

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN
(*Centella asiatica*) PADA MASA PRE SAMPAI DENGAN
POST HATCHING TERHADAP INTERLEUKIN 6,
INTERLEUKIN 10 DAN OSIFIKASI TULANG KERAS
PADA STUNTING LARVA ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



OLEH :

EEN NURAENAH

166070400111002

**PROGRAM STUDI MAGISTER KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

TESIS

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN
(*Centella asiatica*) PADA MASA PRE SAMPAI DENGAN
POST HATCHING TERHADAP INTERLEUKIN 6,
INTERLEUKIN 10 DAN OSIFIKASI TULANG KERAS
PADA STUNTING LARVA ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Oleh :
EEN NURAENAH
166070400111002



Dipertahankan di depan penguji
pada tanggal : 12 Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PENGUJI

Prof. Dr. dr. M. Muljohadi Ali, Sp.FK
NIK 171047692
Ketua

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

dr. Eko Sulistijono, SpA (K)
NIP 197001252006041005
Anggota Penguji

Dr. dr. I Wayan Agung Indrawan, SpOG(K)
NIP 197103232006041019
Anggota Penguji

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis di kutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia tesis ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 Ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 12 Juli 2018

Mahasiswa,



Nama : Een Nuraenah
NIM : 166070400111002
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran UB



Karya Ilmiah ini kutujukan kepada
Ayahanda dan Ibunda tercinta,
Kedua anak-anakku dan suamiku tersayang
M. Atsaal Labiib dan Khaizuraan Zalfaa Rojaani
Kedua adikku yang tersayang
Ida Nurmaida dan Syifa Nurhaliza

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Mu penulis dapat menyajikan tulisan tesis yang berjudul :
“Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) pada Masa Pre Sampai dengan Post Hatching Terhadap Interleukin 6, Interleukin 10 dan Osifikasi Tulang Keras pada *Stunting* Larva Zebrafish (*Danio rerio*)”.

Di dalam tulisan ini disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi *stunting*, rotenon, pegagan (*Centella asiatica*), interleukin 6, interleukin 10, osifikasi tulang keras dan *zebrafish*.

Dengan selesainya tesis ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR, MS selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang periode 2014 – 2018 beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang,
3. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, atas izin yang diberikan selama penulis dapat menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4. Dr. dr. Bambang Rahardjo, SpOG (K) selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
5. Prof. Dr. dr. Moh. Muljohadi Ali, SpFK selaku ketua komisi pembimbing dan Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes selaku anggota pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan masukan selama proses penyusunan tesis ini.
6. dr. Eko Sulistijono, SpA (K) selaku penguji I dan Dr. dr. I Wayan Agung Indrawan, SpOG (K) selaku penguji II yang telah banyak memberikan masukan dan arahan demi kesempurnaan tesis ini.
7. Orang tua, suami dan anak-anakku tercinta yang telah memberikan dukungan motivasi untuk menyelesaikan tesis ini.
8. Tim *stunting* yang telah memberikan semangat untuk menyusun tesis ini.
9. Teman-teman Magister Kebidanan angkatan tahun 2016 yang telah memberikan motivasi dan dukungan untuk menyelesaikan penyusunan tesis ini.
10. Seluruh pihak yang telah membantu mulai awal penyusunan tesis ini sampai terselesaikan.

Dalam penyusunan tesis ini penulis menyadari banyak kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan masukan dari banyak pihak yang bersifat membangun agar tulisan ini lebih sempurna dan bermanfaat untuk banyak pembaca.

Malang, Juli 2018

Penulis

RINGKASAN

Een Nuraenah

Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pada Masa Pre Sampai Dengan Post Hatching Terhadap Interleukin 6, Interleukin 10 dan Osifikasi Tulang Keras Pada Stunting Larva Zebrafish (*Danio rerio*). Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Ketua Komisi Pembimbing : Prof. Dr. Dr. M. Muljohadi Ali, Sp.FK; Anggota : Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes.

Stunting merupakan masalah kesehatan masyarakat yang sulit ditangani mempengaruhi sekitar sepertiga (32%) anak-anak di negara berkembang dan mendasari 14-17% kematian anak di dunia. Penyebab stunting multifaktor, salah satunya adalah adanya paparan pestisida yaitu rotenon. Rotenon terbukti menginduksi stunting larva zebrafish. Rotenon merupakan contoh pestisida yang dapat menyebabkan terjadinya disfungsi mitokondria dengan menghambat kompleks I mitokondria yang berdampak peningkatan ROS, penurunan ATP, kerusakan sel dan jaringan serta apoptosis. Hal ini meningkatkan produksi sitokin proinflamasi antara lain *interleukin 6* (IL-6), penurunan IGF-1, penurunan ekspresi OPG, peningkatan osteoklastogenesis dan RANKL, serta penurunan osifikasi tulang. Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tanaman herbal telah banyak diteliti mengandung bahan bioaktif sebagai antiinflamasi dan antioksidan yang dapat menyeimbangkan peningkatan radikal bebas dan respon imun sitokin proinflamasi.

Tujuan penelitian ini adalah membuktikan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan pada masa pre sampai dengan post hatching dapat menurunkan kadar IL-6, meningkatkan kadar IL-10 dan osifikasi tulang keras pada stunting larva *zebrafish* akibat induksi rotenon.

Metode penelitian ini adalah eksperimen menggunakan model stunting larva zebrafish yang diinduksi rotenon 12,5 ppb. Ekstrak pegagan memproteksi dengan konsentrasi 5 µg/mL yang dibedakan lama pemberiannya yaitu 4, 5 dan 6 hari. Pengamatan panjang badan larva zebrafish usia 3, 4, 5 dan 6 dpf menggunakan *software Image Raster*. Pengukuran kadar IL-6 dan kadar IL-10 dilakukan pada usia 6 dpf dengan ELISA serta osifikasi tulang keras dengan pewarnaan *alizarin red* dihitung nilai *integrated density* disemikuantifikasikan dengan menggunakan *software Image J*.

Hasil penelitian induksi rotenon 12,5 ppb dapat menyebabkan stunting dengan panjang badan kelompok rotenon lebih pendek dari kontrol, namun secara statistik pada usia 3 dpf tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan berbeda halnya pada usia 6 dpf menunjukkan perbedaan secara signifikan dengan selisih panjang badan 0,17 mm ($>2SD=0,16$) pada kelompok rotenon dibanding kelompok kontrol, sehingga larva zebrafish pada usia 6 dpf analog usia anak 2 tahun pada kelompok rotenon mengalami stunting. Pemberian ekstrak etanol pegagan 5µg/mL 4, 5 dan 6 hari secara signifikan dapat mencegah stunting dengan koreksi 99,6%. Perbedaan lamanya pemberian pegagan (4,5 dan 6 hari) secara signifikan mampu menurunkan kadar IL-6 tetapi paling optimal diberikan selama 5 hari. Pemberian pegagan secara signifikan meningkatkan kadar IL-10 dan meningkatkan osifikasi tulang keras pada stunting larva zebrafish. Terdapat signifikansi korelasi negatif yang sangat kuat antara lamanya pemberian ekstrak etanol pegagan dengan kadar IL-6 dan berkorelasi positif kuat terhadap kadar IL-10, osifikasi tulang keras dan panjang badan. Terdapat signifikansi korelasi negatif yang sangat kuat antara panjang badan dengan kadar IL-6, dan berkorelasi positif kuat antara panjang badan dengan kadar IL-10 dan osifikasi tulang keras. Terdapat korelasi negatif kuat antara osifikasi tulang keras dengan kadar IL-6 dan tidak terdapat korelasi yang

signifikan antara osifikasi tulang keras dengan kadar IL-10. Terdapat nilai korelasi negatif kuat antara kadar IL-6 dengan kadar IL-10.

Kesimpulan dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol pegagan 5µg/mL 4, 5 dan 6 hari (pre sampai dengan post hatching) terbukti dapat menurunkan kadar IL-6, meningkatkan kadar IL-10 dan osifikasi tulang keras pada stunting larva zebrafish yang diinduksi rotenon.

SUMMARY

Een Nuraenah

Influence of Ethanol Extract *Centella asiatica* In Period Pre to Post Hatching Against Interleukin 6, Interleukin 10 and Bone Ossification On Stunting Larvae Zebrafish (*Danio rerio*). Master of Midwifery Program of Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. Chairman of Supervisor Commission: Prof. Dr. M. Muljohadi Ali, Sp.FK; Members: Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes.

Stunting is a failure to achieve high potential based on the World Health Organization's (WHO) growth standard is said to be stunting if the height by age of z-score $< -2SD$. The cause of are multifactors stunting, one of which is the presence of pesticide exposure that is rotenon. Rotenon proved to induce stunting of zebrafish larvae. Rotenon is of pesticides that can cause mitochondrial dysfunction by inhibiting complex I mitochondria that caused increased ROS, decreased ATP, cell and tissue damage and apoptosis. This condition can increases the production of proinflammatory cytokines such as interleukin 6 (IL-6), IGF-1 decline, decreased OPG expression, increased osteoclastogenesis and RANKL, and decreased bone ossification. Gotu Kola (*Centella asiatica*) is herb that have bioactive ingredients such as anti-inflammatory and antioxidants that can balance the increase in free radicals and immune responses of proinflammatory cytokines.

The aim of this research was to prove that the effect of ethanol extract of *Centella asiatica* given during pre to post hatching decrease the level of IL-6, increase the level of IL-10 and bone ossification in zebrafish larvae stunting due to by rotenon induction.

The method of this experiment was experiment using stunting model zebrafish larvae rotenone induced 12,5 ppb. Pegagan extracts were given at 5 µg / mL concentrations differentiated for the duration of 4, 5 and 6 days. Observation of zebrafish larvae body length at 3, 4, 5 and 6 dpf using Image Raster software. Measurements of IL-6 and IL-10 levels were performed at 6 dpf with ELISA and bone ossification with alizarin red staining quantified by Image J Software of integrated density.

Show the results of the 12.5 ppb rotenon induced study may cause stunting with a shorter rotenone group length of control, but statistically at age 3 dpf did not show significant differences differently at age 6 dpf showed significant differences with a difference in body length of 0.17 mm ($> 2 SD = 0.16$) in the rotenone group compared to the control group, so the zebrafish larvae at age 6 dpf analogous to 2-year-old children in the rotenone group had stunting. Provision of 5 µg / mL 5 µg / mL atanol extract 4, 5 and 6 days significantly prevented stunting with 99.6% correction. The difference in the duration of pegagan administration (4.5 and 6 days) was significantly reduced in IL-6 but was optimally administered for 5 days. And administration of *Centella asiatica* significantly increased the levels of IL-10 and increased bone ossification in zebrafish larval stunting. It proves that it is an anti-inflammatory and antioxidant compound containing its bioactive compounds (flavonoids, madecassoside, asiaticoside, triterpenoids, saponins) capable of overcoming cellular and tissue damage from free radical induction of rotenone, containing micronutrients (Zn, Phosphorus, Mg) required for growth. There is a strongly strong negative correlation between the duration of ethanol extract of *Centella asiatica* and IL-6 levels and positively correlated strongly with IL-10 levels, bone ossification and body length. There is a strongly strong negative correlation between body length and IL-6 levels, and a strong positive correlation between body length and IL-10 levels and hard bone ossification. There was a strong negative

correlation between hard bone ossification and IL-6 levels and no significant correlation between hard bone ossification and IL-10 levels. There is a strong negative correlation value between IL-6 and IL-10 levels.

The conclusions in this study were the provision of 5 µg / mL 4, 5 and 6 days astringent ethanol extracts (pre to post hatching) proven to decrease the levels of IL-6, increase the levels of IL-10 and hard bone ossification in rotenon-induced zebrafish larvae stunting.

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS.....	iv
HALAMAN PERUNTUKAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
RINGKASAN	viii
SUMMARY	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL.....	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.2.1 Rumusan Masalah Umum	5
1.2.2 Rumusan Masalah Khusus.....	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	7
1.4.2 Manfaat Praktis	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Stunting	9

2.1.1	Pengertian Stunting.....	9
2.1.2	Faktor-faktor Penyebab Stunting.....	12
2.1.3	Patogenesis Stunting.....	15
2.1.4	Dampak Stunting.....	17
2.1.5	Mekanisme Keterlambatan Pertumbuhan Linier.....	17
2.1.6	Hubungan Infeksi, Inflammasi dan Keterlambatan Pertumbuhan Linier.....	18
2.1.7	Upaya Menurunkan Stunting.....	19
2.1.8	Intervensi Gizi Untuk Mengatasi Defisiensi Zat Gizi Makro dan Mikro Pada Ibu dan Anak.....	20
2.2	Interleukin 6 (IL-6).....	20
2.3	Interleukin 10 (IL-10).....	23
2.4	Osifikasi Tulang.....	25
2.4.1	Remodeling Tulang.....	25
2.4.2	Siklus Remodeling Tulang.....	26
2.4.3	Pengaruh Hormon Estrogen Terhadap Osteoklas dan Osteoblas.....	27
2.5	Rotenon.....	29
2.5.1	Gambaran Umum.....	29
2.5.2	Struktur Fisik dan Kimia Rotenon.....	31
2.5.3	Toksisitas Rotenon.....	33
2.5.4	Mekanisme Kerja Rotenon pada Osifikasi Tulang.....	34
2.6	Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	37
2.6.1	Klasifikasi Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	38
2.6.2	Morfologi Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	39
2.6.3	Habitat Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	39
2.6.4	Kandungan Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	40
2.6.5	Manfaat Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	41
2.6.6	Hubungan Manfaat Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) dengan Stunting.....	44
2.6.7	Dosis dan Toksisitas.....	45
2.7	Zebrafish.....	45
2.7.1	Perkembangan Zebrafish.....	47
2.7.2	Faktor Lingkungan yang Mempengaruhi Perkembangan Zebrafish.....	53
2.7.3	Zebrafish Sebagai Model Penelitian.....	54
BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KONSEPTUAL PENELITIAN.....		57
3.1	Kerangka Teori.....	57
3.2	Kerangka Konseptual.....	58
3.3	Hipotesis Penelitian.....	59
BAB 4 METODE PENELITIAN.....		61
4.1	Jenis dan Desain Penelitian.....	61
4.2	Populasi dan Sampel.....	62
4.2.1	Populasi Penelitian.....	62
4.2.2	Sampel Penelitian.....	62
4.3	Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	63
4.4	Tempat dan Waktu Penelitian.....	63
4.5	Variabel Penelitian.....	64
4.6	Definisi Operasional.....	64
4.7	Alat dan Bahan.....	67
4.7.1	Pemeliharaan Zebrafish.....	67



4.7.2	Pembuatan Larutan Medium Embrionik.....	68
4.7.3	Pembuatan Rotenon.....	68
4.7.4	Pembuatan Ekstrak Pegagan.....	68
4.7.5	Pengukuran Osifikasi Tulang.....	69
4.7.6	Pengukuran Ekspresi IL-6 dan IL-10.....	69
4.8	Prosedur Penelitian.....	70
4.8.1	Pemeliharaan <i>Zebrafish</i> (<i>Danio Rerio</i>).....	70
4.8.2	Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio <i>Zebrafish</i>	71
4.8.3	Pembuatan Larutan Embrionik Medium.....	72
4.8.4	Pembuatan Larutan Rotenon Sebagai Bahan Paparan.....	73
4.8.5	Pembuatan Ekstrak Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	74
4.8.6	Pembuatan Larutan Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	75
4.8.7	Pemberian Larutan Rotenon dan Ekstrak Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	76
4.8.8	Pengukuran Panjang Badan (PB) dan Panjang Kepala (PK) Larva <i>Zebrafish</i>	77
4.8.9	Pengukuran dan Pengamatan Osifikasi Tulang Keras.....	78
4.8.10	Pengukuran Kadar IL-6 dan Kadar IL-10.....	79
4.9	Pengumpulan dan Analisa data.....	80
4.9.1	Pengumpulan Data.....	80
4.9.2	Analisis Data.....	80
4.10	Alur penelitian.....	82
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA		83
5.1	Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) Terhadap Kadar IL-6 Larva <i>Zebrafish</i> Usia 6 dpf.....	83
5.2	Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) Terhadap Kadar IL-10 Larva <i>Zebrafish</i> Usia 6 dpf.....	85
5.3	Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) Terhadap Osifikasi Tulang Keras Larva <i>Zebrafish</i> Usia 6 dpf.....	87
5.4	Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) Terhadap Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> Usia 6 dpf.....	90
5.5	Korelasi Antar Variabel Penelitian.....	94
BAB 6 PEMBAHASAN		95
6.1	Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) Terhadap Kadar IL-6 Larva <i>Zebrafish</i> Usia 6 dpf.....	95
6.2	Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) Terhadap Kadar IL-10 Larva <i>Zebrafish</i> Usia 6 dpf.....	97
6.3	Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) Terhadap Osifikasi Tulang Keras Larva <i>Zebrafish</i> Usia 6 dpf.....	98
6.4	Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) Terhadap Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> Usia 6 dpf.....	101
6.5	Korelasi Antara Lamanya Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) Terhadap Kadar IL-6, Kadar IL-10, Osifikasi Tulang Keras dan Panjang Badan.....	104
6.6	Korelasi Antara Kadar IL-6, Kadar IL-10, Osifikasi Tulang Keras Terhadap Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> Usia 6 dpf.....	106
6.7	Korelasi Antara Kadar IL-6 dan Kadar IL-10 Terhadap Osifikasi Tulang Keras Stunting Larva <i>Zebrafish</i> Usia 6 dp.....	107
6.8	Korelasi Kadar IL-6 dan Kadar IL-10.....	108
6.9	Implikasi Hasil Penelitian pada Kebidanan.....	108
6.10	Keterbatasan Penelitian.....	109

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN 110

DAFTAR PUSTAKA 112

LAMPIRAN 127

RIWAYAT HIDUP 168



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Indikator Pertumbuhan Bayi Berdasarkan WHO 12

Tabel 2.2 Kandungan Triterpenoid *Centella asiatica* 40

Tabel 2.3 Kandungan Zat Gizi (Nutrisi) *Centella asiatica* 41

Tabel 2.4 Klasifikasi *Zebrafish* 46

Tabel 2.5 Tahapan Awal Perkembangan *Zebrafish* 49

Tabel 4.1 Definisi Operasional 64

Tabel 5.1 Perbedaan Rerata Panjang Badan Larva *Zebrafish* Usia 3, 4, 5 dan 6 dpf 89

Tabel 5.2 Perbandingan Pertumbuhan Panjang Badan Larva *Zebrafish* Usia 3 dan 6 dpf 91



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Pengukuran Panjang Badan dan Tinggi Badan 9

Gambar 2.2 Grafik Standar Pertumbuhan Berdasarkan TB/U Usia 0-2 Tahun..... 10

Gambar 2.3 Kerangka Konseptual Pertumbuhan dan Perkembangan Stunting Menurut WHO dan Stewart 14

Gambar 2.4 Dampak Jangka Pendek dan Jangka Panjang dari *Stunting* 17

Gambar 2.5 Skema Proses Remodeling Tulang..... 26

Gambar 2.6 Siklus Remodeling Tulang..... 27

Gambar 2.7 *Derris Elliptica* 29

Gambar 2.8 Akar Tuba..... 30

Gambar 2.9 Rumus Bangun Rotenon 31

Gambar 2.10 Ketergantungan Terhadap Osteoblast dalam Diferensiasi Osteoklas..... 37

Gambar 2.11 Perbedaan *Zebrafish* Jantan dan Betina.. 47

Gambar 2.12 Perbedaan Telur *Zebrafish* yang Fertil dan Tidak Fertil..... 48

Gambar 2.13 Siklus Hidup *Zebrafish*..... 49

Gambar 2.14 Larva *Zebrafish* dan *Zebrafish* Dewasa..... 52

Gambar 2.15 Ciri-ciri *Zebrafish*..... 56

Gambar 3.1 Kerangka Teori 57

Gambar 3.2 Kerangka Konsep..... 58

Gambar 4.1 Pemilihan Telur yang Fertil dan Tidak Fertil 72

Gambar 5.1 Perbandingan Rerata Kadar IL-6 Larva *Zebrafish* Usia 6 dpf 84

Gambar 5.2 Perbandingan Rerata Kadar IL-10 Larva *Zebrafish* Usia 6 dpf 85

Gambar 5.3 Osifikasi Tulang Keras Larva *Zebrafish* Usia 6 dpf 87

Gambar 5.4 Perbedaan *Integrated Density* Osifikasi Tulang Keras Larva *Zebrafish* Usia 6 dpf 88

Gambar 5.5 Perbedaan Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish Hari Ke-3, 4, 5 dan 6 90

Gambar 5.6 Perbandingan Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish Usia 3 dan 6 dpf 92

Gambar 5.7 Korelasi Antar Variabel Penelitian 93



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Kelaikan Etik	127
Lampiran 2 Determinasi Tanaman Pegagan	128
Lampiran 3 Hasil Analisa Zebrafish	129
Lampiran 4 Hasil Analisis Statistik	130
Lampiran 5 Cara Penggunaan Aplikasi Image Raster	142
Lampiran 6 Cara Penggunaan Aplikasi Image J	144
Lampiran 7 Dokumentasi Penelitian	148
Lampiran 8 Prosedur Pewarnaan Alizarin Red	157
Lampiran 9 Prosedur Pembuatan Ekstrak Pegagan	158
Lampiran 10 Prosedur Pemeriksaan ELISA	159
Lampiran 11 Surat Keterangan Accepted Jurnal	160
Lampiran 12 Surat Bebas Plagiasi	161
Lampiran 13 Keterangan Submitt Jurnal	162
Lampiran 14 Surat Perijinan Penelitian	163
Lampiran 15 Data Hasil penelitian	164

DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL

- ARF : Aktifasi Resorpsi Formasi
- ASI : Air Susu Ibu
- ATP : *Adenosine Triphosphatase*
- Baduta : Bawah Dua Tahun
- Balita : Bawah Lima Tahun
- BDNF : *Brain Derived Neurotropic Factor*
- BMP : *Bone Morphogenetic Proteins*
- Ca : Kalsium
- CNTF : *Ciliary Neurotropic Factor*
- CRP : *C-Reactive Protein*
- CTPS : Cuci Tangan Pake Sabun
- Dpf : *Day Post Fertilization*
- DMSO : Dimetil Sulfoksida
- EDCs : *Endocrine Disrupting Chemicals*
- EGP : *Epiphyseal Growth Plate*
- ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- ERK : *Extracelluler Signal-Regulated Kinases*
- ESTs : *Expressed Sequence Tags*
- FGF : *Fibroblast Growth Factor*
- FGFR : *Fibroblast Growth Factor Receptor*
- GF : *Growth Factor*
- GH : *Growth Hormon*
- GLU-1 : *Glucose Transforter 1*
- GLUT-4 : *Glucose Transforter 4*



Hpf : *Hour Post Fertilization*

HAZ : *Height For Age (Z-score)*

HPK : *Hari Pertama Kehidupan*

IGF-1 : *Insulin Growth Factor-1*

IL-1 : *Interleukin 1*

IL-6 : *Interleukin 6*

IL-8 : *Interleukin 8*

IL-10 : *Interleukin 10*

IMD : *Inisiasi Menyusui Dini*

KEK : *Kekurangan Energi Kronis*

Kemenkes : *Kementrian Kesehatan*

LIF : *Leukemia Inhibitory Factor*

MDI : *Mental Development Index*

Mg : *Magnesium*

MGRS : *Multicentre Growth Reference Study*

MGSO₄ : *Magnesium Sulfat*

mRNA : *Messenger Ribonukleat Acid*

MP-ASI : *Makanan Pendamping-ASI*

Mg/ml : *Milligram per Milliliter*

Mm : *Milimeter*

NaCl : *Natrium Clorida*

NO : *Nitric Oxide*

OPG : *Osteoprotegrin*

OSM : *Oncostatin M*

P : *Phospor*

PB/U : *Panjang Badan Menurut Umur*

PDI : *Psychomotor Development Index*

PFA	: Paraformaldehyde
PHBS	: Perilaku Hidup Bersih dan Sehat
PLVN	: Pansen Ventrikel Kiri Nekrosis
ppb	: Part Per Billion
PTH	: Paratiroid
RANK	: Receptor Activator Nuclear Kappa- β
RANKL	: Receptor Activator Nuclear Kappa- β Ligan
RI	: Republik Indonesia
Riskesdas	: Riset Kesehatan Dasar
ROS	: Reactive Oxygen Spesies
RPJMN	: Rencana Pembangunan Jangka Menengah Nasional
SD	: Standart Deviasi
SL	: Standart Length
TB	: Tinggi Badan
TB/U	: Tinggi Badan Menurut Umur
TGF	: Transforming Growth Factor
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TNF- α	: Tumor Necrosis Factor- α
VEGF	: Vascular Endotelial Growth Factor
VEGFR-2	: Vascular Endotelial Growth Factor Receptor-2
WHO	: World Health Organization
Zn	: Zinc
$\mu\text{g/ml}$: Microgram Per Milliliter



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Golden (2009) mendefinisikan *stunting* adalah gambaran kegagalan mencapai potensi untuk tinggi, sedangkan berdasarkan standar pertumbuhan *World Health Organization* (WHO) ditetapkan *stunting* bila tinggi badan menurut umur nilai z-scorenya dibawah minus 2 standar deviasi (-2 SD) (Steyn & Temple, 2008).

Stunting merupakan masalah kesehatan masyarakat yang sulit ditangani mempengaruhi sekitar sepertiga (32%) anak-anak di negara berkembang dan memiliki dampak besar pada kesehatan anak serta pembangunan kesehatan.

Stunting mendasari 14-17% kematian anak di seluruh dunia (El-Maksoud *et al.*, 2017). Kejadian *stunting* di Asia Tenggara sebesar 25% (14 juta) pada tahun 2015 terbesar ke-3 di Asia setelah Asia Selatan dan Asia Tengah (WHO, 2017).

Sedangkan kejadian *stunting* di Indonesia terbesar ke-5 di dunia. Prevalensi *stunting* meningkat di tahun 2013 yaitu 37,2% dari 35,6% tahun 2010 dan 36,8% tahun 2007. Prevalensi *stunting* ini, se-Asia Tenggara Indonesia paling tinggi kemudian diikuti Myanmar (35%), Vietnam (23%) dan Thailand (16%). Terdapat 3 provinsi tertinggi kejadian *stunting* di Indonesia yakni Provinsi Nusa Tenggara Timur sebesar 51,7%, Sulawesi Barat sebesar 48% dan Nusa Tenggara Barat sebesar 45,3% (Riskesmas, 2013)

Dalam upaya mengatasi *stunting* WHO menargetkan penurunan anak *stunting* sebesar 40% pada tahun 2025 yaitu 165 juta anak *stunting* tahun 2012 menjadi 100 juta pada tahun 2025. Sedangkan di Indonesia, Rencana Pembangunan Jangka Menengah Nasional (RPJMN) kurun waktu 2015 – 2019

yaitu menurunkan *stunting* pada balita sebesar 28% melalui program peningkatan status gizi masyarakat (Kemenkes RI, 2016).

Risiko *stunting* terjadi pada anak usia 6-11 bulan 1,59 kali dan usia anak 12-23 bulan 2,18 kali dibanding anak usia 0-5 bulan. Periode 1000 Hari Pertama Kehidupan (HPK) disebut sebagai "periode emas" / "periode kritis" yang menentukan kualitas kehidupan (Hayati *et al.*, 2012). Dampak jangka pendek dari masalah gizi buruk pada periode kritis meliputi gangguan pertumbuhan fisik serta metabolisme tubuh, perkembangan otak dan tingkat kecerdasan.

Sedangkan dampak jangka panjang yaitu berkurangnya perkembangan kognitif dan prestasi belajar, sistem imun menurun, berisiko tinggi menderita diabetes, obesitas, kanker, penyakit jantung dan pembuluh darah, stroke, keterbatasan diri di usia tua, kinerja nonkompetitif yang berpengaruh terhadap menurunnya produktivitas ekonomi (Kemenkes RI, 2016).

Fokus utama upaya perbaikan/intervensi gizi khusus (spesifik) mengatasi balita *stunting* ditujukan pada kelompok ibu hamil, ibu menetek, baduta (Balita dua tahun) atau anak usia 0-23 bulan yang disebut dengan kelompok 1000 HPK, karena pada periode kritis atau 1000 HPK merupakan penanganan *stunting* yang paling efektif. Upaya intervensi pemerintah untuk mencegah *stunting* meliputi memberikan makanan tambahan kepada ibu hamil dengan Kurang Energi Kronis (KEK), pemberian zat besi (Fe) sekurang-kurangnya 90 tablet selama kehamilan, pertolongan persalinan oleh bidan atau dokter, dan penerapan Inisiasi Menyusui Dini (IMD), pelaksanaan ASI Eksklusif oleh ibu menyusui, pemberian Makanan Pendamping ASI (MP ASI) sesuai waktunya yaitu bayi dimulai usia 6 bulan, pemberian ASI pada bayi dilakukan berkelanjutan sampai usia 2 tahun atau lebih, bayi dan balita mendapatkan kapsul Vitamin A 2x setahun (Februari dan Agustus) serta imunisasi dasar lengkap (Kemenkes RI, 2016).

Etiologi *stunting* bersifat kompleks dan multifaktoral, yang paling utama yaitu faktor genetik dan lingkungan (Dewey & Huffman, 2009; Victora *et al.*, 2010). Paparan pestisida salah satu contoh dari etiologi faktor lingkungan yang mempengaruhi kejadian *Stunting* (Paudel, 2012; Prendergast & Humprey, 2014). Rotenon merupakan salah satu model jenis pestisida alami (Abdollahi *et al.*, 2004) mampu menginduksi *stunting* pada larva zebrafish (Primihastuti *et al.*, 2017) dengan menghambat kompleks I mitokondria sehingga berdampak terjadinya stress oksidatif melalui peningkatan ROS (*reactive oksigen spesies*), penurunan *Adenosine Triphosphatase* (ATP) dan kematian sel (Sherer, 2003).

Peningkatan ROS dan gangguan produksi ATP mengakibatkan kerusakan jaringan dan meningkatkan produksi sitokin proinflamasi yaitu *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), *interleukin 1 β* (IL-1 β) dan *interleukin 6* (IL-6) (Luo *et al.*, 2015). Menurunnya atau disfungsi *Insulin Growth Factor-1* (IGF-1) merupakan salah satu efek peningkatan sitokin IL-6, IGF-1 sebagai mediator hormon pertumbuhan yang berperan dalam proliferasi dan diferensiasi osteoblas pada proses remodeling tulang (Chen *et al.*, 2004; Asahina *et al.*, 2007). Proses remodeling tulang tidak terlepas dari osteoklas dan osteoblas. Osteoklas berperan dalam resorpsi tulang lama sedangkan osteoblas berperan dalam pembentukan formasi tulang baru (Sihombing *et al.*, 2012). Sitokin yang meningkatkan kerja osteoklas adalah IL-6. Pada penelitian terdahulu telah dibuktikan bahwa rotenon menyebabkan penurunan IGF-1 (Cory'ah *et al.*, 2017), penurunan osifikasi tulang serta peningkatan *Receptor Activator Nuclear Kappa- β Ligan* (RANKL) (Primihastuti *et al.*, 2017) dan penurunan ekspresi *Osteoprotegrin* (OPG) (Ariati *et al.*, 2017).

Kondisi *stunting* karena adanya proses inflamasi menggambarkan bahwa status gizi anak-anak *stunting* di Mesir terdapat gambaran penurunan kadar serum Zn, Ca dan Mg serta adanya peningkatan kadar serum sitokin proinflamasi

IL-6, TNF- α dan C-Reactive Protein (CRP) (El-Maksoud *et al.*, 2017). Sedangkan studi penelitian anak-anak *stunting* karena menderita penyakit infeksi menggambarkan sistem imunologi dari TNF- α dan IL-6 pada anak yang terinfeksi sebagian besar lebih tinggi dibandingkan pada anak dengan status gizi baik (Rytter *et al.*, 2014)

Upaya preventif *stunting* dapat diketahui dari faktor penyebabnya antara lain faktor malnutrisi dan faktor inflammasi. Pegagan selain mengandung zat gizi mikro dan makro, mengandung pula zat bioaktif seperti *triterpenoid* dan *flavonoid* yang mempunyai efek sebagai antioksidan dan antiinflammasi yang mampu mencegah stress oksidatif serta membersihkan radikal bebas (Hanum *et al.*, 2015). Sebagai antiinflammasi, kandungan *asiaticoside* dan *madecasic acid* dalam pegagan mampu menurunkan produksi TNF- α , IL-6, PGE2 dan ekspresi COX-2 dan terjadi peningkatan IL-10 (Li *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008). Berdasarkan hasil penelitian Primihastuti *et al.* (2017) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak pegagan 2,5 $\mu\text{g/ml}$ dan 5 $\mu\text{g/ml}$ pada embrio *zebrafish* usia 2 hpf - 3 dpf (masa intrauterin) terbukti dapat meningkatkan panjang badan dan meningkatkan osifikasi tulang pada model *stunting* larva *zebrafish* yang dipapar rotenon 12,5 ppb, namun upaya preventif ini belum mampu mengoreksi sampai 100% kembali seperti ukuran normal. Dengan demikian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut upaya memperbaiki kondisi *stunting* sampai dengan usia postnatal (extrauterin).

Zebrafish dipilih sebagai model penelitian, karena *zebrafish* memiliki keunggulan utama dapat memberikan informasi genetik yang mirip dengan manusia sebesar 70%, sehingga hasil-hasil penemuan dari penelitian dengan model *zebrafish* kemungkinan besar dapat diaplikasikan pada manusia (Santoriello & Zon, 2012; Astuti, 2013). Adapun keuntungan lain seperti memerlukan biaya yang terjangkau, perawatan mudah, tidak memerlukan tempat yang luas, tingkat reproduksi tinggi, mudah dalam pengamatan karena kulit

transparan, perkembangan embrio di luar uterus dan perkembangan *zebrafish* sangat cepat tidak membutuhkan waktu yang lama (Richard, 2011; Astuti, 2013; Yuniarto *et al.*, 2017. Berdasarkan hal-hal tersebut peneliti merasa tertarik ingin membuktikan bagaimanakah pengaruh lamanya pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) selama masa pre sampai dengan post hatching terhadap proses inflamasi melalui IL-6, IL-10 dan ekspresi osifikasi tulang keras pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum :

Secara umum rumusan masalah penelitian yaitu “Apakah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan pada masa pre sampai dengan post hatching dapat menyebabkan penurunan IL-6, peningkatan IL-10, dan peningkatan ekspresi osifikasi tulang keras pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon?”

1.2.2 Rumusan Masalah Khusus

Adapun secara khusus perumusan masalah penelitian dijabarkan sebagai berikut :

1. Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan selama pre sampai dengan post hatching menurunkan kadar IL-6 pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon?
2. Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan selama pre sampai dengan post hatching meningkatkan kadar IL-10 pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon?
3. Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan selama pre sampai dengan post hatching meningkatkan osifikasi tulang keras pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon?

4. Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan selama pre sampai dengan post hatching meningkatkan panjang badan pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon?
5. Apakah terdapat korelasi antara lamanya pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) konsentrasi 5,0 µg/mL yang diberikan selama masa pre sampai dengan post hatching dengan kadar IL-6, kadar IL-10, ekspresi osifikasi tulang keras dan peningkatan panjang badan?
6. Apakah terdapat korelasi antara peningkatan panjang badan dengan kadar IL-6, kadar IL-10 dan ekspresi osifikasi tulang keras?
7. Apakah terdapat korelasi antara osifikasi tulang keras dengan kadar IL-6, kadar IL-10?
8. Apakah terdapat korelasi antara kadar IL-6 dengan kadar IL-10?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan ingin membuktikan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan pada masa pre sampai dengan post hatching dapat mempengaruhi penurunan IL-6, peningkatan IL-10 dan peningkatan ekspresi osifikasi tulang keras pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan pemberian ekstrak etanol pegagan selama pre sampai dengan post hatching menurunkan kadar IL-6 pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon.
2. Membuktikan pemberian ekstrak etanol pegagan selama pre sampai dengan post hatching meningkatkan kadar IL-10 pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon.

3. Membuktikan pemberian ekstrak etanol pegagan selama pre sampai dengan post hatching meningkatkan osifikasi tulang keras pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon.
4. Membuktikan pemberian ekstrak etanol pegagan selama pre sampai dengan post hatching meningkatkan panjang badan pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon.
5. Membuktikan adanya korelasi antara lamanya pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) konsentrasi 5,0 µg/mL yang diberikan selama masa pre sampai dengan post hatching dengan kadar IL-6, kadar IL-10, ekspresi osifikasi tulang keras dan peningkatan panjang badan.
6. Membuktikan adanya korelasi antara peningkatan panjang badan dengan kadar IL-6, kadar IL-10 dan ekspresi osifikasi tulang keras.
7. Membuktikan adanya korelasi antara osifikasi tulang keras dengan kadar IL-6, kadar IL-10.
8. Membuktikan adanya korelasi antara kadar IL-6 dengan kadar IL-10.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Dapat digunakan untuk mengetahui pertumbuhan dan perkembangan model *zebrafish stunting* sampai usia 6 dpf akibat induksi rotenon sebagai salah satu contoh pestisida.
2. Dapat digunakan untuk menjelaskan pengaruh pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dalam memperbaiki kondisi *stunting* melalui penurunan kadar IL-6, peningkatan kadar IL-10 dan peningkatan osifikasi tulang keras.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Memberikan acuan tentang pentingnya upaya preventif terhadap kejadian *stunting* melalui pemenuhan nutrisi atau gizi yang baik mulai dari prahamil, hamil dan pasca melahirkan.
2. Memberikan gambaran pentingnya upaya preventif dengan meningkatkan antioksidan tubuh terhadap paparan pestisida selama prahamil, hamil dan pasca melahirkan.



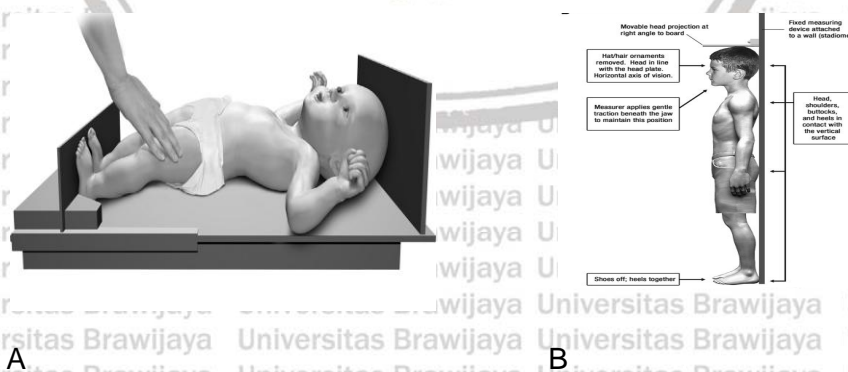
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Stunting*

2.1.1 Pengertian *Stunting*

Balita dengan indeks panjang badan atau tinggi badan berdasarkan umur (PB/U atau TB/U) dikatakan *stunting* jika dibawah standar normal. Sedangkan balita dengan status gizi mengacu ke standar baku WHO dikategorikan *stunting* apabila PB/U atau TB/U mempunyai nilai z-score < -2 SD (Standar Deviasi) (Kemenkes RI, 2016).

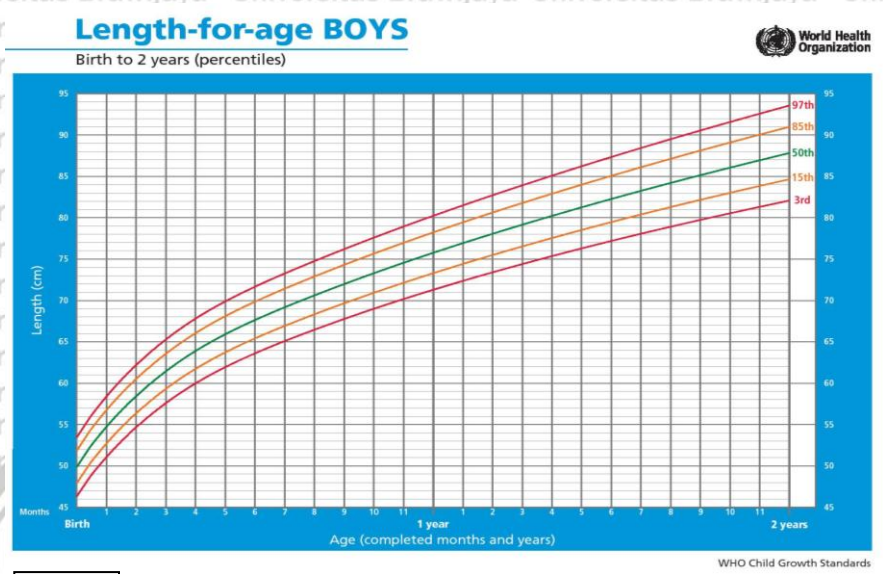
Untuk mengetahui status gizi anak berdasarkan ketentuan PB/U, maka langkah pertama yang dilakukan adalah mengukur panjang/tinggi badan (PB/TB). Parameter panjang badan digunakan untuk mengukur pertumbuhan fisik linier pada anak umur 0-24 bulan dengan posisi berbaring bagi anak yang belum bisa berdiri, sedangkan parameter tinggi badan (TB) digunakan untuk mengukur pertumbuhan linier pada anak umur > 2 tahun dengan posisi berdiri bagi anak yang mampu berdiri sendiri tanpa bantuan (WHO, 2006). Adapun tehnik pengukuran PB dan TB dapat dilakukan seperti gambar dibawah ini :



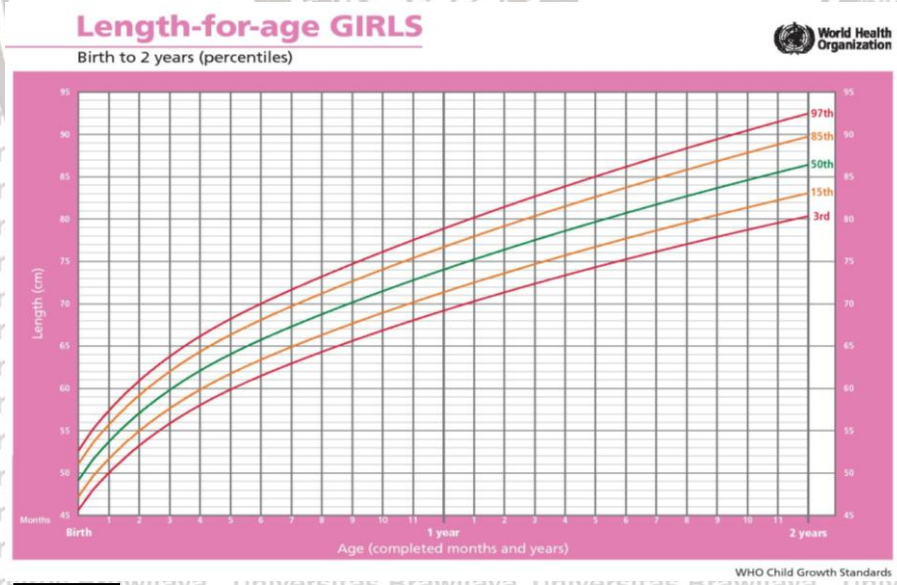
Gambar 2.1 Pengukuran panjang badan dan tinggi badan

Keterangan : (A) Cara pengukuran panjang badan bayi umur 0-24 bulan dengan posisi berbaring dan kaki lurus
(B) Cara pengukuran tinggi badan anak usia > 2 tahun dengan berdiri (WHO, 2008; Rogol & Hayden, 2014)

Langkah selanjutnya setelah mengukur PB atau TB maka interpretasikan hasil pengukuran melalui grafik *length for age WHO Child Growth Standard* dengan memperhatikan sebelumnya jenis kelamin anak (Perempuan atau Laki-laki) untuk menyesuaikan *Growth Chart* yang akan digunakan.



A



B

Gambar 2.2 Grafik standar pertumbuhan berdasarkan TB/U usia 0-2 tahun

Keterangan : (A) Gambar grafik pertumbuhan berdasarkan TB/U usia 0-2 tahun untuk laki-laki
(B) Gambar grafik pertumbuhan berdasarkan TB/U usia 0-2 tahun untuk perempuan (WHO,2006)

Langkah-langkah cara menggunakan *Growth Chart* (Grafik

Pertumbuhan) menurut WHO untuk TB/U sebagai berikut :

1. Menentukan usia, PB atau TB pada anak usia di bawah 2 tahun.
1. Menentukan angka yang berada pada garis horizontal pada *Growth Chart*.
Garis horizontal pada *Growth Chart* WHO memberikan gambaran tentang umur dan panjang/tinggi badan.
2. Menentukan titik temu (*plotted point*) dari angka pada garis horizontal dihubungkan dengan angka pada garis vertikal . *Plotted point* menjadi gambaran perkembangan anak berdasarkan *chart* (kurva) pertumbuhan WHO (IDAI, 2013).

Tehnik interpretasi *Growth Chart* menurut WHO untuk TB/U sebagai berikut :

1. Garis 0 pada *Growth Chart* WHO menggambarkan median atau mean.
2. Garis lain disebut garis z-score. Pada *Growth Chart* WHO garis z-score diberi angka positif (1, 2, 3) atau negatif (-1, -2, -3). Sedangkan *plotted point* berada jauh dari garis median menginterpretasikan gangguan pertumbuhan.
3. *Plotted point* berada antara garis z-score -2 dan -3 diartikan <-2.
4. *Plotted point* berada antara garis z-score 2 dan 3 diartikan >2.
5. Cara menginterpretasikan arti *plotted point* pada *Growth Chart* WHO bisa mengacu pada tabel 2.1 dibawah ini (IDAI, 2013).

Tabel 2.1 Tabel Pedoman Pertumbuhan Bayi Berdasarkan WHO (WHO, 2006; IDAI, 2013)

Z-skor	Indikator pertumbuhan			
	Panjang / tinggi terhadap umur	Berat terhadap umur	Berat terhadap panjang / tinggi	IMT terhadap umur
Di atas 3	Lihat catatan 1	Lihat catatan 2	Obesitas	Obesitas
Di atas 2			Overweight (Gizi Lebih)	Overweight (Gizi Lebih)
Di atas 1			Berisiko Gizi Lebih (Lihat catatan 3)	Berisiko Gizi Lebih (Lihat catatan 3)
0 (median)				
Di bawah -1				
Di bawah -2	Perawakan Pendek (Lihat catatan 4)	Gizi Kurang	Kurus	Kurus
Di bawah -3	Perawakan Sangat Pendek / Kerdil (Lihat catatan 4)	Gizi Buruk (Lihat catatan 5)	Sangat Kurus	Sangat Kurus

2.1.2 Faktor-Faktor Penyebab *Stunting*

Stunting merupakan bentuk manifestasi dari malnutrisi berhubungan dengan multifaktor yang kompleks sebagai penyebabnya. Bloem (2013) menjabarkan tentang penyebab terjadinya malnutrisi berkaitan dengan berbagai aspek antara lain tidak adekuatnya asupan gizi, kurangnya pengetahuan, kurangnya perhatian dan fasilitas kesehatan bagi ibu dan anak, akses terhadap pangan sehat sulit, sampai terhadap berbagai aspek-aspek yang mendasar meliputi aspek sosial, ekonomi dan politik.

