

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN
(*Centella asiatica*) PRE SAMPAI POST HATCHING
TERHADAP PANJANG BADAN, SUPEROKSIDA
DISMUTASE DAN MALONDIALDEHID
LARVA ZEBRAFISH STUNTING**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH :
TRI YULIYANI
166070400111001**

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

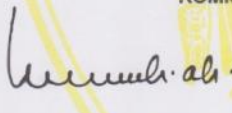
TESIS


**PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN
(*Centella asiatica*) PRE SAMPAI POST HATCHING
TERHADAP PANJANG BADAN, SUPEROKSIDA
DISMUTASE DAN MALONDIALDEHID LARVA
ZEBRAFISH STUNTING**

Oleh :
TRI YULIYANI
166070400111001

Dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 04 Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PEMBIMBING


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


Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes
NIP. 195505121987012001
Anggota

Malang, 17 JUL 2018
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,




Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes
NIP. 195804141987012001

TESIS

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN
(*Centella asiatica*) PRE SAMPAI POST HATCHING
TERHADAP PANJANG BADAN, SUPEROKSIDA
DISMUTASE DAN MALONDIALDEHID LARVA
ZEBRAFISH STUNTING**

Oleh :
TRI YULIYANI
166070400111001

Dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 04 Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PENGUJI

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

Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes
NIP. 195505121987012001
Anggota Penguji

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

Dr. dr. Bambang Rahardjo, Sp. OG (K)
NIP. 196902041999031008
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, 04 Juli 2018

Mahasiswa,



Nama : Tri Yuliyani
NIM : 166070400111001
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran UB



KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH

Darwitri, Tri Yuliyani, Een Nuraenah, Evi Zahara, Husnul Khotimah, Umi Kalsum, Nurdiana & Mohammad Muljohadi Ali. *Centella asiatica* Increased The Body Length Through The Modulation of Antioxidant in Rotenone Induced Zebrafish Larvae. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 11 (2): 827-833. doi.org/10.13005/bpj/ 1438.

Darwitri, Tri Yuliyani, Een Nuraenah, Evi Zahara, Husnul Khotimah, Umi Kalsum, Nurdiana & Mohammad Muljohadi Ali. *Centella asiatica* Increased The Body Length Through The Modulation of Antioxidant in Rotenone Induced Zebrafish Larvae. Disampaikan pada lomba poster pada acara Seminar Memanfaatkan Obat Herbal Menuju Indonesia Sehat. 5 Mei 2018. Malang.





Alhamdulillah.....

Karya ilmiah ini ditujukan untuk

Bapak dan Ibu tersayang (H. Ismid Dachlan & Hj. Mardiani)

Suami dan kedua anakku tersayang

(Syahrudin, Nadya Ramadhani & M. Nur Azmi)

RINGKASAN

Tri Yuliyani

Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre sampai Post Hatching Terhadap Panjang Badan, Kadar Superoksida Dismutase dan Kadar Malondialdehid Larva Zebrafish Stunting. Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Ketua Komisi Pembimbing Prof. Dr. dr. M. Muljohadi Ali, Sp.FK; Anggota Dr. dr. Umi kalsum, M.Kes.

Stunting merupakan suatu gejala kegagalan pertumbuhan linear yang terjadi anak usia dibawah 5 tahun ditandai dengan tinggi badan/panjang badan menurut umur dengan nilai Z-skor (HAZ) berada dibawah -2 Standart Deviasi berdasarkan pengukuran WHO. Stunting dapat disebabkan akibat paparan bahan toksik (pestisida) seperti rotenon. Mekanisme rotenon sebagai *endocrine disrupting chemicals* (EDCs) dapat mengganggu homeostatis hormon dan menurunkan jumlah Adenosine Triphospate (ATP) serta peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS). ROS yang tinggi menyebabkan stress oksidatif dan Interaksi ROS dengan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) menimbulkan terjadinya peroksidasi lipid dengan salah satu produknya *malondialdehyde* (MDA) sehingga menyebabkan kerusakan sel. *Superoxide dismutase* (SOD) adalah enzim antioksidan utama yang berperan dalam eliminasi stress oksidasi. Pegagan mengandung fitonutrien utamanya adalah triterpenoid yang berperan sebagai antioksidan dan bekerja untuk menyeimbangkan oksidan dalam sel sehingga stress oksidatif dapat diatasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap panjang badan larva zebrafish yang diinduksi rotenon melalui mekanisme radikal bebas.

Desain penelitian ini adalah *true experimental* dengan *post test control group design* menggunakan hewan coba embrio zebrafish berusia 0 hpf – 144 hpf. Embrio zebrafish dikelompokkan menjadi 5 yaitu kontrol (diberikan embrionik medium), Rotenon (diberikan rotenon 12.5 ppb pada 2 hpf-72 hpf), dan kelompok perlakuan yang diberikan rotenon 12.5 ppb pada 2 hpf-72 hpf dan pegagan 5 µg/mL dengan lama paparan mulai 2 hpf sampai 96, 120 dan 144 hpf secara berurutan. Pengukuran panjang badan dan rasio panjang kepala dilakukan pada usia 72 – 144 hpf menggunakan *software image raster*. Pada usia 144 hpf (6 dpf) larva diterminasi dan dilakukan homogenisasi untuk dilakukan pengukuran kadar SOD dan kadar MDA dengan metode ELISA. Data dianalisis secara statistik menggunakan program SPSS versi 23.0 dengan uji normalitas *Shapiro Wilk*, uji homogenitas, uji *One Way Anova* dan korelasi *Pearson*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada usia 144 hpf (6 dpf) panjang badan larva zebrafish pada kelompok rotenon berbeda signifikan dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. kelompok perlakuan tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol diusia 144 hpf (6 dpf). Korelasi antar pegagan dengan SOD bernilai positif dengan hubungan yang sangat kuat sedangkan korelasi pegagan dengan MDA bernilai negative dengan hubungan yang kuat.

Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa paparan rotenon 12,5 ppb dapat mengganggu pertumbuhan panjang badan pada larva zebrafish. Mekanisme rotenon dengan menghambat kompleks I mitokondria dan homeostatis hormon. Gangguan pada mitokondria mengakibatkan jumlah Adenosine Triphospate (ATP) berkurang sehingga terjadi kegagalan proses pembelahan sel dan apoptosis. Pemberian pegagan (*Centella asiatica*) mampu meningkatkan panjang badan dengan koreksi panjang badan sebesar 99,6% di usia 144 hpf (6 dpf). Pegagan (*Centella asiatica*) secara signifikan dapat meningkatkan kadar SOD dan menurunkan kadar MDA. Hal ini menunjukkan adanya proteksi dari pegagan (*Centella asiatica*) pada larva zebrafish akibat paparan rotenon, sehingga tidak ada gangguan pada proses pembentukan ATP di mitokondria dan homeostatis hormon. Berbagai bahan aktif pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan antioksidan enzimatik seperti SOD dapat menstabilkan radikal bebas dengan cara *free radical scavenger* serta dapat memodulasi antioksidan endogen melalui peningkatan ekspresi NRF2.

Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pre sampai *post hatching* dapat meningkatkan panjang badan, kadar *superoksida dismutase* dan menurunkan kadar *malondialdehid* larva *zebrafish stunting*.



SUMMARY

Tri Yuliyani

Effect of Ethanol Extract Gotu kola (*Centella asiatica*) Pre to Post Hatching Against body length, levels of superoxide dismutase and malondialdehyde levels Stunting Zebrafish larvae, Master of Midwifery Medical Faculty Brawijaya University . Chairman of the commission: Prof. Dr. dr. M. Muljohadi Ali, Sp.FK; Member Dr. dr. Umi Kalsum, M. Kes.

Stunting a linear growth failure symptoms that occur children under 5 years of age is characterized by height / length of the body according to age with the value of Z-score (HAZ) is below -2 Standard Deviation based on the measurement of the WHO., Stunting can be caused due to exposure to toxic substances (pesticides) like rotenon. Rotenon as Endocrine Disrupting chemicals (EDCs) that interfere with hormone homeostasis and decreases the amount of Adenosine Triphosphate (ATP) and increase the production of reactive oxygen species (ROS). High ROS cause oxidative stress and ROS interaction with polyunsaturated fatty acids (PUFA) cause lipid peroxidation with one of its products malondialdehyde (MDA) that cause cell damage. Superoxide dismutase (SOD) is a major antioxidant enzyme that plays a role in oxidative stress elimination. Pegagan main triterpenoids contain phytonutrients that act as antioxidants and work to balance the oxidant within the cell so that oxidative stress can be overcome. The purpose of this study was to determine the effect of ethanol extract of Gotu kola (*Centella asiatica*) to body length zebrafish larvae induced rotenon through free radical mechanism.

Design of this research is true experimental with posttest control group design using experimental animals aged 0 hpf zebrafish embryos - 6 dpf. Zebrafish embryos were divided into 5 groups : controls (given embryonic medium only), Rotenone (given 12.5 ppb rotenon at 2 hpf-3 day post fertilization-dpf), and a group of 12.5 ppb rotenon treated at 2 hpf-3 dpf and 5 µg/mL extract with long exposure from 2 hpf to 4, 5 and 6 dpf respectively. Measurement body length and head length ratio do at the age of 3-6 dpf using software raster image 3. At the age of 6 dpf larvae terminated and carried out homogenization to measured levels of SOD and MDA levels by ELISA. Data were statistically analyzed using SPSS version 23.0 with Shapiro Wilk normality test, homogeneity test, One Way Anova test and Pearson correlation.

The results showed that the length of the body in the treatment groups did not different significantly from the control group at 6 dpf. Gotu kola (*Centella asiatica*) can increase the length of the body with a body length correction amounting to 99.6% at the age of 6 dpf, Gotu kola (*Centella asiatica*) can significantly improve the levels SOD and lower levels of MDA. This points to the protection of Gotu kola (*Centella asiatica*) on zebrafish larvae caused by exposure to rotenon, so there is no disruption in the formation of ATP in mitochondria and hormone homeostasis. A variety of active ingredient of Gotu kola (*Centella asiatica*) can improve enzymatic antioxidants such as SOD can stabilize free radicals by means of free radical scavenger and can modulate the expression of endogenous antioxidants through increased NRF2.

It is concluded that ethanol extract of ethanol Gotu kola (*Centella asiatica*) pre to post hatching can increase the length of the body, levels of superoxide dismutase and decreased malondialdehyde levels Stunting Zebrafish larvae.

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyajikan tulisan tesis yang berjudul **“Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai Post Hatching terhadap Panjang Badan, Superoksida Dismutase dan Malondialdehid Larva Zebrafish Stunting”**.

Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi pengertian *stunting*, permasalahan *stunting*, stres oksidatif, bahan aktif yang terdapat dalam pegagan dan manfaatnya serta terjadinya *stunting* melalui mekanisme radikal bebas.

Dengan selesainya tesis ini penulis menyampaikan terima kasih 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 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 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.

4. Dr. dr. Bambang Rahardjo, Sp. OG (K) selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Universitas Fakultas Kedokteran Brawijaya Malang yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan selaku Penguji II yang telah banyak memberikan masukan dan arahan demi kesempurnaan tesis ini.
5. Prof. Dr. dr. M. Muljohadi Ali, SpFK., selaku Ketua Komisi Pembimbing dan Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes., selaku Anggota Pembimbing dan Kepala Laboratorium Farmakologi yang telah memberikan bimbingan dan masukan selama proses penyusunan tesis serta memberikan ijin dalam pelaksanaan penelitian.
6. Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes selaku Pembimbing yang telah membimbing dan masukan selama proses penelitian dan penyusunan tesis.
7. dr. Eko Sulistijono, Sp.A (K) selaku Penguji I yang telah banyak memberikan masukan dan arahan demi kesempurnaan tesis ini.
8. Ikhwansyah, M.Kes selaku Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Banjar yang telah memberikan ijin untuk melanjutkan pendidikan Magister Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
9. Teman-teman tim *stunting* dan teman Magister Kebidanan angkatan 2016 yang telah membantu dan memberikan semangat dalam menyelesaikan tesis ini.
10. Orang tua, suami, dan anak yang selalu mendoakan dan memberikan dukungan untuk menyelesaikan tesis ini.
11. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung untuk terselesainya tesis ini.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurangtepatan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Juli 2018

Penulis



DAFTAR ISI

| | |
|--|----------|
| LEMBAR PERSETUJUAN..... | ii |
| LEMBAR PENGESAHAN..... | iii |
| PERNYATAAN ORISINALITAS..... | iv |
| KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH..... | v |
| HALAMAN PERUNTUKAN..... | vi |
| RINGKASAN..... | vii |
| SUMMARY..... | ix |
| KATA PENGANTAR..... | x |
| DAFTAR ISI..... | xiii |
| DAFTAR TABEL..... | xvi |
| DAFTAR GAMBAR..... | xvii |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xviii |
| DAFTAR SINGKATAN..... | xix |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah..... | 5 |
| 1.3 Tujuan..... | |
| 1.3.1 Tujuan Umum..... | 5 |
| 1.3.2 Tujuan Khusus..... | 6 |
| 1.4 Manfaat Penelitian..... | |
| 1.4.1 Manfaat Teoritis..... | 6 |
| 1.4.2 Manfaat Praktis..... | 7 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA | 8 |
| 2.1 <i>Stunting</i> | 8 |
| 2.1.1 Pengertian <i>Stunting</i> | 8 |
| 2.1.2 Faktor Penyebab <i>Stunting</i> | 10 |
| 2.1.3 Mekanisme <i>Stunting</i> | 11 |
| 2.1.4 Manifestasi <i>Stunting</i> Jangka Pendek dan Panjang..... | 12 |
| 2.1.5 Penanganan <i>Stunting</i> | 13 |
| 2.1 Rotenon..... | 14 |
| 2.2.1 Rotenon dan Manfaatnya..... | 14 |
| 2.2.2 Struktur Fisik dan Karakteristik Kimia..... | 15 |
| 2.2.3 Toksisitas..... | 16 |
| 2.2.4 Mekanisme Kerja Rotenon..... | 16 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3 Radikal Bebas dan Antioksidan | 19 |
| 2.3.1 Radikal Bebas | 19 |
| 2.3.2 Antioksidan | 22 |
| 2.3.2.1 Definisi Antioksidan | 22 |
| 2.3.2.2 Macam-macam Antioksidan | 22 |
| 2.4 Peroksida Lipid dan MDA | 24 |
| 2.5 Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) | 25 |
| 2.5.1 Klasifikasi Pegagan | 25 |
| 2.5.2 Morfologi Pegagan | 26 |
| 2.5.3 Kandungan Pegagan | 27 |
| 2.5.4 Manfaat Pegagan | 28 |
| 2.6 Zebrafish | 30 |
| 2.6.1 Karakteristik Zebrafish | 30 |
| 2.6.2 Perkembangan Zebrafish | 31 |
| 2.6.3 Zebrafish sebagai Model Penelitian | 34 |
| BAB 3 KERANGKA TEORI & KERANGKA KONSEP | 36 |
| 3.1 Kerangka Teori | 36 |
| 3.2 Kerangka Konsep | 38 |
| 3.3 Hipotesis | 40 |
| BAB 4 METODE PENELITIAN | 41 |
| 4.1 Jenis dan Desain Penelitian | 41 |
| 4.2 Populasi dan Sampel | 41 |
| 4.2.1 Populasi Penelitian | 41 |
| 4.2.2 Sampel Penelitian | 42 |
| 4.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi | 43 |
| 4.4 Tempat dan Waktu Penelitian | 43 |
| 4.4.1 Tempat Penelitian | 43 |
| 4.4.2 Waktu Penelitian | 43 |
| 4.5 Variabel Penelitian | 44 |
| 4.6 Definisi Operasional | 44 |
| 4.7 Alat & Bahan Penelitian | 45 |
| 4.8 Prosedur Penelitian | 47 |
| 4.8.1 Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio | 47 |
| 4.8.2 Pembuatan Medium Embrionik | 48 |
| 4.8.3 Pembuatan Larutan Rotenon | 48 |
| 4.8.4 Pembuatan Ekstrak Pegagan | 49 |
| 4.8.5 Pembuatan Larutan Pegagan | 50 |
| 4.8.6 Pemberian Larutan Rotenon & Ekstrak Etanol Pegagan .. | 50 |
| 4.8.7 Pengukuran Panjang Badan | 52 |
| 4.8.8 Pengukuran Ratio Panjang Badan : Panjang Kepala | 52 |
| 4.8.9 Pengukuran Kadar SOD | 52 |
| 4.8.10 Pengukuran Kadar MDA | 54 |
| 4.9 Pengumpulan dan Analisis Data | 54 |
| 4.9.1 Pengumpulan Data | 54 |
| 4.9.2 Analisis Data | 54 |
| 4.10 Alur Penelitian | 56 |

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS 57

- 5.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai *Post Hatching* terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish Stunting 57
- 5.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai *Post Hatching* terhadap Kadar SOD Larva Zebrafish Stunting Usia 144 hpf 60
- 5.3 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai *Post Hatching* terhadap Kadar MDA Larva Zebrafish Stunting Usia 144 hpf 62
- 5.4 Korelasi antara Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai *Post Hatching* terhadap Panjang Badan, Kadar SOD, Kadar MDA Larva Zebrafish Stunting 64

BAB 6 PEMBAHASAN 66

- 6.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai *Post Hatching* terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish Stunting 66
- 6.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai *Post Hatching* terhadap Kadar SOD Larva Zebrafish Stunting 69
- 6.3 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai *Post Hatching* terhadap Kadar MDA Larva Zebrafish Stunting 71
- 6.4 Korelasi antara Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai *Post Hatching* dengan Panjang Badan, Kadar SOD, Kadar MDA Larva Zebrafish Stunting 72
- 6.5 Implikasi Hasil Penelitian dalam Asuhan Kebidanan..... 74

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN 76

- 7.1 Kesimpulan..... 76
- 7.2 Saran..... 76

DAFTAR PUSTAKA 78

LAMPIRAN..... 87

RIWAYAT HIDUP..... 116

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Macam-macam Enzim Antioksidan 22

Tabel 2.2 Kandungan Triterpenoid dari *Centella asiatica* 27

Tabel 2.3 Kandungan Zat Gizi Pegagan (*Centella asiatica*) per 100 gram 28

Tabel 2.4 Klasifikasi *Zebrafish* 30

Tabel 2.5 Perkembangan *Zebrafish* 32

Tabel 4.1 Definisi Operasional 44

Tabel 4.2 Pemberian Larutan Rotenon dan Ekstrak Etanol Pegagan 51

Tabel 4.3 Kriteria Koefisien Korelasi 55

Tabel 5.1 Hasil Perbandingan Rerata Panjang Badan Larva *Zebrafish* Dengan *Annova* 58

Tabel 5.2 Hasil Uji Korelasi Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Panjang Badan, Kadar SOD, Kadar MDA 64



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Teknik Pengukuran Tinggi Badan dan Panjang Badan..... 9

Gambar 2.2 Grafik Length For Age Menurut Standart WHO 2006 10

Gambar 2.3 Kekurangan Nutrisi Selama Daur Kehidupan 12

Gambar 2.4 Struktur Molekul Rotenon 16

Gambar 2.5 Proses Pembentukan ATP di Mitokondria 17

Gambar 2.6 Mekanisme Kerja Rotenon Pada Mitokondria..... 18

Gambar 2.7 Skema Pembentukan MDA Melalui Asam Lemak Tidak Jenuh Ganda 25

Gambar 2.8 Tanaman Pegagan..... 27

Gambar 2.9 Perbedaan *Zebrafish* Jantan dan Betina 31

Gambar 2.10 Larva dan Dewasa *Zebrafish*..... 34

Gambar 3.1 Kerangka Teori 36

Gambar 3.2 Kerangka Konsep 38

Gambar 4.1 Alur Penelitian 56

Gambar 5.1 Rerata Panjang Badan Larva *Zebrafish* untuk Semua Kelompok Pada Usia 72,96,120, dan 144 hpf..... 57

Gambar 5.2 Perbandingan Panjang Badan Larva *Zebrafish* Pada Usia 72 dan 144 hpf 59

Gambar 5.3 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Kadar SOD..... 61

Gambar 5.4 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Kadar MDA 63

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1: Keterangan Surat Kelaikan Etik..... 87

Lampiran 2: Surat Keterangan Bebas Plagiasi..... 88

Lampiran 3: Bukti *Accepted* Jurnal..... 89

Lampiran 4: Bukti Publikasi Jurnal 90

Lampiran 5: Poster Pada Acara Seminar Memanfaatkan Obat Herbal Menuju Indonesia Sehat..... 97

Lampiran 6: Determinasi Tanaman Pegagan..... 98

Lampiran 7: Laporan Hasil Analisa *Zebrafish*..... 99

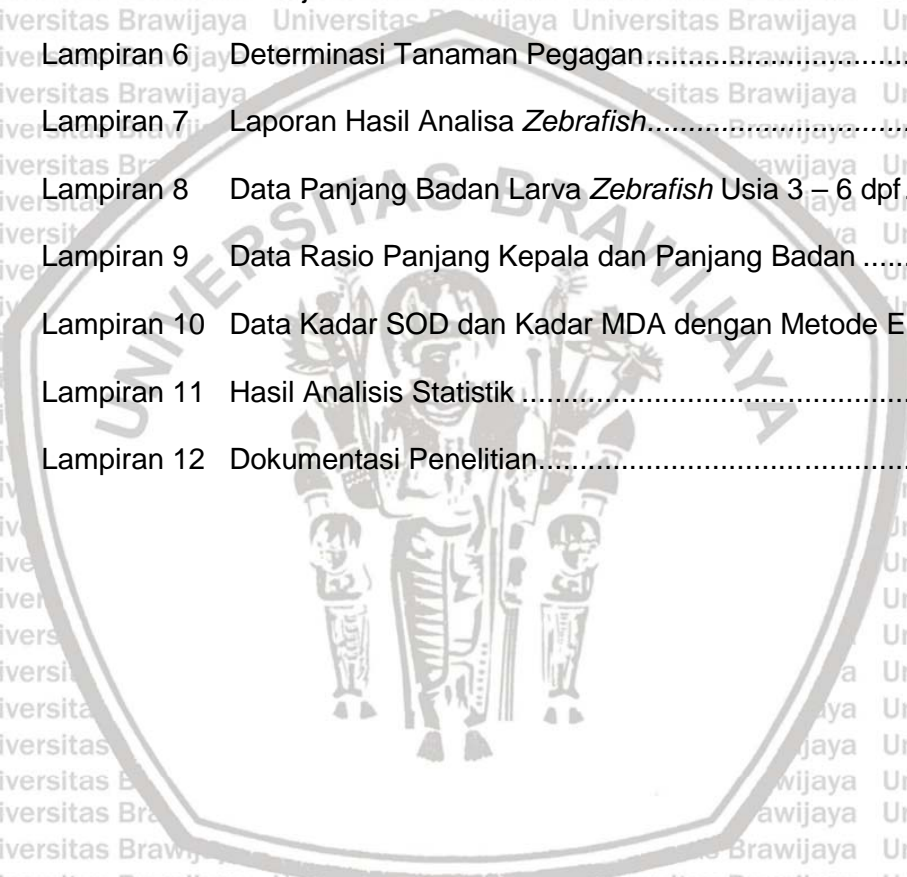
Lampiran 8: Data Panjang Badan Larva *Zebrafish* Usia 3 – 6 dpf..... 100

Lampiran 9: Data Rasio Panjang Kepala dan Panjang Badan 104

Lampiran 10: Data Kadar SOD dan Kadar MDA dengan Metode ELISA..... 105

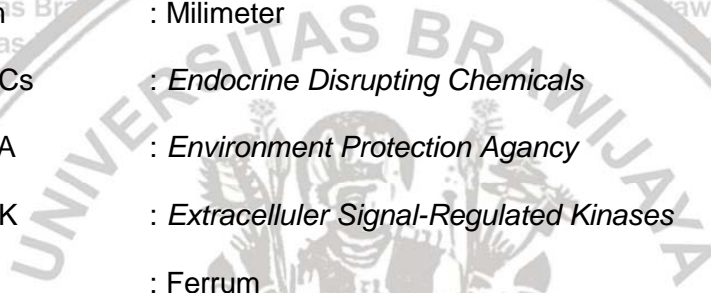
Lampiran 11: Hasil Analisis Statistik 106

Lampiran 12: Dokumentasi Penelitian..... 113



DAFTAR SINGKATAN

- ASI : Air Susu Ibu
- ATP : Adenosine Triphosphatase
- BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor
- CAT : Catalase
- Dpf : Day post fertilization
- DMSO : Dimetil sulfoksida
- Mg/mL : Miligram per mililiter
- Mm : Milimeter
- EDCs : Endocrine Disrupting Chemicals
- EPA : Environment Protection Agency
- ERK : Extracelluler Signal-Regulated Kinases
- Fe : Ferrum
- GH : Growth Hormon
- Glut 1 : Glucose Transporter 1
- Glut 4 : Glucose Transpoeter 4
- H₂ : Hidrogen
- H₂O : Air
- H₂O₂ : Hidrogen peroksida
- HAZ : Height for Age (Z-Score)
- Hpf : Hour post fertilization
- Hsp : Heat Shock Protein
- IGF-1 : Insulin Growth Factor-1
- IRS : Insulin Reseptor Substrat
- MDA : Malondialdehid
- NRF2 : Nuclear Factor 2



- OPG : *Osteoprotegrin*
- PB : *Panjang Badan*
- PB/U : *Panjang Badan dibanding Umur*
- Ppb : *Part per billion*
- RANK : *Receptor Activator Nuclear Factor Kappa-*
- RANKL : *Receptor Activator Nuclear Factor Kappa- Ligan*
- Riskedes : *Riset kesehatan dasar*
- ROS : *Reactive oxygen spesies*
- SD : *Standart Deviasi*
- SOD : *Superoksidasi Dismutase*
- SL : *Standart Length*
- SN : *Substantia Nigra*
- TB : *Tinggi badan*
- VEGF : *Vascular Endhotelial Growth Factor*
- VEGFR : *Vascular Endhotelial Growth Factor Receptor*
- WHO : *World Health Organization*
- µg/mL : *Microgram per mililiter*



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Stunting merupakan kegagalan pertumbuhan linear pada anak usia dibawah 5 tahun ditandai dengan tinggi badan/panjang badan menurut umur dengan nilai Z-skor (HAZ) berada dibawah -2 Standart Deviasi (SD) berdasarkan pengukuran WHO (Prendergast & Humphrey, 2014). *Stunting* menjadi permasalahan di dunia yang terdapat pada anak berusia dibawah 5 tahun dengan prevalensi pada tahun 2012 berjumlah 162 juta dan jika tidak dilakukan upaya penurunan maka *stunting* dapat diproyeksikan menjadi 127 juta pada tahun 2025 dengan distribusi anak *stunting* sebesar 56% di Asia dan 36% di Afrika (Kementrian Kesehatan RI, 2016). Jumlah anak *stunting* di Indonesia menempati peringkat kelima dunia (MCA Indonesia, 2010). Berdasarkan hasil Riskesdas 2013 terlihat adanya peningkatan prevalensi *stunting* di Indonesia menjadi 37,2% pada tahun 2013 dibandingkan tahun 2010 sebesar 35,6%, yang mempunyai arti bahwa satu dari tiga balita di Indonesia mengalami *stunting*. Prevalensi balita *stunting* akan menjadi masalah kesehatan masyarakat jika prevalensinya mencapai $\geq 20\%$, dengan melihat tingginya persentase balita *stunting* di Indonesia maka ini merupakan masalah kesehatan yang harus segera ditanggulangi.

Dampak *stunting* terhadap kesehatan dapat mengakibatkan kelainan patologis yang terkait dengan peningkatan morbiditas dan mortalitas, kehilangan potensi pertumbuhan fisik, mengganggu perkembangan syaraf dan fungsi kognitif, serta peningkatan risiko penyakit kronis di saat dewasa (De Onis & Branca, 2016), terjadi perubahan epigenetik permanen dalam metabolisme, perubahan struktur anatomi dan fungsi organ sehingga memiliki risiko tinggi terhadap penyakit hipertensi, kardiovaskuler, diabetes (Prendergast & Humphrey, 2014). Menurut De

Onis dan Branca (2016), gangguan pertumbuhan ini dimulai dari dalam kandungan dan berlanjut sampai usia 2 tahun pertama setelah dilahirkan. Upaya pemerintah dalam mencegah *stunting* melalui gerakan 1.000 hari pertama kehidupan yang merupakan jendela kritis dimana pertumbuhan linier yang paling cepat dan sensitif terhadap faktor lingkungan, nutrisi, infeksi dan perawatan psikososial (De Onis & Branca, 2016). Upaya intervensi tersebut diantaranya perbaikan gizi dan kesehatan ibu hamil, asi eksklusif selama 6 bulan, dan pemberian makanan pendamping asi setelah bayi berusia 6 bulan serta asi tetap diberikan sampai usia 2 tahun (Kementrian Kesehatan RI, 2016).

Studi epidemiologi menjelaskan bahwa defisiensi mikronutrien, infeksi berulang, menyusui yang tidak optimal, pemberian makanan pendamping yang tidak tepat, status gizi ibu, akses ke pelayanan kesehatan serta faktor lingkungan antara lain paparan terhadap pestisida merupakan penentu utama terjadinya *stunting* (Badham & Sweet, 2010; Martorell *et al.*, 2012; Black *et al.*, 2013). Salah satu pestisida yang biasa digunakan adalah rotenon. Berdasarkan hasil penelitian Primaditya *et al.*, (2017) dengan induksi rotenon konsentrasi 12,5 ppb yang dipaparkan pada 2 hours post fertilization (hpf) sampai 72 hpf (*pre hatching*) dapat menghasilkan model *stunting* pada larva zebrafish dengan tingkat kepercayaan sebesar 98%.

Rotenon sebagai *endocrine disrupting chemicals* (EDCs) yang mengganggu homeostasis hormon (Diamanti *et al.*, 2009) dengan mekanisme kerjanya menghambat respirasi kompleks 1 mitokondria sehingga menurunkan jumlah Adenosine Triphosphate (ATP) dan terjadinya peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS) (Radad *et al.*, 2006). Stres oksidatif adalah suatu keadaan jumlah radikal bebas melebihi jumlah antioksidan. Stres oksidatif disebabkan oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat menyebabkan kerusakan sel (Muthusami *et al.*, 2005). *Superoxide dismutase* (SOD) adalah enzim antioksidan

utama yang berperan dalam eliminasi stres oksidasi (Fuji *et al.*, 2005) dan mampu mencegah terbentuknya senyawa radikal bebas baru (Winarsi, 2014). Berdasarkan penelitian Aly *et al.*, (2014) menjelaskan bahwa anak yang mengalami *stunting* terjadi peningkatan stres oksidatif dan penurunan enzim antioksidan seperti *superoxide dismutase*, *catalase*, dan *glutathione*. Dalam studi tersebut ditemukan peningkatan konsentrasi *Malondialdehid* (MDA) pada anak *stunting*. Hal ini menunjukkan pertahanan antioksidan dalam tubuh terjadi penurunan sehingga terjadi peningkatan reaksi lipid peroksida. Oleh karena itu diperlukan penambahan nutrisi antioksidan dan suplemen makanan mikronutrien untuk memulihkan stres oksidatif.

Salah satu tanaman yang mengandung antioksidan adalah pegagan (*centella asiatica*). Pegagan mengandung makronutrien, mikronutrien dan fitonutrien utamanya adalah triterpenoid yang berperan sebagai antioksidan dan bekerja untuk menyeimbangkan oksidan dalam sel sehingga stres oksidatif dapat diturunkan (Chandrika & Kumarab, 2015). Pegagan sebagai antioksidan dimana salah satu mekanisme kerjanya adalah memiliki kemampuan aktivitas menangkap radikal bebas (*free radical scavenger activity*) (Sugunabai & Karpagam, 2015). Berdasarkan hasil penelitian Alaiya *et al.*, (2015) menunjukkan air perasan pegagan mampu menetralkan efek radikal bebas yang disebabkan oleh stres oksidatif pada tikus melalui peningkatan kadar SOD. Hal ini juga didukung dengan penelitian Alaiya *et al.*, (2014) yang melaporkan bahwa kandungan senyawa Triterpenoid berupa Asiaticosida mampu menangkai senyawa radikal bebas dengan melihat penurunan indikator kadar MDA dalam tubuh tikus yang mengalami stres oksidatif.

