain dapat mencegah terjadinya *stunting* tetapi juga dapat mengurangi resiko terjadinya hipertensi dan penyakit metabolik lainnya sebagai efek jangka panjang dari *stunting*.

## 6.2 Keterbatasan Penelitian

1. Penelitian ini hanya mengukur parameter klinis, berupa panjang badan dan frekuensi detak jantung tanpa mengukur atau mengamati *biomolecular marker*
2. Penelitian ini menggunakan metode penghitungan frekuensi detak jantung yang kurang efektif dan akurat





## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

1. Asam folat konsentrasi 50, 70, dan 100  $\mu\text{M}$  menghambat terjadinya *stunting* pada larva *zebrafish* usia 6 dan 9 dpf.
2. Asam folat konsentrasi 50 dan 70  $\mu\text{M}$  menurunkan frekuensi detak jantung larva *zebrafish* model *stunting* pada usia 3, 6, dan 9 dpf.
3. Asam folat konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  meningkatkan frekuensi detak jantung larva *zebrafish* model *stunting* pada usia 3, 6, dan 9 dpf.

#### 7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lanjut terkait *biomolecular marker* yang menjelaskan mekanisme asam folat dalam menghambat terjadinya *stunting* dan menurunkan frekuensi detak jantung pada larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon.
2. Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan metode penghitungan frekuensi detak jantung yang kurang efektif dan akurat
3. Perlu dilakukan penelitian lanjut dengan durasi pemberian asam folat yang diperpanjang (lebih dari 72 hpf) untuk melihat efek proteksi dan koreksi yang dihasilkan pada larva *zebrafish* model *stunting*.
4. Perlu dilakukan penelitian lanjut dengan pemberian asam folat yang dilakukan setelah induksi rotenon untuk melihat efek koreksi asam folat yang dihasilkan pada larva *zebrafish* model *stunting*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aghamohammadi V., Gargari B. P., Aliasgharzadeh A., 2011. Effect of Folic Acid Supplementation on Homocysteine , Serum Total Antioxidant Capacity , and Malondialdehyde in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus, 30(3): pp. 210-215.
- Aly G.S., Shaalan A.H., Mattar M.K., Ahmed H.H., Zaki M.E. & Abdallah H.R., 2014. Oxidative Stress Status in Nutritionally Stunted Children, *Egyptian Pediatric Association Gazette*, 62:pp. 28-33.
- Badham, J & Sweet L., 2010. Stunting: an overview, *Sight Life*, 3: pp. 40-47.
- Barreto G. S. C., Vanderlei F. M., Vanderlei L. C. M. & Leite A. J. M., 2016. Impact of Malnutrition on Cardiac Autonomic Modulation in Children, *Jornal de Pediatria*, 92(6): pp. 638-644.
- Benedetti D. F., Alonzi T., Moretta A., Lazzaro D., Costa P., Poli V., *et al.*, 1997. Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. A model for stunted growth in children with chronic inflammation, *Journal of Clinical Investigation*, 99(4): pp. 643-650.
- Campese V. M., Ye S., Zhong H., Yanamadala V., Ye Z., & Chiu J., 2003. Reactive Oxygen Species Stimulate Central and Peripheral Sympathetic Nervous System Activity, *The American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 90033: pp. 695-703.
- Cano M. J., Ayele A., Murillo M. L. & Carreras O., 2001. Protective Effects of Folic Acid Against Oxidative Stress Produced in 21 Day Postpartum Rats by Maternal Ethanol Chronic Consumption During Pregnancy and Lactation Period, *Free Radic Biol Res*, 34: pp. 1-8.
- Caulfield E. L., Richard S. A., Rivera J. A., Musgrove P. & Black R. E., 2006. Stunting, Wasting, and Micronutrient Deficiency Disorders.
- Chen Y., Ward E.M., Kong J., Israels S. J. & 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.
- Christian, P., & Stewart, C. P., 2010. Maternal Micronutrient Deficiency, Fetal Development, and The Risk of Chronic Disease. *Journal of Nutrition*, 140(3), 437-445. DOI: 10.3945/jn.109.116327.

Cory'ah F. A., 2017. Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Panjang Badan, Ekspresi Insulin Like Growth Factor-1 (IGF-1) dan Insulin Reseptor Substrat (IRS) pada Larva Zebrafish (*Danio rerio*) Model Stunting dengan Induksi Rotenon.