Stunting dan kesehatan lingkungan, beberapa penelitian telah membuktikan bahwa kontribusi penyehatan lingkungan terhadap pengentasan masalah *stunting* cukup besar, salah satunya penelitian tentang anak-anak di Bangladesh yang terakses air minum bersih, jamban, serta fasilitas CTPS (Cuci Tangan Pake Sabun) pertumbuhan tinggi badannya 50% bertambah lebih tinggi dibanding anak yang tidak mendapat akses tersebut (Lin *et al.*, 2013). Dalam sebuah jurnal juga disebutkan bahwa hygiene dan sanitasi yang buruk

menyebabkan gangguan inflamasi usus kecil yang mengurangi penyerapan zat gizi dan meningkatkan permeabilitas usus yang disebut juga *Environmental Enteropathy* (EE) dimana terjadi pengalihan energi, yang seharusnya digunakan untuk pertumbuhan tetapi akhirnya digunakan untuk melawan infeksi dalam tubuh (Zahraini, 2016)

Saat ini berdasarkan beberapa survey yang dilakukan, masalah kesehatan lingkungan di Indonesia masih cukup tinggi. Masih sekitar 24% masalah tempat Buang Air Besar (BAB) yang tidak sehat (BAB masih menggunakan tempat terbuka) dan terdapat 14% tidak memiliki jangkauan terhadap sumber air bersih (JMP, 2013), padahal ketika anak-anak tumbuh di lingkungan dengan sanitasi yang buruk, maka risiko mereka terkena penyakit menjadi lebih besar dan kemungkinan berulang juga tinggi, inilah yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan mereka (Zahraini, 2016)

Masalah *stunting* bukan hanya disebabkan kurangnya asupan makan sesuai kebutuhan. Seperti halnya masalah kurang gizi lainnya, bahwa secara langsung *stunting* memang disebabkan oleh kurangnya asupan gizi yang cukup serta ancaman penyakit infeksi yang berulang dan kedua hal ini saling mempengaruhi. Namun bila dilihat lebih dalam bahwa dua penyebab langsung ini sangat dipengaruhi oleh bagaimana pola asuh ibu, ketersediaan pangan di tingkat rumah tangga, hingga sanitasi lingkungan (Zahraini, 2016).

Stunted Growth And Development

PENYEBAB

Faktor Keluarga dan Keadaan Rumah Tangga		Makanan Pelengkap Yang Tidak Memadai			ASI	Infeksi
Faktor Ibu	Lingkungan Rumah	Rendahnya Kualitas Makanan	Praktek Yang Inadekuat	Keadaan Air dan Makanan	Praktek Yang Tidak Adekuat	Klinik dan Subklinik
<ul style="list-style-type: none"> - Kekurangan Nutrisi Selama Prakonsepsi, Kehamilan dan Menyusi - Tinggi badan pendek saat hamil - Infeksi - Kehamilan Remaja - IUGR dan Prematur - Terlalu dekat jarak kelahiran 	<ul style="list-style-type: none"> - Minimnya stimulasi - Aktivitas pada anak - Perawatan yang buruk - Sanitasi dan Ketersediaan air yang buruk - Keamanan makanan - Ketidackupaan makanan - Rendahnya pendidikan pengasuh 	<ul style="list-style-type: none"> - Rendahnya Kualitas Mikronutrisi - Rendahnya keanekaragaman makanan dan sumber protein hewani - Rendahnya kadar nutrisi - Rendahnya asupan energi pada makanan 	<ul style="list-style-type: none"> - Frekuensi - Makan tidak teratur - Makan tidak adekuat setelah sembuh dari sakit - Konsistensi makanan rendah - Tidak merespon makanan 	<ul style="list-style-type: none"> - Air dan makanan yang terkontaminasi - Kebersihan saat pengolahan makanan - Penyimpanan dan Persiapan makanan yang tidak aman 	<ul style="list-style-type: none"> - Kerlambatan IMD - Tidak ASI Eksklusif - Terlalu cepat penyapihan 	<ul style="list-style-type: none"> - Infeksi usus; diare, enterotment enteropathy, cacangan - Infeksi pernafasan - Malaria - Menurunya nafsu makan saat infeksi

Faktor Sosial dan Komunitas

<u>Ekonomi dan Politik</u>	<u>Kesehatan dan pelayanan kesehatan</u>	<u>Pendidikan</u>	<u>Social dan Budaya</u>	<u>Pertanian dan sistem pangan</u>	<u>Air, sanitasi dan Lingkungan</u>
<ul style="list-style-type: none"> - Kebijakan perdagangan dan harga makanan - Regulasi pemasaran - Stabilitas politik - Kemiskinan, pendapatan dan kekayaan - Layanan keuangan - Pengangguran dan mata pencaharian 	<ul style="list-style-type: none"> - Akses pelayanan kesehatan - Kualitas pelayanan kesehatan - Infrastruktur - Ketersediaan peralatan - Kebijakan kesehatan dan sistem pelayanan kesehatan 	<ul style="list-style-type: none"> - Akses pendidikan berkualitas - Kualitas pengajar - Kualitas kesehatan pelajar - Infrastruktur 	<ul style="list-style-type: none"> - Aturan dan keyakinan - Jaringan dukungan social - Pola asuh - Status perempuan 	<ul style="list-style-type: none"> - Produksi makanan dan pemrosesan - Ketersediaan Mikronutrisi Pada makanan - Kualitas dan keamanan dan makanan 	<ul style="list-style-type: none"> - Infrastruktur air dan sanitasi - Kepadatan populasi - Perubahan iklim - Urbanisasi - Penyakit alami dan buatan manusia

Gambar 2.3 Kerangka konseptual pertumbuhan dan perkembangan stunting menurut WHO dan Stewart et al. (2013)

2.1.3 Patogenesis *Stunting*

Ada beberapa hal yang menjadi patogenesis terjadinya *stunting* yaitu :

1. Defisiensi zat gizi

a. Defisiensi protein

Defisiensi energi seseorang menggambarkan indikasi defisiensi zat gizi lain. Jika hal ini dibiarkan dalam waktu lama, maka berdampak terjadinya penurunan berat badan. Berat badan yang menurun mengakibatkan kondisi gizi kurang yang berefek terhadap terhambatnya proses pertumbuhan linier (Almatsier, 2009). Defisiensi protein mengakibatkan retardasi pertumbuhan dan maturasi tulang karena protein merupakan zat gizi esensial pada pertumbuhan. Walaupun asupan energi cukup, jika asupan protein kurang dapat menyebabkan pertumbuhan balita terhambat (Oktarina & Sudiarti, 2013).

b. Defisiensi zinc

Pada kekurangan zinc, berdampak terhadap terhambatnya metabolisme GH (*Growth Hormone*) dalam mensintesis dan mensekresi IGF-1. Penurunan sekresi IGF-1 menyebabkan *stunting*. Kekurangan zat besi dapat menyebabkan gangguan sistem immunitas (Adriani & Wirjatmadi, 2012).

2. Stress oksidatif

Berdasarkan status gizi pada anak-anak *stunting* mengalami peningkatan stres oksidatif dan menurunnya sistem pertahanan antioksidan dibandingkan dengan anak-anak yang sehat. Stres oksidatif, malnutrisi dan tingkat sosial rendah mungkin memainkan peran penting dalam patogenesis *stunting* (Aly *et al.*, 2014). Biomarker stres oksidatif darah termasuk katalase (CAT), *superoksida dismutase* (SOD), *malondialdehyde* (MDA), plasma *glutathione*

(GSH), protein plasma total, total kapasitas anti oksidan (TAC), tembaga (Cu), seng (Zn) dan vitamin C (Aly *et al.*, 2014).

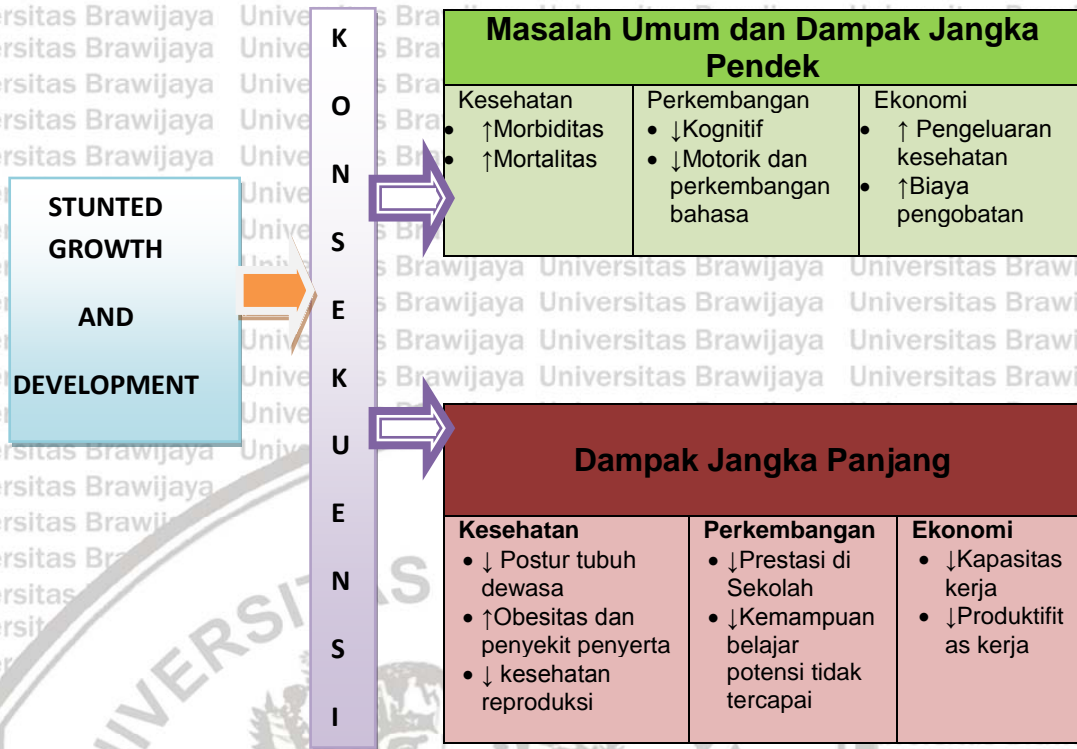
3. Infeksi berulang

Balita sering menderita sakit akan berefek terhadap pertumbuhannya karena pada kondisi sakit dibarengi anoreksia (Malde *et al.*, 2010), sehingga asupan gizi digunakan lebih banyak untuk melawan infeksi bukan untuk proses pertumbuhan.

4. Inflammasi

Mekanisme lain yang menyebabkan terjadinya *stunting* adalah inflammasi. Penelitian menunjukkan bahwa inflammasi dapat mempengaruhi pertumbuhan janin, menyebabkan berat badan lahir rendah dan berdampak *stunting* (Prendergast, 2014). Peningkatan IL-6 sebagai mediator inflammasi kronis pada perkembangan tulang post natal berpengaruh pada perkembangan tulang. IL-6 telah terbukti menjadi mediator yang bertanggungjawab untuk menghambat mineralisasi tulang sehingga pertumbuhan tulang terhambat dan menjadi *stunting* (Prendergast, 2014).

2.1.4 Dampak Stunting



Gambar 2.4 Dampak jangka pendek dan jangka panjang dari *stunting* (WHO, 2013)

2.1.5 Mekanisme Keterlambatan Pertumbuhan Linier

Pertumbuhan linier adalah suatu tahapan yang mencakup pertumbuhan somatik, diferensiasi dan maturasi dari fungsi organ. *Linier Growth* dimulai dari konsepsi dan berakhir ketika akhir usia remaja atau awal usia 20-an. Pertumbuhan terjadi karena hiperplasia & hipertropi sel (Coley *et al.*, 2006). TB atau PB merupakan indikator dari ukuran skeletal dan hal ini memiliki hubungan antara komposisi dan kepadatan mineral tulang. Anak dikatakan tinggi berdasarkan umurnya jika memiliki massa dan kepadatan tulang lebih besar dari anak *stunting* (Zemel, 2013). Pertumbuhan tulang panjang terjadi di plate pertumbuhan melalui siklus osifikasi *endochondral* (Gat-Yablonski *et a.*, 2013)

Mekanisme keterlambatan pertumbuhan linier kemungkinan disebabkan terhambatnya awal fase *childhood* yang dipengaruhi oleh *growth hormone*.

Regulasi zat gizi nutrisi dan sistem hormon berkontribusi pada kontrol pertumbuhan anak. Mekanisme *stunting* merupakan interaksi antara sistem hormon (GH, *insulin*, *Kortisol*), *growth factor (IGFs)* dan binding protein serta reseptor seluler di sel target, kekurangan zat gizi dan pelepasan sitokin selama masa infeksi (Muslihah, 2012).

Mekanisme saat tubuh berhenti untuk tumbuh sebagai respon dari defisiensi zat gizi melalui penurunan produksi pertumbuhan, penurunan regulasi reseptor, berkurangnya dan gagal sintesis protein adalah sebagai tanda klinis dari kekurangan protein, seng, Mg, Fosfor dan Kalium/potassium. Penurunan pada tingkat seluler berefek pada sistem imun yang berakhir dengan prevalensi penyakit infeksi meningkat. Hal ini menggarisbawahi pengamatan penelitian bahwa gagal untuk tumbuh berkorelasi dengan berkurangnya respon imun (Muslihah, 2016).

2.1.6 Hubungan Infeksi, Inflammasi Dengan Keterlambatan Pertumbuhan Linier

Peradangan terbukti berkorelasi dengan kurang gizi, infeksi berdampak *undernutrition* melalui kurangnya asupan zat gizi dan gangguan perubahan metabolisme. Misal ketika sakit, *appetite* menyebabkan asupan makan berkurang, absorpsi menurun, berkurangnya zat gizi. Penurunan asupan makan diikuti *appetite* terjadi umumnya pada anak dengan malaria, *gastroenteritis*, ISPA dan cacangan. Respon metabolik dari infeksi terjadi malabsorpsi dan pelepasan sitokin merupakan bagian yang bertanggungjawab kegagalan dan terhambatnya pertumbuhan anak. Infeksi berkontribusi terhadap pertumbuhan terhambat melalui luka mukosa usus halus, hal ini menyebabkan malabsorpsi, terutama zat

gizi mikro, dan meningkatkan *permeability* terhadap antigen dan bakteri (Muslihah, 2016).

Respon inflammasi merupakan proses yang terbentuk sebagai pertahanan terhadap adanya trauma atau invasi dari organisme atau zat asing. Inflammasi ditandai dengan perubahan sistemik dan lokal dalam ekspresi dan dapat menjadi sebagai aktivator atau inhibitor. Pengaruh inflammasi terhadap pertumbuhan tulang terjadi dua kali. Pertama, efek inflammasi sistemik yang mempunyai konsekuensi terhadap hormon, metabolisme mineral dan zat gizi lainnya yang berpengaruh terhadap pertumbuhan tulang. Kedua, mediator sitokin dari inflammasi yang menyebabkan perubahan lokal dalam regulasi sel untuk mempengaruhi proses *endochondral* dalam *growth plate*, dan aktivitas modeling dan remodeling yang berhubungan dengan pertumbuhan (Muslihah, 2016).

2.1.7 Upaya Menurunkan *Stunting*

Beberapa upaya program pemerintah untuk menurunkan *stunting* dalam daur kehidupan seorang wanita yaitu :

1. Pemberian ASI Eksklusif

ASI Eksklusif dapat menekan risiko prevalensi *stunting* karena ASI memiliki komposisi kekebalan dan kalsium pada ASI mempunyai *bioavailabilitas* tinggi hal ini memudahkan penyerapan secara optimal terutama pada proses pembentukan tulang (Almatsier, 2009).

2. Perubahan perilaku

Upaya-upaya yang dapat dilakukan untuk menurunkan pemicu *stunting* yaitu dengan perubahan perilaku masyarakat berikut ini

- a. Berhenti cara BAB di sembarang tempat
- b. Kebiasaan cuci tangan dengan sabun
- c. Pengelolaan air minum dan makanan rumah tangga

d. Pengaturan dan pembuangan sampah rumah tangga yang aman

e. Pembuangan limbah cair rumah tangga yang aman

Beberapa kampanye terhadap masyarakat yang berhubungan dengan sanitasi yaitu pengenalan PHBS (Perilaku Hidup Bersih dan Sehat) seperti kampanye penggunaan jamban sehat, kampanye penggunaan air bersih dan kampanye CPTS (Cuci Tangan Pakai Sabun) pada air yang mengalir dan bersih (Zahraini, 2016)

2.1.8 Intervensi Gizi Untuk Mengatasi Defisiensi Zat Gizi Makro dan Mikro Pada Ibu dan Anak

Menurut Bhutta *et al.* (2013) 10 intervensi gizi menurut siklus kehidupan dalam mengentaskan defisiensi gizi dan kekurangan zat gizi makro pada ibu dan anak. Fokus sasaran berdasarkan siklus kehidupan wanita yaitu :

1. Nutrisi prahamil dan kesehatan remaja.
2. Pemberian suplemen makanan pada ibu.
3. Pemberian suplemen/fortifikasi zat gizi mikro.
4. ASI & MP ASI.
5. Pemberian suplemen makanan pada anak.
6. Diversifikasi makanan.
7. Stimulasi dan perilaku makan.
8. *Treatment SAM (severe acute malnutrition).*
9. Pencegahan dan tata laksana penyakit.
10. Intervensi gizi untuk emergensi atau kegawat-daruratan.

2.2 Interleukin 6 (IL-6)

Sitokin adalah suatu group glikoprotein kecil yang diproduksi sebagai respons terhadap antigen dan diketahui sebagai mediator dalam regulasi sistem

immunitas langsung dan adaptif. Sitokin bersifat *pleotropik* selain berperan dalam sistem kekebalan tubuh, sitokin juga berperan dalam proses hematopoiesis dan berinteraksi dengan *growth factor*. Mekanisme kerja sitokin dalam satu kaskade dapat bersifat saling sinergis maupun antagonis. Secara umum, sitokin dibagi menjadi tiga keluarga besar yaitu sitokin proinflammasi (IL-1 β , TNF- α , IL-6), sitokin antiinflammasi (IL-4, IL-10, IL-13) dan sitokin hematopoietik (IL-3, IL-5) (Tickell & Walson, 2016).

IL-6 adalah mediator inflammasi awal yang kritikal dan memainkan peranan penting dalam respon imun secara keseluruhan. IL-6 adalah mediator kunci dari respon fase akut. IL-6 diasosiasikan dengan penyakit atherosklerosis dan mediator kunci respon inflammasi pada iskemik otak. Iskemik otak menginduksi pelepasan IL-6 ke aliran darah. IL-6 disebut juga sebagai stimulator poten aksis HPA dibandingkan sitokin lainnya. IL-6 memiliki keunikan dalam fungsinya yaitu dapat menyebabkan atau menghambat reaksi inflammasi (Tickell & Walson, 2016).

IL-6 memiliki peranan utama dalam respon otak terhadap kerusakan jaringan otak. Sebagai respon awal, neutrofil melakukan ekstravasasi ke parenkim otak melibatkan proses perpindahan, aktivasi dan transmigrasi dari P dan E-selectin yang diikuti kemudian oleh peningkatan kadar ICAM dan VCAM dan meningkatkan migrasi leukosit menuju parenkim otak. TN- α dan IL-1 β menyebabkan neutrofil terdegranulasi dan terjadi kerusakan jaringan oleh *matrix metalloproteinase* (MMP) dan TGF- β , sedangkan IL-6 akan menghambat TNF- α dan proses diapedesis neutrofil (Tickell & Walson, 2016).

Pada studi penelitian anak-anak yang menderita penyakit infeksi menggambarkan sistem imunologi dari *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF) dan IL-6 pada anak yang terinfeksi sebagian besar lebih tinggi dibandingkan pada anak dengan status gizi baik (Rytter *et al.*, 2014)

Sitokin yang meningkatkan kerja osteoklas ialah *granulocyte-macrophage colony-stimulating factors* (GM-CSF), *macrophage colony-stimulating factors* (M-CSF), TNF- α , interleukin-1 dan interleukin-6, sedangkan faktor lokal yang meningkatkan kerja osteoblas ialah IL-4 dan *transforming growth factor β* (TGF- β) (Sihombing *et al.*, 2012).

Pada masa anak-anak jika mengalami inflammasi kronis dan terjadi kelebihan kadar IL-6 dapat menyebabkan kegagalan dalam pertumbuhan yang mengarah ke kondisi *stunting*, kadar IL-6 yang tinggi berdampak negatif terhadap ekspresi gen IGF-1 di hati dan meningkatkan degradasi *insuline-like growth factor binding protein-3* (IGFBP-3) (Gaspari *et al.*, 2011; Sederquist *et al.*, 2014).

Pada inflammasi kronis seperti *arthritis juvenile idiopathic* dan penyakit *cronh* menggambarkan bahwa sitokin proinflammasi memediasi pertumbuhan terhambat (*stunting*) melalui penurunan IGF-1 (De Benedetti *et al.*, 1997; Walter, *et al.*, 2009). Disebutkan pula pada kondisi inflammasi kronis, sitokin proinflammasi meregulasi dan melepaskan sitokin proinflammasi (TNF- α , IL-1 β dan IL-6) dalam kadar yang tinggi pada peredaran dan secara langsung bertindak menekan plate pertumbuhan tulang rawan dan menginduksi apoptosis sehingga menekan pertumbuhan tulang (Sederquist *et al.*, 2014).

Hubungan inflammasi kronis pada BBLR dan supresi IGF-1 dapat menjelaskan penurunan pertumbuhan linier yang terjadi sejak lahir pada bayi di Afrika dan Asia (Victoria *et al.*, 2010; Prendergast *et al.*, 2014).

Pertumbuhan *stunting* merupakan komplikasi utama dari inflammasi kronis dan infeksi berulang pada anak-anak. Penelitian dilakukan pada tikus transgenik yang diinduksi murine sehingga mengalami gangguan pertumbuhan fenotype, gangguan pertumbuhan pada tikus transgenik pada penelitian ini menunjukkan bahwa IL-6 memediasi penurunan produksi IGF-1 pada mekanisme utama inflammasi kronis yang mempengaruhi pertumbuhan

terhambat. Dan berdasarkan uji statistik pertumbuhan terhambat, peningkatan kadar IL-6 berhubungan dengan penurunan nilai kadar IGF-1 (De Benedetti *et al.*, 1997).

IL-6 telah dianggap bertindak secara sistemik menekan pertumbuhan dengan mengubah aksis GH/IGF-1, meskipun penelitian terbaru menunjukkan bahwa IL-6 juga memiliki efek langsung pada kondrosit plate pertumbuhan (Nakajima *et al.*, 2009; Fernandez-Vojvodich *et al.*, 2013).

Efek lokal IL-6 pada retardasi pertumbuhan berhubungan dengan penurunan kepadatan sel pada zona proliferasi, penurunan panjang dan area zona hipertropi pada plate pertumbuhan (Macrae *et al.*, 2006).

2.3 Interleukin 10 (IL-10)

IL-10 merupakan sitokin pengatur mediator imun dalam proses inflammasi bersama *interferon- γ* , *limfotoksin*, *interleukin-2* (IL-2), *migration inhibitor factors*, dan TNF- α (Soeroso, 2007).

IL-10 adalah sitokin terbanyak disekresi oleh monosit, memiliki efek pleiotrofik pada sistem imun dan dikenal karena kemampuannya untuk mensupresi aktivitas dan fungsi efektor sel T, monosit & makrofag. IL-10 adalah sitokin antiinflammasi utama dalam respon imun alamiah dan adaptif berperan menghentikan respon inflammasi berlebihan melalui inaktivasi makrofag dan sel T. Sitokin ini merupakan mediator inflammasi lokal dan sistemik dan dapat diproduksi tubuh dalam jumlah besar sehingga mudah terdeteksi dalam serum (Fridolina & Mefi, 2016).

Diantara group sitokin yang menstimulasi osteoklastogenesis yaitu IL-1, IL-3, IL-6, *Leukemia Inhibitory Factor*, *Oncostatin M* *Ciliary Neurotropic Factor* *Tumor Necrosis Factor*, *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor* dan *Macrophage-Colony Stimulating Factor* (M-CSF). Sedangkan IL-4, IL-10, IL-18

dan interferon-gamma merupakan sitokin penghambat osteoklastogenesis (Manolagas, 2000).

Sitokin adalah mediator dari respon inflamasi tubuh terhadap infeksi, diproduksi oleh limfosit T dan makrofag diaktifkan. Sel T merespon baik Th-1 (memproduksi interferon γ , TNF- α , IL-1 dan IL-2) maupun Th-2 (memproduksi IL-4, IL-5, IL-10 dan IL-13). Respon Th-1 memberikan perlindungan terhadap infeksi virus dan bakteri (immunitas seluler) dan respon Th-2 melindungi dari alergi dan infeksi parasit (immunitas humoral). Sitokin proinflamasi menginduksi produksi kaskade sitokin dari limfosit, yang selanjutnya memodulasi fungsi limfosit. Sitokin juga mampu autoregulasi IL-10 dan IL-4, diproduksi dalam menanggapi sitokin proinflamasi, menekan produksi sitokin proinflamasi lainnya (Kaur *et al.*, 2009).

Profil anak-anak kurang gizi, pada sistem kekebalan tubuh terhadap respons Th2 yaitu kadar IL-4 dan IL-10 yang tinggi sedangkan kadar IL-2, IL-12 dan IFN- γ rendah. Peningkatan kadar IL-6 dan TNF- α berhubungan dengan infeksi dan observasi yang mendukung yaitu induksi fase akut (Basso *et al.*, 2009; Ritter *et al.*, 2014). Anak-anak malnutrisi tampaknya memiliki sitokin antiinflamasi yang tinggi dan kurang jelas pengaruh tingkat sitokin proinflamasi dalam darah, berbeda dengan sebagian besar ekspresi sitokin proinflamasi di usus anak kurang gizi (Opal & Depalo, 2000; Rytter *et al.*, 2014).

Ada peningkatan produksi IL-10 pada anak-anak mengikuti rehabilitasi makanan, secara signifikan pada anak-anak yang menerima dadih. Ini mungkin untuk melawan efek merusak dari peningkatan sitokin proinflamasi TNF- α , dan IFN- γ (Kaur *et al.*, 2009).

Rehabilitasi gizi dengan *curd* sekitar dua minggu pada anak dengan gizi buruk, kadar sitokin antiinflamasi IL-10 meningkat (Kaur *et al.*, 2009).

2.4 Osifikasi Tulang

Osifikasi tulang adalah suatu proses pembentukan tulang yang meliputi kejadian perubahan proses pengerasan tulang rawan menjadi tulang sejati.

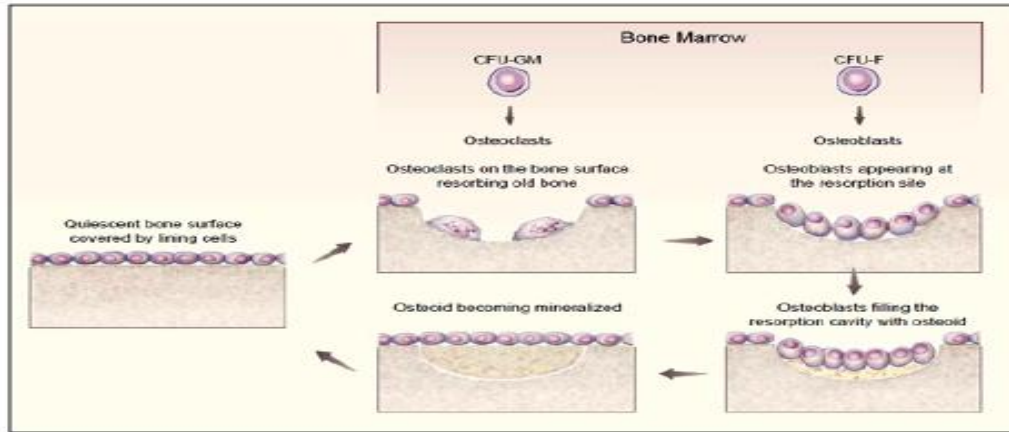
Proses osifikasi terjadi pada masa perkembangan fetus (prenatal) dan setelah individu lahir (postnatal). Pada tulang panjang perkembangan terjadi sampai individu mencapai dewasa (Djuwita *et al*, 2012).

Osifikasi tulang terdiri dari proses modeling dan remodeling terjadi sepanjang kehidupan mulai dari janin usia 6-7 minggu sampai dengan usia lanjut. Proses pembentukan dan penyerapan mencapai keseimbangan usia 30-40 tahun, pada keadaan fisiologis keseimbangan pada wanita terganggu saat memasuki usia menopause sedangkan pada laki-laki pada usia 60 tahun, proses pembentukan tulang (osifikasi) terjadi selama masa pertumbuhan (Manolagas *et al.*, 2002). Pertumbuhan tulang menggambarkan perubahan struktur tulang yakni pada saat pembentukan skeleton, pertumbuhan dan pematangan (Morvan, 2006).

2.4.1 Remodeling Tulang

Proses remodeling merupakan dua tahapan aktivitas seluler yang terjadi secara siklik, yakni resorpsi tulang lama oleh osteoklas dan formasi tulang baru oleh osteoblas. Pertama-tama, osteoklas akan menyelenggarakan resorpsi melalui proses asidifikasi dan digesti proteolitik. Segera setelah osteoklas meninggalkan daerah resorpsi, osteoblas menginvasi area tersebut dan memulai proses formasi dengan cara mensekresi osteoid (matriks kolagen dan protein lain) yang kemudian mengalami mineralisasi. Normalnya, kecepatan resorpsi dan formasi tulang berlangsung dalam kecepatan yang sama sehingga massa tulang tetap konstan. Selama kehidupan proses resorpsi dan formasi tulang terus berlangsung. Pada awalnya pembentukan tulang lebih cepat dibanding dengan

resorpsi, yang menghasilkan tulang menjadi besar, berat dan padat (Sihombing *et al.*, 2012).

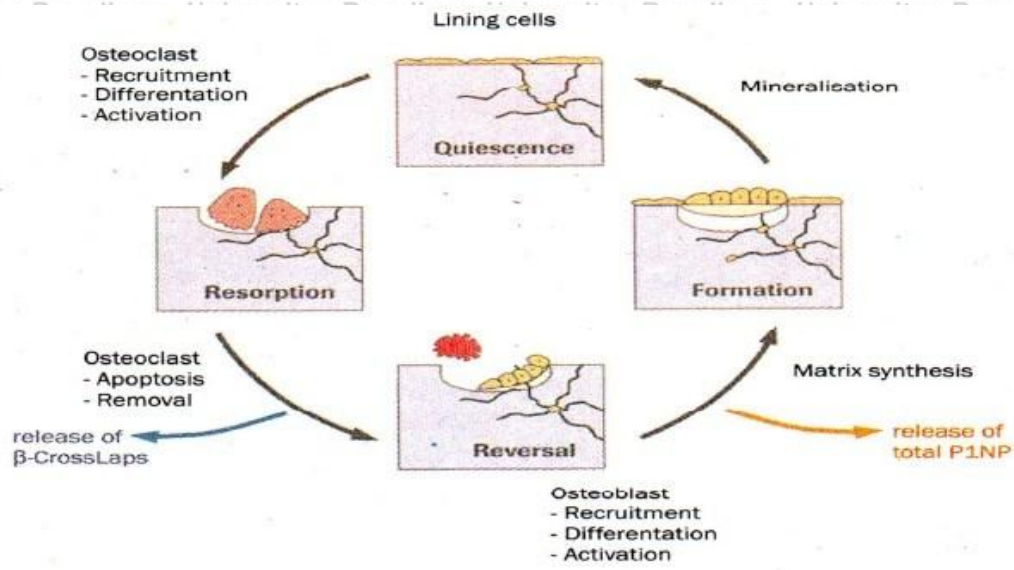


Gambar 2.5 Skema proses remodeling tulang.

Keterangan : Dalam Siklus ini, aktifitas yang konstan dalam diferensiasi osteoblas dan osteoklas dari sel-sel progenitornya merupakan tahap esensial dalam menjaga keseimbangan antara resorpsi tulang lama dan formasi tulang baru (Epstein, 1995)

2.4.2 Siklus Remodeling Tulang

Siklus remodeling tulang dimulai dengan perekrutan sel-sel prekursor osteoklas. Sel-sel ini berdiferensiasi menjadi osteoklas ketika mereka menerima sinyal dari osteoblas. Osteoklas yang matur kemudian mensintesis enzim proteolitik yang mencerna matriks kolagen. Resorpsi tulang ini adalah tahap pertama dari siklus renovasi. Fase yang panjang ini diatur oleh apoptosis osteoklas. Fase selanjutnya dari siklus remodeling preosteoblas ditarik dari stem sel mesenkimal dalam sumsum tulang. Osteoblas matur mensintesis matriks tulang, terutama kolagen tipe I dan mengatur mineralisasi tulang yang baru terbentuk. Beberapa osteoblas matur mungkin terjebak dalam mineralisasi tulang dan menjadi osteosit (Thomas, 2012).



Gambar 2.6 Siklus remodeling tulang

Keterangan : Proses aktifitas remodeling tulang dimulai dengan aktifitas prekursor hemopoetik menjadi osteoklas yang secara normal akan berinteraksi dengan *lining cell* osteoblas. Dalam fase reversal osteoklas menghilang, digantikan oleh sel monosit yang bekerja menempelkan bahan yang akan menjadi 'lapisan cemen', kemudian pada fase formasi tulang oleh pengaruh sinyal tertentu osteoblas menempel dipermukaan lubang *lacuna howship* dan mensintesis kolagen, protein non-kolagen dan mensekresinya membentuk osteoid yang pada akhirnya termineralisasi ekstrasel menjadi 'tulang' (Compston, 2001).

2.4.3 Pengaruh Hormon Estrogen Terhadap Osteoblast dan Osteoklas

Estrogen endogen yang banyak ditemukan dalam tubuh manusia adalah estradiol-17 β (E₂), estron (E₁) dan estriol (E₃). Ketiganya merupakan steroid dengan 18 atom karbon yang terbentuk dari kolesterol. Sumber primer estradiol ialah kelenjar gonad (sel teka dan sel granulosa ovarium pada perempuan dan sel *Leydig* pada laki-laki), sedangkan estron dan estriol disintesis di hepar dari estradiol. Selain itu, pembentukan senyawa estrogen dapat pula berlangsung di otot, jaringan lemak, jaringan saraf dan trofoblas (Sihombing, 2012).

Adapun peran estrogen dalam remodeling tulang yaitu ;

1. Efek estrogen pada sel-sel tulang

Reseptor estrogen dapat ditemukan pada sel osteoklas maupun osteoblas.

Estrogen telah lama dikenal sebagai agen antiresorptif yang bekerja

terutama dengan menekan aktivitas osteoklastik. Namun studi-studi terakhir membuktikan bahwa efek antiresorptif tersebut dapat pula dihasilkan melalui kerjanya pada osteoblas yang secara tidak langsung mempengaruhi aktivitas osteoklastik (Sihombing, 2012).

2. Efek estrogen pada aktivitas osteoklas

Menurut Oursler (2003) membuktikan bahwa estrogen bekerja dengan menekan diferensiasi osteoklas. Pembentukan osteoklas memerlukan interaksi antara RANK (*receptor activator nuclear factor kappa B*, NF- κ B) dan ligannya, RANKL. Interaksi antara RANK dan RANKL ini diregulasi oleh produksi osteoprotegerin (OPG). Estrogen mengendalikan diferensiasi osteoklas dengan cara menghambat interaksi antara RANK dan RANKL. Estrogen pun dapat menghambat produksi IL-6, IL-1 dan atau TNF- α , IL-11, IL-7 dan TGF- β yang juga penting dalam diferensiasi osteoklas. Lama hidup osteoklas juga menentukan jumlah sel osteoklas pada permukaan resorpsi tulang. Estrogen dapat menginduksi apoptosis dan kematian osteoklas sehingga dapat secara langsung menurunkan aktivitas resorpsi (Sihombing, 2012).

3. Efek estrogen pada aktivitas osteoblas

Efek estrogen dalam menekan aktivitas osteoklastik dapat terjadi secara tidak langsung melalui aksinya pada reseptor osteoblastik. Salah satu sitokin yang diproduksi oleh osteoblas, TGF- β , ditekan produksinya oleh estrogen. TGF- β berperan dalam diferensiasi osteoklas serta kelangsungan hidupnya. Estrogen pun menstimulasi produksi OPG (osteoprotegerin) oleh osteoblas. OPG merupakan reseptor TNF yang penting dalam menghambat diferensiasi dan aktivitas osteoklas. Estrogen juga mengendalikan aktivitas osteoklastik dengan menekan produksi interleukin-6 (IL-6) yang diproduksi osteoblas (Sihombing, 2012).

2.5 Rotenon

2.5.1 Gambaran Umum

Rotenon merupakan senyawa yang dihasilkan dari ekstrak tanaman seperti dari akar tuba, biji bengkoang dan tanaman lain. Tanaman tuba tersebar di Asia. Di Malaysia ditemukan banyak spesies (*albinoe*) polenta dari genera *Derris*, *Lonchocarpus* dan *Tephrosia* (Zubairi *et al.*, 2016). Di Indonesia tanaman ini ditemukan di Jawa. Tanaman tuba tumbuh terpencah-pencar di tempat yang tidak begitu kering, di tepi hutan, di pinggir sungai atau dalam hutan belukar yang masih liar (Setiawati *et al.*, 2008). Tanaman tuba mempunyai nama yang berbeda-beda di setiap daerah di Indonesia. Misalnya di Jawa dikenal dengan nama besto, oyod ketungkul, oyod tungkul, tuba, tuba akar, tuba jenu dan di daerah Sunda dikenal dengan nama tuwa, tuwa lalear, tuba leteng (Adharini, 2008).



Gambar 2.7 *Derris elliptica* (Zubairi *et al.*, 2016)

Tanaman berkayu dan tanaman pemanjat ini tumbuh di daerah dataran rendah dan tidak berkembang di ketinggian. Diperlukan setidaknya 75% kadar air tanah dengan suhu sekitar kira-kira 25 sampai 30°C untuk menghasilkan hasil rotenon yang tinggi (Zubairi *et al.*, 2016). Tanaman tuba yang dimanfaatkan adalah bagian akar, karena mengandung senyawa rotenon ($C_{23}H_{22}O_6$)

0,3-12% merupakan senyawa aktif untuk membunuh hama tanaman dan ikan liar (Starr *et al.*, 2003; Duraiapah, 2005). Adapun Taksonomi dari akar tuba adalah sebagai berikut :

Filum : *Magnoliophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Ordo : *Rosales*
Filum : *Caesalpiniaceae*
Genus : *Derris*
Spesies : *Derris elliptica Benth* (Budiyanto *et al.*, 2011)

Rotenon yang dihasilkan pada tanaman tuba akan mudah rusak jika terkena udara, sinar matahari, kondisi basa dan toksisitas senyawa akan hilang dalam 5 sampai 6 hari sinar matahari musim semi atau 2 sampai 3 hari sinar matahari musim panas sehingga aman digunakan oleh petani (Hien *et al.*, 2003; Attawadee *et al.*, 2006).



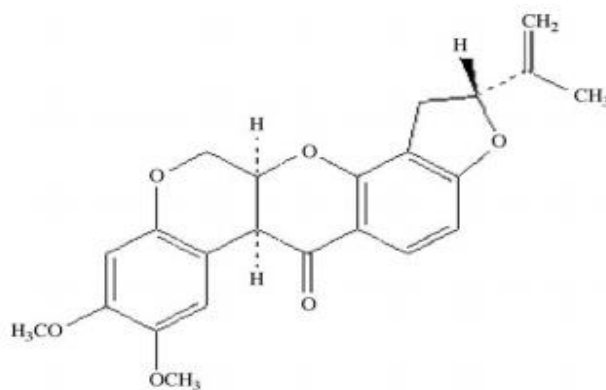
Gambar 2.8 Akar tuba (*Derris elliptica*)

Tanaman tuba memiliki karakter morfologi yang sama namun terdapat keragaman dalam hasil analisa DNA. Punahnya tanaman tuba disebabkan oleh eksploitasi yang berlebihan, alih fungsi lahan, kebijakan pemerintah dan sulitnya tanaman menghasilkan biji (Wicaksono *et al.*, 2015).

Racun tanaman tuba pada masa lalu dikenal sebagai *derris* dan sekarang diketahui sebagai rotenon. Bahan aktif ini ditemukan pada akar tuba dengan kadar antara 2½-3%, paling banyak terkandung dalam kulit akar. Racun tuba diekstrak dengan menumbuk akar yang segar atau yang telah dikeringkan, dan

merendamnya dengan air hingga satu malam atau ada pula yang merebusnya selama beberapa jam. Ekstrak ini kemudian diencerkan, dicampurkan dengan larutan sabun untuk menstabilkannya, serta disemprotkan untuk menanggulangi serangan hama (Budiyanto *et al.*, 2011).

Rumus senyawa dari rotenon seperti disajikan pada gambar 2.9 sebagai berikut ini :



Gambar 2.9 Rumus bangun rotenon (Adharini, 2008)

Senyawa aktif lainnya yang terkandung dalam akar tuba adalah *dequelin* (0,15-2,9%), *eliptone* (0,35-4,6%) dan *toxicarol* (0-4,4%) (Amborese & Haag, 1985; Maini & Rejesus, 1993). Rotenon bersifat sebagai racun perut (Amborese & Haag, 1985).

2.5.2 Struktur Fisik dan Kimia Rotenon

Rotenon memiliki struktur fisik dan kimia sebagai berikut :

Nama Umum : Rotenon

Rumus Empiris : $C_{23}H_{22}O_6$

Nama Kimia : (2R, 6aS, 12aS) 1,2,6,6a,12,12a-hexahydro-isopropenyl-8-9-dimethoxychromeno[3,4-b]furo[2,3-h]chrome-6-one

Berat Molekul : 394.423 g/mol

Tergolong senyawa fenolik

Kelarutan : Larut terbatas dalam air : 2 mg/L @ 20°C,
15 mg/L @ 100°C.

Larut dalam pelarut organik lain yaitu :

- Etanol 2g/L @ 20°C;
- Carbontetrachloride 6 g/L @ 20°C
- Amyl acetate 16 g/L @ 20°C
- Xylene 34 g/L @ 20°C
- Acetone 66 g/L @ 20°C
- Benzene 80 g/L @ 20°C
- Chlorobenzene 135 g/L @ 20°C
- Ethylene dichloride 330 g/L @ 20°C
- Chloroform 472 g/L @ 20°C

Titik Leleh : 165 °C

Titik Didih : 220 °C

Tekanan : < 1 mPa @ 20 °C

Penguapan

Jenis Pestisida : Botanical

Stabilitas : Sensitif terhadap cahaya dan air

Gambaran Bentuk : Berbentuk Kristal berwarna kecoklatan dan
berbentuk serbuk berwarna coklat sampai coklat
keputihan

Tahun Teregistrasi : Berdasarkan USEPA tahun 1947

2.5.3 Toksisitas Rotenon

Rotenon adalah sitotoksin spektrum yang luas, karena menghambat rantai transpor elektron di mitokondria. Ini adalah penghambat enzim pernapasan, yang bekerja antara NAD⁺ (koenzim yang terlibat dalam oksidasi dan pengurangan jalur metabolisme) dan koenzim Q (enzim pernapasan yang bertanggung jawab untuk membawa elektron ke dalam beberapa rantai transpor elektron), yang mengakibatkan kegagalan fungsi pernapasan. Rotenon menghambat oksidasi NADH ke NAD, menghalangi oksidasi oleh NAD dari substrat seperti *glutamat*, *α-ketoglutarat*, dan *piruvat*. Rotenon menghambat rantai pernapasan mitokondria antara *nukleotida diphosphopyridine* dan *flavine*. Blokade ini diatasi oleh Vitamin K3 (*menadione sodium bisulphate*), yang ternyata mengaktifkan bypass dari situs sensitif rotenon. Rotenon adalah penghambat kuat dari transport elektron mitokondria. Pengaturan sintesis asam lemak dalam mitokondria oleh rotenon dapat diubah setelah pemberian kronis, yang mengakibatkan perubahan lemak di hati (Zubairi *et al.*, 2016).

Rotenon bersifat sebagai racun perut (Amborese & Haag, 1985). Rotenon yang masuk ke dalam tubuh akan membuat organisme sulit bernapas karena kesulitan mendapat oksigen. Senyawa rotenon dapat memasuki insang ikan secara langsung dan kerja rotenon adalah menghambat proses oksidasi ganda NADH₂, sehingga ikan tidak dapat melakukan respirasi. Cara menghilangkan efek dari rotenon adalah dengan menggunakan potasium permanganat klorin, *methylen blue*, aktif karbon atau air yang diaerasi dengan kuat (Hinson, 2000).

Senyawa dari tanaman tuba yang bersifat racun ini tidak boleh dialirkan ke sungai karena dapat membuat ekosistem perairan mati (Olufayo, 2009).

2.5.4 Mekanisme Kerja Rotenon Pada Osifikasi Tulang

Pestisida tergolong sebagai *endocrine disrupting chemicals* (EDCs) yaitu bahan kimia yang dapat mengganggu sintesis, sekresi, transport, metabolisme, pengikatan dan eliminasi hormon-hormon dalam tubuh (Utami *et al.*, 2013). Rotenon merupakan salah satu jenis pestisida yang memiliki mekanisme kerja mengganggu kompleks I mitokondria (Li *et al.*, 2003).

Sel memiliki lapisan dinding sel yang bersifat *bilayers*. Rotenon dapat masuk ke dalam sel melalui difusi pasif hal ini dikarenakan rotenon memiliki molekul yang kecil dan bersifat non polar. Setelah masuk dalam sel melalui difusi, rotenon masuk ke dalam mitokondria. Mitokondria terbagi menjadi 2 bagian yaitu bagian luar dan bagian dalam, bagian luar terdiri dari membran halus, sedangkan bagian dalam berupa bagian berkelok-kelok (krista). Mitokondria adalah organel sel yang berfungsi sebagai pengatur dalam aktivitas metabolisme sel, respirasi sel dan penghasil energi sel dalam bentuk *adenosine triphosphate* (ATP) (Kuhlbrandt, 2015).