Menurut Sorribes *et al.*, (2013) usia larva zebrafish dapat dianalogikan dengan usia manusia yaitu 72 hours *post fertilization* (hpf) sama dengan bayi baru lahir dan 144 hpf sama dengan usia 2 tahun pada manusia. Berdasarkan penelitian

Cory'ah *et al* (2017), pegagan dapat meningkatkan ekspresi IGF-1 pada larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon. IGF-1 berperan penting dalam pertumbuhan linear sel somatik, jaringan, dan diferensiasi (Wood *et al.*, 2015). Pada penelitian sebelumnya dengan pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) konsentrasi 5 µg/ml yang diberikan pada usia 2 hours post fertilization (hpf) sampai 48 hpf (*pre hatching*) terbukti secara signifikan dapat meningkatkan panjang badan pada *stunting* larva *zebrafish* akibat induksi rotenon, namun penambahan panjang badan tersebut belum maksimal (Primaditya *et al.*, 2017). Mempertimbangkan hal tersebut maka pada penelitian ini pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) diperpanjang dari *pre hatching* (2 hpf – 48 hpf) sampai dengan *post hatching* (72 hpf – 144 hpf) yang mengacu pada program 1.000 hari pertama kehidupan dalam mengatasi masalah *stunting*.

Penelitian ini merupakan pohon penelitian yang mengembangkan teori dan keilmuan mengenai *stunting*. Penelitian sebelumnya telah dibuktikan oleh Ridlayanti (2016) mengenai proteksi pegagan sebagai pencegahan *stunting* khususnya terhadap perkembangan syaraf yaitu ekspresi BDNF serta mengurangi terjadinya kematian sel akibat stres oksidatif melalui ekspresi Hsp60 dan Bax oleh Wijayanti (2016). Penelitian mengenai *stunting* lainnya dengan mempelajari faktor pertumbuhan IGF-1 dan IRS (Cory'ah *et al.*, 2017); pencegahan *stunting* melalui mekanisme sel otot dan tulang seperti GLUT-4 dan *osteocalcin* (Primaditya *et al.*, 2017); GLUT-1 dan *osteocalcin* (Yuningsih *et al.*, 2017); osifikasi tulang dan osteoklastogenesis (Primihastuti *et al.*, 2017); OPG dan RANKL (Ariati *et al.*, 2017); proses vaskulogenesis dan angiogenesis dengan menilai ekspresi VEGF dan VEGFR (Wardani *et al.*, 2017); dan menilai ekspresi ERK ½ dan protein Ki-67 (Zakiah *et al.*, 2017).

Berdasarkan latar belakang di atas, maka peneliti tertarik untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pada masa *pre*

sampai *post hatching* terhadap panjang badan, kadar *superoksida dismutase* (SOD) serta *malondialdehid* (MDA) larva *zebrafish stunting* yang diinduksi rotenon.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah penelitian adalah : “Apakah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* dapat meningkatkan panjang badan, kadar *superoksida dismutase* dan menurunkan kadar *malondialdehid* larva *zebrafish stunting* yang diinduksi rotenon ?”

Sub masalah yang dapat dibuat berdasarkan rumusan masalah di atas yaitu :

1.2.1 Apakah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* dapat meningkatkan panjang badan larva *zebrafish stunting* diusia 144 *hours post fertilization* (hpf)/ 6 dpf ?

1.2.2 Apakah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* dapat meningkatkan kadar *superoksida dismutase* (SOD) larva *zebrafish stunting* diusia 144 hpf/ 6 dpf ?

1.2.3 Apakah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* dapat menurunkan kadar *malondialdehid* (MDA) larva *zebrafish stunting* diusia 144 hpf/ 6 dpf ?

1.2.4 Apakah terdapat hubungan antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* terhadap panjang badan, kadar SOD, dan kadar MDA larva *zebrafish stunting* ?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* dapat meningkatkan panjang badan, kadar *superoksida*

dismutase dan menurunkan kadar *malondialdehid* larva *zebrafish stunting* yang diinduksi rotenon.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* dapat meningkatkan panjang badan larva *zebrafish stunting* diusia 144 hpf/ 6 dpf.
2. Membuktikan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* dapat meningkatkan kadar *superoxide dismutase* (SOD) larva *zebrafish stunting* diusia 144 hpf/ 6 dpf.
3. Membuktikan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* dapat menurunkan kadar *malondialdehid* (MDA) larva *zebrafish stunting* 144 hpf/ 6 dpf.
4. Membuktikan ada hubungan antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* terhadap panjang badan, kadar SOD, dan kadar MDA larva *zebrafish stunting*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis.

1. Penelitian ini dapat menambah wawasan dan pemahaman tentang mekanisme terjadinya *stunting* akibat induksi rotenon melalui stres oksidatif.
2. Penelitian ini dapat menambah wawasan dan pemahaman tentang manfaat ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dalam mengatasi *stunting* akibat induksi rotenon.
3. Penelitian ini dapat digunakan sebagai bahan rujukan penelitian lain.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Hasil penelitian ini dapat digunakan oleh masyarakat untuk mengetahui pengaruh pestisida khususnya rotenon yang digunakan untuk menangkap ikan dan petani sayur yang memiliki dampak negatif terhadap kesehatan khususnya dalam pertumbuhan anak.

2. Dapat dijadikan sebagai acuan untuk pemanfaatan tanaman herbal pegagan (*Centella asiatica*) di layanan kesehatan terutama masalah pencegahan stunting.



BAB 2

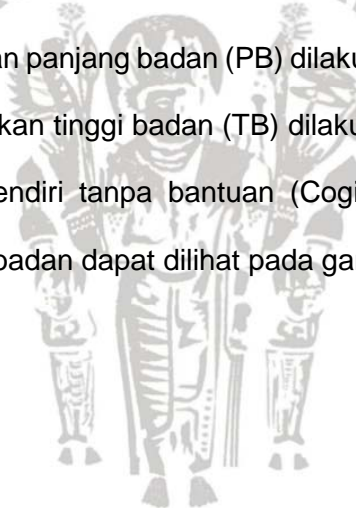
TINJAUAN PUSTAKA

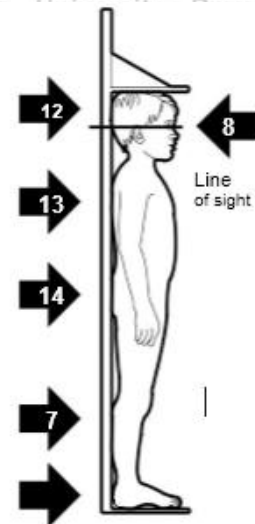
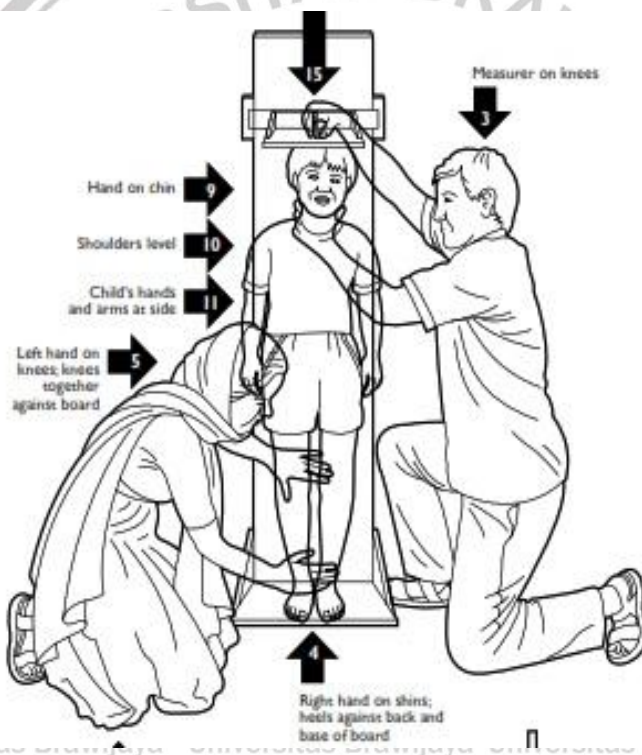
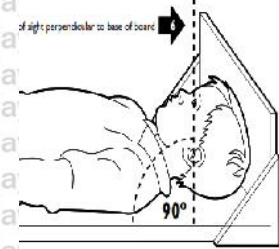
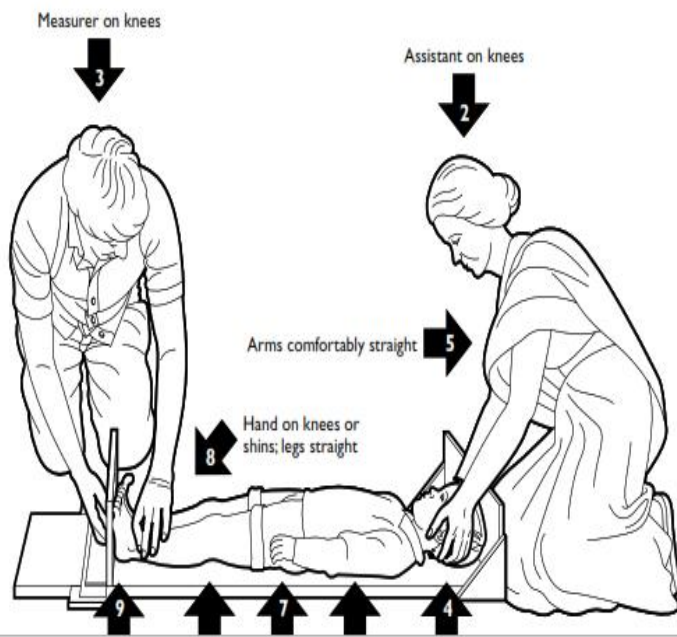
2.1 *Stunting*

2.1.1 Pengertian *Stunting*

Stunting adalah bentuk malnutrisi yang lazim terjadi pada anak balita dengan kriteria panjang badan/tinggi badan sesuai umur dengan nilai z-score kurang dari -2 standart deviasi (SD) (de Onis & Branca, 2016). *Stunting* diakibatkan pemberian makanan yang tidak sesuai dengan kebutuhan gizi dalam waktu yang lama dan dapat terjadi sejak dalam kandungan dan diketahui secara klinis pada usia 2 tahun (MCA Indonesia, 2010).

Pengukuran panjang badan (PB) dilakukan pada usia bayi sampai 24 bulan (2 tahun), sedangkan tinggi badan (TB) dilakukan pada anak usia > 2 tahun yang mampu berdiri sendiri tanpa bantuan (Cogill, 2003). Cara mengukur panjang badan dan tinggi badan dapat dilihat pada gambar 2.1

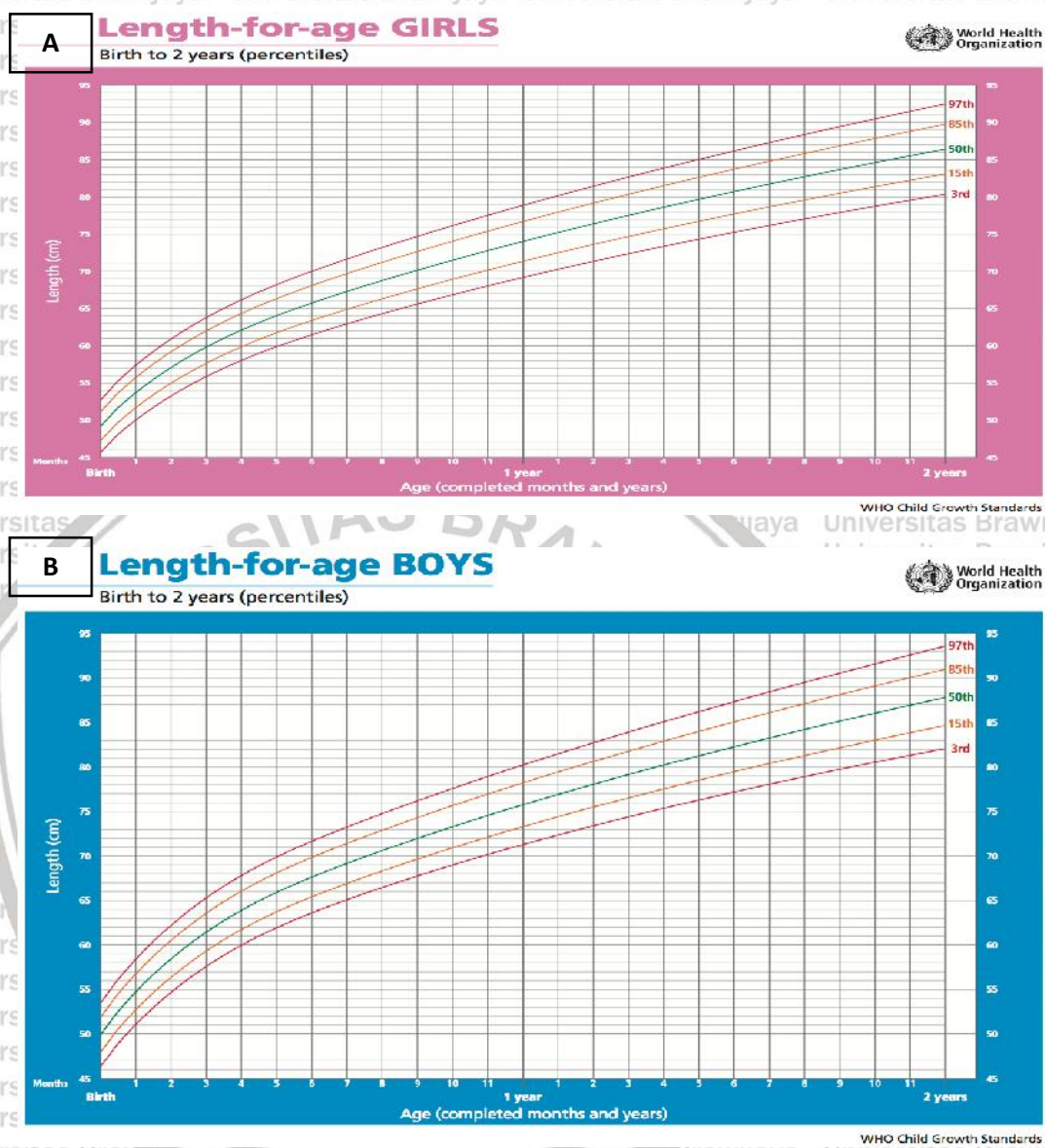




Gambar 2.1 Teknik pengukuran tinggi badan dan panjang badan (Cogil, 2003)
 (A) Pengukuran tinggi badan pada anak usia > 2 tahun.
 (B) Pengukuran panjang badan pada bayi sampai usia 2 tahun.

Hasil pengukuran panjang badan atau tinggi badan dimasukkan ke dalam grafik *length for age* berdasarkan standart WHO sesuai dengan umur dan jenis

kelamin. Grafik *length for age* menurut standart WHO sesuai jenis kelamin ditunjukkan pada gambar 2.2



Gambar 2.2 Grafik *length for age* menurut standart WHO (2006)
(A).Grafik *length for age* untuk anak perempuan, (B) Grafik *length for age* untuk anak laki-laki

2.1.2 Faktor Penyebab Stunting

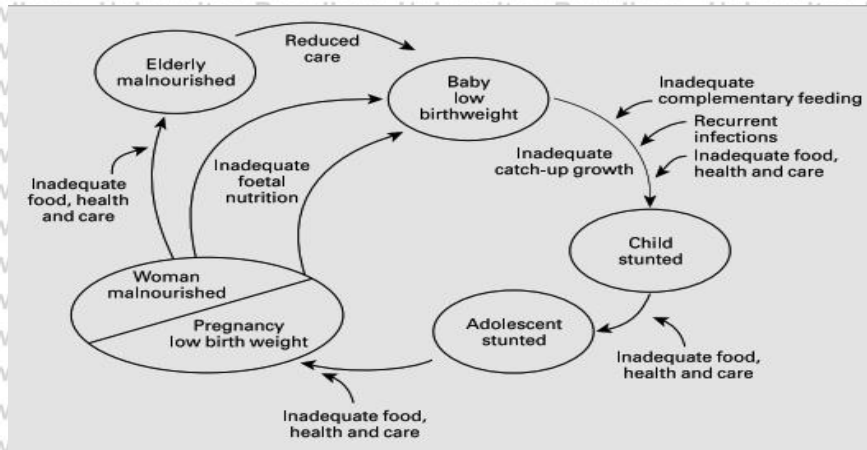
Faktor pertumbuhan dan perkembangan pada anak secara umum adalah genetik dan lingkungan. Faktor genetik merupakan modal dasar untuk mencapai pertumbuhan dan perkembangan anak yang baik. Sebuah studi yang memantau

kesehatan dan panjang badannya dari bayi baru lahir sampai berusia 21 bulan menunjukkan bahwa pertumbuhan merupakan fenomena periodik dengan pertumbuhan yang statis dan diselingi fase pertumbuhan yang cepat. Meskipun tinggi badan merupakan sifat yang diwariskan dari orang tua dengan lebih 200 gen yang diidentifikasi, namun hanya 10% dari gen yang diwariskan dapat menghasilkan tinggi yang optimal (Martorell *et al.*, 2012). Oleh karena itu faktor lingkungan sangat menentukan tercapai atau tidaknya potensi bawaan tersebut.

Adapun faktor lingkungan seperti status gizi ibu waktu hamil, pemberian asi dan makanan pendamping asi yang tidak tepat, sering terkena infeksi, akses ke pelayanan kesehatan dan lingkungan yang terpapar zat kimia/pestisida merupakan penentu terjadinya stunting (Badham & Sweet, 2010; Martorell *et al.*, 2012).

2.1.3 Mekanisme Stunting

Stunting terjadi dimulai dari fase konsepsi, antenatal, neonatus, usia 2 tahun, anak pra sekolah, pubertas hingga dewasa yang mengalami gangguan nutrisi, infeksi, paparan zat kimia sehingga mengganggu proses pertumbuhan dan perkembangan (Prendergast & Humphrey, 2014). Hasil penelitian di Amerika menunjukkan wanita hamil yang mengkonsumsi kalsium, suplemen besi, dan asam folat sejak hamil dapat menurunkan risiko premature dan BBLR (berat badan lahir rendah), jika bayi premature dan BBLR tidak mendapatkan gizi yang baik dapat menimbulkan terjadinya *stunting*. Balita stunting yang menjadi dewasa *stunting* memiliki potensi melahirkan anak yang *stunting* jika selama hamil mengalami kekurangan nutrisi (Branca & Ferrari, 2002). Proses ini dapat dilihat pada gambar 2.3



Gambar 2.3 Kekurangan nutrisi pada siklus kehidupan (Branca & Ferari, 2012)

Menurut Prendergast & Humphrey (2014) adanya kontaminasi makanan dengan aflatoxin yang dikonsumsi anak-anak usia 9 bulan sampai 5 tahun dapat menyebabkan terjadinya *stunting* dan adanya paparan arsenik saat hamil mengakibatkan terjadinya BBLR dan penurunan IGF-1. IGF-1 bekerja sebagai mediator *Growth Hormon* (GH) sehingga GH dan IGF-1 sangat berperan dalam pertumbuhan, metabolisme tulang, metabolisme energi jaringan perifer, sistem imun dan fungsi otot terutama pada bayi (Laron, 2001).

Mekanisme *stunting* dapat melalui inflamasi, dimana diketahui adanya inflamasi akan mempengaruhi pertumbuhan janin, BBLR dan *stunting* (Prendergast & Humphrey, 2014). Adanya peningkatan IL-6 sebagai mediator inflamasi kronis berpengaruh pada perkembangan tulang. IL-6 bertanggung jawab dalam menghambat mineralisasi tulang sehingga terjadinya gangguan pada pertumbuhan tulang dan terjadilah *stunting* (De Benetti *et al.*, 2006).

2.1.4 Manifestasi *Stunting* Jangka Pendek dan Panjang

Manifestasi jangka pendek *stunting* meliputi beberapa aspek seperti pertumbuhan/perkembangan, kesehatan, dan ekonomi. Efek pada pertumbuhan

dan perkembangan terjadi penurunan kemampuan kognitif dan motorik (Stewart *et al.*, 2013). Gangguan tersebut diakibatkan keterlambatan kematangan sel-sel syaraf di daerah cereblum yang merupakan pusat koordinasi gerak motorik (Dewey & Begum, 2011). Pada aspek kesehatan berhubungan dengan peningkatan mortalitas dan morbiditas, sedangkan pada aspek ekonomi yaitu peningkatan biaya perawatan kesehatan jika anak sakit (Stewart *et al.*, 2013).

Manifestasi jangka panjang *stunting* yang terlihat saat dewasa yaitu cacat kognitif sehingga terjadi penurunan intelektual, produktivitas ekonomi dan kinerja yang rendah, penyakit kardiovaskuler dan gangguan metabolik, meningkatnya risiko penyakit degenerative serta meningkatnya risiko terjadinya *stunting* pada generasi selanjutnya (Prendergast & Humphrey, 2014).

2.1.5 Penanganan *Stunting*

Menurut de onis (2013) penanganan *stunting* yang tepat dimulai sejak dalam kandungan hingga berusia 2 tahun, dimana kondisi ini anak mengalami pertumbuhan yang pesat. Upaya pemerintah untuk menangani masalah *stunting* dengan program 1.000 hari pertama kehidupan dengan melakukan kegiatan (MCA Indonesia, 2010) :

1. Kebutuhan zat gizi ibu hamil terpenuhi dengan makanan yang bergizi, mengontrol kesehatan kehamilannya, mengkonsumsi suplemen zat gizi.
2. Pemberian asi eksklusif sampai 6 bulan dan dilanjutkan dengan makanan pendamping asi saat bayi berusia 6 bulan dan asi tetap diteruskan sampai 2 tahun.
3. Pertumbuhan balita terpantau secara rutin diposyandu sehingga terdeteksi dengan cepat saat terjadi gangguan pertumbuhan

4. Mudah-mudahan mendapatkan akses air bersih dan fasilitas sanitasi serta kesadaran menjaga kebersihan lingkungan.

Adanya keseimbangan energi dan protein dalam kehamilan merupakan salah satu cara mencegah terjadinya *stunting*. Pemberian suplemen zat besi, vitamin A dan zink pada ibu hamil dapat meningkatkan panjang badan sampai 0,64 cm dibandingkan wanita hamil yang hanya mengkonsumsi vitamin A (Stewart *et al.*, 2013). Pemberian asi eksklusif sampai usia 6 bulan merupakan upaya pemenuhan gizi dan pembentukan sistem imun sehingga bayi tidak mudah terkena infeksi karena salah satu faktor penyebab *stunting* diakibatkan infeksi yang berulang (Black *et al.*, 2008).

Bayi berusia 6 bulan sampai 24 bulan mengalami pertumbuhan linear yang begitu cepat sehingga diperlukan pemenuhan nutrisi yang adekuat, kuantitas dan kualitas dari makanan pendamping asi yang mengandung gizi dan aman untuk kesehatan. Menurut Prendegast & Humphrey (2014) adanya defisiensi mikronutrien seperti zat besi, zink, iodium, vitamin A dan mikrinutrien lainnya dapat menyebabkan gangguan pada fungsi saraf dan kekebalan tubuh. Selain upaya yang disebutkan di atas, faktor risiko dapat dikurangi dengan peningkatan perilaku hidup bersih dan sehat (PHBS) dan pengendalian sanitasi lingkungan dapat mencegah infeksi serta kesadaran pengelolaan pangan yang bersih dan sehat (Kusumawati, 2015).

2.2 Rotenon

2.2.1 Rotenon dan Manfaatnya

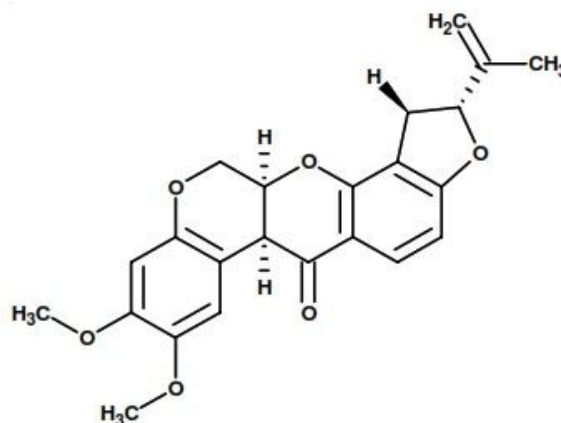
Rotenon adalah pestisida alami yang diekstrak dari akar tanaman tropis dan sub tropis berasal dari family *Leguminosae* dan berasal dari genus *Lonchocarpus* di Amerika dan *Derris* di Asia (Turner *et al.*, 2007). Rotenon

digunakan dalam pengendalian ikan, membunuh ikan yang tidak diinginkan dan membasmi gangguan pada ikan (Radad *et al.*, 2006). Rotenon juga dapat digunakan untuk insektisida, pestisida dan piscisida serta rotenon tidak stabil di kondisi alkali, cahaya, dan udara (Turner *et al.*, 2007).

2.2.2 Struktur Fisik dan karakteristik Kimia

Menurut Ling (2003) struktur fisik dan karakteristik kimia Rotenon sebagai berikut :

| | |
|------------------------|--|
| Nama Umum | : Rotenon |
| Nama Lain | : Tubatoxin; Cube |
| Nama Kimia | : (2R,6aS,12aS) 1,2,6,6a,12, 12 ahexahydro-2-isopropenyl-8, 9-dimethoxychromeno(3,4-b)furo(2,3-h))chrome-6-one |
| Rumus Empiris | : $C_{23}H_{22}O_6$ |
| Berat Molekul | : 394,43 g/mol |
| Kelarutan dalam air | : Sedikit larut dalam air 0,2 mg/L @ 20°C, 15 mg/L @ 100°C |
| Kelarutan dalam etanol | : 2 g/L @ 20°C |
| Titik Didih | : 220°C |
| Titik Cair | : 163°C |
| Tekanan Penguapan | : <1 mPa-20°C |
| Tipe Pestisida | : Botanical |
| Stabilitas | : Sensitif terhadap air dan cahaya |
| Gambaran Umum | : Berwarna putih atau Kristal kecoklatan |



Gambar 2.4 Struktur Molekul Rotenon (Ling, 2003)

2.2.3 Toksisitas

Toksisitas adalah kemampuan suatu senyawa kimia dalam menimbulkan kerusakan pada permukaan tubuh atau mengenai bagian dalam tubuh.

Environmental Protection Agency (EPA) (2007) mengklasifikasikan toksisitas rotenon menjadi kelas I dan kelas III (sangat toksik atau sedikit toksik). Pada konsentrasi tinggi rotenon dapat menyebabkan gangguan transport elektron pada mitokondria sehingga oksigenisasi terganggu yang mengakibatkan kematian sel sampai kematian organisme (Ott, 2006).

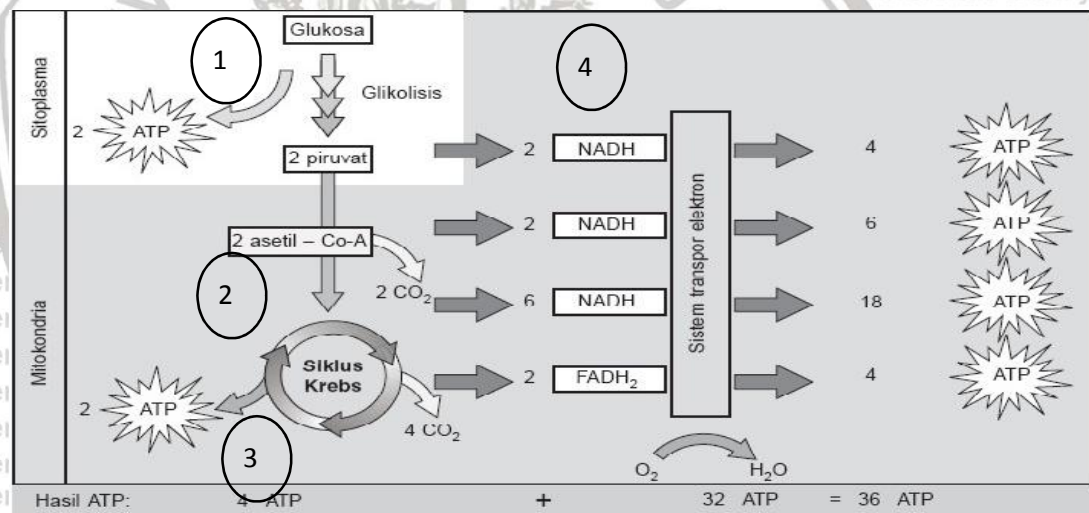
Toksisitas rotenon yang terlarut dalam air tergantung dari pH air, jumlah bahan organik, temperature, dan cahaya yang menembus air (Ott, 2006). Gejala toksisitas akut akibat rotenon adalah sakit kepala, mual, pusing, iritasi kulit dan muntah serta pada keracunan berat dapat menyebabkan kejang, tidak sadar hingga meninggal (Ling, 2003).

2.2.4 Mekanisme Kerja Rotenon

Rotenon merupakan *endocrine disrupting chemicals* (EDCs) yang mengganggu sekresi, sintesis, metabolisme, transport, pengikatan dan eliminasi

hormone dalam tubuh. (Utami *et al.*, 2013). Rotenon sangat lipofilik (larut dalam lemak) sehingga sangat mudah menembus membran sel melalui difusi pasif dan tidak memerlukan transporter (Khotimah *et al.*, 2015). Sifat lipofilik dari rotenon menyebabkan mudah rotenon terkumpul pada bagian subseluler seperti mitokondria.

Mitokondria merupakan organel pada sel yang memiliki fungsi dalam pengaturan aktivitas metabolisme sel, penghasil energi dalam bentuk *adenosine triphosphate* (ATP) dan respirasi sel (Kuhlbrandt *et al.*, 2015). Mitokondria sebagai penghasil ATP memiliki empat proses dalam pembentukannya yaitu glikolisis, dekarboksilasi oksidatif, siklus krebs (siklus asam sitrat) dan transport elektron (Murray *et al.*, 2003). Proses pembentukan ATP dapat dilihat pada gambar 2.5

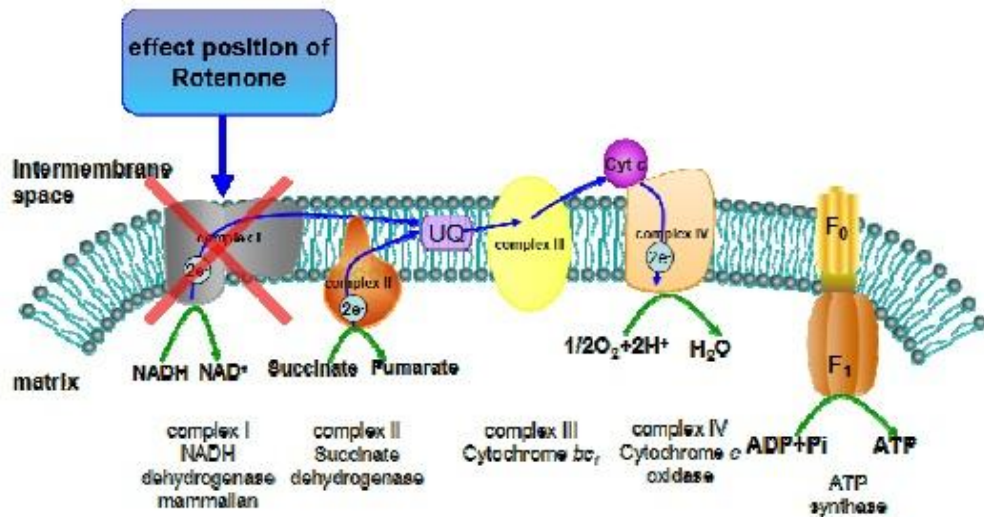


Sumber: Biology, Mader, S. S.

Gambar 2.5 Proses pembentukan ATP di mitokondria

1. Tahap glikolisis terjadi perubahan glukosa menjadi 2 piruvat dan menghasilkan 2 ATP, 2NADH, 2 asam piruvat dan proses ini terjadi di sitoplasma. 2. Tahap dekarboksilasi oksidatif terjadi di matriks mitokondria dengan merubah asam piruvat menjadi 2 asetil Ko-A, 2CO₂, 2NADH. 3. Siklus krebs mengubah asetil Ko-A menjadi 6NADH, 2FADH₂, 4 CO₂, dan proses ini terjadi di matriks mitokondria. 4. Transport elektron terjadi di membran plasma mengubah NADH dan FADH menjadi 32 ATP, 6H₂O (Murray *et al.*, 2003)

Rotenon memiliki mekanisme kerja dengan menghambat kompleks I pada mitokondria dengan cara inhibisi NADH sehingga terbentuk elektron bebas dan bereaksi dengan molekul oksigen. Hal ini akan menghasilkan radikal bebas seperti O_2^* (*superoxide*) yang kemudian akan membentuk H_2O_2 (*hydrogen peroxide*) sehingga produksi ROS akan meningkat dan penurunan produksi ATP. Adanya gangguan pada kompleks I mitokondria dapat berlanjut menghambat kompleks selanjutnya sehingga menyebabkan disfungsi mitokondria, kematian sel karena apoptosis (Li *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2016). Pada gambar 2.6 menunjukkan prinsip kerja rotenon dalam menghambat kompleks I mitokondria.