Darwitri, Yuliyani T., Nuraenah E., Zahara E., Khotimah H., Kalsum U., *et al.*, 2018. *Centella Asiatica* Increased the Body Length Through the Modulation of Antioxidant in Rotenone-Induced Zebrafish Larvae, *Biomedical & Pharmacology Journal*, 11(2): pp. 827-833.

Danson E. J. F., & Paterson D. J., 2006. Reactive Oxygen Species and Autonomic Regulation of Cardiac Excitability, 16: pp. 104-112.

Diamanti-Kandarakis E, *et al.* 2009. Endocrinedisrupting Chemicals. *An Endocrine Society Scientific Statement. Endocrine Reviews*, 30(4): pp. 293-342.

Dewey K.G. & Begum K., 2011. Long-term Consequences of Stunting in Early Life, *Maternal and Child Nutrition*, 7(Suppl. 3): pp. 5–18.

Dooley K. & Zon L. I., 2000. Zebrafish: a Model System for The Study of Human Disease, *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(3): pp. 252-256.

Fato R., Bergamini C., Bortolus M., Maniero A. L., Leoni S., Ohnishi T., 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.

Fauziah, A. N., 2018. Pengaruh Pemberian Asam Folat terhadap Panjang Badan dan Rasio Panjang Kepala dengan Panjang Badan pada Larva *Zebrafish* Model *Stunting* Dengan Induksi Rotenon. (Belum Publikasi)

Garcia G. R., Noyes P. D. & Tanguay R. L., 2016. Advancements in Zebrafish Applications for 21st Century Toxicology, *Pharmacology and Therapeutics*, 161: pp. 11-21.

Gatt M., Baron Y. M., Lautier E. C. & Miriam N. C., 2002. Folic Acid and Prevention of Birth Defects, *Developmental Medicine & Child Neurology*, 44(6).

Gordan R., Gwathmey J. K., & Richard L. X., 2015. Autonomic and Endocrine Control of Cardiovascular Function, *World Journal of Cardiology*, 7(4): pp. 204-214.

Greenberg J. A., Bell S. J., Guan Y., & Yu Y., 2011. Folic Acid Supplementation and Pregnancy: More Than Just Neural Tube Defect Prevention, *Reviews in Obstetrics and Gynecology*, 4(2): pp. 52–59.

Gupta R. C. & Milatovic D., 2014. Biomarkers in Toxicology. San Diego: USA, Elsevier Inc.

Hernandez P. P & Allende M. L., 2008. Zebrafish ( Danio rerio ) as a Model for Studying The Genetic Basis of Copper Toxicity, Deficiency, and Metabolism, *American Journal of Clinical Nutrition*, 88: pp. 835S-839S.

Integrated Taxonomic Information System, 2017. ([https://www.its.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=163699#null](https://www.its.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=163699#null) Diakses 28 November 2017).

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): pp. 1390-1399.

Kartini A., Suhartono, Subagio H. R., Budiyo, Emman I. M., 2016. Kejadian Stunting dan Kematangan Usia Tulang pada Anak Usia Sekolah Dasar di Daerah Pertanian Kabupaten Brebes, *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 11(2).

Kementrian Kesehatan Indonesia (Kemenkes), 2014. Pedoman Gizi Seimbang, Jakarta: Kementrian Kesehatan RI.

Khotimah H., Sumitro S. B., Ali M & Widodo M. A., 2015. Standardized Centella Asiatica Increased Brain-Derived Neurotrophic Factors and Decreased Apoptosis of Dopaminergic Neuron in Rotenone-Induced Zebrafish, *GSTF Journal of Psychology (JPsych)*, 2(1).

Klabunde, R. E., 2012. Cardiovascular Physiology Concepts. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins/Wolters Kluwer.

Lee S. J., Kang M. K., & Min H., 2011. Folic Acid Supplementation Reduces Oxidative Stress and Hepatic Toxicity in Rats Treated Chronically with Ethanol, 5(6): pp. 520-526.

Li N., Ragheb K., Lawler G., Sturgis J., Rajwa B., Melendez J. A., et al., 2003. Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production, *The Journal of Biological Chemistry*, 278:8516-8525.