Proses pembentukan ATP dalam sel meliputi 4 tahap yaitu glikolisis, dekarboksilasi oksidatif, siklus krebs dan transport elektron. ATP terbanyak dihasilkan pada tahap transport elektron (Bai *et al.*, 2005).

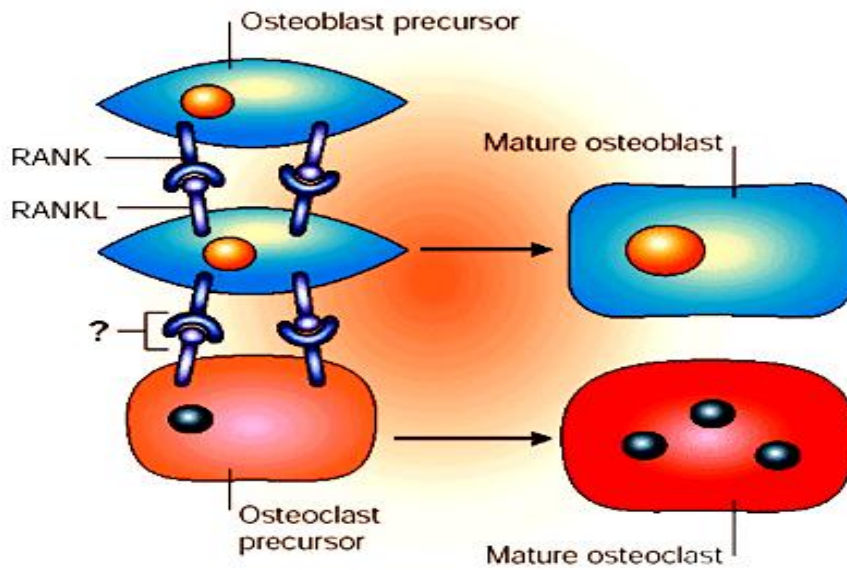
Rotenon masuk dalam mitokondria memiliki mekanisme kerja menghambat *respiratory chain* kompleks I mitokondria penghasil ATP (Radad *et al.*, 2006). *Respiratory chain* kompleks I merupakan bagian dari proses transport elektron atau disebut juga dengan fosforilasi oksidatif. Transport elektron terjadi di inner membran dengan mengubah NADH dan FADH₂ menjadi 32 ATP, 6H₂O. Transport elektron memiliki 5 kompleks enzim yaitu Komplek I NADH dehidrogenase, NADH dehidrogenase mengkatalisis perpindahan 2 elektron dari NADH ke koenzim Q. Komplek II Suksinat dehidrogenase, Suksinat dehidrogenase akan menerima elektron dari suksinat dan mengkatalisis reduksi

Q menjadi QH_2 . Komplek III terdiri dari dua tahap. Komplek III memindahkan elektron ke suatu elektron carier sitokrom c untuk selanjutnya dibawa ke kompleks IV. Komplek IV sitokrom oksidase, sitokrom oksidase akan mengambil elektron dari sitokrom kemudian mentransfer elektron tersebut ke O_2 . Komplek V ATP Sintase, pada kompleks V ini akan dihasilkan ATP saat proton masuk dari ruang intermembran ke matrik (Horton *et al.*, 1996). Kompleks I mitokondria memegang peranan penting dalam produksi ATP di mitokondria, kegagalan aktivitas pada kelompok I ini menyebabkan penurunan produksi ATP oleh sel (Brooks *et al.*, 2004). Komplek I mitokondria awal titik masuk elektron dari NADH ke dalam *respiratory chain*, apabila terjadi hambatan pada aktivitas protein kompleks I mitokondria akan berdampak pada kompleks protein berikutnya, terjadinya penghambatan kompleks I mitokondria dapat menstimulasi produksi *reactive oxygen spesies* (ROS) (Turrens, 1997). ROS merupakan molekul reaktif yang mengandung molekul oksigen dan radikal bebas yang dapat menyebabkan stress oksidatif dan menyebabkan kerusakan molekul DNA, protein dan lipid (Bai *et al.*, 2005).

ROS pada mitokondria yang terpapar rotenon dihasilkan akibat hambatan pada kompleks I mitokondria memproduksi O_2 yang pada akhirnya membentuk H_2O_2 . Tingginya produksi ROS pada mitokondria dapat berakibat terganggunya aktivitas mitokondria dan dapat menyebabkan kematian sel (apoptosis) (Murphy, 2009).

Rotenon dapat meningkatkan ekspresi Hsp 60 dan Bax yang dapat mengarah pada apoptosis sel (Wijayanti *et al.*, 2016). Rotenon menyebabkan apoptosis dengan cara menghambat kompleks I mitokondria, rotenon menstimulasi apoptosis melalui jalur intraseluler p38 JNK MAPK phatway, aktivasi jalur instriksik ini menginduksi protein Bcl 2 ke mitokondria dan membentuk tulang yang menyebabkan lepasnya *cytochrom c* ke sitosol dan

memicu caspase 9 mengaktifkan caspase 3 (Hu *et al.*, 2008). Stress oksidatif dapat menghambat pertumbuhan tulang dengan cara menghambat diferensiasi osteoblast melalui *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) dan ERK-dependent *NF- κ signal pathway* (Bai *et al.*, 2005). Penelitian yang dilakukan oleh Wolney *et al.* (2009) menyatakan bahwa anak-anak dengan keadaan mitokondria terganggu memiliki tubuh yang lebih pendek. Berdasarkan penelitian Ariati *et al.* (2017) menyatakan bahwa rotenon dengan konsentrasi 12,5 ppb dapat menurunkan ekspresi OPG (osteoprotegrin) dan dapat meningkatkan ekspresi RANKL (*Receptor Activator Nuclear Kappa- β Ligan*) pada stunting larva zebrafish (*Danio rerio*). OPG dan RANKL merupakan penanda pertumbuhan tulang untuk menilai proses osteoblastogenesis. Osteoprotegrin merupakan suatu reseptor umpan terlarut untuk RANKL/osteoclast faktor diferensiasi, yang dapat menghambat diferensiasi dan fungsi osteoklast (Undagawa *et al.*, 2000). OPG akan berikatan dengan RANKL untuk mencegah interaksi RANK-RANKL pada progenitor osteoklast. Apabila OPG berikatan dengan RANKL maka dapat menghambat osteoklastogenesis, menurunkan masa hidup osteoklas, dan menginduksi apoptosis osteoklas, sebaliknya jika RANK-RANKL berinteraksi maka memicu diferensiasi, aktivitas dan lama hidup dari osteoklas (Schoppet, 2002). Berdasarkan penelitian Sihombing (2012) menyatakan bahwa jika terjadi peningkatan aktivitas osteoklas (osteoklastogenesis) maka produksi interleukin 6 (IL-6) juga meningkat, ini menandakan bahwa adanya proses inflammasi yang meningkat pada proses pembentukan tulang (osifikasi tulang).



Gambar 2.10 Ketergantungan terhadap osteoblast dalam diferensiasi osteoklas

Keterangan : Pembentukan osteoklas matur mutlak memerlukan interaksi dengan prekursor osteoblas melalui interaksi RANK dengan ligannya/RANKL (Teitelbaum *et al.*, 2003).

2.6 Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan (*Centella asiatica*) atau *Centella asiatica* L. (Gotu Kola) Urban merupakan herbal yang dapat ditemukan di daerah tropis wilayah Asia Tenggara seperti Indonesia, Malaysia, Sri Langka, India dan China terdapat juga di Afrika Selatan dan Madagaskar (Orhan, 2012). Keajaiban dari kandungan *Centella asiatica* atau pegagan telah terkenal sejak 2000 tahun yang lalu (Gohil, 2010). Di India dan Afrika pegagan telah digunakan untuk mengobati berbagai penyakit lepra, di Perancis pegagan sudah ditetapkan sebagai obat farmakopi, di India penduduk telah lama menggunakan serbuk *Centella asiatica* untuk di seduh dengan air panas dengan tujuan meningkatkan daya ingatan (Winarto, 2003), di Bangladesh masyarakat meminum jus daun *Centella asiatica* setiap pagi hari pada saat perut masih kosong dengan tujuan mengobati *Jaundice* (Rahmatullah *et al.*, 2011). Sejak zaman dahulu, pegagan telah digunakan untuk obat

tradisional. Akhir-akhir ini, pemanfaatannya di bidang farmakologi sangat berkembang pesat (Damaiyani & Metusula, 2011).

2.6.1 Klasifikasi Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan berdasarkan Jahan *et al* (2012) diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Eukaryota
Subkingdom	: Embryophyta
Devisi	: Spermatophyta
Subdevisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Subkelas	: Rosidae
Superorder	: Aralianae
Order	: Araliales (<i>Umbelliflorae</i>)
Family	: <i>Aplaceae</i> or <i>Umbelliferae</i>
Subfamily	: <i>Hydrocotyle</i>
Genus	: <i>Centella</i>
Spesies	: <i>Centella asiatica</i>

Di Indonesia pegagan memiliki beberapa nama lain berdasarkan daerahnya di Sumatera (Aceh) dikenal dengan nama daun kaki kuda, daun pegagan, rumput kaki kuda, (Melayu) kaki kuda, (Minangkabau) Pegago, pugago, Jawa (Sunda) cowet gopeng, antanan gede, antanan benar, Bali gagan-gagan, ganggagan, kerok batok, panegowang, panigowang, rending, palduh, penggaga, keke lere (sawo), Maluku : sarowati (Halmahera), kolotidi manora (Ternate), Sulawesi : pagaga, wisu-wisu (Makasar), cipubalawo (Bugis), hisu-hisu (Salayar) : Papua : Dogauke, gogauke, sandanan (BPOM, 2010). Di negara lain *Centella asiatica* juga memiliki berbagai nama diantaranya Gotu Kola (Amerika), *Coctyliole asiaticque* (Inggris), ban dai uyeh (Cina), Brahmi (India), takip kohol (Thailand).

2.6.2 Morfologi Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan merupakan tanaman herba tahunan memiliki batang berupa stolon dengan panjang 10-80 cm, menjalar diatas tanah. Tanaman ini memiliki daun tunggal yang terdiri atas dua sampai sepuluh daun berwarna hijau, berbentuk kipas atau ginjal, bagian muka serta punggung licin, bagian tepi bergerigi, kadangkala berambut, tulang berpusat di pangkal kemudian menyebar ke ujung dan memiliki diameter satu hingga tujuh cm (Winarto, 2003).

Tangkai daun berbentuk seperti pelepah, agak panjang berukuran 5-15 cm, tangkai bunga pegagan sangat pendek, keluar dari ketiak daun, tersusun seperti payung berwarna putih sampai merah muda. Jumlah tangkai bunga antara 1-5. Bentuk bunga bundar lonjong, cekung dan runcing ke ujung dengan ukuran sangat kecil berbentuk bunga majemuk. Kelopak bunga tidak bercuping serta tajuk bunga berbentuk bulat telur, terdiri dari 3-5 bunga (Winarto, 2003).

Buah pegagan berukuran kecil, panjang 2-2,5 mm, lebar 7 mm, berbentuk lonjong atau pipih, menggantung, baunya wangi, berdinding agak tebal, kulit keras dan berwarna kuning. Akarnya rimpang dengan banyak stolon, berkelompok dan lama kelamaan meluas hingga menutupi tanah, merayap dan berbuku-buku. Akar keluar dari buku-buku dan tumbuh masuk ke dalam tanah. Akar berwarna kemerah-merahan (Winarto, 2003).

2.6.3 Habitat Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan merupakan tanaman herba yang tumbuh dan hidup subur pada daerah tropis serta sub tropis, tumbuh pula di ketinggian 1-2.500 meter dari permukaan laut, di Asia tumbuh berlimpah pada tempat yang luas dan terbuka. Di Indonesia pegagan bisa tumbuh di tempat terbuka, cenderung lembab contoh selokan, pesawahan, pinggir jalan, savana serta pada tembok bagian pinggir serta bebatuan dan tepi sungai (Chandrika, 2015).

2.6.4 Kandungan Pegagan (*Centella asiatica*)

Centella asiatica memiliki berbagai kandungan diantaranya :

1. Kandungan Kimia

Kandungan kimia utama dalam *Centella asiatica* adalah *triterpen saponin*.

Triterpenoid menjadi biomarker utama terhadap kualitas dari *Centella asiatica* dimana kualitas *triterpenoid* itu sendiri dipengaruhi oleh lokasi dan kondisi lingkungan tumbuhnya tanaman tersebut (James & Durbey, 2009).

Adapun 4 zat aktif utama *triterpen* dalam *Centella asiatica* yaitu :

Tabel 2.2 Kandungan Triterpenoid *Centella asiatica*

Jenis Triterpenoid	Konsentrasi triterpenoid dalam ekstrak <i>Centella asiatica</i> (mg/ml)
<i>Madecassoside</i>	3.10 ± 4.58
<i>Asiaticoside</i>	1.97 ± 2.65
<i>Madecassic acid</i>	0.55 ± 2.29
<i>Asiatic acid</i>	0.55 ± 0.89

(Hasyim *et al*, 2011)

2. Kandungan Nutrisi (zat gizi)

Centella asiatica mengandung air dalam jumlah yang tinggi, disamping itu mengandung zat gizi makro dan mikro, protein serta vitamin, seperti caroten, tiamin dan asam askorbat. Berikut ini komposisi zat gizi yang dimiliki *Centella asiatica* yaitu :

Tabel 2.3 Kandungan Zat Gizi (Nutrisi) *Centella asiatica*

Komposisi	Nilai
Moisture	84,6%
Protein	2,4%
Fiber (per 100g) (Insoluble dietary)	5.43 g
Soluble dietary	0.49 g
Mineral (mg/100g)	
Kalsium	174
Phospor	32
Kalium	345
Natrium	107.8
Magnesium	87
Fe (Besi)	74,3
Zinc (Seng)	32,51
Cuprum	0.24
Crom	0.046
Ascorbic	11
Thiamine	0.04
Carotene	25.93
β Carotene	3.90

(Hasyim *et al.*, 2011; Joshi & Chaturvedi, 2013)

3. Kandungan *Flavonoid*

Centella asiatica mengandung *flavonoid* sebagai berikut :

- a. *3-glucosylquecetin*, *3-glucosylkaemferol*, dan *7- glucosylkaemferol*
- b. Dua *flavonoid* baru bernama *castilliferol 1* dan *castilliferol 2*
- c. Turunan *flavonoid* seperti *quercetin*, *kaemferl*, *patuletin*, *katenin*, *palutelin*, *castilliferor* *castillicetin* dan *myricetin*.

2.6.5 Manfaat Pegagan (*Centella asiatica*)

Centella asiatica karena kaya akan kandungan kimia dan nutrisi, maka ia mempunyai beberapa faedah menguntungkan bagi kesehatan tubuh (Winarto, 2003). Manfaat *Centella asiatica* antara lain :

1. Antioksidan

Radikal bebas diketahui dapat terjadi akibat adanya proses oksidasi pada senyawa oksigen yang berada pada kondisi stabil kemudian berubah menjadi senyawa tidak stabil, senyawa oksigen yang tidak stabil ini akan merusak jaringan untuk memperoleh energi agar dapat kembali mencapai keadaan stabil. Pemicu radikal bebas salah satunya paparan toksik, untuk melindungi sel dari kerusakan oksidatif oleh oksidan, yang dihasilkan selama metabolisme oksigen, sistem antioksidan digunakan oleh organisme aerobik (Pittela *et al.*, 2009). *Centella asiatica* memiliki kandungan *triterpene* yang tinggi yang dapat memberikan efek antioksidan dan penyembuhan luka (Rahman *et al.*, 2013). Kandungan antioksidan yang tinggi pada *Centella asiatica* berdasarkan studi *in vitro* dapat bekerja pada tiga jalur yaitu aktivitas *free* radikal superoksida (86,4%), menghambat peroksida asam linoleat (98,2%) dan aktivitas *scavenging* radikal (92,7%) (Vimala *et al.*, 2003). Berdasarkan Hashim *et al* (2011) aktivitas antioksidan pada *Centella asiatica* sebesar 84% lebih tinggi dibanding biji anggur yaitu (83%) sedangkan Vitamin C (88%). Selain kandungan *triterpene* kandungan yang dapat berperan sebagai antioksidan adalah kandungan *flavonoid*, *flavonoid* mampu memainkan peran dalam tubuh sebagai antioksidan penting (Chandrika *et al.*, 2015).

2. Anti Inflammasi

Ekstrak *Centella asiatica* bermanfaat sebagai anti inflammasi. Kandungan *Centella asiatica* yang mampu memiliki efek anti inflammasi adalah *flavonoid* dan *triterpene* (Chippada, 2011). Pemberian ekstrak *Centella asiatica* pada tikus artritis dengan dosis (3, 10 dan 30 mg/kg). Arthritis dievaluasi dengan pembengkakan belakang kaki, indeks polyarthritis, dan pemeriksaan histologi. Hasil penelitian didapatkan ekstrak *Centella asiatica* mengurangi

proliferasi sel limpa, menurunkan tingkat plasma TNF- α dan IL-6, serta mengurangi enzim PGE2 dan ekspresi COX-2 sehingga menghambat mediator proinflammasi (Li *et al.*, 2009).

3. Neuroprotectif

Pemberian ekstrak daun segar dari *Centella asiatica* pada tikus dewasa dengan dosis 2,4 dan 6 ml/kg selama 2, 4 dan 6 minggu kemudian hapusan otak diamati di bawah mikroskop, menunjukkan bahwa ekstrak yang diberikan pada dosis 6 ml/kg selama 6 minggu menyebabkan peningkatan struktur percabangan dendritik dalam neuron (Dhanasekaran *et al.*, 2009).

4. Antimikrobia

Penelitian yang dilakukan untuk mempelajari aktivitas antimikroba dari *petroleum eter*, etanol dan ekstrak tanaman pegagan dengan metode difusi. Penelitian dilakukan dengan membandingkan ekstrak *Centella asiatica* dosis 62,5, 125, 250, 500 dan 1000 mg/ml terhadap beberapa strain yang dipilih diukur dan dibandingkan dengan antibiotik standar *ciprofloxacin* (10 μ g/ml). Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Centella asiatica* memiliki aktivitas antimikroba yang lebih tinggi dari *petroleum eter* dan ekstrak air (Jagtap *et al.*, 2009).

5. Kardioprotektif

Penelitian pada tikus *infark miokard* yang dievaluasi secara menyeluruh mengenai kardioprotektif terhadap *iskemia-reperfusi*. Kegiatan kardioprotektif dipelajari dengan mengukur ukuran *infark* dan memperkirakan tingkat peroksida lipid dalam serum dan jaringan hati, serta elektrokardiogram II digunakan untuk memantau percobaan. Pemberian dosis 100-1000 mg ekstrak alkohol dari *Hydrocotyle asiatica L* yang tergantung pengurangan persen ventrikel kiri nekrosis (PLVN) serta tingkat lipid peroksida pada tikus per oral selama 7 hari dibandingkan dengan kontrol hewan, didapatkan

bahwa ekstrak *hydrocotyle asiatica* L memiliki aktivitas kardioprotektif dalam membatasi *iskemia-reperfusi* yang disebabkan cedera *miokard* (Pragada *et al.*, 2004).

6. Manfaat lain dari *centella asiatica* adalah sebagai anti diabetes, anticemas, anti protozoa, penyakit vaskuler dan dapat menurunkan retardasi mental (Jamil *et al.*, 2007), berdasarkan Jamer *et al* (2009) *Centella asiatica* memiliki manfaat lain diantaranya *Anti-ageing* kosmetik, pemberian terapi setelah laser, anti selulit, perawatan kulit, *stretch marks*, anti jerawat, anti alergi, mencegah kulit kemerahan dan teriritasi.

2.6.6 Hubungan Manfaat Pegagan (*Centella Asiatica*) dengan *Stunting*

Berdasarkan penelitian Primihastuti *et al* (2017) pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* konsentrasi 2,5 µg/ml dan 5 µg/ml dapat meningkatkan panjang badan pada model *stunting* larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon 12,5 ppb, meskipun belum dapat mengoreksi/mengembalikan 100% pada ukuran panjang badan normal. Pada penelitian ini juga ditemukan bahwa pemberian ekstrak etanol pegagan konsentrasi 5 µg/ml dapat meningkatkan osifikasi tulang (proses pembentukan tulang) dan menurunkan ekspresi RANKL pada model *stunting* larva *zebrafish*. Sedangkan menurut Ariati *et al* (2017) pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* dengan konsentrasi 1,25, 2,5 dan 5 µg/ml pada model *stunting* larva *zebrafish* dapat meningkatkan ekspresi OPG dan penurunan ekspresi RANKL. RANKL dan OPG merupakan biomarker terjadinya osifikasi tulang yang sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan tulang, sedangkan pertumbuhan tulang dapat menentukan pertumbuhan linier berikutnya.

2.6.7 Dosis dan Toksisitas

Dosis standar pegagan (*Centella asiatica*) untuk orang dewasa berbeda-beda tergantung pada tujuan penggunaan. Namun beberapa penelitian telah menggunakan ekstrak standar yaitu pada dosis 90-120 mg per hari. Ekstrak standar harus mengandung 40% *asiaticoside*, 29-30% *asam asiatic*, 29-30% *asam madecassic* dan 1-2% *madecassoside* (UMCC, 2015).

Sulastri (2009) melaporkan uji toksisitas akut terhadap pegagan, studi penelitiannya pegagan hingga dosis 2000 mg/kgBB tidak menimbulkan toksis, karena tidak ada kematian pada hewan coba dan tidak terdapat toksikan secara klinik yang bermakna di seluruh kelompok hewan coba yang diamati, efek samping jarang terjadi, tetapi dimungkinkan dapat terjadi alergi kulit dan sensasi terbakar pada penggunaan eksternal, sakit kepala/pusing, sakit perut, mual dan muntah. Namun hal ini cenderung terjadi pada penggunaan *Centella asiatica* dosis tinggi (UMCC, 2015).

2.7 *Zebrafish* (*Denio rerio*)

Zebrafish merupakan ikan air tawar yang berasal dari pedalaman sungai di India mulai dari cekungan Gangga dan Brahmaputra sungai Bangladesh, India, dan Nepal. *Zebrafish* juga terdistribusi di daerah Asia Tenggara bahkan dapat ditemukan di Amerika (Mayden, 2007; Spence, 2008). *Zebrafish* memiliki taksonomi sebagai berikut :

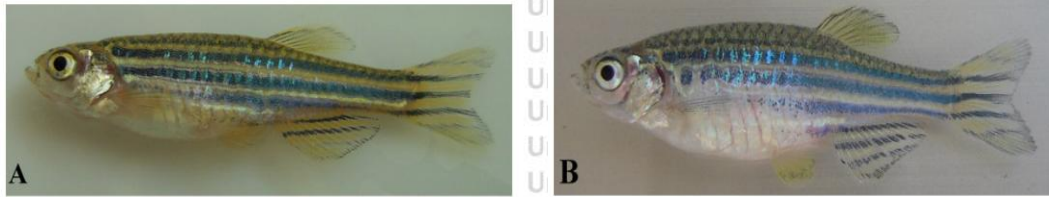
Tabel 2.4 Klasifikasi Zebrafish

Tingkatan	Nama
Kingdom	Animal
Filum	Chordota
Kelas	Actynoptergii
Ordo	Cypriniformes
Famili	Cyprinidae
Subfamili	Rasborine
Genus	Brachydanio
Spesies	Brachydanio rerio

Sumber : Richard, 2011

Zebrafish mempunyai nama lain yaitu *Denio rerio*, *leopard denio*, *Bony Fish*, *brachyodanio rerio* dan *zebra denio* (Richard, 2011). Ikan ini merupakan ikan yang lebih bertahan hidup dengan berkoloni. Ikan zebrafish memiliki siklus hidup 14 jam gelap dan 10 jam terang (Whitmore *et al.*, 2000). Rentang hidup zebrafish berkisar antara 2-3 tahun, bahkan sampai dengan 5 tahun bila dalam perawatan dan pemeliharaan. Zebrafish dikatakan usia dewasa bila memiliki umur lebih dari 90 dpf, rata-rata panjang ikan dewasa 2-3 cm, pada usia 2-3 tahun panjang dapat mencapai 4-5 cm.

Ikan dewasa memiliki garis-garis hitam dan putih horizontal pada tubuhnya mulai dari sirip hingga ekor (*caudal fin*) yang tampak seperti zebra, warna lain yang dapat muncul adalah garis biru hitam dan perak kuning. Terdapat perbedaan warna pada jenis ikan jantan dan betina, ikan jantan memiliki warna lebih terang dari pada betina pada daerah sirip samping dan ekor (Slancev *et al.*, 2005). Perbedaan lain yang dapat ditemukan antara jantan dan betina adalah bentuk tubuh dan aktivitas, bentuk tubuh ikan betina lebih gemuk di daerah perut dibanding ikan jantan (Schilling, 2002; Sneksner *et al.*, 2010), pada aktivitas ikan jantan lebih agresif dari pada ikan betina (Pyron, 2003).



Gambar 2.11 Perbedaan zebrafish jantan dan betina

Keterangan : Pada gambar A adalah zebrafish jantan, sedangkan gambar B adalah zebrafish betina (Avdesh *et al.*, 2012).

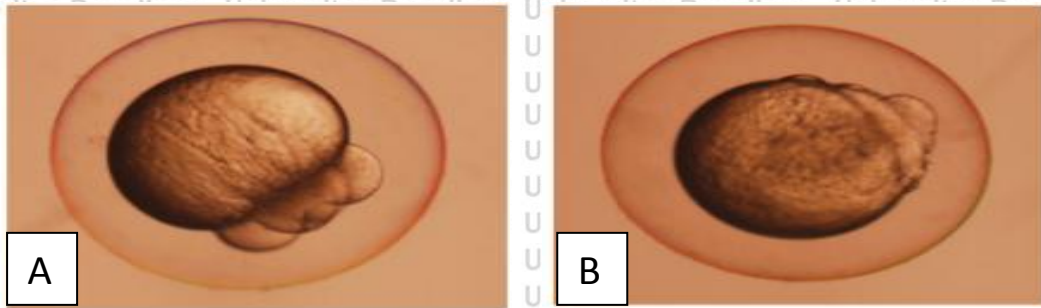
2.7.1 Perkembangan Zebrafish

Zebrafish merupakan jenis ikan yang berkembang biak dengan bertelur, ikan betina mampu bertelur 2-3 hari sebanyak 200 telur per minggu. Ikan ini memiliki siklus gelap terang yaitu 10:14 (Sharif, 2014). Cahaya merupakan isyarat kawin, ikan betina akan bertelur sesaat 30 menit setelah lampu dinyalakan (jika di laboratorium) atau matahari terbit (jika dalam lingkungan alam) dan akan dibuahi oleh ikan jantan. Proses pembuahan telur ikan terjadi diluar tubuh, sehingga terjadinya fertilisasi tergantung dari ikan jantan (Richard, 2011).

Segera setelah telur dilepas oleh ikan betina akan terjadi fertilisasi, namun jika tidak dibuahi pertumbuhan telur terhenti dan akan mati. Fertilisasi merupakan awal dari perkembangan *zebrafish* yang akan menghasilkan zigot.

Terdapat tujuh tahap perkembangan embrio *zebrafish*, *Danio (brachydanio)* mulai dari *embryogenesis* sampai dengan zigot melalui proses : pembelahan (*cleavage*), *blastula*, *gastrula*, segmentasi, *pharyngula*, dan *hatching periods*.

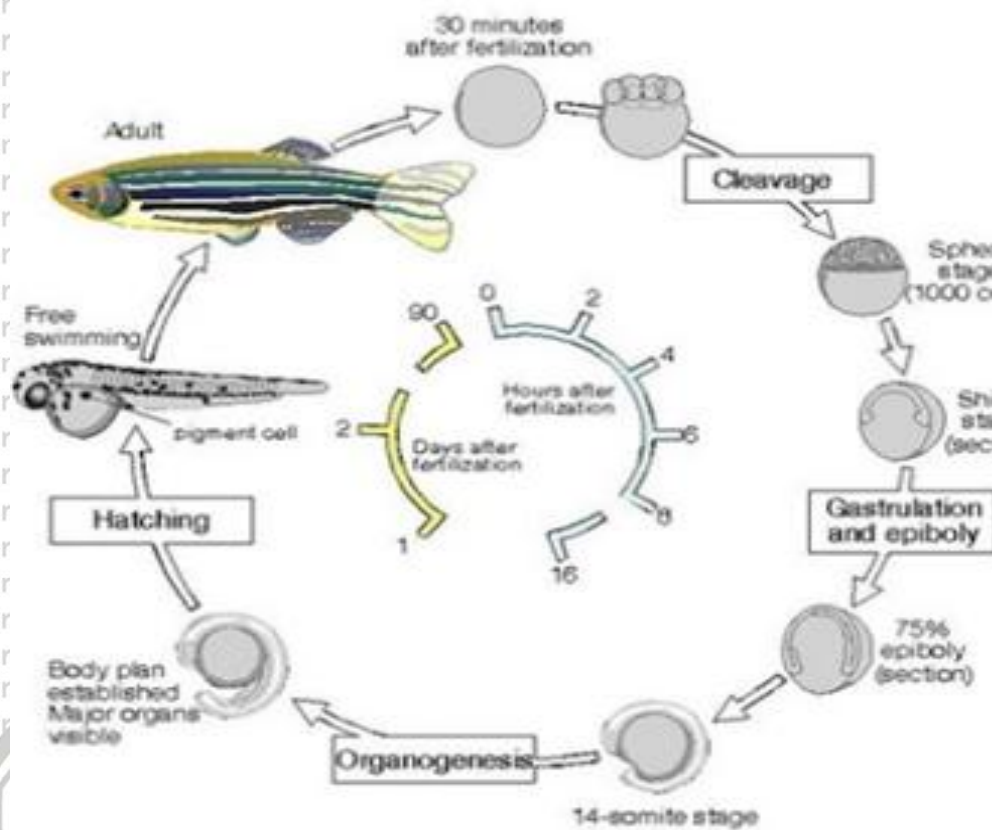
Tiga hari pertama (72 jam) merupakan tahap utama dalam perkembangan embrio dari awal setelah terjadinya fertilisasi (Kimmel *et al.*, 1995).



Gambar 2.12 Perbedaan telur zebrafish yang fertil dan yang tidak fertil

Keterangan : Gambar bagian A adalah telur zebrafish yang fertil, bagian B adalah telur yang tidak fertil (Avdesh *et al.*, 2012).

Post embryonic development dapat didefinisikan sebagai periode setelah *embryogenesis* termasuk pertumbuhan dari bentuk dan morfogenesis selama perkembangan menuju dewasa. *Post embryonic development* diawali dari larva (seekor individu) yaitu fase diantara embrio dan *juvenile* yaitu usia ~ 4 minggu post fertilisasi sampai 6-12 minggu post fertilisasi, merupakan periode menuju dewasa namun belum terjadi maturitas seksual, terdapat pencapaian bentuk dan telah kehilangan *larva fin fold*. Periode dewasa (*Adult*) didefinisikan sebagai individu yang dapat memproduksi gamet dan viabel serta menunjukkan karakteristik seksual sekunder saat perkawinan (Parichy *et al.*, 2009).



Gambar 2.13 Siklus hidup zebrafish

Keterangan : Siklus hidup ikan zebra. Perkembangan zebrafish yang cepat dengan embrio yang dibuahi berubah menjadi 1000 sel dalam waktu 4 jam *postfertilization* (hpf) dan organ-organ yang terlihat pada kira-kira 1 hari *postfertilization* (dpf). Hatching terjadi pada 2-3 dpf dan ikan zebra dewasa dalam waktu 2-3 bulan (Syed, 2015).

Tahap perkembangan embrio secara fisiologis berdasarkan Kimmel (1995) dan Mendieta-Serrano *et al* (2013) yang meneliti proliferasi embrio *zebrafish* melalui *fluorescence* dijelaskan pada berikut ini :

Tabel 2.5 Tahapan Awal Perkembangan Zebrafish

Periode	Tahap	Mulai ke-	Keterangan
Zygote (0-0.75 jam)	1 sel	0 jam	Telur yang baru dibuahi akan menyelesaikan siklus zygote yang pertama
Cleavage/ Pembuahan (0.75-2.25 jam)	2 sel	0.75 jam	pembelahan sel partial
	4 sel	1.00 jam	Tersusun blastomer 2x2
	8 sel	1.25 jam	Tersusun blastomer 2x4



	16 sel	1.50 jam	Tersusun blastomer 4x4
	32 sel	1.75 jam	Tersusun blastomer 4 x 8
	64 sel	2.00 jam	Tersusun 3 tingkatan reguler blastomer
Blastula (2.25-5.25 jam)	128 sel	2.25 jam	Terdapat penipisan kedua yolk
	256 sel	2.50 jam	sincitia layer dan blastoderm yang
	512 sel	2.75 jam	melewati yolk sel (epiboly),
	1k sel	3.00 jam	berubahnya blastokist menjadi
	High	3.33 jam	blastoderm
	Oblong	3.66 jam	
	Sphere	4.00 jam	
	Dome	4.33 jam	
Gastrula (5.25-10.33 jam)	30%-epiboly	4.66 jam	
	50% epiboly	5.25 jam	Epiboly terbentuknya sempurna,
	Germ ring	5.66 jam	terbentuk tail bud, primary germ cell
	Shield	6.00 jam	dan embrionik axis
	74%-epiboly	8.00 jam	
Segmentasi (10.33-24 jam)	90% epiboly	9.00 jam	
	Bud	10.00 jam	
	1-4 somites	10.33 jam	Awal somite furrow
	5-9 somites	11.66 jam	Terbentuknya neural, teridentifikasi opic primordium.
	10-13 somit	14 jam	Awal terbentuknya ginjal
	14-19 somit	16 jam	EL (Embryo length) : 0,9 mm, otic placode (telinga), brain neuromeres
	20-25 somit	19 jam	Panjang embrio: 1,4 mm, lens, otic vesicle, hindbraid neuromeres (merupakan awal dari organogenesis)
Pharingula (24-48 jam)	26+ somit	22 jam	Panjang embrio: 1,6 mm, Terbentuk pulau darah, otoliths, batas otak tengah-otak belakang (awal pembentukan dan diferensiasi sel darah merah, ekor mulai terlihat, terjadi pemanjangan ekor di bagian anterior dan terbentuk kurva di ventral)
	Prim-5	24 jam	Panjang embrio : 1,9 mm. Tahap pylotypic embrio, sumbu tubuh mulai lurus, dari lengkung awal yolksack, sirkulasi mulai terbentuk,
	Prim-15	30 jam	Panjang embrio : 2,5 mm, Terbentuk refleks awal sentuhan; pigmentasi pada retina

	Prim-25	36 jam	Panjang embrio : 2,7 mm; motilitas awal; pigmentasi ekor.
	High-pec	42 jam	Panjang embrio: 2,9 mm; terbentuk dasar sirip dada
Menetas/hatching (48-72 jam)	Long-pec	48 jam	Panjang Embrio = 3,1 mm, Kuncup sirip dada memanjang. Bentuk sistem organ telah sempurna, perkembangan kartilago pada kepala dan sirip pectoral
	Pec-tin	60 jam	EL = 3,3 mm, sirip dada berbentuk helaian. persiapan terjadinya hatching yang akan terjadi secara asinkronisasi

Post Embrionic development

Larva (4-29 hari)

Protruding-mouth	72 jam	Panjang badan 3,5 mm Embrio keluar dari korion, mampu berenang, adanya tunas filament insang.
4 hari	96 jam	Panjang badan 3,7 mm. mampu bergerak menjauh bila disentuh, kandung kemih mengembang
5 hari	120 jam	Panjang badan 3,9 mm, Memiliki 6 gigi, aktif makan
6 hari	144 jam	Panjang badan 4,2 mm
7-13 hari	168 jam	Panjang badan 4,5 mm, memiliki gigi 8, tumbuh tulang rawan di belakang
14-20 hari	14 hari	Panjang badan 6,2 mm, memiliki gigi 10 gigi, saraf dan neuron sempurna.
21-29 hari	21 hari	Panjang badan 7,8 mm. Pembentukan tulang faringeal dorsal dan tunas sirip anal

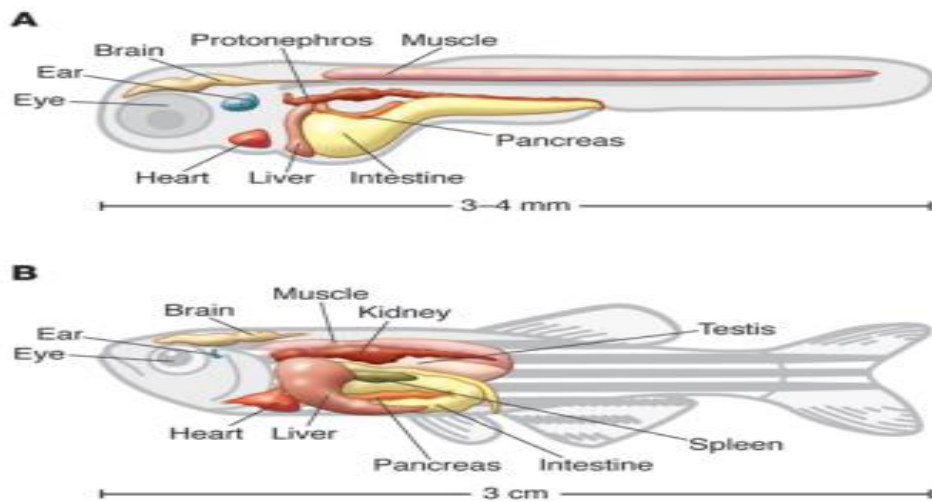
Juvenile (30-89 hari)

30-44 hari	30 hari	Panjang Badan 10 mm. Memiliki sirip dewasa dan muncul pigmentasi.
45-89 hari	45 hari	Panjang badan 14 mm. Memiliki gigi 12 buah. Terbentuknya garis-garis pada tubuh

Adult (Dewasa) (90 hari-2 tahun)

90 hari	Terjadi kematangan sel (siap kawin) Mulai terdapat kematian
---------	---

(Kimmel & Ballard Scilling, 1995)



Gambar 2.14 Larva zebrafish dan zebrafish dewasa

Keterangan : Pada gambar bagian A adalah larva zebrafish usia 3-5 dpf beserta organ dan panjang badan. Pada gambar bagian B adalah zebrafish dewasa beserta organ dan panjang badan (Santoriello *et al.*, 2012).

Usia *zebrafish* dapat dianalogikan dengan usia manusia berdasarkan penelitian Sorribes *et al* (2013) yang menyatakan bahwa dari ontogeny siklus bangun tidur menunjukkan bahwa usia 6-10 hari usia *zebrafish* analog dengan usia anak-anak 2-8 tahun pada manusia, usia 4-6 minggu pada *zebrafish* analog dengan usia praremaja dan remaja 11-16 tahun pada manusia, usia dewasa awal 4-6 bulan pada *zebrafish* analog dengan usia 23-43 tahun pada manusia, usia 12 bulan pada *zebrafish* analog dengan usia dewasa tua pada manusia 50 tahun ke atas (49-74 tahun).

Zebrafish merupakan hewan omnivora, pada habitat normal *zebrafish* memakan zooplankton, serangga, fitoplankton, lumut dan spora telur invertebrata, sisik ikan, arakhnida, detritus, pasir dan lumpur. Ikan yang dipelihara di Laboratorium Farmako FKUB Malang makanannya Tetramin.

Zebrafish mampu makan sendiri sejak usia 5 hari post fertilisasi, hal ini dikarenakan cadangan makanan dalam yolksac telah berkurang (Reed *et al.*, 2010).

2.7.2 Faktor Lingkungan Yang Mempengaruhi Perkembangan Zebrafish

Ada beberapa faktor lingkungan yang mempengaruhi perkembangan hidup *zebrafish* yaitu :

1. Kebersihan

Kebersihan aquarium merupakan hal penting dalam proses perkembangan *zebrafish*. Kebersihan yang harus dijaga diantaranya adalah kebersihan air, kebersihan spon penyaring. Aquarium dikuras setidaknya seminggu sekali, spon penyaring juga diganti minimal 3 hari sekali. Sebelum ikan dimasukkan dalam aquarium, air terlebih dahulu diberikan anti chlorin (*fish all*) selama 30 menit.

2. Temperatur

Suhu yang digunakan untuk pemeliharaan *zebrafish* yang baik yaitu berkisar 26-28°C, suhu yang tinggi dapat mengakibatkan kandungan oksigen pada air berkurang.

3. pH

Kadar pH untuk pemeliharaan *zebrafish* adalah 6,8-7,5. Apabila pH terlalu asam (2-3,5) dapat menyebabkan ikan hipoksia yang disebabkan pengeluaran lendir yang banyak dari pH yang tinggi sehingga mengganggu insang untuk bernafas. Kadar pH 4,0-4,5 menyebabkan asidosis pada ikan, menyebabkan pengentalan darah akibat pengaruh ion Na dan Cl (Avdesh *et al.*, 2012).

4. Pencahayaan

Ikan *zebrafish* sangat peka terhadap cahaya. Ikan ini memiliki siklus gelap terang dengan perbandingan 10 jam gelap : 14 jam terang, penentuan awal mulainya siklus gelap terang sesuai dengan keinginan peneliti. Siklus gelap terang diatur dengan cara menghidupkan dan mematikan lampu aquarium yang telah diatur secara otomatis. Seketika cahaya dihidupkan ikan dewasa

betina merespon untuk bertelur dan ikan jantan membuahi (Nusslein *et al.*, 2002; Avdesh *et al.*, 2012).

5. Stressor

Zebrafish merupakan ikan yang mudah stress, sehingga untuk pemeliharaan *zebrafish* diperlukan tempat yang tenang dan tidak bising suara, ikan ini tipe ikan yang suka bergerombol.

6. Jauhkan dari bahan yang bersifat toksin.

2.7.3 *Zebrafish* Sebagai Model Penelitian

Ada beberapa keunggulan yang dimiliki oleh *zebrafish* sehingga banyak diminati peneliti sebagai model penelitian biomedis, yaitu :

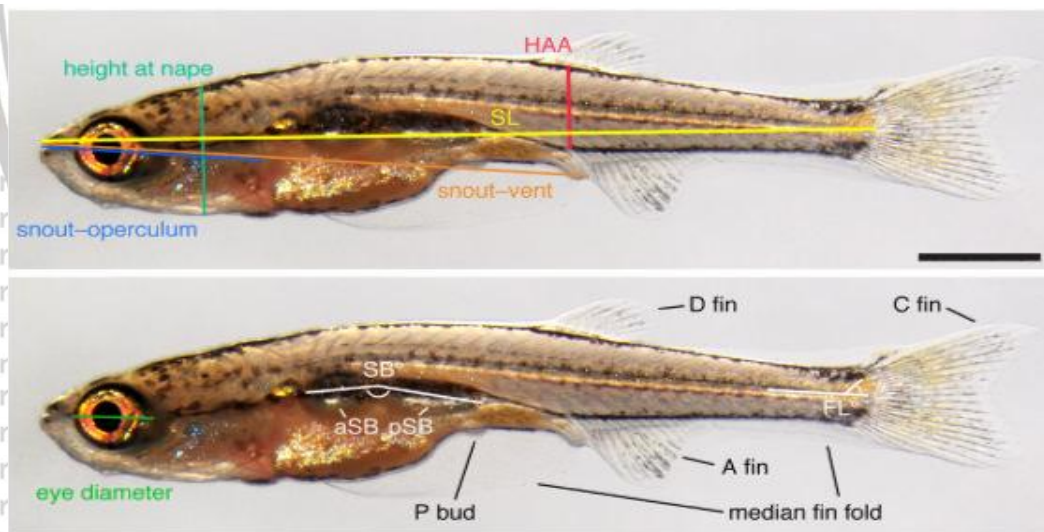
1. Keuntungan utama dari *zebrafish* dalam penelitian biomedis adalah tingkat kemiripannya dengan manusia. Informasi genetik *zebrafish* menunjukkan bahwa 70% gen manusia terdapat pada *zebrafish*, yang berarti bahwa hasil-hasil penemuan dari studi *zebrafish* kemungkinan besar dapat diaplikasikan pada manusia (Santoriello & Zon, 2012; Astuti, 2013). Sebesar 80% gen analisa dari *Expressed sequence Tags* (ESTs) memperlihatkan dua atau lebih gen saling berhubungan antara *zebrafish* dengan manusia serta 56% gen memiliki segmen yang homolog (Barbazuk *et al.*, 2000). Pemahaman terhadap genom *zebrafish* dan genom manusia sangat membantu dalam mengidentifikasi mutasi yang terjadi dan membantu memudahkan dalam mengidentifikasi gen-gen yang terlibat dalam menyebabkan suatu penyakit yang terjadi pada manusia. Persamaan lainnya antara *zebrafish* dan manusia yaitu pada sistem saluran pencernaan, jaringan adiposa visceral, dan sistem otot rangka (Yuniarto *et al.*, 2017).



2. Tingkat reproduksi/pembiakan *zebrafish* sangat tinggi, dari sepasang *zebrafish* bisa menghasilkan ± 200 embrio setiap minggu (Richard, 2011; Astuti, 2013).
3. Memudahkan pengamatan oleh peneliti karena :
 - a. Perkembangan embrio terjadi di luar uterus (rahim), ini mempermudah peneliti untuk manipulasi atau mengamati (Astuti, 2013).
 - b. Kulit *zebrafish* transparan, sehingga memudahkan pengamatan proses perkembangan organ secara langsung dibawah mikroskop (Astuti, 2013)
 - c. Bentuk *zebrafish* kecil (Astuti, 2013).
 - d. Perkembangan *zebrafish* (embrio-larva-adult) terjadi sangat cepat sehingga pengamatan tidak memakan waktu lama. Dalam 24 jam, organ-organ penting sudah mulai terbentuk, jantung sudah berkontraksi dan sirkulasi darah sudah berjalan (Astuti, 2013).
4. *Zebrafish* dewasa usia 3-4 bulan, sehingga mencapai kematangan seksual lebih cepat dan dapat segera mulai berreproduksi.
5. Pemeliharaan tidak membutuhkan ruang yang besar karena ukuran *zebrafish* dewasa sekitar 2-3 cm sehingga biaya lebih murah dalam pemeliharaan dibanding tikus.
6. Secara logistik menjadikan *zebrafish* sebagai organisme yang ideal untuk penelitian yang membutuhkan jumlah sampel yang besar seperti dalam studi *screening*.

