

# PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN (*Centella asiatica*) PRE SAMPAI DENGAN POST HATCHING TERHADAP CATALASE, MALONDIALDEHYDE, DAN PANJANG BADAN LARVA ZEBRAFISH STUNTING

TESIS

## **Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH:**  
**DARWITRI**  
**166070400111003**

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

# TESIS

## PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN (*Centella asiatica*) PRE SAMPAI DENGAN POST HATCHING TERHADAP CATALASE, MALONDIALDEHYDE, DAN PANJANG BADAN LARVA ZEBRAFISH STUNTING



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

Dr. dr. Nurdiana, M.Kes  
NIP 195510151986032001  
Anggota



## TESIS

# PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN (*Centella asiatica*) PRE SAMPAI DENGAN POST HATCHING TERHADAP CATALASE, MALONDIALDEHYDE, DAN PANJANG BADAN LARVA ZEBRAFISH STUNTING



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

Dr. dr. Nurdiana, M.Kes  
NIP 195510151986032001  
Anggota Penguji

dr. Brigitta Ida RVC, Sp.A (K), M.Kes  
NIP 197810162014102001  
Anggota Penguji

dr. Pande Made Dwijayasa, SpOG (K)  
NIP 196401141998031002  
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 : Darwitri  
NIM : 166070400111003  
PS : Magister Kebidanan  
Fak : Kedokteran UB



*Karya ilmiah ini kupersembahkan kepada*

*Ayahanda dan Ibunda terkasih*

*Suamiku tercinta Syukrianto*

*Anakku tersayang Gavyn Alhaziq*

## RINGKASAN

**Darwitri**

Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre sampai dengan Post Hatching terhadap Catalase, Malondialdehyde, dan Panjang Badan 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. Nurdiana, M.Kes.

*Stunting* merupakan gangguan pertumbuhan dimana panjang badan sesuai umur <2 SD berdasarkan grafik pertumbuhan anak WHO. Indonesia berada pada peringkat ke lima di dunia untuk jumlah anak *stunting* dengan prevalensi sebesar 37,2% pada tahun 2013. Paparan pestisida menjadi salah satu faktor lingkungan yang dapat menyebabkan terjadinya *stunting*. Rotenon merupakan pestisida alami yang bekerja menghambat kompleks I mitokondria sehingga terjadi peningkatan produksi ROS dan penurunan jumlah ATP. Pada pertumbuhan tulang, ROS dapat menghambat diferensiasi osteoblas dan merangsang osteoklastogenesis sehingga terjadi ketidakseimbangan pada proses formasi dan resorbsi tulang. ROS dapat menyerang *polyunsaturated fatty acid* menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dengan salah satu biomarkernya adalah *Malondialdehyde* (MDA). Untuk menghentikan reaksi oksidasi dibutuhkan senyawa antioksidan. *Catalase* merupakan enzim antioksidan yang yang mengatalisis dismutasi hidrogen peroksidia ( $H_2O_2$ ) menjadi air dan oksigen. Pegagan memiliki fitonutrien utama yaitu triterpenoid yang berperan sebagai antioksidan sehingga stress oksidatif dapat dicegah. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pada masa pre sampai dengan post hatching terhadap peningkatan kadar *Catalase*, penurunan kadar *Malondialdehyde* (MDA), dan peningkatan panjang badan, larva zebrafish (*Danio rerio*) yang diinduksi rotenon.

Metode penelitian ini adalah eksperimen murni dengan desain *post test only control group*. Penelitian ini menggunakan larva zebrafish usia 2 hpf-6 dpf (n=30/kelompok) yang terdiri dari 5 kelompok yaitu kontrol, rotenon 12.5 ppb pada 2 hpf-3 dpf, dan kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3) yang diberikan rotenon 12.5 ppb 2 hpf-3 dpf dan pegagan 5 µg/mL dengan lama paparan mulai 2 hpf sampai 4, 5 dan 6 dpf secara berurutan. Panjang badan diukur pada 3-6 dpf menggunakan software *Image Raster versi 3* dari *Optilab versi 2.0*. *Malondialdehyde* (MDA) dan *catalase* diukur menggunakan ELISA pada 6 dpf (n=5). Analisis statistik dilakukan dengan ANOVA menggunakan SPSS versi 23.0 dan dilanjutkan uji LSD dengan tingkat kepercayaan 5%.

Hasil penelitian menunjukkan, pada usia 3 dpf (analog bayi baru lahir) tidak terdapat perbedaan yang signifikan panjang badan antara semua kelompok (*p-value* = 0,247). Pada usia 6 dpf (analog anak 2 tahun), terdapat perbedaan yang signifikan antar semua kelompok (*p-value* =0,000). Pada kelompok rotenon tejadi hambatan pertumbuhan panjang badan >2SD dibandingkan kontrol. Rotenon menghambat kompleks I mitokondria yang mengakibatkan peningkatan produksi ROS dan penurunan jumlah ATP. ROS dapat menghambat diferensiasi osteoblas dan merangsang osteoklastogenesis dengan meningkatkan ekspresi RANKL. ROS dapat menyerang PUFA menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dengan salah satu biomarkernya adalah MDA. Hal ini ditandai dengan pada kelompok rotenon terjadi penurunan kadar *catalase* dan peningkatan MDA pada usia 6 dpf.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan signifikan panjang badan 6 dpf antara kelompok rotenon dengan semua kelompok perlakuan (*p-value* = 0,000). Pemberian pegagan pada kelompok P1, P2, dan P3 mampu mengoreksi panjang badan sebesar 99,6%. *Centella asiatica* mengandung triterpen berperan sebagai antioksidan. *Centella asiatica* juga mengandung makronutrien seperti karbohidrat, protein, dan serat serta mikronutrien seperti kalsium dan zinc yang diperlukan dalam menunjang pertumbuhan linier.

Pemberian pegagan selama 4, 5, dan 6 hari signifikan meningkatkan kadar *catalase* dan menurunkan kadar MDA dibandingkan kelompok rotenon (*p-value* = 0,000). *Centella asiatica* berpotensi sebagai *scavenger* radikal bebas superoksida, hidrogen peroksida, nitrit oksida dan hidroksil. Aktivitas *scavenger* ini akan menurunkan produksi



ROS di dalam tubuh, yang akan berdampak pada penurunan kadar MDA. *Centella asiatica* dapat meningkatkan ekspresi gen Nrf2 sebagai faktor transkripsi yang dapat meningkatkan regulasi ekspresi gen yang mengkode protein antioksidan. Kesimpulan penelitian ini adalah etanolaik etanol pegagan 5 µg/mL dapat meningkatkan kadar catalase, menurunkan kadar Malodialdehyde, dan meningkatkan panjang badan pada larva zebrafish yang diinduksi rotenon.



Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya

Darwitra

The Effect of Ethanolic Extract of Gotu Kola (*Centella asiatica*) Pre to Post Hatching on Catalase, Malondialdehyde, and The Body Length in Zebrafish Larvae Stunting. Master of Midwifery Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Chairman of Supervisor Commission: Prof. Dr. dr. Muljohadi Ali, Sp.FK; Member: Dr. dr. Nurdiana, M.Kes.

Stunting is a growth retardation in which the body length corresponds to <-2 SD age based on the WHO child growth chart. Indonesia has fifth ranked in the world for the number of children with stunting prevalence of 37.2% in 2013. Exposure to pesticides is one of environmental factor that can cause the occurrence of stunting. Rotenone is a natural pesticide that works to inhibit mitochondria complex I resulting in increased ROS production and decrease the amount of ATP. In bone growth, ROS can inhibit osteoblast differentiation and stimulate osteoclastogenesis resulting in an imbalance in the formation process and bone resorption. ROS can attack polyunsaturated fatty acid to trigger lipid peroxidation with one of its biomarkers is Malondialdehyde (MDA). To stop the oxidation reaction is needed antioxidant compounds. Catalase is an antioxidant enzyme that catalyzes the dismutation of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) into water and oxygen. Gotu kola has a main phytonutrients of triterpenoids that act as antioxidant so that oxidative stress can be prevented. The aim of this research is to prove the effect of ethanol extract of *Centella asiatica* pre to post hatching on increasing Catalase level and decreasing Malondialdehyde (MDA) level, and increasing body length in Rotenone-induced zebrafish (*Danio rerio*) larvae.

This research method was true experiment with post test only control group design. This research used zebrafish larvae until 6 dpf that consists of 5 groups; controls, rotenone 12.5 ppb at 2 hpf-3 dpf, and group treatment (P1, P2, and P3) that given rotenone 12.5 ppb 2 hpf-3 dpf and 5 µg/mL *Centella asiatica* extract at 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) and catalase were measured by ELISA on 6 dpf ( $n = 5$ ). Statistical analysis was performed by ANOVA from SPSS v 23.0 and continued LSD pos hoc test with 5% confidence level.

The results showed, at the age of 3 dpf (analog to newborn) there was no significant difference in body length among all groups ( $p$ -value = 0.247). At the age of 6 dpf (analog 2 years old in child), there is a significant difference between all groups ( $p$ -value = 0.000). In the rotenone group there was a constraint of growth of body length >2SD compared to control. Rotenone inhibits complex I mitochondria which results in increased ROS production and a decrease in the amount of ATP. ROS can inhibit osteoblast differentiation and stimulate osteoclastogenesis by increasing RANKL expression. ROS can attack PUFA to trigger lipid peroxidation with one of its biomarkers is MDA. It is characterized by the rotenone group there is decreased levels of catalase and increased MDA at age 6 dpf.

The results showed that there was a significant difference of 6 dpf body length between rotenone group and all treatment groups ( $p$ -value = 0.000). Administration of *Centella asiatica* extract in P1, P2, and P3 were able to correct the body length of 99.6%. *Centella asiatica* contains triterpenes as antioxidants. *Centella asiatica* also contains macronutrients such as carbohydrates, proteins, and fibers as well as micronutrients such as calcium and zinc necessary to support linear growth.

Provision of pegagan for 4, 5, and 6 days significantly increased catalase levels and lowered MDA levels compared to the rotenone group ( $p$ -value = 0.000). *Centella asiatica* has potential as a scavenger of superoxide free radicals, hydrogen peroxide, nitric oxide and hydroxyl. This scavenger activity will reduce the production of ROS in the body, which will have an impact on the decrease in MDA levels. *Centella asiatica* can increase the expression of the Nrf2 gene which is a transcription factor that can increase the regulation of gene expression that encodes antioxidant proteins.

## SUMMARY



The conclusion of this research the 5 µg/mL ethanol extract of *Centella asiatica* can increase catalase level, decrease Malodialdehyde level, and increase body length in rotenone-induced zebrafish larvae.

## KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “**Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pre sampai dengan Post Hatching terhadap Catalase, Malondialdehyde, dan Panjang Badan Larva Zebrafish Stunting”.**

Dengan selesainya tesis ini penulis menyampaikan rasa hormat dan terimakasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR., MS selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang Periode 2014-2018 beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, atas izin yang diberikan sehingga penulis dapat menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. Dr. dr. Bambang Rahardjo, Sp.OG (K) selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan

Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

5. Prof. Dr. dr. M. Muljohadi Ali, Sp.FK selaku ketua komisi pembimbing dan Dr. dr. Nurdiana, M.Kes selaku anggota pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan masukan dalam proses penyusunan tesis ini.
6. dr. Brigitta Ida RVC, Sp.A (K), M.Kes selaku pengaji I dan dr. Pandem Made Dwijayasa, Sp.OG (K) selaku pengaji II yang telah banyak memberikan masukan dan arahan demi kesempurnaan tesis ini.
7. Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes yang telah memberikan ide, ilmu, arahan, dan motivasi dalam penyusunan tesis ini.
8. Seluruh Dosen Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas ilmu yang diberikan.
9. Orang tua, suami dan anak tersayang atas do'a, pengorbanan, dukungan serta motivasi dalam menyelesaikan tesis ini.
10. Teman-teman *Stunting Group* dan teman-teman Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Angkatan VI yang telah banyak membantu dan saling memberikan motivasi selama menempuh pendidikan.
11. Seluruh pihak yang telah membantu dalam proses penyelesaian tesis ini. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dan keterbatasan pada tesis ini. Oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun sehingga tesis ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Malang, Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI	xii
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	iv
HALAMAN PERUNTUKAN	v
RINGKASAN	vi
SUMMARY	viii
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.2.1 Umum	5
1.2.2 Khusus	6
1.3 Tujuan	6
1.3.1 Umum	6
1.3.1 Khusus	7
1.4 Manfaat Penelitian	7
1.4.1 Manfaat Teoritis	7
1.4.2 Manfaat Praktis	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 <i>Stunting</i>	9
2.1.1 Pengertian <i>Stunting</i>	9
2.1.2 Faktor Penyebab <i>Stunting</i>	12
2.1.3 Mekanisme <i>Stunting</i>	13
2.1.4 Dampak dari <i>Stunting</i>	15
2.1.5 Upaya Penanganan <i>Stunting</i>	16
2.2 Rotenon	17
2.2.1 Pengertian dan Kegunaan	17
2.2.2 Struktur Fisik dan Kimia	17
2.2.3 Mekanisme Kerja Rotenon	18
2.2.4 Toksisitas	22

Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.3 Radikal Bebas dan <i>Malondialdehyde</i> (MDA).....	23	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.3.1 Radikal Bebas.....	23	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.3.2 Peroksidasi Lipid.....	27	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.3.3 <i>Malondialdehyde</i> (MDA).....	28	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.4 Catalase sebagai Antioksidan .....	31	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.4.1 Antioksidan .....	31	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.4.2 <i>Catalase</i> .....	32	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.5 Pegagan.....	34	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.5.1 Klasifikasi Pegagan.....	34	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.5.2 Habitat Pegagan .....	34	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.5.3 Morfologi Pegagan .....	35	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.5.4 Kandungan Pegagan .....	36	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.5.5 Manfaat Pegagan .....	38	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.6 Zebrafish .....	39	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.6.1 Karakteristik Zebrafish .....	39	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.6.2 Perkembangan Zebrafish .....	40	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.6.3 Perawatan Zebrafish.....	42	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
2.6.4 Zebrafish sebagai Model Penelitian .....	43	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP .....	45	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
3.1 Kerangka Teori.....	45	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
3.2 Kerangka Konsep .....	46	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
3.3 Penjelasan Kerangka Konsep.....	47	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
3.4 Hipotesis.....	48	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	50	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.1 Jenis dan Desain Penelitian.....	50	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.2 Populasi dan Sampel.....	50	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.2.1 Populasi Penelitian .....	50	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.2.2 Sampel Penelitian .....	50	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.3 Kriteria Inklusi dan Ekslusi .....	51	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.3.1 Kriteria Inklusi .....	51	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.3.2 Kriteria Ekslusi .....	52	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.3.3 Kriteria Dropout.....	52	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.4 Tempat dan Waktu Penelitian.....	52	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.4.1 Tempat Penelitian .....	52	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.4.2 Waktu Penelitian .....	52	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.5 Variabel Penelitian.....	52	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.6 Definisi Operasional .....	53	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.7 Alat dan Bahan .....	54	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.7.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Zebrafish.....	54	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.7.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Pegagan.....	54	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.7.3 Alat dan Bahan Pembuatan Medium Embriонik .....	54	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.7.4 Alat dan Bahan Pengukuran Kadar <i>Catalase</i> .....	54	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.7.5 Alat dan Bahan Pengukuran Kadar MDA .....	55	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.8 Prosedur Penelitian .....	55	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.8.1 Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio .....	55	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.8.2 Pembuatan Medium Embriонik .....	56	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.8.3 Pembuatan Larutan Rotenon .....	56	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.8.4 Pembuatan Ekstrak Pegagan .....	57	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.8.5 Pembuatan Larutan Pegagan .....	57	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
4.8.6 Perlakuan pada Setiap Kelompok .....	58	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya

4.8.7	Pengukuran Panjang Badan dan Rasio Panjang Kepala.....	59
4.8.8	Pengukuran Kadar Catalase .....	60
4.8.9	Pengukuran Kadar MDA .....	61
4.9	Pengolahan dan Analisis Data .....	62
4.10	Alur Penelitian .....	64
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA .....</b>		<b>65</b>
5.1	Pengaruh Pegagan terhadap Panjang Badan pada Larva Zebrafish Stunting .....	65
5.2	Pengaruh Pegagan terhadap Kadar Catalase pada Larva Zebrafish Stunting .....	69
5.3	Pengaruh Pegagan terhadap Kadar Malondialdehyde pada Larva Zebrafish Stunting.....	70
5.4	Hubungan Pegagan dengan Panjang Badan, Catalase, dan Malondialdehyde pada Larva Zebrafish Stunting .....	71
<b>BAB 6 PEMBAHASAN.....</b>		<b>73</b>
6.1	Pengaruh Pegagan terhadap Panjang Badan pada Larva Zebrafish Stunting .....	73
6.2	Pengaruh Pegagan terhadap Kadar Catalase pada Larva Zebrafish Stunting .....	76
6.3	Pengaruh Pegagan terhadap Kadar Malondialdehyde pada Larva Zebrafish Stunting.....	77
6.4	Hubungan Pegagan dengan Panjang Badan, Catalase, dan Malondialdehyde pada Larva Zebrafish Stunting .....	78
6.5	Implikasi Hasil Penelitian dalam Asuhan Kebidanan .....	80
6.6	Keterbatasan Penelitian .....	82
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>		<b>83</b>
7.1	Kesimpulan .....	83
7.2	Saran .....	83
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>		<b>84</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>		<b>96</b>
<b>RIWAYAT HIDUP .....</b>		<b>120</b>

**DAFTAR TABEL**

Tabel 2.1 Klasifikasi Pegagan .....	34
Tabel 2.2 Konsentrasi Triterpen pada Ekstrak <i>Centella asiatica</i> .....	36
Tabel 2.3 Kandungan Nutrisi dalam <i>Centella asiatica</i> .....	37
Tabel 2.4 Klasifikasi Zebrafish .....	39
Tabel 2.5 Perkembangan Zebrafish .....	41
Tabel 2.6 Karakteristik Air pada Pemeliharaan Zebrafish .....	43
Tabel 4.1 Definisi Operasional .....	53
Tabel 4.2 Lama Pemberian Rotenon dan Pegagan .....	59
Tabel 4.3 Kekuatan Korelasi dan Arah Korelasi .....	63
Tabel 5.1 Rerata Panjang Badan dan Rasio Panjang Kepala : Panjang Badan pada Larva Zebrafish Usia 3 dan 6 Dpf antara Kelompok Kontrol, Rotenon, dan Rotenon Ditambah Pegagan dengan Lama Pararan yang Berbeda .....	65
Tabel 5.2 Hasil Uji Hubungan Pegagan dengan Panjang Badan, Catalase, dan Malondialdehyde .....	71

<b>DAFTAR GAMBAR</b>		
Gambar 2.1	Teknik pengukuran panjang badan/ tinggi badan .....	10
Gambar 2.2	Grafik standar pertumbuhan anak menurut WHO .....	11
Gambar 2.3	Sindrom <i>stunting</i> .....	13
Gambar 2.4	Struktur rotenon .....	18
Gambar 2.5	Struktur mitokondria .....	19
Gambar 2.6	Proses pembentukan ATP .....	20
Gambar 2.7	Mekanisme kerja rotenon .....	21
Gambar 2.8	Rotenon menginduksi apoptosis .....	22
Gambar 2.9	Kelompok radikal bebas .....	24
Gambar 2.10	Proses pembentukan ROS di dalam tubuh .....	26
Gambar 2.11	Dampak produksi ROS mitokondria .....	27
Gambar 2.12	Tahap pembentukan MDA .....	29
Gambar 2.13	Reaksi MDA dan TBA .....	30
Gambar 2.14	Tumbuhan pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) .....	35
Gambar 2.15	Morfologi zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) .....	40
Gambar 2.16	Pengukuran zebrafish .....	42
Gambar 3.1	Kerangka teori .....	45
Gambar 3.2	Kerangka konsep .....	46
Gambar 4.1	Alur penelitian .....	64
Gambar 5.1	Rerata panjang badan larva zebrafish usia 3-6 dpf .....	66
Gambar 5.2	Perbandingan rerata panjang badan usia 3 dan 6 dpf .....	67
Gambar 5.3	Perbandingan rerata kadar <i>Catalase</i> .....	69
Gambar 5.4	Perbandingan rerata kadar MDA .....	70

<b>DAFTAR LAMPIRAN</b>	
Lampiran 1	Surat Keterangan Kelaikan Etik .....
Lampiran 2	Surat Keterangan Bebas Plagiasi .....
Lampiran 3	Bukti Accepted Jurnal .....
Lampiran 4	Determinasi Tanaman Pegagan .....
Lampiran 5	Laporan Hasil Analisis Zebrafish .....
Lampiran 6	Dokumentasi Penelitian .....
Lampiran 7	Data Panjang Badan .....
Lampiran 8	Data Kadar Catalase dan Malondialdehyde .....
Lampiran 9	Hasil Analisis Statistik .....
Lampiran 10	Diagram Alur Ekstraksi Pegagan .....
Lampiran 11	Diagram Alur Prosedur ELISA .....
Lampiran 12	Cara Menggunakan Software <i>Image Raster</i> .....