Gambar 2.6 Mekanisme Kerja Rotenon pada Mitokondria

Rotenon yang menghambat fosforilasi oksidatif pada kompleks I mitokondria (Xu *et al.*, 2016)

Hasil penelitian Khotimah *et al.* (2015) pada model *zebrafish* parkinson yang diinduksi rotenon menunjukkan penurunan aktifitas lokomotor *zebrafish* akibat disfungsi mitokondria. Adanya disfungsi mitokondria menyebabkan penurunan produksi ATP, peningkatan Ca^{2+} , terganggunya permeabilitas mitokondria dan peningkatan produksi ROS. Hal ini berakibat terjadinya autooksidasi dopamine atau enzim tirosin hidrokinase sehingga dopamine sebagai

neurotransmitter dalam motilitas akan menurun. Stres oksidatif akibat disfungsi mitokondria menyebabkan apoptosis pada neuron dopaminergik dan pelepasan protein caspase pada pasien Parkinson (Carriera *et al.*, 2014). Berdasarkan penelitian Pinho *et al.* (2013) menjelaskan rotenon dapat mengakibatkan kelainan denyut jantung (bradikardi) dan edema jantung. Hal ini dikarenakan adanya gangguan pada rantai respirasi di mitokondria sehingga terjadi kekurangan *ubiquinone* yang sering dimanifestasikan pada kardiovaskuler.

2.3 Radikal Bebas dan Antioksidan

2.3.1 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan suatu molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan di bagian luar orbitnya. Molekul ini bersifat labil dan sangat reaktif untuk merebut elektron dari molekul lain agar mendapatkan pasangan elektronnya (Astuti, 2012). Secara fisiologis sel akan menghasilkan radikal bebas akibat reaksi biokimia dalam kehidupan aerob. Semua organisme aerob dalam menghasilkan ATP memerlukan oksigen melalui fosforilasi oksidatif yang terjadi di mitokondria. Proses tersebut mereduksi O₂ menjadi H₂O dengan pengalihan 4 elektron. Pengalihan elektron kadang berjalan kurang sempurna sehingga terbentuklah radikal bebas yang dapat merusak sel jika tidak dihentikan (Suryohudoyo, 2007). Berdasarkan Winarsi (2011) terbentuknya radikal bebas melalui 3 tahapan yaitu sebagai berikut :

1. Tahapan inisiasi yaitu tahapan awal terbentuknya radikal bebas, Misalnya:



2. Tahapan propagansi yaitu perpanjangan rantai radikal, misalnya :



3. Tahapan terminasi, yaitu reaksi senyawa radikal dengan radikal lain atau dengan menangkap radikal sehingga terjadi perubahan potensi propagansi

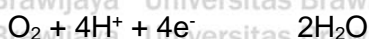


Radikal bebas dapat juga terbentuk dari senyawa yang bukan radikal bebas, tetapi mudah berubah menjadi radikal bebas seperti singlet oksigen (1O_2), hidrogen peroksida (H_2O_2), asam hipoklorat (HOCl) dan ozon (O_3) yang disebut *Reactive Oxygen Species* (ROS) atau senyawa oksigen reaktif (Musarofah, 2015).

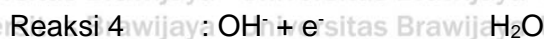
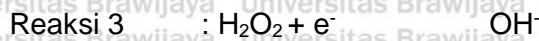
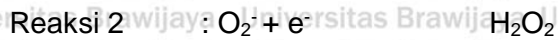
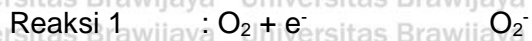
ROS adalah molekul yang terbentuk akibat reduksi oksigen yang tidak sempurna. ROS terdiri dari radikal bebas dan non radikal bebas. Senyawa oksidan non radikal kurang berbahaya dibandingkan reaktivitas senyawa radikal, karena reaktivitas senyawa radikal dapat mengakibatkan terbentuknya senyawa radikal baru. Senyawa radikal baru ini jika bertemu senyawa lain dapat menghasilkan senyawa radikal baru lagi dan seterusnya sehingga terbentuk reaksi berantai (*chain reaction*). Reaksi ini akan berhenti jika bertemu dengan antioksidan (Musarofah, 2015).

Secara fisiologis terbentuknya ROS di dalam tubuh akibat reaksi rantai respirasi pada mitokondria karena menggunakan oksigen sebagai bahan utamanya. Dalam kondisi normal pada metabolisme sel akan mengubah oksigen menjadi H_2O sekitar 95% tanpa membentuk radikal bebas. Berikut proses reduksi

O_2 menjadi H_2O :



Di dalam mitokondria oksigen akan menjadi air melalui 4 tahapan reaksi elektron yaitu:



Hasil pada reaksi tersebut akan menghasilkan dua radikal bebas yaitu O_2^- dan OH^- , serta hidrogen peroksida (H_2O_2) adalah senyawa reaktif namun bukan oksidan yang kuat (Rodrigo, 2009).

Radikal bebas akan berbahaya bagi tubuh jika konsentrasinya tinggi sehingga menyebabkan kerusakan sel. Konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan sistem pertahanan endogen tidak sanggup menetralkannya sehingga terjadi stres oksidatif. Adanya radikal bebas yang tinggi dalam tubuh dapat menimbulkan berbagai penyakit seperti gangguan *neurodegenerative* (Parkinson, Alzheimer, sklerosis), penyakit kardiovaskuler (penyakit jantung, hipertensi), gangguan paru, penyakit penuaan, penyakit autoimun, diabetes, penyakit hati, tumor dan kanker (Musarofah, 2015).

Timbulnya penyakit tersebut diakibatkan karena ROS merupakan mediator dari kerusakan struktur sel, termasuk membrane protein, DNA dan lipid. Reaksi radikal hidroksil pada lemak tidak jenuh akan membuat golongan radikal yang merusak sel dengan cepat. Reaksi radikal dengan protein dapat menimbulkan reaksi oksidasi rantai asam amino dan denaturasi pada protein sekitar. Adanya oksidasi DNA dapat menimbulkan untai DNA terputus dan menghasilkan basa yang teroksidasi (Alessio, 2006; Oliveira, 2010).

2.3.2 Antioksidan

2.3.2.1 Definisi Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat melindungi sel dari reaktifitas radikal bebas oksigen reaktif (ROS) dengan cara memberikan elektron pada senyawa oksidan (pengikatan oksigen dan pelepasan hidrogen (Winarsi, 2014; Musarofah, 2015).

2.3.2.2 Macam – macam Antioksidan

1. Antioksidan Primer (*Antioksidant Endogenous*)

Antioksidan Primer sering disebut juga dengan antioksidan enzimatis yang berfungsi untuk mencegah terbentuknya radikal bebas baru dengan cara mengubah radikal bebas menjadi molekul yang kurang reaktif. Adapun yang termasuk antioksidan primer adalah enzim *superoksida dismutase* (SOD), katalase, dan glutation peroksida (GSH-Px). Mekanisme kerja enzim ini dengan memutus reaksi berantai (polimerasi) dan mengubahnya menjadi molekul yang lebih stabil. Aktifitas enzim ini dipengaruhi oleh mineral seperti seng (Zn), tembaga (Cu), mangan (Mn) yang terkandung dalam makanan dan minuman (Musarofah, 2015).

Tabel 2.1 Macam – macam Enzim Antioksidan (Rodrigo, 2009)

| Enzim Antioksidan | Nama Kimia | Penangkap Agen Oksidan | Karakteristik |
|-------------------|-----------------------|------------------------|---|
| SOD | Superoksida dismutase | O_2^- | Mengurangi senyawa reaktif (H_2O_2) dan mengkatalisis O_2^- menjadi O_2 |
| GSH-PX | Glutation peroksidase | H_2O_2 | Mengkatalisis molekul oksigen dan H_2O_2 menjadi air |
| CAT | Katalase | H_2O_2 | Mengkatalisis molekul oksigen dan H_2O_2 menjadi air |

Superoksida dismutase (SOD) merupakan enzim antioksidan pertama pada pertahanan tubuh terhadap ROS yang bekerja untuk mengkatalisis radikal superoksida menjadi oksigen dan hidrogen peroksida. Radikal superoksida dapat mengalami dismutase spontan walaupun tanpa adanya SOD yang akan mengubah menjadi H_2O_2 , namun kecepatan dismutase akan lebih cepat 1000 kali dengan SOD dibandingkan dismutase spontan (Widiyanti, 2014).

2. Antioksidan Sekunder (*Antioksidant Eksogenous*)

Antioksidan sekunder sering disebut juga antioksidan non enzimatis yang berfungsi mencegah terjadi reaksi berantai dan menangkap radikal bebas sehingga tidak menimbulkan kerusakan yang besar. Antioksidan sekunder termasuk dalam pertahanan preventif dengan komponen nutrisi dan non nutrisi. Antioksidan sekunder meliputi brtakaroten, vitamin C, vitamin E, flavon, katekin, asam lipoat, flavonoid, isoflavon, antosianin dan isokatekin yang diperoleh dari buah-buahan dan sayuran (Musarofah, 2015).

3. Antioksidan Tersier

Antioksidan tersier adalah senyawa yang memiliki kemampuan memperbaiki sel dan jaringan yang telah rusak akibat serangan radikal bebas seperti perubahan radikal lipid menjadi bentuk yang lebih stabil. Mekanisme kerja enzim ini dengan mencegah terjadinya reaksi autooksidasi minyak dan lemak. Penambahan antioksidan tersier akan mencegah reaksi oksidasi pada tahapan inisiasi dan propagansi.



Radikal lipid

Propagansi : $ROO^* + AH \rightarrow ROOH + A^*$

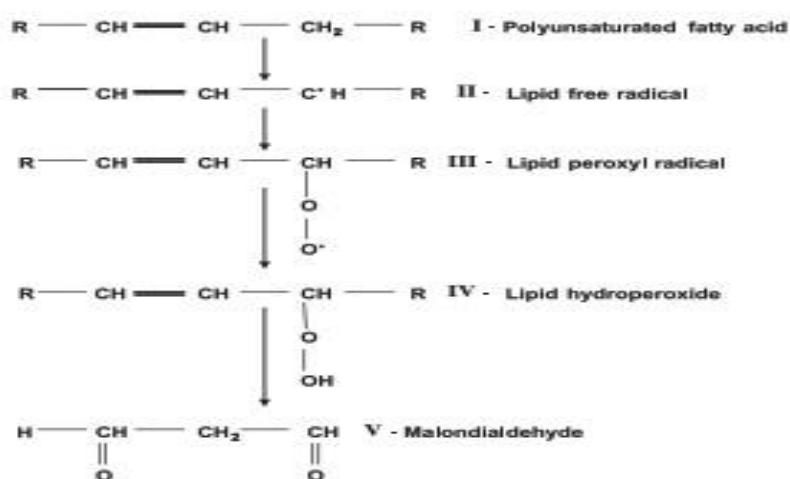
Reaksi penghambat antioksidan primer terhadap radikal lipid

Terbentuknya radikal antioksidan (A^*) pada reaksi tersebut bersifat lebih stabil dan tidak mampu bereaksi dengan molekul lipid lain sehingga tidak terbentuk radikal lipid baru (Musarofah, 2015).

2.4 Peroksida Lipid dan MDA

Peroksida lipid merupakan reaksi secara berantai dan terjadi selama stres oksidatif sehingga akan terbentuk senyawa aktif seperti *propanedial* dan *4-hydroxynonenal* (HNE) yang dapat mengakibatkan kerusakan sel. Peroksida lipid terjadi pada setiap spesies kimia yang mampu mengambil atom hidrogen dari asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) yang terdapat pada membran sel. Peroksida lipid dari asam lemak tidak jenuh ganda akan mudah terurai dan membentuk senyawa kompleks seperti *malondialdehid* (MDA) (Singh *et al.*, 2014).

Malondialdehid (MDA) merupakan senyawa dengan tiga karbon, aldehid yang dihasilkan oleh mekanisme berbeda dengan berat molekul rendah. Proses pembentukan MDA ditunjukkan pada gambar 2.7



Gambar 2.7. Skema pembentukan MDA melalui asam lemak tak jenuh ganda (Grotto *et al.*, 2009)

2.5 Pegagan (*Centella Asiatica*)

2.5.1 Klasifikasi pegagan

Pegagan (*Centella asiatica*) atau Gotu Kola merupakan tanaman di daerah tropis dan subtropis . Tanaman ini salah satu tumbuhan herbal yang digunakan dalam pengobatan tradisional. Pegagan tumbuh di Indonesia pada daerah tropis, di dataran rendah (ketinggian 2500m di atas permukaan laut) serta tempat yang lembab dan subur seperti tepi parit, tegalan padang rumput dan bebatuan (BPOM RI, 2009). Sekarang ini pemanfaatan pegagan di bidang farmakologi berkembang dengan pesat (Damaiyani.J & Metusala.D, 2011).

Berdasarkan Jahan *et al.*, (2011) pegagan (*centella asiatica*) diklasifikasikan sebagai berikut :

- Kingdom : Eukaryota
- Subkingdom : Embryophyta
- Devisi : Spermatophyta
- Subdevisi : Angiospermae
- Kelas : Dicotyledoneae
- Subkelas : Rosidae
- Superorder : Aralianae
- Order : Arariales (Umbelliflorae)

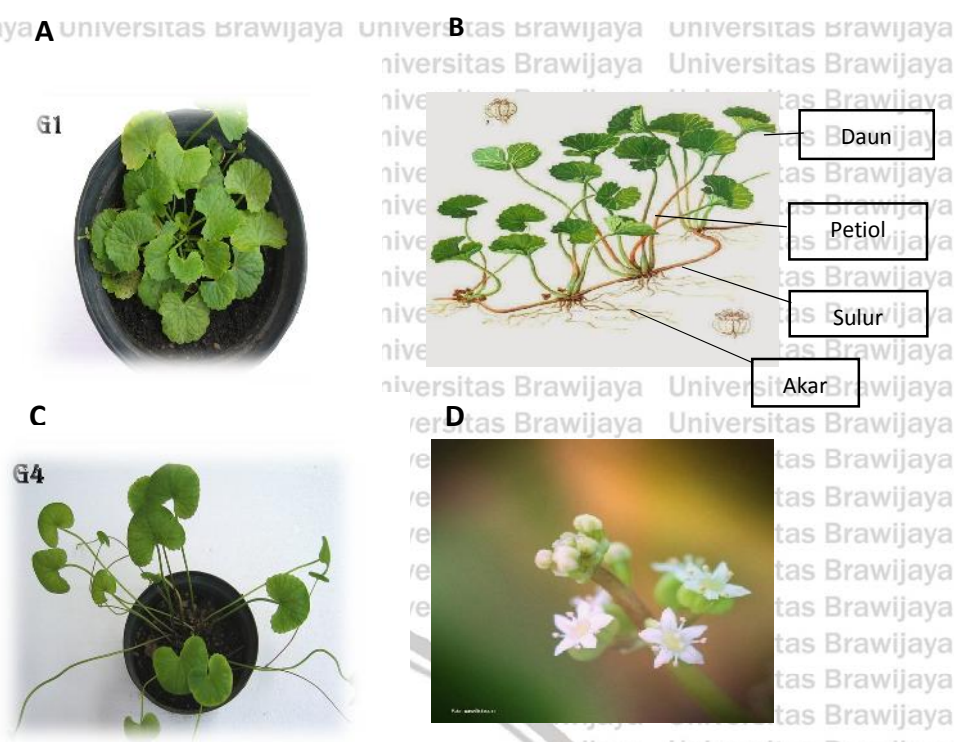
| | |
|-----------|----------------------------|
| Family | : Apiaceae or umbelliferae |
| Subfamily | : Hydrocittle |
| Genus | : Centella |
| Spesies | : Centella asiatica |

2.5.2 Morfologi Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan (*centella asiatica*) dengan tinggi tanaman sekitar 5,39 cm- 13,3 cm, bentuk batang beruas dan lunak sera menjalar hingga 1 meter. Setiap ruas tumbuh akar dan daun dengan panjang tangkai 5-15 cm serta akar yang berwarna putih. Akar berbentuk rimpang dengan banyak stolon dan berkelompok dan merayap hingga dapat menutupi tanah. Daun berwarna hijau dan bentuk daun bulat seperti ginjal pada manusia, bundar dengan garis tengah 1-7 cm dan lebar serta pada tepi daun bergerigi. Pada permukaan daun dan bagian punggung licin.

Jumlah daun pada tanaman induk 5-8 helai sedangkan pada anaknya berjumlah 2-5 helai.

Bunga pegagan berbentuk bunga majemuk dengan ukuran yang sangat kecil. Bentuk bunga cukung, bundar lonjong dan meruncing pada bagian ujung. Kelopak bunga tidak bercuping dan jumlah bunya pada umumnya terdiri 3-5 buah. Buah pegagan berukuran kecil berbentuk lonjong atau pipih, panjang buah 2-2,5 mm dan lebar 7 mm, baunya wangi, menggantung, kulitnya keras, berlekuk dua, berusuk jelas, berwarna kuning kecoklatan dan rasa yang pahit (BPOM RI, 2010; Chandrika & Kumarab, 2015).



Gambar 2.8 Tanaman pegagan (*Centella asiatica*)
 A. Morfotipe pegagan (*Centella asiatica*) ; B. Tanaman pegagan beserta bagian-bagiannya; C. Daun dan batang; D. Bunga pegagan (Chandrika & Kumarab, 2015).

2.5.3 Kandungan Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan mengandung beberapa fitokimia yang bermanfaat seperti triterpeneoid, karatenoid, glikosida, flavonoid, alkaloid dan minyak atsiri (Chandrika & Kumarab, 2015). Komponen utama dan terpenting dari pegagan adalah triterpene saponin. Kualitas triterpeneoid dipengaruhi oleh lokasi dan lingkungan dimana pegagan tersebut tumbuh (James & Dubery, 2009). Zat aktif triterpene saponin dalam pegagan ditunjukkan pada tabel 2.2 berikut ini :

Tabel 2.2 Kandungan Triterpene dari *Centella Asiatica* (Hashim et al., 2011)

| Jenis Triterpene | Waktu Retensi (min) | Konsentrasi treiterpene dalam ekstrak <i>Centella asiatica</i> (mg/mL) |
|------------------|---------------------|--|
| Madecassoside | 6,313 | 3,10 ± 4,58 |
| Asiaticoside | 7,997 | 1,97 ± 2,65 |
| Asam Madecassic | 12,199 | 0,55 ± 2,99 |
| Asam Asiatica | 13,573 | 0,55 ± 0,89 |

Centella asiatica mengandung makronutrien, mikronutrien, protein dan vitamin seperti tiamin, karoten, dan asam askorbat. Komposisi zat gizi dalam *centella asiatica* sebagai berikut :

Tabel 2.3 Kandungan Zat Gizi Pegagan (*Centella asiatica*) per 100 gram (Hashim *et al.*, 2011; Joshi & Chaturvedi, 2013)

| Kandungan Zat Gizi | Jumlah |
|---------------------------|---------|
| Kalori | 37kcal |
| Makronutrien | |
| Karbohidrat | 6,7 % |
| Protein | 2 % |
| Air | 87,7 % |
| Serat | 1,6 % |
| Lemak | 0,2% |
| Mineral | |
| Kalium | 391 mg |
| Kalsium | 171 mg |
| Natrium | 21 mg |
| Phosphor | 32 mg |
| Magnesium | 87 mg |
| Sodium | 5,6 mg |
| Zat besi | 5,6 mg |
| Vitamin | |
| - Carotein | 3,9 mg |
| Vitamin C (Asam ascorbic) | 48,5 mg |
| Vitamin A | 0,44 mg |
| Vitamin B1 (Thiamin) | 0,09 mg |
| Vitamin B2 (Riboflavin) | 0,19 |
| Vitamin B3 (Niasin) | 0,1 mg |

2.5.4 Manfaat Pegagan (*Centella asiatica*)

Beberapa manfaat pegagan (*centella asiatica*) bagi kesehatan tubuh yaitu:

1. Antioksidan

Terbentuknya radikal bebas dapat dikarenakan paparan bahan toksik.

Sistem antioksidan pada organisme aerobik berfungsi melindungi sel dari kerusakan oksidatif oleh oksigen akibat metabolisme oksigen (Pitella *et al.*, 2009). Pegagan (*centella asiatica*) mengandung triterpen yang tinggi

sehingga dapat sebagai antioksidan dan penyembuh luka (Rahman *et al.*,

2013). Aktivitas antioksidan pegagan (*centella asiatica*) sebesar 84% dibandingkan vitamin C (88%) dan pada ekstrak biji anggur (83%). Selain triterpenoid, flavonoid yang terkandung dalam pegagan (*centella asiatica*) juga berperan sebagai antioksidan penting (Chandrika & Kumarab, 2015). Antioksidan pada pegagan (*centella asiatica*) bekerja dengan cara aktivitas radikal bebas superoksida (84,4%), aktivitas scavenging radikal bebas (92,7%), dan menghambat peroksidasi asam linoleat (98,2%) (Vimala *et al.*, 2003; Sugunabai & Karpagam, 2015).

2. Anti Inflamasi

Penelitian yang dilakukan Li *et al.* (2009) dengan pemberian madekasosida dengan dosis 3,0 dan 30 mg/kg/BB pada mencit yang telah diinduksi kolagen sapi. Hasil penelitian tersebut menunjukkan hasil efek anti inflamasi yaitu dengan terhambatnya proliferasi sel limfosit, mengurangi produksi prostaglandin dan ekspresi enzim siklooksigenase yang berperan dalam proses inflamasi, penurunan interleukin (IL) 6 dan *tumor necrosis factor* (TNF- α) serta ukuran sel lebih kecil dibandingkan jaringan yang tidak mendapatkan madekasosida.

3. Kardioprotektif

Senyawa aktif yang berperan sebagai kardioprotektif adalah asiaticoside dan asam arjunolat. Senyawa aktif tersebut dapat mengurangi kadar enzim glutamate piruvat transaminase, glutamat oksaloasetat transaminase, laktat dehidrogenase dan keratin posfokinase. Enzim-enzim inilah sebagai *marker diagnostic* dari disfungsi jantung (Gnanapragasam *et al.*, 2004).

4. Neuroprotektif

Berdasarkan penelitian Xu, L *et al.* (2013) dengan pemberian maecacoside dari pagagan (*centella asiatica*) pada tikus yang diinduksi MPTP sehingga mengalami disfungsi lokomotor dapat meningkatkan dopamine pada

striatum, penurunan *malonedialdehida* (MDA) peningkatan GSH dan BDNF. Selain efek antioksidan *centella asiatica* memiliki peranan untuk melindungi neuron dopaminergik melalui peningkatan neurotropin seperti BDNF. Ekstrak daun *centella asiatica* menunjukkan neuroproteksi melalui jalur BDNF yang berkontribusi besar untuk melindungi neuron dopamine dan konservasi dopamine (Khotimah *et al.*, 2015). Uji efektifitas ekstrak *centella asiatica* menunjukkan dapat memperbaiki aktivitas lokomotor dan meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase pada *zebrafish* yang telah dipapar rotenon. Rotenon secara selektif merusak neuron dopaminergik yang dapat mengakibatkan penyakit Parkinson (Hanum *et al.*, 2016).

5. Manfaat lain dari *centella asiatica* adalah anticemas, penyakit vaskuler, anti diabetes, anti protozoa dan mengurangi retardasi mental (Jamil *et al.*, 2007). Kegunaan lain dari *centella asiatica* sebagai anti-ageing, anti jerawat, anti selulit, mengurangi stretch marks dan mencegah kulit kemerahan serta iritasi (Jamer *et al.*, 2009).

2.6 *Zebrafish* (*Danio rerio*)

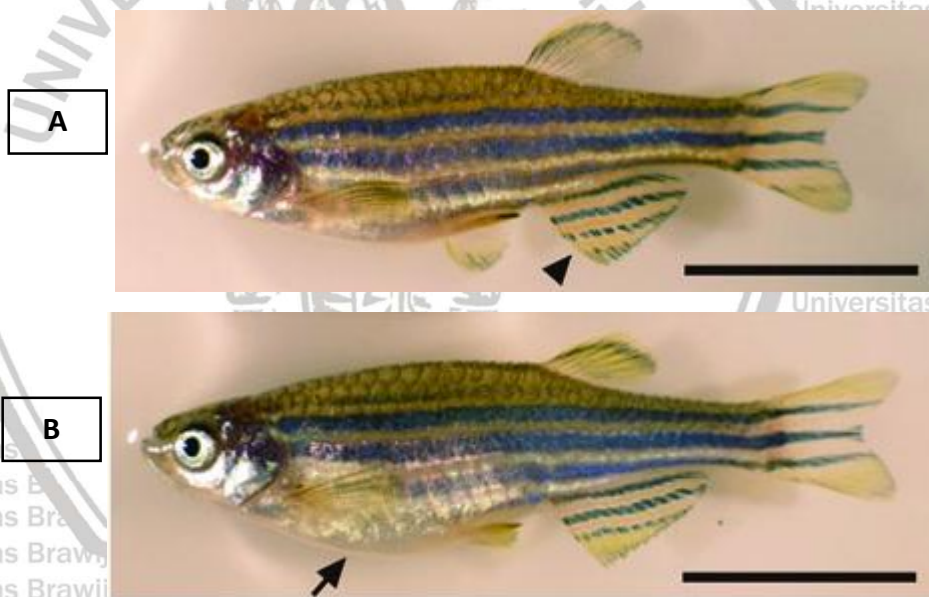
2.6.1 Karakteristik *Zebrafish*

Zebrafish adalah ikan di air tawar yang berasal dari sungai India dan Nepal. Penyebaran *zebrafish* sampai ke daerah Asia Tenggara dan Amerika (Spance, 2008). Klasifikasi *zebrafish* diperlihatkan pada tabel 2.4

Tabel 2.4 Klasifikasi *Zebrafish* (*Danio rerio*) (Richard, 2011)

| Taksonomi | Nama |
|-----------|-------------------|
| Kingdom | Animal |
| Filum | Chordota |
| Kelas | Actynoptergii |
| Ordo | Cypriniformes |
| Family | Cyprinidae |
| Subfamily | Rasborine |
| Genus | Brachydanio |
| Spesies | Brachydanio rerio |

Zebrafish hidup secara berkelompok dengan rentang hidup antara 2-3 tahun bahkan ada yang sampai 5 tahun dalam perawatan dan pemeliharaan yang baik. *Zebrafish* dewasa pada saat berusia 90 dpf dengan rata-rata panjang badan 2 – 3 cm sedangkan pada usia 2 -3 tahun panjang badan mencapai 4-5 cm (Richard, 2011). Pada *zebrafish* dewasa memiliki garis-garis putih dan hitam/biru yang horizontal mulai dari sirip sampai ekor (*caudal fin*) sehingga tampak seperti zebra. Terdapat perbedaan bentuk tubuh *zebrafish* jantan dan betina, pada jantan memiliki bentuk tubuh yang memanjang dengan garis-garis warna biru dan emas terutama pada sirip dubur jantan. *Zebrafish* betina memiliki tubuh yang lebih besar (perut lebih besar), bagian perut berwarna putih, dan terdapat garis-garis perak pada sisi tubuh (Aoyama *et al.*, 2015).



Gambar 2.9 Perbedaan *Zebrafish* Jantan dan Betina (Aoyama *et al.*, 2015).
 A. *Zebrafish* jantan
 B. *Zebrafish* betina

2.6.2 Perkembangan *Zebrafish*

Zebrafish berkembang biak dengan bertelur, ikan betina mampu menghasilkan telur rata-rata 2-3 hari sebanyak 200 telur. *Zebrafish* memiliki siklus gelap terang (10:14) dalam berkembang biak (Sharif, 2014). Proses pembuahan


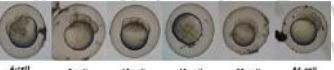

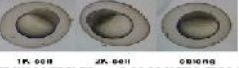
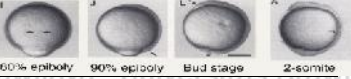
telur terjadi di luar tubuh sehingga tergantung kemampuan ikan jantan untuk membuahnya (Richard, 2011). Perkembangan *zebrafish* dari telur sampai embriogenesis melalui tahapan pembelahan sel (*cleavage*), blastula, gastrula, segmentasi pharingula dan periode menetas (*hatching*). Dikatakan embrio *zebrafish* yaitu sejak berbentuk telur sampai menetas (*hatching*) pada usia 72 hpf (Kimmel *et al.*, 1995).



Post embryonic development adalah periode pertumbuhan dan perkembangan dari bentuk tubuh serta morfogenesis menuju *zebrafish* dewasa setelah embriogenesis. Pertumbuhan dan perkembangan ini diawali dari larva.

Larva adalah fase dimana *zebrafish* diantara embrio dan *juvenile*, sedangkan *juvenile* adalah usia 4 minggu post fertilisasi sampai 6-12 minggu post fertilisasi.

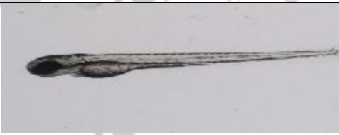
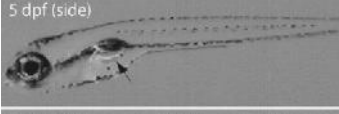
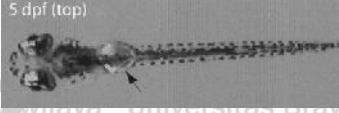

Pada periode ini karakteristik sama dengan dewasa yaitu lipatan pada sirip larva sudah menghilang namun maturitas seksual belum terjadi. *Zebrafish* dewasa adalah ikan yang sudah mampu memproduksi gamet dan telah menunjukkan karakteristik seksual sekunder saat kawin (Parichy, 2011). Tahapan perkembangan *zebrafish* ditunjukkan pada tabel 2.5 sebagai berikut :


Tabel 2.5 Perkembangan *Zebrafish* (Kimmel *et al.*, 1995)

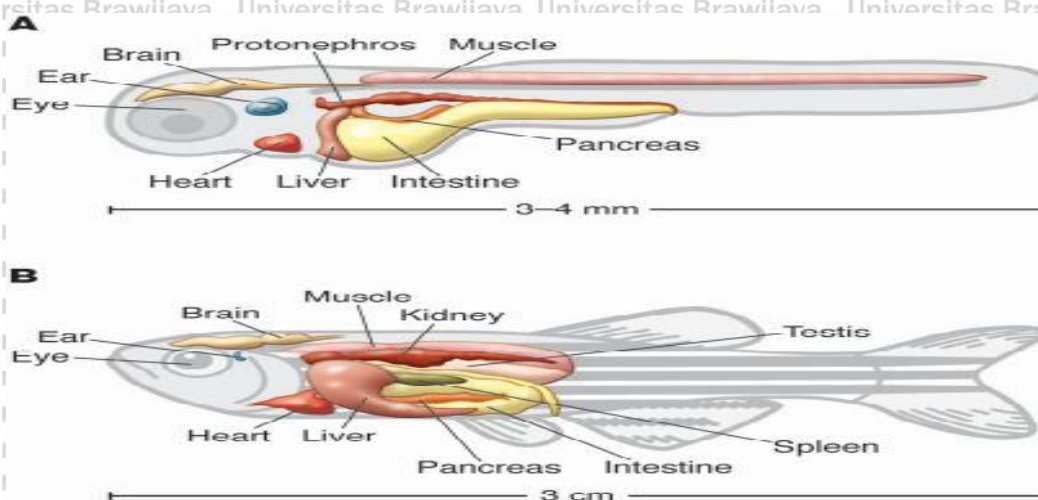
| Periode | Usia | Panjang Badan | Keterangan | Gambar |
|--------------------------------|---------|---------------|---|--|
| Zigot | 0 hpf | | Telur yang dibuahi dan akan segera menyelesaikan siklus zygote yang pertama |  |
| Pembelahan (<i>Cleavage</i>) | 3/4 hpf | | Terjadi pembelahan 2 sel hingga 7 sel dengan cepat dan serempak |  |
| Blastula | 2 ¼ hpf | | Fase cepat, siklus pembelahan sel <i>matasinkronous</i> (8,9), epiboly mulai terbentuk dan berubahnya blastokist menjadi blastoderm |   |
| Gastrula | 5 ¼ hpf | | Sudah terbentuknya epiboly dengan |  |

| | | | | |
|------------|--------|--------------|--|---|
| | | | sempurna. Terbentuk primary germ cell, embrionik axis dan tail bud | |
| Segmantasi | 10 hpf | 0,9 - 1,6 mm | Terbentuk lengkungan faring promordia, perkembangan neuron, terjadi tahap organogenesis serta adanya gerakan awal pada bagian ekor |   |
| Faringula | 24 hpf | 1,9 - 2,9 mm | Tahap <i>phylotipic</i> embrio, sumbu tubuh lurus dari lengkung yolk sack, sudah terbentuk sirkulasi dan sirip |  |
| Hatching | 48 hpf | 3,1 - 3,5 mm | Sistem organ terbentuk sempurna, sirip pectoral dan kartilago kepala terjadi perkembangan dalam persiapan penetasan |  <p>48-hour</p> |

Fase Early Larva

| | | | | |
|------------|--------|------------|---|---|
| Larva Muda | 3 dpf | 3,5 mm | Embrio keluar dari korion, dapat berenang aktif, mampu bergerak menjauh jika disentuh |  |
| | 5 dpf | 3,9 mm | Sudah memiliki 6 gigi dan aktif makan |   |
| | 7 dpf | 4,5 mm | Sudah memiliki 8 gigi dan tulang rawan di belakang sudah tumbuh |  |
| Mild Larva | 14 dpf | 6,2 mm | Sudah memiliki 10 gigi, neuron dan syaraf terbentuk sempurna | |
| | 21 dpf | 7-7,78 mm | Tulang faringeal dorsal dan tunas sirip anal terbentuk | |
| Juvenile | 30 dpf | 9-10 mm | Sudah memiliki 12 gigi, terdapat pigmentasi dan garis-garis pada tubuh | |
| | 45 dpf | 12,5-14 mm | | |

| | | | | |
|-------|----------|------------|---|---|
| Adult | 90 dpf | 2 cm | Sudah terdapat maturasi seksual dan siap bereproduksi |  |
| | 1000 dpf | 4 – 4,5 cm | Mulai terdapat kematian | |



Gambar 2.10 Larva dan dewasa zebrafish (Santoriello et al., 2012)

(A) Larva zebrafish pada usia 3-5 dpf beserta panjang badan dan organ. (B) Ikan zebrafish beserta organ dan panjang badan

Menurut Sorribes *et al.*, (2013) usia pada zebrafish dapat dianalogikan pada usia manusia berdasarkan ontogeni siklus bangun tidur. Usia 3 dpf, 6 dpf, dan 9 dpf analog dengan usia bayi baru lahir, 2 tahun, dan 8 tahun pada manusia.