Ada beberapa aplikasi *zebrafish* yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti sebagai model eksperimental atau model penelitian diantaranya yaitu sebagai model obesitas, diabetes melitus, gangguan ginjal, gangguan jantung, gangguan pencernaan, gangguan sistem saraf pusat, gangguan sistem immunitas, dislipidemia, perlemakan hati, kanker, penyakit genetika, hemofilia, dan osteoporosis (Santoriello & Zon, 2012; Yuniarto *et al.*, 2017).

Penelitian dengan model *zebrafish* pada tumbuh kembang telah dilakukan oleh Macdonald *et al* (2016). Pada penelitian ini model *zebrafish* diinduksi dengan paparan *methimazole* (MMI) dengan hasil penelitiannya menggambarkan bahwa *methimazole* mampu menghambat/mengganggu pertumbuhan *zebrafish* yang ditandai dengan pemendekan panjang badan pada 24 hpf sebesar $\pm 0,25$ mm. Penelitian lain dilakukan oleh Ariati *et al* (2017), pada penelitian ini *zebrafish* diinduksi rotenon dengan konsentrasi 12,5 ppb pada 2 hpf-72 hpf sebagai hasilnya yaitu konsentrasi rotenon 12,5 ppb mampu menurunkan panjang badan pada model stunting larva *zebrafish* dengan derajat kepercayaan 98%, hal ini sedikit berbeda dengan penelitian sebelumnya oleh Ridlayanti & Wijayanti (2016) dalam penelitiannya model stunting larva *zebrafish* diinduksi rotenon 10 ppb mampu menurunkan panjang badan dengan derajat kepercayaan 93%.

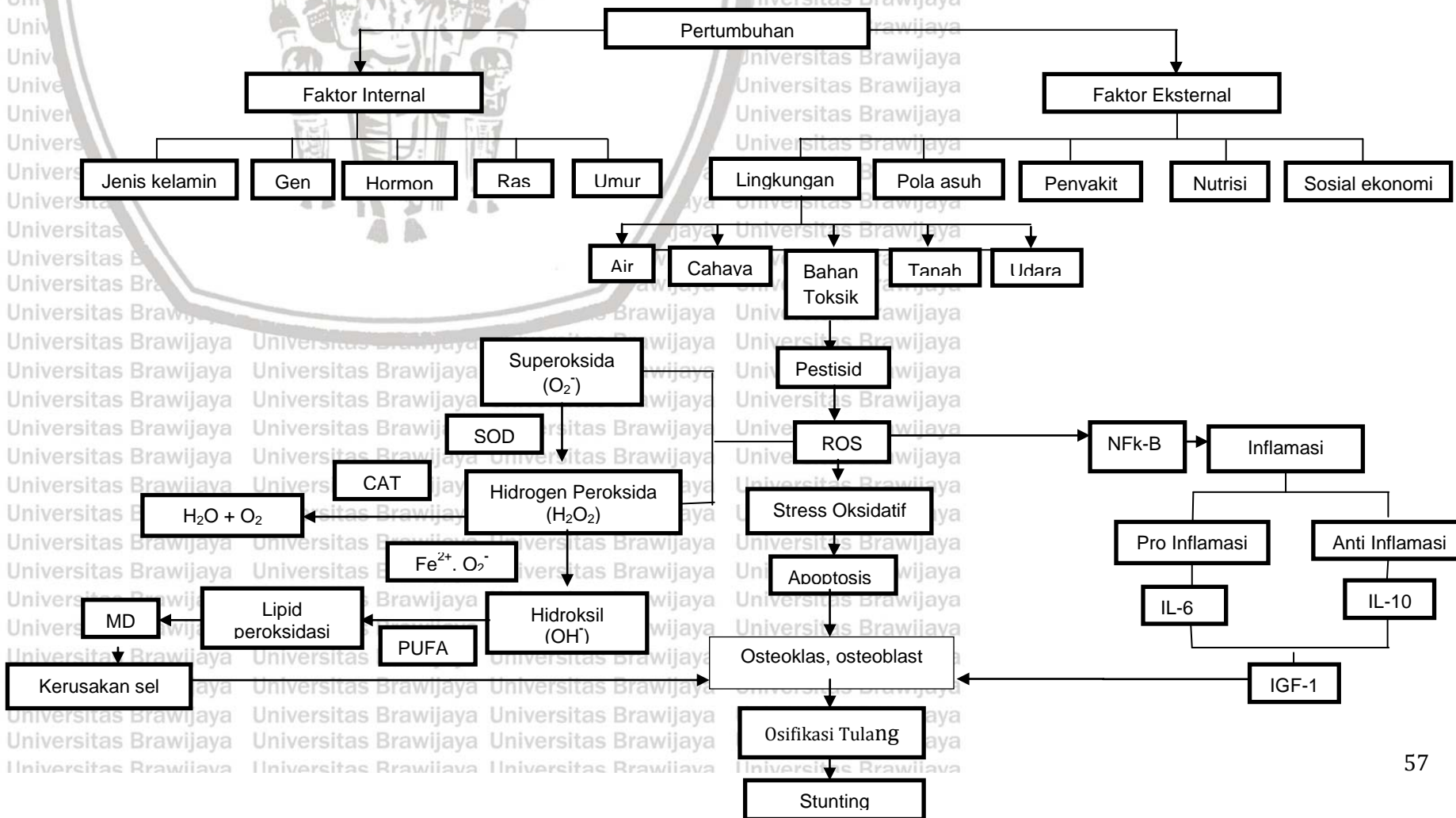


Gambar 2.15 Ciri-ciri *zebrafish*
 Keterangan : Ciri-ciri *zebrafish* post embrionik yang digunakan untuk melihat perkembangan. Salah satu Indikatornya adalah SL, *Standart Lenght*: (Parichy *et al.*, 2009).

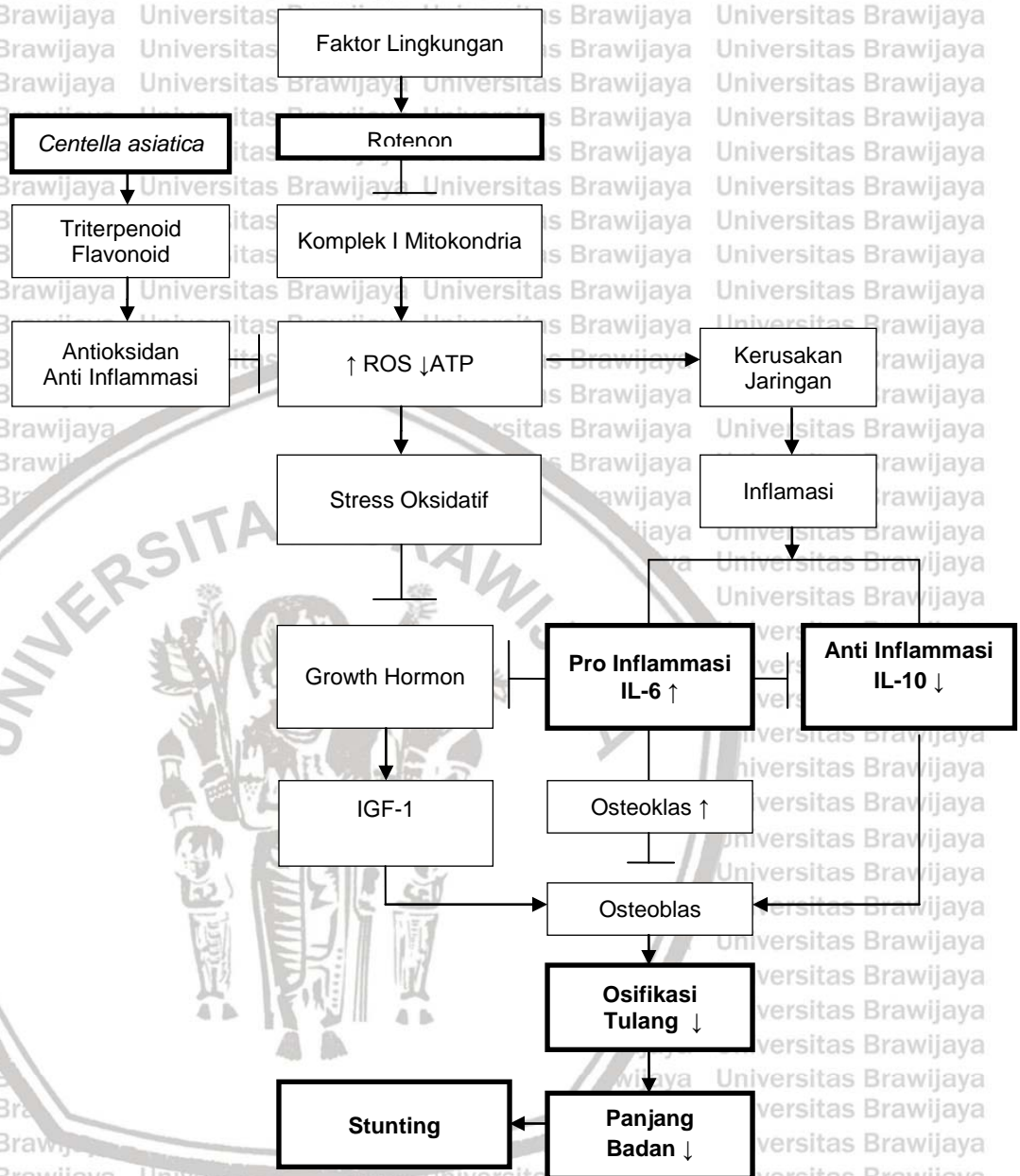
BAB 3

KERANGKA TEORI DAN KONSEPTUAL PENELITIAN

3.1. Kerangka Teori



3.2 Kerangka Konsep

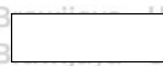


Gambar 3.2. Kerangka Konsep

Keterangan :



: Variabel yang diteliti



: Variabel yang tidak diteliti



: Menstimulasi / Menginduksi



: Menghambat

Salah satu faktor eksternal yang mempengaruhi pertumbuhan anak adalah lingkungan. Rotenon merupakan salah satu pestisida nabati yang berasal dari faktor lingkungan di sekitar kita yang dapat ikut berperan mempengaruhi pertumbuhan. Jika rotenon masuk ke tubuh seseorang, maka rotenon akan bekerja menghambat *respiratory chain* kompleks I mitokondria dengan adanya peningkatan ROS. Peningkatan ROS yang berlebihan ditandai dengan adanya stress oksidatif yang menyebabkan kerusakan sel dan jaringan di seluruh tubuh karena sel mengalami hipoksia, disfungsi mitokondria menyebabkan produksi ATP berkurang dan terjadi apoptosis. Kerusakan jaringan mengaktifasi respon immune terutama sitokin proinflamasi seperti IL-6. Peningkatan sitokin IL-6 berpengaruh terhadap kinerja osteoklas dan *growth hormon* seperti IGF-1. Overekspresi IL-6 akan menghambat osteoblastogenesis dan gangguan kinerja IGF-1 pada proses pertumbuhan tulang (osifikasi tulang). Terhambatnya pertumbuhan tulang dapat menyebabkan *stunting*.

Berdasarkan beberapa penelitian pegagan (*Centella asiatica*) dikenal memiliki kandungan *flavonoid* dan *triterpene* (*asiaticoside*, *madecasic acid*) yang berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Penemuan lain pegagan sebagai antiinflamasi mampu meningkatkan sitokin antiinflamasi IL-10 dan menekan sitokin proinflamasi IL-6. Dengan demikian pemberian pegagan dapat menangkal ROS dan dapat menghambat mediator sitokin proinflamasi.

3.3 Hipotesis Penelitian

Hipotesis utama pada penelitian ini adalah “Pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan pada masa pre sampai dengan post hatching dapat menurunkan IL-6, meningkatkan IL-10 dan meningkatkan osifikasi tulang keras pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon”.

Sedangkan sub hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) selama pre sampai dengan post hatching menurunkan kadar IL-6 pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon
2. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) selama pre sampai dengan post hatching meningkatkan kadar IL-10 pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon
3. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) selama pre sampai dengan post hatching meningkatkan osifikasi tulang keras pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon
4. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) selama pre sampai dengan post hatching meningkatkan panjang badan pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon
5. Adanya korelasi antara lamanya pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) konsentrasi 5,0 µg/mL yang diberikan selama masa pre sampai dengan post hatching dengan kadar IL-6, kadar IL-10, ekspresi osifikasi tulang keras dan peningkatan panjang badan
6. Adanya korelasi antara peningkatan panjang badan dengan kadar IL-6, kadar IL-10 dan ekspresi osifikasi tulang keras
7. Adanya korelasi antara osifikasi tulang keras dengan kadar IL-6 dan kadar IL-10
8. Adanya korelasi antara kadar IL-6 dengan kadar IL-10

BAB 4

METODE PENELITIAN

Beberapa strategi yang dilakukan dalam kegiatan penelitian ini meliputi strategi pembuatan model *stunting* larva *zebrafish* dengan pemberian paparan rotenon dengan konsentrasi 12,5 ppb, pemberian preventif *stunting* dengan pegagan (*Centella asiatica*) konsentrasi 5 µg/mL dan kegiatan perawatan (pemeliharaan) serta observasi pertumbuhan dan perkembangan *zebrafish* sampai usia 9 dpf. Kriteria utama dikatakan *stunting* yaitu terjadinya pemendekan panjang badan <-2 Standar Deviasi dibanding dengan kontrol (De Onis & Blossner, 2003). Kriteria tambahan adalah tidak ada kelainan kongenital saat lahir (Syed, 2015; Picasso, 2016). Analogi usia larva *zebrafish* 6 dan 9 dpf setara usia anak 2 dan 8 tahun (Sorribes *et al.*, 2013).

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Adapun rancangan pada penelitian ini menggunakan eksperimental murni (*true eksperiment*) dengan desain penelitian *post-test control group design*. Penelitian ini menggunakan hewan model embrio *zebrafish* (*Danio rerio*) yang diamati pertumbuhannya sampai usia *zebrafish* 6 dpf, embrio *zebrafish* dikelompokkan secara random menjadi 5 kelompok yaitu sebagai berikut :

1. Kelompok Kontrol.
2. Kelompok Rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf - 3dpf).
3. Kelompok Rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf - 3dpf) + Pegagan (konsentrasi 5 µg/mL) yang dipapar selama 4 hari (2 hpf – 4 dpf).
4. Kelompok Rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf - 3dpf) + Pegagan (konsentrasi 5 µg/mL) yang dipapar selama 5 hari (2 hpf – 5 dpf).

5. Kelompok Rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf - 3dpf) + Pegagan (konsentrasi 5 µg/mL) yang dipapar selama 6 hari (2 hpf – 6 dpf).

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini yaitu embrio *zebrafish* (*Danio rerio*) usia 0-2 hpf. Embrio *zebrafish* didapatkan dari hasil fertilisasi jenis *wild type* antara induk jantan dan betina dengan perbandingan jumlah induk jantan dan betina adalah 2 : 1 dan berusia 4 bulan (dewasa). Hewan coba ini dibiakkan dan dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB) Malang yang telah diuji dan tersertifikasi di Laboratorium Hidrologi Fakultas Ilmu Perikanan (Khotimah *et al.*, 2015). Ciri *zebrafish* strip horizontal warna biru tua kehitaman dan dasar warna perak.

4.2.2 Sampel Penelitian

Jumlah sampel pada penelitian ini adalah 20 embrio *zebrafish* (*Danio rerio*) per kelompok yang kemudian dilakukan *triplikate* jadi totalnya 300 embrio berdasarkan beberapa penelitian dengan menggunakan embrio ikan *zebrafish* antara 20-30 embrio *zebrafish* untuk penelitiannya (Luccit *et al.*, 2008; Hallare *et al.*, 2016). Adapun kelima kelompok tersebut adalah :

1. Kelompok kontrol negatif adalah sampel yang tidak mendapat intervensi paparan rotenon dan pegagan, simbol (K) atau Kontrol Negatif.
2. Kelompok kontrol positif rotenon adalah sampel yang hanya diberikan paparan rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari 2 hpf – 3 dpf, simbol (R).

3. Kelompok perlakuan rotenon + pegagan 1 adalah sampel yang diintervensi paparan rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf - 3 dpf) dan konsentrasi pegagan 5 µg/ml selama 4 hari (2 hpf – 4 dpf), simbol (P1).
4. Kelompok perlakuan rotenon + pegagan 2 adalah sampel yang diintervensi paparan rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf – 3 dpf) dan konsentrasi pegagan 5 µg/ml selama 5 hari (2 hpf – 5 dpf), simbol (P2).
5. Kelompok perlakuan rotenon + pegagan 3 adalah sampel yang diintervensi paparan rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf – 3 dpf) dan konsentrasi pegagan 5 µg/ml selama 6 hari (2hpf – 6 dpf), simbol (P3).

4.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Embrio *zebrafish* pada penelitian diambil jika memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi :

1. Kriteria inklusi

Embrio *zebrafish* adalah embrio yang memiliki *yolk sack* berwarna transparan bening, embrio tidak terdeteksi adanya jamur (serabut putih), tidak cacat dan hatching pada usia 3 dpf.

2. Kriteria eksklusi

Embrio *zebrafish* yang berwarna putih (tanda bahwa embrio *zebrafish* mati dan hatching pada hari ke-2 dan ke-4.

3. Kriteria dropout adalah embrio dan *zebrafish* mati sebelum penelitian selesai.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan November 2017 - Februari 2018 yang bertempat di :

1. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk pemeliharaan ikan *zebrafish* dewasa (induk), embrio *zebrafish* mulai 0 hpf sampai dengan 6 dpf, pengukuran dan pengamatan panjang badan, pembuatan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dan pemeriksaan osifikasi tulang keras.
2. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk pemeriksaan kadar IL-6 dan IL-10.

4.5 Variabel Penelitian

1. Variabel Independent (bebas) : Konsentrasi Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*).
2. Variabel Dependent (Tergantung) : Panjang Badan, Rasio Panjang Kepala dan panjang badan, Kadar IL-6, kadar IL-10 dan osifikasi tulang keras.
3. Variabel Kendali : Konsentrasi Rotenon, Embrionik Medium (EM), Suhu inkubator 28°C ± 1 °C, pakan Larva Tetramin dan siklus gelap terang.

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional penelitian adalah sebagai berikut :

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Kriteria Stunting	Kriteria berdasarkan modifikasi dari WHO (2010) dengan ketentuan PB/U <-2 SD, tidak terdapat kelainan kongenital dan proporsi
-------------------	---



tubuh normal dengan *Confidence Coefficient* 95% dan menetap hingga hari ke-6 (Sorribes *et al.*, 2013; Prendergas & Humphrey, 2014).

Embrio Zebrafish
(*Danio rerio*)

Jenis embrio *zebrafish* yang digunakan yaitu embrio yang berwarna transparan (tidak berwarna putih), tidak berjamur (berserabut putih), dan berbentuk bulat dan terdapat pembelahan (*fertile*). Embrio didapatkan dari hasil fertilisasi induk jantan dan betina *zebrafish* induk *wildtype* telah diidentifikasi di Laboratorium Kelautan FPIK-UB dan tersertifikasi Laboratorium Farmakologi.

Rotenon

Jenis insektisida nabati yang diperoleh dari sigma (R8875) dengan kemurnian $\geq 95\%$ dan konsentrasi yang digunakan 12,5 ppb.

Ekstrak Pegagan
(*Centella asiatica*)

Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) diperoleh dari Materia Medica Batu – Malang Jawa Timur yang telah tersertifikasi. Ekstraksi pegagan menggunakan metode maserasi (etanol) 96% dengan dosis 5 $\mu\text{g/mL}$ (Khotimah *et al.*, 2015).

Osifikasi tulang keras

Pembentukan tulang keras larva *zebrafish* usia 6 dpf yang diamati melalui pengecatan *whole mount* dengan menggunakan metode pewarnaan *Alizarin Red* dilihat dengan menggunakan mikroskop stereo (Olympus

SZ61), pembesaran 400x, visualisasi densitas warna merah dengan *Integritas Density* pada software *Image J* dengan satuan pixel.

Panjang Badan Larva *Zebrafish* pengukuran panjang badan dilakukan dengan mengukur *Standard Length* (SL) yang diukur mulai dari moncong mulut (*snout*) sampai dengan pangkal sirip ekor (*caudal fin*) biasa disingkat *snout-fin* (Spence *et al.*, 2008) dalam satuan mm (milimeter) pada hari ke-3, 4, 5 dan ke-6 dpf. Larva *zebrafish* diamati dengan mikroskop stereo (Olimpus SZ61), difoto menggunakan OptiLab versi 2.0 dengan pembesaran 4,5 pada telur dan 2,5 pada embrio dengan cara memindahkan larva *zebrafish* dari well plate pada objek glass, kurangi airnya sampai larva *zebrafish* terlihat jelas, posisi ikan diam dan lurus kemudian diukur dengan menggunakan skala pada software *Image Raster* yang sebelumnya telah dikalibrasi.

Rasio panjang kepala dan panjang badan larva *zebrafish* Rasio panjang kepala dan panjang badan larva *zebrafish* diamati dengan mengukur panjang kepala dari mulut (*snout*) ke *overculum* dan panjang badan larva dari *operculum* ke ekor (*caudal fin*) dalam satuan milimeter kemudian dibandingkan untuk melihat proporsi panjang

badan, pengukuran dilakukan dengan menggunakan *Image Raster* dan *software Optilab* pada 3, 4, 5 dan 6 dpf.

Kadar IL-6 Kadar protein dari larva *zebrafish* usia 6 dpf yang diamati dengan metode ELISA Kit Merk *Bioassay Technology Laboratory* Cat No. E0026Fi.

Kadar IL-10 Kadar protein dari larva *zebrafish* usia 6 dpf yang diamati dengan metode ELISA Kit Merk *Bioassay Technology Laboratory* Cat No. E0096Fi.

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan *Zebrafish*

Alat dan bahan yang digunakan untuk memelihara *zebrafish* dan memperoleh telur dalam penelitian ini antara lain

1. Alat : aquarium 60 Liter, alat ukur konduktifitas, pH meter, penyaring air, jaring dan tempat penangkaran telur ikan, pompa air, well plate isi 6 sumuran, inkubator suhu $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, alat gerus (*homogenizer*), pipet plastik, kamera digital, laptop (terdapat *Software Optilab* dan *Image Raster*), mikroskop dan *Zebrafish (Danio rerio)* induk.
2. Bahan : embrionik medium (EM), pakan *Tetramin* dan *Fish All* untuk menetralkan air.

4.7.2 Alat dan Bahan Pembuatan Embrionik Medium (EM)

Alat dan bahan yang digunakan untuk membuat embrionik medium (EM)

yaitu :

1. Alat : tabung reaksi 500 ml, sendok pengaduk, timbangan digital (Mettler Toledo).
2. Bahan : kertas saring, CaCl 0,08 gram, KCl 0,06 gram, NaCl 2 gram, MgSO₄ 0,815 gram dan aquadest 200 ml.

4.7.3 Alat dan Bahan Pembuatan Rotenon

Alat dan bahan yang diperlukan untuk membuat larutan rotenon dengan konsentrasi 12,5 ppb yang digunakan untuk menginduksi *stunting* pada larva *zebrafish* yaitu rotenon dalam bentuk serbuk diperoleh dari sigma (R8875) dengan kemurnian 95% dilarutkan dalam DMSO (*Dimethyl sulfoxide* 1%) sebagai stok dengan konsentrasi ($2 \times 10^3 \mu\text{g/L}$) (Khotimah *et al.*, 2015) yaitu :

1. Alat : tabung reaksi 15 ml, yellow tip, white tip, blue tip dan mikropipet.
2. Bahan : *handscoon disposable*, embrionik medium yang sudah diencerkan 1 : 9.

4.7.4 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Pegagan

Alat dan bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak pegagan yaitu sebagai berikut :

1. Alat :

Rotary evaporator untuk menguapkan pelarut etanol dan mengentalkan ekstrak, gelas ukur, corong buncher, pipet tetes, erlenmeyer, gunting, spatel dan pinset, desikator, oven, blender, pompa air, selang pompa air, water bath, pompa vacum, botol hasil ekstraksi, mortir dan stamfer, vial, plat tetes, dan timbangan analitik.

2. Bahan :

Kertas saring, label, benang pengikat, aluminium foil, plat tetes, dan timbangan analitik.

4.7.5 Alat dan Bahan Pengukuran Osifikasi Tulang

Pengamatan untuk melihat osifikasi tulang dengan pewarnaan alizarin red (Art.6279 Alizarinrot S).

1. Alat : mikroskop dengan software *Image J*.

2. Bahan : Alkohol 96%, Aquadest, Alizarin red 0,01 gram, Gliserol 87%, KOH 4%, H₂O₂ 3%.

4.7.6 Alat dan Bahan Pengukuran Kadar IL-6 dan IL-10

Pengamatan untuk melihat kadar IL-6 dan IL-10 dengan metode ELISA merk Bioassay Technology Laboratory Cat. No.E0026Fi untuk Pemeriksaan ELISA IL-6 dan Cat no E0096F1 untuk IL-10 yaitu :

1. Alat :

Incubator 37°C ± 0,5°C, kertas absorbansi, Pipet disposable, tabung bersih, air suling Microplate reader dengan panjang gelombang 450±10 nm.

2. Bahan :

a. Standar Solution 160 ng/L.

b. Pro-coated ELISA Plate.

c. Standar Diluent 3 ml.

d. Streptavidin-HRP 6 ml.

e. Stop Solution 6 ml.

f. Substrate Solution A 6 ml.

g. Substrate Solution B 6 ml.

h. Wash Buffer Concentrate 20 ml.

i. Biotin-Conjugate Anti Fish IL-6 Antibody dan IL-10 Antibody 1ml.

j. User Instruction.

k. Plate Sealer.

l. Zipper bag.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Pemeliharaan Zebrafish (*Danio rerio*)

Beberapa hal yang harus terpenuhi dan diperhatikan dalam pemeliharaan

induk zebrafish adalah sebagai berikut :

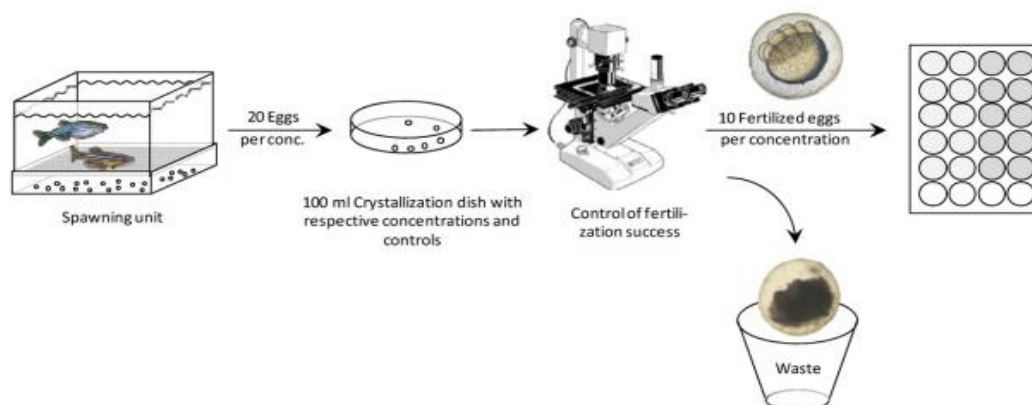
1. *Zebrafish* sebagai induk *zebrafish* dengan perbandingan jumlah induk jantan dan betina adalah 2 : 1 dipelihara pada akuarium berukuran panjang 59,5cm, lebar 30 cm dan tinggi 35,5 cm dengan kapasitas air 60 L air tawar dengan konduktivitas 400-1500 μS , dengan suhu sesuai suhu ruangan $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, pH 6,8-7,5 dengan sirkulasi yang terpantau stabil (*semi static*) serta diberi penyaring air.
2. Sebelum *zebrafish* dipelihara dalam akuarium, air akuarium yang akan dipakai dinetralkan terlebih dahulu dengan menggunakan anti chlorin (*fish all*) dan didiamkan selama 30 menit hingga 1 jam.
3. Kebersihan dan pemeliharaan kesehatan *zebrafish* harus dijaga dengan baik untuk menghasilkan indukan yang sehat sehingga dapat bereproduksi dengan optimal dan banyak menghasilkan telur fertil. Adapun tehniknya dengan cara pengurasan aquarium 1 minggu sekali, penggantian busa penyaringan tiap 2-3 hari sekali (*sponing*), pencucian busa penyaring dilakukan 2 hari sekali, pemberian makan tetramin 2-3 kali/hari, pemasangan airtor agar kebutuhan oksigen tercukupi, kaca akuarium sekelilingnya ditutup dengan kertas karton untuk menghindari stress lingkungan seperti bising suara (Khotimah *et al.*, 2015).

4.8.2 Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio Zebrafish

Adapun standar penggunaan *Zebrafish* untuk model penelitian yaitu oksigen terlarut (>60%), fertilitas (>70%), survival embrio ($\geq 80\%$) (Lammer *et al.*, 2009). Langkah-langkah pembiakan (*breeding*) yaitu :

1. Peralatan pemasangan trap dibersihkan dengan menggunakan air mengalir tanpa sabun dan dikeringkan sebelum dipasang.
2. Sebelum tempat penangkaran telur dipasang, *zebrafish* diberi makan ± 1 jam sebelum dimulainya siklus gelap – terang.
3. Pasang tempat penangkaran telur untuk menangkap embrio hasil fertilisasi.
4. Ciptakan lingkungan akuarium dengan memasang pohon-pohon hias untuk kondisi kawin (bercinta).
5. Pengaturan siklus gelap-terang, siklus ini dapat disesuaikan berdasarkan keinginan peneliti.
6. Aquarium ditutup dengan kardus hingga tertutup rapat dan diusahakan tidak ada cahaya yang masuk.
7. Tempat penangkaran telur (trap) diangkat setelah 30 menit lampu dinyalakan untuk memberikan kesempatan perkawinan
8. Setelah waktu tunggu 30 menit selesai, trap diangkat dibuang dulu air dan dipastikan telur tidak ikut terbang. Telur dipindah ke plate yang bersih, lakukan pembilasan telur dengan air filtrasi hingga bersih.
9. Penentuan kriteria inklusi dan eksklusi dilakukan setelah diperiksa dan dilihat dibawah mikroskop.
10. Tindakan pengangkatan trap dan pemilihan telur tidak boleh melebihi waktu 2 hpf agar telur tidak mudah berjamur dan kualitasnya baik.
11. Embrio yang sudah sesuai dengan kriteria inklusi dipindahkan ke well plate 6 sumuran yang telah diisi embrionik medium dan diisi embrio setiap well 20 embrio.

12. Masukkan ke dalam inkubator dengan suhu 28°C (Avdesh *et al.*, 2012).



Gambar 4.1 Pemilihan telur yang fertil dan tidak fertil

Keterangan : Setelah trap diangkat, telur dibersihkan dan diamati dibawah mikroskop untuk melihat telur yang fertil dan tidak fertil kemudian yang fertil dimasukan ke dalam well yang telah diisi EM (Lammer *et al.*, 2009).

4.8.3 Pembuatan Larutan Embrionik Medium

Prosedur pembuatan 200 ml embrionik medium 10 x mengacu pada Avdesh *et al.*, (2012) yaitu :

1. Semua bahan yang dibutuhkan CaCl 0,08 gr, Kcl 0,06 gr, NaCl 2 gr, MgSO₄ 0,815 gr (*Cord Spring Harb Protoc*) ditimbang dengan timbangan digital.
2. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam 200 ml aquadest dalam tabung reaksi.
3. Diaduk sampai semua bahan terlarut.
4. Masukkan ke botol stok sebagai stok EM, ditutup rapat dan disimpan di lemari es suhu 2-8 °C, stok EM hanya bisa dipergunakan selama 1 minggu setelah pembuatan, oleh karena itu setiap pembuatan EM diberikan label tanggal dan jam pembuatan EM. Pada saat EM mau dipakai sebagai media *zebrafish*, maka EM ditambahkan air filtrasi dengan perbandingan EM dan air filtrasi yaitu 1 : 9. Penggunaan EM sebelumnya harus dibiarkan dulu dengan suhu ruang. Apabila ada sisa dari pencampuran tadi harus dibuang

tidak boleh dipakai lagi untuk besok atau dicampurkan (Haffer et al., 1996; CSH Protocols 2011).

4.8.4 Pembuatan Larutan Rotenon Sebagai Bahan Paparan

Rotenon dengan konsentrasi 12,5 ppb yang digunakan untuk menginduksi *stunting* pada larva zebrafish dibuat dengan cara sebagai berikut :

1. Rotenon dalam bentuk serbuk diperoleh dari sigma (R8875) dengan kemurnian 95% dilarutkan dalam DMSO (Dimethyl sulfoxide 1%) sebagai stok dengan konsentrasi ($2 \times 10^3 \mu\text{g/L}$) (Khotimah et al., 2015).
2. Cara membuat larutan rotenon 12,5 ppb dengan menggunakan rumus pengenceran :

$$V1.M1=V2.M2$$

Keterangan :

V1 = Volume rotenon yang diperlukan

V2 = Volume total yang diinginkan

M1 = Konsentrasi stok

M2 = Konsentrasi akhir yang diinginkan.

Dengan rumus diatas untuk mendapatkan konsentrasi 12,5 ppb

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$V1.2 \times 10^3 = 15 \text{ ml} \times 12,5$$

$$V1 = 187,5 / 2 \times 10^3$$

$$V1 = 0,09375 \mu\text{g/L} = 93,75 \mu\text{g/mL}$$

Setelah didapatkan volume rotenon yang diperlukan yaitu 93,75 $\mu\text{g/mL}$, maka sediaan tersebut diambil dengan menggunakan mikropipet dari stok

rotenon $2 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ dan ditambahkan dengan air filtrasi sampai dengan 15 mL dengan konsentrasi rotenon adalah 12,5 ppb.

4.8.5 Pembuatan Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*)

Prosedur pembuatan ekstrak pegagan dengan menggunakan pelarut etanol adalah sebagai berikut :

1. Pegagan (*Centella asiatica*) dicuci dengan air bersih, dipotong kecil-kecil kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari atau dimasukan ke dalam oven dengan suhu 40 – 60 °C. Berat kering ditimbang didapatkan simplisia pegagan 100 gram.
2. Simplisia pegagan yang telah kering diblender atau ditumbuk sampai halus, kemudian diayak dengan menggunakan saringan (B_{40})
3. Serbuk yang telah dihaluskan, dimasukan kedalam gelas *Erlenmeyer* ukuran ± 1 liter, direndam dalam 900 ml etanol 98%, dikocok sampai tercampur (± 30 menit) diamkan semalaman sampai mengendap.
4. Diambil lapisan atas campuran etanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur (kertas saring), perendaman dilakukan sebanyak 3 kali.
5. Proses evaporasi dimulai dengan memasukan hasil rendaman *Centella asiatica* dalam labu evaporasi 1 L, pasang labu evaporasi pada evaporator.
6. *Water bath* diisi air sampai penuh, pasang semua rangkaian alat termasuk evaporator, pemanasan *water bath* diatur sampai 70°C (sesuai dengan titik didih pelarut).
7. Semua rangkaian alat dipasang dan disambungkan dengan aliran listrik, biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada pada labu penampungan ($\pm 1,5$ sampai 2 jam untuk satu labu) ± 900 ml.
8. Didapatkan hasil ekstraksi sebanyak 10 gram ekstrak kental (kira-kira 1/5 dari bahan kering)

9. Dimasukan hasil ekstraksi ke dalam botol plastik atau kaca dan ditimbang sebelum disimpan dalam freezer (Selvi *et al.*, 2012).

Khotimah *et al.* (2015) telah melakukan pengukuran kadar *asiaticosida* dari pegagan yang diperoleh di Materia Medica Batu malang Jawa Timur dengan menggunakan LCMS (*Liquid Chromatography-Mass Spestrometry*) (*Thermo Scientific, Accela*) yang menunjukkan adanya aktivitas *asiaticosida* sebagai salah satu zat aktif dari *Centella asiatica*.

4.8.6 Pembuatan Larutan Pegagan (*Centella asiatica*)

Dalam penelitian ini, peneliti menggunakan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dengan konsentrasi 5 µg/ml. Adapun untuk mendapatkan konsentrasi tersebut kita ambil dari stok ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dengan langkah-langkah sebagai berikut :

1. Mengambil 10 mg ekstrak centella asiatica dari stok yang ada kemudian diencerkan dengan aquabides 10 ml, sehingga didapatkan konsentrasi 1mg/ml dengan perhitungan sebagai berikut :

$$= 10 \text{ mg}/10\text{ml aquabides}$$

$$= 1 \text{ mg/ml} = 1000\mu\text{g/ml}$$

2. Konsentrasi 5 µg/ml dengan rumus :

$$V1.M1 = V2.M2$$

Keterangan :

V1 = Volume yang ditambahkan

N1 = Konsentrasi awal/stok

V2 = Volume akhir

N2 = Konsentrasi akhir

Dengan rumus diatas maka konsentrasi 5 µg/ml dari pegagan (*Centella asiatica*) yaitu :

$$V1 \cdot 1000 \mu\text{g/ml} = 15 \text{ ml} \times 5 \mu\text{g/ml}$$

$$V1 = \frac{15 \text{ ml} \times 5 \mu\text{g/ml}}{1000 \mu\text{g/ml}}$$

$$V1 = 0,075 \text{ ml} = 75 \mu\text{l}$$

4.8.7 Pemberian Larutan Rotenon dan Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*)

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya bahwa konsentrasi untuk rotenon yang dapat menyebabkan *stunting* didapatkan konsentrasi 12,5 ppb (Primihastuti *et al.*, 2017). Sedangkan berdasarkan hasil penelitian sebelumnya juga bahwa ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dengan konsentrasi 5 µg/ml secara bermakna dapat menambah panjang badan *stunting* larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon 12,5 ppb (Yuningsing *et al.*, 2017). Pencampuran kedua larutan dilakukan secara konsisten dalam waktu yang berbeda dalam lamanya pemberian paparan/perlakuan. Adapun waktu pemberian paparannya sebagai berikut :

1. Kontrol Positif (diberikan rotenon saja)

Dengan menggunakan mikropipet, stok rotenon (2×10^3) tersebut diambil sebanyak 93,73 µg/mL ditambahkan air filtrasi sampai dengan 15 ml dimasukan dalam tabung valcon dan dibagikan kepada masing-masing perlakuan rotenon sebanyak 5 ml/well (5 ml/sumuran) yang diberikan mulai 2 hpf – 3 dpf (selama 3 hari yaitu 2 hpf, 24 hpf dan 48 hpf) dimana *zebrafish* masih dalam periode embrio. Paparan ini diasumsikan masih di dalam kandungan (intrauterin). Pada 72 hpf (3 dpf) embrio dibilas dengan embrionik medium sebanyak 3 kali untuk memastikan medium paparan tidak ada dan

menjadi fisiologis. Larva yang hatching dipindahkan dari well plate isi 6 sumuran ke dalam well plate isi 24 sumuran dan sisanya sebagai stok.

2. Rotenon dan pegagan konsentrasi I, II, dan III (P1, P2 dan P3)

Pengenceran ekstrak *Centella asiatica* (pegagan) dan rotenon dilakukan dengan rumus $v_1 \cdot n_1 = v_2 \cdot n_2$. Adapun konsentrasi dan paparannya sebagai berikut :

- a. P1 merupakan larutan rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf – 3 dpf) + pegagan 5 µg/mL diberikan mulai 2 hpf - 4 dpf.
- b. P2 merupakan larutan rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf – 3 dpf) + pegagan 5 µg/mL diberikan mulai 2 hpf - 5 dpf.
- c. P3 merupakan larutan rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf – 3 dpf) + pegagan 5 µg/mL diberikan mulai 2 hpf - 6 dpf.

Untuk paparan P1, P2 dan P3 berlanjut sampai dengan 4 dpf, 5 dpf dan 6 dpf paparan ini diasumsikan bahwa larva sudah berada diluar extrauterin (Post natal sampai dengan umur 2 tahun). Setelah selesai pemaparan dibilas dengan embrionik medium sebanyak 3 kali juga untuk memastikan medium paparan tidak ada dan menjadi fisiologis.

Larva *zebrafish* masih mendapatkan nutrisi dari *yolk sack* sampai usia 5 dpf sedangkan pada usia 6 dpf sudah membutuhkan nutrisi dari luar dan untuk mencegah kematian larva dapat diberikan Tetramin (Vargesson, 2007).

4.8.8 Pengukuran Panjang Badan (PB) dan Panjang Kepala Larva *Zebrafish*

Larva *zebrafish* usia 3 dpf, 4 dpf, 5 dpf dan 6 dpf dipindahkan ke well plate isi 24 sumuran, kemudian diukur panjang badannya dengan cara diamati di bawah mikroskop stereo (Olympus SZ61), difoto menggunakan Optilab versi 2.0 dan diukur dengan menggunakan skala pada *software Image Raster* yang

sebelumnya telah dikalibrasi. *Standard Length* (SL) yang diukur mulai dari ujung hidung (*tip of the snout*) sampai dengan pangkal sirip ekor (*caudal fin*) biasa disingkat snout-fin (Spence *et al.*, 2008) dalam satuan mm (milimeter).

4.8.9 Pengukuran dan Pengamatan Osifikasi Tulang Keras Larva Zebrafish

Larva zebrafish Setelah usia 6 dpf dieuthanasia dan diperiksa secara keseluruhan atau *whole mount* untuk mengetahui osifikasi tulang dengan menggunakan pewarnaan *alizarin red*. Pada pengamatan osifikasi tulang keras dengan pewarnaan alizarin red (Art. 6279 Alizarinrot S.). Adapun prosedur pewarnaan *alizarin red* dengan modifikasi Jonathan Knight (2009) yaitu :

1. Fiksasi larva zebrafish dengan menggunakan alkohol/Methanol 96% selama 12 jam
2. Rendam larva dalam aquadest selama semalam.
3. Kemudian larva direndam dalam KOH 1 % dengan Hidrogen peroksida 3 % (sekitar 5 ml 3% H₂O₂ dalam larutan KOH 1% 100 ml) selama 15 menit.
4. Pigmen hitam harus berubah menjadi warna coklat sampai coklat muda. Jangan terlalu banyak melakukan langkah ini karena beberapa jaringan, terutama mata bisa meledak atau hancur.
5. Bilas larva dengan aquadest selama 10 menit.
6. Selanjutnya larva direndam dalam larutan pewarna *alizarin red* 1 mg/ml selama 3 hari.
7. Dicuci dalam aquadest sebanyak 5 kali pembilasan.
8. Larva hasil pewarnaan *alizarin red* diamati dibawah mikroskop dan diukur densitas warnanya dengan *integrated density* menggunakan *software image J*.
9. Larva dapat disimpan pada glycerol 87% (bertahan hingga 6 bulan)

4.8.10 Pengukuran Kadar IL-6 dan IL-10

Pada usia 6 dpf larva *zebrafish* dikumpulkan dan diperiksa konsentrasi IL-6 dan IL-10 dengan menggunakan ELISA Kit *Bioassay Technology Laboratory*

Cat. No. E0026Fi untuk IL-6 dan Cat. No. E0096Fi untuk IL-10. Adapun prosedurnya yaitu :

1. Siapkan semua reagen, standard solution dan sampel sesuai ketentuan dalam prosedur ELISA Kit Fish Interleukin 6. Semua reagen sebelum dipakai, disiapkan pada suhu ruangan. Pemeriksaan ELISA dilakukan pada suhu ruangan.
2. Menentukan jumlah strip yang diperlukan untuk pemeriksaan. Masukkan strip ke dalam frame yang akan digunakan.
3. Menambahkan 50µl standar dengan well standard.
4. Menambahkan 40µl sampel ke well sampel (sumur sampel) dan kemudian menambahkan 10µl antibodi anti-IL-6 ke well sampel, kemudian menambahkan 50µl streptavidin-HRP ke well sampel dan well standar (Well control/blanko well). Campur well. Menutupi plate dengan sealer. Inkubasi selama 60 menit pada suhu 37 ° C.
5. Hilangkan sealer dan cuci plate 5 kali dengan *wash buffer*. Rendam well dengan 0,35 ml *wash buffer* selama 30 detik sampai 1 menit untuk setiap mencuci.
6. Menambahkan 50µl substrate solution A ke tiap well dan kemudian menambahkan 50µl substrate solution B ke tiap well. Inkubasi 10 menit pada suhu 37 °C, plate ditutup dengan sealer baru dan kondisi ruangan gelap.
7. Menambahkan 50µl Stop Solution ke tiap well, warna biru akan berubah menjadi kuning.

8. Menentukan *optical density* (nilai OD) masing-masing well dengan menggunakan microplate reader dengan panjang gelombang 450 nm dalam waktu 30 menit setelah menambahkan stop solution.

4.9 Pengumpulan Data dan Analisis Data

4.9.1 Pengumpulan Data

Beberapa data yang diperoleh, dikumpul dan diolah saat penelitian mencakup data sebagai berikut :

1. Data Panjang Badan, meliputi rerata panjang badan *zebrafish* usia 3, 4, 5 dan 6 dpf pada setiap kelompok
2. Data Rasio Panjang Kepala (PK) berbanding Panjang Badan (PB) larva *zebrafish* pada setiap kelompok
3. Data Kadar IL-6, Kadar IL-10 dan ekspresi osifikasi tulang keras.

4.9.2 Analisis Data

Setelah data terkumpul langkah selanjutnya yaitu analisis data penelitian.