**DAFTAR SINGKATAN**

ATP	: <i>Adenosine Triphosphate</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
ASI	: <i>Air Susu Ibu</i>
BMD	: <i>Bone Mineral Density</i>
CAT	: <i>Catalase</i>
CO <sub>2</sub>	: <i>Carbon dioksida</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase 2</i>
DMSO	: <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DNA	: <i>Deoxyribose nucleic acid</i>
dpf	: <i>day post fertilization</i>
e <sup>-</sup>	: elektron
EDCs	: <i>Endocrine Disrupting Chemicals</i>
EPA	: <i>Environmental Protection Agency</i>
FADH	: <i>Flavin Adenine Dinukleotida Hidrogen</i>
FoxO	: <i>Forkhead box O</i>
GPx	: <i>Glutathione peroxidase</i>
GSH	: <i>Glutathione</i>
GST	: <i>Glutathione-S-transferase</i>
H <sub>2</sub> O	: Air
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrogen Peroksid
hpf	: <i>hour post fertilization</i>
HPLC	: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IDAI	: Ikatan Dokter Anak Indonesia
H <sup>+</sup>	: ion Hidrogen
IGF-1	: <i>Insulin Like Growth Factor-1</i>
IGF-1R	: <i>Insulin Like Growth Factor-1 Receptor</i>
IL-6	: <i>Inter leukin-6</i>
IL-10	: <i>Inter leukin-10</i>
IMD	: Inisiasi Menyusu Dini
IUGR	: <i>Intra Uterine Growth Restriction</i>
KEK	: Kurang Energi Kronis
LD <sub>50</sub>	: <i>Median Lethal Dose</i>
L·	: Radikal lipid

awijaya	universitas Brawijaya	universitas Brawijaya	universitas Brawijaya	universitas Brawijaya	universitas Brawijaya
awijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	LH	: Liped	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	LO·	: Radikal alkoksil lipid	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	LOO·	: Radikal peroksil lipid	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	LOOH	: Hidroperoksa lipid	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	LSD	: Least Significance Different	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	MCA	: Millennium Challenge Account	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	MDA	: Malondialdehyde	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	MPASI	: Makanan Pendamping Air Susu Ibu	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	NADH	: Nikotinamida Adenosin Dinukleotida Hidrogen	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	NADPH	: Nikotinamida Adenin Dinukleotida Fosfat	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	NO·	: Nitrit oksida	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	NO2·	: Nitrit dioksida	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	ONOO·	: Nitrit peroksid	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	Nrf2	: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	OPG	: Osteoprotegrin	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	PB	: Panjang Badan	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	PB/U	: Panjang Badan menurut Umur	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	PGE2	: Prostaglandin E2	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	PK	: Panjang Kepala	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	PUFA	: Polyunsaturated Fatty Acid	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	O <sub>2</sub>	: Oksigen	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	: Oksigen tunggal	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	O <sub>2</sub> ·	: Superoksid	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	OH·	: Hidroksil	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	ppb	: part per bilion	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	ppm	: part per million	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	RANK	: Receptor Activator Nuclear Kappa-	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	RANKL	: Receptor Activator Nuclear Kappa-Ligan	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	RNA	: Ribonucleic acid	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	ROS	: Reactive Oxigen Species	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	ROO·	: Radikal peroksil	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	rpm	: rotasi per menit	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	SD	: Standar Deviasi	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	SL	: Standard Length	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya
awijaya	SOD	: Superoxide Dismutase	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya



T3	Tiroksin	Thiobarbituric Acid	Thiobarbituric Acid Reactive Substance	Tinggi Badan menurut Umur	Tumor Necrosis Factor Alpha	Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography	United Nations Emergency Children's Fund	World Health Organization
T4	Tiroksin	Thiobarbituric Acid	Thiobarbituric Acid Reactive Substance	Tinggi Badan menurut Umur	Tumor Necrosis Factor Alpha	Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography	United Nations Emergency Children's Fund	World Health Organization
TBA	Tiroksin	Thiobarbituric Acid	Thiobarbituric Acid Reactive Substance	Tinggi Badan menurut Umur	Tumor Necrosis Factor Alpha	Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography	United Nations Emergency Children's Fund	World Health Organization
TBARS	Tiroksin	Thiobarbituric Acid	Thiobarbituric Acid Reactive Substance	Tinggi Badan menurut Umur	Tumor Necrosis Factor Alpha	Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography	United Nations Emergency Children's Fund	World Health Organization
TB/U	Tiroksin	Thiobarbituric Acid	Thiobarbituric Acid Reactive Substance	Tinggi Badan menurut Umur	Tumor Necrosis Factor Alpha	Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography	United Nations Emergency Children's Fund	World Health Organization
TNF-	Tiroksin	Thiobarbituric Acid	Thiobarbituric Acid Reactive Substance	Tinggi Badan menurut Umur	Tumor Necrosis Factor Alpha	Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography	United Nations Emergency Children's Fund	World Health Organization
tRNA	Tiroksin	Thiobarbituric Acid	Thiobarbituric Acid Reactive Substance	Tinggi Badan menurut Umur	Tumor Necrosis Factor Alpha	Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography	United Nations Emergency Children's Fund	World Health Organization
UHPLC	Tiroksin	Thiobarbituric Acid	Thiobarbituric Acid Reactive Substance	Tinggi Badan menurut Umur	Tumor Necrosis Factor Alpha	Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography	United Nations Emergency Children's Fund	World Health Organization
UNICEF	Tiroksin	Thiobarbituric Acid	Thiobarbituric Acid Reactive Substance	Tinggi Badan menurut Umur	Tumor Necrosis Factor Alpha	Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography	United Nations Emergency Children's Fund	World Health Organization
WHO	Tiroksin	Thiobarbituric Acid	Thiobarbituric Acid Reactive Substance	Tinggi Badan menurut Umur	Tumor Necrosis Factor Alpha	Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography	United Nations Emergency Children's Fund	World Health Organization

BAB 1

## PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Stunting adalah kegagalan dalam mencapai pertumbuhan linear pada

balita (Sudirman, 2008). Pertumbuhan linier dijadikan sebagai indikator terbaik

untuk menilai kesejahteraan anak dan menggambarkan terjadinya kesenjangan

perkembangan manusia (de Onis & Branca, 2016). *Stunting* diidentifikasi dengan

mengukur panjang atau tinggi badan anak dibandingkan rata-rata standar

pertumbuhan WHO berdasarkan usia dan jenis kelamin, dimana nilai z-scorenya

kurang dari -2 standar deviasi (-2SD) (WHO, 2008; de Onis et al., 2013). *Stunting*

terjadi sejak janin masih dalam kandungan dan baru dapat dinilai gejala klinisnya

saat anak berusia dua tahun (MCA Indonesia, 2013).

Peningkatan Internasional Meningkat Setelah menyadari signifikansi Starting

Sebagai masalah keselamatan utama pada masyarakat (de Onis & Branca, 2010). Universitas Brawijaya

UNICEF, WHO, dan Bank Dunia (2011) menekan, pada tahun 2010 terdapat 101 Universitas Brawijaya

Jata untuk siswa di bawah 8 tahun yang mendekati starting di dalam setelah  
rsit a Universitas Braw

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

*Stunting* sebagai sindrom kegagalan pertumbuhan linear berfungsi sebagai penanda beberapa gangguan patologis yang berhubungan dengan peningkatan morbiditas dan mortalitas, hilangnya potensi pertumbuhan fisik, penurunan fungsi perkembangan neuro dan kognitif serta risiko tinggi penyakit kronis di masa dewasa (de Onis & Branca, 2016). Periode kritis pertumbuhan terjadi dalam 1000 hari pertama kehidupan yang dimulai dari masa kehamilan sampai usia anak 2 tahun (Victora *et al.*, 2008). Caulfield *et al.* (2006) menyatakan hanya 3% anak yang *stunting* dapat kembali normal tanpa dilakukan intervensi. Pemerintah Indonesia berupaya menurunkan prevalensi *stunting* pada anak di bawah 2 tahun menjadi 28% di tahun 2019 dengan melakukan intervensi gizi spesifik melalui pemenuhan kebutuhan zat gizi bagi ibu hamil, pemberian ASI ekslusif sampai 6 bulan dilanjutkan pemberian MPASI serta pemberian zat penambah gizi mikro untuk anak. Upaya lain adalah dengan meningkatkan akses terhadap air bersih dan sanitasi lingkungan (MCA Indonesia, 2013; Kemenkes RI, 2016).

Faktor utama yang mempengaruhi tumbuh kembang anak adalah faktor genetik dan lingkungan. Faktor lingkungan dapat berupa nutrisi, penyakit, perawatan kesehatan, sosial ekonomi, toksin/ zat kimia, dan lainnya. Paparan toksin atau zat kimia pada masa prenatal dapat berpengaruh pada tumbuh kembang anak, karena masa organogenesis sangat peka terhadap zat-zat teratogen (Soetjiningsih, 1995). Pestisida merupakan bahan kimia yang bertindak sebagai *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDCs) yang mengganggu fungsi homeostasis hormon di dalam tubuh (Suhartono, 2014).

Rotenon merupakan salah satu jenis dari pestisida organik yang berasal dari akar tuba (*Derris Eliptica*) (Sherer *et al.*, 2003). Rotenon bekerja menghambat kompleks I mitokondria yang mengakibatkan penurunan jumlah Adenosine Triphosphate (ATP) sehingga nukleus gagal membelah dan terjadi

apoptosis (Li et al., 2003). Kebocoran pada kompleks I mengakibatkan banyaknya elektron bebas yang bereaksi dengan molekul oksigen menghasilkan superokksida (Sanders & Greenamyre, 2013). Terganggunya sistem transport elektron mengakibatkan kurangnya oksigenasi dan peningkatan kadar hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang merupakan tanda terjadinya stress oksidatif (Li et al., 2003). Stress oksidatif meningkatkan oksidasi DNA yang dikaitkan dengan penurunan IGF-1 pada anak usia dini yang memiliki dampak jangka panjang pada *stunting* (Stein et al., 2008).

Proses terbentuknya molekul radikal bebas yang baru melalui reaksi oksidasi yang lebih kompleks mengakibatkan kerusakan sel, organ, dan akhirnya dapat menimbulkan penyakit degeneratif (Winarsi, 2011; Rodrigo, 2009). ROS sebagai molekul yang sangat reaktif dan dapat merusak struktur sel seperti karbohidrat, asam nukleat, lipid, dan protein dan mengubah fungsinya (Birben et al., 2012). Molekul target yang paling rentan terhadap serangan radikal bebas adalah asam lemak tak jenuh pada membran sel yang mengakibatkan dinding sel menjadi rapuh (Winarsi, 2011). Interaksi ROS dengan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dan membentuk hidroperoksida (Burton & Jauniaux, 2011). Salah satu biomarker yang digunakan sebagai pengukuran peroksidasi lipid adalah *Malondialdehyde* (MDA). MDA merupakan produk peroksidasi lipid berupa aldehid reaktif dan merupakan salah satu dari banyak spesies elektrofil reaktif yang menyebabkan stres toksik pada sel (Ebenhardt, 2001). Aly et al. (2014) melaporkan anak *stunting* mengalami peningkatan kadar MDA dan mengalami penurunan jumlah antioksidan seperti Catalase, SOD dan GSH.

Untuk menghentikan reaksi oksidasi dibutuhkan senyawa yang bersifat antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa reduktan berfungsi untuk menurunkan reaksi oksidasi dan mengikat radikal bebas yang dapat

menghambat kerusakan sel (Chandrika & Kumarab, 2015). Antioksidan dibedakan menjadi antioksidan endogen dan antioksidan eksogen. Salah satu antioksidan endogenous adalah *catalase*. *Catalase* merupakan enzim yang mengandung heme, yang mengatalisis dismutasi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) menjadi air dan oksigen (Winarsi, 2011). Melo *et al.* (2015) melaporkan paparan rotenon dengan konsentrasi 1 µg/L telah signifikan menurunkan kadar enzim antioksidan *catalase* dan *glutathione-S-transferase* (GST). Sedangkan antioksidan eksogen dapat diperoleh dari makanan yang mengandung vitamin C, E, provitamin A dan fitokimia.

Salah satu tanaman yang memiliki kandungan antioksidan adalah pegagan (*Centella asiatica*). *Centella asiatica* telah digunakan sebagai obat herbal tradisional oleh negara-negara di Asia selama ratusan tahun (Hashim *et al.*, 2011). Pegagan memiliki fitonutrien utama yaitu triterpenoid yang berperan sebagai antioksidan dalam menyeimbangkan oksidan dalam sel sehingga stress oksidatif dapat dicegah (Winarsi, 2011; Chandrika *et al.*, 2015). *Centella asiatica* berpotensi sebagai scavenger radikal bebas superoksida, hidrogen peroksida, nitrit oksida (Sugunabai *et. al.*, 2015), dan hidroksil (Shinomol & Muralidhara, 2008). Giribabu, *et al.* (2014) melaporkan, *Centella asiatica* secara signifikan dapat menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) dan meningkatkan kadar enzim antioksidan yaitu superoksida dismutase, *catalase* dan *glutation peroxidase* pada tikus diabetes. Sedangkan pada model *stunting* hal ini belum banyak diteliti. Selain itu *Centella asiatica* juga memiliki kandungan nutrisi yang baik berupa makronutrien (protein dan karbohidrat) serta mikronutrien seperti vitamin dan mineral (Hashim *et al.*, 2011; Joshi & Chaturvedi, 2013).

Penggunaan zebrafish untuk model penelitian karena zebrafish memiliki kemiripan fisiologis dan 70% homolog dengan gen manusia (Howe *et al.*, 2013). Usia zebrafish analog dengan manusia berdasarkan ontogeni siklus bangun tidur

yaitu pada usia 3, 6, dan 9 dpf setara dengan bayi baru lahir (0 hari), 2 tahun dan 8 tahun (Sorribes *et al.*, 2013). Penelitian sebelumnya pada zebrafish menyebutkan bahwa rotenon 12,5 ppb dapat menginduksi terjadinya *stunting* dan pemberian ekstrak pegagan 5 µg/mL *pre hatching* (sebelum menetas) pada 2-72 hpf dapat meningkatkan panjang badan melalui IGF-1 dan IRS (Cory'ah *et al.*, 217); ERK ½ dan protein Ki-67 (Zakiah *et al.*, 2017), melalui mekanisme pertumbuhan tulang yaitu osteoprotegrin dan RANKL (Ariati *et al.*, 2017); osifikasi tulang dan osteoklastogenesis (Primihastuti *et al.*, 2017); GLUT 4 dan osteocalcin (Primaditya *et al.*, 2017); serta melalui mekanisme vaskulogenesis yaitu VEGF dan VEGFR-2 (Wardani *et al.*, 2017). Namun usaha preventif ini belum mencapai panjang badan normal.

Mengingat periode kritis pertumbuhan terjadi dalam 1000 hari pertama kehidupan, lama paparan ekstrak pegagan perlu ditingkatkan sampai *post hatching* (setelah menetas) agar panjang badan normal dapat dicapai.

Berdasarkan latar belakang di atas peneliti tertarik untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre sampai dengan post hatching* melalui peningkatan kadar Catalase dan penurunan kadar Malondialdehyde (MDA) dalam hubungannya dengan panjang badan normal larva zebrafish.

## 1.2 Rumusan Masalah

### 1.2.1 Umum

Apakah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre sampai dengan post hatching* dapat meningkatkan kadar Catalase, menurunkan kadar Malondialdehyde (MDA), dan meningkatkan panjang badan larva zebrafish *stunting?*

### 1.2.2 Khusus

1. Apakah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre sampai dengan post hatching* dapat meningkatkan panjang badan pada larva zebrafish *stunting* di usia 6 dpf?
2. Apakah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre sampai dengan post hatching* dapat meningkatkan kadar *Catalase* pada larva zebrafish *stunting* di usia 6 dpf?
3. Apakah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre sampai dengan post hatching* dapat menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada larva zebrafish *stunting* di usia 6 dpf?
4. Apakah terdapat hubungan antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre sampai dengan post hatching* dengan panjang badan pada larva zebrafish *stunting*?
5. Apakah terdapat hubungan antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pada masa *pre sampai dengan post hatching* dengan kadar *Catalase* pada larva zebrafish *stunting*?
6. Apakah terdapat hubungan antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pada masa *pre sampai dengan post hatching* dengan kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada larva zebrafish *stunting*?

### 1.3 Tujuan

#### 1.3.1 Umum

Membuktikan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre sampai dengan post hatching* terhadap peningkatan kadar *Catalase*, penurunan kadar *Malondialdehyde* (MDA) dan peningkatan panjang badan larva zebrafish *stunting*.

### 1.3.2 Khusus

1. Membuktikan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pre sampai dengan *post hatching* terhadap peningkatan panjang badan pada larva zebrafish *stunting* di usia 6 dpf.
2. Membuktikan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pre sampai dengan *post hatching* terhadap peningkatan kadar *Catalase* pada larva zebrafish *stunting* di usia 6 dpf.
3. Membuktikan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pada masa *pre* sampai dengan *post hatching* terhadap penurunan kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada larva zebrafish *stunting* di usia 6 dpf.
4. Membuktikan hubungan antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai dengan *post hatching* dengan panjang badan pada larva zebrafish *stunting*.
5. Membuktikan hubungan antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai dengan *post hatching* dengan kadar *Catalase* pada larva zebrafish *stunting*.
6. Membuktikan hubungan antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre* sampai dengan *post hatching* dengan kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada larva zebrafish *stunting*.

## 1.4 Manfaat penelitian

### 1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Penelitian ini dapat digunakan untuk meningkatkan ilmu pengetahuan dan pemahaman tentang patomekanisme *stunting* akibat induksi rotenon serta kandungan pegagan (*Centella asiatica*) dalam mengatasi *stunting* pada larva zebrafish.

2. Sebagai tambahan informasi bagi pengembangan penelitian berikutnya tentang *stunting*.
- 1.4.2 Manfaat Praktis**
1. Meningkatkan kesadaran orangtua dan tenaga kesehatan khususnya bidan tentang pentingnya pemeriksaan tumbuh kembang anak, seperti pemantauan tinggi badan secara tepat sehingga dapat melakukan diagnosis dan intervensi dini terhadap kejadian *stunting*.
  2. Dapat dijadikan sebagai bahan pertimbangan bagi masyarakat untuk membudidayakan tanaman pegagan yang memberikan banyak manfaat terhadap kesehatan sehingga dapat dikonsumsi sebagai sayuran.



## Stunting

### 2.1.1 Pengertian Stunting

*Stunting* didefinisikan sebagai status gizi yang didasarkan pada indeks Panjang Badan menurut Umur (PB/U) atau Tinggi Badan menurut Umur (TB/U) dibandingkan rata-rata Standar Pertumbuhan Anak WHO, nilai z-scorenya kurang dari -2SD (WHO, 2012; Kemenkes RI, 2016). Anak-anak dianggap severely stunted jika panjang/ tinggi mereka < -3 SD (WHO, 2008; de Onis et al., 2013).

*Stunting* merupakan masalah kurang gizi kronis yang disebabkan oleh asupan gizi yang kurang dalam waktu cukup lama akibat pemberian makanan yang tidak sesuai dengan kebutuhan gizi. Kondisi ini terjadi sejak janin masih berada dalam kandungan dan gejala klinisnya muncul saat anak berusia dua tahun (MCA Indonesia, 2013). *Stunting* dibedakan dengan kretinisme, dimana *stunting* memiliki proporsi tubuh yang sama dengan keadaan normal, sebaliknya kretinisme memiliki proporsi tubuh yang tidak sama dengan normal.