2.6.3 Zebrafish sebagai Model Penelitian

Zebrafish (*Denio rerio*) merupakan ikan vertebrata kecil yang disukai menjadi hewan model dalam penelitian. Penelitian yang mempelajari toksikologi, proses pertumbuhan dan perkembangan serta penyakit yang terdapat pada manusia. Adapun alasan zebrafish digunakan sebagai hewan coba adalah :

1. Memiliki kesamaan genetik dengan manusia dimana sekitar 70% gen penyakit manusia homolog dengan zebrafish (Santoriello *et al.*, 2012).

Berdasarkan penelitian Barbazuk *et al.* (2000), hasil analisa dari *Expressed Sequence Tags* (ESTs) 80% gen antara manusia dan zebrafish saling berhubungan dan 56% gen memiliki segmen yang homolog.

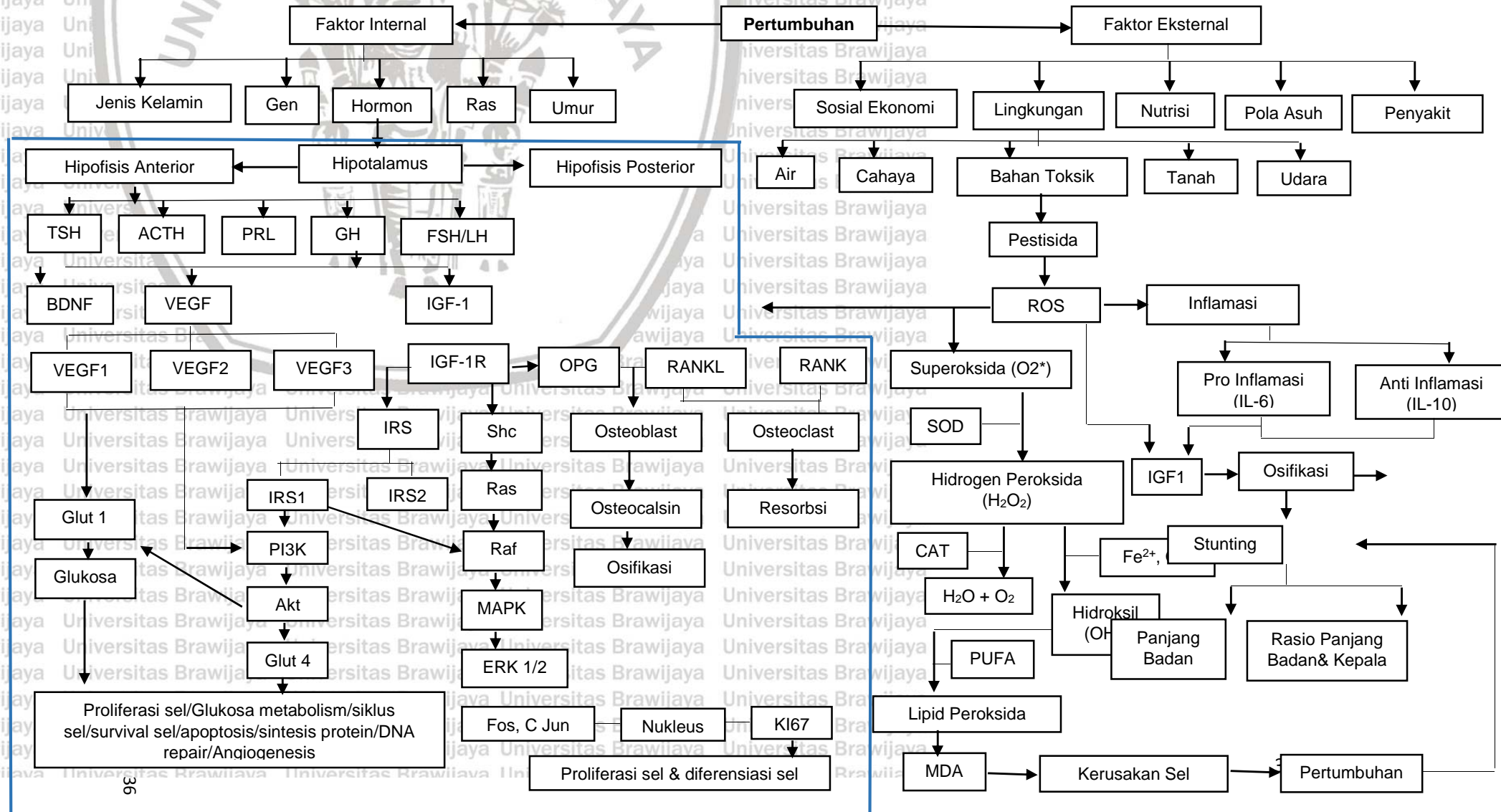
2. Memiliki ukuran yang kecil sehingga mudah dalam pemeliharaan dan perawatan dalam jumlah yang besar serta memerlukan biaya yang murah dalam perawatannya.
3. Kemampuan *zebrafish* dalam berkembang biak yang tinggi dan dapat menghasilkan telur sebanyak 200 – 300 perminggu (Richard, 2011).
4. Proses embryogenesis yang cepat dan transparan pada usia embrio sampai dewasa awal sehingga perkembangan *zebrafish* mudah diamati.
5. Genom pada *zebrafish* mudah dimanipulasi karena fertilisasi dilakukan di luar tubuh ikan (Padilla *et al.*, 2012).



BAB 3

KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1 Kerangka Teori

Pertumbuhan dipengaruhi oleh dua faktor yaitu faktor internal dan faktor eksternal. Genetik dan lingkungan berpengaruh terhadap tumbuh kembang, terutama pertumbuhan fisik khususnya panjang badan. Faktor lingkungan dalam kehidupan sehari-hari dapat dilihat dalam penggunaan bahan toksik seperti pestisida (rotenon).

Mekanisme kerja rotenon di dalam sel adalah menghambat kompleks I mitokondria yang menyebabkan produksi ROS meningkat sehingga memicu terjadinya stres oksidatif dan inflamasi yang di mediatori IL-6 sebagai pro-inflamasi dan IL-10 sebagai antiinflamasi. Hal tersebut dapat menghambat kerja mediator pertumbuhan yaitu IGF-1 sehingga dapat mengakibatkan *down regulation*. Gangguan pada IGF-1 mempengaruhi proses osifikasi tulang baik tulang rawan ataupun tulang keras.

Konsentrasi ROS yang tinggi akan menghambat antioksidan endogen seperti *Superoksida dismutase* (SOD) dan *catalase*. Penurunan kadar SOD dan *catalase* akan mengakibatkan sistem pertahanan antioksidan terganggu sehingga terjadi penurunan aktivitas antioksidan SOD dalam mendismutase radikal superoksida menjadi hidrogen peroksida dan antioksidan *catalase* yang mengkatalisis hidrogen peroksida menjadi air dan udara. Hal ini menyebabkan peningkatan jumlah superoksida dan hidroksil yang akan mengalami peroksida lipid sehingga akan membentuk senyawa kompleks *Malondialdehid* (MDA). Ketidakseimbangan antara ROS (prooksidan) dan antioksidan dapat mengakibatkan kerusakan sel sehingga terjadi gangguan pertumbuhan panjang badan yang akan berpengaruh terjadinya *stunting*.

Faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan salah satunya adalah penggunaan pestisida (rotenon). Mekanisme kerja rotenone menghambat kompleks I mitokondria sehingga kemampuan oksidatif fosforilasi menurun dan sintesis ATP terhambat (EPA, 2007; Turner, 2007). Kompleks I berperan sebagai regulasi ROS dan menentukan efisiensi dari produksi ATP oleh mitokondria. Gangguan pada aktivitas ini menimbulkan penurunan produksi ATP oleh sel dan meningkatnya ROS, hal ini dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif.

Konsentrasi ROS yang berlebihan dalam mitokondria akan menghambat antioksidan endogen seperti *Superoksida dismutase* (SOD). Penurunan kadar SOD akan mengakibatkan sistem pertahanan antioksidan tidak dapat mengkatalis radikal superoksida menjadi hidrogen peroksida, sehingga terjadi peningkatan jumlah superoksida dan hidroksil yang akan mengalami peroksida lipid dan akan membentuk senyawa kompleks *Malondialdehid* (MDA). Ketidakseimbangan antara ROS (prooksidan) dan antioksidan menyebabkan stres oksidatif yang berasosiasi dengan terjadinya kerusakan sel sehingga terjadi gangguan pertumbuhan, dalam hal ini pertumbuhan panjang badan yang akan berpengaruh terhadap terjadinya *stunting*.

Centella asiatica mengandung triterpenoid yang tinggi memiliki efek sebagai antioksidan, antiinflamasi dan nutrisi. Triterpenoid memiliki mekanisme penangkapan radikal bebas dan memiliki aktivitas menghambat terjadinya reaksi oksidasi serta menghambat pembentukan ROS (Salamah, 2014). Penambahan antioksidan dari luar dapat meningkatkan kadar SOD dan radikal superoksida dapat mengalami dismutase dengan bantuan SOD membentuk H_2O_2 pada semua sel anaerob dengan melibatkan transfer satu atau dua elektron. *Centella asiatica* sebagai penurun ROS dapat mencegah terjadinya stres oksidatif dan kerusakan sel sehingga pertumbuhan pada balita dapat berjalan secara normal, khususnya

panjang badan/tinggi badan sesuai dengan umur dan kejadian *stunting* dapat dicegah.

3.3 Hipotesis

Hipotesis utama penelitian ini adalah:” Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* dapat meningkatkan panjang badan, kadar *superoksida dismutase* dan menurunkan kadar *malondialdehid* larva *zebrafish stunting* yang diinduksi rotenon”.

Sub hipotesis dari penelitian ini adalah :

1. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* dapat meningkatkan panjang badan larva *zebrafish stunting* berusia 144 *hours post fertilization* (hpf)/ 6 dpf.
2. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* dapat meningkatkan kadar *superoxide dismutase* (SOD) larva *zebrafish stunting* berusia 144 hpf/ 6 dpf.
3. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* dapat menurunkan kadar *malondialdehid* (MDA) larva *zebrafish stunting* berusia 144 hpf/ 6 dpf.
4. Ada hubungan antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* terhadap panjang badan, kadar SOD, dan kadar MDA larva *zebrafish stunting*.

BAB 4 METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini, pertama-tama yang dilakukan adalah membuat model *stunting* larva *zebrafish* yang diinduksi rotenon dengan konsentrasi 12,5 ppb. Larva *zebrafish* dikatakan *stunting* jika panjang badan kurang -2 standart deviasi dibandingkan dengan kontrol dan tidak memiliki kelainan kongenital (De Onis *et al.*, 2012). Usia *zebrafish* dapat dianalogikan dengan usia manusia yaitu usia larva 144 *hours post fertilization* (hpf) /6 *day post fertilization* (dpf) setara dengan usia anak 2 tahun (Sorribes *et al.*, 2013). Langkah kedua yang dilakukan adalah pemberian pegagan konsentrasi 5 µg/mL bersamaan dengan paparan rotenon untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol pegagan terhadap mekanisme *stunting* pada larva *zebrafish*.

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis Penelitian ini adalah eksperimen murni (*true experiment*) dan menggunakan *post test control group design* dengan memberikan perlakuan pada larva *zebrafish*. Dalam desain penelitian terdiri dari kelompok perlakuan dan kontrol dengan penentuan sampel pada setiap kelompok dilakukan secara acak. Larva *zebrafish* sebagai subyek penelitian diikuti perkembangannya dari 0 *hour post fertilization* (hpf) sampai 144 hpf.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Pada penelitian ini, populasinya adalah embrio – larva *zebrafish* dengan usia 0 – 144 hpf yang merupakan hasil fertilisasi induk betina dan jantan *zebrafish wild type* dengan perbandingan 2 betina dan 1 jantan. *Zebrafish* indukkan (dewasa) dipelihara dan dibiakkan di Laboratorium Farmakologi Fakultas

Kedokteran Universitas Brawijaya. Adapun ciri *zebrafish* yang digunakan sebagai hewan coba adalah memiliki strip horizontal berwarna biru tua kehitaman dan memiliki warna dasar perak. Hewan coba ini telah diuji dan diidentifikasi di Laboratorium Hidrologi Fakultas Ilmu Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya (Khotimah *et al.*, 2015)

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah embrio - larva *zebrafish* yang berusia 0-144 hpf. Pengambilan sampel penelitian dilakukan secara random alokasi.

Sampel penelitian terdiri dari 5 kelompok dengan jumlah sampel yang diambil sebanyak 20-30 embrio pada masing-masing kelompok dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali (*triplicate*) sehingga jumlah embrio yang digunakan sebesar 300 embrio (Lucitt *et al.*, 2008). Adapun kelima kelompok sampel penelitian terdiri dari:

1. Kontrol (K) adalah embrio *zebrafish* yang tidak diberikan rotenon dan ekstrak etanol pegagan hanya mendapatkan medium embrionik.
2. Rotenon (R) adalah embrio *zebrafish* yang diberikan rotenon konsentrasi 12,5 ppb.
3. Perlakuan 1 (P1) adalah embrio *zebrafish* yang diberikan rotenon konsentrasi 12,5 ppb dan ekstrak etanol pegagan konsentrasi 5 µg/mL sejak 2 hpf sampai 96 hpf (4 dpf).
4. Perlakuan 2 (P2) adalah embrio *zebrafish* yang diberikan rotenon konsentrasi 12,5 ppb dan ekstrak etanol pegagan konsentrasi 5 µg/mL sejak 2 hpf sampai 120 hpf (5 dpf).
5. Perlakuan 3 (P3) adalah embrio *zebrafish* yang diberikan rotenon konsentrasi 12,5 ppb dan ekstrak etanol pegagan konsentrasi 5 µg/mL sejak 2 hpf sampai 144 hpf (6 dpf).

4.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Embrio yang digunakan untuk penelitian ini telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

1. Kriteria Inklusi

Embrio *zebrafish* berusia 0-2 hpf yang berwarna bening transparan dan tidak adanya jamur saat dilihat menggunakan mikroskop yang tersambung dengan software optilab.

2. Kriteria Eksklusi

Embrio *zebrafish* berwarna putih dan tidak dibuahi, lengket dengan telur yang lain, berjamur dan *hatching* sebelum berusia 72 hpf (3 dpf) serta embrio yang mati atau cacat sebelum berakhirnya penelitian.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

4.4.1 Tempat Penelitian

1. Pemeliharaan *zebrafish*, embrio *zebrafish*, pembuatan larutan rotenon, larutan embrionik, pembuatan ekstrak etanol pegagan (*centella asiatica*), pengukuran panjang badan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

2. Pemeriksaan kadar SOD dan MDA dilakukan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini berlangsung sejak bulan Desember 2017 sampai dengan Februari 2018.

4.5 Variabel Penelitian

1. Variabel Independent (Bebas)

Variabel independent dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol pegagan (*centella asiatica*).

2. Variabel Dependent (Terikat)

Variabel dependent dalam penelitian ini adalah panjang badan, rasio panjang kepala dan badan, kadar SOD dan kadar MDA.

3. Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah konsentrasi rotenon, konsentrasi ekstrak etanol pegagan, medium embrionik, kebersihan well plate, suhu $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, pakan ikan, air filtrasi.

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dapat dilihat pada table 4.1 :

Tabel 4.1 Definisi Operasional

| Variabel | Definisi Operasional | Hasil Ukur | Skala Data |
|--|---|-------------------------------------|------------|
| Kriteria Stunting | Kriteria yang berdasarkan dengan ketentuan panjang badan sesuai umur < -2 SD dengan confidence coefficient sebesar 95% | < -2 Standart Deviasi | Ratio |
| Panjang Badan Larva Zebrafish | Pengukuran panjang badan dari moncong mulut (<i>snout</i>) sampai pangkal sirip ekor (<i>caudal fin</i>) pada usia 3, 4, 5, dan 6 dpf. Larva zebrafish yang diletakkan pada obyek glass dengan kondisi air minimal, posisi larva lurus dan diam kemudian diamati dengan mikroskop stereometri (Olympus SZ61) dan dilakukan pengambilan gambar menggunakan optilab versi 2.0. Pengukuran panjang badan menggunakan software Immage Raster versi 3. | Panjang badan dalam millimeter (mm) | Ratio |
| Rasio Panjang Kepala dan Panjang Badan | Pengukuran rasio panjang kepala dan panjang badan larva zebrafish dengan cara | PK : PB | Ratio |

| | | | |
|---|--|--|-------|
| | menghitung panjang badan dan panjang kepala yang diukur dari <i>snout</i> sampai <i>operculum</i> kemudian dibandingkan untuk melihat proporsi panjang badan larva pada usia 3, 4, 5, dan 6 dpf. | | |
| Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) pada masa <i>pre</i> sampai dengan <i>post hatching</i> | Waktu dalam pemberian pegagan dengan konsentrasi 5 µg/mL pada setiap kelompok | Ada lima kelompok perlakuan yang terdiri dari kontrol (K), Rotenon (R), Rotenon + Pegagan 4 dpf (P1), Rotenon + Pegagan 5 dpf (P2), dan Rotenon + Pegagan 6 dpf (P3) | Ratio |
| Kadar <i>Superoxide Dismutase</i> (SOD) | SOD merupakan enzim antioksidan endogen pada larva <i>zebrafish</i> yang diberikan ekstraksi etanol pegagan. Larva diterminasi pada 6 dpf dan kadar SOD diukur dengan metode Elisa kit merk BioAssay Technology. | ng/mL | Ratio |
| Kadar <i>Malondialdehid</i> (MDA) | MDA merupakan produk dari proses peroksida lipid dan merupakan marker untuk mengetahui stress oksidatif dalam larva <i>zebrafish</i> . Larva diterminasi pada 6 dpf dan kadar MDA diukur dengan metode Elisa Kit merk BioAssay Technology. | nmol/mL | Ratio |

4.7. Alat dan Bahan Penelitian

1. Pemeliharaan *zebrafish* dan memperoleh telur

Alat : alat pH meter, jaring, penyaring air (filtrasi), aerasi, aquarium 60 liter, kotak plastik tempat penangkaran telur, tanaman/ bunga plastik hias, pompa air, inkubator dengan suhu $28^{\circ} \text{C} \pm 10 \text{C}$, *well plate* dengan 6 sumuran, pipet plastik, mikropipet dan tip (*Blue dan Yellow*) laptop (dengan software Optilab dan Image Raster), kamera digital, sentrifugasi dingin 4°C , mikroskop, alat gerus (homogenizer), lampu aquarium.

Bahan : pakan ikan (tetramint), air aqua dan fish All.

2. Pembuatan ekstrak etanol pegagan

Alat : gelas ukur, corong *Buchner* , pipet tetes, *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut etanol dan mengentalkan ekstrak, gunting, kertas saring, benang pengikat, spatel dan pinset, erlenmeyer, oven, pompa air, water bath, selang pompa air, blender, botol hasil ekstraksi, pompa vacuum, mortar dan stamper, aluminium foil, plat tetes, vial dan timbangan analitik.

Bahan : simplisia pegagan dan larutan etanol.

3. Pembuatan medium embrionik

Alat : tabuk reaksi 500 ml, timbangan digital, kertas saring, dan sendok pengaduk.

Bahan : untuk medium embrionik 200 ml adalah CaCl 0,08 gr, KCl 0,06 gr, NaCl 2 gr, MgSO₄ 3,2 gr dan aquades 200ml.

4. Pengukuran Panjang Badan dan Rasio Panjang Kepala dan Badan

Alat : objek glass, pipet plastik, mikroskop stereometri (Olympus SZ61), Kamera Optilab Versi 2.0

Bahan : medium embrionik

5. Pengukuran kadar SOD

Alat : *Rat Super Oxidase Dismutase Elisa Kit* merk BioAssay Technology (Cat.No E0168Ra), tabung reaksi, mikropipet dan tip, evendoft, vortex, sentrifuge, *microplate reader*, inkubator, ELISA reader

Bahan : Standart solution, standart diluent, Streptavidin HRP, larutan substrat A dan B, *washing buffer*, antibodi anti rat SOD, stop solution.

6. Pengukuran kadar MDA

Alat : *Rat Malondialdehyd Elisa Kit* merk BioAssay Technology (Cat.No E0156Ra), evendoft, vortex, sentrifuge, mikropipet dan tip, ELISA reader, inkubator.

Bahan : Standart solution, standart diluent, Streptavidin HRP, larutan substrat A dan B, *washing buffer*, antibodi anti rat MDA, stop solution,

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio

Zebrafish dewasa jenis wild type dipelihara di laboratorium farmakologi dalam aquarium yang berisi 60 liter air tawar dengan suhu 26,0 C – 28,50 C dan pH air 6,8 sampai 7,5. Jumlah *zebrafish* dewasa untuk setiap aquarium berisi 25 sampai 30 ekor dengan perbandingan betina 2 dan jantan 1. Pengurusan dan pembersihan aquarium dilakukan seminggu sekali dan spon penyaring (filtrasi) diganti / dibersihkan setiap 3 hari sekali. Untuk menjaga kebutuhan oksigen dalam aquarium dipasang aerator. Untuk menghindari *zebrafish* stress lingkungan maka pada bagian luar aquarium ditutupi dengan kertas manila. Pemberian makan pada *zebrafish* dilakukan minimal 2 kali sehari berupa pakan ikan tetramin.

Persiapan peneluran dengan meletakkan kotak plastik (trap) untuk menampung telur/ embrio *zebrafish* pada dasar aquarium dan letakkan hiasan/bunga plastik di atas trap. Penatalaksanaan fertilisasi disesuaikan dengan siklus gelap terang dengan perbandingan 10 jam kondisi gelap dan 14 jam dalam kondisi terang, kemudian trap diangkat dan embrio dipindahkan ke dalam cawan petri yang bersih untuk dibersihkan. Pembersihan embrio dilakukan dengan membilas embrio menggunakan air aqua sehingga embrio bersih dari kotoran dan jamur. Setelah embrio bersih dan telah diseleksi sesuai kriteria inklusi maka

pindahkan embrio tersebut ke dalam well plate 6 sumuran yang telah berisi medium embrionik 15 ml. Setiap well dimasukkan sebanyak 20 – 30 embrio kemudian disimpan dalam inkubator dengan suhu $28^{\circ}\text{C} \pm 1$.

4.8.2 Pembuatan Medium Embrionik

Menurut Avdesh *et al.* (2012) pembuatan medium embrionik 200 ml dengan kepekatan 10 kali dengan cara semua bahan ditimbang dengan timbangan digital sesuai takaran (CaCl 0,08 gr; KCl 0,06 gr; NaCl 2 gr; MgSO₄ 3,2 gr) dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian tambahkan aquades sampai dengan 200 ml, selanjutnya aduk larutan tersebut hingga semua bahan larut.

Kemudian stok medium embrionik dimasukkan ke dalam botol, tutup botol dengan rapat dan simpan dalam lemari es dengan suhu $2 - 8^{\circ}\text{C}$. Untuk menggunakan stok medium embrionik tersebut medium mebrionik harus ditambahkan air aqua dengan perbandingan medium embrionik dan air aqua adalah 1 : 9.

4.8.3 Pembuatan Larutan Rotenon

Rotenon (sigma R8875) dalam bentuk serbuk yang dilarutkan dengan dimethyl sulfoxide 1% (DMSO) sehinggann diperoleh konsentrasi rotenon 2×10^3 µg/L yang dan dijadikan sebagai stok (Khotimah *et al.*, 2015). Untuk pembuatan rotenon konsentrasi 12,5 ppb dan volume yang dibutuhkan 15 ml (5 ml x 3 sumuran) dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

Keterangan :

$$V_1 \times 2.10^3 = 15 \times 12,5$$

V1 : Volume awal

$$V_1 = 93,75 \mu\text{g/L}$$

M1 : Konsentrasi stok

V2 : Volume yang diinginkan

M2 : Konsentrasi akhir yang dinginkan

Cara membuat rotenon konsentrasi 12,5 ppb yaitu ambil rotenon stok dengan menggunakan mikropipet sebanyak 93,75 µg/L kemudian tambahkan air filtrasi sampai dengan 15 ml.

4.8.4 Pembuatan Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan yang diperoleh dari Materi medica Kota Batu akan dibuat menjadi ekstrak pegagan dengan menggunakan etanol sebagai pelarut. Bagian tanaman pegagan yang digunakan adalah bagian atas /berada di atas tanah, sedangkan bagian akar dan stolon tidak digunakan (Khotimah *et al.*, 2015).

Prosedur pembuatan ekstrak pegagan sebagai berikut :

1. Pegagan dicuci sampai bersih menggunakan air yang bersih, setelah bersih dikeringkan dengan diangin-anginkan kemudian dipotong kecil-kecil dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40°C.
2. Pegagan yang telah di oven dihaluskan menggunakan blender lalu disaring dengan kertas saring kemudian ditimbang serbuk pegagan sebanyak 100 gram.
3. Serbuk pegagan dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer dan ditambahkan larutan etanol 98 % sebanyak 900 ml kemudian dikocok selama 30 menit hingga tercampur dan diamkan semalam (24 jam) sampai mengendap.
4. Rendaman pegagan yang sudah dibiarkan semalam diambil lapisan bagian atasnya (campuran etanol dan zat aktif) kemudian disaring menggunakan corong buncher.
5. Proses evaporasi untuk memisahkan larutan etanol dan zat aktif menggunakan *rotary evaporator*. Rendaman pegagan dimasukkan ke dalam labu evaporasi 1 liter dan pasang pada evaporator. Mengisi air pada water bath hingga penuh dan dipanaskan hingga suhu 70°C (sesuai titik

didih pelarut). Proses ini berlangsung dalam waktu 1,5 sampai 2 jam untuk satu labu (900 ml).

6. Hasil ekstraksi ditimbang dan diperoleh ekstrak pegagan sebanyak 10.99 gram, kemudian dimasukkan dalam botol plastik yang telah diberi label dan dilakukan penyimpanan dalam freezer.

4.8.5 Pembuatan Larutan Pegagan (*Centella asiatica*)

Pembuatan larutan stok pegagan 1000 µg/mL (1 mg/mL) dengan mengambil ekstrak pegagan sebanyak 100 mg kemudian tambahkan aquadest sebanyak 10 ml. Dari stok pegagan tersebut diencerkan kembali untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak pegagan yang diinginkan. Pada penelitian ini konsentrasi ekstrak pegagan yang diinginkan adalah 5 µg/mL, sehingga untuk membuatnya dengan menggunakan rumus :

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 10000 \mu\text{g/mL} = 15 \text{ mL} \times 5 \mu\text{g/mL}$$

$$V_1 = \frac{15 \text{ mL} \times 5 \mu\text{g/mL}}{1000 \mu\text{g/mL}}$$

$$V_1 = 0,075 \text{ mL} = 75 \mu\text{L}$$

Keterangan :

- V1 : Volume yang ditambahkan
- M1 : Konsentrasi awal/ stok
- V2 : Volume akhir
- M2 : Konsentrasi akhir

Berdasarkan hitungan di atas, maka untuk membuat larutan pegagan konsentrasi 5 µg/mL dengan cara mengambil 75 µg/mL dari stok pegagan dan ditambahkan air filtrasi sampai dengan 15 mL.

4.8.6 Pemberian Larutan Rotenon dan Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*)

Pemberian larutan rotenon dan ekstrak etanol pegagan diberikan bersamaan dengan pembagian kelompok sebagai berikut :

1. Rotenon (R)

Larutan rotenon konsentrasi 12,5 ppb yang telah disiapkan dimasukkan ke masing-masing well sebanyak 5 ml untuk setiap sumuran. Larutan rotenon ini diberikan saat usia embrio 2 hpf, 24 hpf, dan 48 hpf. Pada usia 72 hpf (3 dpf) embrio dibilas menggunakan medium embrionik sebanyak 1 kali untuk menghilangkan paparan rotenon. Larva yang telah *hatching* letakkan di obyek glass untuk diamati dibawah mikroskop kemudian diambil gambar pada usia 72 hpf -144 hpf (3-6 dpf). Medium embrionik diganti setiap hari.

2. Rotenon dan pegagan (P1, P2, dan P3)

Pada kelompok perlakuan penelitian, pemberian larutan rotenon konsentrasi 12,5 ppb dan ekstrak etanol pegagan konsentrasi 5 µg/mL diberikan bersamaan pada embrio *zebrafish* usia 2 hpf, 24 hpf dan 48 hpf. Pada usia 72 hpf (3 dpf) embrio *zebrafish* dibilas dengan medium embrionik sebanyak 1 kali untuk menghilangkan paparan rotenon. Lama paparan rotenon dan ekstrak etanol pegagan ditunjukkan pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Pemberian Larutan Rotenon dan Ekstrak Etanol Pegagan

| Kelompok | 2 hpf - 72 hpf (3 dpf) | 96 hpf (4 dpf) | 120 hpf (5 dpf) | 144 hpf (6 dpf) |
|----------|------------------------|------------------|------------------|-----------------|
| KN | Embrionik Medium (EM) | | | |
| Rotenon | Rotenon 12,5 ppb | Embrionik Medium | | |
| P1 | Rotenon 12,5 ppb | Pegagan 5 µg/mL | Embrionik Medium | |
| | Pegagan 5 µg/mL | | | |
| P2 | Rotenon 12,5 ppb | Pegagan 5 µg/mL | | EM |
| | Pegagan 5 µg/mL | | | |
| P3 | Rotenon 12,5 ppb | Pegagan 5 µg/mL | | |
| | Pegagan 5 µg/mL | | | |

4.8.7 Pengukuran Panjang Badan

Pengukuran panjang badan dilakukan pada usia larva *zebrafish* 72 hpf - 144 hpf (3-6 dpf). Larva dipindahkan di obyek glass dan diamati serta difoto dengan mikroskop Olympus SZ61 yang sudah terhubung dengan kamera Optilab.

Panjang badan diukur dengan software Image Raster versi 3 yang telah dikalibrasi. Panjang badan larva diukur mulai dari moncong mulut (*snout*) sampai sirip ekor (*caudal fin*) (Spence *et al.*, 2008).

4.8.8 Pengukuran Rasio Panjang Kepala dan Panjang Badan

Pengukuran rasio panjang kepala dan panjang badan dilakukan pada usia 72 hpf -144 hpf (3-6 dpf). Panjang kepala diukur dari snout sampai operculum dengan software Image Raster versi 3. Pengukuran rasio panjang kepala dan panjang badan dengan cara membandingkan hasil panjang kepala dengan panjang badan.

4.8.9 Pengukuran Kadar SOD

Kadar SOD diukur dengan Rat *Super Oxidase Dismutase* Elisa Kit (Cat. No E0168Ra) Merk BioAssay Technology pada larva *zebrafish* usia 144 hpf (6 dpf). Adapun langkah-langkah pengukuran kadar SOD sebagai berikut :

Homogenasi jaringan

1. Dilakukan homogenisasi dengan menggerus 30 larva *zebrafish* dalam 500 μ L rifa buffer menggunakan cawan petri berada di atas es dengan ujung plunger.
2. Sampel yang telah digerus di masukkan kedalam ependorf dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2500 RPM dengan suhu 4 °C selama 20 menit.

3. 300 μ L supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam ependorf yang telah diberi label.