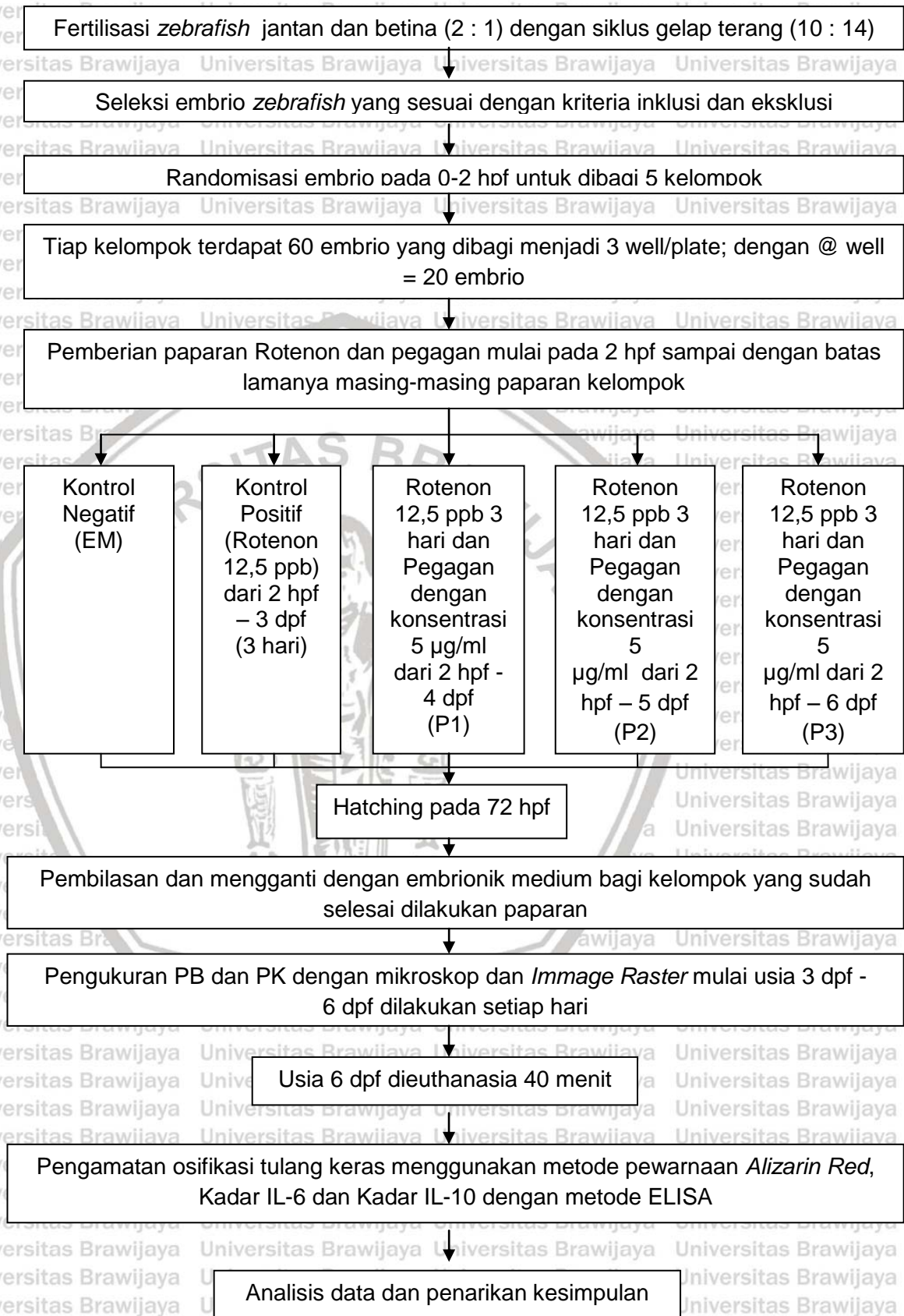
Adapun analisis data tersebut meliputi :

1. Tes normalitas dan homogenitas data pada setiap parameter penelitian dengan Shapiro-Wilk atau Kolmogorov-Smirnov untuk normalitas data dan Levene's test untuk homogenitas data.
2. Untuk uji beda setiap parameter menggunakan One Way Anova jika data berdistribusi normal dan homogen yang dilanjut Pos hoc test LSD, uji Kruskal Wallis jika data tidak memenuhi syarat normalitas atau homogenitas data.
3. Untuk mengetahui kuat tidaknya korelasi antar parameter penelitian dilakukan uji statistik pearson correlation jika data berdistribusi normal dan jika tidak berdistribusi normal uji Spearman correlation. Dan interpretasi dari

korelasi antar parameter mengacu pada Dahlan (2009) yaitu berkorelasi sangat lemah jika nilai koefisien korelasi 0,0 sampai dengan $< 0,2$, lemah 0,2 sampai dengan $< 0,4$, sedang 0,4 sampai dengan $< 0,6$, Kuat 0,6 sampai dengan $< 0,8$ dan sangat kuat jika 0,8 sampai dengan < 1 .



4.10 Alur Perlakuan



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

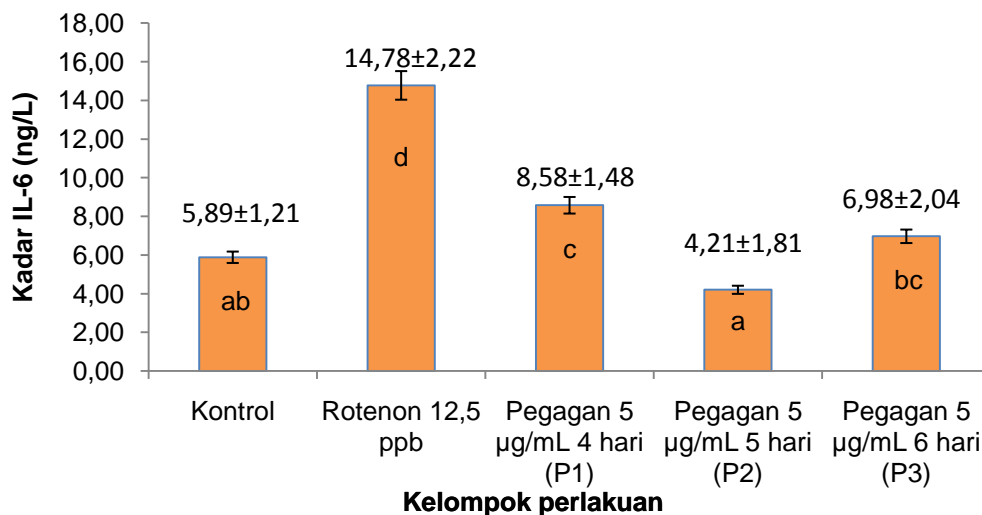
Penelitian dilakukan untuk membuktikan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan pada masa pre sampai dengan post hatching dapat menurunkan interleukin 6, meningkatkan interleukin 10 dan meningkatkan osifikasi tulang keras pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon konsentrasi 12,5 ppb. Rentang waktu pelaksanaan penelitian antara November 2017 - Februari 2018. Kegiatan tersebut meliputi persiapan pemasangan trap, persiapan bahan paparan, perawatan ikan *zebrafish* induk, persiapan pewarnaan *Alizarin Red* dan persiapan pemeriksaan ELISA seperti telah diuraikan pada BAB 4 metode penelitian. Adapun lokasi penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Biomedik FKUB Malang. Adapun penjabaran hasil penelitian yaitu :

5.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Kadar IL-6 Larva *Zebrafish* Usia 6 dpf

Pada penelitian ini, kadar IL-6 larva *zebrafish* usia 6 dpf diukur dengan pemeriksaan ELISA (*Enzyme Linked Immune-sorbent Assay*). Berdasarkan gambar 5.1 Rerata kadar IL-6 pada kelompok rotenon lebih tinggi dari kelompok kontrol, sedangkan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 yaitu kelompok dengan pemberian pegagan konsentrasi 5µg/mL selama 4, 5 dan 6 hari menunjukkan penurunan rerata kadar IL-6 dibanding kelompok rotenon, meskipun tampak pada kelompok P3 mulai ada peningkatan kembali rerata kadar IL-6 dengan nilai rerata lebih tinggi dari kelompok kontrol.

Ada tidaknya perbedaan yang bermakna dari induksi rotenon 2,5 ppb dan pengaruh pemberian ekstrak etanol pegagan konsentrasi 5 µg/ml terhadap kadar

IL-6 larva zebrafish di usia 6 dpf dapat diketahui melalui uji statistik *one way anova* dan hasil analisis seperti tampak pada gambar 5.1:



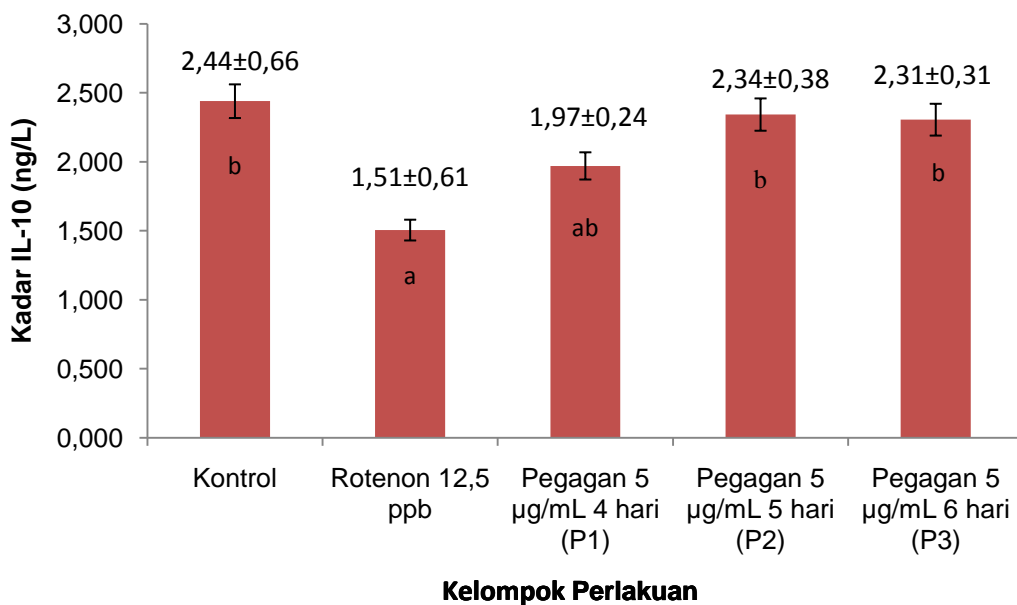
Gambar 5.1 Perbandingan rerata kadar IL-6 larva zebrafish usia 6 dpf
 Keterangan : Pemberian ekstrak etanol pegagan 5 µg/mL selama 4, 5 dan 6 hari secara signifikan menurunkan kadar IL-6 larva zebrafish usia 6 dpf yang diinduksi rotenon 12,5 ppb

Berdasarkan gambar 5.1 menunjukkan terdapat perbedaan rerata kadar IL-6 secara signifikan antara kelompok rotenon terhadap kelompok kontrol dengan nilai $p\text{-value}=0,000$ ($p<0,05$), begitu juga jika dibandingkan kelompok rotenon terhadap kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3) terdapat perbedaan secara signifikan dengan nilai $p\text{-value}=0,000$, $0,000$ dan $0,000$ ($p<0,05$). Untuk kelompok P1 terdapat perbedaan secara signifikan terhadap kelompok kontrol, kelompok rotenon dan kelompok P2 dengan nilai $p\text{-value}=0,027$, $0,000$ dan $0,001$ ($p<0,05$), sedangkan terhadap kelompok P3 tidak terdapat perbedaan secara signifikan dengan nilai $p\text{-value}=0,171$ ($p>0,05$). Kelompok P2 tidak memiliki perbedaan secara signifikan terhadap kontrol dengan nilai $p\text{-value}=0,53$ ($p>0,05$) dan terdapat perbedaan secara signifikan terhadap rotenon, P1 dan P3 dengan nilai $p\text{-value}=0,000$, $0,001$ dan $0,024$ ($p<0,05$).

5.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Kadar IL-10 Larva Zebrafish Usia 6 dpf

Kadar IL-10 larva zebrafish usia 6 dpf pada penelitian ini juga menggunakan pemeriksaan ELISA. Berdasarkan hasil pemeriksaan ELISA rerata kadar IL-10 seperti gambar 5.2, rerata kelompok rotenon tampak lebih rendah dari kelompok kontrol, sedangkan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 (kelompok dengan pemberian pegagan konsentrasi 5µg/mL selama 4, 5 dan 6 hari) menunjukkan rerata kadar IL-10 tampak lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok rotenon dan lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok kontrol

Untuk melihat ada tidaknya perbedaan yang bermakna kadar IL-10 antar kelompok maka dilakukan uji statistik *one way anova* dengan hasil seperti tampak pada gambar dibawah ini :



Gambar 5.2 Perbandingan rerata kadar IL-10 larva zebrafish usia 6 dpf.

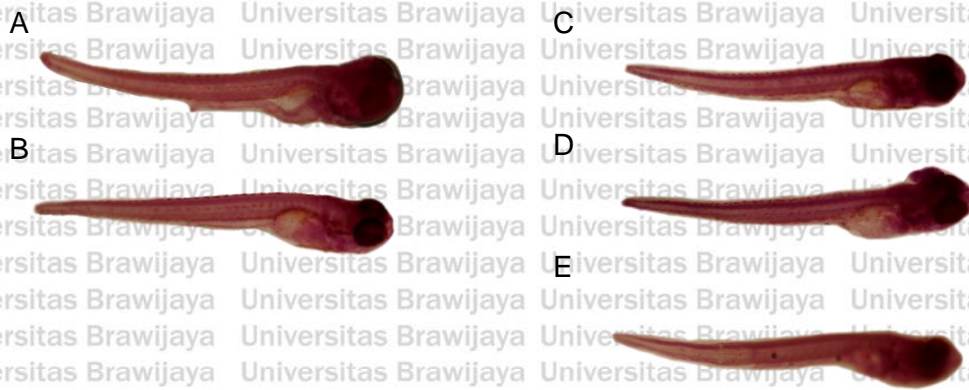
Keterangan : Pemberian ekstrak etanol pegagan 5 µg/mL selama 4, 5 dan 6 hari meningkatkan kadar IL-10 larva zebrafish usia 6 dpf yang diinduksi rotenon 12,5 ppb tidak signifikan terhadap P1 dan signifikan terhadap P2 dan P3

Hasil uji statistik *one way anova* serta pos hoc test LSD seperti pada gambar 5.2 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan secara signifikan rerata

kadar IL-10 pada kelompok rotenon jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan nilai $p=0,005$ ($p<0,05$). Sedangkan kelompok perlakuan, P1 tidak signifikan terhadap kelompok rotenon dengan nilai $p=0,134$ ($p>0,05$), P2 dan P3 terdapat perbedaan yang signifikan terhadap kelompok rotenon dengan nilai $p=0,011$ dan $0,014$ ($p<0,05$). Akan tetapi jika dibandingkan kelompok P1, P2 dan P3 terhadap kelompok kontrol tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai $p=0,130$, $0,747$ dan $0,659$ ($p>0,05$).

5.3 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Osifikasi Tulang Keras Larva *Zebrafish* Usia 6 dpf

Untuk mengetahui ekspresi osifikasi tulang keras dari larva *zebrafish* usia 6 dpf yang diinduksi rotenon 12,5 dan pemberian pegagan konsentrasi $5 \mu\text{g/mL}$ selama 4, 5 dan 6 hari pada penelitian ini menggunakan pewarnaan (*staining*) *alizarin-red*. Penilaian ekspresi osifikasi tulang keras melalui *staining alizarin red* adalah warna merah terang sampai warna merah gelap pada bagian yang terwarnai, bagian yang dilakukan *staining* ini dapat dilihat pada mikroskop stereo CX21 LED Olympus dengan pembesaran 40x dan bagian yang terstaining sebagai ekspresi osifikasi tulang keras tampak pada bagian kepala dan punggung (tulang belakang). Hasil *staining alizarin red* pada masing-masing kelompok disajikan pada gambar 5.3



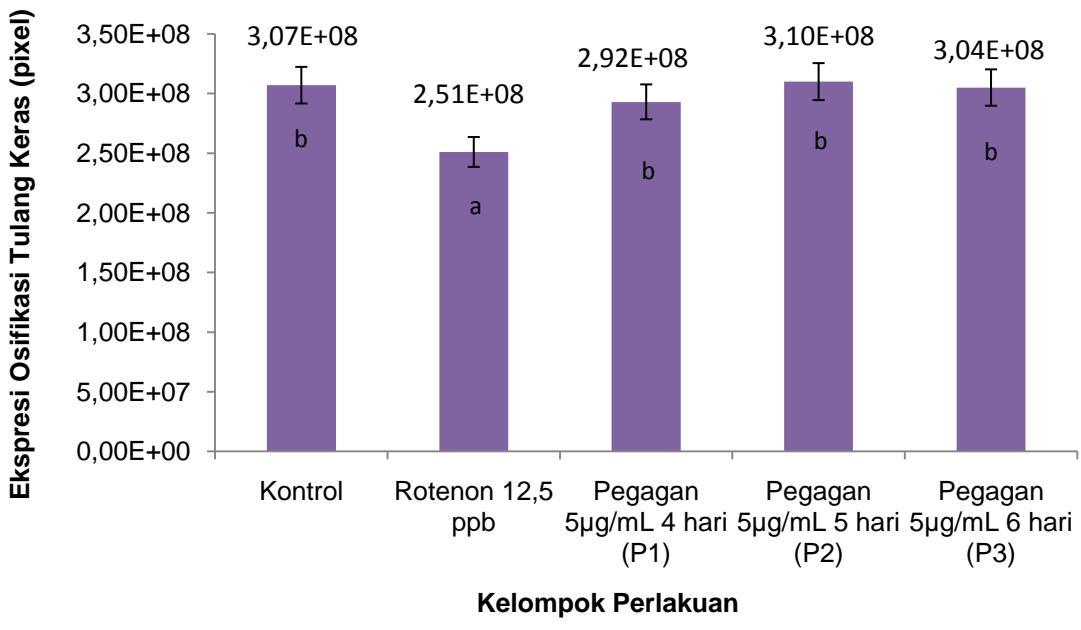
Gambar 5.3 Osifikasi tulang keras larva zebrafish 6 dpf

Keterangan :

- A. Kelompok Kontrol
- B. Kelompok Rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf - 3dpf)
- C. Kelompok Rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf - 3dpf) + Pegagan (konsentrasi 5 µg/mL) yang dipapar selama 4 hari (2 hpf - 4 dpf)
- D. Kelompok Rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf - 3dpf) + Pegagan (konsentrasi 5 µg/mL) yang dipapar selama 5 hari (2 hpf - 5 dpf)
- E. Kelompok Rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf - 3dpf) + Pegagan (konsentrasi 5 µg/mL) yang dipapar selama 6 hari (2 hpf - 6 dpf)

Untuk menilai hasil *staining* menggunakan aplikasi *Image J* dengan mengukur nilai *integrated density* yang dikuantifikasikan dalam satuan pixel..

Adapun rerata nilai *staining* dan hasil pewarnaan (*staining*) *Alizarin Red* pada larva *zebrafish* usia 6 dpf dapat terlihat pada gambar 5.4 bahwa rerata ekspresi osifikasi tulang keras pada kelompok rotenon memiliki rerata ekspresi lebih rendah dibandingkan kontrol, sedangkan kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 memiliki rerata ekspresi lebih tinggi dibandingkan kelompok rotenon. Rerata P1 dan P3 jika dibandingkan dengan kelompok kontrol memiliki rerata lebih rendah, sedangkan P2 memiliki rerata lebih tinggi daripada kelompok kontrol.



Gambar 5.4 Perbedaan *integrated density* osifikasi tulang keras usia 6 dpf larva zebrafish

Keterangan : Nilai *Integrated Density* Osifikasi tulang keras tertinggi pada kelompok P2 yaitu kelompok pemberian pegagan (*Centella asiatica*) konsentrasi 5µg/ml yang diberikan selama 5 hari serta nilainya melebihi kelompok kontrol, sedangkan nilai terendah pada kelompok rotenon. Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan

Berdasarkan hasil analisis statistik *one way anova* dan *pos hoc test* LSD seperti pada gambar 5.4 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan secara signifikan antara ekspresi osifikasi tulang keras kelompok rotenon jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan nilai $p=0,006$ ($p < 0,05$), begitu juga terdapat perbedaan secara signifikan antara kelompok rotenon jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 dengan nilai $p= 0,031$, $0,004$ dan $0,007$ ($p < 0,05$). Sedangkan Kelompok P1, P2 dan P3 tidak terdapat perbedaan secara signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan nilai $p= 0,440$, $0,868$ dan $0,904$ ($p > 0,05$).

5.4 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish Usia 3, 4, 5 dan 6 dpf

Pengukuran panjang badan larva zebrafish pada kelompok yang diinduksi rotenon 12,5 ppb dan kelompok yang mendapat perbedaan perlakuan lamanya pemberian ekstrak etanol pegagan konsentrasi 5 µg/ml pada usia 3, 4, 5 dan 6 dpf diukur dengan menggunakan aplikasi *software Image Raster* serta hasil pengukuran panjang badan dinyatakan dalam satuan milimeter (mm). Adapun uraian hasil tampak di tabel 5.1 berikut :

Tabel 5.1 Perbedaan Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish usia 3, 4, 5 dan 6 dpf

Kelompok	3 dpf		4 dpf		5 dpf		6 dpf	
	Mean (mm)	SD	Mean (mm)	SD	Mean (mm)	SD	Mean (mm)	SD
K	3,4	0,08	3,64	0,06	3.68	0.08	3.76	0.07
R	3,36	0,08	3,51	0,08	3.58	0.09	3.59	0.09
P1	3,4	0,06	3,61	0,06	3.69	0.05	3.73	0.06
P2	3,39	0,07	3,61	0,07	3.71	0.07	3.76	0.07
P3	3,39	0,06	3,6	0,05	3.71	0.06	3.74	0.08

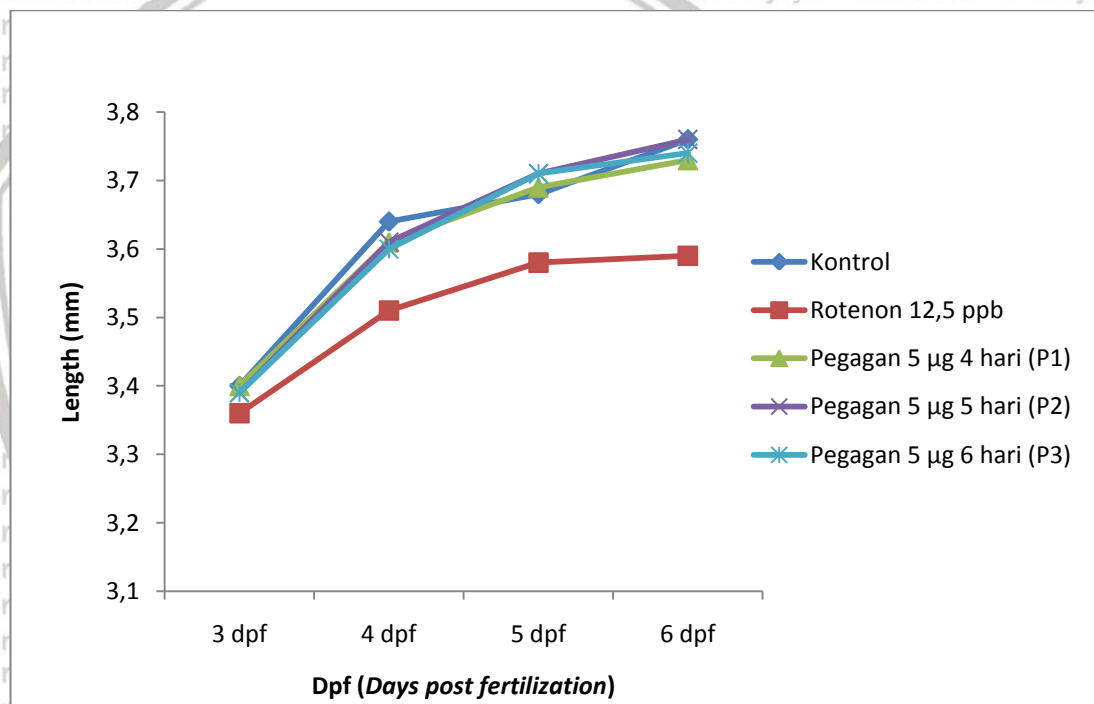
Keterangan	K	Kelompok Kontrol
	R	Kelompok Rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf - 3dpf)
	P1	Kelompok Rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf - 3dpf) + Pegagan (konsentrasi 5 µg/mL) yang dipapar selama 4 hari (2 hpf – 4 dpf)
	P2	Kelompok Rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf - 3dpf) + Pegagan (konsentrasi 5 µg/mL) yang dipapar selama 5 hari (2 hpf – 5 dpf)
	P3	Kelompok Rotenon 12,5 ppb yang dipapar selama 3 hari (2 hpf - 3dpf) + Pegagan (konsentrasi 5 µg/mL) yang dipapar selama 6 hari (2 hpf – 6 dpf)

Berdasarkan tabel 5.1 rerata panjang badan larva zebrafish usia 3, 4, 5 dan 6 dpf tampak kelompok rotenon memiliki rerata panjang badan lebih pendek dari kelompok kontrol, sedangkan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 yaitu kelompok dengan perbedaan pemberian ekstrak etanol pegagan 4, 5 dan 6 hari tampak memiliki rerata panjang badan lebih tinggi dari kelompok rotenon.

Kelompok P1 dan P3 memiliki pola pertumbuhan yang sama mulai usia 4 dpf

memiliki rerata lebih rendah dari kelompok kontrol di usia 4 dan 6 dpf dan lebih tinggi di usia 5 dpf, sedangkan kelompok P2 memiliki pola pertumbuhan dengan rerata lebih rendah dari kelompok kontrol di usia 4 dpf, lebih tinggi di usia 5 dpf dan sama di usia 6 dpf. Dengan demikian tampak di usia 5 dpf semua kelompok mengalami peningkatan panjang badan lebih tinggi dibanding kontrol, sedangkan di usia 6 dpf kelompok P1 dan P3 terdapat penurunan panjang badan tetapi rerata masih lebih tinggi daripada kelompok rotenon.

Untuk mengetahui perbedaan rerata pertumbuhan larva zebrafish usia 3 dpf sampai dengan 6 dpf tampak terlihat pada gambar 5.5 :













Gambar 5.5 Perbedaan rerata panjang badan larva zebrafish hari ke-3, 4, 5 dan 6 dpf

Keterangan : Terdapat kesamaan rerata panjang badan pada semua kelompok di usia 3 dpf, sedangkan hari ke-6 adanya perbedaan rerata panjang badan antar kelompok, terlihat kelompok rotenon (garis merah) pertumbuhan panjang badan berada paling bawah diantara kelompok yang lainnya, kelompok kontrol berada paling atas sedangkan kelompok perlakuan yang diberi pegagan (P1, P2 dan P3) tampak meningkat hampir mencapai ukuran panjang badan kelompok kontrol

Untuk mengetahui bagaimana perbandingan pertumbuhan larva zebrafish usia 3 dpf yang dianalogikan dengan usia bayi baru lahir dan usia 6 dpf yang

dianalogikan dengan usia anak 2 tahun terhadap pengaruh induksi rotenon konsentrasi 12,5 ppb dan pemberian ekstrak etanol pegagan konsentrasi 5 µg/mL yang diberikan selama 4, 5 dan 6 hari terlihat jelas di bawah ini :

Tabel 5.2 Perbandingan Pertumbuhan Panjang Badan Larva Zebrafish Usia 3 dpf dan 6 dpf

Usia	3 dpf					6 dpf					
	Kelompok	K	R	P1	P2	P3	K	R	P1	P2	P3
											
Mean PB (mm)		3,40	3,36	3,40	3,39	3,39	3,76	3,59	3,73	3,76	3,74
SD		0,08	0,08	0,06	0,07	0,06	0,07	0,09	0,06	0,07	0,08
Rasio		1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5

Keterangan : Perbandingan rerata, standar deviasi dan rasio usia larva zebrafish 3 dpf dan 6 dpf yang diinduksi rotenon dan pemberian ekstrak pegagan

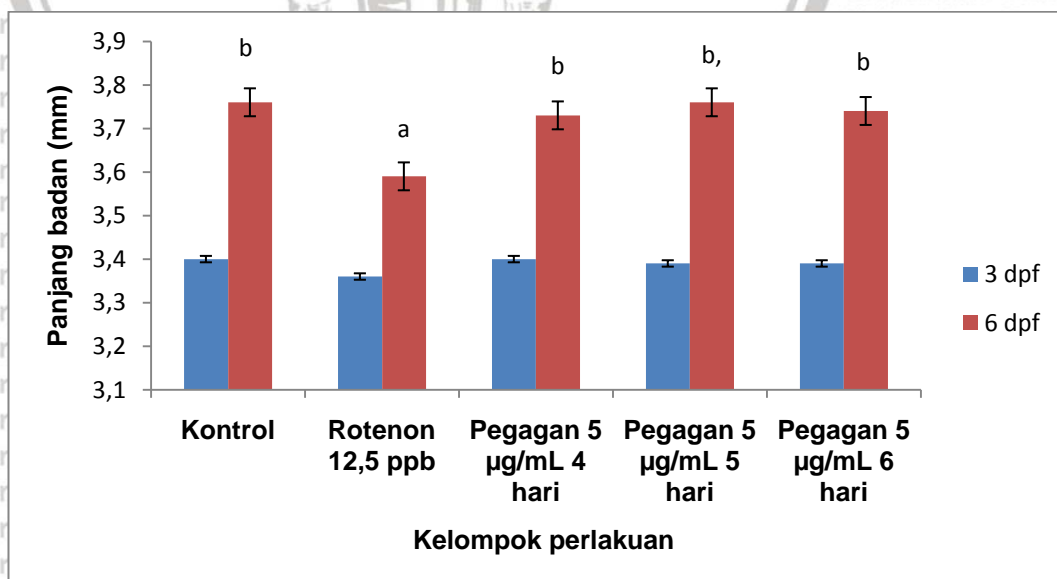
Berdasarkan tabel 5.2 menunjukkan perbandingan rerata panjang badan dari masing-masing kelompok pada usia 3 dpf dan 6 dpf, rerata panjang badan 3 dpf tampak memiliki nilai rata-rata satu sama lain hampir sama, sedangkan pada usia 6 dpf tampak memiliki nilai rata-rata berbeda terutama kelompok rotenon lebih pendek daripada kelompok kontrol dan kelompok P1, P2 dan P3, sedangkan rasio panjang badan dan panjang kepala pada semua kelompok sama 1 : 5.

Seperti tampak pada tabel 5.2 terdapat selisih rerata panjang badan larva zebrafish usia 6 dpf antara kelompok rotenon (3,59 mm) dengan kelompok kontrol (3,76 mm) yaitu sebesar 0,17 mm, dan nilai 2 SD pada kelompok kontrol usia 3 dpf sebesar 0,16 dan usia 6 dpf sebesar 0,14, sehingga kelompok rotenon

rerata panjang badannya < -2 SD $(-0,17)$ jika dibandingkan terhadap kelompok kontrol usia 3 dpf dan 6 dpf, dengan demikian kelompok rotenon di usia 6 dpf terjadi *stunting*.

Berbeda halnya pada kelompok P1, P2 dan P3 yang merupakan kelompok yang diinduksi rotenon konsentrasi 12,5 ppb selama 3 hari dan ditambah dengan pemberian ekstrak etanol pegagan konsentrasi 5 $\mu\text{g/mL}$ selama 4, 5 dan 6 hari tampak terjadi peningkatan rerata panjang badan di usia 6 dpf jika dibandingkan dengan kelompok rotenon serta memiliki selisih yang tidak berbeda jauh dengan kelompok kontrol yaitu P1 memiliki selisih sebesar 0,03 mm, P2 sebesar 0,00 mm dan P3 sebesar 0,04 mm yang berarti rerata panjang badan kelompok P1, P2 dan P3 lebih dari 2 SD sehingga tidak terjadi *stunting*. Dengan demikian pemberian pegagan terbukti dapat mencegah pertumbuhan terhambat pada larva *zebrafish*.

Untuk mengetahui signifikansi perbedaan rerata panjang badan dari masing-masing kelompok maka dilakukan uji statistik *one way anova* pada usia 3 dpf dan 6 dpf seperti tampak pada gambar 5.6.

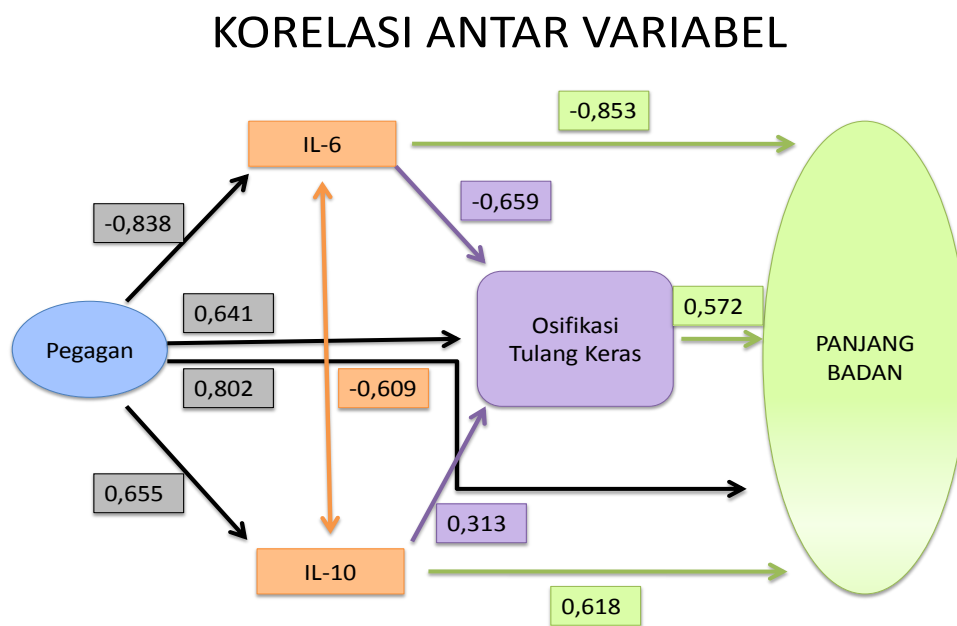


Gambar 5.6 Perbandingan rerata panjang badan larva *zebrafish* usia 3 dpf dan 6 dpf

Berdasarkan hasil uji statistik *one way anova* rerata panjang badan larva *zebrafish* usia 3 dpf tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok rotenon dengan kelompok lainnya ($p > 0,05$) baik terhadap kontrol maupun kelompok perlakuan, sedangkan rerata panjang badan larva *zebrafish* usia 6 dpf menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok rotenon terhadap kelompok kontrol dengan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) serta kelompok rotenon terhadap kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 dengan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

5.5 Korelasi Antar Variabel Penelitian

Untuk mengetahui korelasi antar variabel penelitian maka dilakukan analisis statistik *pearson correlation* seperti pada tabel berikut ini :



Gambar 5.7 Korelasi antar variabel penelitian

Berdasarkan gambar 5.7 terdapat signifikansi korelasi negatif yang sangat kuat antara lamanya pemberian ekstrak etanol pegagan dengan kadar

IL-6. Korelasi negatif tersebut menunjukkan semakin lamanya pemberian ekstrak etanol pegagan akan diikuti dengan penurunan kadar IL-6. Terdapatnya signifikansi korelasi positif kuat antara lamanya pemberian ekstrak etanol pegagan dengan kadar IL-10. Korelasi positif mempunyai makna semakin lamanya pemberian ekstrak etanol pegagan semakin dapat meningkatkan kadar IL-10. Terdapat signifikansi korelasi positif kuat diantara lamanya pemberian pegagan dan osifikasi tulang keras, hal ini berarti semakin lama pemberian ekstrak etanol pegagan maka akan diikuti adanya peningkatan osifikasi tulang keras. Adanya signifikansi korelasi positif yang sangat kuat antara lamanya pemberian pegagan dan panjang badan. Korelasi positif menunjukkan semakin lama pemberian ekstrak etanol pegagan maka akan diikuti adanya peningkatan panjang badan.

Berdasarkan gambar 5.7 terdapat korelasi negatif yang sangat kuat antara kadar IL-6 dengan panjang badan yang menunjukkan bahwa penurunan kadar IL-6 diikuti peningkatan panjang badan. Terdapat korelasi positif kuat antara kadar IL-10 dengan panjang badan yang berarti bahwa peningkatan kadar IL-10 diikuti peningkatan panjang badan. Dan terdapat korelasi positif kuat antara osifikasi tulang keras dengan panjang badan yang berarti bahwa peningkatan osifikasi tulang keras diikuti peningkatan panjang badan

Berdasarkan hasil penelitian seperti pada gambar 5.7 terdapat korelasi negatif kuat antara kadar IL-6 dengan osifikasi tulang keras yang menunjukkan bahwa penurunan kadar IL-6 diikuti peningkatan osifikasi tulang keras. tidak terdapat korelasi antara kadar IL-10 dengan osifikasi tulang keras.

Hasil penelitian seperti pada gambar 5.7 terdapat korelasi negatif kuat antara kadar IL-6 dan kadar IL-10 yang berarti bahwa penurunan kadar IL-6 akan diikuti dengan peningkatan kadar IL-10.

BAB 6

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini model *stunting* menggunakan larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon konsentrasi 12,5 ppb sesuai dengan studi penelitian sebelumnya konsentrasi tersebut terbukti menyebabkan *stunting* dengan derajat kepercayaan 98% (Primaditya *et al.*, 2017), dengan kriteria *stunting* telah terpenuhi yaitu panjang badan berdasarkan umur mempunyai batas nilai z-score $<-2SD$ (WHO, 2010), tidak ada kelainan kongenital saat lahir dan semua kelompok perlakuan memiliki nilai rasio yang sama dengan kelompok kontrol pada hasil pengukuran rasio panjang badan dan kepala (De Onis *et al.*, 2012; Syed, 2015; Picasso, 2016). Adapun pengukuran parameter penelitian dilakukan pada usia 3 dpf dan 6 dpf hal ini merujuk pada analogi usia larva *zebrafish* dengan manusia yaitu usia 3 dpf analog dengan bayi baru lahir dan 6 dpf analog dengan anak usia 2 tahun (Sorribes *et al.*, 2013). Untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pada kondisi *stunting* dengan parameter yang mau diteliti, paparan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dilakukan dengan membedakan lamanya perlakuan (4 hari, 5 hari dan 6 hari) pada setiap kelompok dengan konsentrasi yang sama yaitu 5 $\mu\text{g/ml}$ karena konsentrasi ini pada studi penelitian sebelumnya memberikan efek terbaik pada *stunting* (Wardani *et al.*, 2017).

6.1. Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Kadar IL-6 Larva *Zebrafish* Pada Usia 6 dpf

Berdasarkan hasil penelitian bahwa induksi rotenon 12,5 ppb secara signifikan meningkatkan kadar IL-6 pada *stunting* larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon. Diketahui bahwa pada anak-anak dengan kondisi *stunting* terdapat

peningkatan kadar IL-6 (El-Maksoud *et al.*, 2017), peningkatan kadar IL-6 yang berlebihan menyebabkan pertumbuhan terhambat (De Benedetti *et al.*, 2006).

Inflammasi kronis berkontribusi terhadap *stunting* (Kosek *et al.*, 2017), IL-6 dan IL-10 merupakan bagian dari marker inflammasi kronis yang berhubungan dengan *stunting* (Naylor *et al.*, 2016; Kosek *et al.*, 2017; Harper *et al.*, 2018).

Pemberian ekstrak etanol pegagan konsentrasi 5µg/mL selama 4, 5 dan 6 hari secara signifikan menurunkan kadar IL-6 pada semua kelompok larva zebrafish usia 6 dpf. Penurunan rerata kadar IL-6 kelompok P1 secara signifikan berbeda dengan kelompok rotenon dan kontrol, namun rerata kadar IL-6 pada kelompok P1 masih lebih tinggi dibanding kelompok kontrol yang berarti penurunan rerata kadar IL-6 pada kelompok P1 belum mencapai batas normal.

Sedangkan penurunan rerata kadar IL-6 pada kelompok P2 secara signifikan berbeda dengan rotenon dan P1 tetapi tidak signifikan terhadap kelompok kontrol yang berarti pada kelompok P2 penurunan rerata kadar IL-6 sudah secara optimal telah mencapai batas normal sesuai dengan rerata kadar IL-6 pada kelompok kontrol. Untuk P3 penurunan rerata kadar IL-6 secara signifikan berbeda dengan rotenon dan P2, tetapi tidak signifikan terhadap kontrol dan P1, yang berarti rerata kadar IL-6 masih dalam batas normal meskipun sudah mulai adanya peningkatan. Dengan demikian pada penelitian ini pemberian pegagan konsentrasi 5 µg/mL selama 4, 5 dan 6 hari secara signifikan mampu menghambat inflammasi dengan menurunkan kadar IL-6. Dan perlakuan yang paling optimal untuk menurunkan kadar IL-6 sampai batas normal adalah perlakuan P2 yaitu pemberian pegagan konsentrasi 5 µg/mL selama 5 hari, karena pada perlakuan P1 meskipun terdapat penurunan kadar IL-6 tetapi masih terjadi proses inflammasi, berbeda halnya dengan P3 kadar IL-6 tidak berbeda dengan kontrol yang berarti rerata masih dalam batas normal akan tetapi sudah mulai ada peningkatan.

Pemberian ekstrak etanol pegagan 4 dan 5 hari dapat menurunkan kadar IL-6. Hal ini membuktikan bahwa pegagan memiliki kemampuan sebagai antiinflammasi. Hasil ini sesuai dengan penelitian oleh Wan *et al.* (2012) meneliti bahwa pegagan (*Centella asiatica*) mengandung *Triterpenoid* jenis *Asiaticoside* yang dapat menghambat mediator proinflammasi IL-6. Pegagan mengandung juga *Triterpenoid* jenis *Madecassic acid* yang berperan sebagai antiinflammasi (Li *et al.*, 2007) yang efektif menghambat induksi *Lipopolysaccharide* (LPS) pada ekspresi kadar protein iNOS dan COX-2 dan transkripsi iNOS, COX-2, TNF α dan IL-6 melalui hambatan degradasi dan fosforilasi I κ B- α yang merupakan subunit dari NF κ B pada makrofag RAW 264.1 (Won *et al.*, 2010).

Pegagan mengandung mikronutrien Zinc, sesuai dengan penelitian Lindenmayer *et al.* (2014) menemukan bahwa defisiensi zinc cenderung memperburuk peradangan sistemik yang telah ditunjukkan untuk memediasi *stunting*. Zn memiliki sifat antiinflammasi dengan menghambat aktivasi transkripsi NF- κ B sebagai faktor transkripsi yang bertanggung jawab atas generasi sitokin inflammasi (El-Maksoud *et al.*, 2017). Pegagan mengandung Zn untuk memperbaiki kondisi *stunting* karena suplementasi Zn diperlukan sebagai zat untuk meningkatkan IGF-1 dan IGFBP-3 dalam proses percepatan pertumbuhan pada masa anak-anak (Hakimi *et al.*, 2006; Hamza *et al.*, 2012; El-Maksoud *et al.*, 2017).

6.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Kadar IL-10 Larva *Zebrafish* Pada Usia 6 dpf

Pada penelitian ini ditemukan bahwa pemberian pegagan 5 μ g/ml pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon dapat meningkatkan kadar IL-10, dengan bertambah waktu paparan pegagan 5 μ g/ml semakin meningkat kadar dari IL-10, hal ini membuktikan bahwa IL-10 sebagai antiinflammasi pada

stunting larva *zebrafish*. Rotenon 12,5 ppb dapat meningkatkan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang dapat memicu terjadinya stress oksidatif dan menyebabkan kerusakan jaringan. Hal ini sebagai molekul sinyal transduksi untuk berbagai jalur baik itu terhadap *growth factor*, sitokin maupun hormon (Sandana *et al.*, 2017). Pemberian rotenon 12,5 ppb menginisiasi sitokin seperti IL-6 sebagai sitokin proinflammasi mengalami peningkatan setelah larva *zebrafish* diinduksi rotenon 12,5 ppb selama 3 hari. Dengan pemberian pegagan 5 µg/mL mengaktivasi IL-10 dan menekan peningkatan kadar IL-6.

Pegagan mengandung *asiatikosida*, *madekosida*, *triterpenoid* dan *saponin* berperan penting melindungi kerusakan sel dan jaringan dengan mensintesis kolagen, serat kolagen berperan pada proses perbaikan luka akibat kerusakan jaringan (Winarto dan Surbakti, 2003; Selfitri dan Anggraeni, 2008; Sutardi, 2016).

Pemberian ekstrak pegagan 4, 5 dan 6 hari secara signifikan dapat meningkatkan kadar IL-10 pada *stunting* larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon. Hasil ini sesuai dengan penelitian Wan *et al.* (2012) menemukan *Asiaticoside* dari Pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan kadar IL-10, hal ini membuktikan pegagan dapat berfungsi sebagai antiinflammasi. Dengan demikian pada penelitian ini membuktikan bahwa pegagan berfungsi sebagai antiinflammasi ditandai adanya peningkatan kadar IL-10 pada *stunting* larva *zebrafish*.

6.3 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Osifikasi Tulang Keras Larva *Zebrafish* Pada Usia 6 dpf

Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara signifikan pemberian pegagan 5µg/mL selama 4, 5 dan 6 hari mampu meningkatkan osifikasi tulang keras pada *stunting* larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon. *Stunting* merupakan suatu

kondisi kegagalan dalam mencapai sebuah potensi genetik untuk menjadi tinggi (Golden, 2009). Tinggi badan atau panjang badan merupakan indikator pertumbuhan anak terutama berhubungan dengan ukuran kerangka tulang/skeletal. Ukuran skeletal berkorelasi dengan komposisi dan *density* mineral tulang (Zemel, 2013).

Skeletal Growth merupakan komponen pertumbuhan somatik ditandai dengan ukuran atau dimensi tulang yang meningkat, serta kekuatan tulang ditentukan oleh perubahan genetik, nutrisi, komposisi tubuh, maturasi seksual dan aktifitas fisik (Leonardo, 2002). Pertumbuhan tulang panjang terjadi pada *growth plate* bagian ujung tulang panjang oleh peristiwa *endochondral ossification* melalui proses pembentukan tulang dan perbaikan tulang (Leonardo, 2002).

Rotenon 12,5 ppb telah terbukti menyebabkan *stunting* dengan menurunkan IGF-1 (Cory'ah *et al.*, 2017) dan penurunan ekspresi osifikasi tulang (Primiastuti *et al.*, 2017). Rotenon dapat menyebabkan peningkatan apoptosis dan peningkatan ROS (Hock *et al.*, 2001; Alikhani *et al.*, 2005). *Apoptosis bone lining cells* yang tinggi berpengaruh terhadap proses pembentukan tulang baru (Hock *et al.*, 2001). Penyebab utama osteoklastogenesis adalah produksi ROS yang meningkat seperti terbentuknya radikal bebas, ion oksigen, serta peroksidase (Kim *et al.*, 2010; Jules *et al.*, 2012). Stress oksidatif menginisiasi respon imun IL-6 menghambat kondrogenesis awal sel ATDC5 yang merupakan sel line sebagai model yang sangat baik untuk mempelajari ossifikasi endokondral pada plate pertumbuhan (Nakajima *et al.*, 2009). IL-6 menghambat diferensiasi stem sel plate pertumbuhan ke proliferasi kondrosit, diferensiasi hipertropi kondrosit, dan mineralisasi matrik tulang pada proses pertumbuhan tulang (Nakajima *et al.*, 2009). Pada kondisi inflammasi kronis, kadar IL-6 meningkat dalam darah, secara langsung bertindak menekan plate pertumbuhan

tulang rawan dan menginduksi apoptosis sehingga menekan pertumbuhan tulang (Sederquist *et al.*, 2014). Kadar IL-6 meningkat mengakibatkan penurunan aksis GH/IGF-1 (De Benedetti *et al.*, 1997; Najakima *et al.*, 2009; Walter *et al.*, 2009). GH/IGF-1 merupakan hormon yang berperan penting dalam pertumbuhan tulang (Wit & Camacho-Hubner, 2011; Sederquist *et al.*, 2014). IL-6 berperan mengaktivasi osteoklastogenesis, sehingga jika terjadi peningkatan osteoklastogenesis maka akan menekan osteoblastogenesis yang berdampak pada pertumbuhan tulang (Wauquier *et al.*, 2009).