Menilai pertumbuhan linier tidak sulit, tapi membutuhkan kepatuhan terhadap prinsip-prinsip dan perhatian terhadap komponen-komponen pengukuran. Variabilitas pengukuran panjang atau tinggi badan dapat dipengaruhi oleh pengaturan tempat pengukuran, tingkah laku anak, akurasi alat, teknik pengukuran, dan metode pembacaan hasil pengukuran (de Onis et al., 2004). Panjang badan pada anak usia 0-2 tahun diukur pada posisi tidur telentang, sedangkan tinggi badan anak usia >2 tahun diukur pada posisi berdiri (IDAI, 2015), yang dapat dilihat pada gambar 2.1

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA



A

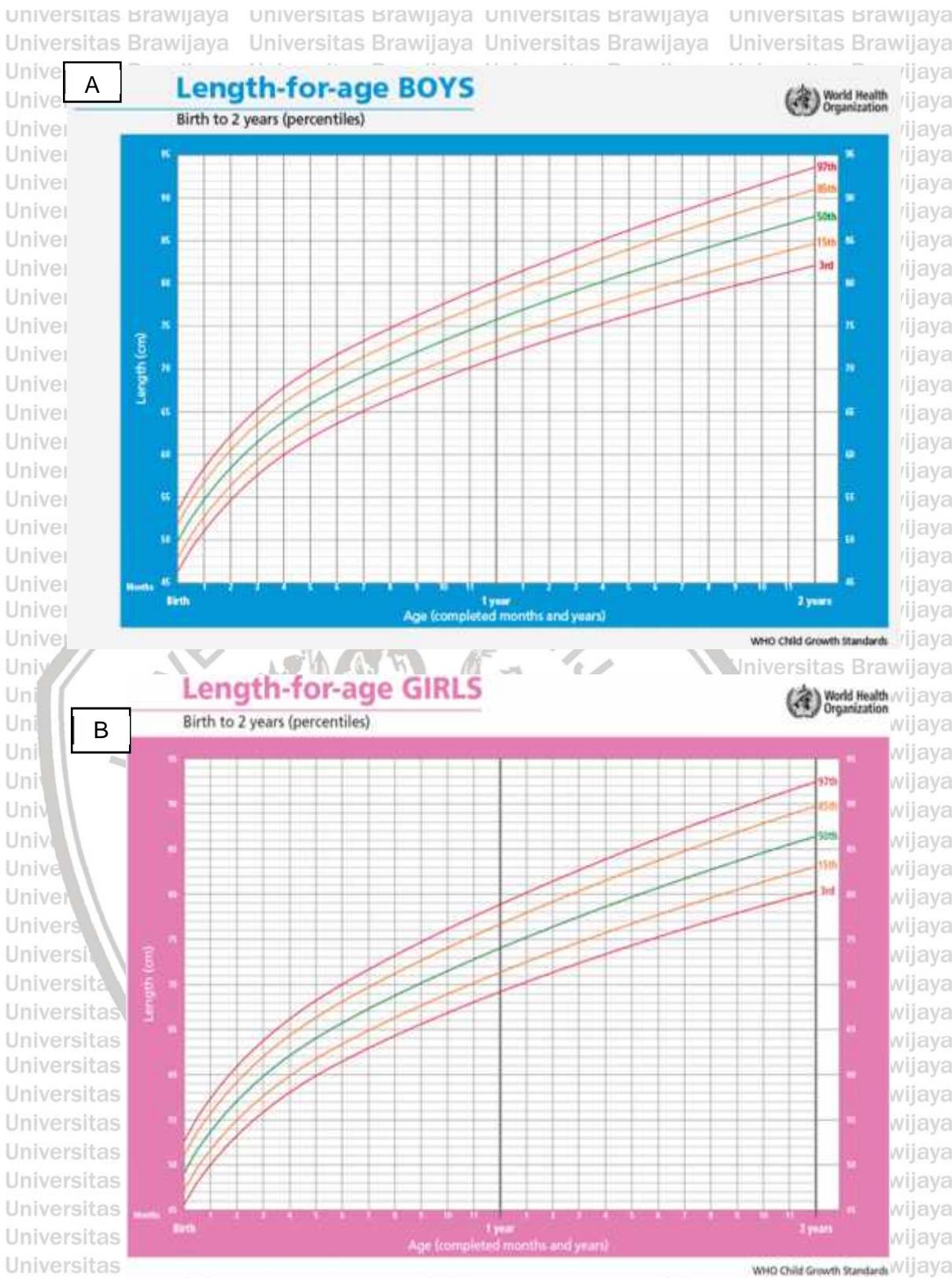


B

**Gambar 2.1 Teknik pengukuran panjang badan/ tinggi badan.**

Keterangan : A. Panjang badan untuk anak 0-2 tahun diukur pada posisi telentang,  
B. Tinggi badan untuk anak > 2 tahun diukur pada posisi berdiri (UNICEF,  
WHO, The World Bank, 2014).

Hasil pengukuran panjang badan atau tinggi badan diinterpretasikan dengan menggunakan grafik standar pertumbuhan anak WHO berdasarkan usia dan jenis kelamin, seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.2



**Gambar 2.2 Grafik standar pertumbuhan anak menurut WHO.**

Keterangan : A. Standar panjang badan/ umur untuk anak aki-laki umur 0-24 bulan.  
 B. Standar panjang badan/umur untuk anak perempuan umur 0-24 bulan.  
 Garis melengkung pada kurva menunjukkan z-score : 97th (-3SD), 85th (2 SD), 50th (0 SD), 15th(-2 SD), dan 3rd (-3 SD). Jika titik temu antara umur dan panjang badan berada dibawah garis 15th (-2SD) diinterpretasikan terdapat gangguan pertumbuhan panjang badan (*stunted*) (WHO, 2006).

## 2.1.2 Faktor Penyebab *Stunting*

Secara umum, tumbuh kembang anak dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan. Faktor genetik terdiri dari faktor bawaan baik normal atau patologik, jenis kelamin dan suku bangsa. Faktor lingkungan dibagi menjadi lingkungan pranatal dan postnatal. Lingkungan pranatal meliputi gizi ibu hamil, toksin/zat kimia, mekanis, endokrin, radiasi, stress, infeksi, imunitas, dan anoksia embrio. Sedangkan lingkungan postnatal terdiri dari lingkungan biologis, faktor fisik, pskososial, keluarga, dan adat istiadat (Soetjiningsih, 1995). Prendergast & Humprey (2014), menyatakan faktor prenatal dan postnatal yang menyebabkan terjadinya *stunting* adalah nutrisi, infeksi, polusi udara, paparan bahan kimia, mycotoxin, arsenik dan bahan bakar.

*Stunting* terjadi karena masalah gizi kronis, dipengaruhi dari kondisi ibu/calon ibu, masa janin, dan masa bayi/balita, termasuk penyakit yang diderita selama masa balita (Kemenkes RI, 2016). Asupan yang tidak memadai dari zat gizi makro seperti energi dan protein serta zat gizi mikro berupa seng, besi, fosfor, vitamin D, vitamin A dan vitamin C mengakibatkan kegagalan pada pertumbuhan. Kekurangan zat gizi ini akan menghambat pertumbuhan linear yang berdampak terhadap *stunting* (Caulfield *et al.*, 2006). van Stuijvenberg *et al.* (2015) menunjukkan bahwa asupan rendah kalsium dan vitamin D karena asupan susu tidak memadai setelah disapih, mungkin telah memberi kontribusi yang tinggi terhadap kejadian *stunting* pada populasi yang mereka teliti. Susu dinilai sebagai sumber kalsium, fosfor, vitamin D, dan riboflavin yang baik.

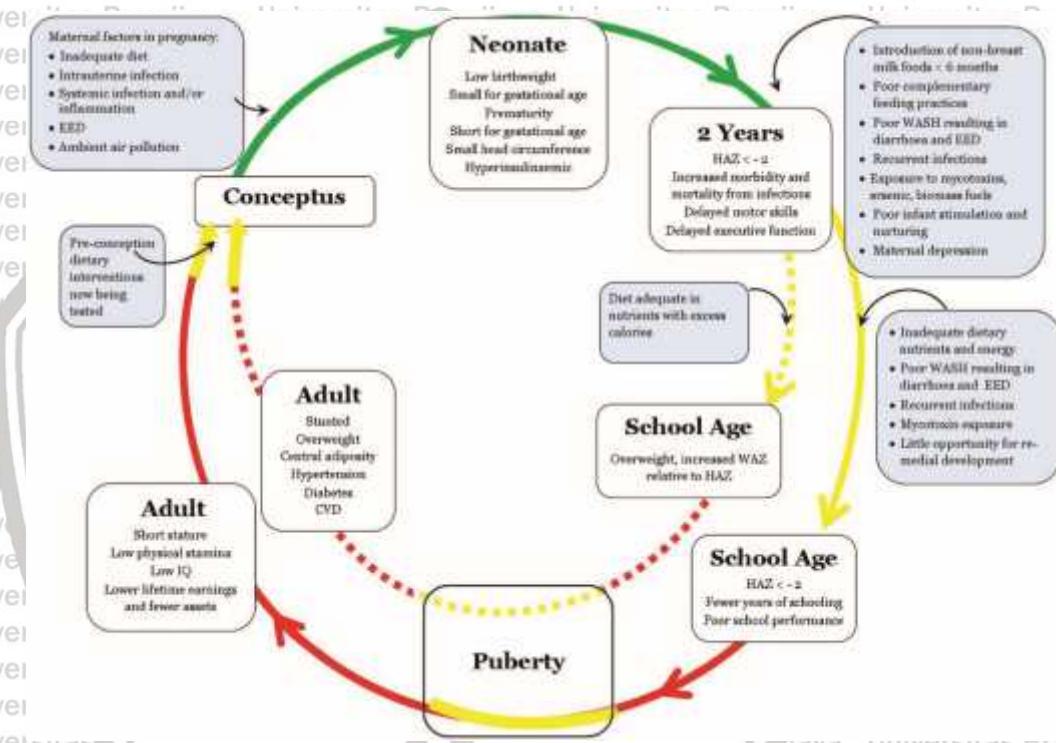
Pemberian ASI yang tidak optimal, pemberian makanan pendamping ASI yang kurang tepat, infeksi berulang dan defisiensi mikronutrien merupakan faktor penting yang menyebabkan terjadinya *stunting* (Dewey & Mayers, 2011; Black *et al.*, 2013). Selain itu kegagalan pertumbuhan linier dapat disebabkan oleh faktor sosial dan komunitas seperti stabilitas ekonomi dan politik, akses pelayanan



kesehatan, pendidikan, urbanisasi, kepadatan penduduk, serta dukungan sosial. (Stewart *et al.*, 2013).

**2.1.3 Mekanisme *Stunting***

Mekanisme *stunting* sangat kompleks yang dimulai dari fase konsepsi, masa antenatal, usia 2 tahun, sekolah, pubertas hingga dewasa. Siklus tersebut saling berkaitan, jika terjadi gangguan seperti nutrisi, metabolisme, dan infeksi dapat menyebabkan gangguan dalam pertumbuhan dan perkembangan.



**Gambar 2.3 Sindrom *stunting*.**

Keterangan : Jalur hijau merupakan periode konsepsi hingga usia 2 tahun yang sangat dipengaruhi oleh penyebab dan intervensi. Jalur kuning merupakan periode usia 2 tahun, pertengahan masa kanak-kanak dan remaja. Jalur kuning yang pendek merupakan masa pra konsepsi yang membuktikan intervensi pada masa ini memperbaiki keturunan. Jalur merah menunjukkan ketika sindrom *stunting* tidak responsif terhadap intervensi. Pada usia 2 tahun sampai dewasa terdapat garis putus-putus yang merupakan jalur menyimpang, ketika diberikan nutrisi yang berlebih pada anak pendek akan menyebabkan kenaikan berat badan yang berlebih (Prendergast & Humphrey, 2014).

Mekanisme terjadinya *stunting* pada awal kehidupan berhubungan dengan malnutrisi, gangguan pada hormon pertumbuhan dan inflamasi kronik (Prendergast & Humphrey, 2014). Asupan energi yang tidak mencukupi untuk

metabolisme menyebabkan organ menarik cadangan nutrisi terutama yang ada dari lemak dan otot (Cahill, 2006). Penurunan lemak dan massa otot tercermin dalam indeks antropometri *stunting* dan *wasting* (Briend et al., 2015). Jaringan lemak menghasilkan leptin yang berpengaruh terhadap kepadatan tulang dan pertumbuhan linier (Karsenty, 2006). Hiperplasia pada pertumbuhan tergantung pada hormon seperti insulin, IGF-1, BP3, kortisol, leptin, hormon pertumbuhan, dan T3/T4 yang membutuhkan nutrisi penting seperti asam amino, yodium, besi, tembaga, seng, natrium, potassium, fosfor, energi yang cukup, dan asam lemak esensial. Jika terjadi kekurangan nutrisi pada fase ini, maka pertumbuhan akan menjadi *stunted* (Uauy, 2013). Perkembangan jaringan dipengaruhi *Growth Hormones* yang merangsang hati dan epiphyses tulang untuk melepaskan hormon lain, seperti insulin Growth Factor 1 (IGF-1). IGF-1 berperan terhadap duplikasi sel pada tubuh, terutama tulang rangka, otot, sumsum tulang, saraf, hati, ginjal, kulit, dan paru-paru (Berk, 2012).

Saat infeksi, terjadi stress nutrisi ganda karena kurangnya asupan makanan akibat anoreksia dan peningkatan kebutuhan asam amino untuk akelerasi sintesis protein fase akut, produksi glutation, dan membangun respon kekebalan adaptif (Briend et al., 2015). Anak-anak yang sering terpapar dengan patogen enteric akan mengalami perubahan struktur dan fungsi usus yang ditandai atrofi vili dan peradangan kronis usus kecil serta berkangnya penyerapan dan peningkatan permeabilitas usus. Permeabilitas menyebabkan translokasi produk mikroba dari lumen usus ke sirkulasi sistemik, sehingga memicu peradangan kronik dan menekan IGF-1 (Prendergast & Humphrey, 2014). Peningkatan ekspresi IL-6 sebagai mediator inflamasi kronis yang terjadi pada perkembangan tulang masa postnatal terbukti menghambat mineralisasi tulang yang bertanggungjawab terhadap pertumbuhan linier (De Benedetti et al., 2014).

2006). Untuk mengimbangi mediator pro inflamasi diperlukan mediator antiinflamasi. Hovsepian *et al.* (2013) membuktikan terjadi penurunan mediator pro inflamasi seperti IL-6 akibat penambahan IL-10 eksogen pada kardiomiosit yang terinfeksi. Hal ini mengakibatkan penghambatan sinyal transduksi dari IL-6 yang menekan jalur pensinyalan IGF-1 (Al-Shanti & Steward, 2012).

Faktor lain yang dapat menyebabkan *stunting* adalah bahan kimia dari lingkungan. Pestisida bertindak sebagai *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDCs) yang dapat mengganggu metabolisme, sintesis, sekresi, transport, aksi pengikatan, dan eliminasi hormon-hormon di dalam tubuh yang berfungsi menjaga homeostasis, reproduksi dan proses tumbuh kembang (Suhartono, 2014). Paparan pestisida pada masa prenatal dapat meningkatkan kejadian bayi berat lahir rendah, keterlambatan pertumbuhan di dalam kandungan dan prematuritas (Colosio *et al.*, 2003). Pestisida dapat menyebabkan stres oksidatif, menginduksi radikal bebas, menyebabkan perubahan antioksidan, *scavenging* sistem enzim, serta menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid (Abdollahi *et al.*, 2004). Anak-anak dengan status gizi *stunting* mengalami peningkatan stres oksidatif dan penurunan jumlah antioksidan (Aly *et al.*, 2014).

#### 2.1.4 Dampak dari *Stunting*

*Stunting* memiliki dampak jangka pendek, jangka menengah, dan jangka panjang yang berpengaruh terhadap kualitas hidup manusia sepanjang daur kehidupannya. Konsekuensi jangka pendek yang terjadi adalah peningkatan mortalitas dan morbiditas akibat infeksi, diare dan pneumonia. Hal ini dapat menyebabkan peningkatan anggaran perawatan kesehatan dan biaya perawatan anak sakit. Selain itu *stunting* menyebabkan penurunan kemampuan kognitif, motorik, dan perkembangan bahasa (Stewart *et al.*, 2013; Prendergast & Humphrey, 2014).

Dalam jangka menengah, *stunting* mempengaruhi perkembangan anak dari segi kognitif, perilaku, dan pendidikan. Anak *stunting* memiliki gangguan perkembangan perilaku, kecil kemungkinan untuk belajar di sekolah, terlambat mendaftar sekolah, cenderung mencapai nilai yang lebih rendah, serta memiliki kemampuan kognitif yang lebih rendah dibandingkan anak yang tidak *stunting* (Prendergast & Humphrey, 2014). Sedangkan, konsekuensi jangka panjang *stunting* dari segi kesehatan adalah penurunan postur tubuh saat dewasa, peningkatan obesitas dan berhubungan dengan morbiditas, serta penurunan kesehatan reproduksi. Dari segi ekonomi, *stunting* mengakibatkan penurunan produktivitas (Stewart et al., 2013).

### 2.1.5 Upaya Penanganan *Stunting*

1000 hari pertama (konsepsi sampai 2 tahun pertama kehidupan) adalah periode kritis untuk pertumbuhan dan perkembangan manusia (Victora et al., 2008). Upaya pemerintah Indonesia dalam mengatasi balita *stunting* difokuskan pada periode kritis dengan beberapa program, antara lain :

1. Pemenuhan kebutuhan zat gizi ibu hamil dengan pemberian tablet zat besi-folat atau multivitamin dan mineral.
2. Pemberian makanan tambahan pada ibu hamil dengan Kekurangan Energi Kronis (KEK) dan memperhatikan kesehatan ibu hamil.
3. Promosi Inisiasi Menyusu Dini (IMD), ASI ekslusif dan Makanan Pendamping ASI yang bergizi
4. Memantau pertumbuhan balita di posyandu
5. Pemberian imunisasi lengkap, vitamin A, zat penambah gizi mikro, dan obat cacing pada anak.
6. Gerakan perilaku hidup bersih dan sehat
7. Penanganan anak dengan gizi buruk (MCA Indonesia, 2013; Kemenkes RI, 2016)

## 2.2 Rotenon

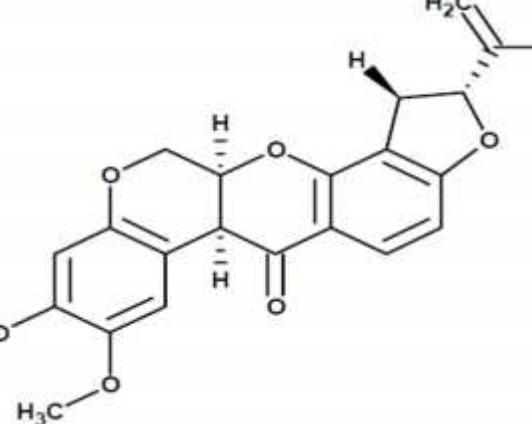
### 2.2.1 Pengertian dan Kegunaan

Rotenon merupakan pestisida alami berupa senyawa isoflavan, sehingga termasuk ke dalam golongan flavonoid (Casacchia *et al.*, 2009). Rotenon berasal dari akar famili leguminosae, yaitu *Derris* di Asia dan *Lonchocarpus* di Amerika Selatan (Hien *et al.*, 2003). Rotenon sering digunakan pada pengelolaan perikanan, seperti racun kuat bagi ikan, pemberantasan hama ikan, pengendalian penyakit ikan, serta pemulihhan keadaan air untuk spesies terancam (Ling, 2003).