Prosedur Assay

1. Semua reagen, larutan standart dan sampel larva *zebrafish* disiapkan pada suhu ruangan. Pengukuran dilakukan pada suhu ruangan.
2. Microplate well ELISA kit SOD disiapkan dan diberi label.
3. 40 μ L sampel dimasukkan ke semua well sampel dan di tambahkan 10 μ L *biotin conjugate antibody* ke well sampel.
4. Microplate well dimixer sebentar dan diinkubasi
5. Menyiapkan larutan standart.
6. 50 μ L larutan standart di masukkan ke masing-masing well standart
7. 50 μ L streptavidin-HRP dimasukkan ke dalam well sampel dan well standart dan tutup dengan sealer.
8. Pencampuran dilakukan dengan dimixer dan diinkubasi selama 60 menit.
9. Pencucian dilakukan sebanyak 3 kali dengan menggunakan *washing buffer* 300 μ L.
10. 50 μ L substrat solution A dimasukkan ke masing-masing well sampel dan standart.
11. 50 μ L substrat solution B dimasukkan ke masing-masing well sampel dan standart
12. *Microplate well* ditutup dan dimixer sebentar kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C.
13. 50 μ L stop solution dimasukkan ke masing-masing well sampel dan standart kemudian dimixer.
14. Pengukuran dilakukan dengan ELISA reader pada 450 nm.

4.8.10 Pengukuran kadar MDA

Kadar MDA diukur dengan Rat *Malondialdehyde* Elisa Kit (Cat. No E0156Ra) Merk BioAssay Technology pada larva *zebrafish* usia 144 hpf (6 dpf).

Prosedur kerja pengukuran kadar MDA sama dengan langkah kerja pengukuran kadar SOD.

4.9 Pengumpulan dan Analisis Data

4.9.1 Pengumpulan Data

Data penelitian yang dikumpulkan dan ditabulasi meliputi :

1. Data Panjang Badan dan Ratio Panjang Kepala - Badan
2. Data Pengukuran Kadar SOD
3. Data Pengukuran Kadar MDA

4.9.2 Analisis Data

Teknik analisis data pada penelitian ini menggunakan SPSS 23.00. Data yang didapatkan dari penelitian ini merupakan data yang berskala rasio, sehingga digunakan analisis parametrik. Sebelum melakukan analisis parametrik terdapat syarat yang harus dipenuhi yaitu data berdistribusi normal dan merupakan data yang homogen. Pada penelitian ini uji normalitas menggunakan *Shapiro Wilk*, dikatakan berdistribusi normal jika $p\text{-value} > 0,05$ dan uji homogenitas menggunakan uji Levene, jika $p\text{-value} > 0,05$ maka data memiliki varians yang sama (homogen).

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh ekstrak etanol pegagan terhadap panjang badan, rasio panjang kepala dengan panjang badan, kadar SOD dan kadar MDA pada kelompok rotenon (R) dengan kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3) menggunakan uji *One Way Anova*. Jika didapatkan nilai $p < 0,05$ maka disimpulkan ada perbedaan pada kelompok tersebut dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD (Least Signifikan Difference)*. Uji *Post Hoc LSD* bertujuan untuk

mengetahui pada kelompok yang mana terdapat perbedaan bermakna, sehingga dapat diketahui berapa lama pemberian ekstrak etanol pegagan berpengaruh pada masing-masing variabel dependen yang diuji. Jika syarat *One Way Anova* tidak terpenuhi maka analisis yang digunakan adalah *Kruskal-Wallis*.

Untuk mengetahui adanya hubungan pemberian ekstrak etanol pegagan terhadap, panjang badan, rasio panjang kepala dengan panjang badan, denyut jantung, kadar SOD dan kadar MDA pada kelompok rotenon (R) dengan kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3) menggunakan uji korelasi Pearson.

Pada uji korelasi dilihat koefisien korelasinya untuk melihat kekuatan hubungan antara kedua variabel dan arah hubungannya. Nilai korelasi berkisar antara 0 sampai 1 dan dapat bernilai positif ataupun negatif. Kriteria hasil uji korelasi sebagai berikut :

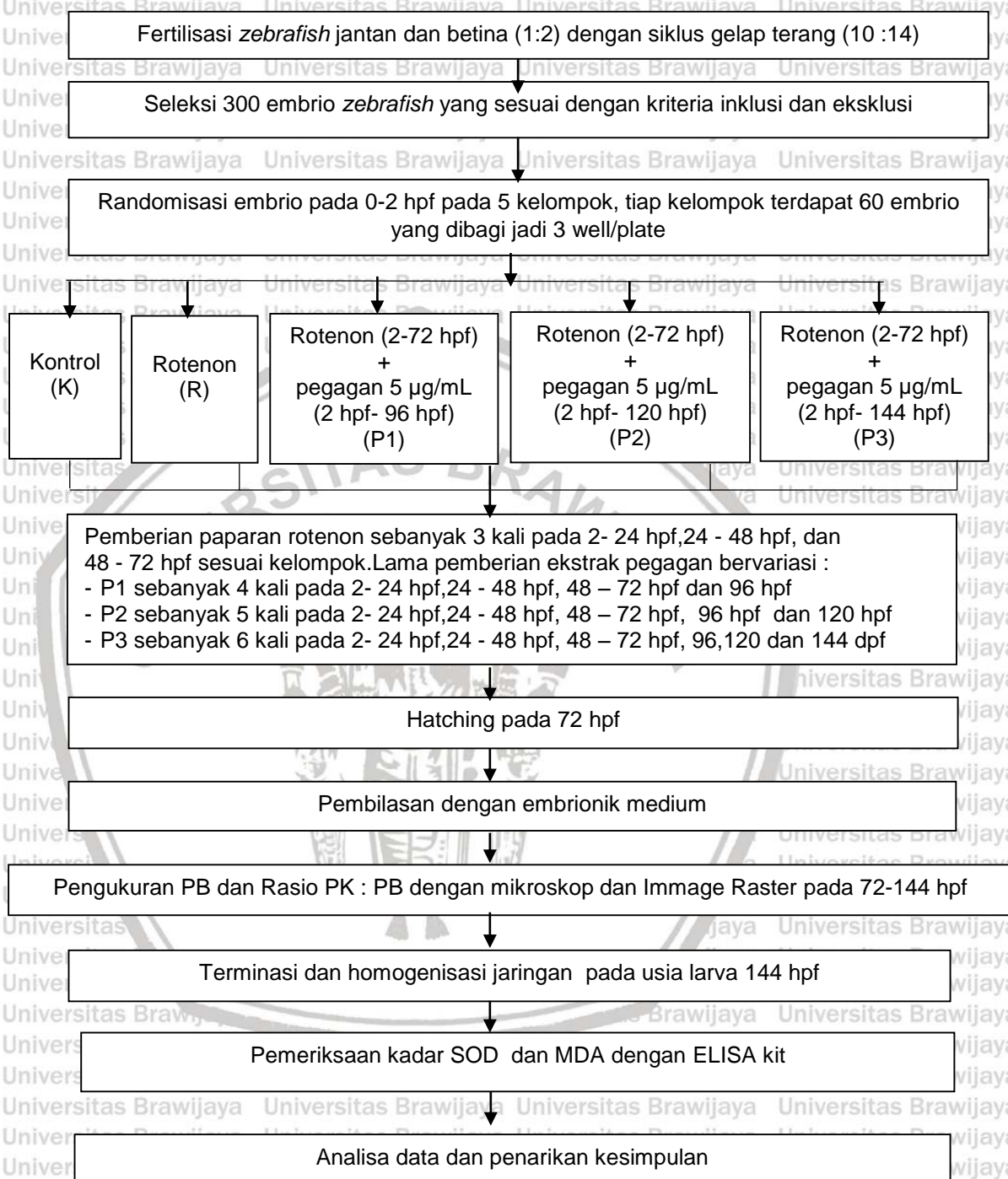
1. Korelasi positif berarti terdapat hubungan yang positif yang memiliki arti pemberian ekstrak etanol pegagan akan diikuti peningkatan kadar SOD dan penurunan kadar MDA.
2. Korelasi negative berarti terdapat hubungan yang negative, yang memiliki arti waktu pemberian ekstrak etanol pegagan akan diikuti dengan penurunan kadar SOD dan peningkatan Kadar MDA.

Adapun kekuatan hubungan antar variabel digunakan kriteria seperti pada table 4.3

Tabel 4.3 Kriteria Koefisien Korelasi (Dahlan, 2011)

| Nilai Koefisien Korelasi | Interpretasi Hasil |
|--------------------------|-----------------------|
| 0 | Tidak ada korelasi |
| 0 - < 0,2 | Korelasi sangat lemah |
| 0,2 - < 0,4 | Korelasi Lemah |
| 0,4 - < 0,6 | Korelasi Sedang |
| 0,6 - < 0,8 | Korelasi Kuat |
| 0,8 - 1 | Korelasi sangat kuat |

4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

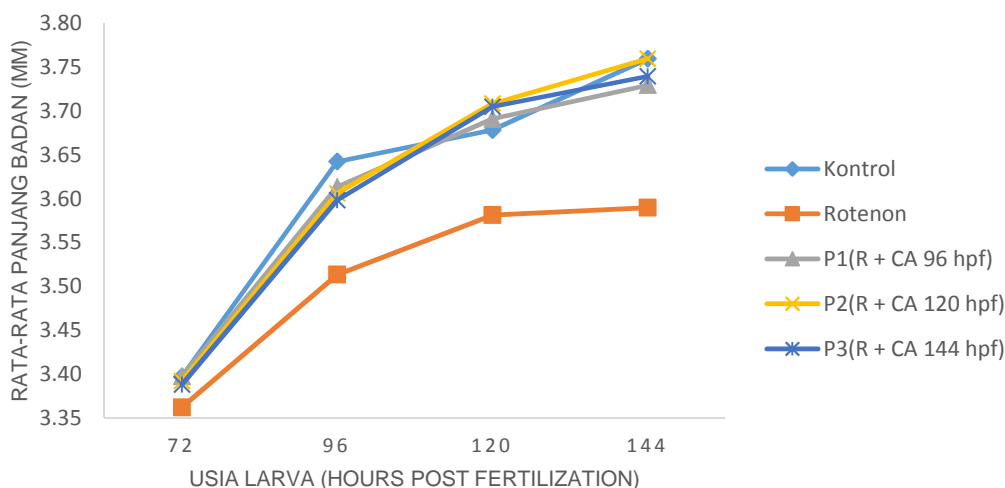
BAB 5
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan hewan coba larva zebrafish yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Parameter penelitian ini selain kadar *superoksida dismutase* (SOD) dan *malondialdehid* (MDA) adalah panjang badan larva *zebrafish*.

5.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai Post Hatching terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish Stunting

Pengukuran rata-rata panjang badan dilakukan dengan mengambil foto larva *zebrafish* menggunakan mikroskop yang terhubung dengan software optilab.

Panjang badan larva diukur dengan software image raster 3. Berikut ini merupakan grafik pertumbuhan larva *zebrafish* berdasarkan rata-rata panjang badan setiap kelompok.



Gambar 5.1 Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish untuk Semua Kelompok pada Usia 72, 96, 120, dan 144 hpf.

Grafik pertumbuhan larva zebrafish (n=30) dari usia 72 hpf sampai 144 hpf menunjukkan pada kelompok rotenon memiliki tingkat pertumbuhan panjang badan yang paling rendah di bandingkan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Pertumbuhan semua kelompok larva *zebrafish* pada usia 72 hpf (3 dpf) terlihat pada titik awal yang hampir sama, namun dengan bertambahnya usia larva terlihat ada perbedaan pertumbuhan panjang badan yang jauh pada kelompok rotenon dibandingkan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terutama diusia 144 hpf (6 dpf). Data rata-rata panjang badan larva *zebrafish* di analisis dengan uji *One Way Anova* yang terlebih dahulu dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan didapatkan *p-value* data panjang badan 72 hpf dan 144 hpf secara berurutan 0.201 dan 0.138, yang memiliki arti semua data terdistribusi normal. Hasil uji *Levene* untuk data panjang badan 72 hpf dan 144 hpf diperoleh *p-value* berurutan sebesar 0.640 dan 0.368 yang berarti semua data panjang badan homogen. Prasyarat pengujian *One way anova* telah terpenuhi dan diperoleh *p-value* 0.00 sehingga dapat dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc LSD* dengan tingkat kepercayaan 5 %.

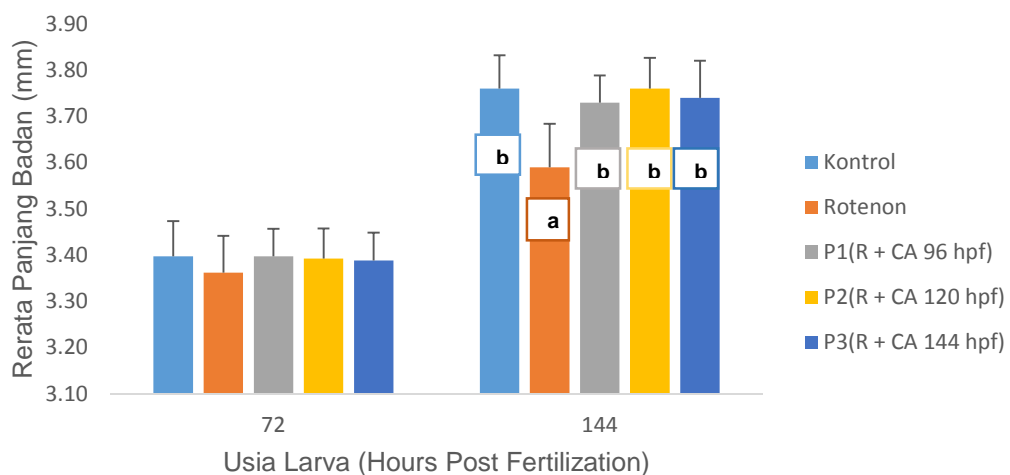
Tabel 5.1 Hasil Perbandingan Rerata Panjang Badan Larva *Zebrafish* dengan ANNOVA

| | Kelompok | Mean ± SD | p-value |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------|---------|
| Panjang Badan 72 hpf (3 dpf) | Kontrol | 3.4 ± 0.08 | 0.247 |
| | Rotenon | 3.36 ± 0.08 | |
| | P1(Rotenon + Pegagan 96 hpf) | 3.4 ± 0.06 | |
| | P2(Rotenon + Pegagan 120 hpf) | 3.39 ± 0.07 | |
| | P3(Rotenon + Pegagan 144 hpf) | 3.39 ± 0.06 | |
| Panjang Badan 144 hpf (6 dpf) | Kontrol | 3.76 ± 0.07 | b |
| | Rotenon | 3.59 ± 0.09 | a |
| | P1(Rotenon + Pegagan 96 hpf) | 3.73 ± 0.06 | b |
| | P2(Rotenon + Pegagan 120 hpf) | 3.76 ± 0.07 | b |
| | P3(Rotenon + Pegagan 144 hpf) | 3.74 ± 0.08 | b |

Keterangan : Pada nilai mean ± sd jika terdapat notasi yang berbeda memiliki arti ada perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) dan jika terdapat notasi yang sama memiliki arti tidak ada perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$).

Pada tabel 5.1 terlihat bahwa panjang badan larva *zebrafish* pada usia 72 hpf (3 dpf) pada kelompok kontrol, kelompok rotenon dan semua kelompok perlakuan tidak ada perbedaan yang signifikan (*p-value* 0.247). Hal ini menunjukkan tidak ada perbedaan panjang badan yang signifikan antara semua

kelompok, sehingga dapat dikatakan bahwa larva *zebrafish* saat *hatching* memiliki rerata panjang badan yang sama. Selisih panjang badan larva *zebrafish* antara kelompok kontrol dengan kelompok rotenon pada usia 144 hpf (6 dpf) diperoleh 0.17 yang berarti selisih panjang badan tersebut mencapai $>2SD$ (>0.16). Proporsi panjang kepala dan panjang badan juga diamati dalam penelitian ini dengan membandingkan panjang kepala terhadap panjang badan didapatkan rasio 1 : 5 pada semua kelompok, sehingga pada larva *zebrafish* memiliki proporsi tubuh yang sama pada semua kelompok (data terlampir). Memperhatikan hal tersebut diatas maka kriteria *stunting* pada penelitian ini telah terpenuhi. Hal ini juga diperkuat dengan hasil analisis *One way annova* adanya perbedaan secara signifikan ($p\text{-value} = 0.00$).



Gambar 5.2 Perbandingan Panjang Badan Larva *Zebrafish* pada Usia 72 dan 144 hpf.

Rerata panjang badan larva *zebrafish* ($n=30$) pada kelompok rotenon terlihat perbedaan yang jauh dibandingkan kelompok kontrol dan semua kelompok perlakuan di usia 144 hpf. Jika terdapat notasi yang sama memiliki arti tidak ada perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$).

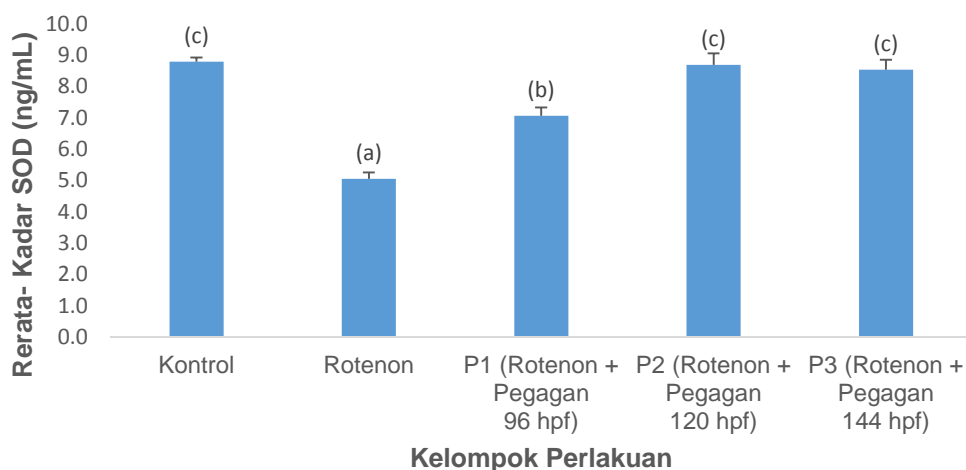
Pada gambar 5.2 terlihat rerata panjang badan larva *zebrafish* di usia 72 hpf kelompok rotenon memiliki panjang badan yang lebih rendah, namun perbedaan panjang badan tersebut tidak signifikan berbeda. Pada usia 144 hpf rerata panjang badan kelompok rotenon terlihat jauh tertinggal di bandingkan

kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Perbandingan antar kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3) tidak memiliki perbedaan panjang badan secara signifikan ($p\text{-value}>0.05$) dan antar kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3) dengan kelompok kontrol tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value}>0.05$).

Hal tersebut menunjukkan dengan pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pre sampai post hatching memiliki pengaruh yang signifikan ($p\text{-value}<0.05$) terhadap penambahan panjang badan larva zebrafish stunting yang diinduksi rotenon diusia 144 hpf (6 dpf). Pada penelitian ini terdapat angka koreksi panjang badan sebesar 99.6 % pada usia 144 hpf (6 dpf).

5.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai Post Hatching terhadap Kadar Superoksida Dismutase (SOD) Larva Zebrafish Stunting Usia 144 hpf

Pemeriksaan kadar SOD dilakukan dengan metode ELISA Kit yang dilakukan pada usia larva zebrafish 144 hpf. Hasil perhitungan rerata kadar SOD pada semua kelompok dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Berdasarkan hasil uji *Shapiro-Wilk* diperoleh nilai signifikansi 0.131 ($p\text{-value}>0.05$) yang berarti data rerata kadar SOD terdistribusi normal sedangkan hasil uji *Levene* didapatkan nilai signifikansi 0.222 ($p\text{-value} >0.05$) yang berarti data rerata kadar SOD homogen. Berdasarkan hasil di atas data rerata kadar SOD telah memenuhi prasyarat uji *One way annova*. Hasil uji *One Way Annova* didapatkan $p\text{-value}$ 0.00 sehingga dapat dilanjutkan dengan uji LSD. Rerata kadar SOD pada larva zebrafish usia 144 hpf pada kelompok kontrol, rotenon, dan semua perlakuan secara lengkap ditunjukkan pada gambar 5.3.



Gambar 5.3 Perbandingan Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Kadar SOD

Kadar SOD tertinggi pada kelompok kontrol dan yang terendah pada kelompok rotenon. Pada kelompok perlakuan P2 dan P3 memiliki kadar SOD mendekati kontrol. Adanya notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan. (n=5).

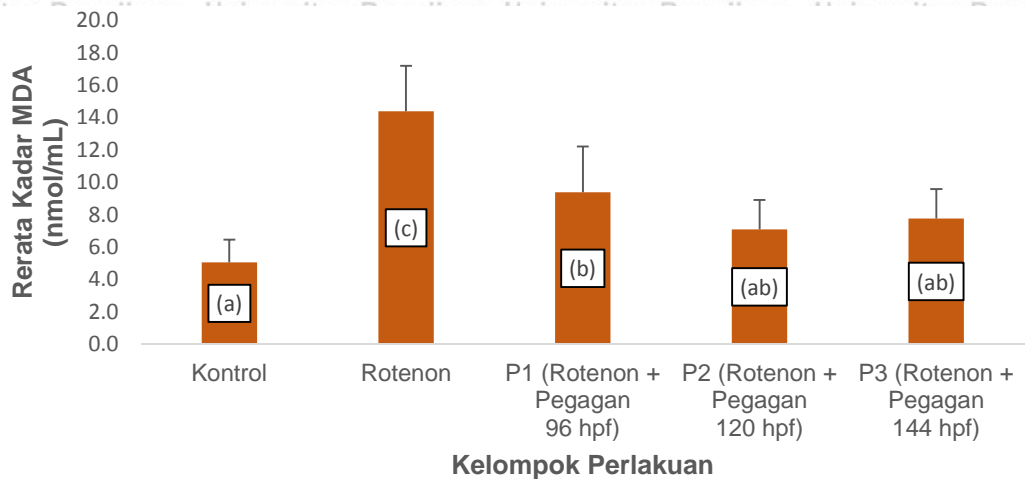
Gambar 5.3 menunjukkan hasil analisis uji *One way anova* dan *Post Hoc LSD* ada perbedaan rerata kadar SOD secara bermakna ($p\text{-value}=0.00$). Kelompok rotenon memiliki kadar SOD yang paling rendah dibandingkan kontrol dan ini menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p\text{-value}=0.00$). Pada kelompok P1, P2, dan P3 terdapat peningkatan kadar SOD yang berbeda bermakna dibandingkan kelompok rotenon ($p\text{-value}<0.05$). Rerata kadar SOD pada kelompok P1 terdapat perbedaan yang bermakna dibandingkan P2 dan P3 dimana didapatkan $p\text{-value}=0.00$, sedangkan Kelompok P2 dengan P3 tidak memiliki perbedaan secara signifikan ($p\text{-value}>0.05$).

Hal tersebut menunjukkan bahwa dengan adanya paparan rotenon pada saat *pre hatching* dapat menurunkan kadar SOD pada larva *zebrafish*. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* dapat meningkatkan kadar SOD. Peningkatan kadar SOD yang paling baik pada kelompok P2 dan P3 yang artinya dengan pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) sampai 120 hpf (5 dpf) dan 144 hpf (6 dpf) lebih baik

dibandingkan pemberian hanya sampai 96 hpf (4 dpf). Jadi, hipotesis penelitian ini terbukti yaitu dengan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pre sampai post hatching dapat meningkatkan kadar SOD larva zebrafish stunting.

5.3 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai Post Hatching terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Larva Zebrafish Stunting Usia 144 hpf

Pemeriksaan kadar MDA dilakukan dengan metode ELISA Kit yang dilakukan pada usia larva zebrafish 144 hpf. Hasil perhitungan rerata kadar MDA pada semua kelompok dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Berdasarkan hasil uji *Shapiro-Wilk* diperoleh nilai signifikansi 0.112 ($p\text{-value} > 0.05$) yang berarti data rerata kadar MDA terdistribusi normal sedangkan hasil uji *Levene* didapatkan nilai signifikansi 0.179 ($p\text{-value} > 0.05$) yang berarti data rerata kadar MDA homogen. Berdasarkan hasil di atas data rerata kadar MDA telah memenuhi prasyarat uji *One way annova*. Hasil uji *One way annova* didapatkan $p\text{-value}$ 0.00 sehingga dapat dilanjutkan dengan uji LSD. Rerata kadar MDA pada larva zebrafish usia 6 dpf pada kelompok kontrol, rotenon, dan semua perlakuan secara lengkap ditunjukkan pada gambar 5.4.



Gambar 5.4 Perbandingan Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella Asiatica*) terhadap Kadar MDA

Kadar MDA tertinggi pada kelompok rotenon dan yang terendah pada kelompok kontrol. Pada kelompok perlakuan P2 memiliki kadar SOD yang paling rendah dibandingkan P1 dan P3. Adanya notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan. (n=5)

Gambar 5.4 menunjukkan hasil analisis uji *One Way Anova* dan *Post Hoc LSD* ada perbedaan rerata kadar MDA secara bermakna ($p\text{-value}=0.00$). kelompok rotenon memiliki kadar MDA yang paling tinggi dibandingkan kontrol dan didapatkan $p\text{-value}=0.00$ sehingga dapat dikatakan ada perbedaan yang bermakna antar dua kelompok tersebut. Pada kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 terdapat penurunan kadar MDA dibandingkan kelompok rotenon, dimana terdapat perbedaan yang signifikan ($p\text{-value}< 0.05$). Kelompok P2 memiliki rerata kadar MDA yang paling rendah dibandingkan P1 dan P3, namun perbedaan rerata kadar MDA tersebut tidak berbeda secara signifikan ($p\text{-value}>0.05$). Perbedaan rerata kadar MDA pada kelompok kontrol dengan P2 dan P3 tidak berbeda secara signifikan ($p\text{-value}>0.05$).

Hasil uraian di atas menunjukkan bahwa dengan paparan rotenon pada saat *pre hatching* dapat meningkatkan kadar MDA pada larva zebrafish. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* dapat menurunkan kadar MDA pada larva zebrafish. Pemberian ekstrak etanol

pegagan (*Centella asiatica*) baik selama 96, 120 dan 144 hpf menghasilkan penurunan kadar MDA yang tidak berbeda secara signifikan. Jadi hipotesis penelitian ini terbukti yaitu dengan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pre sampai *post hatching* dapat menurunkan kadar MDA larva *zebrafish stunting*.

5.4 Korelasi antara Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai *Post Hatching* terhadap Panjang Badan, Kadar SOD, dan Kadar MDA Larva *Zebrafish Stunting*

Korelasi antar ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap panjang badan, kadar SOD dan kadar MDA dilakukan dengan uji *Pearson correlation*. Hasil korelasi antar variabel tersebut di tampilkan pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 Hasil Uji Korelasi Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Panjang Badan, Kadar SOD, dan Kadar MDA

| Korelasi | Pearson Correlation | <i>p-value</i> | Keterangan |
|--------------------------------|---------------------|----------------|---------------------------|
| Pegagan dengan kadar SOD | 0.951** | 0.00 | Hubungan yang sangat kuat |
| Pegagan dengan kadar MDA | -0.779** | 0.00 | Hubungan yang kuat |
| Pegagan dengan panjang badan | 0.636** | 0.00 | Hubungan yang kuat |
| Kadar SOD dengan panjang badan | 0.793** | 0.00 | Hubungan yang kuat |
| Kadar MDA dengan panjang badan | -0.690** | 0.00 | Hubungan yang kuat |
| Kadar SOD dengan kadar MDA | -0.817** | 0.00 | Hubungan yang sangat kuat |

Berdasarkan pada tabel 5.2 menunjukkan adanya korelasi yang signifikan antar ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap kadar SOD. Nilai koefisien sebesar 0.951 menunjukkan hubungan positif yang sangat kuat, yang berarti dengan pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) sampai 96, 120, dan 144 hpf dapat meningkatkan kadar SOD.

Ada korelasi yang signifikan antar ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap kadar MDA. Nilai koefisien sebesar -0.779 menunjukkan hubungan negatif yang kuat, dimana mengandung arti dengan pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) sampai 96, 120, dan 144 dpf dapat menurunkan kadar MDA.

Korelasi antar kadar SOD terhadap panjang badan didapatkan *p-value* 0.00 yang berarti ada korelasi yang signifikan. Nilai koefisien sebesar 0.793 menunjukkan hubungan positif yang kuat, dimana mengandung arti dengan peningkatan kadar SOD dapat disertai dengan penambahan panjang badan.



BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai Post Hatching terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish Stunting

Berdasarkan gambar 5.1 terlihat pertumbuhan rerata panjang badan kelompok rotenon yang paling rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pada larva zebrafish usia 72 hpf (3 dpf) memiliki rerata panjang badan yang tidak berbeda secara bermakna ($p\text{-value}>0.05$). Hal ini menunjukkan larva zebrafish saat hatching dalam kondisi normal pada semua kelompok.

Pada usia 144 hpf (6 dpf) rerata panjang badan pada kelompok rotenon dengan kontrol memiliki perbedaan yang signifikan dimana secara statistik didapatkan $p\text{-value}<0.05$. Kelompok rotenon diusia 144 hpf (6 dpf) memiliki selisih panjang badan dengan kelompok kontrol sebesar 0.17 ($> 2\text{ SD}$). Pada penelitian ini tidak hanya mengamati panjang badan larva zebrafish tetapi juga memperhatikan rasio panjang kepala dan panjang badan. Didapatkan rasio panjang kepala dan panjang badan sebesar 1 : 5 pada semua kelompok. Hal ini menunjukkan larva zebrafish memiliki proporsi tubuh yang normal, sehingga dapat disimpulkan bahwa larva zebrafish kelompok rotenon mengalami gangguan pertumbuhan panjang badan yaitu stunting. Usia zebrafish 72 hpf (3 dpf) dan 144 hpf (6 dpf) analog dengan usia manusia yaitu bayi baru lahir dan 2 tahun (Sorribes *et al.*, 2013)

Stunting merupakan gangguan pertumbuhan pada anak yang ditandai dengan panjang badan/ tinggi badan dibandingkan dengan umur kurang -2 SD dan baru didiagnosa pada saat anak berusia 2 tahun (WHO, 2017). Selain kriteria tersebut Picasso (2016) menyebutkan anak stunting memiliki panjang badan

normal saat lahir, memiliki proporsi tubuh yang normal dan tidak disertai dengan kelainan kongenital.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rotenon dapat mengganggu pertumbuhan panjang badan pada larva *zebrafish*. Mekanisme rotenon dengan menghambat kompleks I mitokondria mengakibatkan jumlah *Adenosine Triphosphate* (ATP) berkurang sehingga terjadi kegagalan proses pembelahan sel dan apoptosis. Gangguan pada kompleks I mitokondria menyebabkan peningkatan produksi ROS (Li *et al.*, 2003).

Paparan rotenon dapat mempengaruhi homeostatis hormon seperti pada hormon pertumbuhan (*growth hormone*) dan hormon tiroid. Defisiensi atau hiposekresi dari kedua hormon tersebut pada masa anak-anak dapat mengakibatkan terjadinya *critinisme* atau *dwarmfisme*, sedangkan jika terjadi hipersekresi dari *growth hormone* sampai akhir pubertas dapat menyebabkan *gigantisme* (Kopchick *et al.*, 2000).

Berdasarkan hasil analisis statistik uji *One Way Anova* menunjukkan pada larva *zebrafish* usia 144 hpf (6 dpf) perbandingan panjang badan antar kelompok P1 (rotenon + pegagan 96 hpf), P2 (rotenon + pegagan 120 hpf) dan P3 (rotenon + pegagan 144 hpf) dengan kelompok kontrol tidak ada perbedaan yang signifikan ($p\text{-value} > 0.05$). Hal ini dapat disimpulkan bahwa dengan pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai *post hatching* dapat meningkatkan panjang badan larva *zebrafish stunting* pada usia 144 hpf (6 dpf). Angka koreksi panjang badan diusia 144 hpf (6 dpf) sebesar 99.6 %.

Penelitian lain yang dilakukan oleh Bueno *et al* (2017) di daerah pinggiran Brazil dengan melakukan intervensi pada 75 anak *stunting* dengan usia ≤ 24 bulan sebanyak 38 orang (50,7%) dan usia > 24 bulan sebanyak 37 orang (49,3%). Selama penelitian anak *stunting* diberikan makanan seimbang (memenuhi 80% kebutuhan energi) dan lama perawatan selama 41 bulan menghasilkan 18 orang

(24%) pulih dari *stunting* (HAZ > -1). Usia anak *stunting* saat memulai intervensi sangat berpengaruh terhadap keberhasilan pemulihan. Anak usia < 24 bulan memiliki kesempatan yang lebih tinggi untuk pulih menjadi normal, mengingat usia 24 bulan pertama merupakan tahapan kritis perkembangan dimana tubuh anak lebih rentan terhadap efek dari intervensi nutrisi (Fernandes *et al.*, 2012). Hal ini didukung dengan penelitian lain bahwa anak *stunting* pada usia 0 – 2 tahun dengan dilakukan intervensi dengan baik akan memiliki tinggi badan yang normal pada usia 4 – 6 tahun (Aryastami, 2017).