Pegagan mengandung *asiaticoside* dan *madecassoside* mempunyai potensi sebagai antiinflamasi yang baik dalam menekan aktivitas COX-1 serta COX-2 (Nurlaily *et al.*, 2012) ini dibuktikan pada studi penelitian terhadap tikus arthritis yang diinduksi kolagen mendapat pengobatan dengan *asiaticoside* dilaporkan dapat menghambat peradangan dengan mengurangi ekspresi COX2 dan sitokin inflamasi (Li *et al.*, 2007).

Pegagan mengandung *flavonoid* (Winarto dan Surbakti, 2003), *flavonoid* menghambat diferensiasi osteoklast, inhibit RANKL-induced nuclear factor dan aktivasi *Activator Protein 1* (AP-1), inhibit osteoklastogenik, dan meningkatkan OPG (Pelletier *et al.*, 2015; Sandana *et al.*, 2017). Kandungan Fosfor dalam pegagan menurut Sutardi (2016) meningkatkan ekspresi RANK dan RANKL yang memicu peningkatan osteoklas sehingga terjadi resorpsi tulang (Tjandranegara, 2017).

Dengan demikian pada penelitian ini pegagan secara signifikan mampu meningkatkan osifikasi tulang keras karena pegagan banyak mengandung berbagai zat nutrisi yang dibutuhkan pada proses osifikasi tulang keras dan berfungsi sebagai antiinflamasi mampu memperbaiki kerusakan jaringan akibat peningkatan radikal bebas.

6.4 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Panjang Badan Larva *Zebrafish* Usia 3 dan 6 dpf

Hasil penelitian menunjukkan rerata panjang badan larva *zebrafish* usia 3 dpf dan 6 dpf kelompok rotenon memiliki rerata lebih pendek dibanding kelompok kontrol. Secara statistik pada usia 3 dpf tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p=0,247$ ($p>0,05$) berbeda halnya pada usia 6 dpf menunjukkan perbedaan secara signifikan dengan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa induksi rotenon dengan konsentrasi 12,5 ppb dapat menurunkan panjang badan larva *zebrafish* usia 6 dpf. Dan berdasarkan penelitian ditemukan terdapat selisih panjang badan >2 SD pada kelompok rotenon dibanding kelompok kontrol, sehingga larva *zebrafish* pada usia 6 dpf pada kelompok rotenon mengalami *stunting*. Dengan demikian pada penelitian ini rotenon 12,5 ppb terbukti dapat menginduksi *stunting* larva *zebrafish* di usia 6 dpf, studi ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa rotenon konsentrasi 10 ppb dan 12,5 ppb dapat menyebabkan model *stunting* pada usia 6 dpf dan 9 dpf dengan derajat kepercayaan 93% dan 98% (Ridlayanti *et al.*, 2016; Primaditya, *et al.*, 2017). Pada penelitian tersebut dibuktikan bahwa rotenon dapat menurunkan panjang badan larva *zebrafish* (Ridlayanti *et al.*, 2016; Ariati *et al.*, 2017) dan faktor-faktor yang berhubungan dengan pertumbuhan terhambat atau *stunting* yaitu rotenon mampu menurunkan ekspresi BDNF (Ridlayanti *et al.*, 2016), menurunkan ekspresi Hsp60 dan meningkatkan ekspresi Bax (Wijayanti *et al.*, 2016), meningkatkan ekspresi RANKL dan menurunkan ekspresi OPG (Ariati *et al.*, 2017), menurunkan ekspresi osteocalcin dan GLUT-1 (Yuningsih *et al.*, 2017), menurunkan ekspresi GLUT 4 dan osteocalcin (Primaditya *et al.*, 2017), menurunkan ekspresi osifikasi tulang, meningkatkan ekspresi RANKL, dan meningkatkan ekspresi osteoklastogenesis (Primiastuti *et al.*, 2017),

menurunkan ekspresi VEGF dan ekspresi VEGFR-2 (Wardani *et al.*, 2017) dan menurunkan IGF-1 (Cory'ah *et al.*, 2017).

Pada usia 6 dpf larva *zebrafish* mengalami *stunting* dan usia 6 dpf analog dengan usia 2 tahun, hasil penelitian sejalan dengan Badham & Sweet (2010) yang berpendapat tentang *stunting* menggambarkan keadaan kegagalan seorang anak mencapai pertumbuhan linier disebabkan malnutrisi kronis, terjadi sejak masa intrauterin sampai usia 2 tahun. Kondisi *stunting* sebagai indikator malnutrisi salah satunya dengan mengukur panjang badan (PB) atau tinggi badan (TB) berdasarkan umur (WHO, 2010). Kondisi *stunting* berbeda dengan kretinisme. *Stunting* adalah pertumbuhan terhambat dengan kondisi tinggi badan berdasarkan umur <-2 SD (WHO, 2013) sedangkan kretinisme memiliki karakteristik tinggi badan kurang normal serta postur tubuh tidak proporsional (Syed, 2015). Berdasarkan hal ini, maka pengukuran rasio panjang badan dan panjang kepala dijadikan parameter pada penelitian ini. Pada tabel 5.2 menginformasikan bahwa rasio antara panjang kepala dengan panjang badan kelompok kontrol dan kelompok rotenon memiliki proporsi yang sama sejak usia 3 dpf sampai usia 6 dpf yaitu 5 : 1 sehingga dapat disimpulkan bahwa berdasarkan rasio tersebut pertumbuhan larva *zebrafish* normal tidak mengalami kretinisme atau kecacatan.

Rotenon sebagai pestisida, insektisida dan piscisida memiliki efek toksik lebih tampak pada ikan (Ott, 2006). Rotenon menyebabkan disfungsi mitokondria yang berdampak gangguan replikasi, migrasi dan oksigensisasi sel, sehingga terjadi peningkatan ROS, ROS kandidat utama yang menyebabkan apoptosis (Singer & Ramsay, 1994; Alikhani *et al.*, 2005). Kematian sel (apoptosis) yang meningkat dapat mengganggu pertumbuhan tulang, kematangan organ serta tumbuh kembang embrio akibat dari gangguan

transportasi elektron dan oksigenisasi sel sebagai efek toksik dari rotenon (Uauy, 2013).

Cautheal *et al.* (2002) menyatakan hanya 3% seorang anak memiliki peluang untuk bisa tumbuh mencapai kondisi normal. Hal ini jika dilakukan intervensi ketika anak berusia kurang dari 2 tahun, karena pada usia ini mereka lebih responsif, akan tetapi lain halnya jika dilakukan lebih dari 2 tahun kesempatan reversibel tidak tercapai.

Berdasarkan penelitian ini pemberian ekstrak etanol pegagan konsentrasi 5 µg/mL mampu mencegah pertumbuhan terhambat pada larva *zebrafish* akibat induksi rotenon 12,5 ppb sehingga tidak mengalami *stunting* dengan koreksi rata-rata sebesar 99,6% dengan uraian pencapaian panjang badan normal usia 6 dpf yaitu pada kelompok P1 sebanyak 10 larva (33,3%), P2 19 larva (63,3%) dan P3 9 larva (30%). Hasil temuan ini sejalan dengan studi penelitian sebelumnya yang menemukan bahwa perbedaan dosis pegagan konsentrasi 2,5 dan 5 µg/mL mampu meningkatkan panjang badan dan meningkatkan ekspresi BDNF (Ridlayanti *et al.*, 2016), meningkatkan ekspresi Hsp60 dan menurunkan ekspresi Bax (Wijayanti *et al.*, 2016), menurunkan ekspresi RANKL dan meningkatkan ekspresi OPG (Ariati *et al.*, 2017), meningkatkan ekspresi osteocalcin dan GLUT-1 (Yuningsih *et al.*, 2017), meningkatkan ekspresi GLUT 4 dan osteocalcin (Primaditya *et al.*, 2017), meningkatkan ekspresi osifikasi tulang, menurunkan ekspresi RANKL, dan menurunkan ekspresi osteoklastogenesis (Primiastuti *et al.*, 2017), meningkatkan ekspresi VEGF dan ekspresi VEGFR-2 (Wardani *et al.*, 2017) dan meningkatkan IGF-1 (Cory'ah *et al.*, 2017).

Peningkatan panjang badan dengan pemberian pegagan pada larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon, dikarenakan pegagan mengandung *asiaticoside* yang berfungsi sebagai antiinflammasi dan antioksidan. Penelitian Luo *et al.* (2015) menggunakan model tikus yang mengalami cedera tulang

belakang (*spinal cord injury rat model*) mengatakan bahwa *asiaticoside* mampu menghambat kerusakan jaringan dengan cara menghambat produksi sitokin proinflammasi yang ditandai adanya penurunan NF κ B unit p65, TNF- α , IL-1 β dan IL-6 serta menghambat aktivitas radikal bebas yang ditandai dengan adanya penurunan MDA dan iNOS serta peningkatan GSH dan GSH-PX.

Pegagan sebagai antioksidan telah dibuktikan juga pada penelitian terhadap tikus yang mengalami hipoksia dengan pemberian *Centella asiatica* 150mg/kgBB ditambah *Acalypha indica* 200mg/kgBB mampu melindungi hati pascahipoksia dengan peningkatan aktivitas antioksidan endogen dengan nilai GSH/GSSG dan aktivitas SOD dan mampu menurunkan kadar MDA (Frethernety *et al.*, 2015)

Berdasarkan beberapa penelitian diatas mendukung hasil penelitian ini bahwa pegagan mampu sebagai antiinflammasi dan antioksidan dengan terbukti meningkatkan panjang badan dengan menghambat aktivitas sitokin proinflammasi dan radikal bebas.

6.5 Korelasi Antara Lamanya Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Kadar IL-6, kadar IL-10, Osifikasi Tulang Keras dan Panjang Badan

Terdapat korelasi negatif yang sangat kuat dan signifikan antara lamanya pemberian ekstrak etanol pegagan dengan kadar IL-6 dengan nilai koefisien korelasi sebesar -0,838 dan $p=0,000$., dan berkorelasi positif yang kuat terhadap kadar IL-10 dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,655 dan $p=0,001$ yang berarti semakin lamanya pemberian ekstrak etanol pegagan akan diikuti dengan penurunan kadar IL-6 dan diikuti adanya peningkatan kadar IL-10.

Pegagan mengandung *madecassic acid* berfungsi sebagai antiinflamasi (Li *et al.*, 2007) efektif menghambat ekspresi kadar protein iNOS dan COX-2 dan transkripsi iNOS, COX-2, TNF α , dan IL-6 dengan penghambatan degradasi dan

fosforilasi I κ B- α yang merupakan subunit dari NF κ B pada makrofag RAW 264.7. pada tikus yang diinduksi *lipopolysaccharide* (LPS) (Won *et al.*, 2010). Penelitian lain pegagan mengandung *asiatikosida* dapat menekan peningkatan sitokin proinflammasi IL-6 dan mengaktivasi peningkatan sitokin IL-10 sebagai antiinflammasi (Wan *et al.*, 2013), IL-6 mempunyai pengaruh terhadap pertumbuhan dengan mengubah aksis IGF-1 (De Benedetti *et al.*, 2001; Lieskovska *et al.*, 2002).

Peningkatan kadar IL-10 pada pemberian pegagan merupakan suatu mekanisme mempertahankan haemostasis imun sebagai sitokin antiinflammasi akibat adanya peningkatan sitokin proinflammasi IL-6 dari induksi rotenon (Kim *et al.*, 2001).

Berdasarkan hasil penelitian terdapat korelasi positif yang kuat dan signifikan antara lamanya pemberian pegagan dengan osifikasi tulang keras dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,641 dan $p=0,001$ dan berkorelasi positif yang sangat kuat dengan panjang badan dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,802 dan $p=0,000$, hal ini berarti semakin lama pemberian ekstrak etanol pegagan maka akan diikuti adanya peningkatan osifikasi tulang keras dan peningkatan panjang badan.

Pertumbuhan pada masa bayi, anak-anak dan remaja sangat bergantung pada zat gizi, didukung oleh *growth hormon* dan diatur oleh sex steroid (Karlberg, 1989; Muslihah, 2016). Beberapa zat gizi menjadi penentu pertumbuhan dan perkembangan tulang rangka, antara lain cukup energi, asam amino dan beberapa mineral pembentuk tulang (Kalsium, Phospor, Magnesium dan Zinc) serta beberapa ion lainnya (Cuprum/Cu, Mangan/Mn, *carbonate* dan *citrate*) serta vitamin C, D dan K (Prentice *et al.*, 2006).

Pada penelitian ini pegagan mampu meningkatkan osifikasi tulang keras dan meningkatkan panjang badan larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon, hal ini

diyakini beberapa zat gizi yang terkandung pada pegagan banyak dibutuhkan pada proses pembentukan tulang seperti fosfor (Santa dan Bambang, 1992; Sutardi, 2016) sangat dibutuhkan pada proses resorpsi tulang pada proses remodeling tulang (Tjandranegara, 2017), mengandung suplemenentasi Zn yang diperlukan untuk meningkatkan IGF-1 dan IGFBP-3 dalam proses percepatan pertumbuhan masa anak-anak (Hakimi *et al.*, 2006; Hamza *et al.*, 2012; El-Maksoud *et al.*, 2017) dan suplementasi Zinc memberikan pengaruh terhadap penambahan tinggi badan (Brown *et al.*, 2002), pegagan juga mengandung kalsium yang sangat tinggi yang dibutuhkan pada proses pembentukan tulang (Chandrika, 2015).

6.6 Korelasi Antara Kadar IL-6, Kadar IL-10 dan Osifikasi Tulang Keras Terhadap Panjang Badan *Stunting* Larva *Zebrafish* Usia 6 dpf

Pada penelitian ini terdapat korelasi negatif yang sangat kuat antara kadar IL-6 dengan panjang badan dengan nilai koefisien korelasi sebesar -0,853 dan $p=0,000$. Korelasi negatif yang sangat kuat menunjukkan bahwa penurunan kadar IL-6 diikuti peningkatan panjang badan. Terdapat korelasi positif kuat antara kadar IL-10 dan osifikasi tulang keras terhadap panjang badan dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,618 dan $p=0,002$ pada IL-10 serta 0,572 dan $p=0,004$ pada osifikasi tulang keras, hal ini menunjukkan bahwa peningkatan kadar IL-10 dan peningkatan osifikasi tulang keras akan diikuti pula dengan peningkatan panjang badan.

Hasil ini sesuai dengan De benedetti *et al.* (2001) yang mengatakan bahwa IL-6 dianggap mempengaruhi pertumbuhan melalui mekanisme sistemik yang mengubah aksis *Growth Hormon*/IGF-1 dan overekspresi kronis IL-6 dapat menyebabkan retardasi pertumbuhan. Berdasarkan studi penelitian berikutnya De Benedetti *et al.* (2006) menemukan pada masa prapubertas IL-6 yang

overekspresi menyebabkan osteopenia, dengan akselerasi resorpsi tulang, reduksi pembentukan tulang dan rusaknya osifikasi (defek osifikasi). Peningkatan resorpsi tulang karena peningkatan osteoklastogenesis dapat mengurangi aktivitas osteoblas dalam menginduksi mekanisme efek proliferasi prekursor dan fungsi osteoblas.

Penelitian lain mengatakan bahwa peningkatan IL-6 mengaktifkan osteoklastogenesis sehingga menghambat osteoblastogenesis yang berdampak pada pertumbuhan tulang terhambat (Wauquier *et al.*, 2009).

6.7 Korelasi Antara Kadar IL-6 dan Kadar IL-10 Terhadap Osifikasi Tulang Keras *Stunting* Larva *Zebrafish* Usia 6 dpf

Pada penelitian ditemukan terdapat korelasi negatif kuat antara kadar IL-6 dengan osifikasi tulang keras dengan nilai koefisien korelasi sebesar -0,659 dan $p=0,001$ yang berarti bahwa penurunan kadar IL-6 akan diikuti peningkatan osifikasi tulang keras. Dan tidak terdapat korelasi antara kadar IL-10 dengan osifikasi tulang keras. Hal ini sesuai pada penelitian terhadap tikus transgenik bahwa aktivitas osteoblast dipengaruhi oleh sitokin IL-6, penurunan kadar IL-6 dapat meningkatkan kerja osteoblast, meningkatkan proliferasi prekursor osteoblas dan meningkatnya ekspresi gen protein matriks tulang (De Benedetti *et al.*, 2006).

Dan pada penelitian ini juga menemukan bahwa tidak terdapat korelasi yang signifikan antara osifikasi tulang keras dengan kadar IL-10. Hal ini diduga ada peran sitokin antiinflamasi lain yang ikut terlibat dalam proses remodeling tulang seperti IL-4 atau TGF- β , sitokin-sitokin ini yang berperan meningkatkan kerja osteoblast dalam pembentukan tulang baru atau faktor lain yang berhubungan tidak langsung terhadap osifikasi tulang keras (Sihombing *et al.*, 2012)

6.8 Korelasi kadar IL-6 dan Kadar IL-10

Berdasarkan hasil penelitian terdapat nilai korelasi negatif kuat diantara kadar IL-6 dengan kadar IL-10 dengan nilai koefisien korelasi sebesar $-0,609$ dan $p=0,002$ yang berarti bahwa penurunan kadar IL-6 akan diikuti dengan peningkatan kadar IL-10. Peningkatan kadar IL-10 sebagai sitokin antiinflamasi merupakan suatu mekanisme mempertahankan haemostasis yang berdasarkan atas fungsi fisiologisnya, IL-6 sebagai sitokin proinflamasi dan IL-10 sebagai antiinflamasi, untuk mempertahankan haemostasis imun diperlukan adanya keseimbangan antara efek dari kedua sitokin karena ketidakseimbangan antara proinflamasi dan antiinflamasi berhubungan dengan berkurangnya kelangsungan hidup (Kim *et al.*, 2001).

6.9 Implikasi Hasil Penelitian pada Kebidanan

Stunting merupakan masalah global dan terbanyak prevalensinya di negara-negara berkembang termasuk Indonesia. *Stunting* dapat dijadikan sebagai faktor resiko meningkatnya morbiditas dan mortalitas dari penyakit infeksi. Pertumbuhan yang sehat sejak konsepsi hingga usia 2 tahun pertama kehidupan merupakan sebagai dasar dari pembentukan dan cukupnya fungsi organ, kuatnya sistem imun, kesehatan fisik, dan perkembangan syaraf dan kognitif (Piwoz *et al.*, 2012).

WHO mempunyai target ingin menurunkan kejadian *stunting* sebesar 40% pada tahun 2025 yaitu dari 165 juta anak *stunting* pada tahun 2012 menurun menjadi 100 juta anak pada tahun 2025. Penelitian ini digunakan untuk mengetahui patomekanisme *stunting* pada level molekuler yang mendukung studi epidemiologi tentang *stunting* dan untuk mengetahui bagaimana memanfaatkan peluang yang dapat dilakukan untuk mencegah *stunting* sehingga prevalensi *stunting* berkurang

Window of opportunity atau jendela peluang untuk mengurangi kejadian *stunting* yaitu pada 1000 HPK yang dimulai saat pembuahan hingga umur 2 tahun (Victoria *et al.*, 2010). Asupan nutrisi pada ibu sebelum pembuahan sangat menentukan status gizi generasi yang akan dilahirkannya (Bhutta *et al.*, 2013; Prentice *et al.*, 2013). Penelitian ini digunakan untuk mengetahui patomekanisme *stunting* pada level molekuler yang mendukung studi epidemiologi tentang *stunting* dan untuk mengetahui bagaimana peluang untuk mencegah *stunting* sehingga prevalensi *stunting* berkurang

Bidan sebagai ujung tombak pelayanan terdekat terhadap seorang wanita sepanjang siklus kehidupannya mulai masa pranikah, hamil, menyusui dan melahirkan. Sebagai bidan mempunyai tugas dan kewenangan dalam memberikan asuhan kebidanan antara lain meliputi ANC, INC dan PNC, namun seyogyanya asuhan kebidanan yang diberikan haruslah pelayanan yang berkualitas, karena dengan pelayanan berkualitas akan memudahkan untuk dapat mendeteksi sedini mungkin faktor-faktor apa saja yang berhubungan dan mempunyai resiko terjadinya *stunting*, sehingga jika terdeteksi sedini mungkin maka dapat bertindak secara cepat dan tepat untuk segera mengatasinya.

6.10 Keterbatasan Penelitian

Adapun keterbatasan dalam penelitian ini adalah keterbatasan jumlah sampel yang diharapkan lebih banyak sehingga dapat meningkatkan hasil penelitian yang lebih baik. Kurangnya ketelitian dan ketelatenan dari peneliti karena keterbatasan pengetahuan dalam merawat ikan *zebrafish*.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak etanol pegagan pada masa pre sampai dengan post hatching terbukti menurunkan kadar IL-6 pada *stunting* larva *zebrafish*.
2. Pemberian ekstrak etanol pegagan pada masa pre sampai dengan post hatching terbukti meningkatkan kadar IL-10 pada *stunting* larva *zebrafish*.
3. Pemberian ekstrak etanol pegagan pada masa pre sampai dengan post hatching terbukti meningkatkan osifikasi tulang keras pada *stunting* larva *zebrafish*.
4. Pemberian ekstrak etanol pegagan pada masa pre sampai dengan post hatching terbukti meningkatkan panjang badan *stunting* larva *zebrafish*.
5. Adanya korelasi negatif sangat kuat antara lamanya pemberian pegagan dengan kadar IL-6, korelasi positif kuat dengan kadar IL-10 dan osifikasi tulang keras dan berkorelasi positif sangat kuat dengan panjang badan *stunting* larva *zebrafish*.
6. Adanya korelasi negatif sangat kuat antara panjang badan dengan kadar IL-6, berkorelasi positif kuat dengan kadar IL-10 dan osifikasi tulang keras.
7. Adanya korelasi negatif kuat antara osifikasi tulang keras dengan kadar IL-6 dan tidak adanya korelasi antara osifikasi tulang keras dengan kadar IL-10.
8. Adanya korelasi negatif kuat antara kadar IL-6 dan kadar IL-10.

Berdasarkan hasil penelitian ini pegagan (*Centella asiatica*) dengan kandungan zat aktif serta nutrisinya memiliki keistimewaan sebagai antiinflamasi, antioksidan dan zat nutrisi yang dibutuhkan untuk mengatasi gangguan pertumbuhan embrio dan larva *zebrafish* yang mengalami *stunting* karena adanya inflamasi (peradangan), stress oksidatif (radikal bebas) dan defisiensi zat gizi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan oleh karena itu layak untuk dibudidayakan dan dimanfaatkan sebagai tanaman herbal. *Zebrafish* sebagai model *stunting* pada penelitian ini yang memiliki kemiripan genetik 70% dengan manusia memberikan acuan bahwa hasil penelitian dapat diaplikasikan terhadap manusia. Sehingga intervensi pencegahan *stunting* lebih efektif pada 1000 HPK (Pranatal dan Postnatal).

7.2 Saran

1. Perlu penelitian lebih lanjut tentang efektivitas pemberian pegagan apabila diberikan dalam jangka waktu yang lebih lama terhadap pencegahan *stunting* seperti pemberian pegagan diberikan sampai usia remaja dan dewasa
2. Perlu penelitian lebih lanjut tentang penyebab *stunting* pada tingkat DNA sehubungan *stunting* salah satu penyebabnya adalah bersifat genetik.
3. Perlu penelitian lebih lanjut terhadap isolasi zat aktif pegagan yang paling berperan terhadap pencegahan *stunting*.
4. Perlu penelitian lebih lanjut bagaimana fertilitas generasi *stunting* berikutnya

DAFTAR PUSTAKA

Abdollahi, M. 2004. Pesticides and oxidative stress : a review. *Medical Sciences Monitor*. **10** (6): 141-148

Adharini. 2008. Uji Kemampuan Ekstrak Akar Tuba (*Derris elliptica Benth*) untuk Mengendalikan Rayap Tanah (*Captotermes curvinagtus Holmgren*). Departemen Silviculture Fakultas Pertanian IPB. Bogor.

Adriana, M. dan Wirjatmadi, B. 2012. *Peranan Gizi dalam Siklus Kehidupan*. Penerbit Kencana Prenada Media Group: Jakarta.

Agustina, D.I.V., Tinny E.H., and Hidayat S. 2011. Moringa Oleifera Leaf Powder Decrease Fatty Liver Degree and Liver Interleukin-6 Expression of Rat with Protein Energi Malnutrition. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. **26** (3): 125-130.

Ali S.S., Dhaded, Goudar, S. 2014. The Impact of Nutrition on Child Development at 3 Years in Rural Community of India. *International Journal of Preventif Medicine*. Int J Prev Med. **5** (4): 494-499.

Almatsier, S., Soetardjo, S., Soekarti, M. 2012. *Gizi Seimbang Dalam Daur Kehidupan*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.

Aly, G.S., Shaalan, A.H., Mattar, M.K., Ahmed, H.H., Zaki, M.E., and Abdallah, H.R. 2014. Oxidatif Stress Status in Nutritionally Stunted Children. *Egyptian Pediatric Association Gazette*. **62**: 28-33.

Ariati, L.I.P., Ali M., Khotimah H. *Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (Centella asiatica) Terhadap Ekspresi Osteoprotegrin (OPG) dan Receptor Activator Nuclear Kappa- β Ligan (RANKL) pada Stunting Larva Zebrafish (Danio rerio) yang Diinduksi Rotenon* [Tesis]. Malang: Universitas Brawijaya; 2017.

Asahina, A.H., Yamazaki, Y., Uchida, M., Shinohara, Y., Honda, M.J., Kagami, H & Ueda, M. 2007. Effective bone engineering with periosteum-derived cells. *J. Dental. Res*. **86** (1):79-83.

Astuti, Y. 2013. Zebrafish : Si Kecil bermanfaat Besar. Majalah 1000 Guru. Department of Pediatrics, Division of Blood and Marrow Transplantation, University of Minnesota. <http://majalah1000guru.net/2013/10/zebrafish-kecil-manfaat-besar/> diakses tanggal 25 oktober 2017

Avdesh, A., Chen M., Iverson, M.T.M., Mondal, A., Ong, D., Smith, S.R., et al. 2012. Regular Care and maintenance of a zebrafish (Danio rerio) laboratory : An Introduction. *Journal of Visualized Experiments*. **69** (e4196): 1-8.

Badan Pengawas Obat dan Makanan RI. 2010. Pegagan (Centella asiatica (L) Urban). Jakarta : Direktorat OAI, Deputi II, Badan POM RI, 2010.

Bai, X. C., Lu, D., Liu, A. L., Zhang, Z.M., Li, X.M., Zou, Z. P & Luo, S. Q. 2005. Reactive Oxygen Species Stimulates Receptor Activator of NF-KB Ligand Expression in Osteoblast. *Journal of Biological Chemistry*. **280** (17): 17497 – 17506.

Barbazuk, W. B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., & Johnson, S.L. 2000. The Syntenic Relationship of the zebrafish and Metabolism. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, **23** (1-2): 3-16

Basso, A.S., Cheroutre, H, and Mucida, D. 2009. More stories on Th17 cells. *Cell Res*. **19**: 399–411.

Bloem, Martin, W., Saskia, D.P., Le T.H., Nguyen, C.K., Arnaud, L., et al. 2013. Key Strategies to Further Reduce Stunting in Southeast Asia: Lessons from the ASEAN Countries Workshop. *Food and Nutrition Bulletin*. **34** (2).

Brinkman HJ, de Pee S, & Sanogo I. 2010. High Food Prices and The Global Financial Crisis Have Reduced Access to Nutritious Food and Worsened Nutritional Status and Health. *J. Nut*. **140**: 153S-161S.

Brooks, I., & Price, R. 1961. Studies on the Chronic Toxicity of Pro-Noxfish, A Proprietary Synergized Rotenone Fish-Toxicant. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **3**: 49-56.

Budiyanto, E., Aditya, A.R., & Wardani, A. Y. Pemanfaatan Ekstrak Akar Tuba (Derris Elliptica) Sebagai Insektisida Ramah lingkungan Untuk mengendalikan Populasi Ulat Bulu. FMIPA. Yogyakarta: Universitas Negeri; 2011.

Bhutta, Z.A. 2008. Maternal and Child Undernutrition 3 What Works? Intervention for Maternal and Child Undernutrition and Survival. *Lancet*. **37**: 417-40.

Caetano-Lopes, J., Canhao, H., & Fonseca, J.E. 2006. Osteoblasts and Bone formation. *Acta reumatologica portuguesa*, **32** (2) : 103-110

Celik, Sercan B., Figen S., Ufuk B., & Huseyin C. 2014. Growth Status of Children in Well-Baby Outpatient Clinics and Related factors.

Chandrika, U.G., & Peramune, K.A. 2015. Gotu Kola (Centella asiatica) : Nutritional Properties and Plausible Health Benefits, *Advances in Food and Nutrition research*. Elsevier: 125-153

Chen, C.L., Wen-Hao Tsai, W.H., Chen & C.J., Pan, T.M. 2016. Centella asiatica extract protects against amyloid β_{1-40} -induced neurotoxicity in neuronal cells by activating the antioxidative defence system. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. **6**: 362-369

Chippada, S.C., & Vangalapati, M. 2011. Antioxidant and Anti-inflammatory and anti-arhtritic Activity of Centella asiatica Extract. *Journal of Chemical, biological and Physical Sciences (JCBPS)*. **1** (2): 260.

Chen, D., Zhao, M & Mundy, G.R 2004. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. **22**: 233-241.

Coley An MJDaT, Benefice E, Simondon F, Wade S, Simondonk B. 2006. Preschool stunting, adolescent migration catch-up growth and adult height in young senegalese men and women of rural origin. *J Nutr*. **136**: 2414-2420

Cory'ah, Fitra A.N. *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* [Tesis]. Malang : Universitas Brawijaya; 2017.

Dahlan, Sopiudin. 2009. Statistik untuk kedokteran dan Kesehatan (Edisi 5). Penerbit : Salemba Medika

Damaiyani, J., & Metusula, D. 2011. Fenologi Perkembangan Bunga Centella asiatica dan Studi Waktu Pematangan Pollen Pada Berbagai Stadia. *Jurnal Hayati*. **7**: 75-78.

De Benedetti, F. D., 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. *The American Society for Clinical Investigation*. **99** (4) : 643-650

De Benedetti, F., Meazza, C., Oliveri, M., Pignatti, P., Vivarelli, M., Alonzi, T., et al. 2001. Effect of IL-6 on IGF binding protein-3: a study in IL-6 transgenic mice and in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Endocrinology*. **142**: 4818-26.

De Benedetti, F., Rucci, N., Del Fattore, A., Peruzzi, B., Paro, R., Longo, M., & Ferrari, S. 2006. Impaired Skeletal Development in Interleukin 6 Transgenic Mice: A Model For The Impact Of Chronic Inflammation on the Growing Skeletal System. *Arthritis & Rheumatism*. **54** (11): 3551-3563

Dewey, K.G & Huffman, S.L. 2009. Maternal, infant, and young child nutrition: combining efforts to maximize impacts on child growth and micronutrient status. *Food Nutr Bull*. **30**:S187-9.

Dhanasekaran, M., Holcomb, L. A., Hitt, A. R., Tharakan, B., Porter, J. W., Young, K.A., & Manyam, B. V. 2009. Centella asiatica extract Selectively Decrease Amyloid β Levels in Hippocampus of Alzheimer's Disease Animal Model. *Phytotherapy Research*. **23** (1) : 14-19.

Djuwita, I., Pratiwi, I., A., and Winarto, A., 2012. Proliferasi Dan Diferensiasi Sel Tuang Tikus Dalam Medium Kultur In Vitro Yang Mengandung Ekstrak Batang Cissus Quadrangula Salisb (Sipatah-Patah). *Jurnal Kedokteran Hewan*. **6** (2): 75-80

Duraiappah, A. 2005. Ecosystems and Human Well-being: Biodiversity Synthesis (Island Pres, Washington, District of Columbia) 100pp.

El-Maksoud, A.M.A., Khairy, S.A., Sharada, H.M., Abdalla, M.S., & Ahmed, N.F., 2017. Evaluation of pro-inflammatory cytokines in nutritionally stunted Egyptian Children. *Egyptian Pediatric Association Gazette*. Xxx: 1-5

Epstein F.H., 1995. Bone marrow, cytokine, and bone remodeling. *N Engl J Med*.

Ernawati F., Muljati S., Dewi S.M., Safitri A. 2014. Hubungan Panjang Badan Lahir Terhadap Perkembangan Anak Usia 12 Bulan. *Penel Gizi Makan*. **37** (2) : 109-118

Frerherty, A., Louisa, M., Hardiany, N.S., Dwijayanti, A. & Purwaningsih, E.H. 2015. Efek Antioksidan Kombinasi Ekstrak Etanol *Acalypha indica* dan *Centella asiatica* pada Fungsi Hati Tikus Pascahipoksia Sistemik. *eJKI*. **3** (2) : 101-106

Fridolina Mau & Mefi Mariana Tallan, 2016. Gambaran Peningkatan Kadar Inter Leukin-10 (IL-10) dan Tumor Necrosis Faktor – Alfa (TNF- α) dengan Gejala Klinis pada Penderita Malaria. *Buletin Penelitian Kesehatan*. **44** (3): 181 – 186

Garey H., Nouris M.D., Nancy A., Murfi M.D. 2013. Motor Delays : Early Identification And Evaluation. *Pediatric Juni 2013, Volume 131/Issue 6 from The American Academy of Pediatric Clinical Report*.

Gaspari, S., Marcovecchio, M.L., Breda, L & Chiarelli, F. 2011. Growth in juvenile idiopathic arthritis : the role of inflammation. *Clinical and Experimental Rheumatology*. **29**:104-110

Gat-Yablonski G, Pando R, Phillip M. 2013. Nutritional catch-up growth. *World Rev Nutr Diet*. **106**: 83-9.

Gohil, K., Patel, J., & Gajjar, A. 2010. Pharmacological Review on *Centella asiatica*: A Potential Herbal Cure-all. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 546-556

Golden MH. 2009. Proposed Recommended Nutrient Densities for Moderately Malnourished Children. *Food Nutr Bull*. **30**: S267-342.

Goody, M. F. and Henry, C. A. 2013. Motility Assay for Zebrafish Embryos. *Bio-protocol*. **3** (11): e787.

Goody, M. F., Kelly, M. W., Reynolds, C. J., Khalil, A., Crawford, B. D. and Henry, C. A. 2012. NAD⁺ Biosynthesis Ameliorates a Zebrafish Model of Muscular Dystrophy. *PLoS Biol*. **10** (10): e1001409.

Haffter, P., & Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Odenthal, J., Van Eeden, F.J., Jiang, Y.J., Heisenberg, C.P. and Kelsh, R.N., 1996. The Identification of Genes With Unique and Essential Functions in The Development of The Zebrafish, *Danio rerio*. *Development*. **123** (1): pp1-36.

Hakimi, S.M., Hashemi, F., Valaeei, N., Seyed-Masood, K., Velayati, A.A., Boloursaz, M.R. 2006. The Effect of Supplemental Zinc on the Height and Weight Percentiles of Children. *Arch Iran Med.* **9**:148–152.

Hallare, A.V., Kohler H.R., and Triebkom R. 2004. Developmental Toxicity and Stress Protein Responses in Zebrafish Embryos After Exposure to Diclofenac and Its Solvent, DMSO. *Chemosphere.* **56**: 659-666.

Hamza, R.T., Hamed, A.I., Sallam, M.T. 2012. Effect of Zinc Supplementation on Growth Hormone Insulin Growth Factor Axis in Short Egyptian Children with Zinc Deficiency. *Ital J Pediatr.* **38**:21.

Hanum, S., Widodo, M., Rahayu, M. 2016. Pengaruh Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Tirosin Hidroksilase (TH) serta aktivitas Lokomotor ikan Zebra (*Danio rerio*). **29** (2): 99-103

Harper, K.M., Mutasa, M., Prendergast, A.J., Humphrey, J., Manges, R. 2018. Environmental Enteric Dysfunction Pathways And Child Stunting : A Systematic Review. *PLOS Neglected Tropical Disease.* 1-23

Hart, G.R. 2005. Medical Conditions Associated with Vitamin Deficiency and The Clinical Consequences. *IDS.* **1** :1–7.

Hashim, P., Sidek, H., Helan, M.H., Sabery, A., Palanisamy, U.D., & Ilham, M. 2011. Triterpene Composition and Bioactivities of *Centella asiatica*. *Molecules.* **16** (2): 1310-1322

Hayati, A.W., Hardinsyah, Jalal F., Madanijah, & Briawan D. 2012. Faktor-faktor Risiko Stunting, Pola Asupan Pangan, Asupan Energi dan Zat Gizi Anak 0-23 Bulan. *Jurnal Gizi dan Pangan.* **7** (2): 73-80

Hien, P. P., H. Gortnizka dan R. Kraemer. 2003. Rotenone – Potential And Prospect For Sustainable Agriculture. *Cuu Long Delta Rice Research Institute.* Vietnam. *OMONRICE* **11**: p83-92

Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., J.D., & Scrimgeour, K. G. 1996. Principles of Biochemistry (pp.509-509). Upper Saddle River, NY: Prentice Hall.

Hunt MJ. 2005. The Potential Impact of Reducing Global Malnutrition on Poverty Reduction and Economic Development. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition.* 10-38.

IDAI. 2013. Kurva Pertumbuhan WHO. Indonesian Pediatric society. Committed in improving The Health of Indonesian Children.

Jagtap, N. S., Khadabadi, S. S., Ghorpade, D. S., Banarase, N. B., & Naphade, S.S 2009. Antimicrobial and Antifungal Activity of *Centella asiatica* (L) Urban, Umbeliferae. *Research Journal of Pharmacy and Technology.* **2** (2): 328-330.

James, J.T., & Dubery, I.A. 2009. Pentacyclic Triterpenoids From The Medicinal herb, *Centella asiatica* (L) Urban. *Molecules.* **14** (10): 3922-3941.

Jamil, S.S., Nizami, Q., Salam, M., & Urban, L. 2007. *Centella asiatica* (Linn.) Urban 6A Review. **6** (2): 158-170.

Jeneponto Regency. *Indonesian Journal of Human Nutrition*. **3** (1) Suplemen : 42 – 53

Jonathan, K. 2009. Clearing And Staining For Larval Fish Cartilage And Bone. ZFIN Protocol.

Joshi, K., & Chaturvedi, P. 2013. Therapeutic Efficiency of *Centella asiatica* (L.) Urb. An Underrutilized Green Leafy Vegetable : an overview. *International Journal Of Pharma And Bio Sciences*. **4** (1): 135-49.

Kaitlyn, M.H., Maxine, M., Andrew, J.P., Jean H., and Ameer, R.M. 2018. Environmental enteric dysfunction pathways and child Stunting : A systematic review. *Neglected Tropical Diseases*. **12** (1): 1-23.

Kaku K OH, Seki K, Sekiya S. 2007. Insulin-like Growth Factors 2 (IGF-2) and IGF2 Receptor Gene Variants are Associated with Fetal Growth. *Acta Paediatr*. **96**: 363-367.

Kaur,P.D.I.R., Faridi, M.M.A., and Agarwal, K.N. 2009. Cytokine Response to Dietary Rehabilitation with Curd (Indian dahi) & Leaf Protein Concentrate in Malnourished Children. *Indian J Med Res*. pp31-36

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2016. Situasi Balita Pendek. Pusat Data dan Informasi (Infodatin)

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

Khotimah, H., Sumtro, S.B., Widodo M.A. 2015. Zebrafish Parkinson's Model : Rotenon Decrease Motility, Dopamine, and Increase α -synuclein Aggregation and Apoptosis of Zebrafish Brain. *International Journal of PharmTech Research*. **8** (4) : pp 614-621.

Kim, M. H., Hahm, T. O. 2001. Plasma Levels of Interleukin-6 and Interleukin-10 are Affected by Ketorolac as an Adjunct to Patient-Controlled Morphine after Abdominal Hysterectomy. *The Clin J Pain*. **17**: 72-7.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel S.R., Ullmann, B., & Schilling, T.F. 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Development Dynamics*. **203** (3): 253-310

Kosek, M.N., Ahmed, T., Bhutta, Z., Caulfield, L., Guerrant, R., Houpt, E., et al. 2017. Causal Pathways from Enteropathogen to Environmental Enteropathy: Findings from the MAL-ED Birth Cohort Study. *Ebiomedine*. **18**: 109-117.

Kronenberg H.M. 2003 Developmental Regulation of the Growth Plate. *Nature*. **423**: 332–336.

Kuhlbrandt, W. 2015. Structure and Function of Mitochondrial Membrane Protein Complexes. *BMC Biology*. **13** (1) : 89

Kusuma I.R., Salimo H., & Sulaeman E.S. 2017. Analisis Pengaruh Berat Badan Lahir Rendah, Pemberian ASI Eksklusif, Stimulasi dan Status Gizi Terhadap Perkembangan Motorik Kasar Anak Usia 6-24 Bulan Di Kabupaten Banyumas. *Prosiding Seminar Nasional Kebidanan dan Call For Paper*. 321-327

Lammer, E., Carr G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T. 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the Zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. **149** : 196-209

Le Roith D., Bondy C., Yakar S., Liu J.L & Butler A. 2001. The Somatomedin Hypothesis. *Endocrine Reviews*. **22**: 53-74.

Li, H., Gong, X., Zhang, L., Zhang, Z., Luo, F., Zhou, Q., et al. 2009. Madecassoside Attenuates Inflammatory Response on Collagen-induced Arthritis in DBA/1 Mice. *Phytomedicine*. **16** (6): 538-546

Li, H.Z., Wan, J.Y., Zhang, L., Zhou, Q.X., Luo, F.L. & Zhang, Z. 2007. Inhibitory Action of Asiaticoside on Collagen-induced Arthritis in Mice. *Acta pharmaceutica Sinica* **42** (7): 698-703.

Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J.A., & Robinson, J.P. 2003. Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis Through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Journal of Biological Chemistry*. **278** (10): 8516-8525.

Lieskovska, J., Guo, D., and Derman, E. 2002. IL-6-Overexpression Brings About Growth Impairment Potentially Through a GH Receptor Defect. *Growth Horm IGF Res*. **12**: 388-98.

Lin A., Arnold B.F., Afreen S., Goto R., Huda T.M., et al. 2013. Household Environmental Conditions are Associated with Enteropathy and Impaired Growth in Rural Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg*. **89**: 12-0629.

Lindenmayer, G.W., Stoltzfus, R.J., Prendergast, A.J. 2014. Interactions Between Zinc Deficiency and Environmental Enteropathy in Developing Countries. *Adv Nutr*. **5**: 1-6.

Luccit, 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 dan Cellular Proteomics*. **7** (5): 981 - 994.

Lui J.C., Nilsson O., & Baron J. 2014. Recent Insights Into the Regulation of The Growth Plate. *J Mol Endocrinol*. **53**: T1-T9.

Luo, Y., Fu, C.F., Wang, Z., Zhang, Z., Wang, H., & Liu Y. 2015. Asiaticoside Attenuates The Effects of Spinal Cord Injury Through Antioxidant and Anti-inflammatory Effects, and Inhibition of The p38-MAPK Mechanism. *Molecular Medicine Report*. **12**: 8294-8300.

Ma'mun, A. 2000. Perkembangan Gerak dan Belajar Gerak. *Departemen Pendidikan dan Kebudayaan*.

Macdonald, N.P., Zhu, F., Hall, C.J., Reboud, J., Crosier, P.S., Patton, E.E., et al. 2016. Assesment of Biocompatibility of 3D Printed Photopolymers Using Zebrafish Embryo Toxicity Assays. *Lab on a Chip*. **16** (2): 291-297.

Mackie E.J., Ahmed Y.A., Tatarczuch L., Chen K.S., & Mirams M. 2008. Endochondral Ossification: How Cartilage is Converted into Bone in The Developing Skeleton. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**: 46–62.

MacRae, V.E., Wong, S.C., Farquharson, C., and Ahmed, S.F., 2006. Cytokine Actions in Growth Disorders Associated with Pediatric Chronic Inflammatory Diseases (review). *International Journal of Molecular Medicine*. **18**: 1011–1018.

Mainardi, G L., Saleri, R., Tamanini, C., & Baratta, M. 2002. Effects of interleukin-1- β , interleukin-6 and tumor necrosis factor- α , alone or in association with hexarelin or galanin, on growth hormone gene expression and growth hormone release from pig pituitary cells. *Hormone Research* . **58**: 180–186.

Manolagas, S.C. 2000. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews*. **21** (2): 115–137.

Mark, D., Deboer, M.D., Rebecca J., Scharf, M.D., Alvaro, M., Leite, M.D., et al. 2016. Systemic Inflammation, Growth Factors, and Linear Growth in The Setting of Infection and Malnutrition. *Nutrition*. **33**: 248-253.

Martensson, K., Chrysis, D., & Savendahl, L. 2004. Interleukin-1 β and TNF- α Act in Synergy to Inhibit Longitudinal Growth in Fetal Rat Metatarsal Bones. *Journal of Bone and Mineral Research*. **19**: 1805–1812.

Martorell, R., Horta, B.L., & Adair, L.S., et al. 2010. Weight Gain in the First Two Years of Life Is an Important Predictor of Schooling Outcomes in Pooled Analyses from Five Birth Cohort from Low and Midle Income Countries. Consortium on Health Oriented Research in Transitional Societies Group. *J. Nutr.* **140**: 348—354.

Mayden, R.L., Tang, K.L., Conway, K.W., Freyhof, J., Chamberlain, S., Haskins, M., et al. 2007. Phylogenetic Relationships of Danio within The Order Cypriniformes : a Framework for Comparative and Evolutionary Studies of a Model species. *Journal of Experimental Zoology Part B : Molecular and Developmental Evolution*. **308** (5): 642-654.