### 2.2.2 Struktur Fisik dan Kimia

Menurut Ling (2003), struktur fisik dan kimia dari rotenon sebagai berikut :

Nama umum	:	Rotenon
Rumus empiris	:	$C_{23}H_{22}O_6$
Nama Kimia	:	(2R,6as,12as)-1,2,6,6a,12,12a-hexahydro-2-isopropenyl-8,9-dimethoxychromeno[3,4-b]furo[2,3-h]chromen-6-one
Berat molekul	:	394.43 g/mol
Kelarutan	:	<ul style="list-style-type: none"><li>- Kelarutan dalam air terbatas yaitu 0.2 mg/L @ 20°C, 15 mg/L @ 100°C.</li><li>- Kelarutan dalam pelarut organik lain yaitu ethanol 2g/L @ 20°C; carbon tetrachloride 6 g/L @ 20°C; amyl acetate 16 g/L @ 20°C; xylene 34 g/L @ 20°C; acetone 66 g/L @ 20°C; benzene 80 g/L @ 20°C; chlorobenzene 135 g/L @ 20°C; ethylene dichloride 330 g/L @ 20°C; chloroform . 472 g/L @ 20°C.</li></ul>
Titik cair	:	~ 165°C
Titik didih	:	~ 220°C
Tekanan penguapan	:	<1 mPa @ 20°C

Bentuk	Kristal tidak berwarna sampai berwarna kecoklatan
Stabilitas	Bubuk kristal berwarna putih sampai putih kecoklatan
Jenis pestisida	Botani
Registrasi (USEPA)	Tahun 1947
Struktur	

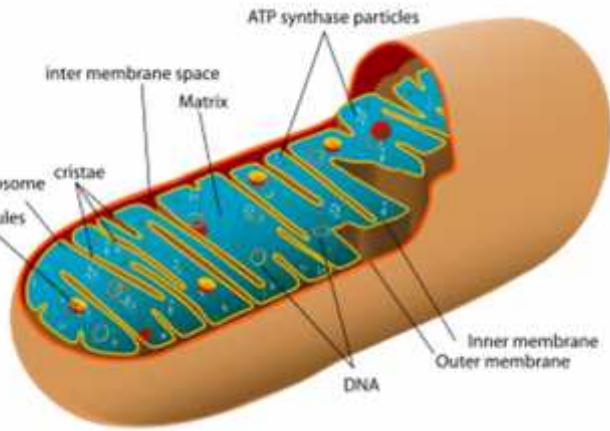
Gambar 2.4 Struktur rotenon (Ling, 2003)

### 2.2.3 Mekanisme Kerja Rotenon

Rotenon bersifat sangat lipofilik, sehingga dengan mudah melintasi membran sel tanpa memerlukan transporter (Irwin *et al.*, 2014). Rotenon memiliki berat molekul sebesar 394.43 g/mol (Hien *et al.*, 2003), sehingga dapat masuk ke dalam sel melalui difusi pasif karena syarat molekul dapat masuk ke dalam sel jika berat molekul 1000 g/mol (Cairns, 2009). Hal ini menyebabkan rotenon mudah berkumpul pada struktur subseluler termasuk mitokondria.

Struktur Mitokondria terdiri dari 4 bagian utama. Pertama, membran luar yang mengandung banyak protein, bersifat permeabel, terlibat dalam sintesis lipid, memecah lipid menjadi bentuk yang dapat dimetabolisir di matriks. Kedua, ruang antar membran, berisi cairan mengandung enzim yang menggunakan ATP dari matriks untuk memfosforilasi nukleotida lainnya. Ketiga, membran dalam,

berlipat-lipat dan membentuk krista, mengandung protein yang berfungsi membuat ATP, serta protein transport untuk mengatur keluar masuknya metabolit dari matriks. Keempat, ruang matriks yang mengandung ratusan enzim untuk oksidasi piruvat, asam lemak dan untuk siklus krebs serta mengandung DNA mtokondria, ribosom mtokondria, dan tRNA (Santoso & Santri, 2016).



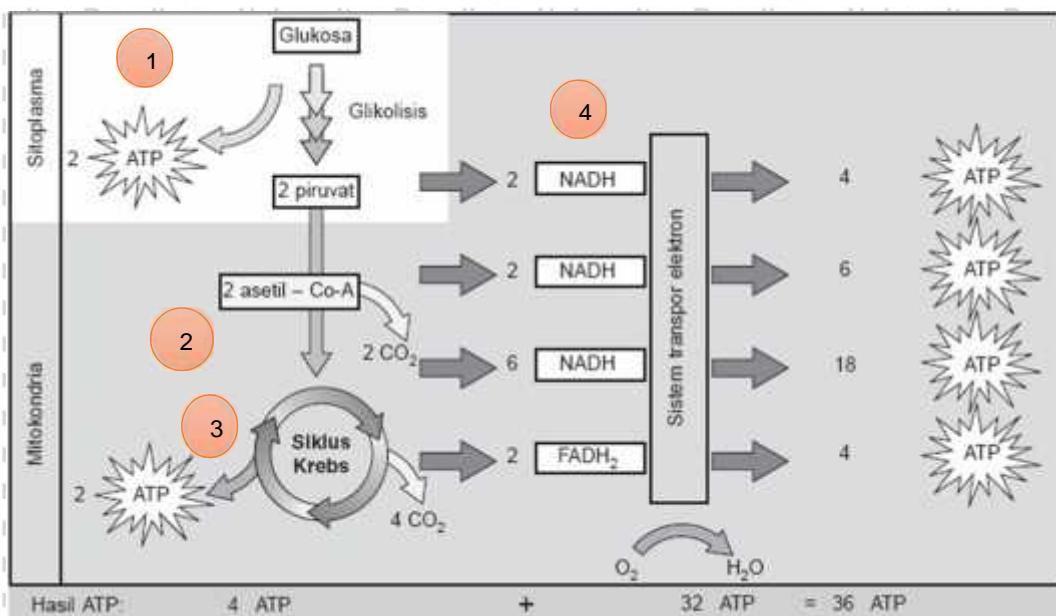
**Gambar 2.5 Struktur mitokondria.**

Keterangan : Mitokondria terdiri dari membran luar, ruang antar membran, membran dalam, dan ruang matriks (Santoso & Santri, 2016).

Proses pembentukan ATP pada mitokondria melalui 4 tahap yaitu proses glikolisis, dekarboksilasi oksidatif, siklus krebs, dan proses transport elektron.

Secara fisiologis proses pembentukan ATP di mitokondria dapat dilihat pada

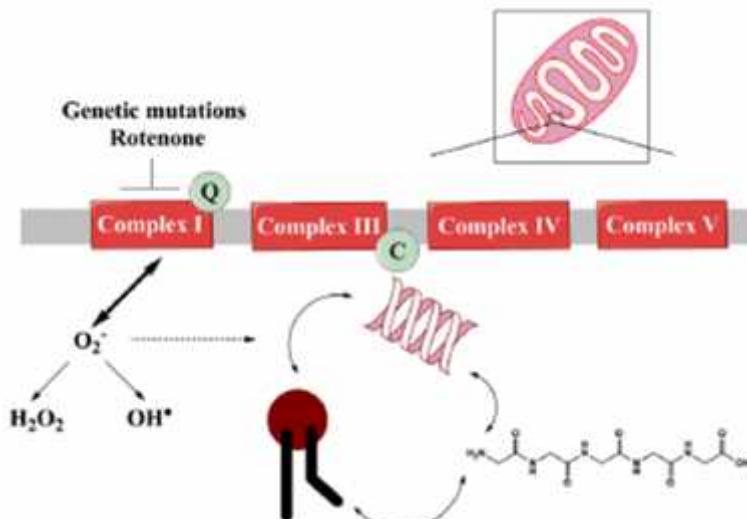
gambar 2.6



**Gambar 2.6 Proses pembentukan ATP.**

Keterangan : 1. Proses glikolisis di sitosol yang merubah glukosa menjadi 2 asam piruvat, 2 ATP, 2 NADH, 2 asam piruvat. 2. Proses dekarboksilasi oksidatif di matriks mitokondria merubah asam piruvat menjadi 2 acetil Co-A, 2 NADH, dan 2CO<sub>2</sub>. 3. Proses siklus krebs di matriks mitokondria yang merubah 2 acetil Co-A menjadi 6 NADH, 2FADH<sub>2</sub>, 4 CO<sub>2</sub>. 4. Proses transport elektron di membran dalam mitokondria yang merubah NADH dan FADH<sub>2</sub> menjadi 32 ATP dan 6 H<sub>2</sub>O (Mader et al., 2007).

Rotenon dapat menghambat kompleks I mitokondria sehingga terjadi penurunan jumlah Adenosine Triphosphate (ATP) (N. Li et al., 2003). Rotenon menghambat respirasi mitokondria melalui pengikatan kompleks I dengan afinitas 10-20 nM sehingga mengurangi aliran elektron ke ubiquinone. Kebocoran elektron pada kompleks I mengakibatkan banyaknya elektron bebas yang bereaksi dengan molekul oksigen menghasilkan superoksid dan membentuk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Murphy, 2009; Sanders & Greenamyre, 2013). Generasi superoksid dan ROS lebih lanjut dapat merusak kompleks I serta kompleks lain dari rantai transport elektron terutama yang mengandung besi. ROS juga dapat merusak protein lain di mitokondria, serta makromolekul lainnya sehingga terjadi kerusakan oksidatif kumulatif (Sanders & Greenamyre, 2013).



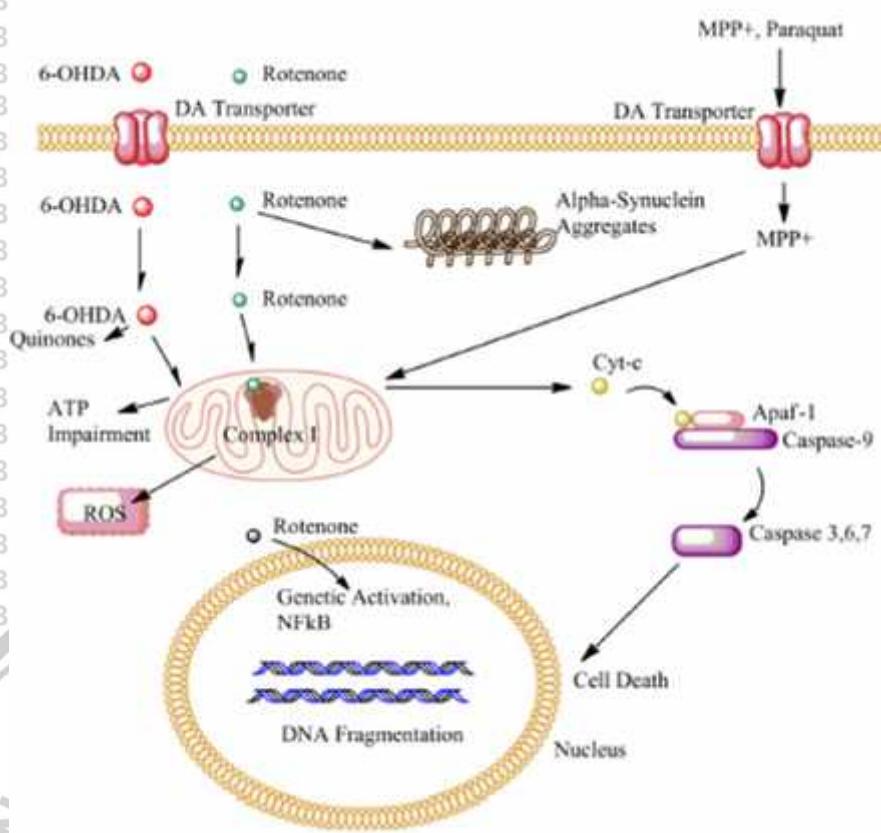
**Gambar 2.7 Mekanisme kerja rotenon.**

Keterangan : Rotenon dapat menghambat kompleks I mitokondria dan menghasilkan ROS. ROS yang dihasilkan dapat merusak makromolekul, termasuk asam nukleat, lipid, dan protein (Sanders & Greenamyre, 2013).

Peningkatan ROS di mitokondria menyebabkan kerusakan oksidatif pada protein mitokondria, membran dan DNA sehingga terjadi disfungsi mitokondria dalam mensintesis ATP dan melaksanakan berbagai fungsi metabolisme. Hal ini berdampak pada kerusakan sel dan menimbulkan keadaan patologi (Murphy, 2009).

Penghambatan sintesis ATP karena rotenon memblok aliran elektron ke

oksigen sehingga tidak ada  $\text{H}^+$  atau ATP yang dihasilkan yang menyebabkan peningkatan ROS endogen sehingga menginduksi jalur apoptosis instriksik melalui lepasnya agen-agen proapoptotik ke sitosol seperti sitokrom C yang mengaktifkan caspase 9. Selanjutnya caspase 9 memicu caspase 3, 6, dan 7 dan menginduksi apoptosis (Cabezas et al., 2013).



**Gambar 2.8 Rotenon menginduksi apoptosis.**

Keterangan : Rotenon bersifat hidrofobik, pemhamatan kompleks mitokondria I oleh rotenon menyebabkan penurunan ATP, peningkatan ROS dan pelepasan molekul proapoptotik, seperti sitokrom c yang mengaktifkan caspase 9, yang memicu caspase 3, 6 dan 7, dan menginduksi apoptosis (Cabezas *et al.*, 2013).

Gangguan mitokondria menyebabkan penurunan pasokan energi pada organ seperti otak, otot, dan sistem endokrin sehingga terjadi gangguan pertumbuhan yang ditandai perawakan pendek pada anak-anak (Wolny *et al.*, 2009).

#### 2.2.4 Toksisitas

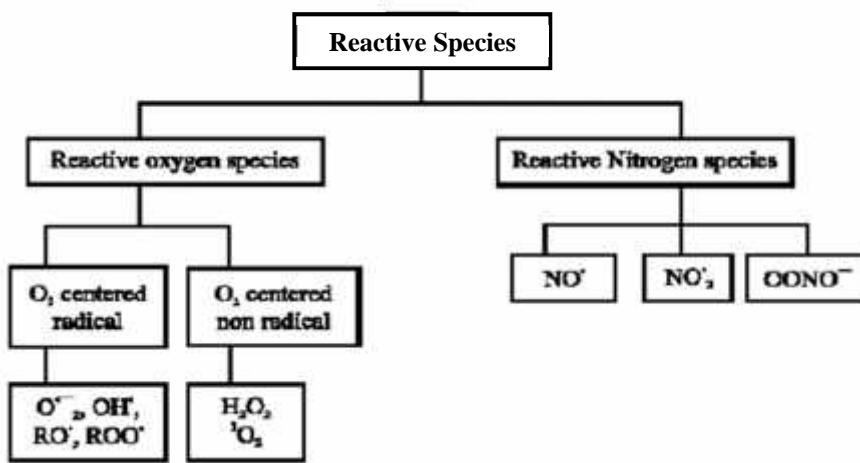
Toksisitas rotenon diklasifikasikan dalam kelas I dan III (sangat toksik dan sedikit toksik) yang tergantung pada formulasi produknya (EPA, 2007). Toksisitas rotenon pada ikan lebih tinggi karena ikan hidup dan bernafas di air sehingga rotenon dapat langsung masuk pada pembuluh darah. Rotenon dapat masuk melalui korion pada tahap embrio, serta melalui insang dan kulit pada tahap larva

(Cheng *et al.*, 2007). Rotenon memiliki toksisitas yang lebih rendah pada manusia dan aves karena rute masuknya rotenon melalui sistem pencernaan sehingga banyak kandungan toksik dari rotenon yang hilang dan rusak sebelum masuk ke dalam aliran darah (Ott, 2006). Rotenon memiliki nilai  $LD_{50}$ , yaitu dosis insektisida yang diperlukan untuk mebunuh 50% individu spesies hewan uji yang telah ditetapkan. Hal ini menunjukkan rotenon bersifat sangat beracun (EPA, 2007). Rotenon memiliki toksisitas yang tinggi pada ikan dengan nilai  $LD_{50}$  yang timbul setelah paparan rotenon 5-100  $\mu\text{g/L}$  selama 24 jam. Dosis toksisitas pada manusia adalah 40 mg/kg/BB dan  $LD_{50}$  sekitar 300-500 mg/kg/BB. Kematian akibat rotenon jarang terjadi pada manusia, namun ditemukan gejala toksisitas seperti sakit kepala, sakit tenggorokan, luka pada selaput lendir, ruam kulit dan iritasi mata (Ling, 2003).

### 2.3 Radikal Bebas dan Malondialdehyde (MDA)

#### 2.3.1 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Radikal bebas bersifat tidak stabil, sangat reaktif dan dapat mengambil elektron dari molekul lain untuk mendapatkan pasangan elektronnya (Astuti, 2008). Secara biokimia, proses pelepasan elektron dari suatu senyawa disebut oksidasi, sedangkan reduksi merupakan proses penangkapan elektron (Winarsi, 2011). Radikal bebas lebih berbahaya dibandingkan oksidan non radikal, karena radikal bebas mempunyai reaktivitas yang tinggi (Muchtadi, 2013). Pengelompokan radikal bebas dapat dilihat pada gambar 2.9



**Gambar 2.9 Kelompok radikal bebas.**

Keterangan : Radikal bebas dibagi dikelompokkan menjadi 2, yaitu: 1. *Reactive oxygen species* (ROS) terdiri dari *O<sub>2</sub> centered radical* (anion superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), radikal hidroksil (OH·), radikal peroksil (ROO<sup>·</sup>)) dan *O<sub>2</sub> centered non radical* (hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), oksigen tunggal ('O<sub>2</sub>)). 2. *Reactive Nitrogen species* terdiri dari Nitrit oksida (NO<sup>·</sup>), Nitrit dioksida (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), dan Nitrit peroksida (ONOO<sup>-</sup>) (Bahr, 2013).

Menurut Winarsi (2011) radikal bebas terbentuk melalui 3 tahapan yaitu sebagai berikut.

- (1) Tahap inisiasi merupakan tahap awal pembentukan radikal bebas misalnya :



- (2) Tahap propagansi merupakan pemanjangan rantai radikal, misalnya :

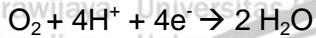


- (3) Tahap terminasi merupakan senyawa radikal dengan radikal lain atau dengan penangkap radikal sehingga potensi propagasinya rendah.

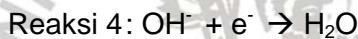
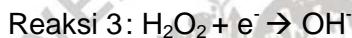
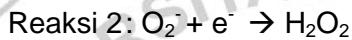
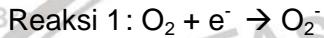


dan seterusnya.

ROS adalah beberapa molekul radikal yang dibentuk oleh reduksi oksigen yang tidak sempurna (Musarofah, 2015). ROS diproduksi oleh organisme hidup sebagai hasil metabolisme sel normal dan dapat juga berasal dari faktor lingkungan, seperti polutan udara dan faktor lingkungan (Birben *et al.*, 2012). Proses respirasi mitokondria mereduksi oksigen menjadi ROS sebesar 1-5% dari total oksigen yang digunakan. 95% O<sub>2</sub> akan dirubah menjadi H<sub>2</sub>O pada proses metabolisme fisiologis mamalia melalui reaksi :

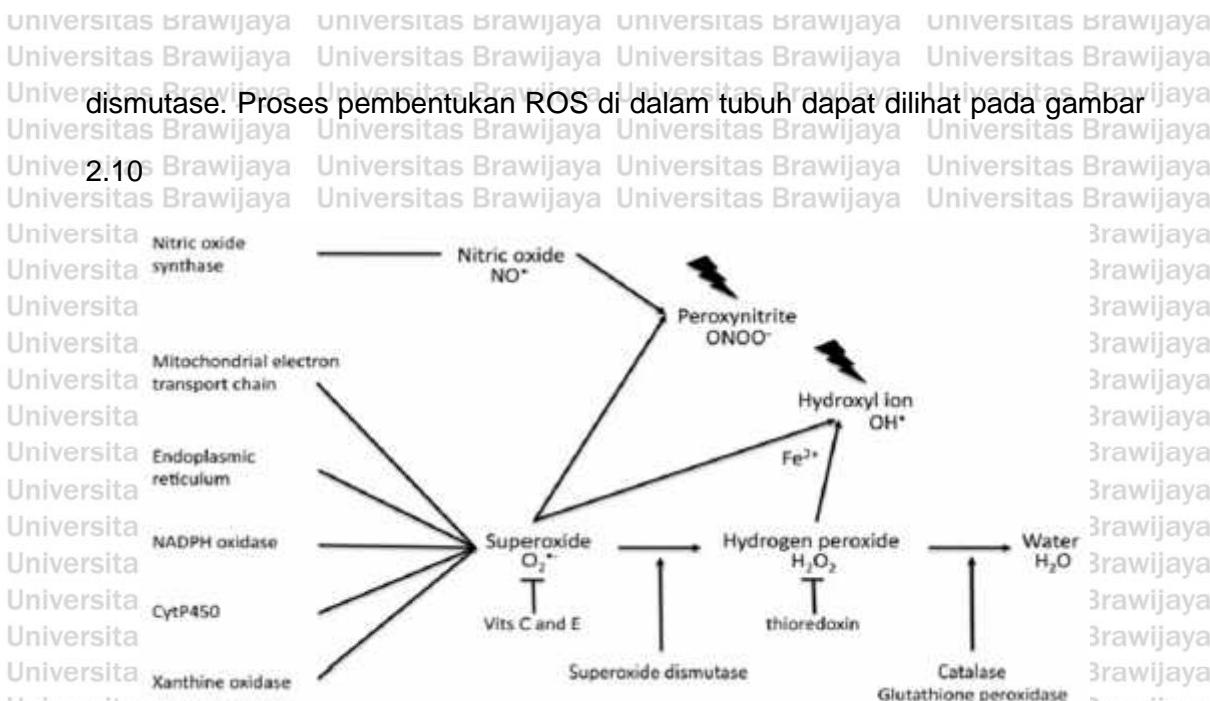


Secara fisiologis, sebanyak 5% O<sub>2</sub> berubah menjadi radikal bebas melalui reaksi :



Pembentukan H<sub>2</sub>O melalui rangkaian reaksi yang menghasilkan radikal bebas O<sub>2</sub><sup>-</sup> dan OH<sup>-</sup>. Hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) merupakan senyawa reaktif, namun tidak termasuk oksidan kuat.