Menurut Chandrika & Kumarab (2015), pegagan (*Centella asiatica*) memiliki kandungan zat gizi makronutrien (karbohidrat, protein, air, serat, dan lemak), mineral (kalium, kalsium, natrium, magnesium, sodium, dan zat besi) dan vitamin. Kandungan zat inilah yang memenuhi kebutuhan nutrisi pada proses pertumbuhan. Penelitian lain menunjukkan pegagan (*Centella asiatica*) mampu meningkatkan fungsi mitokondria sehingga melindungi terjadinya disfungsi mitokondria pada tikus *Alzheimer's*. Pengobatan dengan pegagan (*Centella asiatica*) selama 2 hari secara signifikan terjadi peningkatan ATP pada *Hippocampal Neuron* tikus yang mengalami *Alzheimer's* (Gray *et al.*, 2017).

Hal ini menunjukkan adanya proteksi dari pegagan (*Centella asiatica*) pada larva *zebrafish* akibat paparan rotenon, sehingga tidak ada gangguan pada proses pembentukan ATP di mitokondria dan homeostatis hormon. Ini sejalan dengan hasil satu tim penelitian yang menunjukkan pemberian pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan osifikasi tulang rawan dan tulang keras melalui penurunan kadar IL-6 dan peningkatan kadar IL-10 (Zahara *et al.*, 2018; Nuraenah *et al.*, 2018).

Penelitian sebelumnya dengan pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi BDNF yang merupakan salah satu faktor pertumbuhan yang berperan dalam proliferasi, diferensiasi,

kelangsungan hidup dan fungsi neuron (Ridlayanti *et al.*, 2016). Pernyataan tersebut didukung dengan hasil penelitian Cory'ah *et al.* (2017) menyatakan pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi IGF-1 dan IRS. IGF-1 berperan dalam memediasi pertumbuhan dan perkembangan sel somatik termasuk otot dan tulang pada saat prenatal dan post natal (Wood *et al.*, 2005). Hasil penelitian lain juga menunjukkan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi OPG dan menurunkan ekspresi RANKL (Arianti *et al.*, 2017) serta meningkatkan osifikasi dalam proses pembentukan tulang (Primihastuti *et al.*, 2017).

Penelitian ini membuktikan dengan pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pre sampai post hatching dapat meningkatkan panjang badan larva zebrafish stunting. Lama pemberian pegagan (*Centella asiatica*) selama 120 hpf (5 dpf) dan 144 hpf (6 dpf) memiliki panjang badan yang baik dimana rerata panjang badan mendekati kondisi normal.

6.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai Post Hatching terhadap Kadar Superoksida Dismutase (SOD) Larva Zebrafish Stunting

Berdasarkan hasil analisis statistik uji *One way annova*, didapatkan $p\text{-value} = 0.00$. Ini menunjukkan dengan paparan rotenon dapat menurunkan kadar SOD pada larva zebrafish. Perbandingan kadar SOD antara kelompok rotenon dengan kelompok kontrol dan kelompok P1 (rotenon + pegagan 96 hpf), P2 (rotenon + pegagan 120 hpf) serta P3 (rotenon + pegagan 144 hpf) ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} < 0.05$). Perbandingan kadar SOD antara kelompok P2 (rotenon + pegagan 120 hpf) dan P3 (rotenon + pegagan 144 hpf) dengan kelompok kontrol tidak memiliki perbedaan yang signifikan ($p\text{-value} > 0.05$).

Dapat disimpulkan bahwa dengan pemberian pegagan (*Centella asiatica*) selama 120 dan 144 hpf dapat meningkatkan kadar SOD larva zebrafish stunting mendekati kondisi normal. Ini sejalan dengan hasil satu tim penelitian yang

menunjukkan pemberian pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan kadar antioksidan *catalase* (Darwitri *et al.*, 2018).

Paparan rotenon dapat menurunkan kadar SOD dikarenakan rotenon yang bersifat *endocrine disrupting chemicals* (EDCs) dan menghambat kompleks I mitokondria sehingga terjadi peningkatan produksi ROS. Konsentrasi ROS yang tinggi dapat merusak sel-sel osteoblast dengan mencegah pertumbuhan dan perkembangan sel osteoblas serta menginduksi terjadinya kematian sel (Rao & Rao, 2013). Adanya stres oksidatif mengakibatkan penurunan jumlah osteoblast dan mengaktifkan RANKL sehingga sinyal *osteoclastogenesis* lebih berperan (Nojiri *et al.*, 2011). Penelitian lain menyatakan tikus yang kekurangan Cu/Zn SOD (SOD1) pada sitoplasma mengalami penurunan massa otot, kekuatan tulang serta penurunan kepadatan mineral pada tulang (Smietana *et al.*, 2010)

Ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan akan terjadi stres oksidatif. Adanya produksi ROS dalam tubuh akan merangsang terbentuknya sintesis protein antioksidan endogen. Hal ini merupakan mekanisme tubuh dalam menjaga homeostatis. Enzim antioksidan endogen seperti SOD bertindak sebagai pertahanan garis pertama dalam menghadapi ROS. SOD akan mendismutasi anion superoksida (O_2^*) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2) (Ighodaro & Akinloye, 2017). Antioksidan SOD sangat penting dalam mencegah terjadinya peroksida lipid serta mempertahankan struktur dan fungsi membran sel (Nimse & Pal, 2015).

Pegagan (*Centella asiatica*) yang memiliki kandungan utamanya triterpenoid dapat bertindak sebagai antioksidan (Chandrika & Kumarab, 2015).

Penelitian Khotimah *et al.* (2015) dengan pemeriksaan UPHLC menemukan kandungan asiaticoside pada pegagan (*Centella asiatica*) sebesar 2,94 ppm yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan dan anti inflamasi. Pada penelitian ini menggunakan simplisia pegagan (*Centella asiatica*) yang sama dengan penelitian

Khotimah *et al* (2015), sehingga diasumsikan memiliki kandungan asiaticoside yang sama. Flavanoid yang terkandung dalam pegagan (*Centella asiatica*) berperan sebagai antioksidan yang penting (Chandrika & Kumarab, 2015).

Penelitian lain menyatakan asiaticoside yang terkandung dalam pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan antioksidan enzimatis (SOD, *Catalase* dan GPx) dan non enzimatis (vitamin E dan askorbat) (Kanchi, 2013). Menurut Raju

et al (2015) pegagan (*Centella asiatica*) dapat menstabilkan radikal bebas dengan cara *free radical scavenger*. Pegagan (*Centella asiatica*) dapat memodulasi antioksidan endogen melalui peningkatan ekspresi NRF2 (Gray *et al.*, 2016).

NRF2 merupakan faktor transkripsi yang mengatur respon antioksidan di dalam tubuh. NRF2 akan aktif jika diinduksi dengan keadaan stres oksidatif (Li & Kong, 2009).

6.3 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai Post Hatching terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Larva Zebrafish Stunting

Hasil analisis statistik pada penelitian ini dengan menggunakan uji *One way annova* didapatkan *p-value* 0.00 Ini menunjukkan dengan paparan rotenon dapat meningkatkan radikal bebas ditandai dengan peningkatan kadar MDA.

Perbandingan kadar MDA pada kelompok kontrol dengan P2 dan P3 tidak berbeda secara signifikan (*p-value*>0.05). Dapat disimpulkan bahwa dengan pemberian pegagan (*Centella asiatica*) selama 120 hpf (5 dpf) dan 144 hpf (6 dpf)

lebih baik dalam menurunkan kadar MDA larva *zebrafish stunting*.

Salah satu aldehid yang dihasilkan melalui proses peroksida lipid adalah MDA. MDA merupakan produk peroksida lipid yang paling mutagenik dan banyak digunakan sebagai biomarker dalam penelitian radikal bebas (Ayala *et al.*, 2014).

ROS dengan jumlah yang banyak di dalam tubuh akan memicu timbulnya penyakit.

Stres oksidatif dalam tubuh dapat dihambat dengan mengonsumsi makanan yang mengandung antioksidan seperti pegagan (*Centella asiatica*). Hasil penelitian lain dengan pemberian air rebusan pegagan (*Centella asiatica*) yang mengandung flavonoid sebagai antioksidan secara signifikan dapat menekan peroksida lipid sehingga terdapat penurunan kadar MDA (Mughtaromah *et al.*, 2016).

Pegagan (*Centella asiatica*) secara signifikan dapat menurunkan kadar MDA dan meningkatkan enzim antioksidan seperti SOD, *catalase* dan *glutathione peroksidase* sehingga dapat melindungi tubuh dari efek negative ROS (Choi *et al.*, 2016). Pegagan (*Centella asiatica*) bekerja sebagai *scavenger* radikal bebas superoksida, hidrogen peroksida dan nitrit oksida (Sugunabai *et al.*, 2015). Hal ini yang menyebabkan penurunan produksi ROS dalam tubuh sehingga disertai penurunan kadar MDA. Menurunnya kadar MDA menunjukkan adanya hambatan terhadap peroksida lipid.

6.4 Korelasi Antara Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre Sampai Post Hatching dengan Panjang Badan, Kadar SOD, dan Kadar MDA Larva Zebrafish Stunting

Hasil analisis statistik uji korelasi menggunakan *Pearson* menunjukkan korelasi antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dengan kadar SOD menunjukkan hubungan positif yang sangat kuat. Hal ini menunjukkan bahwa dengan pemberian pegagan (*Centella asiatica*) sangat berhubungan dengan peningkatan kadar SOD. Kandungan triterpenoid pada pegagan (*Centella asiatica*) dapat memberikan efek sebagai antioksidan (Rahman *et al.*, 2013). SOD merupakan antioksidan enzimatik yang paling kuat di dalam sel dan komponen sistem pertahanan baris pertama terhadap ROS (Ighodaro & Akinloye, 2017). Dengan kondisi homeostatis antara oksidan dan anti oksidan maka semua proses

metabolisme sel dalam tubuh berjalan dengan normal dan proses pertumbuhan berlangsung dengan baik.

Korelasi antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap kadar MDA memiliki hubungan negatif yang kuat. Ini menunjukkan dengan pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat menurunkan kadar MDA.

Korelasi antar variabel tersebut lebih rendah dibandingkan kekuatan korelasi pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dengan SOD. Hal ini disebabkan pegagan (*Centella asiatica*) lebih berperan langsung sebagai antioksidan dan *radical scavenger*. Pegagan (*Centella asiatica*) memiliki kemampuan sebagai *scavenger* radikal bebas seperti superoksida, hidrogen peroksida dan nitrit oksida (Sugunabai *et al.*, 2015).

Korelasi antar kadar SOD dengan panjang badan memiliki hubungan positif yang kuat. Hal ini menunjukkan bahwa variabel tersebut memiliki peranan yang penting terhadap pertumbuhan khususnya pertumbuhan tulang (panjang badan). Sejalan dengan hasil penelitian dengan adanya peningkatan kadar SOD pada kelompok perlakuan menghasilkan 42% larva *zebrafish* yang memiliki panjang badan normal.

Tulang adalah jaringan dinamis yang terus diperbaharui sepanjang hidup melalui proses remodeling tulang yang terdiri *osteoblast* (pembentukan tulang) dan *osteoclas* (absorpsi tulang). Kondisi stres oksidatif dapat mempengaruhi absorpsi tulang (*osteoclast*) yang patologis (Oevisi *et al.*, 2011). Tikus yang mengalami defisiensi SOD1 (CuZn-SOD) mengalami kerapuhan tulang akibat terganggunya proliferasi *osteoblast* (Nojiri *et al.*, 2011).

Selama diferensiasi *osteoclast* yang diinduksi RANKL terjadi sedikit peningkatan ekspresi SOD1 dan tidak ada ekspresi SOD3. Ini menunjukkan fungsi SOD1 dikompensasi oleh antioksidan lainnya. Oleh karena itu, kemungkinan

SOD2 mitokondria adalah enzim SOD yang memiliki peranan penting dalam diferensiasi *osteoclast* dengan mengurangi stres oksidatif seluler (Kim *et al.*, 2017). Hal ini sesuai dengan penelitian Tao-Gou *et al.* (2014) menyatakan antioksidan SOD2 diperlukan untuk mempertahankan diferensiasi *osteoclast*. *Osteoclast* merupakan sel yang berinti dan berasal dari sel monosit/makropag.

6.5 Implikasi Hasil Penelitian dalam Asuhan Kebidanan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan membuat model *stunting* pada larva *zebrafish* dengan paparan rotenon pada saat intauterin. Rotenon merupakan salah satu bahan toksik yang digunakan sebagai pestisida. Sebagian besar rakyat Indonesia adalah petani atau pekebun yang sudah terbiasa menggunakan pestisida. Penggunaan pestisida yang tidak hati-hati membuat lingkungan tercemar sehingga dapat mempengaruhi pertumbuhan pada anak khususnya pada ibu yang sedang hamil, dimana janin di dalam rahim dapat terganggu proses pertumbuhannya sehingga menimbulkan anak *stunting*.

Stunting didiagnosa pada umumnya saat anak berusia 2 tahun dimana diketahui panjang badan/tinggi badan berdasarkan umur kurang -2 SD. Banyak ibu-ibu ataupun orang tua yang belum mengerti tentang *stunting* (perawakan pendek) sehingga masyarakat belum banyak mengerti untuk memantau pertumbuhan anaknya. Bidan yang mempunyai tugas dan wewenang memberikan pelayanan kebidanan pada wanita dan balita hendaknya selalu memberikan edukasi tentang pentingnya pemantauan pertumbuhan dan perkembangan anak balita serta upaya pencegahan *stunting* melalui gerakan 1000 hari pertama kehidupan.

Pemantauan tumbuh kembang anak dapat dilakukan di pelayanan posyandu atau pun di puskesmas dengan secara rutin menimbang dan mengukur panjang badan/tinggi badan anak balita serta didokumentasikan dengan baik dan

benar pada KMS/ buku KIA. Adanya pendokumentasian yang baik, tentu bidan dapat mengetahui gangguan pertumbuhan pada bayi/ balita secara dini.

Penanganan *stunting* yang dilakukan lebih awal akan menghasilkan panjang badan/ tinggi badan kembali normal. Balita *stunting* yang tidak teratasi akan menyebabkan dewasa *stunting* dan akhirnya akan menghasilkan keturunan yang memiliki risiko *stunting*.

Salah satu upaya mencegah *stunting* dengan menjaga lingkungan yang bersih dan aman dari bahan toksik (pestisida), pemenuhan nutrisi saat kehamilan dan setelah melahirkan, pemberian ASI eksklusif pada bayi dan pemberian makanan tambahan yang tepat pada bayi > 6 bulan.



BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan secara umum bahwa ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pre sampai post hatching dapat meningkatkan panjang badan, kadar *superoksida dismutase* dan menurunkan kadar *malondialdehid* larva *zebrafish stunting* yang diinduksi rotenon. Secara khusus dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pre sampai post hatching dapat meningkatkan panjang badan larva *zebrafish stunting* usia 144 hpf (6 dpf).
2. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pre sampai post hatching dapat meningkatkan kadar *superoxide dismutase* (SOD) larva *zebrafish stunting* usia 144 hpf (6 dpf).
3. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pre sampai post hatching dapat menurunkan kadar *malondialdehid* (MDA) larva *zebrafish stunting* usia 144 hpf (6 dpf).
4. Terdapat korelasi positif yang sangat kuat antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap SOD, serta terdapat korelasi negatif yang kuat antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap MDA.

7.2 Saran

Adapun saran yang dapat disampaikan oleh peneliti adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang uji toksisitas dari pemberian ekstrak pegagan.

2. Perlu dilakukan penelitian uji klinis dengan melibatkan inter profesi sehingga ekstrak pegagan dapat di aplikasikan ke manusia.



DAFTAR PUSTAKA

Alaiya, S., Andri & Lana A.E. 2014. Inhibisi Radikal Bebas oleh Pegagan (*Centella asiatica*) ala "Pan's CaKes" (Pegagan sebagai Camilan Kesehatan) melalui Penurunan *Malondialdehyde* (MDA) untuk Alternatif Terapi Penyakit Degeneratif Demensia pada Tikus Tua (*Rattus norvegicus*) diduga Demensia. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. (Tesis). Universitas Islam Malang. Malang.

Alaiya, S., Athiroh, N., & Santoso, H. 2015. Peran Air Perasan Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap SOD pada Tikus. *Biosaintropis (Bioscience-Tropic)*, 1(1): 35–45.

Alessio, H., Ann, H.M. 2006. *Oxidative Stress, Exercise and Aging*. London : Imperial College Press.

Aly, G. S., Shaalan, A. H., Mattar, M. K., Ahmed, H. H., Zaki, M. E., & Abdallah, H. R. 2014. Oxidative Stress Status In Nutritionally Stunted Children. *Egyptian Pediatric Association Gazette*, 62(1): 28–33.

Aoyama, Y., Moriya, N., Shingo, T., Tomoko, T., Hiroshi, H., & Shingo M. 2015. A Novel Method for Rearing Zebrafish by Using Freshwater Rotifers (*Brachionus calyciflorus*). *ZEBRAFISH*, 12 (4): 288-295

Astuti, S. 2012. Isoflavon Kedelai dan Potensinya sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi dan Industri Hasil Pertanian*, 13 (2).

Ariati, L. I. P., Ali, M., & Kalsum, U. 2017. Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi *Osteoprotegerin* (OPG) dan *Receptor Activator Nuclear KAPPA-B Ligan* (RANKL) pada Stunting Larva Zebrafish (*Danio rerio*) yang diinduksi Rotenon, (Tesis). Universitas Brawijaya.

Aryastami, N.K. 2017. Pertumbuhan Usia Dini Menentukan Pertumbuhan Hingga Usia Pra-pubertas (Studi Longitudinal IFLS 1993-1997-2000). (Desertasi). Universitas Indonesia.

Ayala A., Munoz M.F., & Arguelles S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanism of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014 : 1-31.

Badham, J & Sweet L. 2010. Stunting : an overview, *Sight Life*. 3 : 40-47

Black, R. E., Victora, C. G., Walker, S. P., Bhutta, Z. A., Christian, P., de Onis, M., et al. 2013. Maternal And Child Undernutrition And Overweight In Low-Income And Middle-Income Countries. *Lancet*, 2013 (382):427–51.

Bobak, L & Jensen. 2005. *Keperawatan Maternitas*. EGC : Jakarta

BPOM RI. 2010. Serial Data Ilmiah Terkini Tumbuhan Obat dalam Daftar Obat Indonesia. *Pegagan Centella Asiatica (L) Urban*. Jakarta: BPOM RI

Bueno, N. B., Lisboa, C. B., Clemente, A. G., Antunes, R. T., Sawaya, A. L., & Florencio, T. T. 2017. Effectiveness Of A Stunting Recovery Program For Children Treated In A Specialized Center. *Pediatric Research*, **321** : 11-14

Carriere, C., Kang, N., & Nies, L. 2014. Neuroprotection by Valproic Acid in an Intrastratial Rotenone Model of Parkinson's Disease. *Neuroscience*, **8** (12) :114-121

Chandrika, U. G., & Kumarab. 2015. *Gotu Kola (Centella asiatica): Nutritional Properties and Plausible Health Benefits. Advances in Food and Nutrition Research*. 1st ed., Vol. 76. Elsevier Inc.

Cogill, B. 2003. Anthropometric Indicators Measurement Guide. Revised edition. Washington, D.C., Academy for Educational Development [AED], Food and Nutrition Technical Assistance Project, 92

Choi M.J., Zheng H.M., Kim J.M., Lee K.W., Park Y.H., & Lee D.H. (2016). Protective effects of *Centella asiatica* leaf extract on dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats. *Molecular Medicine Reports*.14, 4521-4528.

Cory'ah, F.A., Nurdiana., & Khotimah, H. 2017. Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pada Model Stunting Larva Zebrafish (*Danio rerio*) dengan Induksi Rotenon Melalui Ekspresi *Insuline Like Growth Factor-1* (IGF-1) dan *Insulin Receptor Substrat* (IRS). (Tesis). Universitas Brawijaya

Dahlan, M.S. 2011. *Statistik Untuk Kedokteran & Kesehatan* Edisi Kelima. Jakarta : Salemba Medika.

Damaiyani, J., & Metusula, D. 2010. Fenologi Perkembangan Bunga *Centella Asiatica* dan Studi Waktu Pematangan Pollen Pada Berbagai Stadia. *Jurnal Hayati*. **7** : 75-78.

Darwitri., Ali, M., & Nurdiana. 2018. Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pada Masa Pre Sampai Dengan Post Hatching Terhadap Pajang Badan, *Catalase* dan *Malondialdehyde* Larva Zebrafish (*Danio rerio*) Stunting. (Tesis). Universitas Brawijaya.

De-Benedetti, F., Rucci, B., Del-Fattore, A., Peruzzi, B., Paro, P., 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

de Onis, M., & Branca, F. 2016. Childhood Stunting: A Global Perspective. *Maternal and Child Nutrition*, **12** : 12-26.

Dewey, K. G., & Begum, K. 2011. Original Article Long-Term Consequences Of Stunting In Early Life. *Maternal & Child Nutrition*, **7** : 5-18.

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, H., Prins, G.G., Soto, A.M., Zoeller, R.T., and Gore, A.C. 2009. Endocrine-Disrupting Chemicals : An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine reviews*. **30**(4): 293-342

EPA. 2007. Registration Eligibility Decision For Rotenone. United States Preventive Services Task Force. EPA 739-R-07-005 Pic Su Agency.

Ferrari, F. B. M. 2002. Impact of Micronutrient Deficiencies on Growth: The Stunting Syndrome, **46**(suppl 1): 8–17

Fernandes MB, López RV, & Albuquerque MP. 2012. A 15-year study on the treatment of undernourished children at a nutrition rehabilitation centre (CREN), Brazil. *Public Health Nutr*, **15**: 1108-16..

Fuji, J., Luchi, Y., & Onaka, Y. 2005. Review: Fundamental Roles Of Reactive Oxygen Species And Protective Mechanisms In The Female Reproductive System. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **3**: 43

Gnanapragasam, A., Yogeeta, S., Subhashini R., Ebenezer K., Sathish V. & Devaki T. 2007. Adriamycin induced myocardial failure in rats: protective role of centella asiatica. *Molecular and cellular biochemistry*, **294**(1): 55-63.

Gray N.E, Harris C.J, Quinn J.F, & Soumyanath A. 2016 Centella asiatica modulates antioxidant and mitochondrial pathways and improves cognitive function in mice. *J Ethnopharmacol*, **180**: 78-86.

Gray, N.E., Zweig, J.A., Matthews, D.G., Caruso, M., & Quinn, J.F. 2017. Centella asiatica Attenuates Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in A β -Exposed Hippocampal Neurons. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **124** :pp 1-8

Hanum, S., Aris, W. M., & Rahayu, M. 2016. Pengaruh Ekstrak Pegagan (Centella asiatica) terhadap Ekspresi Tirosin Hidroksilase (TH) serta Aktivitas Lokomotor Ikan Zebra (Danio rerio). *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, **29**(2) : 99–103.

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

Hoage, T., Ding Y. , & Xiaolei Xu. 2012. Quantifying Cardiac Functions in Embryonic and Adult Zebrafish. *Methods Mol Biol*, **843**: 11–20

Ighodaro, OM & Akinloye, OA. (2017). First line defence antioxidant-superoxide (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. **9**(01): pp 1-7

Jahan, R., Hossain, S., Seraj, S., Nasrin, D., Khatun, Z., Das, P.R & Rahmatullah, M. 2012. Centella asiatica (l) urb. Ethnomedicinal Uses and Their Scientific Validations. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. **6**(4) : 261-270

James, J.T. & Dubery, I.A. 2009. Pentacyclic Triterpenoids From The Medicinal Herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules*, **14** (1): 135-149

Jamil, S., Nizami, Q., & Salam, M. 2007. *Centella asiatica* (linn.) Urban : A review. *Natural Products Radiance*, **6** : 158-170

Joshi, K., & Chaturvedi, P. 2013. Therapeutic Efficiency of *Centella Asiatica* (L) Urb. An Underutilized Green Leafy Vegetable: An Overview. *International Journal of Pharma and Bio Science*, **4**(1): 135-149

Kanchi, A.P. 2013. Effect of *Centella Asiatica* (Gotu kola) on the antioxidant enzyme activities and glutathione levels in different regions of rat brain during pentylenetetrazole-induced epilepsy. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, **4**(1): 2324-2334.

Kementrian kesehatan RI. 2016. Info. *Situasi Balita Pendek*, 2442–7659.

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

Khotimah, H.; Sumitri, S.B.; Ali, M & Widodo, M. Aris. 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): 22-27.2

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

Kim, H., Lee, Y. D., Kim, H.J., Lee, Z. H., & Kim, H. H. 2017. SOD2 and Sirt3 Control Osteoclastogenesis by Regulating Mitochondrial ROS. *Journal of Bone and Mineral Research*, **32** (2) : 397-406

Kopchick J.J & Andry J.M. 2000. Growth hormone, GH receptor, and signal transduction. *Molecular genetics and metabolism*, **72** (1) : 293-314

Kusumawati, E., Rahardjo, S., & Sari, H.P. 2015. Model Pengendalian Faktor Risiko Stunting pada Anak bawah Tiga Tahun. *Kesmas: National Public Health Journal*, **9**(3): 249-256

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

Laron, Z. 2001. Insulin-like growth factor 1(IGF-1): a growth hormone. *Molecular Pathology*, **54**(5): 311-316.

Li, H., Gong, X., Zhang, L., Zhang, Z., Luo, F., Zhou, Q., & Wan, J. 2009. Madecassoside Attenuates Inflammatory Response On Collagen-Induced Arthritis In Db/a1 Mice. *Phytomedicine*, **16** (6): 538-546.

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.

Ling, N. 2003. Rotenone: A Review Of Its Toxicity And Use For Fisheries Management. New Zealand Departement of Conservation. *Science for Conservation*, 211.

Li W, & Kong A N. 2009. Moleculer of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog*, **48**(2): 91-104.

Martorell R, & Zongrone, A. 2012. Intergenerational Influences On Child Growth And Undernutrition. *Pediatric Perinatology Epidemiol*, **26** (1): 302-14.

MCA. Indonesia. 2010. Stunting dan Masa Depan Indonesia. pp. 2-5

Muchtaromah, B., Ahmad, M., Romaidi, S., Bahri, S., & Kumalasari, H.P. 2015. Dosis dan lama pemberian pegagan terhadap penurunan SOD dan MDA serta peningkatan histologi otak pada tikus. *Jurnal Teknologi UTM*, **78**(5): 57-61

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., & Rodwell, V.W. 2003. *Biokimia Harper* edisi 25. EGC: Jakarta.

Musarofah. 2015. *Tumbuhan Antioksidan*. Bandung: PT. Remaja Rosdakarya

Muthusami, S., Ramachandran, I., Muthusami, B., Vasudevan, D., Parbu, V., Subramaniam, V., Jagadeesan, A., & Narasimhan, S. 2005. Ovariectomy Induced Oxidative Stress and Impairs Bone Antioxidant System in Adult Rats. *Clinica Chimica Acta*, **79**(1): 4-7

Nojiri, H., Saita, Y., Morikawa, D., Kobayashi, K., Tsuda, C., & Miyazaki, T. 2011. Cytoplasmic superoxide causes bone fragility owing to low-turnover osteoporosis and impaired collagen cross-linking. *Journal of Bone & Mineral Research*, **26**(11): 2682-94

Nimse, S.B. & Dilipkumar, Pal. 2015. Free radicals, natural antioxidant, and their reaction mechanism. *Royal Society of Chemistry*, **5** : 27986-28006.

Nuraenah, E., Ali, M., & Khotimah H. 2018. 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). Universitas Brawijaya.

Oliveira, BF., Noguera-Machado, J.A., & Chaves, M.M. 2010. The Role of Oxidative Stress in the Aging Process. *The Science World Journal*, **10** : 1121-1128

Ott, K. C. 2006. Rotenone. A Brief Review Of Its Chemistry, Environmental Fate, And The Toxicity Of Rotenone Formulations. Dipetik 15 September 2017. dari www.newmexicotu.org/Rotenon_Summary.pdf.

Oevisi, M.R., Sadeghi, N., Jannat, B., Hajimahmoodi, M., Hadjibabaie, M., & Behfar, A. 2010. Evaluation of antioxidants in bone mineral density of Iranian osteoporotic women. *Iranian Journal of Basic Medical Science*, **14**(2):158-166.

Parichy, D.M., Elizondo, M.R., Mills, M.G., Gordon, T.N. & Engeszer, R.E. 2009. Normal Table Of Postembryonic Zebrafish Development: Staging By Externally Visible Anatomy Of The Living Fish. *Developmental Dynamics*, **238** (12) : 2975-3015

Peter, S. T., Scholl, T. O., Schluter, M. D, Leskiw, M. J., Chen X., & Spur, B.W. 2008. Oxidative stress Early In Pregnancy And Pregnancy Outcome. *Free Radic Res.* **42**(10): 841–8.

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

Pinho, B. R., Santos, M. M., Fonseca-Silva, A., Valentão, P., Andrade, P. B., & Oliveira, J. M. A. 2013. How mitochondrial dysfunction affects zebrafish development and cardiovascular function: An in vivo model for testing mitochondria-targeted drugs. *British Journal of Pharmacology*, **169**(5) : 1072–1090.

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 Science*, **10**(9) : 3713-3721

Prendergast, A. J., & Humphrey, J. H. 2014. The stunting syndrome in developing countries. *Paediatric and International Child Health*, **34**(4): 250-265

Primaditya, V., Ali, M., & Khotimah, H. 2017. Efek Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella Asiatica*) pada Stunting Larva Zebrafish (*Danio rerio*) Akibat Induksi Rotenon melalui Peningkatan Ekspresi *Glucose Transporter 4* (GLUT 4) dan *Osteocalcin*. (Tesis). Universitas Brawijaya

Primihastuti, D., Ali, M., & Kalsum, U. 2017. Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) pada Osifikasi Tulang dan Osteoklastogenesis pada Model Stunting Larva Zebrafish (*Danio rerio*) yang diinduksi Rotenon. (Tesis). Universitas Brawijaya.

Radad, K., Rausch, W.D & Gille, G. 2006. Rotenon induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. *Neurochemistry International*, **49**(4): 379-386

Rahman, M., M.A., Khatun, N., Morshed, P.K., Neogi, S.U.A., Khan, Md. S., Hossan, M.J., Mahal & Jahan R. 2010. A randomized survey of medicinal plants used by folk medicinal healers of sylhet division, Bangladesh. *Advances in Natural and Applied Science*, **4**: 52-62

Rao, L.G & Rao, A.V. 2013. Oxidative stress and antioxidant in the risk of osteoporosis – role of the antioxidant lycopene and polyphenols. *Intech*, **5**: 117-161.

Raju D.C., Victoria T.D., Biji N, and Nikitha G. 2015. Evaluation of Antioxidant Potential of Ethanolic Extract of *Centella asiatica* L. *Research J. Pharm. And Tech*, **8**(9): 1289-1293.

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

Ridlayanti, A., Ali, M., & Khotimah, H. 2016. Proteksi Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) pada Model *Stunting* Larva Zebrafish (*Danio rerio*) yang diinduksi Rotenon Melalui Peningkatan Ekspresi BDNF. (Tesis). Universitas Brawijaya

Rodrigo, R.A.T. 2009. *Oxidative Stress and Antioxidant : Their Role in Human Disease*. New York: Nova Science Publisher.

Santoriello,C.,& Zon,L.I. 2012. Hooked modelling human disease in zebrafish. *The Journal of Clinical investigation*, **122**(7). 2337-2343

Sharif, F., de Bakker,M.A., & Richardson, M.K. 2014. Osteoclast-like cells in early zebrafish embryos. *Cell J*, **16** (2).

Smietana, M.J., Arruda, E.M., Faulkner, J.A., Brooks, S.V.,& Larkin, L.M. 2010. Reactive oxygen species on bone mineral density and mechanics in Cu, Zn superoxide dismutase (Sod1) knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **403**: 140-153

Sorribes,A., Porsteinsson, H., Arnardottir, H., & Juhannesdottir, I. 2013. The ontogeny of sleep-wake cycles in zebrafish : a comparison to humans. *Frontier in Neura Circuits*, **7** (11): 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

Singh, Z., Karthigesu,I.P., Singh,P., Kaur., & Rupinder. 2014. Use of Malondialdehyde as a Biomarker for Assessing Oxidative Stress in Different Disease Pathologies:a Review. *Iranian J Publ Health*, **43** (3) :7-16.

Stewart, C. P., Iannotti, L., Dewey, K. G., Michaelsen, K. F., & Onyango, A. W. 2013. Original Article Contextualising complementary feeding in a broader framework for stunting prevention. *Maternal & Child Nutrition*, **9** : 27–45.