Mendieta-Serrano, M.A., Schnabel, D., Lomeli, H., Salas-Vidal, E. 2013. Cell Proliferation Patterns in Early Zebrafish Development. *The Anatomical Record*. **296**: 759-773

Mohan, S. And Kesavan C. 2012. Role of Insulin-like Growth Factor-1 in The Regulation of Skeletal Growth. *Curr Osteoporos Rep.* **10**: 178-86.

Morvan, F., Boulukos, K., K., Clement-lacroix, P., Roman, S. R., Suc-royer, I., Vayssiere, B., & Mollat, P. 2006. Deletion of A Singel Allele of The Dkk1 Gene Leads to an Increase in Bone Formation and Bone Mass. *Journal of Bone and Mineral Research.* **21** (6): 934-945

Mosser, D.M. & Zhang, X., 2008. Interleukin-10 : New Perspectives on an Old Cytokine. *National Institutes of Health. Immunol Rev.* **226**: 205–218.

Muljati S., Heryudarini, Sandjaja, Irawati A., Sudjasmin. 2002. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Perkembangan Mental dan Psikomotor pada Anak Balita Gizi Kurang. *Penel Gizi Makan.* **25**: 31-37.

Murphy, M.P. 2009. How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species. *Biochemical Journal.* **417** (1): 1-13

Muslihah N. Pengaruh Suplemen Gizi Berbasis Lipid Dosis Kecil Terhadap Pertumbuhan dan Kadar Hemoglobin Bayi. Bogor Agricultural : Institut Pertanian Bogor; 2016

Nakajima, S., Naruto, T., Miyamae, T., Imagawa, T., Mori, M., Nishimaki, S. 2009. Interleukin 6 Inhibits Early Differentiation of ATDC5 Chondrogenic Progenitor Cells. *Cytokine.* **47**: 91-97.

Naylor, C., Lu, M., Ma, J.A., Prentice, A.M. 2016. The Impact of Environmental Enteropathy and Systemic Inflammation on Infant Growth Failure. *FASEB Journal.*

Nency F, Arifin TM. 2005. Gizi Buruk, Ancaman Generasi yang Hilang. Majalah inovasi Online. Edisi vol. 5/XVIII/November 2005. Diunduh dari URL : <http://io.ppijepang.org>.

Nurlaily, A., Noorbaitee, A.R., and Musalmah, M. 2012. Comparative Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Different Extracts of Centella asiatica (L.) Urban and Its Active Compounds, Asiaticoside and Madecassoside. *Med & Health.* **7**(2): 62-72

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

Oktarina, Z. dan Sudiarti T. 2013. Faktor Risiko Stunting Pada Balita (24 - 59 bulan) di Sumatera. *Journal of Nutrition and Food.* **8** (3) : 175-180.

Opal, S.M. and DePalo, V.A. (2000). Anti-inflammatory Cytokines. *Chest* **117**: 1162–1172.

Orhan, I. E. 2012. Centella asiatica (L) Urban: From Traditional Medicine to Modern Medicine With Neuroprotective Potential. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.

Parichy, D.M., Elizondo, M.R., Mills, M.G., Gordon, T.N., Engeszer, R.E. 2009. Normal table of Postembryonic Zebrafish Development : staging by External visible anatomy of the living fish. *Developmental Dynamics*. **238** (12): 2975-3015

Paudel, R., Pradhan, B., Wagle, R.R., Pahari, D.P & Onta, S.R. 2013. Risk factor for stunting among children : a community based case control study in Nepal. *Kathmandu University Medical Journal*. **10** (3): 18-24

Pelletier, J.M., Farran, A., Montel, E., Verges, J., Pelletier, J.P.. 2015. Discrepancies in Composition and Biological Effects of Different Formulations of Chondroitin Sulfate. *Molecules*. **20**: 4277-89.

Picasso, B.C. 2016. A Public Health Approach To Undernutrition In Children Under Five And Infants In Ethiopia : An Overview.

Pittella, F., Dutra, R.C., Junior, D. D., Lopes, M. T., &, & Barbosa, N. R. 2009. Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Centella asiatica* (L) Urb. *International Journal of Molecular Sciences*. **10** (9): 3713-3721.

Prendergas, A.J & Humphrey, J.H. 2014. The Stunting Syndrome in Developing Countries. *Paediatrics and International Child Health*. **34** (4): 250-65

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 Infant. *Plos ONE*. **9** (2): e86928

Prentice, A., Schoenmakers, I., Laskey, M.A., De Bono, S., Ginty, F., Goldberg, G.R. 2006. Nutrition and Bone Growth and Development. *Proc Nutr Soc*, **65**: 348-60.

Priet, B., Treiber, G., Pieber, T., Amrein, K.. 2013. Vitamine D and Immune Function. *Nutrients*. **5**: 2502–2521.

Primihastuti, D. *Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (Centella asiatica) Pada Osifikasi Tulang dan Osteoklastogenesis Pada Model Stunting Larva zebrafish (Danio rerio) Yang Di Induksi Rotenon* [Tesis]. Malang: Universitas Brawijaya. 2017.

Pusat Data dan Informasi (Infodatin) Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2016. Situasi Balita Pendek.

Pyron, M. 2003. Female Preferences and Male Interactions in Zebrafish (*Danio rerio*). *Canadian Journal of Zoology*. **81** (1): 122-125

Rahman, F. A., Tion, C. S., Lee, K.S., Abdullah, A.H., & Ming, L.C. 2013. Safety and Efficacy of Health Supplement (Pegagan Based Product). *Arch Pharmacy Practice. Wolters Kluwer-Medknow*. S29-33.

Rahmatullah, M.A., Khatun, N., Morshed, P.K., Neogi, S.U.A. Khan, Md.S., Hossain, M.J. et al. 2011. A Randomized Survey of Medicinal Plants Used by Folk Medicinal Healers of Sylhet Division, Bangladesh. *Advances in Natural and Applied Sciences*. **4**: 52-62.

Reed, B., & Jennings, M. 2010. Guidance on the Housing and Care of Zebrafish. RSPCA, Southwater.

Richards, J.G. 2011. Bony Fishes! Zebrafish. University of British Columbia.

Ridlayanti, A. *Proteksi Ekstrak Centella asiatica Pada Model Stunting Larva Zebrafish (Danio rerio) yang Diinduksi Rotenon melalui Peningkatan Ekspresi BDNF* [Tesis]. Malang : Universitas Brawijaya. 2016.

Riset Kesehatan Dasar. 2013. Stunting dan Masa Depan Indonesia. *Millenium Challenge Account* : 2-5

Risma. *Hubungan Antara Status Pekerjaan Ibu dengan Status Gizi dan Perkembangan Anak Usia 1-3 tahun di Kecamatan Kadia Kota Kendari* [Tesis]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada. 2009.

Rogol, A.D. & Hayden, G.F. 2014. Etiologies and Early Diagnosis of Short Stature and Growth Failure in Children and Adolescents. *The Journal of Pediatric*. **164** (5):1-20

Ruike L, Jui S, Yan H.L., Fang L. 2015 Correlation Between Growth Rate Of Corpus Callosum And Neuromotor Development In Preterm Infants. *Chinese Journal of Contemporary Pediatric* .**17** (8): 841-346.

Rusmiati. 2007. Pengaruh Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Terhadap Viabilitas Spermatozoa Mencit Jantan (*Mus musculus* L.). *J. Biosci*. **4** (2): 34-38.

Rytter, M.J.H., Koltez, L., Briend, A., Friis, H., Christensen, V.B. 2014. The Immune System in Children with Malnutrition-A Systematic Review. *Plos One*. **9** (8): e105017

Sandana, I.K.I., Velisia, J., Yunior, A., Brahmanta, A., Prameswari., N. 2017. Potential f *Stichopus Hermanii* and Hyperbaric Oxygen Therapy for Accelerating Orthodontic Treatment. *Jurnal Kedokteran Gigi*. **29** (3): 38-46.

Santa, I.G.P. dan Bambang, P.E.W. 1992. Studi Taksonomi *Centella Asiatica* (L) *Urban*. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*. **1** (2): 46-48

Santoriello, C., & Zon, L.I. 2012. Hooked! Modeling Human Disease in Zebrafish. *The Journal of Clinical Investigation*. **122** (7): 2337-2343

Sara M, Hertanto, Irene M, Anies, Suhartono. *Makanan (Prelakteal dan Papahan) sebagai faktor Risiko Kejadian Stunting pada Anak Usia 12-24 Bulan di Lombok Timur NTB* [Tesis]. Semarang: Universitas Diponegoro; 2016.

Schilling, T.F. 2002. The Morphology of Larva and Adult Zebrafish. *Zebrafish*. **261**: 59-94.

Schoppet, M., Preissner, K.T., & Hofbauer, L.C. 2002. RANK Ligand and Osteoprotegerin. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular biology*. **22** (4): 549-553

Sederquist, B., Fernandez-Vojvodich, P., Zaman, F., Säwendahl, L. 2014. Impact of Inflammatory Cytokines on Longitudinal Bone Growth Bettina. *J Mol Endocrinol.* **53**: T35–T44.

Selfitri dan Anggrahaeni, D. *Efek Elisitasi dan Transformasi Genetik Terhadap Produksi Asiatikosida Pada Kalus Pegagan (Centella asiatica (L) Urban)* [Skripsi]. Bandung: *Institut Teknologi Bandung*. 2008.

Selvi, P.T., Kumar, M.S., Rajesh, R., & Kathiravan, T. 2012. Antidepressant Activity of Ethanolic Extract of Leaves of *Centella asiatica*. Linn by in Vivo Methods. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science.* **2** (2): 76-79.

Setiawati, W., R. Murtiningsih dan N. Gunaeni. 2008. Tumbuhan Bahan Pestisida Nabati Dan Proses Pembuatannya. Balai Penelitian Tanaman Sayuran. Bandung. P 13-15

Sharif, F., de Bakker, M.A., & Richardson, M.K. 2014. Osteoclast-Like Cell in Early Zebrafish Embryos. *Cell J (Yakhteh).* **16** (2).

Sherer, T.B., Betarbet, R., Testa, C.M., Seo, B. B., Richardson, J. R., Kim, J.H., Greenamyre, J.T. 2003. Mechanism of Toxicity in Rotenone Models of Parkinson's Disease. **23** (34) : 10756-10764.

Sihombing I., Wangko S., Kalangi S.J.R. 2012. Peran Estrogen pada Remodeling Tulang. *Jurnal Biomedik.* **4** (3): S18-28

Slanchev, K., Stebler, J., de la Cueva-Mendes, G., Raz, E. 2005. Development Without Germ Cells: The Role of The Germ Line in Zebrafish Sex Differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **102** (11): 4074-4079.

Snekser, J.L., Ruhl, N., Bauer, K., Mc. Robert, S.P. 2010 . The Influence of Sex and Phenotype on Shoaling Decisions in Zebrafish. *International Journal of Comparative Psychology.* **23** (1): 70-81.

Sorribes, A. 2013. The Ontogeny of Sleep-wake Cycles in Zebrafish: A Comparison to Humans. *Frontiers in Neural Circuits.* **7**: 178.

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

Steyn, N., & Temple, N. 2008. Community Nutrition Textbook For South Africa : A Rights-based Approach. *Chronic Disease of Lifestyle Unit, Medical Research Council.*

Stewart, C., Lannotti, L., Dewey, K., Michaelsen, K., & Onyago, A. (2013) Contextualizing Complementary Feeding in a broader Framework for Stunting Prevention. *Maternal & Child Nutrition.* **9**: 27-45.

Sulistiyawati, A. 2014. Tumbuh Kembang Anak. Salemba Medica. Jakarta

Suradi, R., Hegar B., Pratiwi I.G., Marzuki A.N., Ananta Y. 2010. Indonesia Menyusui. Jakarta : IDAI

Sutardi. 2016. Bioactive Compounds in Pegagan Plant and Its Use for Increasing Immune System. *Jurnal Litbang Pertanian*. **33** (3): 121-130.

Syed, S. 2015. Iodine And The Near Eradication of Cretinisme. *Pediatrics*. **135** (4): 594-596.

Teitelbaum, S.L. and Ross, F.P. 2003. Genetic Regulation of Osteoclast Development and Function. *Nat Rev Gen*. **4**: 638–649.

Thomas, S.D.C. 2012. Bone Turnover Markers. *Aust Prescr*. **35**: 156-158.

Tickell, K.D. & Walson, J.L. 2016. Nutritional Enteric Failure: Neglected Tropical Diseases and Childhood Stunting. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 1-5

Tjandranegara, F. *Perbedaan Jumlah Osteoklas di Daerah Tekanan dan Tarikan Ligamen Periodontal Akibat Pemberian Terapi Oksigen Hiperbarik dan Teripang Emas (Stichopus Hermanii) pada Pergerakan Gigi Ortodonti* [Skripsi]. Surabaya: Universitas Hang Tuah; 2017.

Utami, R.P., Suhartono, S., Nurjazuli, N., Kartini, A., & Rasipin, R. 2013. Faktor Lingkungan dan Perilaku yang Berhubungan dengan Kejadian Stunting pada Siswa SD di Wilayah Pertanian. *Jurnal Kesehatan Lingkungan*. **12** (2): 127-131.

Undagawa, N., Takahashi, N., Yasuda, H., Mizuno, A., Itoh, K., Ueno, Y., & Suda, T. 2000. Osteoprotegerin Produced by Osteoblasts is an Important Regulator in Osteoclast Development and Function. *Endocrinology*. **141** (9): 3478-3484.

Varela, S., Dios, B., Novoa., Figueras. 2011. Characterisation, Expression and Ontogeny of Interleukin-6 and Its Receptors in Zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental and Comparative Immunology*. **37**: 97-106

Vargesson, N.A. 2007. 'Zebrafish' in Manual of Animal Technology (ed. S. Barnett) Blackwell Publishing Ltd : Oxford, UK.

Victora CG, de Onis M, Hallal PC, Blossner M, Shrimpton R. 2010. Worldwide Timing of Growth Faltering: Revisiting Implications for Interventions. *Pediatrics*. **125** :e473–480.

Victora, C.G., Adair, L., Fall, C., Hallal, P.C., Martorell, R., Richter, L., & Sachdev, H.S. 2008. Maternal and Child Undernutrition 2 Maternal and Child Undernutrition : Consequences For Adulth Health And Human Capital. *The Lancet*. **371**: 340-357.

Vimala, S., Adenan, M.I., Ahmad, A.R., & Shahdan, R. 2003. Nature's Choice to Wellness : Antioxidant Vegetables/ulam.

Walters, T.D. and Griffiths, A.M. 2009. Mechanisms of Growth Impairment in Pediatric Crohn's Disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **6**: 513–523.

Wan, J., Gong, X., Jiang, R., Zhang, Z. and Zhang, L. 2013. Antipyretic and Anti-Inflammatory Effects of Asiaticoside in Lipopolysaccharide-treated Rat through Up-regulation of Heme Oxygenase-1. *Res Phytother.* **27**: 1136-1142.

Wardani, D.W.K.K. *Pengaruh Ekstrak Ethanol Pegagan (Centella Asiatica) Terhadap Ekspresi Vascular Endothelial Growth Factor dan Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Pada Larva Zebrafish (Danio rerio) pada Model Stunting Akibat Induksi Rotenon* [Tesis]. Malang: Universitas Brawijaya. 2017.

Wauquier, F., Leotoing, L., Coxam, V., Guicheux, J., & Wittrant, Y. 2009. Oxidative Stress in Bone Remodeling and Disease. *Trends in molecular medicine.* **15** (10): 468-477

Whitmore, D., Foulkes, N.S., & Sassone-Corsi, P. 2000. Light Acts Directly on Organs And Cells in Culture to Set The Vertebrate Circadian Clock. *Nature.* **404** (6773): 87-91

WHO, 2017. *Nutrition Landscape Information System (NLIS) Country Profile Indicators : Interpretation Guide*. Geneva : World Health Organization.

WHO. 2006. Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, Weight-for-age, Weight-for-length, Weight-for-height and Body Mass Index-for-age: Methods and Development. Geneva: World Health Organization.

Wicaksono, S., Damanhuri & Saptadi, D. 2015. Karakter Morfologi dan Analisa DNA RAPD Tanaman Tuba (*Paraderris elliptica* (Wall) Adema) Hasil Eksplorasi di Provinsi Jawa Timur. *Buana Sains.* **15** (2): 137-144

Wijayanti, A.R. *Proteksi Ekstrak Pegagan (Centella Asiatica) Melalui Ekspresi Hsp60 Dan Bax Terhadap Model Stunting larva Zebrafish (Danio rerio) yang Diinduksi Rotenon* [Tesis]. Malang : Universitas Brawijaya. 2016.

Winarto, W.R. dan M. Surbakti. 2003. Khasiat dan Manfaat Pegagan. Agromedia Pustaka, Jakarta.

Wit, J.M. & Camacho-Hubner C. 2011. Endocrine Regulation of Longitudinal Bone Growth. *Endocrine Development.* **21**: 30–41.

Wolney, S., McFarland, R., Chinnery, P., & Cheetham, T. 2009. Abnormal Growth in Mitochondrial Disease. *Acta Paediatrica.* **98** (3): 553-554.

Won, J.H., Shin, J.S., Park, H.J., Jung, H.J.J., Koh, D.J., Jo, B.G., et al. 2010. Anti-inflammatory Effects of Madecassic Acid via the Suppression of NF-KB Pathway in LPS-induced RAW264.7 Macrophage Cells. *Planta Med.* **76**: 251-257

Wulandari, T.W. Pengaruh pemberian Stimulasi Motorik Kasar Terhadap Kemampuan Berjalan Pada Bayi Usia 36-39 Minggu. [Skripsi]. Surakarta: Universitas Muhammadiyah; 2015.

Yuniarto, A., Sukandar, E.Y., Fidrianny, I., Adnyana, I.K.A. 2017. Aplikasi Zebrafish (*Danio rerio*) pada Beberapa Model Penyakit Eksperimental. *Media Pharmaceutica Indonesiana*.1 (3): 115-126

Yuningsih. Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekpresi Glukosa Transporter 1 (Glut 1) Dan Osteocalcin Pada Stunting Larva zebrafish (*Danio rerio*) [Tesis]. Malang: Universitas Brawijaya; 2017.

Zahraini, Y. 2017. Hubungan Stunting Dengan Kesehatan Lingkungan Di Indonesia. Kemenkes RI. Jakarta.

Zemel, B. 2013. Bone Mineral Accretion and Its Relationship to Growth, Sexual Maturation and Body Composition During Childhood and Adolescence. *World Rev Nutr Diet*. 106: 39-45.

Zhang, Z., Qin, D.L., Wan, J.Y., Zhou, Q.X., Xiao, S.H., Wu, K. 2008. Effects of Asiaticoside on The Balance of Inflammatory Factors of Mouses Acute Lung Injury Induced by LPS. *Zhong Yao Cai*. 31 (4): 547-9

Zubairi, S.I., Othman, Z.S., Sarmidi, M.R., & Aziz, R.A. 2016. Environmental Friendly Biopesticide Rotenone Extracted From Derris sp. : A Review on The Extraction Method, Toxicity And Field Effectiveness. *Jurnal Teknologi*. 78 (8): 47-69

Lampiran 1 : Keterangan Kelaikan Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 403 / EC / KEPK / 12 / 2017

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

- JUDUL** : Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) pada Masa Pre sampai dengan Post Hatching Meningkatkan Osifikasi, Memperbaiki Inflamasi, dan Menurunkan Stress Oksidatif Larva Zebrafish (*Danio rerio*) Stunting.
- PENELITI UTAMA** : Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes
- ANGGOTA** : Tri Yuliyani
Een Nuraenah
Dawitri
Evi Zahra
- UNIT / LEMBAGA** : Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Biomedik dan Farmakologi Universitas Brawijaya Malang.


DINYATAKAN LAIK ETIK.



Catatan :

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)

Lampiran 2 : Determinasi Tanaman Pegagan



DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR
UPT MATERIA MEDICA
Jalan Labor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313)
KOTA BATU

Nomor : 074 / 014 / B/ 101.8 / 2013
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Pegagan**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : HUSNUL KHOTIMAH , S.Si., M.Kes.
N I P : 19751125 200501 2 001
Fakultas : Lab Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

1. Perihal determinasi tanaman Pegagan

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Umbellales
Suku : Umbelliferae
Marga : Centella
Jenis : *Centella asiatica* (Linn). Urban
Sinonim : *Hydrocotyle asiatica* Linn. = *Pasequimus*, Rumph.
Pegagan, Gagan-gagan, Rendeng, Kerok batok (Jawa); Daun kaki kuda (Indonesia), Pegaga (Ujung Pandang); Antanan gede, Antanan rambat (Sunda); Dau tungke (Bugis); Kos tekosan (Madura), Kori-kori (Halmahera)
Kunci determinasi : 1b -2b - 3b - 4b- 6b- 7b- 9b-10b- 11b - 12b - 13b-14b - 16a-239b- 243b- 244b-248b- 249b-250b-266b-267a- 268a -269a- 2b- 3

2. **Morfologi** : Pegagan merupakan terna menahun tanpa batang, tetapi dengan rimpang pendek dan stolon-stolon yang merayap dengan panjang 10 cm - 80 cm, akar keluar dari setiap bonggol, banyak bercabang yang membentuk tumbuhan baru. Helai daun tunggal, bertangkai panjang sekitar 5 cm - 15 cm berbentuk ginjal. Tepinya bergerigi atau beringgit, dengan penampang 1 cm - 7 cm tersusun dalam roset yang terdiri atas 2 - 10 helai daun, kadang-kadang agak berambut. Bunga berwarna putih atau merah muda, tersusun dalam karangan berupa payung, tunggal atau 3-5 bersama-sama keluar dari ketiak daun. Tangkai bunga 5 mm - 50 mm. Buah kecil bergantung yang bentuknya lonjong/pipih panjang 2 - 2,5 mm, baunya wangi dan rasanya pahit

3. **Nama Simplisia** : *Centellae Folium*/ daun pegagan

4. **Kandungan kimia** : Asiaticoside, thankuniside, isothankuniside, madecassoside, brahmoside, brahminoside, brahmic acid, madasiatric acid, meso-inositol, centellose, carotenoids, garam-garam mineral seperti garam kalium, natrium, magnesium, kalsium, besi, vellarine, zat samak. Senyawaan glikosida triterpenoida yang disebut asiaticoside dan senyawaan sejenis, mempunyai kasiat anti lepra (Morbus Hansen). Daun kaki kuda mengandung senyawa glikosida trigergepnoida, alkaloid hidrokotilin, steroid, tanin, minyak atsiri, gula pereduksi dan garam-garam mineral seperti garam kalium, natrium, magnesium, kalsium dan besi


5. **Penggunaan** : Penelitian


6. **Daftar Pustaka** :

- Anonim, *Materia Medica Indonesia " Jilid I "*, 1977. Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Anonim , *Serial Tanaman Obat " PEGAGAN "*, 2007. Badan POM Republik Indonesia
- Anonim , <http://www.ipteknet.co.id/pegagan>, diakses tanggal 29 oktober 2010
- Steenis, CGGJ Van Dr , *FLOKA*, 2008, Pradnya Paramita , Jakarta
- Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johny Ria.1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.

Demikian determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 14 Januari 2013
Kepala UPT Materia Medica Batu


Dr. Husnul Khotimah, Apt, M.Kes.
NIP.19751125 200501 2 001



Lampiran 3 : Hasil Analisa Zebrafish



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
JL. VETERAN TELP. (0341) 575838 MALANG 65145

LAPORAN HASIL ANALISA

NO : 02/LAB.IIP/HA/FPIK/2012

- 1. Data Konsumen :
 - Nama Konsumen : Husnul Khotimah S.Si, M.Kes
 - Instansi : Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
 - Alamat : Perum Bumi Palapa J 4 Malang
 - Telepon : 081136946739
 - Status : Mahasiswa S3
 - Keperluan Analisis : Identifikasi Ikan
- 2. Sampling Yang dilakukan : Oleh Konsumen
- 3. Identifikasi Sampel :
 - Nama Sampel : *Danio rerio*
 - Warna : Kuning strip hitam
- 4. Prosedur Analisa : Dari Lab. Ilmu – Ilmu Perairan FPIK UB
- 5. Penyampaian Laporan Hasil Analisis : Dikirim sendiri
- 6. Tanggal Terima Sampel : 05 November 2012
- 7. Analis : Nuriyani
- 8. Data Hasil Analisa : terlampir pada buku kerja

Malang, 09 November 2012



Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS
NIP. 19591230 198503 2 002

Lampiran 4 : Hasil Analisis Statistik SPSS

HASIL ANALISIS UJI NORMALITAS IL-6, IL-10, OSIFIKASI TULANG DAN PANJANG BADAN 6 DPF

1. Normalitas dan Homogenitas Data

a. IL-6

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for IL6	.169	25	.064	.954	25	.300

a. Lilliefors Significance Correction

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: IL6

F	df1	df2	Sig.
.625	4	20	.650

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Kelompok

b. IL-10

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for IL10	.091	25	.200*	.981	25	.903

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: IL10

F	df1	df2	Sig.
2.761	4	20	.056

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Kelompok

c. Osifikasi Tulang Keras

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for OTK	.097	25	.200 [*]	.973	25	.713

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: OTK

F	df1	df2	Sig.
2.704	4	20	.060

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Kelompok

d. Panjang Badan 3 dpf

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for PB3dpf	.080	150	.021	.988	150	.201

a. Lilliefors Significance Correction

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: PB3dpf

F	df1	df2	Sig.
.633	4	145	.640

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Kelompok

e. Panjang Badan 6 dpf

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for PB	.103	25	.200*	.961	25	.426

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Panjang Badan 6 dpf

F	df1	df2	Sig.
.404	4	20	.804

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Kelompok

2. Uji Beda

a. IL-6

ANOVA

IL6

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	330.921	4	82.730	25.859	.000
Within Groups	63.984	20	3.199		
Total	394.905	24			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IL6

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Rotenon	-8.892400*	1.131233	.000	-11.25211	-6.53269
	P1	-2.691200*	1.131233	.027	-5.05091	-.33149
	P2	1.682200	1.131233	.153	-.67751	4.04191
	P3	-1.085000	1.131233	.349	-3.44471	1.27471
Rotenon	Kontrol	8.892400*	1.131233	.000	6.53269	11.25211
	P1	6.201200*	1.131233	.000	3.84149	8.56091

	P2	10.574600*	1.131233	.000	8.21489	12.93431
	P3	7.807400*	1.131233	.000	5.44769	10.16711
P1	Kontrol	2.691200*	1.131233	.027	.33149	5.05091
	Rotenon	-6.201200*	1.131233	.000	-8.56091	-3.84149
	P2	4.373400*	1.131233	.001	2.01369	6.73311
	P3	1.606200	1.131233	.171	-.75351	3.96591
P2	Kontrol	-1.682200	1.131233	.153	-4.04191	.67751
	Rotenon	-10.574600*	1.131233	.000	-12.93431	-8.21489
	P1	-4.373400*	1.131233	.001	-6.73311	-2.01369
	P3	-2.767200*	1.131233	.024	-5.12691	-.40749
P3	Kontrol	1.085000	1.131233	.349	-1.27471	3.44471
	Rotenon	-7.807400*	1.131233	.000	-10.16711	-5.44769
	P1	-1.606200	1.131233	.171	-3.96591	.75351
	P2	2.767200*	1.131233	.024	.40749	5.12691

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

b. IL-10

ANOVA

IL10

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.927	4	.732	3.319	.031
Within Groups	4.410	20	.221		
Total	7.338	24			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IL10

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Rotenon	.933600*	.296996	.005	.31408	1.55312
	P1	.469200	.296996	.130	-.15032	1.08872
	P2	.097200	.296996	.747	-.52232	.71672
	P3	.133200	.296996	.659	-.48632	.75272
Rotenon	Kontrol	-.933600*	.296996	.005	-1.55312	-.31408
	P1	-.464400	.296996	.134	-1.08392	.15512
	P2	-.836400*	.296996	.011	-1.45592	-.21688
	P3	-.800400*	.296996	.014	-1.41992	-.18088

P1	Kontrol	-.469200	.296996	.130	-1.08872	.15032
	Rotenon	.464400	.296996	.134	-.15512	1.08392
	P2	-.372000	.296996	.225	-.99152	.24752
	P3	-.336000	.296996	.271	-.95552	.28352
P2	Kontrol	-.097200	.296996	.747	-.71672	.52232
	Rotenon	.836400*	.296996	.011	.21688	1.45592
	P1	.372000	.296996	.225	-.24752	.99152
	P3	.036000	.296996	.905	-.58352	.65552
P3	Kontrol	-.133200	.296996	.659	-.75272	.48632
	Rotenon	.800400*	.296996	.014	.18088	1.41992
	P1	.336000	.296996	.271	-.28352	.95552
	P2	-.036000	.296996	.905	-.65552	.58352

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

c. Osifikasi Tulang Keras

ANOVA

Osifikasi Tulang Keras

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1180716346928	4	29517908673224	3.677	.021
Within Groups	1605598712297	20	80279935614876		
Total	2786315059226	24			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Osifikasi Tulang Keras

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Rotenon	55672061.800*	17919814.242	.006	18291984.31	93052139.29
	P1	14129710.600	17919814.242	.440	-23250366.89	51509788.09
	P2	-3018491.800	17919814.242	.868	-40398569.29	34361585.69
	P3	2191689.000	17919814.242	.904	-35188388.49	39571766.49
Rotenon	Kontrol	-55672061.800*	17919814.242	.006	-93052139.29	-18291984.31
	P1	-41542351.200*	17919814.242	.031	-78922428.69	-4162273.71
	P2	-58690553.600*	17919814.242	.004	-96070631.09	-21310476.11
	P3	-53480372.800*	17919814.242	.007	-90860450.29	-16100295.31

P1	Kontrol	-14129710.600	17919814.242	.440	-51509788.09	23250366.89
	Rotenon	41542351.200*	17919814.242	.031	4162273.71	78922428.69
	P2	-17148202.400	17919814.242	.350	-54528279.89	20231875.09
	P3	-11938021.600	17919814.242	.513	-49318099.09	25442055.89
P2	Kontrol	3018491.800	17919814.242	.868	-34361585.69	40398569.29
	Rotenon	58690553.600*	17919814.242	.004	21310476.11	96070631.09
	P1	17148202.400	17919814.242	.350	-20231875.09	54528279.89
	P3	5210180.800	17919814.242	.774	-32169896.69	42590258.29
P3	Kontrol	-2191689.000	17919814.242	.904	-39571766.49	35188388.49
	Rotenon	53480372.800*	17919814.242	.007	16100295.31	90860450.29
	P1	11938021.600	17919814.242	.513	-25442055.89	49318099.09
	P2	-5210180.800	17919814.242	.774	-42590258.29	32169896.69

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

d. Panjang Badan 3 dpf

ANOVA

PB3dpf

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.026	4	.006	1.370	.247
Within Groups	.680	145	.005		
Total	.706	149			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PB3dpf

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Rotenon	.03500*	.01769	.050	.0000	.0700
	P1	-.00033	.01769	.985	-.0353	.0346
	P2	.00500	.01769	.778	-.0300	.0400
	P3	.00900	.01769	.612	-.0260	.0440
Rotenon	Kontrol	-.03500*	.01769	.050	-.0700	.0000
	P1	-.03533*	.01769	.048	-.0703	-.0004
	P2	-.03000	.01769	.092	-.0650	.0050
	P3	-.02600	.01769	.144	-.0610	.0090
P1	Kontrol	.00033	.01769	.985	-.0346	.0353
	Rotenon	.03533*	.01769	.048	.0004	.0703
	P2	.00533	.01769	.763	-.0296	.0403
	P3	.00933	.01769	.599	-.0256	.0443

P2	Kontrol	-.00500	.01769	.778	-.0400	.0300
	Rotenon	.03000	.01769	.092	-.0050	.0650
	P1	-.00533	.01769	.763	-.0403	.0296
	P3	.00400	.01769	.821	-.0310	.0390
P3	Kontrol	-.00900	.01769	.612	-.0440	.0260
	Rotenon	.02600	.01769	.144	-.0090	.0610
	P1	-.00933	.01769	.599	-.0443	.0256
	P2	-.00400	.01769	.821	-.0390	.0310

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

e. Panjang Badan 6 dpf

ANOVA

Panjang Badan 6 dpf

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.107	4	.027	12.215	.000
Within Groups	.044	20	.002		
Total	.151	24			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Panjang Badan 6 dpf

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Rotenon	.17800*	.02960	.000	.1163	.2397
	P1	.03400	.02960	.264	-.0277	.0957
	P2	.00600	.02960	.841	-.0557	.0677
	P3	.03200	.02960	.292	-.0297	.0937
Rotenon	Kontrol	-.17800*	.02960	.000	-.2397	-.1163
	P1	-.14400*	.02960	.000	-.2057	-.0823
	P2	-.17200*	.02960	.000	-.2337	-.1103
	P3	-.14600*	.02960	.000	-.2077	-.0843
P1	Kontrol	-.03400	.02960	.264	-.0957	.0277
	Rotenon	.14400*	.02960	.000	.0823	.2057
	P2	-.02800	.02960	.355	-.0897	.0337
	P3	-.00200	.02960	.947	-.0637	.0597
P2	Kontrol	-.00600	.02960	.841	-.0677	.0557
	Rotenon	.17200*	.02960	.000	.1103	.2337
	P1	.02800	.02960	.355	-.0337	.0897

	P3	.02600	.02960	.390	-.0357	.0877
P3	Kontrol	-.03200	.02960	.292	-.0937	.0297
	Rotenon	.14600*	.02960	.000	.0843	.2077
	P1	.00200	.02960	.947	-.0597	.0637
	P2	-.02600	.02960	.390	-.0877	.0357

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



HASIL ANALISIS KORELASI INTERLEUKIN 6, INTERLEUKIN 10, OSIFIKASI TULANG KERAS DENGAN LAMANYA PEMBERIAN PEGAGAN DAN PANJANG BADAN

1. Korelasi Pegagan dengan Interleukin 6

Correlations

		Pegagan (Centella asiatica)	Interleukin 6
Pegagan (Centella asiatica)	Pearson Correlation	1	-.838**
	Sig. (1-tailed)		,000
	N	20	20
Interleukin 6	Pearson Correlation	-.838**	1
	Sig. (1-tailed)	,000	
	N	20	20

** Correlation is significant at the 0.01 level (1-tailed).

2. Korelasi Pegagan dengan Interleukin 10

Correlations

		Pegagan (Centella asiatica)	Interleukin 10
Pegagan (Centella asiatica)	Pearson Correlation	1	.655**
	Sig. (1-tailed)		,001
	N	20	20
Interleukin 10	Pearson Correlation	.655**	1
	Sig. (1-tailed)	,001	
	N	20	20

** Correlation is significant at the 0.01 level (1-tailed).

3. Korelasi Pegagan dengan Osifikasi Tulang Keras

Correlations

		Pegagan (Centella asiatica)	Osifikasi Tulang keras
Pegagan (Centella asiatica)	Pearson Correlation	1	.641**
	Sig. (1-tailed)		,001
	N	20	20
Osifikasi Tulang keras	Pearson Correlation	.641**	1
	Sig. (1-tailed)	,001	
	N	20	20

** Correlation is significant at the 0.01 level (1-tailed).

4. Korelasi Pegagan dengan Panjang Badan

Correlations

		Pegagan (Centella asiatica)	Panjang Badan
Pegagan (Centella asiatica)	Pearson Correlation	1	.802**
	Sig. (1-tailed)		,000
	N	20	20
Panjang Badan	Pearson Correlation	.802**	1
	Sig. (1-tailed)	,000	
	N	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level (1-tailed).

5. Korelasi Interleukin 6 dengan Panjang Badan

Correlations

		Interleukin 6	Panjang Badan
Interleukin 6	Pearson Correlation	1	-.853
	Sig. (1-tailed)		,000
	N	20	20
Panjang Badan	Pearson Correlation	-.853	1
	Sig. (1-tailed)	,000	
	N	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level (1-tailed).

6. Korelasi Interleukin 10 dengan Panjang badan

Correlations

		Interleukin 10	Panjang Badan
Interleukin 10	Pearson Correlation	1	.618**
	Sig. (1-tailed)		,002
	N	20	20
Panjang Badan	Pearson Correlation	.618**	1
	Sig. (1-tailed)	,002	
	N	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level (1-tailed).

7. Korelasi Osifikasi Tulang Keras dengan Panjang badan

Correlations

		Osifikasi Tulang keras	Panjang Badan
Osifikasi Tulang Keras	Pearson Correlation	1	.572**
	Sig. (1-tailed)		.004
	N	20	20
Panjang Badan	Pearson Correlation	.572**	1
	Sig. (1-tailed)	.004	
	N	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level (1-tailed).

8. Korelasi Interleukin 6 dengan Osifikasi Tulang Keras

Correlations

		Osifikasi Tulang keras	Interleukin 6
Osifikasi Tulang Keras	Pearson Correlation	1	-.659**
	Sig. (1-tailed)		.001
	N	20	20
Interleukin 6	Pearson Correlation	-.659**	1
	Sig. (1-tailed)	.001	
	N	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level (1-tailed).

9. Korelasi Interleukin 10 dengan Osifikasi Tulang Keras

Correlations

		Osifikasi Tulang keras	Interleukin 10
Osifikasi Tulang Keras	Pearson Correlation	1	.313
	Sig. (1-tailed)		.090
	N	20	20
Interleukin 10	Pearson Correlation	.313	1
	Sig. (1-tailed)	.090	
	N	20	20

10. Korelasi Interleukin 6 dengan Interleukin 10

Correlations

		Interleukin 6	Interleukin 10
Interleukin 6	Pearson Correlation	1	-.609**
	Sig. (1-tailed)		,002
	N	20	20
Interleukin 10	Pearson Correlation	-.609**	1
	Sig. (1-tailed)	,002	
	N	20	20

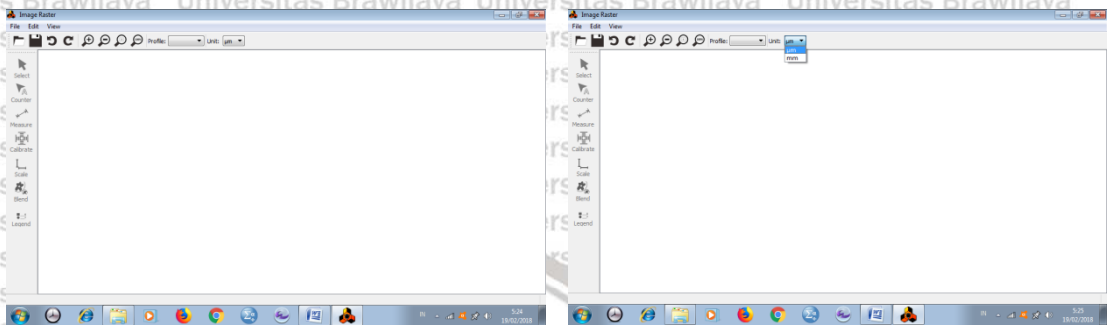
** . Correlation is significant at the 0.01 level (1-tailed).



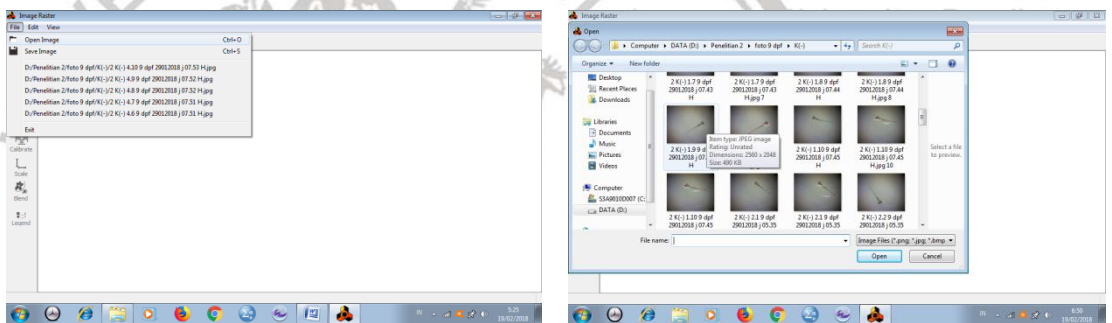
Lampiran 5 : Cara menggunakan aplikasi Image Raster

CARA MENGUKUR PANJANG BADAN ZEBRAFISH DENGAN MENGGUNAKAN SOFTWARE IMAGE RASTER

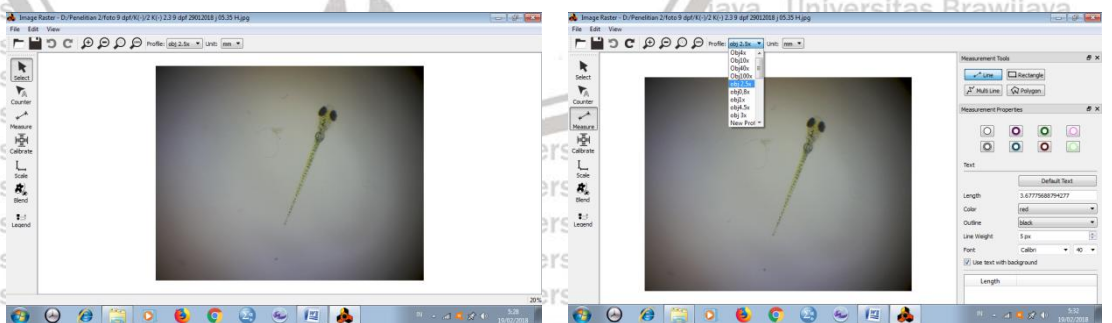
1. Membuka Laman Aplikasi Image Raster, klik unit pilih mm (milimeter)



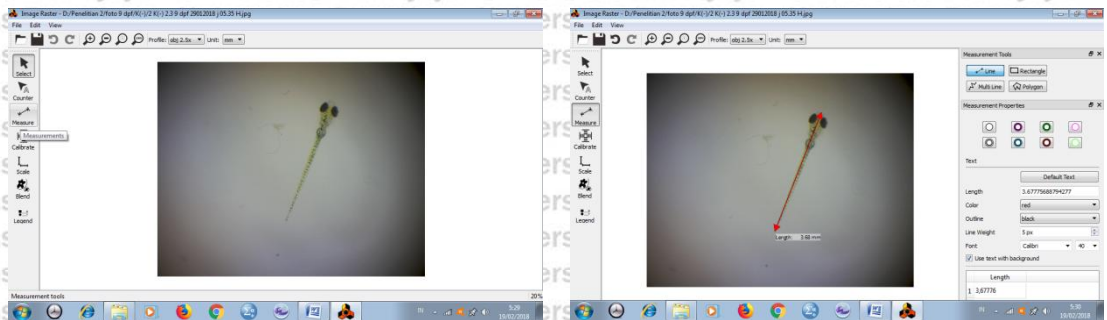
2. Buka gambar pada hasil foto zebrafish yang akan diukur panjang dengan klik menu file pilih *open image* dan pilih foto hingga muncul objek gambar yang akan diukur



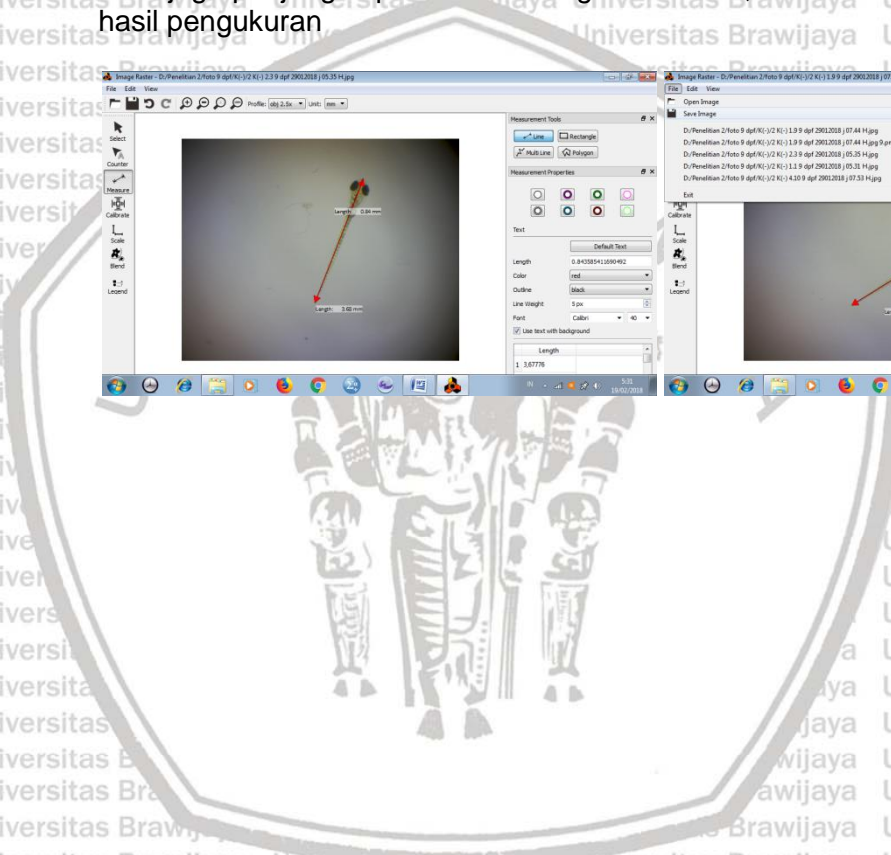
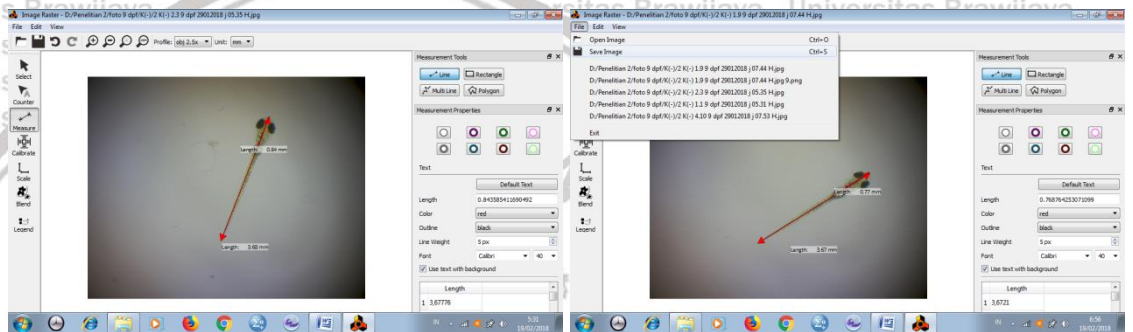
3. Setelah objek gambar yang akan diukur muncul, klik *profile* pilih pembesaran yang digunakan saat mengambil foto objek