Jumlah ROS yang tidak berlebihan di dalam tubuh adalah fisiologis bagi kehidupan aerobik. Konsentrasi ROS yang tinggi dapat menyebabkan kerusakan sel, baik secara langsung atau melalui sinyal yang beragam (Rodrigo, 2009; Musarofah, 2015). Dalam kondisi fisiologis, radikal bebas oksigen yang paling umum adalah anion superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Anion superoksida dibentuk dengan penambahan 1 elektron pada molekul oksigen. Pembentukan anion superoksida terutama dimediasi oleh sistem transport elektron di mitokondria, selain itu juga oleh NADPH oksidase dan xantin oksidase (Burton & Jauniaux, 2011; Birben *et al.*, 2012). Mekanisme pembentukan radikal bebas yang terjadi pada proses transport elektron di mitokondria telah dijelaskan pada subbab 2.2.3. Superoksida dirubah menjadi hidrogen peroksida oleh enzim superoksida

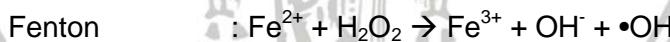
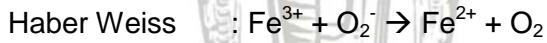


**Gambar 2.10. Proses pembentukan ROS di dalam tubuh**

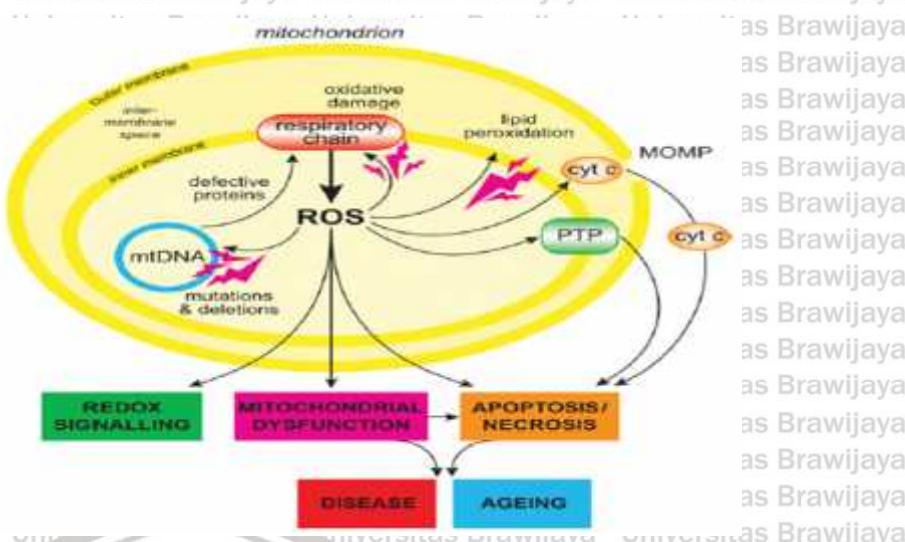
Keterangan : Superoksida merupakan ROS yang pertama kali terbentuk terutama pada proses transpor elektron mitokondria, NADPH oxidase, xantine oxidase. Superoksida akan dirubah oleh enzim superoksida dismutase menjadi hidrogen peroksida yana akan dikatalisis menjadi air oleh ezim catalase. Jumlah hidrogen peroksida yang banyak di dalam tubuh dapat bereaksi dengan inon  $\text{Fe}^{2+}$  menghasilkan radikal hidroksil yang sangat reaktif. (Burton & Jauniaux, 2011).

Hidrogen peroksida dapat berubah menjadi radikal hidroksil melalui reaksi

Fenton dan Haber-Weiss dengan adanya logam  $\text{Fe}^{2+}$  atau  $\text{Cu}^{2+}$  melalui reaksi:



$\text{O}_2^-$  juga bisa bereaksi dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$  menghasilkan  $\text{OH}^-$ . Radikal hidroksil merupakan ROS yang paling reaktif dan dapat merusak protein, lipid, karbohidrat dan DNA (Birben et al., 2012).



**Gambar 2.11 Dampak produksi ROS mitokondria.**

Keterangan : Produksi ROS oleh mitokondria dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada protein mitokondria, membran dan DNA, sehingga mengganggu fungsi metabolisme termasuk sintesis ATP. ROS memicu pelepasan sitokrom c dan mengakibatkan apoptosis sel. Hal ini berdampak terhadap kondisi patologis yaitu penyakit dan penuaan (Murphy, 2009).

Konsentrasi ROS yang berlebihan akan menimbulkan stress oksidatif

(Birben *et al.*, 2012). Stress oksidatif merupakan suatu kondisi yang terkait dengan peningkatan kecepatan kerusakan sel akibat induksi oksigen beserta turunannya. Kerusakan sel terjadi akibat ketidakseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas pertahanan enzim antioksidan. Radikal bebas dan senyawa ROS dapat menyebabkan oksidasi protein, oksidasi lipid, uptaian

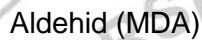
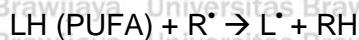
DNA terputus, modifikasi basa DNA, dan modulasi ekspresi genetik di dalam tubuh (Jin *et al.*, 2011).

### 2.3.2 Peroksidasi Lipid

Target utama ROS adalah protein, asam lemak tak jenuh, lipoprotein, karbohidrat serta unsur DNA termasuk RNA. Namun yang paling rentan terhadap serangan ROS adalah asam lemak tak jenuh (Valko *et al.*, 2007). Komponen terpenting pada membran sel adalah fosfolipid, glikolipid dan kolesterol. Dua komponen pertama mengandung asam lemak tak jenuh berupa asam linoleat, linolenat, dan arakidonat. Proses peroksidasi lipid terjadi ketika ROS (terutama

radikal hidroksil) berinteraksi dengan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) pada sel yang menghasilkan hidrogen peroksida (Winarsri, 2011; Burton & Jauniaux, 2011).

Peroksidasi-lipid akan terbentuk melalui rantai yang makin panjang dan dapat merusak organisme membran sel, sebagaimana dapat dilihat pada reaksi berikut:



(Tandon *et al.*, 2005; Winarsih 2011)

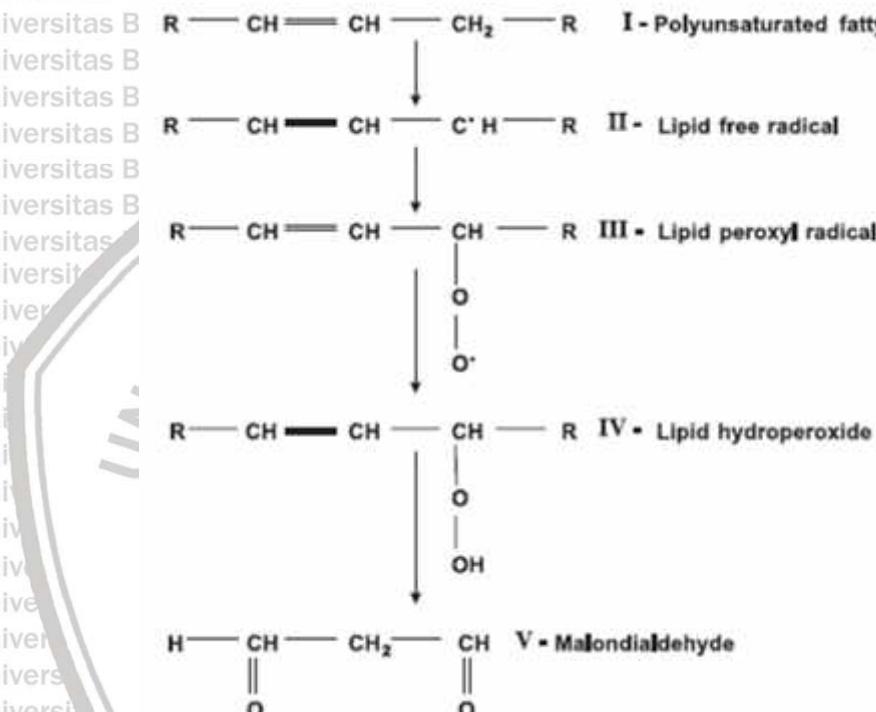
ROS dapat menginduksi peroksidasi lipid dan mengganggu susunan membran lipid bilayer yang dapat menonaktifkan reseptor dan enzim di membran dan meningkatkan permeabilitas jaringan (Birben *et al.*, 2012). Peroksidasi lipid akan mempengaruhi *cross linking* membran, serta struktur dan fungsi membran (Winarsri, 2011; Agarwal *et al.*, 2012). Kadar lipid yang tinggi merupakan indikator kerusakan oksidatif pada membran sel serta molekul lipoprotein lainnya yang mengandung lipid (Gubaljeviæ & Ēauševiæ, 2013).

### 2.3.3 Malondialdehyde (MDA)

Peroksidasi lipid dari asam lemak tak jenuh ganda yang tidak stabil, mudah terurai membentuk serangkaian kompleks senyawa, salah satunya adalah *Malondialdehyde* (MDA) (Singh, 2008). MDA merupakan aldehid reaktif sehingga dapat menyebabkan stres toksik pada sel (Ebenhardt, 2001).

MDA mampu menonaktifkan banyak protein seluler dengan membentuk hubungan silang protein (Birben *et al.*, 2012).

MDA memiliki tiga rantai karbon dengan rumus molekul  $C_3H_4O_2$  (Winarsi, 2011). Terbentuknya MDA dari PUFA dengan adanya lebih dari dua ikatan rangkap dari metilen yang terputus. Prekursor utama MDA adalah asam arakidonat dan asam dokosahexaenik. Sedangkan asam oleat dan linoleat yang memiliki kurang dari dua ikatan rangkap merupakan prekursor MDA yang lemah (Abele et al., 2011). Proses terbentuknya MDA dapat dilihat pada gambar 2.12



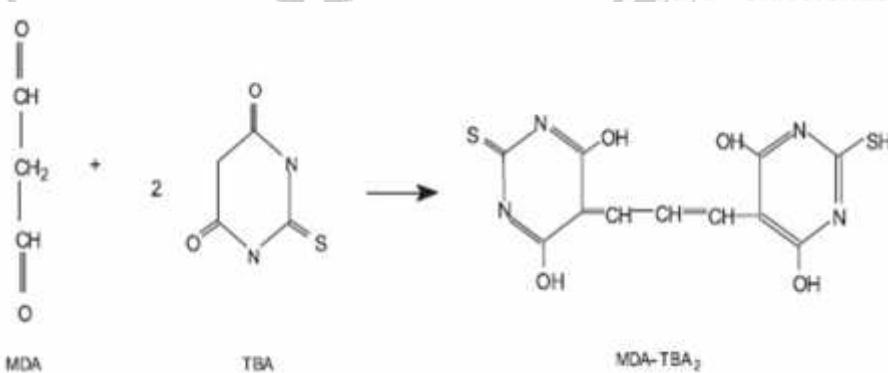
**Gambar 2.12 Tahap pembentukan MDA.**

Keterangan : Target dari ROS adalah asam lemak tak jenuh ganda (I) Ikatan ganda melemahkan ikatan karbon-hidrogen dan radikal bebas menyebabkan hidrogen mudah hilang sehingga radikal bebas lipid terbentuk (II). Oksidasi radikal lipid menghasilkan radikal peroksil lipid (III). Radikal peroksil lipid bereaksi dengan asam lemak tak jenuh ganda lainnya menghasilkan lipid hidroperokksida (IV) dan radikal lipid lain. Lipid hidroperokksida bersifat tidak stabil dan terfragmentasi menghasilkan produk *Malondialdehyde* (V) dan 4-hidroksi-2-nonenal (Grotto et al., 2009).

Pemeriksaan MDA secara tidak langsung dapat menganalisis jumlah radikal bebas yang terbentuk. Analisis radikal bebas secara langsung sulit dilakukan karena radikal bebas memiliki sifat sangat tidak stabil serta cenderung mengambil elektron dari senyawa lain supaya lebih stabil. Proses ini berlangsung

sangat cepat sehingga pengukuran sangat sulit dilakukan bila dalam bentuk senyawa radikal bebas (Winarsi, 2011). MDA merupakan marker peroksidasi lipid *in vivo* yang baik untuk diteliti pada manusia dan hewan coba, karena signifikan akurat dan stabil dibandingkan senyawa lain (Niki, 2009). Selain itu MDA tepat digunakan sebagai biomarker stres oksidatif karena MDA meningkat seiring dengan peningkatan stress oksidatif, pengukurannya tidak dipengaruhi kandungan lemak dalam diet, jumlahnya dapat dideteksi pada semua jaringan tubuh dan cairan biologis sehingga memungkinkan untuk menentukan referensi interval (Lirba et al., 2004).

Pengukuran MDA yang direaksikan dengan Asam thiobarbituric (TBA) menghasilkan kompleks zat reaktif asam thiobarbituric (TBARS) yang menyerap cahaya pada panjang gelombang 532 nm dan dinyatakan sebagai MDA/ mg protein (Marmol et al., 2015). MDA-TBA2 dibentuk melalui aksi karbon-5 dari TBA dan karbon-1 dari MDA, kemudian diikuti oleh dehidrasi dan reaksi yang sama dengan molekul kedua TBA sehingga menghasilkan pigmen merah. Intensitas pigmen merah muda yang terbentuk menunjukkan tingkat peroksidasi lipid. Suhu, pH dan konsentrasi TBA menentukan kecepatan reaksi (Grotto et al., 2009).



**Gambar 2.13 Reaksi MDA dan TBA.**

Keterangan : Reaksi MDA-TBA membentuk pigmen MDA-TBA2 menunjukkan tingkat peroksidasi lipid (Grotto et al., 2009).

## 2.4 Catalase sebagai Antioksidan

### 2.4.1 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat melindungi sel dari bahaya radikal bebas dengan cara mendonorkan elektronnya pada senyawa yang bersifat oksidan melalui pengikatan oksigen dan pelepasan hidrogen (Winarsi, 2011; (Musarofah, 2015). Antioksidan bekerja menangkap radikal bebas dengan cara :

1. Mencegah atau menghambat pembentukan radikal bebas yang baru.
2. Menonaktifkan atau menangkap radikal.
3. Memperbaiki dan memotong propagansi (putusnya reaksi berantai).

(Hamid *et al.*, 2010).

Antioksidan terdiri dari antioksidan enzimatis (endogen) dan non enzimatis (eksogen). Antioksidan enzimatis secara aktif dibentuk oleh tubuh dan bekerja secara langsung terhadap pertahanan radikal bebas. Antioksidan enzimatis terdiri dari superoksida dismutase (SOD), catalase (CAT), dan glutathione peroxidase (GPx) (Winarsi, 2011; Muchtadi, 2013). Enzim tersebut bekerja dengan memutus reaksi berantai dan kemudian mengubahnya menjadi molekul yang lebih stabil (Musarofah, 2015). Seperti enzim SOD yang bekerja mengkatalisis reaksi dismutase dari radikal anion superoksida ( $O_2^-$ ) menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) (Hu *et al.*, 2005) dan GPx yang merubah  $H_2O_2$  menjadi molekul air dan oksigen (Rodrigo, 2009).

Antioksidan non enzimatis merupakan antioksidan yang didapat dari luar tubuh berupa nutrisi dan non nutrisi. Antioksidan ini berfungsi menangkap radikal bebas dan mencegah terbentuknya reaksi berantai sehingga kerusakan yang lebih besar tidak terjadi. Antioksidan sekunder bersumber dari vitamin C, vitamin E, flavonoid, isoflavon, flavon, betakaroten, antosianin, katekin, isokatekin, dan

asam lipoat yang berasal dari sayur-sayuran dan buah-buahan (Musarofah, 2015).

#### 2.4.2 Catalase

Catalase adalah enzim umum yang ditemukan di hampir semua organisme hidup yang terpapar oksigen (Chelikani et al, 2004). Pada organisme eukariot, *catalase* terutama terdapat di peroksisom. *Catalase* dengan jumlah yang lebih rendah ditemukan di mitokondria, retikulum endosplasma, dan sitosol (Scibior & Czeczot, 2006). *Catalase* merupakan tetramer yang terdiri dari 4 monomer identik, yang masing-masing berisi gugus heme (Birben et al., 2012), dan molekul NADPH. Total berat molekul *catalase* pada mamalia bervariasi antara 220-350 kDa dengan berat masing-masing subunit sebesar 60 kDa (Scibior & Czeczot, 2006).

*Catalase* memiliki aktivitas ganda yaitu katalase dan peroksidase.

Aktivitas tertinggi ditemukan pada hati, ginjal, darah (eritrosit), tulang, dan membran mukosa. Sedangkan aktivitas terendah ditemukan pada jaringan ikat (Scibior & Czeczot, 2006). Menurut Winarsi (2011), enzim *catalase* berperan dalam mengkatalisis dismutase hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) menjadi air ( $H_2O$ ) dan oksigen ( $O_2$ ) melalui reaksi :



*Catalase* bereaksi secara cepat dengan hidrogen peroksida, dimana dalam waktu 1 menit, katalase merubah sekitar 6 juta molekul  $H_2O_2$  menjadi air dan oksigen. Kecepatan reaksi katalisis adalah  $1,7 \times 10^7 \times 1 \text{ mol}^{-1} \times s^{-1}$  (Scibior & Czeczot, 2006).

Degradasi  $H_2O_2$  dilakukan melalui konversi antara 2 konformasi katalisase-ferrikatalisase (besi yang dikoordinasikan dengan air) dan senyawa (besi dikomplekskan dengan atom oksigen). *Catalase* juga mengikat NADPH

untuk mencegah inaktivasi oksidatif enzim (pembentukan senyawa II) oleh  $H_2O_2$  karena akan direduksi menjadi air (Birben *et al.*, 2012).

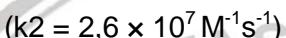
Mekanisme katalitik hidrogen peroksida ditunjukkan melalui reaksi :



Senyawa I

Pada tahap reaksi pertama katalase (Fe (III) - CAT) dengan hidrogen peroksida

mengurangi hidrogen peroksida menjadi  $Fe^{3+}$  untuk membentuk senyawa I (Fe (V) - CAT) dimana besi dioksidasi.



Pada tahap kedua, hidrogen peroksida dioksidasi oleh senyawa I, menghasilkan molekul oksigen dan air. Senyawa I kembali ke kondisi awal dimana zat besi berada pada tahap oksidasi (Scibior & Czeczot, 2006).

Enzim catalase selain mendukung SOD juga dapat mengkatalisa perubahan berbagai macam peroksida dan radikal menjadi oksigen dan air (Winarsi, 2011). Dengan adanya senyawa kimia tertentu, catalase juga menunjukkan aktivitas peroksidase, yang mengkatalisis reaksi oksidasi etanol, metanol, nitrit, dan lainnya. Dengan reaksi ini, hidrogen peroksida adalah substrat yang direduksi menjadi air melalui donor hidrogen.



(Scibior & Czeczot, 2006).

Klasifikasi	Keterangan
Kingdom	Plantal
Subkongdom	Embryophyta
Divisi	Spermatophyta
Subdivisi	Angiospermae
Kelas	Dicotyledonae
Subkelas	Rosidae
Order	Araliales
Suborder	Araliales
Family	Apiaceae
Subfamily	Hydrocotyle
Genus	Centella
Spesies	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban

Keterangan : Pegagan termasuk dalam kingdom *plantal* dan spesies *Centella asiatica* (L.) Urban (Joshi and Caturvedi, 2013).