Sugunabai, J., M.Jeyaraj, T., & Karpagam. 2015. Analysis Of Functional Compounds And Antioxidant Activity Of *Centella Asiatica*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4** (8) : 1982-1993

Suryohudoyo,P. 2007. Oksidan, Antioksidan, dan Radikal Bebas. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Unair

Tao, G., Zhang, L., Konermann, A., Zhou, H., & Liu, W. 2014. Manganese superoxide dismutase is required to maintain osteoclast differentiation and fuction under static force. *Scientific Report*, **5** ; 8016

Turner, L., Jacobson, S., & Shoemaker, L. 2007. Risk Assessment for Piscicidal Formulation of Rotenone. Complication Service International, Lakewood. 25

Wardani, D.W.K., Nurdiana, & Khotimah, H. 2017. Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi *Vascular Endotelial Growth Factor* dan *Vascular Endotelial Growth Factor Receptor-2* pada Larva Zebrafish Model *Stunting* Akibat Induksi Rotenon. (Tesis). Universitas Brawijaya.

WHO., 2006. WHO Child growth standart: Methods and development.

_____, 2009. WHO Child growth standarts and the identification of severe acute malnutrition in infants and children. A Joint Statement, Geneva : WHO

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

Wood A.W, Duan C, and Bern H.A.(2005). Insulin-like growth factor signaling in fish. *International Review of Cytology*. 243: pp 215-285.

Widiyanti. E.S. 2014. Kadar Glutathione Peroxidase Plasma yang Rendah Meningkatkan Resiko Abortus Inkomplit Trimester I. (Tesis). Denpasar: Program pascasarjana Ilmu Biomedik Universitas Udayana.

Wijayanti, A.R., Ali, M., & Khotimah, H. 2016. Proteksi Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) Melalui Ekspresi *Hsp60* dan *Bax* Terhadap Model *Stunting* Larva Zebrafish (*Danio rerio*) yang diinduksi Rotenon. (Tesis). Universitas Brawijaya.

Winarsi, H. 2014. *Antioksidan Daun Kapulaga; Aplikasinya di Bidang Kesehatan*. Yogyakarta: Graha Ilmu.

Xu, C. L., R. Qu, J. Zhang, L. F. Li, S., Ma, P. 2013. Neuroprotective Effects of Madecassoside in Early Stage of Parkinson's Disease Induced by MPTP in Rats. *Fitoterapia*, **90** : 112–118.

Xu, X-L., Shang, Y & Jiang, J-G. 2016. Plant Species Forbidden in Health Food and Their Toxic Constituents, Toxicology and Detoxification. *Food & Functions*. **7**(2) : 634-664.

Yuningsih., Ali, M., & Nurdiana. 2017. Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap *Glucosa Transporter 1* (GLUT 1) dan *Osteocalcin* pada *Stunting* Larva Zebrafish (*Danio rerio*). (Tesis). Universitas Brawijaya


Zakiah., Kalsum, U., & Khotimah, H. 2017. Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi ERK ½ Dan Ki67 pada Larva Zebrafish (*Danio rerio*) Model *Stunting* Akibat Induksi Rotenon. (Tesis). Universitas Brawijaya.

Zahara, E., Ali, M., & Khotimah, K. 2018. Efek Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pada Masa *Pre* Sampai Dengan *Post Hatching* Terhadap IL-6,

IL-10 dan Osifikasi Tulang Rawan Pada Larva Zebrafish (*Danio rerio*)
Stunting. (Tesis). Universitas Brawijaya.



Lampiran 1 : Surat 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.



Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjud ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr.H.
NIK. 180746683

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 : Surat Keterangan 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 : 154 /UN10.F08.08/PN/2018

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

Judul : Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pada Masa Pre sampai dengan Post Hatching Terhadap Peningkatan Kadar Superoksida Dismutase dan Penurunan Kadar Malondialdehid pada Stunting Larva Zebrafish (*Danio rerio*)

Penulis : Tri Yuliyani

NIM : 166070400111001

Jumlah Halaman : 78

Jenis Artikel : Tesis (Program Studi Magister Kebidanan)

Kemiripan : 3%

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

11 APR 2018



Ketua Badan Penerbitan Jurnal,

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

Lampiran 3 : Bukti Accepted Jurnal



ACCEPTANCE LETTER

Biomedical & Pharmacology Journal
Published by ORIENTAL SCIENTIFIC PUBLISHING CO.

Dr. S.A. Iqbal
Executive Editor

Postal Address
54, Near Post Office, Thana Street,
Shahjahanabad, Bhopal - 462 001. INDIA.
Contact No.: +91-9893809167, 9893222458
E-mail : micro_drkhan@yahoo.com

S.No. BPJ/2025/18
M/s. Received on 10/04/2018

Dear Dr. **HUSNUL KHOTIMAH**
Laboratory of Pharmacology,
Medical Faculty, Brawijaya University,
Indonesia

(A) Your manuscript **Centella asiatica Increased The Body Length
ThroughThe Modulation of Antioxidant in
Rotenone induced Zebrafish Larvae**

has been accepted for publication in **BIOMEDICAL & PHARMACOLOGY JOURNAL** Vol.11..
No. 2..... 20 18...

(B) To expedite the process of publication please send your subscription charges and of your co-authors
subscription charges **DARWITRI, TRI YULIYANI, EEN NURAEHAH,
EVI ZAHARA, UMI KALSUM, NURDIANA, MOHAMMAD MULJOHAR**

Dated
16-05-2018

For : Executive Editor/Publisher



Centella Asiatica Increased the Body Length Through the Modulation of Antioxidant in Rotenone-Induced Zebrafish Larvae

Darwitri¹, Tri Yuliyani¹, Een Nuraenah¹, Evi Zahara¹, Husnul Khotimah², Umi Kalsum², Nurdiana² and Mohammad Muljohadi Ali²

¹Master of Midwifery, Medical Faculty, Brawijaya University, Indonesia.

²Laboratory of Pharmacology, Medical Faculty, Brawijaya University, Indonesia.

*Corresponding author E-mail: husnul_farmako.fk@ub.ac.id

<http://dx.doi.org/10.13005/bpj/1438>

(Received: 10 April 2018; accepted: 16 May 2018)

Centella asiatica (CA) is herbal medicine that used as traditional medicine including ayurvedic therapy since hundreds years ago. This herb contains pentacyclic triterpenoids such as asiaticoside, madecassoside, Asiatic acid and brahmoside that proved had anti-oxidant and anti-inflammatory properties. This research aims to know the effect of ethanolic extract of CA extract against the length of rotenone-induced zebrafish larvae through the free radicals mechanism. This research used zebrafish larvae until 6 dpf that consists of 5 groups (controls, rotenon 12.5 ppb on 2 hpf-3 dpf, and group treatment given rotenone 12.5 ppb 2 hpf-3 dpf and 5 µg/mL extract with long exposure to start 2 hpf to 4, 5 and 6 dpf respectively). The body length measured on 3-6 dpf using software Image Raster v 3.0 from optilab v 2.0. Malondialdehyde (MDA), superoxide Dismutase (SOD), catalase were measured by ELISA on 6 dpf. The results showed rotenon can inhibit the growth of length > 2 standard deviation (SD) and CA extract may increase the body in 6 dpf which correction value was 99.8%. CA extract significantly decreased the levels of MDA, and increased the level of SOD and catalase (p=0.000). Ethanolic extract of *Centella asiatica* may increase in length through the modulation of oxidative stress.

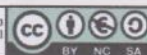
Keywords: *Centella Asiatica*; Catalase; Malondialdehyde; Rotenone; Superoxide Dismutase; Zebrafish.

Rotenone is a natural pesticide extracted from the roots of tropical and sub-tropical plants derived from the leguminosae family and from the genus *Lonchocarpus* in America, and *Derris* in Asia that can be used for insecticides, pesticides and piscisida¹. Rotenone as endocrine disrupting chemicals (EDCs) can disrupt hormonal homeostasis² and decrease the amount of Adenosine Triphosphate (ATP) and increase the production of reactive oxygen species (ROS)³.

ROS interaction with polyunsaturated fatty acid (PUFA) causes lipid peroxidation with one of its products malondialdehyde (MDA)⁴. Antioxidants are reductant compounds that function to lower oxidation reactions and bind to free radicals that can inhibit cell damage⁵. Antioxidants are classified into endogenous antioxidants and exogenous antioxidants. Endogenous antioxidants include superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). SOD is the main antioxidant enzyme that plays a

This is an Open Access article licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), which permits unrestricted Non Commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Published by Oriental Scientific Publishing Company © 2018



role in the elimination of oxidative stress.6 Catalase is an enzyme that plays a role in catalyzing the dismutation of hydrogen peroxide (H₂O₂) into water and oxygen⁷.

Centella asiatica has the main phytonutrients of triterpenoids that act as antioxidants in balancing the oxidants in cells so that oxidative stress can be prevented⁵. In addition *Centella asiatica* contains nutrients such as macronutrients (proteins and carbohydrates) and micronutrients such as vitamins and minerals^{8,9}. *Centella asiatica* significantly reduced levels of malondialdehyde (MDA) and increased antioxidant enzyme levels i.e superoxide, catalase and glutathione peroxidase in diabetic rats¹⁰.

Previous studies have suggested 12.5 ppb rotenone can induced stunting with 98% confidence degree and administration of 5 µg/mL pre hatching (2-72 hpf) significantly increases insulin growth factor-1 (IGF-1) expression and increases body length¹¹. The purpose of this research is to know effect of ethanolic extract of *Centella asiatica* until the sixth day to rotenone-induced zebrafish larvae through the antioxidant mechanism.

MATERIALS AND METHODS

Animal Treatment

The mature wild type zebrafish males and females were identified in the laboratory of Hydrology Faculty of fisheries and Marine Sciences University of Brawijaya Malang, Indonesia. Zebrafish are kept in semistatic 60 L tank¹². The water temperature was kept between 26-28°C, pH 6.8-7.5, and a lighting cycle 14:10 (dark: light)¹³. Fish were fed three times a day (Tetra Bit Color Tropical Flakes, Tetra Sales, Blacksburg, Germany)¹².

The zebrafish embryo was obtained from the fertilization of male and female parent with a ratio of 2:1. Zebrafish embryos 0-2 hpf (hour post fertilization) with criteria round, transparent, fertile, and not moldy. The number of larvae used was 30 larvae/group. All procedures have been approved by the Ethics Committee, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya (No. 403/EC/KEPK/12/2017). Zebrafish embryos were divided into 5 groups : controls (C), Rotenone (R), Rotenone + CA extract for 4,5 and 6 days respectively.

Embryonic Medium

Embryonic medium was made with concentration of 10x by CaCl 0.25 gr, KCl 0.15 gr, NaCl 5 gr, MgSO₄ 0.815 gr and 500 ml of aquadest (Modified from Cold Spring Harbor Laboratory Press)¹⁴.

Extraction of *Centella asiatica*

Centella asiatica was certified from UPT Materia Medica, Batu, Malang East Java, Indonesia. The extraction was done using maceration method with 98% ethanol solvent¹².

Rotenone and Extract Administration

Rotenone sigma (R8875) with purity of =95% dissolved in DMSO (dimethyl sulfoxide 1%) to obtain a stock solution of 2 x 10⁷ µg/L (ppb). Rotenone was given at 12.5 ppb and *Centella asiatica* extract 5 mg/mL. The extracts were stocked with concentrations of 1 mg/mL. The medium was replaced daily¹¹.

The Body Length Measurement

The body length measurements of zebrafish larvae were performed at 3-6 dpf. Larvae were observed using the Olympus SZ61 stereometry microscope that was connected to Optilab software version 2.0. The body length was measured from the tip of the nose (tip of the snout) to the base of the caudal fin using the calibrated Image Raster software version 3.0.15

Measurements of Malondialdehyde

The evaluation of MDA, SOD and Catalase levels was performed on day 6. The zebrafish larvae were euthanized by put in zebrafish larvae into ice water containing 5 parts of ice and 1 part of water for 40 minutes. The temperature of the ice water was held at a temperature of 0°C monitored using a thermometer¹⁶.

Zebrafish larvae (n=30 larvae/group) homogenized using 500 µL Ripa Buffer in glass homogenizer. Homogenate was centrifuged at 4°C, 2500 rpm for 20 min. Supernatant was taken for evaluation procedure. Malondialdehyde, SOD, and Catalase were examined in accordance with the ELISA Kit protocol (Bioassay Laboratory Technology, Shanghai, China), Cat.No E0156Ra (MDA), Cat.No E0168Ra (Cat) N. Cat E0869Ra (Catalase).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by IBM ANOVA SPSS v23.0 and continued by LSD post hoc test with 5% confidence level. Normality

testing was performed using the Shapiro-Wilk test and homogeneity testing was performed using Levene test.

RESULTS AND DISCUSSION

Based on figure 1, at the 3 dpf the growth chart shows adjacent points in all groups. The result of statistical analysis of length comparison at age 3 dpf got p-value equal to 0.247. So it can be concluded that there was no significant difference between all groups. Figure 2 showed that there was significant difference of the body length at 6 dpf among groups (p-value = 0.000). The rotenone

group had the lowest body length compared to the control and treatment groups. This is in accordance with previous studies, where rotenon projections of 2.21 µg/L and 2.75 µg/L for 32 days significantly decreased the length of the body length in rainbow trout¹⁷. Rotenone can decrease bone ossification in zebrafish larvae, which causes damage¹⁸. Increased ROS in bone cells causes bone growth disorders¹⁹. Highly concentration of ROS in the body will induce RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) to interact with RANK thus activating the RANKL pathway that may cause imbalance in the formation process and resorption of the bone²⁰. In addition, the increasing of ROS causes impairment

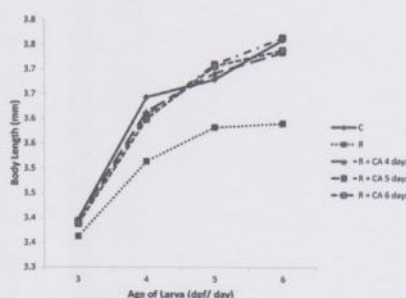


Fig. 1. The average of body length at 3-6 dpf. Rotenone group showed the average of body length had the shortest compared to others. Linear growth of R+CA 4 days, R+CA 5 days, dan R+CA 6 almost reach the control group

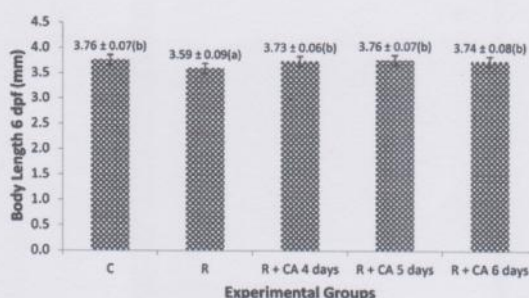


Fig. 2. The average of body length at 6 dpf. There were significant different among the groups (p = 0.000). The group of R+CA 4 days, R+CA 5 days, and R+CA 6 days have the average of body length more than rotenone group and had no significant different to the control group (p>0.05)

in Insulin Growth Factor-I (IGF-I)²¹. IGF-I plays a role in mediating growth and development of somatic cells, including the muscles and bones during prenatal and post natal²².

Rotenone group showed the average of body length had the shortest compared to others. Linear growth of R+CA 4 days, R+CA 5 days, dan R+CA 6 almost reach the control group.

There were significant different among the groups ($p=0.000$). The group of R+CA 4 days, R+CA 5 days, and R+CA 6 days have the average of body length more than rotenone group and had no significant different to the control group ($p>0.05$).

Figure 3 showed that the rotenone group had higher MDA levels and lower SOD and catalase levels. Another study proved that rotenone 30 mg/kg for 60 days in mice significantly increased levels of MDA and reduced endogenous antioxidants such as GSH²³. Rotenone inhibit the mitochondrial

complex I which causes a decrease in the amount of Adenosine Triphosphate (ATP) so that the nucleus fails to divide and apoptosis occurs²⁴. Leakage of complex I results in the increasing of free electrons reacting to oxygen molecules resulting in superoxide (O₂⁻) production²⁵. Superoxide will be converted to hydrogen peroxide (H₂O₂) and O₂ by SOD as an endogenous antioxidant. Hydrogen peroxide will be convert by catalase to H₂O and O₂²⁶. Hydrogen peroxide is not reactive²⁷, but if H₂O₂ reacts with Fe²⁺ or Cu²⁺ (Haber-Weiss and Fenton reaction) to form a highly reactive hydroxyl (OH⁻) radical²⁸. Hydroxyl radicals can attack polyunsaturated fatty acid (PUFA) by lipid peroxidation process to form hydroperoxide. One of the secondary aldehydes produced by lipid peroxidation is Malondialdehyde (MDA)²⁸ which is capable of inactivating many cellular proteins²⁶.

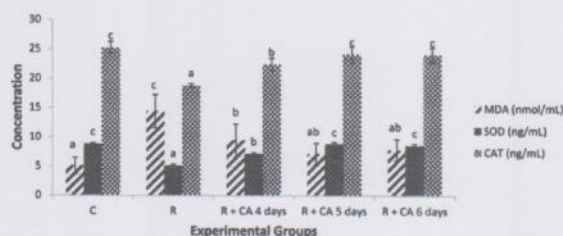


Fig. 3. The average of MDA, SOD and Catalase. There were significant different among the groups ($p=0.000$). CA extract significantly decreased the MDA level, and increased the antioxidant (SOD and Catalase) in zebrafish larvae-induced rotenon

Table 1. The Average of MDA, SOD, and Catalase at 6 dpf Zebrafish larvae

| Group | Control | Rotenon | R + CA 4 days | R + CA 5 days | R + CA 6 days | p-value |
|-------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------|
| Body length 3 dpf (mm) (n=30) | 3.40 ± 0.08a | 3.36 ± 0.08a | 3.40 ± 0.06a | 3.39 ± 0.07a | 3.39 ± 0.06a | 0.247 |
| Body length 6 dpf (mm) (n=30) | 3.76 ± 0.07b | 3.59 ± 0.09a | 3.73 ± 0.06b | 3.76 ± 0.07b | 3.74 ± 0.08b | 0.000 |
| MDA (nmol/mL) (n=5) | 5.07 ± 1.4a | 14.39 ± 2.81c | 9.39 ± 2.83b | 7.09 ± 1.83ab | 7.77 ± 1.83ab | 0.000 |
| SOD (ng/mL) (n=5) | 8.80 ± 0.12c | 5.05 ± 0.21a | 7.07 ± 0.27b | 8.7 ± 0.37c | 8.54 ± 0.32c | 0.000 |
| Catalase (ng/mL) (n=5) | 25.18 ± 1.06c | 18.76 ± 0.31a | 22.34 ± 1.07b | 24.03 ± 1.37c | 23.93 ± 1.27c | 0.000 |



There were significant different among the groups ($p=0.000$). CA extract significantly decreased the MDA level, and increased the antioxidant (SOD and Catalase) in zebrafish larvae-induced rotenone.

Research conducted on stunting children increased MDA levels and decreased the amount of antioxidants such as catalase, SOD and GSH.²⁹ Stunting is a growth disorder in which the body length corresponds to $<-2SD$ age based on the WHO child growth chart.³⁰ Stunting children found normal body length at birth, no congenital abnormalities, and have the same body proportions with normal children³¹.

Based on figure 3, 5 $\mu\text{g/mL}$ *Centella asiatica* extract for 4, 5, and 6 dpf significantly decreased MDA level compared to rotenone group ($p<0.05$). Administration of *Centella asiatica* in this study was given from intrauterine to extra uterine. This refers to the occurrence of stunting starting from within the womb and continues until 2 years (first 1000 days of life)³⁰. Figure 3 also showed that administration of ethanol in extract of *Centella asiatica* for 4,5 and 6 days significantly increased the SOD and Catalase levels ($p<0.05$). Administration of *Centella asiatica* extract for 4,5 and 6 days were able to correct the body length of 99.6%. *Centella asiatica* might increased the body length through the expression of osteoprotegerin (OPG) as receptor for osteoblast and decreasing the expression of RANKL (receptor activator of Nuclear kappa beta ligand) as indicator for osteoclastogenesis.³² Thus, the binding of OPG and RANKL inhibit of osteoclastogenesis process³⁰.

Centella asiatica contains phytonutrients including of triterpenoids, carotenoids, flavonoids, alkaloids, glycosides, and essential oils⁵. The high level of triterpen in *Centella asiatica* can provide antioxidant protection³³. Asiaticoside contain in *Centella asiatica* by UHPLC (ultra high performance liquid chromatography) examination of 2.94 ppm.¹² The ethanolic extract of *Centella asiatica* in this study came from the same simplia as the previous study (Khotimah, et al), so it is assumed to have the same asiaticoside content. In addition, flavonoids contained in *Centella asiatica* can act as an important antioxidant⁵.

Centella asiatica significantly decreases MDA and increases antioxidant enzymes, such

as SOD, glutathione peroxidase, and catalase to protect the body from the ROS reactions³⁴. It has potential as a scavenger of superoxide free radicals, hydrogen peroxide, nitric oxide³⁵. This condition leads to a decrease in ROS production in the body, thus reducing MDA levels. MDA is an poly-unsaturated fatty acid oxidation product by free radicals hydroxyl and metabolite of cell components production³⁶. Another study proved that ethanolic extract of *Centella asiatica* stabilized free radicals by radical scavenger and show H2O2 scavenging activity²⁷. It also increase the activity of SOD, Catalase, and glutathione peroxidase, and glutathione reductase³⁷. *Centella asiatica* increases the expression of the NRF2 gene³⁸, which is the key transcription factor regulating the antioxidant response³⁹.

Decreasing the MDA levels, elevated SOD and Catalase levels were followed by a significant increase in body length between treatment groups compared to the rotenone group ($p\text{-value} < 0.05$). Administration of *Centella asiatica* showed non-significant body length to control ($p\text{-value} > 0.05$) with correction of body length at 6 dpf of 99.6%.

CONCLUSION

It can be concluded that *Centella asiatica* increased the body length in rotenone-induced zebrafish larvae. Administration of 5 $\mu\text{g/mL}$ ethanol extract of *Centella asiatica* can decrease free radical activity with decrease MDA, and increase SOD and catalase level in rotenone-induced zebrafish larvae.

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thanks to Mrs. Ferrida and Mr. Wahyudha Ngatiril Lady for the kindly help in laboratory.

REFERENCES

1. Turner L, Jacobson S, and Shoemaker L. Risk assesment for piscicidal formulation of Rotenone. Compliance Services International. Lakewood. 2007; Pp.15-19.
2. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J.P, Guidice L.C, Hauser R, Prins G.S, Soto A.M, Zoeller R.T, and Gore A.C. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine society scientific

- statement. *Endocrine Review.*, 30(4): 293-342 (2009).
3. Radad K, Rausch W.D, and Gille G. Rotenon induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. *Neurochemistry International.*, 49(4): 379-386 (2006).
 4. Burton G.J, and Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology.*, 25(3): 287-299 (2011).
 5. Chandrika U.G, and Kumarab P.A.A.S.P. Gotu Kola (*Centella asiatica*): Nutritional properties and plausible health benefits. *Advances in Food and Nutrition Research.*, 76: 1043-4526 (2015).
 6. Fuji J, Luchi Y, and Onaka Y. Review: Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reproductive Biology and Endocrinology.*, 3: 43 (2005).
 7. Dominguez L, Sosa-Peinado A, and Hansberg W. Catalase evolved to concentrate H₂O₂ at its active site. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, 500: 82-91 (2010).
 8. Hashim P, Sidek H, Helan M.H.M, Sabery A, Palanisamy U.D, and Ilham M. Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica*. *Molecules.*, 16(2): 1310-1322 (2011).
 9. Joshi K, and Chaturvedi P. Therapeutic efficiency of *Centella asiatica* (L.)Urb. An underutilized green leafy vegetable: An overview. *International Journal of Pharma and Bio Science.*, 4(1): 135-149 (2013).
 10. Giribabu N, Srinivasarao N, Rekha S.S, Muniandy S, and Salleh N. *Centella asiatica* attenuates diabetes induced hippocampal changes in experimental diabetic rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*, 2014: 1-10 (2014).
 11. Cory'ah F.A, Nurdiana, and Khotimah H. Pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pada model Stunting larva zebrafish (*Danio rerio*) dengan induksi rotenon melalui ekspresi Insuline Like Growth Factor-1 (IGF-1) dan Insulin Receptor Substrat (IRS). Universitas Brawijaya, Indonesia. 2017.
 12. Khotimah H, Sumitro S.B, Ali M, and Widodo M.A. Standardized *Centella asiatica* increased brain-derived neurotrophic factor and decreased apoptosis of dopaminergic neuron in rotenone-induced zebrafish. *GSTF Journal of Psychology (JPsyche).*, 2(1): 22-27 (2015).
 13. Avdesh A, Chen M, Martin-iverson M.T, Mondal A., Ong, D., Rainey-smith S, and Martin R.N. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory/ : An Introduction. *Journal of Visualized Experiments.*, 69: 1-8 (2012).
 14. Protocol Zebrafish embryo medium. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2011. http://cshprotocols.cshlp.org/content/2011/8/pdb.rec12478.full?text_only=true. Accessed January 3, 2018.
 15. Primaditya V, Ali M, and Khotimah H. Efek ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pada Stunting larva zebrafish (*Danio rerio*) akibat induksi rotenon melalui peningkatan ekspresi GLUT 4 dan osteocalcin. Universitas Brawijaya, Indonesia. (2017).
 16. Strykowski J.L, and Schech J.M. Effectiveness of recommended euthanasia methods in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.*, 54(1): 81-84 (2015).
 17. Bills T.D, Rach J.J, and Marking L.L. Toxicity of rotenone to developing rainbow trout. U.S Fish and Wildlife Service. United States. Pp. 1-3 (1988).
 18. Primihastuti D, Ali M, and Kalsum, U. Pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pada osifikasi tulang dan osteoklastogenesis pada model stunting larva zebrafish (*Danio rerio*) yang diinduksi rotenon. Universitas Brawijaya, Indonesia. (2017).
 19. Riancho J.A, and Delgado-Calle J. Mecanismos de interaccion osteoblasto-osteoclasto. *Reumatologia Clinica.*, 7: 1-4 (2011).
 20. Ha H, Kwak H.B, Lee S.W, Jin H.M, Kim H.M, Kim H.H, and Lee Z.H. Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclast. *Experimental Cell Research.*, 301(2): 119-127 (2014).
 21. Backeljauw P, Bang P, Dunger D.B, Juul A, Le Bouch Y, and Rosenfeld R. Insulin-like growth factor-I in growth and metabolism. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism.*, 23(1-2): 3-16 (2010).
 22. Wood A.W, Duan C, and Bern H.A. Insulin-like growth factor signaling in fish. *International Review of Cytology.*, 243: 215-285 (2005).
 23. Zou Q, Chen B, Wang X, Wu L, Yang Y, Cheng X, Hu Z, Cai X, Yang J, Sun X, Lu W, Yan H, Chen J, Ye J, Yang J, Sun X, Lu W, Yan H, Chen J, Ye J, Shen J, and Cao P. Sulforaphane protects against rotenone-induced neurotoxicity in vivo: Involvement of the mTOR, Nrf2, and autophagy pathways. *Scientific Reports.*, 6(32206): 1-12 (2016).
 24. Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez J.A, and Robinson J.P. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *Journal of Biological*



- Chemistry*, 27(10): 8516-8525 (2003).
25. Sanders L.H, and Greenamyre J.T. Free Radical Biology and Medicine Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radical Biology and Medicine*, 62: 111-120 (2013).
 26. Birben E, Murat U, Sahiner M.D, Sackesen C, Erzurum S, and Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO Journal*, 5: 9-19 (2012).
 27. Raju D.C, Victoria T.D, Biji N, and Nikitha G. Evaluation of Antioxidant Potential of Ethanolic Extract of *Centella asiatica* L. *Research J. Pharm. And Tech*, 8(9): 1289-1293 (2015).
 28. Ayala A, Munoz M.F, and Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanism of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014; 2014: 1-31.
 29. Aly G.S, Shaalan A.H, Mattar M.K, Ahmed H.H, Zaki M.E, and Abdallah H.R. Oxidative stress status in nutritionally stunted children. *Egyptian Pediatric Association Gazette*, 62(1): 28-33 (2014).
 30. de Onis M, and Branca F. Childhood Stunting: A global perspective. *Maternal and Child Nutrition*, 12: 12-26 (2016).
 31. Picasso B.C. A public health approach to undernutrition in children under five and infants in Euthiopia: An Overview. The University of Arizona (2016).
 32. Ariyati L.L.P, Ali M, and Kalsum, U. Pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap terhadap ekspresi Osteoprotegri (OPG) dan Receptor Activator Nuclear Kappa- β Ligan (RANKL) pada stunting larva zebrafish (*Danio rerio*) yang diinduksi rotenon. Universitas Brawijaya, Indonesia. (2017).
 33. Rahman M, Hossain S, Rahaman A, Fatima N, Nahar T, and Uddin B. Antioxidant activity of *Centella asiatica* (Linn.) Urban/ : Impact of extraction solvent polarity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6): 27-32 (2013).
 34. Choi M.J, Zheng H.M, Kim J.M, Lee K.W, Park Y.H, and Lee D.H. Protective effects of *Centella asiatica* leaf extract on dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats. *Molecular Medicine Reports*, 14: 4521-4528 (2016).
 35. Sugunabai J, Jeyaraj M, and Karpagam, T. Analysis of functional compounds and antioxidant activity of *Centella asiatica*. *World Journal Of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(8): 1982-1993 (2015).
 36. Devlin M.T. Bioenergetic and Oxidative Metabolism in Biochemistry with Clinical Correlations. 5 th ed. Wiley-liss. Canada. 2002; Pp. 590-592.
 37. Chen C.L, Tsai W.H, Chen C.J, and Pan T.M. *Centella asiatica* extract protects against amyloid β_{1-40} induced neurotoxicity in neural cells by activating the antioxidave defence system. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6: 362-369 (2016).
 38. Gray N.E, Harris C.J, Quinn J.F, and Soumyanath A. *Centella asiatica* modulates antioxidant and mitochondrial pathways and improves cognitives function in mice. *J Ethnopharmacol*, 180: 78-86 (2016).
 39. Li W, and Kong A.N. Moleculer of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog*, 48(2): 91-104 (2009).

Lampiran 5 : Poster Pada Acara Seminar Memanfaatkan Obat Herbal Menuju Indonesia Sehat

Centella asiatica Increased The Body Length Through Modulation of Oxidative Stress in Rotenone-induced Zebrafish Larvae



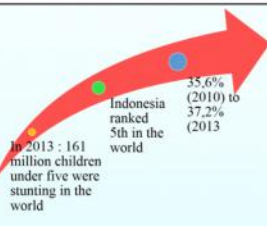
Darwitri^{1,3}, Tri Yuliyani^{1,4}, Een Nuraenah^{1,5}, Evi Zahara^{1,6}, Husnul Khotimah², Umi Kalsum², Nurdiana², and Mohammad Muljohadi Ali²

¹ Master Student of Midwifery, Faculty of Medicine, Brawijaya University, Indonesia. ² Laboratory of Pharmacology, Medical Faculty, Brawijaya University, Indonesia. ³ Politechnic of Health, Ministry of Health Tanjungpinang. ⁴ Banjar District Health Office South Kalimantan. ⁵ Polytechnic of Health, Ministry of Health, Jakarta III. ⁶ Polytechnic of Health, Ministry of Health, Aceh.

INTRODUCTION



Comparison of stunting and normal children



Rotenone as endocrine disrupting chemicals (EDCs) can disrupt hormonal homeostasis and increase the production of reactive oxygen species (ROS).

ROS interaction with polyunsaturated fatty acid (PUFA) causes lipid peroxidation with one of its products malondialdehyde (MDA).

Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) are endogenous antioxidants that plays a role in the elimination of oxidative stress.

Centella asiatica has the main phytonutrients of triterpenoids that act as antioxidants in balancing the oxidants in cells so that oxidative stress can be prevented.

This research aims to know the effect of ethanolic extract of *Centella asiatica* against the length of rotenone-induced zebrafish larvae through the free radicals mechanism

METHOD



Table 1. Experimental Groups

| Groups | 2 hpf - 3 dpf | 4 dpf | 5 dpf | 6 dpf |
|---------------|---------------------------------|------------------|------------------|-------|
| Control (C) | Embryonic Medium | | | |
| Rotenone (R) | Rotenone 12.5 ppb | Embryonic Medium | | |
| R + CA 4 days | Rotenone 12.5 ppb CA 5 µg/mL | CA 5 µg/mL | Embryonic Medium | |
| R + CA 5 days | Rotenone 12.5 ppb CA 5 µg/mL | CA 5 µg/mL | Embryonic Medium | |
| R + CA 6 days | Rotenone 12.5 ppb CA 5 µg/mL | CA 5 µg/mL | | |



The body length measured on 3-6 dpf using software Image Raster v 3.0 from optilab v 2.0

MDA, SOD, and catalase (n=5/group) were measured by ELISA on 6 dpf.