4. Klik *measure* pada sisi kiri laman dan ukur panjang badan sesuai prosedur (panjang badan : snout to fin)



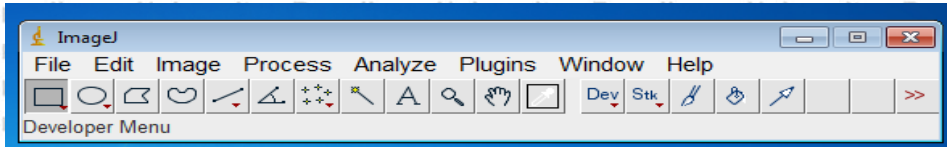
5. Ukur juga panjang kepala untuk mengetahui rasio, klik *save image* untuk menyimpan hasil pengukuran



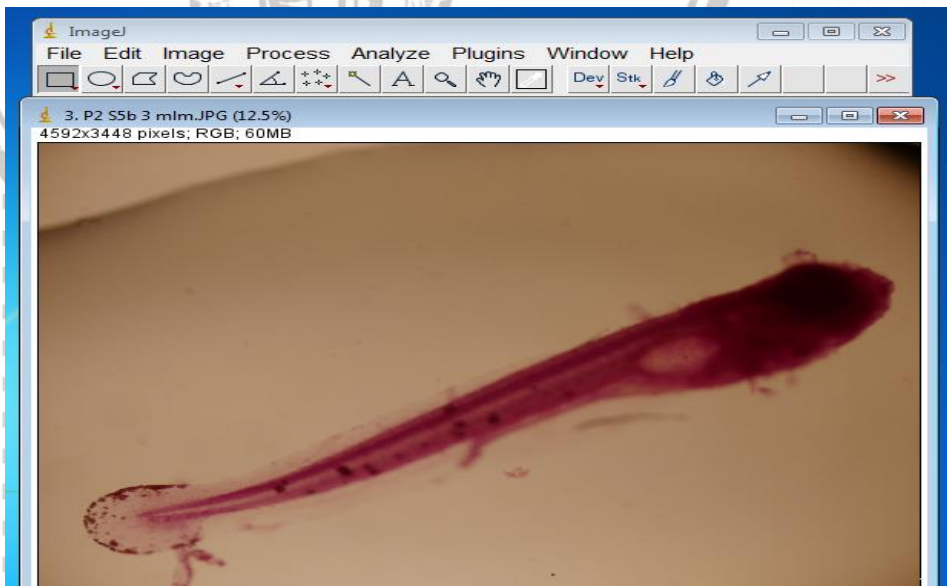
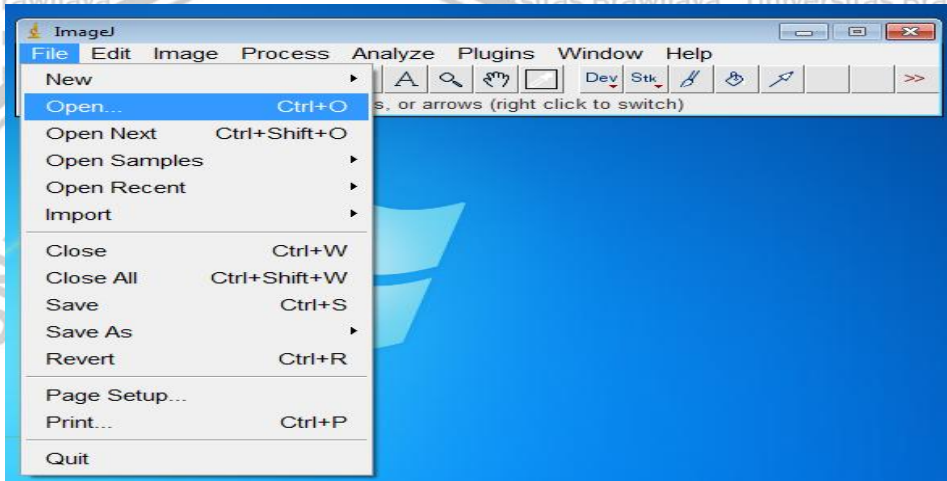
Lampiran 6 : Cara Menggunakan Aplikasi Image J

CARA MENGUKUR EKSPRESI OSIFIKASI TULANG KERAS PADA LARVA ZEBRAFISH DENGAN MENGGUNAKAN SOFTWARE IMAGE J

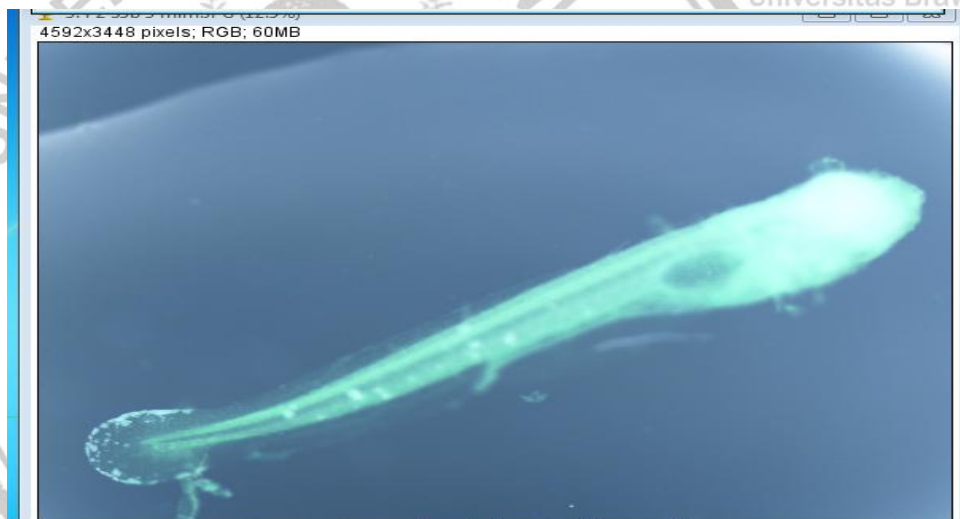
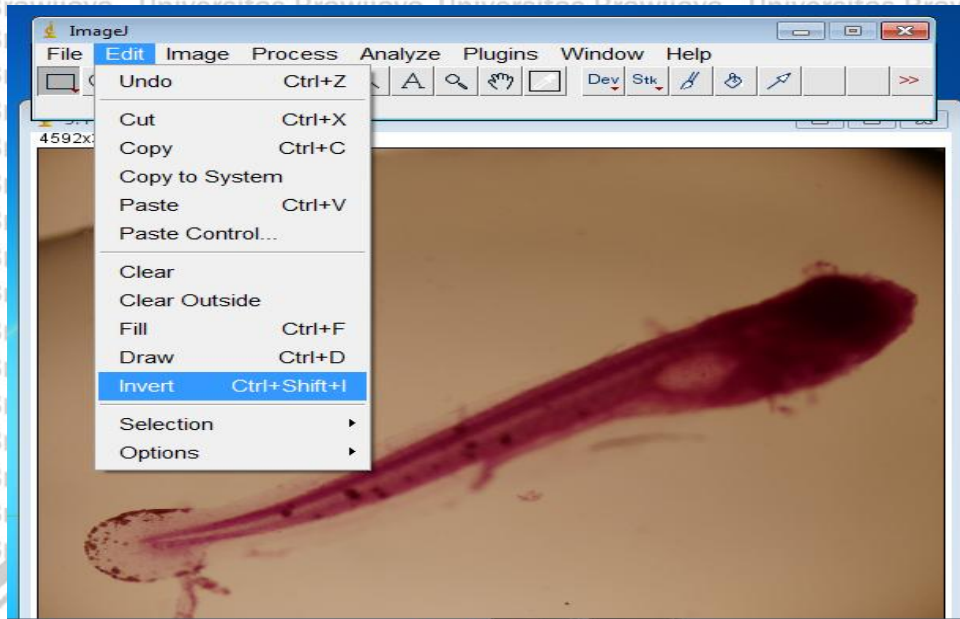
1. Buka Laman Image J



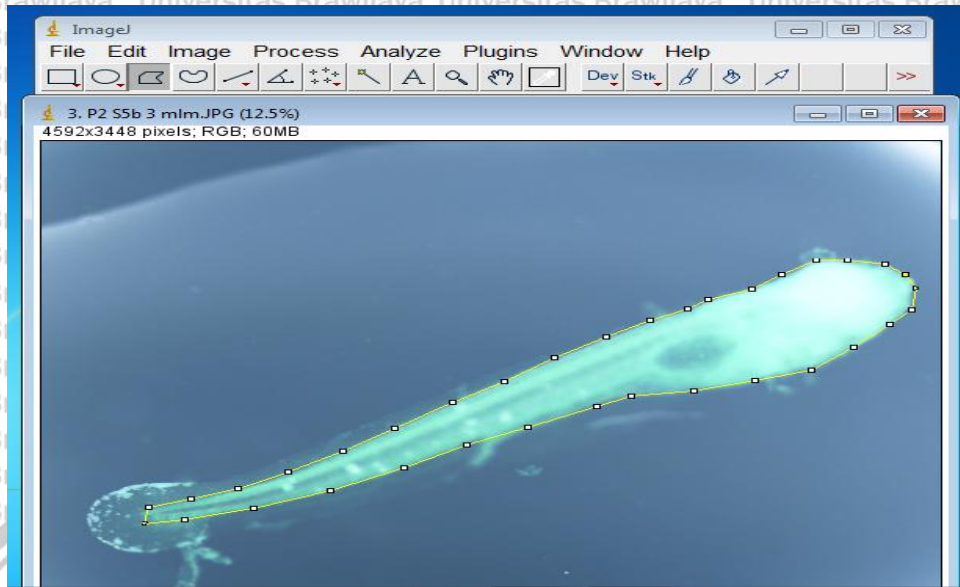
2. Buka gambar pada hasil foto Alizarin Red zebrafish yang akan diukur *integrated densitynya* dengan klik file open hingga muncul objek gambar yang diukur



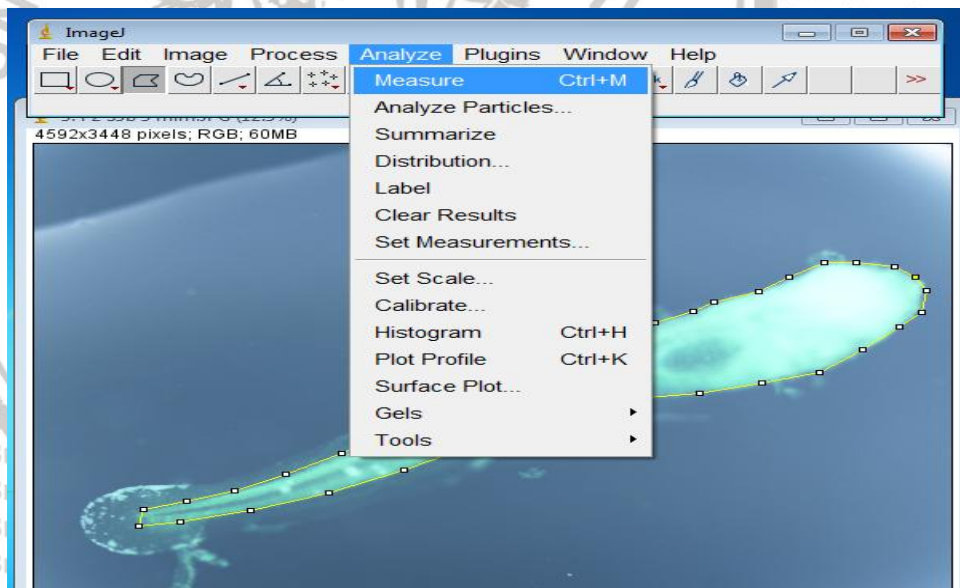
3. Tekan menu *Edit* kemudian pilih *invert* sampai dengan gambar berubah menjadi biru



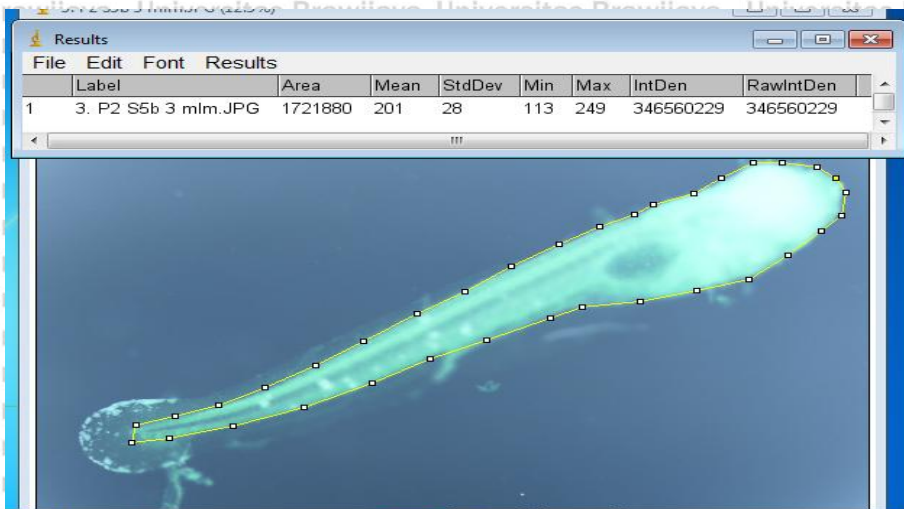
- Batasi daerah yang akan diukur densitas warnanya. Pilih model pembatasan pada *tool box*



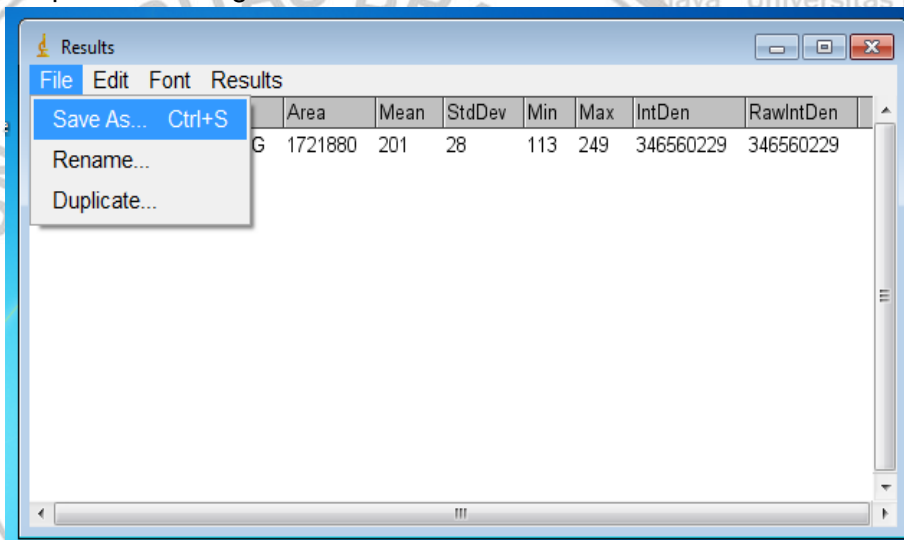
- Setelah gambar dibatasi, klik menu *Analyze*, kemudian pilih menu *Measurement*



6. Setelah klik menu measurement maka akan muncul laman **Result**



7. Simpan Hasil dengan klik menu file



Lampiran 7 : Dokumentasi Kegiatan Penelitian

KEGIATAN PENELITIAN
DILABORATORIUM FARMAKOLOGI DAN BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Ruang Laboratorium Farmakologi Dan Laboratorium Biomedik



2. Bahan-bahan Paparan Larutan Embrionik, Pegagan dan Rotenon

Menyiapkan Embrionik Medium (EM)

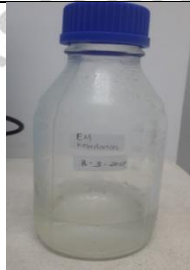
Bahan-Bahan EM



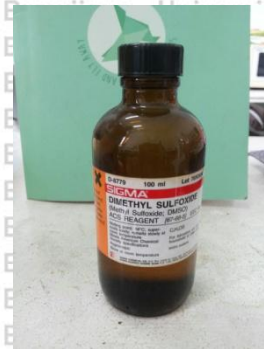
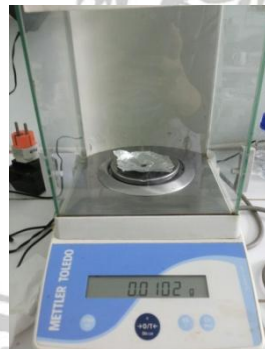
Menimbang bahan-bahan EM



Larutan EM



Menyiapkan Rotenon



Menyiapkan Pegagan	
Ekstrak Pegagan	Pasta Ekstrak Pegagan
	
Menimbang pegagan	Bahan-bahan paparan sudah siap dipakai
	

3. Pemeliharaan Ikan Zebrafish Induk (Dewasa)

Makanan Ikan	Pengaturan Siklus Gelap Terang
	
Alat Pengukur pH Air Akuarium	Food Timer
	

Termometer akuarium 	Heater (Penghangat air akuarium) 
Menguras Akuarium 	Akuarium 
Ikan Zebra Dewasa	
	

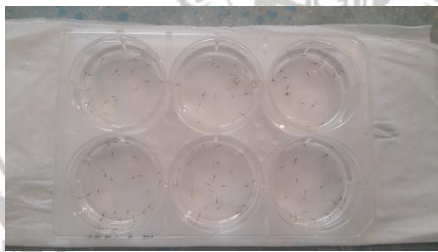

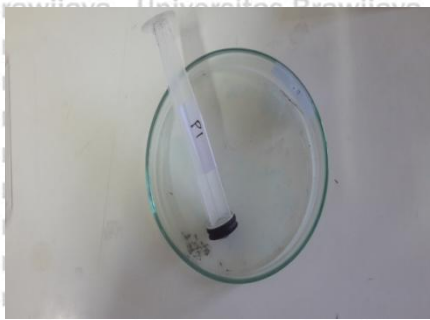

4. Peneluran dan Identifikasi memilih Telur


Pasang Trap 	Pasang bunga-bunga 
---	---

<p>Menutup Akuarium</p> 	<p>Mengangkat telur</p> 
<p>Identifikasi telur yang fertil</p>	<p>Identifikasi telur fertil dibawah mikroskop</p>
	
<p>Gambar Telur Yang fertil</p>	<p>Menyiapkan paparan</p>
	
<p>Melakukan paparan</p>	<p>Embrio dan Larva di Well Plate</p>
	

<p>Semua embrio sudah Hatching</p>	<p>Menyimpan embrio dan Larva di inkubator</p>
	
<p>Inkubator dalam keadaan tertutup</p>	<p>Suhu dipertahankan $\pm 28^{\circ}\text{C}$</p>
	

5. Kegiatan Pemeriksaan Elisa

<p>Collecting Sampel</p>	
<p>Larva sebelum euthanasia</p>	<p>Euthanasia dengan es:air</p>
	
<p>Larva dikeringkan</p>	<p>Pemberian buffer pada larva</p>
	

Larva+buffer 10 menit diatas es	Larva digerus
	
Hasil gerusan diambil dengan mikropipet dimasukan ke ependorf	Pengumpulan Sampel hasil gerusan
	
Sampel sebelum dicentrifuge disimpan diatas es	Dicentrifuge
	
Pengambilan supernatan	Supernatan di simpan di freezer
	

Pemeriksaan ELISA

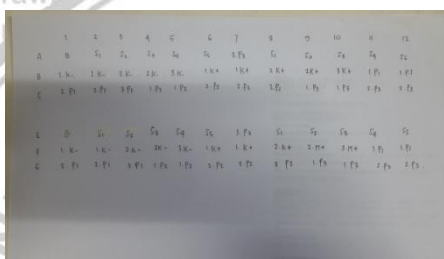
Elisa Kit IL-6



Elisa Kit IL-10



Membuat pola sampel



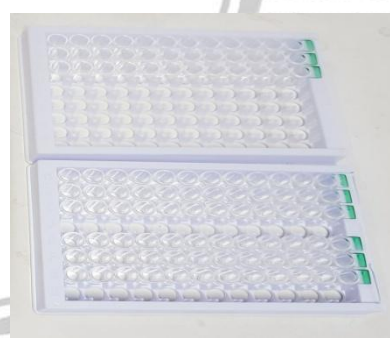
Menyiapkan sampel



Menyiapkan reagen dan larutan standar



Menyiapkan well microplate





Kegiatan Washing



Hasil ELISA



Elisa Reader	Print out hasil elisa
	

6. Pewarnaan/Staining Alizarin Red

Menimbang serbuk alizarin red untuk stok	Serbuk alizarin red
	
Menyiapkan larutan alizarin Red dari stok	Pewarnaan (Staining) alizarin Red
	
Foto zebrafish hasil staining alizarin red	Hasil Staining disimpan pada larutan gliserol 87% dalam evendop
	

Lampiran 8 : Prosedur Pewarnaan Alizarin Red

Prosedur Pewarnaan Alizarin-red

Fiksasi larva ikan zebrafish dengan menggunakan alkohol/Methanol 96% selama 12 jam

Rendam dalam aquadest semalam

Kemudian larva direndam dalam KOH 1% dengan Hirogen Peroksida 3% (sekitar 5 ml 3% H₂O₂ dalam larutan KOH 1 % 100 ml) selama 15 menit

Pigmen hitam harus berubah menjadi warna coklat sampai coklat muda

Bilas Larva dengan aquadest selama 10 menit

Selanjutnya larva direndam dalam larutan pewarna alizarin red 0,01 gram selama 3 hari

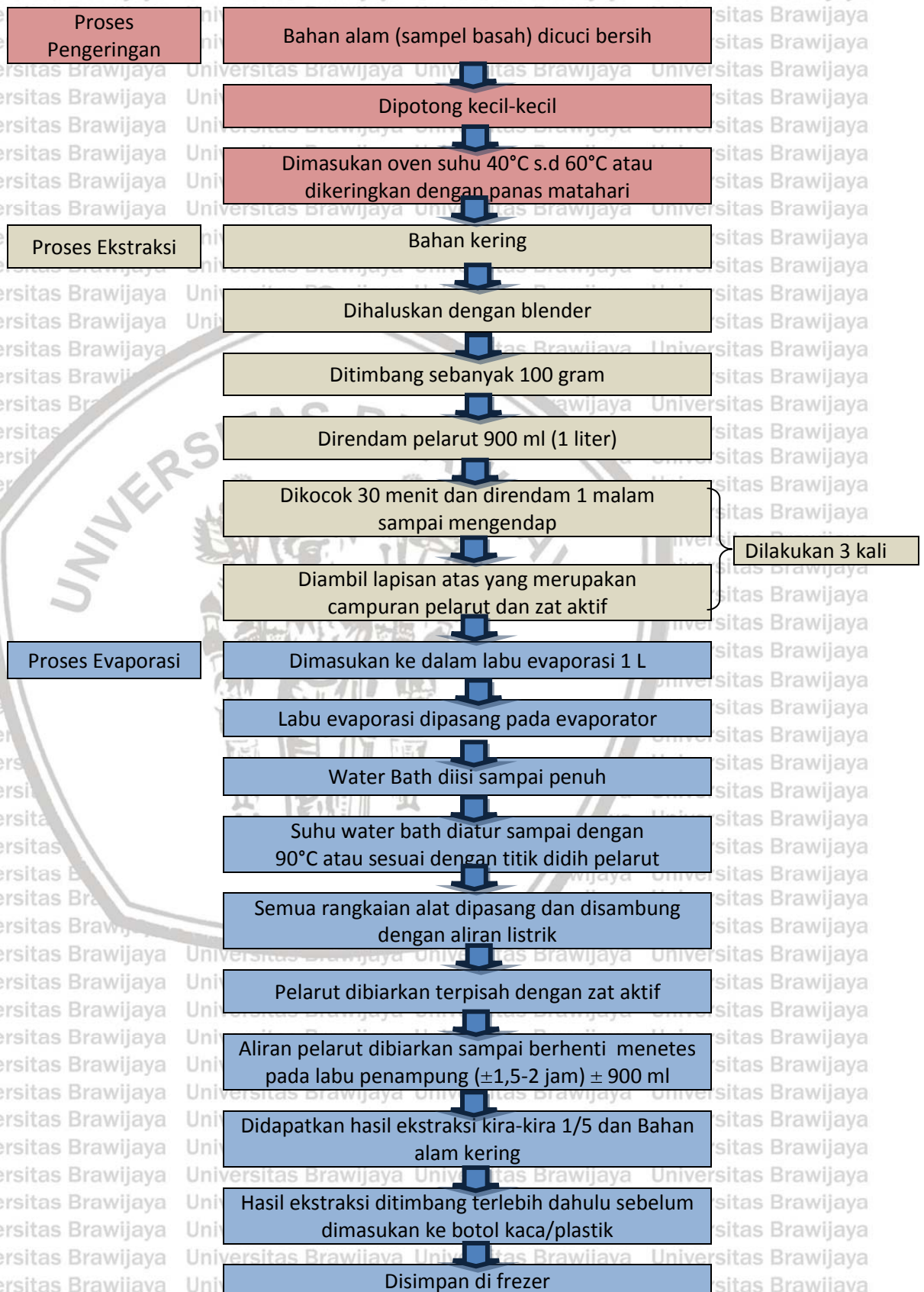
Dicuci dalam aquadest sebanyak 5 kali pembilasan

Larva hasil pewarnaan alizarin red diamati dibawah mikroskop dan diukur densitas warnanya dengan *integrated density* menggunakan software *image J*

Larva dapat disimpan pada *glycerol* 87% (bertahan hingga 6 bulan)

Lampiran 9 : Ekstraksi Pegagan

EKSTRAKSI PEGAGAN (*Centella Asiatica*)



Lampiran 10 : Prosedur Pemeriksaan ELISA Interleukin 6 dan Interleukin 10**Prosedur Pemeriksaan ELISA**

Siapkan semua reagen, standard solution dan sampel sesuai ketentuan dalam prosedur ELISA Kit Fish Interleukin 6 dan Interleukin 10

Menentukan jumlah strip yang diperlukan untuk pemeriksaan dan masukkan strip ke dalam frame yang akan digunakan.

Menambahkan 50 μ l standar ke well standard

Menambahkan 40 μ l sampel ke well sampel (sumur sampel) dan kemudian menambahkan 10 μ l antibodi anti-IL-6 /antibodi anti-IL-10 ke well sampel, kemudian menambahkan 50 μ l streptavidin-HRP ke well sampel dan well standar (Well control/blanko well). Campur well. Menutupi plate dengan sealer. Inkubasi selama 60 menit pada suhu 37 ° C.

Hilangkan sealer dan cuci plate 5 kali dengan wash buffer. Rendam well dengan 0,35 ml wash buffer selama 30 detik sampai 1 menit untuk setiap mencuci.

Menambahkan 50 μ l substrate solution A ke tiap well dan kemudian menambahkan 50 μ l substrate solution B ke tiap well. Inkubasi plate ditutup dengan sealer baru selama 10 menit pada suhu 37 ° C dalam kondisi gelap.

Menambahkan 50 μ l Stop Solution ke tiap well, warna biru akan berubah menjadi kuning.

Menentukan optical density (nilai OD) masing-masing well dengan menggunakan microplate reader dengan panjang gelombang 450 nm dalam waktu 30 menit setelah menambahkan stop solution.

Menghitung konsentrasi Interleukin 6/Interleukin 10

Lampiran 11 : Surat Keterangan Accepted Jurnal



JURUSAN GIZI POLITEKNIK KESEHATAN KEMENKES ACEH
Kampus Jurusan Gizi Poltekkes Kemenkes Aceh, Aceh Besar, 23352
Telp/Fax. 0651 46126 / 0651 46121
<http://ejournal.poltekkesaceh.ac.id/index.php/an> e-mail: jurnal6121@gmail.com

Banda Aceh, 5 Juli 2018

- Yth. Penulis Naskah:
1. *Husnul Khotimah*
 2. *Evi Zahara*
 3. *Een Nurainah*
 4. *Tri Yuliani*
 5. *Darwitri*
 6. *I Wayan Arsana Wiyaza*
 7. *Nurlaili Ramli*
 8. *Umi Kalsum*
 9. *Mohammad Muljohadi Ali*

Bersama dengan surat pemberitahuan ini, kami menginformasikan bahwa artikel ilmiah berjudul "EKSTRAK ETHANOL *Centella asiatica* MENINGKATKAN PERTUMBUHAN PANJANG BADAN, OSIFIKASI TULANG HOMEOSTASIS SITOKIN INFLAMASI PADA LARVA ZEBRAFISH (*Danio rerio*) MODEL STUNTING USIA 9 DAY POST FERTILIZATION" dapat dimuat dalam Jurnal AcTion: Aceh Nutrition Journal, P-ISSN: 2527-3310, E-ISSN: 2548-5741 untuk Vol. 3 No. 2, Nopember 2018.

Terima kasih atas ketersediaan penulis untuk bekerja sama dengan Jurnal AcTion: Aceh Nutrition Journal. Semoga kolaborasi ini dapat berkontribusi bagi perkembangan ilmu pengetahuan dibidang gizi dan kesehatan.

Ketua Redaksi



Agus Hendra Al Rahmad, SKM, MPH



Lampiran 12 : Bebas Plagiasi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

SURAT KETERANGAN

Nomor : 166 /UN10.F08.08/PN/2018

Berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal (BPJ) Fakultas Kedokteran menyatakan bahwa Artikel Ilmiah berikut :

- Judul : Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pada Masa Pre Sampai Dengan Post Hatching Terhadap Interleukin 6, Interleukin 10 Dan Osifikasi Tulang Keras pada *Stunting* Larva Zebrafish (*Danio rerio*)
- Penulis : Een Nuraenah
- NIM : 166070400111002
- Jumlah Halaman : 119
- Jenis Artikel : Tesis (Program Studi Magister Kebidanan)
- Kemiripan : 5%

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

12 APR 2018

Ketua Badan Penerbitan Jurnal,



Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes
NIP 19751125 200501 2 001

Lampiran 13 : Keterangan Submitt Jurnal



enadha nuraenah <enadha.nuraenah@gmail.com>

Fwd: [BJP] Submission Acknowledgement

1 pesan

Husnul Khotimah <husnul_farmako.fk@ub.ac.id> 11 April 2018 08.34
Kepada: darwitri darwitri <dwitri84@gmail.com>, "enadha.nuraenah@gmail.com" <enadha.nuraenah@gmail.com>, evi zahara <zaharaevi@yahoo.com>, tri yuliyani <yuliyani1907@gmail.com>

----- Forwarded message -----
From: Prof. Mir Misbahuddin <dgdabd@gmail.com>
Date: Wed, 11 Apr 2018 at 08.32
Subject: [BJP] Submission Acknowledgement
To: Mrs Husnul Khotimah <husnul_farmako.fk@ub.ac.id>

Dear Dr. Mrs Husnul Khotimah:

Thank you for submitting the manuscript, "Antiinflammatory effect of Centella asiatica in Rotenone-induced Zebrafish Larvae" to Bangladesh Journal of Pharmacology. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL:
<https://www.banglajol.info/index.php/BJP/author/submission/36346>
Username: husnul

There is no need to reply this e-mail. It is an automated generate reply to the author(s).

Always mention the manuscript ID during any correspondence with the editor.

Please see the video
<https://plus.google.com/collection/lvCrgB>

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Prof. Mir Misbahuddin
Bangladesh Journal of Pharmacology

Prof. Mir Misbahuddin, Editor-in-Chief, Bangladesh Journal of Pharmacology
<http://www.banglajol.info/index.php/BJP>



Lampiran 14 : Surat Perijinan Penelitian di Laboratorium Farmakologi

Hal : Permohonan melakukan Penelitian Kepada Yth. Kepala Laboratorium Farmakologi Fak. Kedokteran Univ. Brawijaya Malang

Lamp : 1 Bendel Proposal Penelitian & ETIK

Dengan hormat,

Yang bertandatangan dibawah ini :

Nama : Een Nuraenah
NIM / NIP : 166070400111002
PS (S1,S2,S3/Umum) : Magister Kebidanan
Alamat asal : Perumahan Purigading Blok H7 No.17 Kelurahan Jatimelati Kecamatan Pondok Melati Kota Bekasi Provinsi Jawa Barat
Telpon : 089507176220
Alamat kost : Jl. Bendungan Bening No.49 Malang
Judul Penelitian : Pengaruh Ekstrak Centella asiatica pada Model Zebrafish (Danio rerio) Stunting yang Diinduksi Rotenon terhadap Fertilitas Melalui Ekspresi LH (Proposal terlampir)
Pembimbing : Prof. Dr.dr. Mohammad Muldjohadi Ali.
Keperluan : 1. [] Uji Ekstrak 2. [] Pemeriksaan MDA/SOD 3. [x] Pemeliharaan & Pelakuan Hewan Coba

Alat yang digunakan :

Mohon agar kami diijinkan untuk melakukan penelitian di Lab. Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya terhitung mulai tanggal : 12 Juni 2017 s/d 31 Agustus 2018

Kami akan mematuhi segala peraturan dan tata tertib yang berlaku di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Demikian, atas perhatiannya kami ucapkan terima kasih.

Malang, 12 Juni 2017

Kepala Lab. Farmakologi FK-Universitas Brawijaya

Pembimbing, (Prof. Dr.dr. Mohammad Muldjohadi Ali)

Pemohon, (Een Nuraenah)

Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes NIP. 19550512198701 2 001



Lampiran 15 : Data Hasil Penelitian

REKAPITULASI DATA HASIL PENELITIAN

1. Panjang badan

Nomor Sampel	Kelompok					Kelompok					Kelompok					Kelompok				
	3 dpf (day post fertilization) atau 3 hari					4 dpf (day post fertilization) atau 4 hari					5 dpf (day post fertilization) atau 5 hari					6 dpf (day post fertilization) atau 6 hari				
	K	R	P 1	P 2	P 3	K	R	P 1	P 2	P 3	K	R	P 1	P 2	P 3	K	R	P 1	P 2	P 3
	Satuan panjang badan mm (milimeter)																			
1	3.35	3.20	3.32	3.40	3.38	3.62	3.47	3.50	3.50	3.61	3.76	3.64	3.73	3.65	3.66	3.88	3.67	3.80	3.84	3.86
2	3.34	3.33	3.29	3.34	3.25	3.67	3.44	3.53	3.49	3.62	3.78	3.65	3.67	3.66	3.74	3.75	3.69	3.72	3.70	4.00
3	3.32	3.36	3.35	3.27	3.33	3.69	3.51	3.60	3.67	3.62	3.72	3.57	3.65	3.80	3.70	3.79	3.54	3.79	3.87	3.71
4	3.18	3.36	3.33	3.33	3.34	3.65	3.54	3.50	3.63	3.44	3.69	3.55	3.76	3.79	3.72	3.90	3.63	3.78	3.85	3.75
5	3.37	3.33	3.43	3.38	3.24	3.61	3.57	3.53	3.70	3.50	3.73	3.69	3.61	3.80	3.68	3.78	3.60	3.68	3.81	3.72
6	3.42	3.24	3.31	3.25	3.26	3.64	3.53	3.68	3.61	3.59	3.77	3.69	3.67	3.68	3.66	3.88	3.73	3.74	3.75	3.76
7	3.44	3.22	3.40	3.24	3.31	3.66	3.49	3.56	3.50	3.50	3.76	3.67	3.76	3.78	3.70	3.83	3.68	3.76	3.78	3.72
8	3.31	3.26	3.33	3.39	3.41	3.62	3.59	3.55	3.57	3.52	3.68	3.67	3.74	3.60	3.89	3.88	3.62	3.85	3.79	3.84
9	3.38	3.34	3.38	3.39	3.41	3.61	3.43	3.56	3.52	3.62	3.72	3.51	3.76	3.56	3.83	3.86	3.65	3.87	3.89	3.80
10	3.36	3.36	3.34	3.41	3.44	3.69	3.57	3.55	3.49	3.57	3.65	3.58	3.78	3.73	3.60	3.79	3.69	3.80	3.78	3.76
11	3.50	3.45	3.49	3.43	3.47	3.74	3.47	3.62	3.69	3.66	3.67	3.60	3.72	3.84	3.71	3.74	3.53	3.66	3.67	3.70
12	3.34	3.40	3.49	3.46	3.39	3.63	3.33	3.69	3.57	3.61	3.66	3.39	3.63	3.78	3.71	3.63	3.64	3.74	3.80	3.68
13	3.38	3.32	3.44	3.38	3.47	3.64	3.53	3.62	3.68	3.65	3.56	3.58	3.71	3.65	3.75	3.70	3.57	3.65	3.67	3.74
14	3.46	3.34	3.40	3.50	3.44	3.75	3.46	3.62	3.68	3.65	3.70	3.52	3.66	3.70	3.7	3.70	3.66	3.68	3.68	3.68
15	3.30	3.38	3.43	3.45	3.42	3.55	3.57	3.59	3.67	3.59	3.74	3.60	3.63	3.67	3.72	3.70	3.54	3.69	3.72	3.72
16	3.46	3.38	3.33	3.43	3.42	3.58	3.63	3.69	3.59	3.65	3.61	3.57	3.66	3.78	3.67	3.78	3.61	3.66	3.76	3.87
17	3.35	3.37	3.38	3.48	3.45	3.63	3.50	3.64	3.50	3.62	3.61	3.65	3.7	3.82	3.73	3.78	3.59	3.77	3.78	3.72
18	3.38	3.29	3.44	3.45	3.46	3.58	3.60	3.65	3.64	3.58	3.47	3.66	3.72	3.73	3.65	3.73	3.56	3.74	3.72	3.73
19	3.46	3.35	3.40	3.38	3.37	3.55	3.60	3.62	3.58	3.56	3.67	3.57	3.64	3.77	3.66	3.80	3.57	3.66	3.77	3.69



20	3.40	3.48	3.35	3.42	3.37	3.63	3.56	3.61	3.65	3.60	3.63	3.66	3.71	3.68	3.76	3.67	3.65	3.67	3.70	3.63
21	3.35	3.53	3.43	3.36	3.39	3.74	3.63	3.67	3.72	3.60	3.56	3.50	3.66	3.63	3.64	3.73	3.66	3.7	3.67	3.75
22	3.48	3.26	3.44	3.48	3.40	3.70	3.44	3.71	3.62	3.58	3.64	3.64	3.73	3.77	3.70	3.71	3.62	3.72	3.76	3.76
23	3.41	3.45	3.47	3.44	3.40	3.51	3.43	3.70	3.64	3.64	3.61	3.62	3.74	3.71	3.65	3.72	3.5	3.73	3.81	3.74
24	3.49	3.44	3.45	3.34	3.39	3.72	3.50	3.65	3.58	3.59	3.85	3.44	3.72	3.71	3.64	3.75	3.6	3.75	3.68	3.71
25	3.39	3.39	3.44	3.35	3.38	3.63	3.58	3.56	3.50	3.68	3.75	3.63	3.55	3.64	3.71	3.68	3.39	3.78	3.79	3.67
26	3.39	3.36	3.43	3.41	3.40	3.63	3.55	3.68	3.62	3.68	3.80	3.37	3.66	3.72	3.66	3.70	3.35	3.72	3.62	3.81
27	3.53	3.36	3.31	3.38	3.40	3.71	3.32	3.61	3.60	3.58	3.53	3.34	3.7	3.71	3.67	3.72	3.48	3.8	3.79	3.62
28	3.41	3.43	3.47	3.36	3.42	3.75	3.56	3.66	3.63	3.64	3.66	3.67	3.71	3.63	3.72	3.68	3.38	3.74	3.78	3.72
29	3.42	3.40	3.47	3.47	3.40	3.61	3.59	3.62	3.62	3.60	3.70	3.63	3.68	3.65	3.78	3.69	3.62	3.66	3.82	3.65
30	3.55	3.49	3.39	3.40	3.44	3.54	3.42	3.64	3.73	3.61	3.68	3.59	3.68	3.62	3.75	3.81	3.66	3.68	3.83	3.62
Mean	3.40	3.36	3.40	3.39	3.39	3.64	3.51	3.61	3.61	3.60	3.68	3.58	3.69	3.71	3.71	3.76	3.59	3.73	3.76	3.74
SD	0.08	0.08	0.06	0.07	0.06	0.06	0.08	0.06	0.07	0.05	0.08	0.09	0.05	0.07	0.06	0.07	0.09	0.06	0.07	0.08

Mean (rata-rata) Panjang Badan

Nomor Sampel	Kelompok				
	Kontrol	Rotenon	P 1 (Perlakuan 1)	P 2 (Perlakuan 2)	P 3 (Perlakuan 3)
1	3.88	3.67	3.80	3.84	3.86
2	3.75	3.69	3.72	3.70	4.00
3	3.79	3.54	3.79	3.87	3.71
4	3.90	3.63	3.78	3.85	3.75
5	3.78	3.60	3.68	3.81	3.72
6	3.88	3.73	3.74	3.75	3.76
Mean 1	3.83	3.64	3.75	3.80	3.80
7	3.83	3.68	3.76	3.78	3.72
8	3.88	3.62	3.85	3.79	3.84
9	3.86	3.65	3.87	3.89	3.80
10	3.79	3.69	3.80	3.78	3.76
11	3.74	3.53	3.66	3.67	3.70
12	3.63	3.64	3.74	3.80	3.68
Mean 2	3.79	3.64	3.78	3.79	3.75
13	3.70	3.57	3.65	3.67	3.74
14	3.70	3.66	3.68	3.68	3.68
15	3.70	3.54	3.69	3.72	3.72
16	3.78	3.61	3.66	3.76	3.87
17	3.78	3.59	3.77	3.78	3.72
18	3.73	3.56	3.74	3.72	3.73
Mean 3	3.73	3.59	3.70	3.72	3.74
19	3.80	3.57	3.66	3.77	3.69
20	3.67	3.65	3.67	3.70	3.63
21	3.73	3.66	3.70	3.67	3.75
22	3.71	3.62	3.72	3.76	3.76
23	3.72	3.50	3.73	3.81	3.74
24	3.75	3.60	3.75	3.68	3.71
Mean 4	3.73	3.60	3.71	3.73	3.71
25	3.68	3.39	3.78	3.79	3.67
26	3.70	3.35	3.72	3.62	3.81
27	3.72	3.48	3.80	3.79	3.62
28	3.68	3.38	3.74	3.78	3.72
29	3.69	3.62	3.66	3.82	3.65
30	3.81	3.66	3.68	3.83	3.62
Mean 5	3.71	3.48	3.73	3.77	3.68

Nomor Sampel	Kelompok				
	Kontrol	Rotenon	P 1 (Perlakuan 1)	P 2 (Perlakuan 2)	P 3 (Perlakuan 3)
Mean 1	3.83	3.64	3.75	3.80	3.8
Mean 2	3.79	3.64	3.78	3.79	3.75

Mean 3	3.73	3.59	3.70	3.72	3.74
Mean 4	3.78	3.62	3.74	3.77	3.76
Mean 5	3.71	3.48	3.73	3.77	3.68

2. Kadar IL-6

Nomor Sampel	KADAR INTERLEUKIN 6 (IL-6) ng/L (nanogram/Liter)				
	Kelompok				
	Kontrol	Rotenon	P 1	P 2	P 3
1	4.691	11.751	7.119	2.783	6.678
2	4.691	15.509	8.530	3.673	5.442
3	7.119	13.562	10.074	2.783	4.691
4	7.119	15.509	7.119	4.691	9.544
5	5.840	17.591	10.074	7.119	8.530
Mean	5.892	14.784	8.583	4.210	6.977
SD	1.214	2.215	1.478	1.807	2.041

3. Kadar IL-10

Nomor Sampel	KADAR INTERLEUKIN 10 (IL-10) ng/L (nanogram/Liter)				
	Kelompok				
	Kontrol	Rotenon	P 1	P 2	P 3
1	1.430	1.821	1.554	2.111	1.963
2	2.111	2.426	2.111	2.265	2.265
3	2.945	1.199	2.111	2.945	2.426
4	2.945	1.092	1.963	1.963	2.765
5	2.765	0.990	2.111	2.426	2.111
Mean	2.439	1.505	1.970	2.342	2.306
SD	0.660	0.608	0.241	0.379	0.309

4. Osifikasi Tulang Keras

Nomor Sampel	EKSPRESI OSIFIKASI TULANG KERAS (Pixel)				
	Kelompok				
	Kontrol	Rotenon	P 1	P 2	P 3
1	271354473	270276029	268520124	277376312	331740133
2	295754004	214542288	274939962	326153561	278121342
3	344081957	280793745	304795851	311122630	302101439
4	323665675	288829212	318573694	354262460	297035155
5	300391682	202446208	297769607	281425287	315291277
Mean	307049558	251377496	292919848	310068050	304857869
SD	27809845	39925571	20864457	32024051	20094444

RIWAYAT HIDUP

Een Nuraenah, lahir di Majalengka, 19 Juli 1978 anak pertama dari tiga bersaudara putri dari Bapak H. Muadan Nurdin dan Ibu Hj. Kusrinah. Lulus SD Negeri Burujul Wetan IV Jatiwangi tahun 1990, lulus SMP Negeri 1 Jatiwangi tahun 1993, dan lulus SPK (Sekolah Perawat Kesehatan) di SPK Pemda Subang tahun 1997.



Tahun 1997 melanjutkan pendidikan Diploma I Kebidanan yaitu Program Pendidikan Bidan-A (PPB-A) di SPK Depkes karawang yang sekarang berubah menjadi Poltekkes Bandung, lulus tahun 1998. Mulai tahun 1998 bekerja sebagai Bidan PTT (Bidan Desa) di Puskesmas Jatitujuh dan Puskesmas Dawuan di Kabupaten Majalengka sampai dengan tahun 2001. Pada tahun 2001 melanjutkan pendidikan Program Diploma III Kebidanan di AKBID Depkes Karawang (Poltekkes Bandung), lulus tahun 2004, dan melanjutkan pendidikan Program Diploma IV Bidan di Universitas Padjadjaran (UNPAD) Bandung di Kota Bandung, lulus tahun 2005 dan bekerja sebagai dosen di STIKes YPIB Majalengka. Pada tahun 2006 mulai bekerja sebagai Bidan Pelaksana Ruang Bersalin (VK) di RSUD Cideres Kabupaten Majalengka, dan bekerja sebagai dosen program studi D III Kebidanan di STIKes YPIB Majalengka serta AKBID Respati Sumedang. Pada tahun 2012 mulai bekerja sebagai Instruktur Laboratorium di Poltekkes Kemenkes Jakarta III sampai dengan sekarang. Pada tahun 2016 mengambil pendidikan program studi Magister Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.