Pegagan dikenal dengan nama lain berdasarkan daerah di Indonesia yaitu pegaga (Aceh), ampagaga (Batak), daun kaki kuda (Melayu), antanan (Sunda), rendeng, gagan-gagan (Jawa), taidah (Bali), sandanan (Irian). Di negara lain, pegagan memiliki nama diantaranya broken copper coin, buabok (Inggris), paardevoet (Belanda), gotu kola (India), dan ji xue cao (China) (Agoes, 2010).

### 2.5.2 Habitat Pegagan

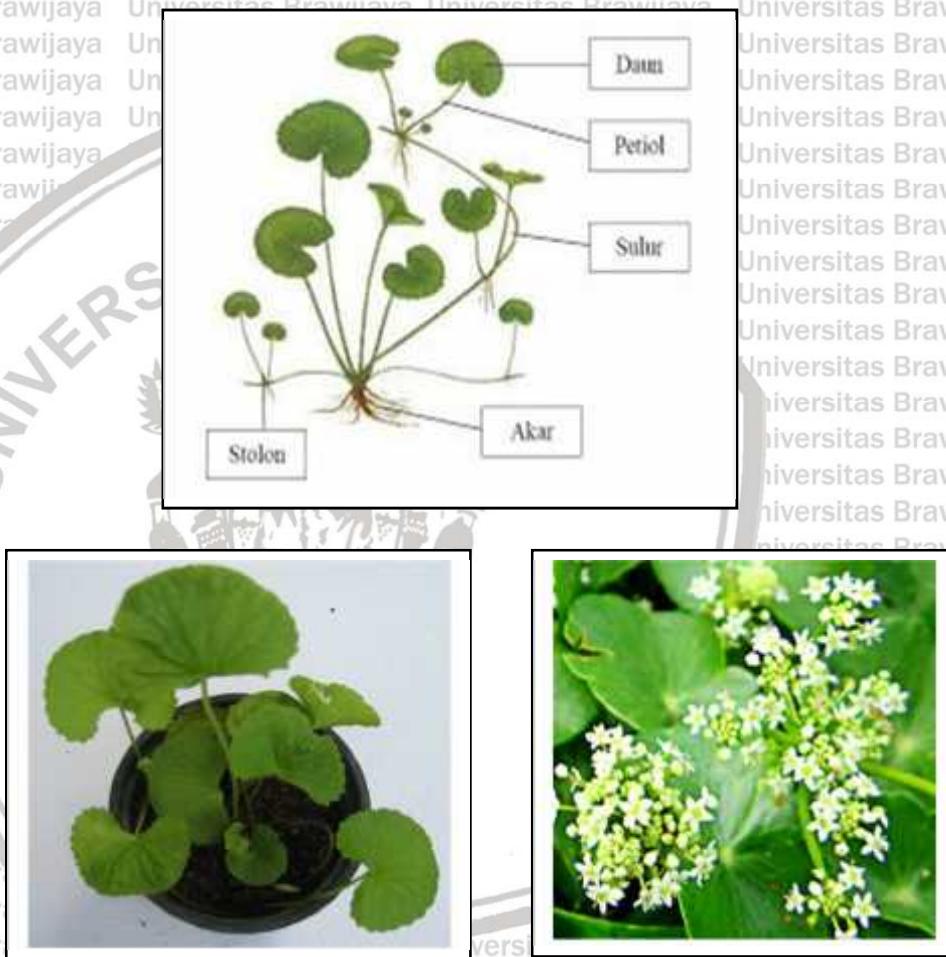
Tanaman pegagan tersebar luas di daerah tropis dan sub tropis.

Tanaman ini berasal dari Asia tropis dan banyak ditemukan di tempat terbuka.

Pegagan dapat tumbuh subur pada tanah dengan ketinggian 1-2.500 m di atas permukaan laut. Di Indonesia sering tumbuh di tempat terbuka seperti area persawahan, selokan, tepi jalan, pinggir-pinggir tembok, padang rumput, dan tepi sungai (Chandrika & Kumarab, 2015).

Budidaya pegagan dapat dilakukan secara vegetatif menggunakan stolon (tunas anakan) dan secara degeratif menggunakan biji. Pegagan memerlukan intensitas cahaya matahari 30-40% sehingga bisa dikembangkan sebagai tanaman sela. Panen dapat dilakukan setelah tanaman berumur 3-4 bulan (Agoes, 2010).

### 2.5.3 Morfologi Pegagan



**Gambar 2.14 Tumbuhan pegagan (*Centella asiatica*)**

Keterangan : A. Bagian-bagian pegagan. B. Daun dan Batang. C. Bunga (Chandrika & Kumarab, 2015).

Pegagan merupakan tumbuhan terna yang menjalar di atas tanah dan bercabang membentuk tumbuhan baru. Pegagan memiliki batang yang lunak dan beruas, akar berwarna putih dengan rimpang yang pendek serta stolon dengan panjang 10-80 cm. Stolon adalah tunas horizontal yang tumbuh merayap di

tanah (Campbell *et al.*, 2010). Tanaman memiliki daun tunggal berbentuk ginjal berjumlah 2-10 daun hijau, tepi bergerigi, permukaan punggung licin, serta tulang berpusat di pangkal dan tersebar ke ujung dengan diameter 1-7 cm. Tangai daun pegagan agak panjang berukuran sekitar 5-15 cm (Winarto & Surbakti, 2003; Badan POM RI, 2010). Bunga pegagan umumnya berjumlah 3, memiliki putik, benang sari dan daun pelindung dengan mahkota berwarna merah muda sampai keunguan. Buah berbentuk pipih lebar dengan lebar sekitar 7 mm dan tinggi sekitar 3 cm, bertekuk (beruang) 2, berdinding agak tebal dan memiliki warna kuning kecoklatan. Setiap lekuk mengandung satu biji, buah akan pecah ketika biji masak, namun biji tidak dapat keluar (Nurjanah, 2008).

#### 2.5.4 Kandungan Pegagan

Pegagan mengandung fitonutrien yang terdiri dari triterpenoid, karotenoid, flavonoid, alkaloid, glikosida, dan minyak atsiri (Chandrika & Kumarab, 2015). *Centella asiatica* mengandung triterpenoid yang terdiri dari 30% asiatic acid, 30% madecasic acid, dan 40% asiaticosida (Bylka *et al.*, 2014). Selain itu, Hashim *et al.* (2011) membuktikan bahwa madecassoside merupakan kandungan triterpen tertinggi pada ekstrak *Centella asiatica* diantara 3 komponen lainnya yang diperiksa menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) sebagaimana terlihat pada tabel 2.2

**Tabel 2.2 Konsentrasi Triterpen pada Ekstrak *Centella asiatica***

Jenis Triterpen	Waktu Retensi (menit)	Konsentrasi Triterpen dalam ekstrak <i>Centella asiatica</i> (mg/mL)
Madecassoside	6.313	3.10 ± 4.58
Asiaticoside	7.997	1.97 ± 2.65
Madecassic acid	12.199	0.55 ± 2.29
Asiatic acid	13.573	0.55 ± 0.89

Keterangan : Madecassoside merupakan kandungan triterpen yang tertinggi pada ekstrak *Centella asiatica* (Hashim *et al.*, 2011).

*Centella asiatica* juga mengandung karatonoid yang berperan sebagai antioksidan kuat dengan komponen utama neoxantin, -karoten, violaxanthin dan lutein (Chandrika & Kumarab, 2015). Selain itu, *Centella asiatica* mengandung flavonoid berupa kaempferol, quercetin, kaempferol, castilicetin, castiliferol, dan isochlorogenic acid (Subban et al., 2008).

Secara umum, *Centella asiatica* kaya nutrisi berupa mineral (kalsium, kalium, dan zat besi) dan vitamin (B,C,E,K). *Centella asiatica* mengandung makronutrien antara lain: karbohidrat, protein, lemak, serat, dan air (Hashim et al., 2011).

**Tabel 2.3 Kadungan Nutrisi dalam *Centella asiatica***

Komposisi	Jumlah
Moisture	84,6 %
Protein	2,4 %
Serat (per 100 g)	5,43 g
Soluble dietary	0,49 g
<b>Mineral</b>	
Ca (mg/100 g)	174
P	17
K	345
Na	107,8
Mg	87
Fe	14,86
Zn	0,97
Cu	0,24
Cr	0,046
<b>Vitamin (mg/100 g)</b>	
Asam askorbic	11
Thiamin	0,04
Caroten	25,93
B Caroten	3,90

Keterangan : *Centella asiatica* banyak mengandung moisture, kandungan mineral tertinggi adalah kalium, dan kandungan vitamin terbanyak adalah caroten (Joshi & Caturvedi, 2013).

Uji toksisitas akut yang dilakukan pada hewan menunjukkan bahwa pegagan tidak menunjukkan gejala klinis jika diberikan hingga dosis 2000 mg/kg/BB (Sulastry, 2019).

### 2.5.5 Manfaat Pegagan

Pegagan kaya akan kandungan kimia dan nutrisi sehingga memiliki manfaat pada kesehatan tubuh (Winarto & Surbakti, 2003). Beberapa manfaat pegagan adalah:

#### 1. Antioksidan

Pegagan memiliki kandungan triterpen yang tinggi sehingga dapat memberikan efek antioksidan dan penyembuhan luka (Rahman *et al.*, 2013).

Beberapa antioksidan yang terkandung dalam pegagan adalah polifenol, flavonoid, -karoten, tanin, dan vitamin C (Chandrika & Kumarab, 2015). Hashim *et al.* (2011) melaporkan ekstrak *Centella asiatica* menunjukkan aktivitas *scavenging* radikal sebesar 84% pada konsentrasi 1 mg / mL.

#### 2. Antiinflamasi

Kandungan pegagan yang memiliki efek anti inflamasi adalah flavonoid dan triterpen (Chippada & Vangalapati, 2011). Li *et al.* (2009) membuktikan madecassoside sebagai produk triterpenoid dari *Centella asiatica* dapat menurunkan proliferasi sel limpa, tingkat plasma TNF- dan IL-6, PGE2 jaringan sinovial dan ekspresi protein COX-2 pada penyakit arthrititis.

#### 3. Antihipertensi

Triterpenoid berperan dalam sintesis elemen pembuluh darah vena, dimana senyawa ini aktif pada mikrosirkulasi pembuluh darah vena dan mikroangiopati diabetes (Incandela *et al.*, 2001).

#### 4. Penyembuhan tukak lambung

Pemberian ekstrak air pegagan 250 mg/kgBB dan asiatisosida 10 mg/kg BB mampu menyembuhkan tukak lambung yang ditandai dengan pembentukan angiogenesis, proliferasi epitel, regenerasi sel mukosa dan penghambatan aktivitas meioperoksidase penyebab tukak lambung (Cheng *et al.*, 2004).

5. Efek kardioprotektif  
Asiatikosida dan asam arjunolat dari ekstrak air pegagan mampu menurunkan enzim laktat dehidrogenase, glutamat oksaloasetat transminase, kreatin posvokinase, dan glutamat piruvat transminase yang berperan sebagai marker disfungsi jantung (Gnanapragasam *et al.*, 2004; Gnanapragasam *et al.*, 2007).

6. Efek Neuroprotektif  
Pegagan memiliki efek protektif terhadap penurunan kognitif dan kerusakan oksidatif yang diinduksi kolsikin (Kumar *et al.*, 2009). Ekstrak daun segar pegagan 6 mL/kg selama 6 minggu dapat meningkatkan struktur percabangan dendrit (Dhanasekaran *et al.*, 2009).

Manfaat lain pegagan adalah sebagai obat tonik, antiinfeksi, antirematik, penenang, mepercepat penyembuhan luka, dan diuretik (Agoes, 2011).

## 2.6 Zebrafish (*Danio rerio*)

### 2.6.1 Karakteristik Zebrafish

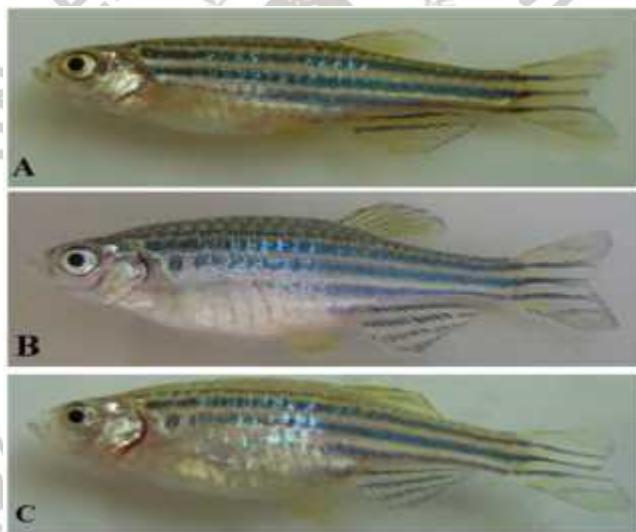
Zebrafish (*Danio rerio*) merupakan ikan air tawar yang berasal dari pedalaman sungai di India. Selain itu zebrafish juga ditemukan di Asia Tenggara, bahkan di Amerika (Mayden *et al.*, 2007; Spence *et al.*, 2008). Klasifikasi zebrafish dapat dilihat pada tabel 2.4

Tabel 2.4 Klasifikasi Zebrafish

Tingkatan	Nama
Kingdom	Animal
Filum	Chordata
Kelas	Actynoptergii
Ordo	Cypriniformes
Family	Cyprinidae
Subfamily	Rasborone
Genus	Brachydanio
Spesies	Brachydanio rerio

(Richards, 2011).

Zebrafish memiliki panjang standar sekitar 40 mm yang diukur dari ujung moncong ke arah sirip ekor. Pertumbuhan paling cepat terjadi selama tiga bulan pertama setelah menetas, kemudian mulai menurun dan mendekati nol sekitar usia 18 bulan. Rata-rata rentang hidup zebrafish sampai usia 42 bulan, dengan individu tertua yang bertahan 66 bulan (Spence et al., 2008). Ikan dewasa memiliki tubuh dengan garis hitam dan putih horizontal mulai dari sirip hingga ekor yang terlihat seperti zebra. Warna lain yang tampak adalah garis biru hitam serta kuning perak. Ikan jantan memiliki warna lebih gelap dibandingkan ikan betina pada daerah sirip samping dan ekor (Slanchev et al., 2005) seperti terlihat pada gambar 2.15. Ikan jantan lebih agresif dari ikan betina (Pyron, 2003).

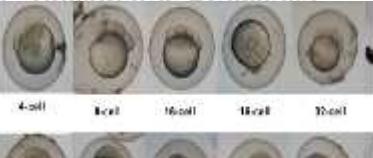
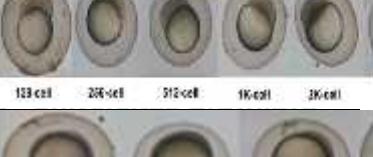
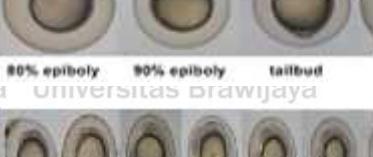
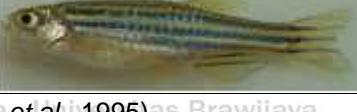


**Gambar 2.15 Morfologi zebrafish (*Danio rerio*)**

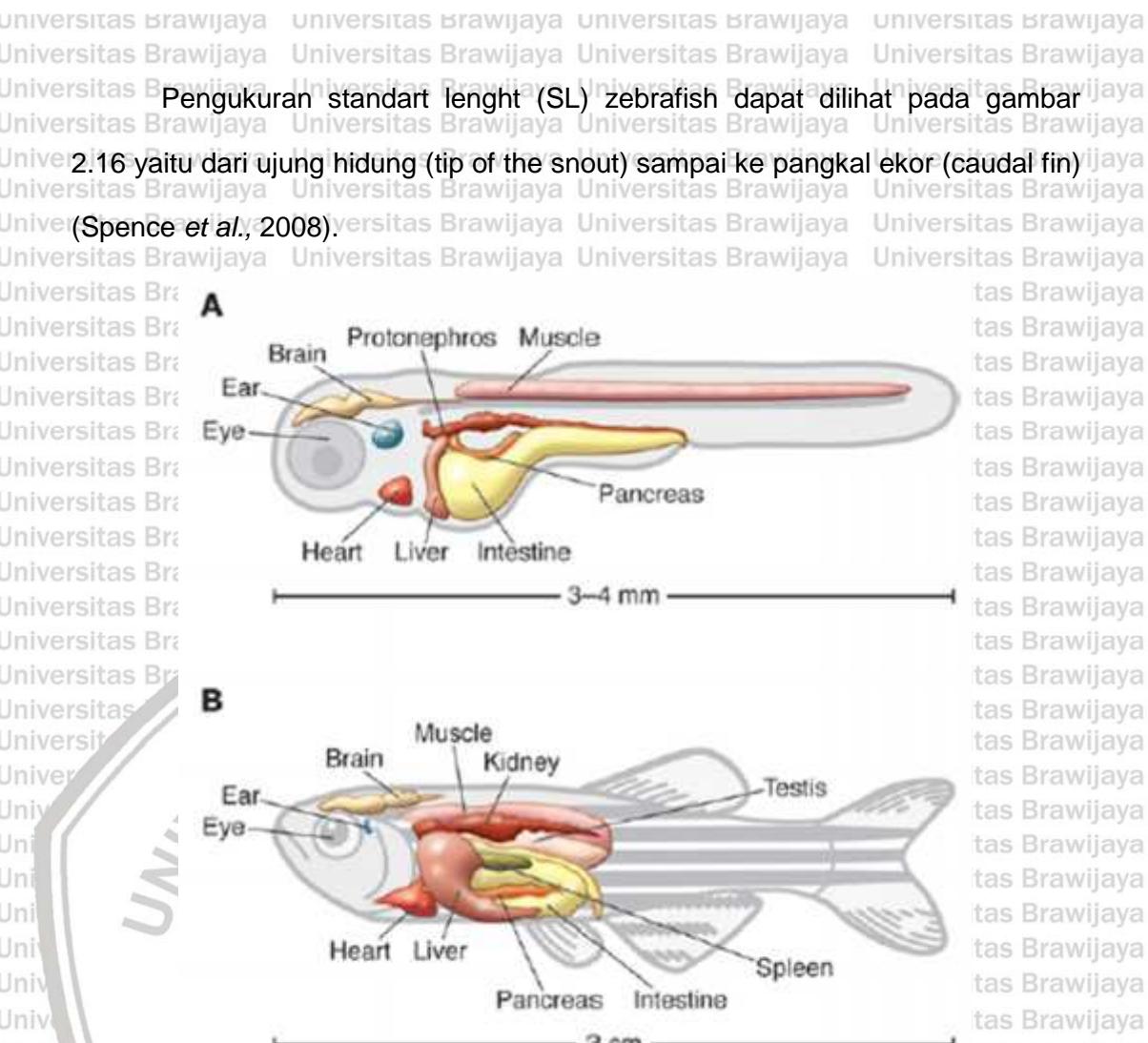
Keterangan : A. Zebrafish jantan terlihat lebih ramping dengan garis sirip berwarna biru gelap . B dan C. Zebrafish betina terlihat lebih gemuk dengan sirip berwarna biru perak (Avdesh et al., 2012).

## 2.6.2 Perkembangan Zebrafish

Zebrafish mengalami kematangan seksual pada usia 2-4 bulan (Wilson, 2012). Meskipun demikian, pengembangbiakan ikan harus dilakukan pada usia antara 7 dan 18 bulan untuk produksi embrio maksimum (Sullivan, 2017).