Lifshitz F., 2009. Nutrition and Growth Fima, *Journal of Crinical Research in Endocrinology*, 1(4): pp. 157–163.

Ling N., 2003. Rotenone - A Review of Its Toxicity and Use for Fisheries Management, *Science for Conservation*, 211: pp. 1-40.

Lucitt M. B., Price T. S., Pizarro A., Wu W., Yocum A. K., Seiler C., et al., 2008. Analysis of The Zebrafish Proteome during Embryonic Development, *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(5): pp. 981-994.

Martinelli C. E., Custodio R. J., Olivieira M. H. A., 2008. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF, *Arq Bras Endocrinol Metab*, 52(5).

Matthews M., Trevarrow B.& Matthews J., 2002. A Virtual Tour of The Guide for Zebrafish Users, *Lab Animal*, 31(3): pp. 34-40.

MCA 2013, 'Stunting dan Masa Depan Indonesia', pp.2-5.

Meilyasari F. & Isnawati M., 2014. Faktor Resiko Kejadian Stunting pada Balita 12 Bulan di Desa Purwokerto Kecamatan Patebon, Kabupaten Kendal, *Journal of Nutrition College*, 3(2): pp. 16-25.

Mishra, T. K., & Rath P. K., 2011. Pivotal Role of Heart Rate in Health and Disease, *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*, 12(4): pp. 297-302.

Mittal M, Siddiqui M. R., Tran K., Reddy S. P., & Malik A. B., 2014. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury, *Antioxidant & Redox Signaling*, 20(7): pp. 1126-1167.

Ni'mah K., & Nadhiroh S. R., 2015. Faktor yang Berhubungan dengan Kejadian Stunting pada Balita, *Media Gizi Indonesia*, 10(1): pp. 13-19.

Nusslein V. C. & Dahm R., 2002. Zebrafish, Oxford University Press.

Ott K.C., 2006. Rotenone. A Brief Review of its Chemistry, Environmental Fate, and the Toxicity of Rotenone Formulations, *New Mexico Council of Trout Unlimited*.

Parichy D. M., Elizondo M. R., Mills M. G., Gordon T. N. & 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, et al. 2012. Risk Factors for Stunting Among Children: a Community Based Case Control Study in Nepal. *Kathmandu University Medical Journal*, 10(3): pp.18-24.

Penitente A. R., Fernandes L. G., Cardoso L. M., Silva M. E., Pedrosa M. L., Silva A. L., et al., 2007. Malnutrition Enhances Cardiovascular Responses to Chemoreflex Activation in Awake Rats, *Life Sciences*, 81(7): pp. 609-614.

Pramanik D., 2007. Principle of Physiology. Kolkata, Academic Publishers.

Prendergast A.J. & Humphrey J. H., 2014. The Stunting Syndrome in Developing Countries, *Paediatrics and International Child Health*, 34(4): pp. 250-265.

Prendergast A. J., Rukobo S., Chasekwa B., Mutasa K., Ntozini R., Mbuya M. N. N., et al., 2014. Stunting Is Characterized by Chronic Inflammation in Zimbabwean Infants. 9(2).

Prentice A. M., Ward K. A., Golberg G. R., Jarjou L. M., Moore S. E., Fulford A. J. & Prentice A, 2013. Critical Windows for Nutritional Interventions Against Stunting, *American Society for Nutrition*, 97(5): pp. 911-918.

Primaditya V. 2017. Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centela asiatica*) pada Osifikasi Tulang dan Osteoklastogenesis pada Model *Stunting* Larva *Zebrafish* (*Danio rerio*) yang Diinduksi Rotenon. Fakultas Kedokteran Program Studi Magister Kebidanan Universitas Brawijaya.

PubChem, 2017. National Center for Biotechnology Information. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6758> Diakses 1 Desember 2017).

PubChem, 2017. National Center for Biotechnology Information. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6037> Diakses 1 Desember 2017).

Radi R., 2013. Peroxynitrite, a Stealthy Biological Oxidant, *The Journal of Biological Chemistry*, 288(37): pp. 26464-26472.

Rahayu A., Yulidasari F., Putri A. O., & Rahman F., 2015. Riwayat Berat Badan Lahir dengan Kejadian Stunting pada Anak Usia Bawah Dua Tahun, *Kesmas: National Public Health Journal*, 10(2): 67.