Statistical analysis was performed by IBM ANOVA SPSS v23.0 and continued by LSD post hoc test.

RESULTS AND DISCUSSION

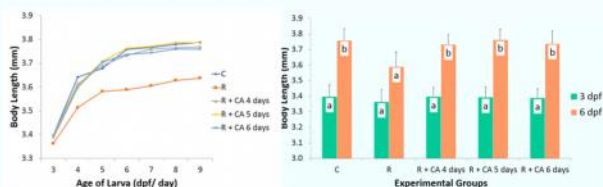


Figure 1. The average of body length at 3-6 dpf

Figure 2. Body length analysis 3 and 6 dpf

- The rotenone group has the lowest body length compared to the control and treatment groups. The difference of body length between control and rotenone group was 0.17 mm (2SD = 0.14 mm). Thus, this condition meet the stunting criteria.
- Rotenone inhibits complex I mitochondria which results in increased production of ROS and a decrease in the amount of ATP. ROS may inhibit osteoblast differentiation and stimulate osteoclastogenesis by increasing RANKL expression.
- Administration of *Centella asiatica* showed non-significant body length to control (p-value > 0.05) with correction of body length at 6 dpf of 99.6%.

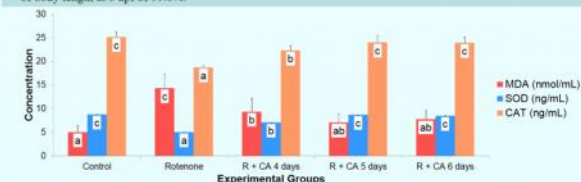


Figure 3. The average of MDA, SOD and Catalase. CA extract significantly decreased the MDA level, and increased the antioxidant (SOD and Catalase) in zebrafish larvae-induced rotenone.

Centella asiatica has potential as a scavenger of superoxide free radicals, hydrogen peroxide, nitric oxide, and hydroxyl. This condition leads to a decrease in ROS production in the body, thus reducing MDA levels. *Centella asiatica* increases the expression of the Nr2f2 gene, which is the key transcription factor regulating the antioxidant response

CONCLUSIONS

Centella asiatica increased the body length in rotenone-induced zebrafish larvae through the modulation of antioxidant role.

REFERENCES

- Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, and 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.
- Waquieer F, Leonting L, Cosam V, Guicheux J, and Wittant Y. 2009. Oxidative stress in bone remodeling and disease. *Trends in molecular medicine*, 15(10): 468-477.
- Suganah J, Jeyaraj M, and Karpagam, T. 2015. Analysis of functional compounds and antioxidant activity of *Centella asiatica*. *World Journal Of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(8): 1982-1993.
- Gray N.E, Harris C.J, Quinn J.F, and Soumyanath A. 2016. *Centella asiatica* modulates antioxidant and mitochondrial pathways and improves cognitive function in mice. *Journal of Ethnopharmacol*, 180: 78-86.

Lampiran 6 : Determinasi Tanaman *Centella asiatica* (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 tera 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, haunya wangi dan rasanya pahit
3. **Nama Simplicia** : *Centellae Folium*/ daun pegagan
4. **Kandungan kimia** : Asiaticoside, thiankunsiside, isothankuniside, madecassoside, brahmoxide, brahminoside, brahmic acid, madsianic 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 sejents, mempunyai kasiat anti lepra (Morbus Hansen). Daun kaki kuda mengandung senyawa glikosida trigerpepnoida, alkaloid hidrokolitin, 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 1 "*. 1977. Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Anonim. *Serial Tanaman Obat " PEGAGAN "*. 2007. Badan POM Republik Indonesia
- Anonim. <http://ipetka.net.cn/id/pegagan>, diakses tanggal 29 Oktober 2010
- Steenis, C.G.G. Van Dr. *FLORA*. 2008. Pradnya Paramita, Jakarta
- Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johnny Ria 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia 1*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia - Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan

Danikian determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya

Batu, 14 Januari 2015
Kepala UPT Materia Medica Batu

Dr. HUSNUL KHOTIMAH, Apt, MKes.
NIP. 19751125 200501 2 001

Lampiran 7 : Laporan Hasil Analisa Zebrafis



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

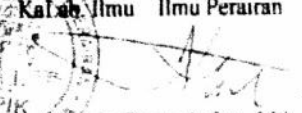
LAPORAN HASIL ANALISA

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 : tertampir pada buku kerja

Malang, 09 November 2012

Kalab Ilmu Ilmu Perairan



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

Lampiran 8 : Data Panjang Badan Larva Zebrafish Usia 3 dpf – 6 dpf










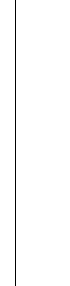
| Usia Larva | Nomor Sampel | Kelompok | | | | |
|------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Kontrol (mm) | Rotenon (mm) | P1 (mm) | P2 (mm) | P3 (mm) |
| 3 dpf | 1 | 3.88 | 3.67 | 3.80 | 3.84 | 3.86 |
| | 2 | 3.75 | 3.69 | 3.72 | 3.70 | 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 |
| | 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 |
| | 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 |
| | 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 |
| | 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 | 3.76 | 3.59 | 3.73 | 3.76 | 3.74 |
| | SD | 0.07 | 0.09 | 0.06 | 0.07 | 0.08 |

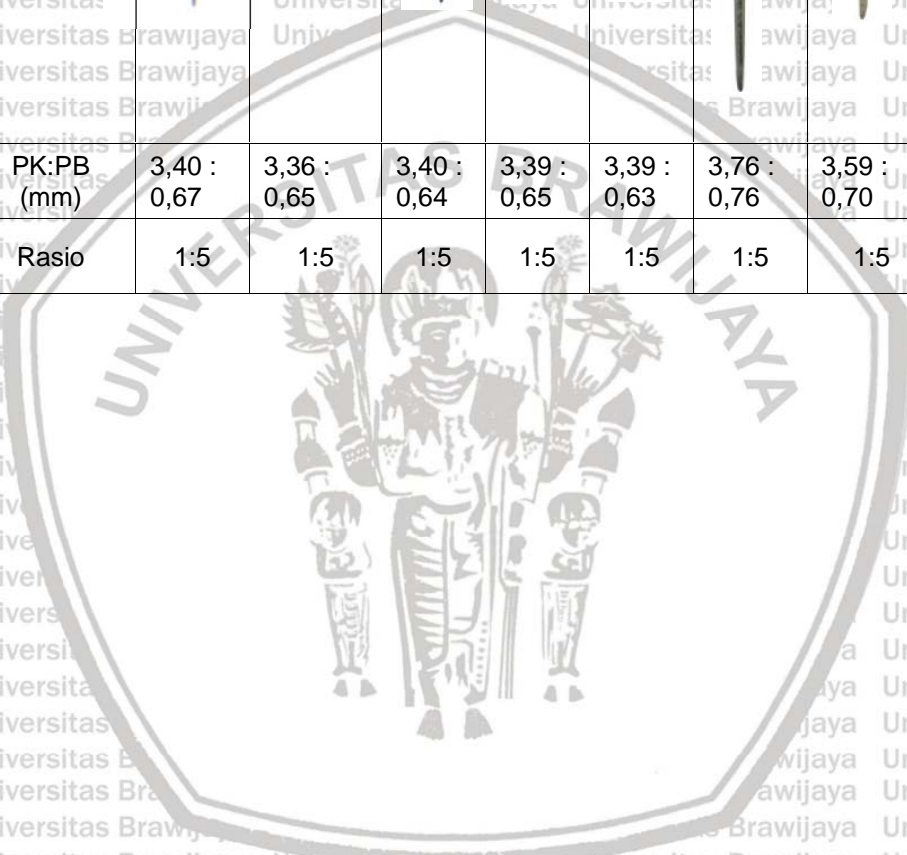
| Usia Larva | Nomor Sampel | Kelompok | | | | |
|------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Kontrol (mm) | Rotenon (mm) | P1 (mm) | P2 (mm) | P3 (mm) |
| 4 dpf | 1 | 3.62 | 3.47 | 3.50 | 3.50 | 3.61 |
| | 2 | 3.67 | 3.44 | 3.53 | 3.49 | 3.62 |
| | 3 | 3.69 | 3.51 | 3.60 | 3.67 | 3.62 |
| | 4 | 3.65 | 3.54 | 3.50 | 3.63 | 3.44 |
| | 5 | 3.61 | 3.57 | 3.53 | 3.70 | 3.50 |
| | 6 | 3.64 | 3.53 | 3.68 | 3.61 | 3.59 |
| | 7 | 3.66 | 3.49 | 3.56 | 3.50 | 3.50 |
| | 8 | 3.62 | 3.59 | 3.55 | 3.57 | 3.52 |
| | 9 | 3.61 | 3.43 | 3.56 | 3.52 | 3.62 |
| | 10 | 3.69 | 3.57 | 3.55 | 3.49 | 3.57 |
| | 11 | 3.74 | 3.47 | 3.62 | 3.69 | 3.66 |
| | 12 | 3.63 | 3.33 | 3.69 | 3.57 | 3.61 |
| | 13 | 3.64 | 3.53 | 3.62 | 3.68 | 3.65 |
| | 14 | 3.75 | 3.46 | 3.62 | 3.68 | 3.65 |
| | 15 | 3.55 | 3.57 | 3.59 | 3.67 | 3.59 |
| | 16 | 3.58 | 3.63 | 3.69 | 3.59 | 3.65 |
| | 17 | 3.63 | 3.50 | 3.64 | 3.50 | 3.62 |
| | 18 | 3.58 | 3.60 | 3.65 | 3.64 | 3.58 |
| | 19 | 3.55 | 3.60 | 3.62 | 3.58 | 3.56 |
| | 20 | 3.63 | 3.56 | 3.61 | 3.65 | 3.60 |
| | 21 | 3.74 | 3.63 | 3.67 | 3.72 | 3.60 |
| | 22 | 3.70 | 3.44 | 3.71 | 3.62 | 3.58 |
| | 23 | 3.51 | 3.43 | 3.70 | 3.64 | 3.64 |
| | 24 | 3.72 | 3.50 | 3.65 | 3.58 | 3.59 |
| | 25 | 3.63 | 3.58 | 3.56 | 3.50 | 3.68 |
| | 26 | 3.63 | 3.55 | 3.68 | 3.62 | 3.68 |
| | 27 | 3.71 | 3.32 | 3.61 | 3.60 | 3.58 |
| | 28 | 3.75 | 3.56 | 3.66 | 3.63 | 3.64 |
| | 29 | 3.61 | 3.59 | 3.62 | 3.62 | 3.60 |
| | 30 | 3.54 | 3.42 | 3.64 | 3.73 | 3.61 |
| | Mean | 3.64 | 3.51 | 3.61 | 3.61 | 3.60 |
| | SD | 0.06 | 0.08 | 0.06 | 0.07 | 0.05 |

| Usia Larva | Nomor Sampel | Kelompok | | | | |
|------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Kontrol (mm) | Rotenon (mm) | P1 (mm) | P2 (mm) | P3 (mm) |
| 5 dpf | 1 | 3.76 | 3.64 | 3.73 | 3.65 | 3.66 |
| | 2 | 3.78 | 3.65 | 3.67 | 3.66 | 3.74 |
| | 3 | 3.72 | 3.57 | 3.65 | 3.80 | 3.70 |
| | 4 | 3.69 | 3.55 | 3.76 | 3.79 | 3.72 |
| | 5 | 3.73 | 3.69 | 3.61 | 3.80 | 3.68 |
| | 6 | 3.77 | 3.69 | 3.67 | 3.68 | 3.66 |
| | 7 | 3.76 | 3.67 | 3.76 | 3.78 | 3.70 |
| | 8 | 3.68 | 3.67 | 3.74 | 3.60 | 3.89 |
| | 9 | 3.72 | 3.51 | 3.76 | 3.56 | 3.83 |
| | 10 | 3.65 | 3.58 | 3.78 | 3.73 | 3.60 |
| | 11 | 3.67 | 3.60 | 3.72 | 3.84 | 3.71 |
| | 12 | 3.66 | 3.39 | 3.63 | 3.78 | 3.71 |
| | 13 | 3.56 | 3.58 | 3.71 | 3.65 | 3.75 |
| | 14 | 3.70 | 3.52 | 3.66 | 3.70 | 3.7 |
| | 15 | 3.74 | 3.60 | 3.63 | 3.67 | 3.72 |
| | 16 | 3.61 | 3.57 | 3.66 | 3.78 | 3.67 |
| | 17 | 3.61 | 3.65 | 3.7 | 3.82 | 3.73 |
| | 18 | 3.47 | 3.66 | 3.72 | 3.73 | 3.65 |
| | 19 | 3.67 | 3.57 | 3.64 | 3.77 | 3.66 |
| | 20 | 3.63 | 3.66 | 3.71 | 3.68 | 3.76 |
| | 21 | 3.56 | 3.50 | 3.66 | 3.63 | 3.64 |
| | 22 | 3.64 | 3.64 | 3.73 | 3.77 | 3.70 |
| | 23 | 3.61 | 3.62 | 3.74 | 3.71 | 3.65 |
| | 24 | 3.85 | 3.44 | 3.72 | 3.71 | 3.64 |
| | 25 | 3.75 | 3.63 | 3.55 | 3.64 | 3.71 |
| | 26 | 3.80 | 3.37 | 3.66 | 3.72 | 3.66 |
| | 27 | 3.53 | 3.34 | 3.7 | 3.71 | 3.67 |
| | 28 | 3.66 | 3.67 | 3.71 | 3.63 | 3.72 |
| | 29 | 3.70 | 3.63 | 3.68 | 3.65 | 3.78 |
| | 30 | 3.68 | 3.59 | 3.68 | 3.62 | 3.75 |
| | Mean | 3.68 | 3.58 | 3.69 | 3.71 | 3.71 |
| | SD | 0.08 | 0.09 | 0.05 | 0.07 | 0.06 |

| Usia Larva | Nomor Sampel | Kelompok | | | | |
|------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Kontrol (mm) | Rotenon (mm) | P1 (mm) | P2 (mm) | P3 (mm) |
| 6 dpf | 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 |
| | 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 |
| | 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 |
| | 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 | 3.7 | 3.67 | 3.75 |
| | 22 | 3.71 | 3.62 | 3.72 | 3.76 | 3.76 |
| | 23 | 3.72 | 3.5 | 3.73 | 3.81 | 3.74 |
| | 24 | 3.75 | 3.6 | 3.75 | 3.68 | 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 | 3.8 | 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 | 3.76 | 3.59 | 3.73 | 3.76 | 3.74 |
| | SD | 0.07 | 0.09 | 0.06 | 0.07 | 0.08 |

Lampiran 9 : Data Rasio Panjang Kepala dan Panjang Badan

| Usia Kelompok | 3 dpf | | | | | 6 dpf | | | | |
|------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Kontrol | Rotenon | P1 | P2 | P3 | Kontrol | Rotenon | P1 | P2 | P3 |
| Gambar Perbesaran 2,5x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| PK:PB (mm) | 3,40 : 0,67 | 3,36 : 0,65 | 3,40 : 0,64 | 3,39 : 0,65 | 3,39 : 0,63 | 3,76 : 0,76 | 3,59 : 0,70 | 3,73 : 0,73 | 3,76 : 0,74 | 3,74 : 0,74 |
| Rasio | 1:5 | 1:5 | 1:5 | 1:5 | 1:5 | 1:5 | 1:5 | 1:5 | 1:5 | 1:5 |



Lampiran 10 :Data Kadar SOD dan MDA dengan metode ELISA

| NO | KELOMPOK | NO. SAMPEL | Konsentrasi SOD (ng/mL) | Konsentrasi MDA (nmol/mL) |
|----|------------------|------------|-------------------------|---------------------------|
| 1 | Kontrol | 1 | 8.991 | 3.986 |
| | | 2 | 8.865 | 6.014 |
| | | 3 | 8.741 | 6.689 |
| | | 4 | 8.680 | 3.311 |
| | | 5 | 8.741 | 5.338 |
| 2 | Rotenon | 1 | 5.086 | 11.419 |
| | | 2 | 5.381 | 12.095 |
| | | 3 | 5.051 | 16.149 |
| | | 4 | 4.911 | 14.122 |
| | | 5 | 4.842 | 18.176 |
| 3 | Perlakuan 1 (P1) | 1 | 6.882 | 12.095 |
| | | 2 | 6.931 | 12.770 |
| | | 3 | 7.541 | 8.041 |
| | | 4 | 7.029 | 6.689 |
| | | 5 | 6.980 | 7.365 |
| 4 | Perlakuan 2 (P2) | 1 | 8.439 | 6.014 |
| | | 2 | 9.247 | 5.338 |
| | | 3 | 8.321 | 7.365 |
| | | 4 | 8.619 | 6.689 |
| | | 5 | 8.865 | 10.068 |
| 5 | Perlakuan 3 (P3) | 1 | 8.380 | 10.743 |
| | | 2 | 8.148 | 8.041 |
| | | 3 | 8.865 | 7.365 |
| | | 4 | 8.865 | 6.689 |
| | | 5 | 8.439 | 6.014 |

Lampiran 11 :Hasil Analisis Statistik

1. Perbandingan Panjang Badan Usia 3 dpf

A. Uji Normalitas

Tests of Normality

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|--------------------|---------------------------------|-----|------|--------------|-----|------|
| | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Panjang Badan 3dpf | .080 | 150 | .021 | .988 | 150 | .201 |

a. Lilliefors Significance Correction

B. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Panjang Badan 3 dpf

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| .633 | 4 | 145 | .640 |

C. ANOVA

ANOVA

Panjang Badan 3 dpf

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

D. Post Hoc LSD

Multiple Comparisons

Panjang Badan 3 dpf
LSD

| (I) Kelompok | | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------|-------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol | Rotenon | .03500 | .01769 | .050 | -.0000 | .0700 |
| | Perlakuan 1 | -.00033 | .01769 | .985 | -.0353 | .0346 |
| | Perlakuan 2 | .00500 | .01769 | .778 | -.0300 | .0400 |
| | Perlakuan 3 | -.00900 | .01769 | .612 | -.0260 | .0440 |
| Rotenon | Kontrol | -.03500 | .01769 | .050 | -.0700 | .0000 |
| | Perlakuan 1 | -.03533 | .01769 | .048 | -.0703 | -.0004 |
| | Perlakuan 2 | -.03000 | .01769 | .092 | -.0650 | .0050 |
| | Perlakuan 3 | -.02600 | .01769 | .144 | -.0610 | .0090 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|---------|--------|------|--------|-------|
| Perlakuan 1 | Kontrol | .00033 | .01769 | .985 | -.0346 | .0353 |
| | Rotenon | .03533* | .01769 | .048 | .0004 | .0703 |
| | Perlakuan 2 | -.00533 | .01769 | .763 | -.0296 | .0403 |
| Perlakuan 2 | Perlakuan 3 | -.00933 | .01769 | .599 | -.0256 | .0443 |
| | Kontrol | -.00500 | .01769 | .778 | -.0400 | .0300 |
| | Rotenon | .03000 | .01769 | .092 | -.0050 | .0650 |
| | Perlakuan 1 | -.00533 | .01769 | .763 | -.0403 | .0296 |
| Perlakuan 3 | Perlakuan 3 | .00400 | .01769 | .821 | -.0310 | .0390 |
| | Kontrol | -.00900 | .01769 | .612 | -.0440 | .0260 |
| | Rotenon | .02600 | .01769 | .144 | -.0090 | .0610 |
| | Perlakuan 1 | -.00933 | .01769 | .599 | -.0443 | .0256 |
| | Perlakuan 2 | -.00400 | .01769 | .821 | -.0390 | .0310 |

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

2. Perbandingan Panjang Badan Usia 6 dpf

A. Uji Normalitas

Tests of Normality

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|---------------------|---------------------------------|-----|-------|--------------|-----|------|
| | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Panjang Badan 6 dpf | .046 | 150 | .200* | .986 | 150 | .138 |

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

a. Lilliefors Significance Correction

B. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Panjang Badan 6 dpf

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 1.082 | 4 | 145 | .368 |

C. ANOVA

ANOVA

Panjang Badan 6 dpf

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|-----|-------------|--------|------|
| Between Groups | .624 | 4 | .156 | 27.470 | .000 |
| Within Groups | .823 | 145 | .006 | | |
| Total | 1.448 | 149 | | | |

D. Post Hoc

Multiple Comparisons

Panjang Badan 6 dpf
LSD

| (I) Kelompok | | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------|-------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol | Rotenon | .16933* | .01946 | .000 | .1309 | .2078 |
| | Perlakuan 1 | .02567 | .01946 | .189 | -.0128 | .0641 |
| | Perlakuan 2 | -.00400 | .01946 | .837 | -.0425 | .0345 |
| | Perlakuan 3 | .02100 | .01946 | .282 | -.0175 | .0595 |
| Rotenon | Kontrol | -.16933* | .01946 | .000 | -.2078 | -.1309 |
| | Perlakuan 1 | -.14367* | .01946 | .000 | -.1821 | -.1052 |
| | Perlakuan 2 | -.17333* | .01946 | .000 | -.2118 | -.1349 |
| | Perlakuan 3 | -.14833* | .01946 | .000 | -.1868 | -.1099 |
| Perlakuan 1 | Kontrol | -.02567 | .01946 | .189 | -.0641 | .0128 |
| | Rotenon | .14367* | .01946 | .000 | .1052 | .1821 |
| | Perlakuan 2 | -.02967 | .01946 | .130 | -.0681 | .0088 |
| | Perlakuan 3 | -.00467 | .01946 | .811 | -.0431 | .0338 |
| Perlakuan 2 | Kontrol | .00400 | .01946 | .837 | -.0345 | .0425 |
| | Rotenon | .17333* | .01946 | .000 | .1349 | .2118 |
| | Perlakuan 1 | .02967 | .01946 | .130 | -.0088 | .0681 |
| | Perlakuan 3 | .02500 | .01946 | .201 | -.0135 | .0635 |
| Perlakuan 3 | Kontrol | -.02100 | .01946 | .282 | -.0595 | .0175 |
| | Rotenon | .14833* | .01946 | .000 | .1099 | .1868 |
| | Perlakuan 1 | -.00467 | .01946 | .811 | -.0338 | .0431 |
| | Perlakuan 2 | -.02500 | .01946 | .201 | -.0635 | .0135 |

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

3. Perbandingan Kadar SOD pada usia 6 dpf

A. Uji Normalitas

Tests of Normality

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-----------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Kadar SOD | .170 | 25 | .060 | .938 | 25 | .131 |

a. Lilliefors Significance Correction

B. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Kadar SOD

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 1.566 | 4 | 20 | .222 |

C. ANOVA

ANOVA

Kadar SOD

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 51.454 | 4 | 12.863 | 175.363 | .000 |
| Within Groups | 1.467 | 20 | .073 | | |
| Total | 52.921 | 24 | | | |

D. Post Hoc

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar SOD
LSD

| (I) Kelompok | | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------|-------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol | Rotenon | 3.74940* | .17129 | .000 | 3.3921 | 4.1067 |
| | Perlakuan 1 | 1.73100* | .17129 | .000 | 1.3737 | 2.0883 |
| | Perlakuan 2 | .10540 | .17129 | .545 | -.2519 | .4627 |
| | Perlakuan 3 | .26420 | .17129 | .139 | -.0931 | .6215 |
| Rotenon | Kontrol | -3.74940* | .17129 | .000 | -4.1067 | -3.3921 |
| | Perlakuan 1 | -2.01840* | .17129 | .000 | -2.3757 | -1.6611 |
| | Perlakuan 2 | -3.64400* | .17129 | .000 | -4.0013 | -3.2867 |
| | Perlakuan 3 | -3.48520* | .17129 | .000 | -3.8425 | -3.1279 |
| Perlakuan 1 | Kontrol | -1.73100* | .17129 | .000 | -2.0883 | -1.3737 |
| | Rotenon | 2.01840* | .17129 | .000 | 1.6611 | 2.3757 |
| | Perlakuan 2 | -1.62560* | .17129 | .000 | -1.9829 | -1.2683 |
| | Perlakuan 3 | -1.46680* | .17129 | .000 | -1.8241 | -1.1095 |
| Perlakuan 2 | Kontrol | -.10540 | .17129 | .545 | -.4627 | .2519 |
| | Rotenon | 3.64400* | .17129 | .000 | 3.2867 | 4.0013 |
| | Perlakuan 1 | 1.62560* | .17129 | .000 | 1.2683 | 1.9829 |
| | Perlakuan 3 | .15880 | .17129 | .365 | -.1985 | .5161 |
| Perlakuan 3 | Kontrol | -.26420 | .17129 | .139 | -.6215 | .0931 |
| | Rotenon | 3.48520* | .17129 | .000 | 3.1279 | 3.8425 |
| | Perlakuan 1 | 1.46680* | .17129 | .000 | 1.1095 | 1.8241 |
| | Perlakuan 2 | -.15880 | .17129 | .365 | -.5161 | .1985 |

4. Perbandingan Kadar MDA pada usia 6 dpf

A. Uji Normalitas

Tests of Normality

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-----------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Kadar MDA | .144 | 25 | .196 | .935 | 25 | .112 |

a. Lilliefors Significance Correction

B. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Kadar MDA

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 1.747 | 4 | 20 | .179 |

C. ANOVA

ANOVA

Kadar MDA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 247.529 | 4 | 61.882 | 12.621 | .000 |
| Within Groups | 98.064 | 20 | 4.903 | | |
| Total | 345.593 | 24 | | | |

D. Post Hoc

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar MDA

LSD

| (I) Kelompok | | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------|-------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol | Rotenon | -9.324600* | 1.400460 | .000 | -12.24591 | -6.40329 |
| | Perlakuan 1 | -4.324400* | 1.400460 | .006 | -7.24571 | -1.40309 |
| | Perlakuan 2 | -2.027200 | 1.400460 | .163 | -4.94851 | .89411 |
| Rotenon | Perlakuan 3 | -2.702800 | 1.400460 | .068 | -5.62411 | -.21851 |
| | Kontrol | 9.324600* | 1.400460 | .000 | 6.40329 | 12.24591 |
| | Perlakuan 1 | 5.000200* | 1.400460 | .002 | 2.07889 | 7.92151 |
| Perlakuan 2 | Perlakuan 2 | 7.297400* | 1.400460 | .000 | 4.37609 | 10.21871 |
| | Perlakuan 3 | 6.621800* | 1.400460 | .000 | 3.70049 | 9.54311 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|----------|------|----------|----------|
| Perlakuan 1 | Kontrol | 4.324400* | 1.400460 | .006 | 1.40309 | 7.24571 |
| | Rotenon | -5.000200* | 1.400460 | .002 | -7.92151 | -2.07889 |
| | Perlakuan 2 | 2.297200 | 1.400460 | .117 | -.62411 | 5.21851 |
| Perlakuan 3 | | 1.621600 | 1.400460 | .261 | -1.29971 | 4.54291 |
| Perlakuan 2 | Kontrol | 2.027200 | 1.400460 | .163 | -.89411 | 4.94851 |
| | Rotenon | -7.297400* | 1.400460 | .000 | - | -4.37609 |
| | Perlakuan 1 | -2.297200 | 1.400460 | .117 | -5.21851 | .62411 |
| Perlakuan 3 | | -.675600 | 1.400460 | .635 | -3.59691 | 2.24571 |
| Perlakuan 3 | Kontrol | 2.702800 | 1.400460 | .068 | -.21851 | 5.62411 |
| | Rotenon | -6.621800* | 1.400460 | .000 | -9.54311 | -3.70049 |
| | Perlakuan 1 | -1.621600 | 1.400460 | .261 | -4.54291 | 1.29971 |
| Perlakuan 2 | | -.675600 | 1.400460 | .635 | -2.24571 | 3.59691 |

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

5. Korelasi Pemberian Pegagan terhadap Kadar SOD

Correlations

| | | Kadar SOD | Pemberian Pegagan |
|-------------------|---------------------|-----------|-------------------|
| Kadar SOD | Pearson Correlation | 1 | .951** |
| | Sig. (1-tailed) | | .000 |
| | N | 20 | 20 |
| Pemberian Pegagan | Pearson Correlation | .951** | 1 |
| | Sig. (1-tailed) | .000 | |
| | N | 20 | 20 |

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

6. Korelasi Pemberian Pegagan terhadap Kadar MDA

Correlations

| | | Pemberian Pegagan | Kadar MDA |
|-------------------|---------------------|-------------------|-----------|
| Pemberian Pegagan | Pearson Correlation | 1 | -.779** |
| | Sig. (1-tailed) | | .000 |
| | N | 20 | 20 |
| Kadar MDA | Pearson Correlation | -.779** | 1 |
| | Sig. (1-tailed) | .000 | |
| | N | 20 | 20 |

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

7. Korelasi Pemberian Pegangan terhadap Pajang Badan

Correlations

| | | Pemberian Pegangan | Panjang Badan Usia 6 dpf |
|--------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|
| Pemberian Pegangan | Pearson Correlation | 1 | .636** |
| | Sig. (1-tailed) | | .000 |
| | N | 120 | 120 |
| Panjang Badan Usia 6 dpf | Pearson Correlation | .636** | 1 |
| | Sig. (1-tailed) | .000 | |
| | N | 120 | 120 |

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

8. Korelasi Kadar SOD terhadap Pangjang Badan

Correlations

| | | Kadar SOD | Panjang Badan Usia 6 dpf |
|--------------------------|---------------------|-----------|--------------------------|
| Kadar SOD | Pearson Correlation | 1 | .793** |
| | Sig. (1-tailed) | | .000 |
| | N | 20 | 20 |
| Panjang Badan Usia 6 dpf | Pearson Correlation | .793** | 1 |
| | Sig. (1-tailed) | .000 | |
| | N | 20 | 20 |

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

9. Korelasi Kadar MDA terhadap Panjang Badan

Correlations

| | | Kadar MDA | Panjang Badan Usia 6 dpf |
|--------------------------|---------------------|-----------|--------------------------|
| Kadar MDA | Pearson Correlation | 1 | -.690** |
| | Sig. (1-tailed) | | .000 |
| | N | 20 | 20 |
| Panjang Badan Usia 6 dpf | Pearson Correlation | -.690** | 1 |
| | Sig. (1-tailed) | .000 | |
| | N | 20 | 20 |

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

10. Korelasi Kadar SOD terhadap Kadar MDA

Correlations

| | | Kadar SOD | Kadar MDA |
|-----------|---------------------|-----------|-----------|
| Kadar SOD | Pearson Correlation | 1 | -.817** |
| | Sig. (1-tailed) | | .000 |
| | N | 20 | 20 |
| Kadar MDA | Pearson Correlation | -.817** | 1 |
| | Sig. (1-tailed) | .000 | |
| | N | 20 | 20 |

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



Lampiran 12 : Dokumentasi Penelitian

Pemeliharaan Hewan Coba Zebrafish di Laboratorium Farmakologi



Menelurkan zebrafish Dewasa



Seleksi Telur dan Pemeliharaan Embrio 2 hpf – 6 dpf



Pembuatan Embrionik Medium, Larutan Rotenon dan Larutan Pegagan



Mengambil Foto Larva Zebrafish dan Mengukur Panjang Badan



Homegenisasi Larva Zebrafish Usia 6 dpf



Pemeriksaan Kadar MDA dan SOD dengan Metode ELISA



RIWAYAT HIDUP

Tri Yuliyani, lahir di Banjarmasin (Kalimantan Selatan),

19 Juli 1980. Anak ketiga dari tiga bersaudara, putri dari

bapak H. Ismid Dachlan dan ibu Hj. Mardiani. Lulus SDN

Kebun Bunga 5 Banjarmasin tahun 1992, lulus SMPN 3

Banjarmasin 1995, dan lulus SMAN 2 Palangkaraya

tahun 1998. Melanjutkan Pendidikan D III Kebidanan di

Poltekkes Banjarmasin dan lulus pada tahun 2001.

Setelah lulus bekerja sebagai bidan kontrak Dinas Kesehatan Propinsi Kalimantan

Selatan dan ditempatkan menjadi bidan di Desa Suato Tatakan Kecamatan

Tambarangan Kabupaten Tapin dari tahun 2001 – 2002. Melanjutkan pendidikan

DIV Bidan Pendidik di Universitas Padjadjaran Bandung tahun 2002 dan lulus

tahun 2003. Tahun 2003 – 2005 bekerja di Akademi Kebidanan Martapura

Yayasan Korpri Kabupaten Banjar sebagai Dosen tetap dan Pudir III. Tahun 2005

diterima sebagai PNS Kabupaten Banjar dan ditempatkan di unit kerja Dinas

Kesehatan Kabupaten Banjar dengan status sebagai PNS DPK Akademi

Kebidanan Kabupaten Banjar (Tahun 2005-2011). Tahun 2012 sampai sekarang

bekerja di Dinas Kesehatan Kabupaten Banjar. Tahun 2016 melanjutkan

pendidikan program studi Magister Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas

Brawijaya Malang.