Periode	Usia	Ukuran	Deskripsi	Gambar
Zigot	0 hpf		Telur yang baru dibuahi akan menyelesaikan siklus zigot yang pertama	
Cleavage	3/4 hpf		Siklus sel dari 2 sampai 7 terjadi secara cepat dan serentak	
Blastula	2 1/4 hpf		Siklus pembelahan sel metasinkronus (8,9) secara cepat, memanjang, epiboly mulai terbentuk	
Gastrula	5 1/4 hpf		Gerakan morfogenetik dari involusi, konvergensi dan ekstensi membentuk epiblas, hipoblas, dan sumbu embrio di akhir epiboly.	
Segmentasi	10 hpf	0,9-1,6 mm	Terbentuk lengkung faring, neuro berkembang, organogenesis primer, gerakan awal, ekor mulai muncul	
Faringula	24 hpf		Tahap philotipic, sumbu lurus tubuh melengkung mengikuti yolk sac, sirkulasi, pigmentasi dan sirip mulai berkembang	
Hatching	48 hpf	1,9-2,9 mm	Penyelesaian morfogenesis dari sistem organ utama, tulang rawan di kepala dan sirip dada berkembang, terjadi penetasan	
<b>Fase post embrio</b>				
Early larva	3 dpf	3,5 mm	Embrio keluar dari korion, mampu berenang, tumbuh tunas filamen insang, kandung kemih mengembang.	
	5 dpf	3,9 mm	Memiliki 6 gigi, aktif makan	
	7 dpf	7-7,8 mm	Memiliki 8 gigi, tumbuh tulang rawan	
Mid larva	14 dpf	6,2 mm	Memiliki 10 gigi, saraf dan neuron sempurna	
	21 dpf	7-7,8 mm	Pembentukan tulang faring dorsal dan tunas sirip anal	
Juvenile	30 dpf	9-10 mm	Memiliki 12 gigi, sirip dewasa dan muncul pigmentasi	
	45 dpf	12,5-14 mm		
Adult	90 dpf	2 cm	Organ seksual matang dan siap untuk breeding	
	1000 dpf	4-5 cm	Mati	

Keterangan : Proses perkembangan zebrafish sangat cepat (Kimmel et al., 1995).



**Gambar 2.16 Pengukuran zebrafish**

Keterangan : Panjang zebrafish diukur dari ujung hidung sampai ke pangkal ekor  
 A. Larva zebrafish berukuran 3-4 mm B. Zebrafish dewasa berukuran 3 cm (Santoriello & Zon, 2012).

### 2.6.3 Perawatan Zebrafish

#### 1. Karakteristik Air

Zebrafish dipelihara pada sistem sirkulasi, aerasi, dan penyaringan yang baik untuk menjaga kualitas air sehat. Karakteristik air yang digunakan dapat dilihat pada tabel 2.6

Parameter	Rentang Optimum
Alkalinitas	50-150 mg/L CaCO <sub>3</sub>
pH	6,8-7,5
Suhu	26-28,5 °C
Hardness	50-100 mg/L CaCO <sub>3</sub>
Amonia tidak terionisasi	<0,02 mg/L
Nitrat (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	<50 mg/L
Nitrit (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	<0,1 mg/L
Oksigen terlarut	>6 mg/L
Salinitas	0,5-1 g/L
Konduktivitas	300-1.500 µS
Advesh, et al., 2012.	

## 2. Kebersihan

Aquarium perlu dibersihkan secara teratur dengan menguras seminggu sekali, dan spon penyaring diganti setiap 3 hari (Advesh et al., 2012; Zfin.org).

## 3. Pencahayaan

Zebrafish membutuhkan pencahayaan berdasarkan siklus gelap-terang (14 jam teranga dan 10 jam gelap) menggunakan lampu yang diletakkan di atas aquarium. Ikan dewasa betina akan berespon untuk bertelur dan ikan jantan membuat setelah cahaya dihidupkan (Nusslein & Dahm, 2002).

## 4. Makanan

Zebrafish dapat diberi makan dengan makanan kering (ukuran 100 mikron untuk larva dan 300/400 mikron untuk ikan dewasa) atau makanan hidup berupa artemia (Advesh, et al., 2012).

### 2.6.4 Zebrafish Sebagai Model Penelitian

Zebrafish (*Danio rerio*) sering dipilih sebagai hewan coba dalam penelitian karena :

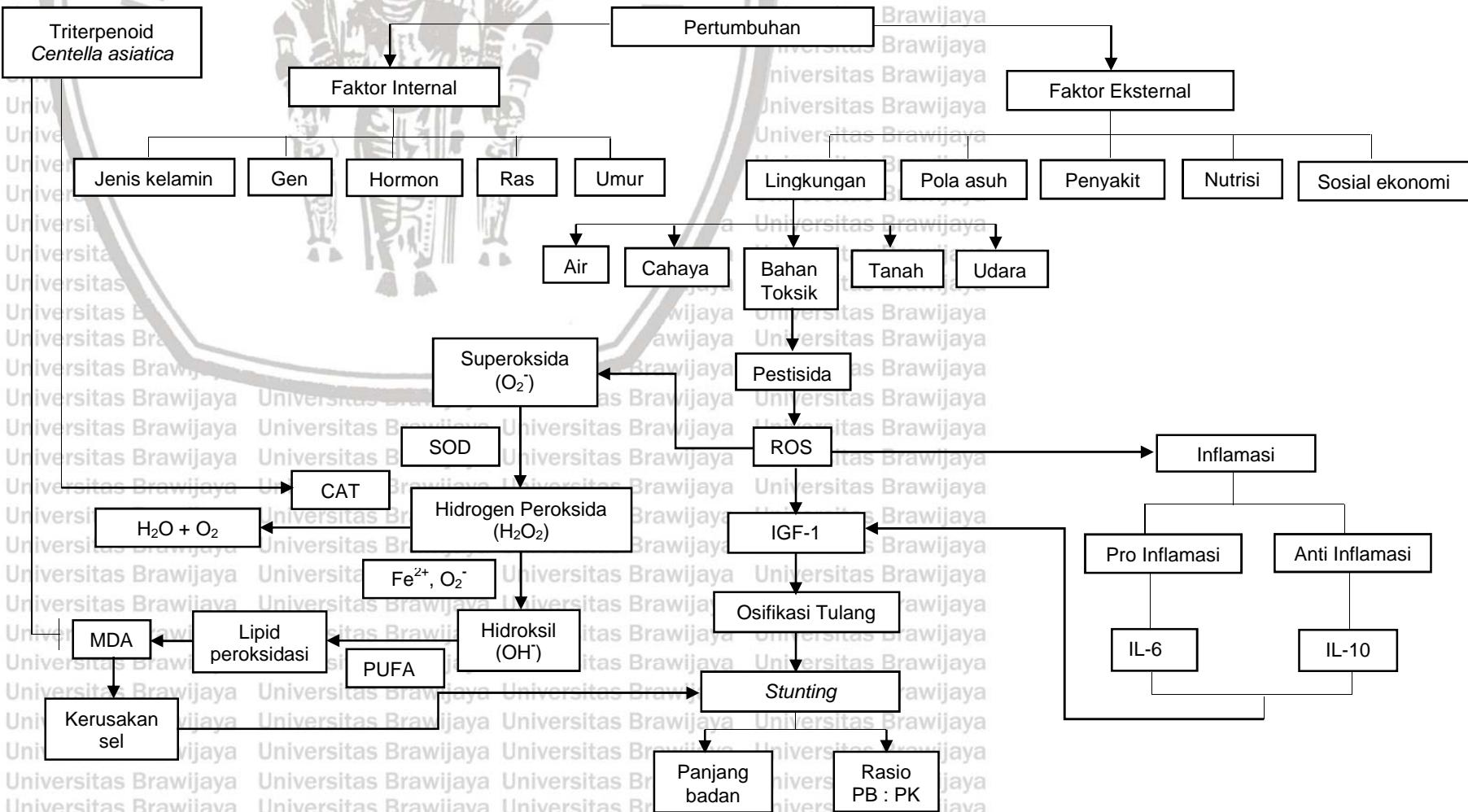
1. Zebrafish memiliki kesamaan genetik dengan manusia dimana sekitar 70% dari semua gen penyakit manusia homolog dengan zebrafish (Santoriello & Zon, 2012).

2. Zebrafish memiliki ukuran yang kecil sehingga mudah dalam perawatan.
- Selain itu zebrafish memiliki kemampuan reproduksi yang tinggi, ditandai dengan kemampuan zebrafish menghasilkan telur sebanyak 200-3000 telur per minggu (Eimon et al., 2010; Richards, 2011).
3. Proses embriogenesis zebrafish cepat dimana keseluruhan rangka tersusun 24 jam pasca fertilisasi, dan organ internal seperti jantung, hati, dan usus berkembang sempurna pada 96 jam pasca fertilisasi (Eimon et al., 2010).
4. Larva zebrafish transparan sehingga mudah diamati (Eimon et al., 2010).
5. Sistem kardiovakuler, sistem pencernaan dan sistem syaraf menyerupai mamalia (Eimon et al., 2010).
6. Genom pada zebrafish mudah dimanipulasi (Padilla et al., 2012).

### BAB 3

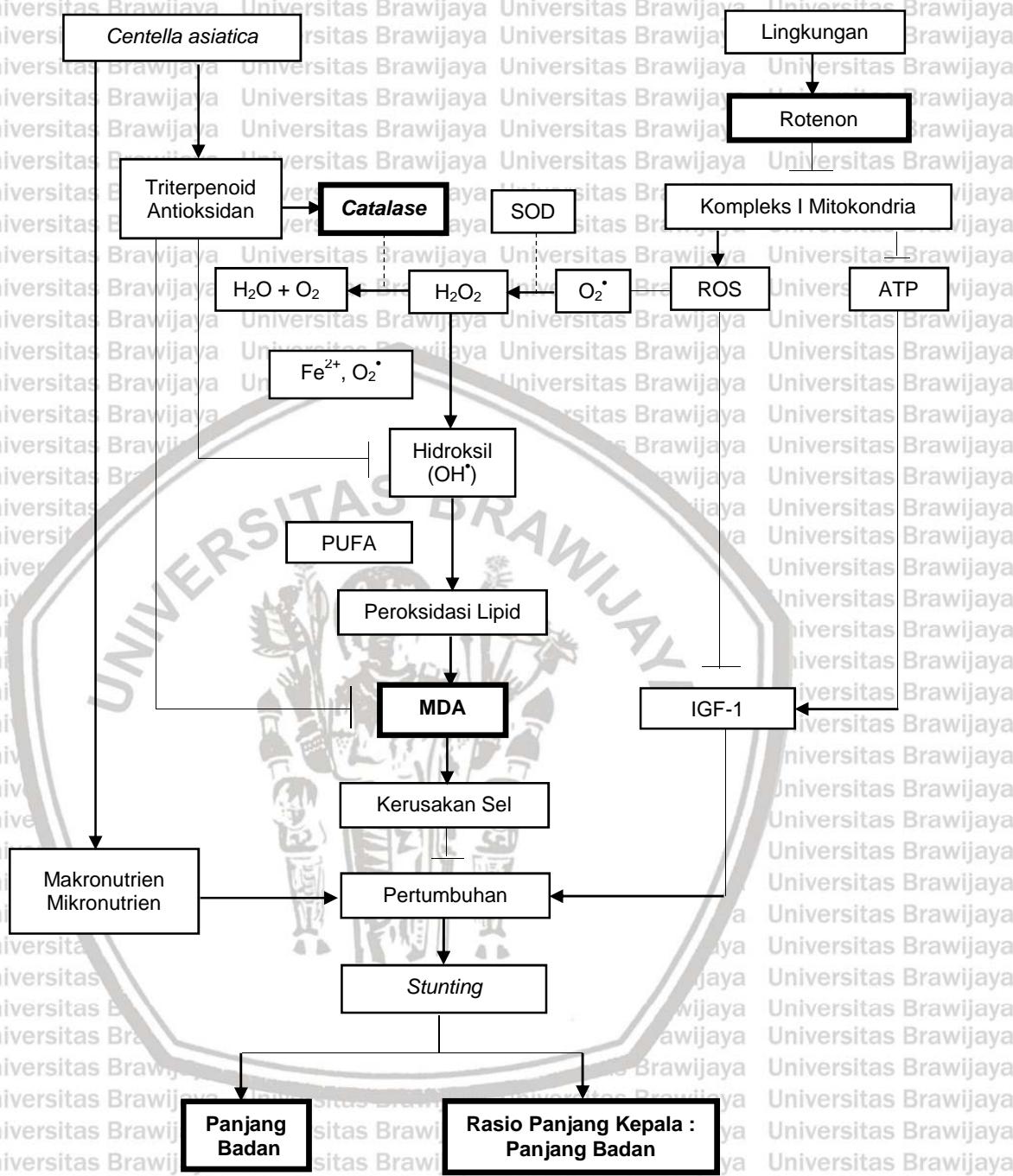
## KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP

### 3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1 Kerangka teori

### 3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka konsep

Keterangan :

: Parameter yang diteliti

: Parameter yang tidak diteliti

: Mempengaruhi

: Menghambat

### 3.3 Penjelasan Kerangka Konsep

Faktor genetik dan lingkungan sangat berpengaruh terhadap tumbuh kembang anak. Pestisida seperti rotenon merupakan bahan toksin atau zat kimia yang berasal dari lingkungan. Ibu hamil berisiko untuk terpapar pestisida sehingga dapat berpengaruh pada tumbuh kembang anak nantinya. Rotenon menghambat kompleks I mitokondria sehingga meningkatkan produksi ROS dan menurunkan jumlah Adenosine Triphosphate (ATP). Terganggunya sistem transport elektron mengakibatkan penurunan oksigenasi dan peningkatan kadar hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) (N. Li *et al.*, 2003).

Untuk mencegah serangan radikal bebas terhadap kerusakan sel diperlukan antioksidan sehingga reaksi yang lebih kompleks dapat dihentikan.

Catalase merupakan salah satu antioksidan enzimatis yang bekerja dengan cara mengatalisis dismutasi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) menjadi air dan oksigen (Winarsi, 2011). Kadar antioksidan akan terus menerus meningkat seiring dengan peningkatan ROS, namun jika ROS meningkat melebihi kapasitas antioksidan maka akan terjadi reaksi Fenton-Haber Weiss yang menghasilkan radikal hidroksil yang sangat reaktif.

Radikal hidroksil dapat menyerang *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dengan salah satu produk akhirnya yaitu MDA. Produk peroksidasi lipid ini merupakan aldehid reaktif yang dapat menyebabkan stres toksik pada sel. Kerusakan pada sel dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan dan menghambat pertumbuhan linier sehingga memediasi terjadinya *stunting* pada awal kehidupan. Selain itu ROS dapat menyebabkan oksidasi DNA yang mengakibatkan terjadi penurunan IGF-1 sehingga mengganggu proses pertumbuhan serta memiliki dampak jangka panjang terhadap *stunting*.

*Stunting* diidentifikasi dengan mengukur panjang badan, dimana nilai z-score <-2 SD. Anak *stunting* memiliki tubuh yang proporsional, sehingga perlu dilakukan pengukuran rasio panjang kepala dan panjang badan yang berguna untuk membedakan *stunting* dengan kretinisme.

Penggunaan pegagan (*Centella asiatica*) sebagai salah satu tanaman obat dapat mencegah efek toksik dari rotenon. Pegagan memiliki kandungan utama yaitu triterpenoid yang berperan sebagai antioksidan dalam menyeimbangkan oksidan dalam sel sehingga stress oksidatif dapat dicegah. Antioksidan dari pegagan berperan dalam scavenger radikal bebas superoksida, hidrogen peroksida dan hidroksil. Pegagan dapat menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) dan meningkatkan kadar antioksidan enzimatis seperti *catalase*. Selain itu pegagan juga memiliki kandungan nutrisi seperti makronutrien, mikronutrien, dan fitonutrien yang berfungsi mengatur proses pertumbuhan.

### 3.4 Hipotesis

Hipotesis umum dalam penelitian ini adalah “ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pre sampai dengan *post hatching* dapat meningkatkan kadar *Catalase*, menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA), dan meningkatkan panjang badan larva zebrafish *Stunting*“.

Secara khusus hipotesis penelitian ini dijabarkan dalam sub hipotesis berikut ini :

1. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pre sampai dengan *post hatching* dapat meningkatkan panjang badan pada larva zebrafish *stunting* di usia 6 dpf.
2. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pre sampai dengan *post hatching* dapat meningkatkan kadar *Catalase* pada larva zebrafish *stunting* di usia 6 dpf.

3. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre sampai dengan post hatching* dapat menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada larva zebrafish *stunting* di usia 6 dpf.
4. Terdapat hubungan antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre sampai dengan post hatching* dengan panjang badan pada larva zebrafish *stunting*.
5. Terdapat hubungan antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre sampai dengan post hatching* dengan kadar *Catalase* pada larva zebrafish *stunting*.
6. Terdapat hubungan antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre sampai dengan post hatching* dengan kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada larva zebrafish *stunting*.



## METODE PENELITIAN

#### **4.1 Jenis dan Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah eksperimen murni (*true experiment*) yang menggunakan *post test only control group design* dengan random alokasi. Dalam penelitian ini terdapat kelompok eksperimen dan kelompok kontrol, dimana penentuan sampel ke dalam setiap kelompok dilakukan secara acak dengan membagi langsung ke dalam masing- masing kelompok.

## 4.2 Populasi dan Sampel

#### **4.2.1 Populasi Penelitian**

Populasi penelitian ini adalah embrio sampai larva zebrafish usia 0-6 dpf yang diperoleh dari hasil fertilisasi zebrafish *wild type* antara induk jantan dan betina dengan perbandingan 1:2. Zebrafish yang dipilih memiliki ciri strip horizontal berwarna biru tua kehitaman yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang serta telah teruji dan tersertifikasi di Laboratorium Hidrologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawiiaya Malang (Khotimah *et al.*, 2015).

#### **4.2.2 Sampel Penelitian**

Sampel dalam penelitian ini adalah embrio sampai larva zebrafish pada usia 0-6 dpf. Pengambilan sampel dilakukan secara random alokasi, dimana penentuan sampel pada masing-masing kelompok dilakukan secara acak.

Penentuan jumlah replikasi menggunakan rumus :

(t-1) (r-1) 15

(5-1) (r-1) 15

(4) (r-1) 15

Pembagian kelompok tersebut adalah :

- 
  1. Kontrol adalah sampel yang tidak diberikan paparan rotenon dan ekstrak pegagan.
  2. Rotenon adalah sampel yang diberikan paparan rotenon 12,5 ppb (2 hpf-3 dpf).
  3. Perlakukan 1 (P1) adalah sampel yang dberikan paparan rotenon 12,5 ppb (2 hpf-3 dpf) dan konsentrasi pegagan 5 $\mu$ g/mL pada 2 hpf-4 dpf.
  4. Perlakukan 2 (P2) adalah sampel yang dberikan paparan rotenon 12,5 ppb (2 hpf-3 dpf) dan konsentrasi pegagan 5 $\mu$ g/mL pada 2 hpf-5 dpf.
  5. Perlakukan 3 (P3) adalah sampel yang dberikan paparan rotenon 12,5 ppb (2 hpf-3 dpf) dan konsentrasi pegagan 5 $\mu$ g/mL pada 2 hpf-6 dpf.

#### **4.3 Kriteria Inklusi dan Ekslusi**

#### 4.3.1 Kriteria Inklusi

Embrio zebrafish berusia 0-2 hpf, berwarna jernih transparan, tidak terdapat serabut putih atau jamur saat dilihat di bawah mikroskop optilab, dan embrio yang kosong (tidak terbuahi).

### 4.3.2 Kriteria Eksklusi

Embrio zebrafish yang *hatching* atau menetas sebelum 3 dpf, embrio yang cacat.

### 4.3.3 Kriteria Dropout

Embrio yang mati sebelum penelitian selesai dilaksanakan.

## 4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

### 4.4.1 Tempat Penelitian

1. Pemeliharaan zebrafish, pembuatan ekstrak pegagan dan larutan rotenon,

serta pengukuran panjang badan dilakukan di Laboratorium Farmakologi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

2. Pemeriksaan kadar Catalase dan kadar *Malondialdehyde* (MDA) dilakukan

di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Malang.

### 4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari – Maret 2018.

## 4.5 Variabel Penelitian

1. Variabel *Independent* : ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre hatching* sampai dengan *post hatching*.