Ramsay J. M., Feist G.W., Varga Z. M., Westerfield M., Kent M. L. & Schreck C. B., 2006. Whole-body Cortisol is an Indicator of Crowding Stress in Adult Zebrafish, *Danio rerio*, *Aquaculture*, 258(1-4): pp. 565-574.

Reed B. & Jennings M., 2011. Guidance on The Housing and Care of Zebrafish *Danio rerio*, *Research Animals Department, Science Group, RSPCA*.

Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas), 2013. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan, Republik Indonesia.

Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas), 2018. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan, Republik Indonesia.

Rooyen J. M. V., Kruger H. S., Huisman H. W., Schutte A. E., Malan, N. T., *et al.*, 2005. Early cardiovascular changes in 10- to 15-year-old stunted children : the Transition and Health during Urbanization in South Africa in Children study, *Nutrition*, 21: pp. 808-814

Sanders L. H. & 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.

Sarmah Swapnalee & Marrs James A., 2013. Complex Cardiac Defects After Ethanol Exposure During Discrete Cardiogenic Events in Zebrafish : Prevention with Folic Acid, *Developmental Dynamics*, 242: pp. 1184–1201.

Singleman C. & Holtzman N. G., 2014. Growth and Maturation in the Zebrafish, *Danio Rerio* : A Staging Tool for Teaching and Research, *Zebrafish*, 11(4): pp. 396-406.

Škovierová H., Vidomanová E., Mahmood S., Sopková J., Drgová A., Cerveňová T., *et al.*, 2016. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health, *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10): pp. 1-18.

Smith A. D., Kim Young-In, & Refsum H., 2008. Is folic acid good for everyone? *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(3): pp. 517-533.

Smith D., Homstra J., Rocha M., Jansen G., Assaraf Y., Lasry I., *et al.*, 2017. Folic Acid Impairs the Uptake of 5-Methyltetrahydrofolate in Human Umbilical Vascular Endothelial Cells, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 70(4): pp. 271-275.

Spence R., Gerlach G., Lawrence C. & Smith C., 2008. The Behaviour and Ecology of The Zebrafish, *Danio rerio*, *Biological Reviews*, 83(1): pp. 13-34.

Solini A., Santini E. & 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., Þorsteinsson H., Arnardóttir H., Jóhannesdóttir I. Þ., Sigurgeirsson B., Polavieja G. G., *et al.*, 2013. The Ontogeny of Sleep-Wake Cycles in Zebrafish; a Comparison to Humans, *Frontiers in Neural Circuits*, 7:p 178.

Stanhewicz A. E., & Kenney W. L., 2016. Role of Folic Acid in Nitric Oxide Bioavailability and Vascular Endothelial Function, *Nutrition Reviews*, 75(1): pp. 61-70.

Swiglo A. G., 2007. Foliates as Antioxidants, *Food Chemistry*, 101(4): pp. 1480-1483.

Syed S., 2015. Iodine and the "Near" Eradication of Cretinism, *American Academy of Pediatrics*, 135(4)

Tarim O., 2011. Thyroid Hormones and Growth in Health and Disease, 3(2): pp. 51-55.

Vargesson N., 2007. 'Zebrafish' in Manual of Animal Technology, *Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK*.

Veldman M. B. & Lin S., 2008. Zebrafish as a Developmental Model Organism for Pediatric Research, *Pediatric Research*, 64(5): pp. 470-476.

Vidal A. T., & Farquhar M. G., 2013. Ultrastructure in Biological Systems, Volume 7: The Anterior Pituitary revised edition, *Elsevier*

Ware W. R., 2008. Raising Concerns About Unmetabolized Folic Acid, *Journal of Orthomolecular Medicine*, 23(1): pp. 43-51

WHO, 2010. Nutrition Landscape Information System (NLIS) Country Profile Indicators

WHO, 2015. Stunting in A Nutshell.

WHO, 2012. WHA Global Nutrition Target 2025: Stunting Policy Brief.

Yuniarto A., Sukandar E. Y., Fidrianny I., & Adnyana I. K., 2017. Aplikasi Zebrafish (Danio rerio) pada Beberapa Model Penyakit Eksperimental, *Media Pharmaceutica Indonesiana*, 1(3): pp. 116-126.