2. Variabel *Dependent* : panjang badan, kadar catalase dan kadar MDA.

3. Variabel kendali : konsentrasi rotenon, embrionik medium, kebersihan well plate dan inkubator, dan suhu

$28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

## 4.6 Definisi Operasional

**Tabel 4.1 Definisi Operasional**

Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Data
Ekstrak etanol pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) pre sampai dengan post hatching	Waktu paparan ekstrak pegagan dengan konsentrasi 5 µg/mL yang diberikan pada masing-masing kelompok perlakuan dimulai dari masa pre sampai dengan post hatching	Pemberian	Rasio
Stunting	Panjang atau tinggi badan menurut umur dimana nilai z-score <-2 SD dan rasio PK: PB = 1:5	< -2 Standar Deviasi	Rasio
Panjang badan larva zebrafish	Pengukuran panjang badan dari ujung hidung sampai pangkal sirip (snout-fin) pada usia 3-6dpf, yang diamati dengan mikroskop stereometri (Olympus SZ61), kemudian gambar diambil menggunakan Optilab versi 2.0, dan panjang badan diukur menggunakan software Immage Raster versi 3 yang telah dikalibrasi.	Panjang badan (mm)	Rasio
Rasio panjang kepala dan panjang badan	Pengukuran panjang kepala dari snout ke operkulum dibandingkan dengan panjang badan larva keseluruhan (snout-fin).	PK : PB	Rasio
Kadar catalase	Kadar catalase larva zebrafish usia 6 hari setelah dilakukan terminasi yang diukur menggunakan Rat Catalase Elisa Kit- Bioassay Technology Laboratory di Laboratorium Biomedik FKUB Malang.	Kadar catalase zebrafish ng/ml	Rasio
Kadar MDA	Kadar MDA larva zebrafish usia 6 hari setelah dilakukan terminasi yang diukur menggunakan Rat Malondialdehyde Elisa Kit- Bioassay Technology Laboratory di Laboratorium Biomedik FKUB Malang.	Kadar MDA zebrafish nmol/ml	Rasio
Konsentrasi rotenon	Rotenon Sigma (R8875) dengan kemurnian 95% dilarutkan dengan dimethyl sulfoxide 1%	Konsentrasi 12,5 ppb	Rasio
Medium embrionik	Larutan medium dari bahan CaCl 0,25 gr; KCl 0,15 gr; NaCl 5 gr; dan MgSO4 0,815 gr dan 500 ml aquadest dengan kepekatan 10 kali dan disimpan pada suhu 2-8 °C	mL	Rasio
Suhu	Suhu inkubator yang dipertahankan pada 28 °C ± 1 °C	°C	Interval

## 4.7 Alat dan Bahan

### 4.7.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Zebrafish

1. Alat : aquarium dengan kapasitas 60 L, filtrasi dan aerasi air, pH meter, alat pengukur suhu, tempat penakaran telur ikan, *well plate* berisi 6 sumuran, pipet plastik, mikropipet dan tip (*blue, yellow, white*), inkubator suhu  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , mikroskop, laptop, *software optilab* dan *image raster*.
2. Bahan : air aqua, medium embrionik, dan pakan ikan (tetramin).

### 4.7.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Pegagan

1. Alat : timbangan, oven, blender, gelas erlenmeyer, evaporator, corong gelas, labu penampung etanol, *rotary evaporator*, *water pump*, selang *water pump*, *water bath*, *vaccum pump*, botol tempat hasil ekstraksi, dan lemari pendingin.
2. Bahan : tanaman pegagan, pelarut etanol, kertas saring, dan *alumunium foil*.

### 4.7.3 Alat dan Bahan Pembuatan Medium Embrionik

1. Alat : tabung reaksi 500 mL, timbangan digital (Metter Toledo), dan alat pengaduk.
2. Bahan : CaCl 0,25 gr, KCl 0,15 gr, NaCl 5 gr, MgSO<sub>4</sub> 0,815 gr, dan aquadest 500 mL.

### 4.7.4 Alat dan Bahan Pengukuran Kadar Catalase

1. Alat : *Rat Catalase ELISA Kit- Bioassay Technology Laboratory, pre-coated ELISA plate*, *plate sealer*, mikropipet dan tip, *ependorft* 1,5 mL, *vortex centrifuge*, inkubator dan *microplate reader*.
2. Bahan : *standard solution*, *standartd diluent*, *streptavidin HRP*, *substrat solution A*, *substrat solution B*, *stop solution*, *wash buffer*, *Biotin Conjugate Anti -Rat CAT Antibody*.

#### 4.7.5 Alat dan Bahan Pengukuran Kadar MDA

1. Alat : *Rat Malondialdehyde Elisa Kit- Bioassay Technology Laboratory, precoated ELISA plate, plate sealer, mikropipet dan tip, eppendorf 1,5 mL, vortex, centrifuge, inkubator dan microplate reader.*

2. Bahan : *standard solution, standard diluent, streptavidin HRP, substrat solution A, substrat solution B, stop solution, wash buffer, Biotin Conjugate Anti -Rat MDA Antibody.*

#### 4.8 Prosedur Penelitian

##### 4.8.1 Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio

Zebrafish dipelihara di lingkungan air tawar dalam aquarium dengan kapasitas 60 liter. Air yang digunakan adalah air aqua pada suhu 26-28,5 °C, dan pH 6,8-7,5 (Avdesh *et al.*, 2012). Jenis pakan yang diberikan adalah tetramin dengan frekuensi 3 kali sehari (Khotimah *et al.*, 2015). Pembibitan zebrafish disesuaikan dengan siklus gelap : terang (10 jam : 14 jam) (Advesh *et al.*, 2012) pada lingkungan yang tenang dan terhindar dari stress lingkungan.

Siklus gelap-terang dapat diatur sesuai dengan keinginan peneliti. Pembibitan zebrafish diawali dengan siklus terang selama 14 jam. Setelah zebrafish diberi makan, tempat penangkaran telur (trap) dipasang, dan siklus gelap selama 10 jam dapat dimulai. Trap diangkat 30 menit setelah lampu dinyalakan untuk memberikan kesempatan fertilisasi dan peletakan telur pada tempat trap yang dipasang (Advesh *et al.*, 2012). Setelah trap diangkat, embrio dipindahkan ke cawan petri dan dibersihkan menggunakan air aqua hingga tidak ada kotoran dan jamur. Setelah embrio diperiksa menggunakan mikroskop stereo (Olympus SZ61), dipindahkan ke well plate 6 serta diberikan perlakuan yang sesuai untuk masing-masing kelompok. Kemudian well plate dimasukkan ke

dalam inkubator dengan suhu 28 °C. Prosedur ini dilakukan dengan cepat sebelum embrio berusia 2 hpf.

#### 4.8.2 Pembuatan Medium Embriонik

Pembuatan 500 ml larutan stok medium embrionik dengan kepekatan 10 kali menggunakan bahan CaCl 0,25 gr; KCl 0,15 gr; NaCl 5 gr; dan MgSO<sub>4</sub> 0,815 gr dan 500 mL aquadest yang dimasukkan dalam tabung reaksi (Modified from

Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2011). Larutan stok disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 2-8 °C. Saat akan digunakan, medium embrionik ditambahkan air aqua dengan perbandingan medium embrionik dan air aqua adalah 1:9.

#### 4.8.3 Pembuatan Larutan Rotenon

Rotenon sigma (R8875) dengan kemurnian 95% dalam bentuk serbuk dilarutkan dengan DMSO (dimethyl sulfoxide 1%) sehingga didapatkan konsentrasi stok sebesar  $2 \times 10^3 \mu\text{g/L}$  (Khotimah *et al.*, 2015). Untuk membuat rotenon 12,5 ppb sebanyak 5 mL (1 sumuran) dari konsentrasi stok  $2 \times 10^3 \mu\text{g/L}$  menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 2 \times 10^3 \mu\text{g/L} &= 5 \text{ mL} \times 12,5 \text{ ppb} \\ V_1 &= \frac{5 \text{ mL} \times 12,5 \text{ ppb}}{2 \times 10^3 \mu\text{g/L}} \\ &= 62,5 \text{ mL} \\ &= \frac{62,5 \text{ mL}}{2 \times 10^3} \\ &= 31,25 \times 10^{-3} \text{ mL} \\ &= 31,25 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Keterangan :

$V_1$  = Volume awal

$M_1$  = Konsentrasi stok

$V_2$  = Volume yang diinginkan

$M_2$  = Konsentrasi akhir yang dinginkan

1 ppb = 1  $\mu\text{g/L}$

Jadi, sebanyak 31,25  $\mu\text{L}$  stok rotenon diambil menggunakan mikropipet dan ditambahkan medium embrionik sampai 5 mL.

#### 4.8.4 Pembuatan Ekstrak Pegagan

Pegagan yang digunakan diperoleh dari UPT Material Medica Batu Jawa Timur yang telah bersertifikat. Khotimah *et al.* (2015) menyatakan terdapat zat aktif *asiatocosida* sebesar 0,29% pada *Centella asiatica* yang diukur menggunakan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) (*Thermo Scientific, Accela*). Bagian dari tanaman yang digunakan untuk pembuatan ekstrak adalah bagian atas tanpa stolon dan akar (Khotimah *et al.*, 2015c).

Prosedur pembuatan ekstrak pegagan adalah sebagai berikut :

1. Pegagan dicuci bersih kemudian dikeringkan dengan cara dianginkan dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40 °C.
2. Pegagan yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender.
3. 100 gram serbuk pegagan dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer dan direndam dalam 900 mL larutan ethanol 98%. Kemudian diaduk selama ± 30 menit dan didiamkan sampai mengendap selama 24 jam.
4. Lapisan atas rendaman serbuk pegagan (campuran etanol dan zat aktif) diambil dan disaring menggunakan corong buncher.
5. Proses evaporasi dilakukan menggunakan *rotary evaporator* dengan cara memasukkan filtrat ke dalam labu evaporasi 1L dan dipasang pada evaporator. *Water bath* diisi sampai penuh, dan dipanaskan hingga suhu 70 °C. Proses evaporasi berlangsung ± 1,5-2 jam.
6. Hasil ekstraksi ditimbang dan dimasukkan dalam botol plastik dan disimpan pada lemari pendingin (*freezer*) (Selvi *et al.*, 2012).

#### 4.8.5 Pembuatan Larutan Pegagan

Konsentrasi pegagan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 µg/mL.

Pembuatan konsentrasi stok pegagan didapatkan dengan perhitungan :

$$\underline{10 \text{ mg pegagan}} = 1 \text{ mg/mL} = 1000 \mu\text{g/mL}$$

$$10 \text{ ml aquades}$$

Untuk membuat larutan pegagan dengan konsentrasi 5  $\mu\text{g/mL}$  sebanyak 5 mL (1 sumuran) dari konsentrasi stok 1000  $\mu\text{g/mL}$  menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 1000 \mu\text{g/mL} &= 5 \text{ mL} \times 5 \mu\text{g/mL} \\ V_1 &= \underline{\underline{5 \text{ mL} \times 5 \mu\text{g/mL}}} \\ &\quad 1000 \mu\text{g/mL} \\ &= 25 \times 10^{-3} \text{ mL} \\ &= 25 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Keterangan :

$V_1$  = Volume awal

$M_1$  = Konsentrasi stok

$V_2$  = Volume yang diinginkan

$M_2$  = Konsentrasi akhir yang dinginkan

Jadi, sebanyak 25  $\mu\text{L}$  stok pegagan diambil menggunakan mikropipet dan ditambahkan medium embrionik sampai 5 mL.

#### 4.8.6 Perlakuan pada Setiap Kelompok

##### 1. Kontrol

Untuk kontrol diberikan 5 mL medium embrionik pada setiap sumuran.

##### 2. Rotenon

Larutan rotenon 12,5 ppb diberikan pada usia 2 hpf-3 dpf hpf dengan penggantian medium setiap 24 jam.

##### 3. Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2), dan Perlakuan 3 (P3)

Cara membuat campuran larutan rotenon 12,5 ppb + pegagan 5  $\mu\text{g/mL}$  untuk 1 sumuran (5 mL) diperoleh dengan mencampurkan 31,25  $\mu\text{L}$  stok rotenon dan 25  $\mu\text{L}$  stok pegagan kemudian ditambahkan medium embrionik sampai 5 mL. Lama pemberian rotenon dan ekstrak etanol pegagan dapat dilihat pada tabel 4.2

**Tabel 4.2 Lama Pemberian Rotenon dan Pegagan**

<b>Kelompok</b>	<b>Usia Larva</b>			
	<b>2 hpf – 3 dpf</b>	<b>4 dpf</b>	<b>5 dpf</b>	<b>6 dpf</b>
Kontrol				
Rotenon				
P1				
P2				
P3				
<b>Keterangan :</b>				
Universitas Brawijaya	: Medium Embrionik			
Universitas Brawijaya	: Rotenon 12,5 ppb			
Universitas Brawijaya	: Rotenon 12,5 ppb + pegagan 5 µg/mL			
Universitas Brawijaya	: Pegagan 5 µg/mL			

Pemberian paparan rotenon pada zebrafish dilakukan sebelum *hatching* (2hpf-3 dpf) yang diasumsikan masih di dalam kandungan (inta uterin).

Pemberian paparan pegagan juga dimulai sejak intra uterin, dan dilanjutkan sampai ekstra uterin, dimana terdapat perbedaan lama paparan antara kelompok P1 (sampai 4 dpf), P2 (sampai 5 dpf), dan P3 (sampai 6 dpf). Setelah selesai pemberian pegagan pada masing-masing kelompok, larva dibilas dengan medium embrionik sebanyak 3 kali dan selanjutnya diberikan medium embrionik saja. Semua medium diganti setiap hari untuk menghindari kontaminasi.

#### 4.8.7 Pengukuran Panjang Badan dan Rasio Panjang Kepala

Pengukuran panjang badan dan rasio panjang kepala : panjang badan dilakukan pada usia 3-6 dpf. Panjang badan diukur dari ujung hidung (*tip of the snout*) sampai pangkal sirip ekor (*caudal fin*) yang dikenal dengan *snout-fin* (Spence et al., 2008). Satuan yang digunakan adalah milimeter. Rasio panjang kepala dan pajang badan dilakukan dengan membandingkan ukuran panjang kepala dari *snout* ke *operculum* dengan panjang badan larva keseluruhan (*snout-fin*). Larva zebrafish diletakkan pada *object glass* dalam keadaan lurus, diam dan tidak bergerak, kemudian diamati menggunakan mikroskop stereometri.

(Olympus SZ61). Pengambilan gambar dilakukan menggunakan Optilab versi 2.0, dan panjang badan diukur menggunakan software Immage Raster versi 3 yang telah dikalibrasi sebelumnya.

#### 4.8.8 Pengukuran Kadar Catalase

Persiapan sampel dilakukan dengan cara homogenisasi jaringan dengan cara :

1. Larva zebrafish dieutanasia dengan cara dimasukkan pada air es dengan

komposisi 5 bagian es dan 1 bagian air selama 40 menit. Suhu air es

dipertahankan pada suhu 0 °C yang dipantau menggunakan termometer

(Strykowski & Schech, 2015).

2. Larva zebrafish ( $n = 30$  larva/kelompok) dihomogenisasi dengan 500  $\mu\text{L}$

Ripa Buffer menggunakan homogenizer kaca. Homogenate disentrifus

pada suhu 4 °C dengan kecepatan 2,500 rpm selama 20 menit.

Supernatan diambil untuk dilakukan prosedur pemeriksaan.

Kadar catalase dari jaringan yang telah disiapkan diukur menggunakan

Rat Catalase ELISA Kit merk Bioassay Technology Laboratory (Cat.No

E0869Ra) dengan langkah sebagai berikut:

1. Semua reagen, larutan standar, sampel dan pre-coated ELISA plate

disiapkan.

2. Standar disiapkan secara bertingkat dengan mengambil 120  $\mu\text{L}$  original

standar ditambah 120  $\mu\text{L}$  standard diluent untuk standar 5. Kemudian

mengambil 120  $\mu\text{L}$  ditambah 120  $\mu\text{L}$  standard diluent untuk standar 4 dan

seterusnya.

3. 50  $\mu\text{L}$  standar dimasukkan ke dalam well standar.

4. 40  $\mu\text{L}$  sampel dimasukkan ke dalam *well* sampel, kemudian ditambahkan 10  $\mu\text{L}$  antibodi anti-CAT. Selanjutkan dishaker dan diinkubasi beberapa menit.
5. 50  $\mu\text{L}$  streptavidin-HRP ditambahkan ke dalam *well* sampels dan *well* standar (kecuali *blank well*). Kemudian ditutup dengan sealer.
6. Selanjutnya dishaker beberapa menit, dan diinkubasi selama 60 menit pada 37 °C.
7. Sealer dilepaskan dan *plate* dicuci sebanyak 3 kali menggunakan 0,35 ml *wash buffer* dan *well* direndam selama 30 detik untuk setiap kali pencucian.
8. 50  $\mu\text{L}$  substrat solution A dimasukkan ke masing-masing *well* dilanjutkan penambahan 50  $\mu\text{L}$  larutan substrat B. *Plate* ditutup kemudian dishaker dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit dalam kondisi gelap.
9. 50  $\mu\text{L}$  *stop solution* ditambahkan ke masing-masing *well*, warna biru akan berubah menjadi kuning.
10. *Optical Density* dibaca menggunakan *microplate reader* set pada 450 nm.

#### 4.8.9 Pengukuran Kadar MDA

Persiapan sampel dilakukan seperti persiapan sampel pada pemeriksaan kadar *catalase*. Kadar MDA dari jaringan yang telah disiapkan diukur menggunakan *Rat Malondialdehyde ELISA Kit* merk *Bioassay Technology Laboratory* (Cat.No.E0156Ra) dengan langkah sebagai berikut:

1. Semua reagen, larutan standar, sampel dan *pre-coated ELISA plate* disiapkan.
2. Standar disiapkan secara bertingkat dengan mengambil 120  $\mu\text{L}$  *original standard* ditambah 120  $\mu\text{L}$  *standard diluent* untuk standar 5. Kemudian mengambil 120  $\mu\text{L}$  ditambah 120  $\mu\text{L}$  *standard diluent* untuk standar 4 dan seterusnya.
3. 50  $\mu\text{L}$  standar dimasukkan ke dalam *well* standar.

4. 40  $\mu\text{L}$  sampel dimasukkan ke dalam *well* sampel, kemudian ditambahkan 10  $\mu\text{L}$  antibodi anti-MDA. Selanjutkan dishaker dan diinkubasi beberapa menit.
5. 50  $\mu\text{L}$  streptavidin-HRP ditambahkan ke dalam *well* sampels dan *well* standar (kecuali *blank well*). Kemudian ditutup dengan sealer.
6. Selanjutnya dishaker beberapa menit, dan diinkubasi selama 60 menit pada 37 °C.
7. Sealer dilepaskan dan *plate* dicuci sebanyak 3 kali menggunakan 0,35 ml *wash buffer* dan *well* direndam selama 30 detik untuk setiap kali pencucian.
8. 50  $\mu\text{L}$  substrat solution A dimasukkan ke masing-masing *well* dilanjutkan penambahan 50  $\mu\text{L}$  larutan substrat B. *Plate* ditutup kemudian dishaker dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit dalam kondisi gelap.
9. 50  $\mu\text{L}$  *stop solution* ditambahkan ke masing-masing *well*, warna biru akan berubah menjadi kuning.
10. *Optical Density* dibaca menggunakan *microplate reader* set pada 450 nm.

#### 4.9 Pengolahan dan Analisis Data

Pengolahan data akan dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 23.0.

Tingkat kepercayaan yang digunakan adalah 95% dengan nilai  $p < 0,05$ . Data akan dianalisis dengan menggunakan uji statistik, yaitu:

1. Uji normalitas data dilakukan dengan uji *Sapiro Wilk*. Data dikatakan berdistribusi normal jika *pvalue* > 0,05.
2. Uji homogenitas data dilakukan dengan uji *t*-levene. Jika *pvalue* > 0,05, maka data memiliki varians yang sama (homogen).
3. Untuk menguji adanya perbedaan paparan ekstrak etanol pegagan terhadap panjang badan, catalase, dan MDA antar masing-masing kelompok (Kontrol, Rotenon, P1, P2, dan P3) dilakukan uji One Way

*ANOVA*. Jika  $p\text{-value} < 0,05$ , maka dapat diinterpretasikan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok sehingga dilanjutkan dengan analisis *Post-Hoc LSD (Least Significant Difference)*. Tujuan uji *Post-Hoc* adalah untuk mengetahui pada kelompok manakah terdapat perbedaan yang bermakna, sehingga dapat diketahui paparan ekstrak pegagan pada kelompok mana yang berpengaruh pada masing-masing variabel dependen yang diuji.

4. Uji korelasi dilakukan menggunakan uji korelasi Pearson. Jika  $p\text{-value} < 0,05$  maka dapat diinterpretasikan terdapat korelasi yang bermakna antara dua variabel yang diuji.

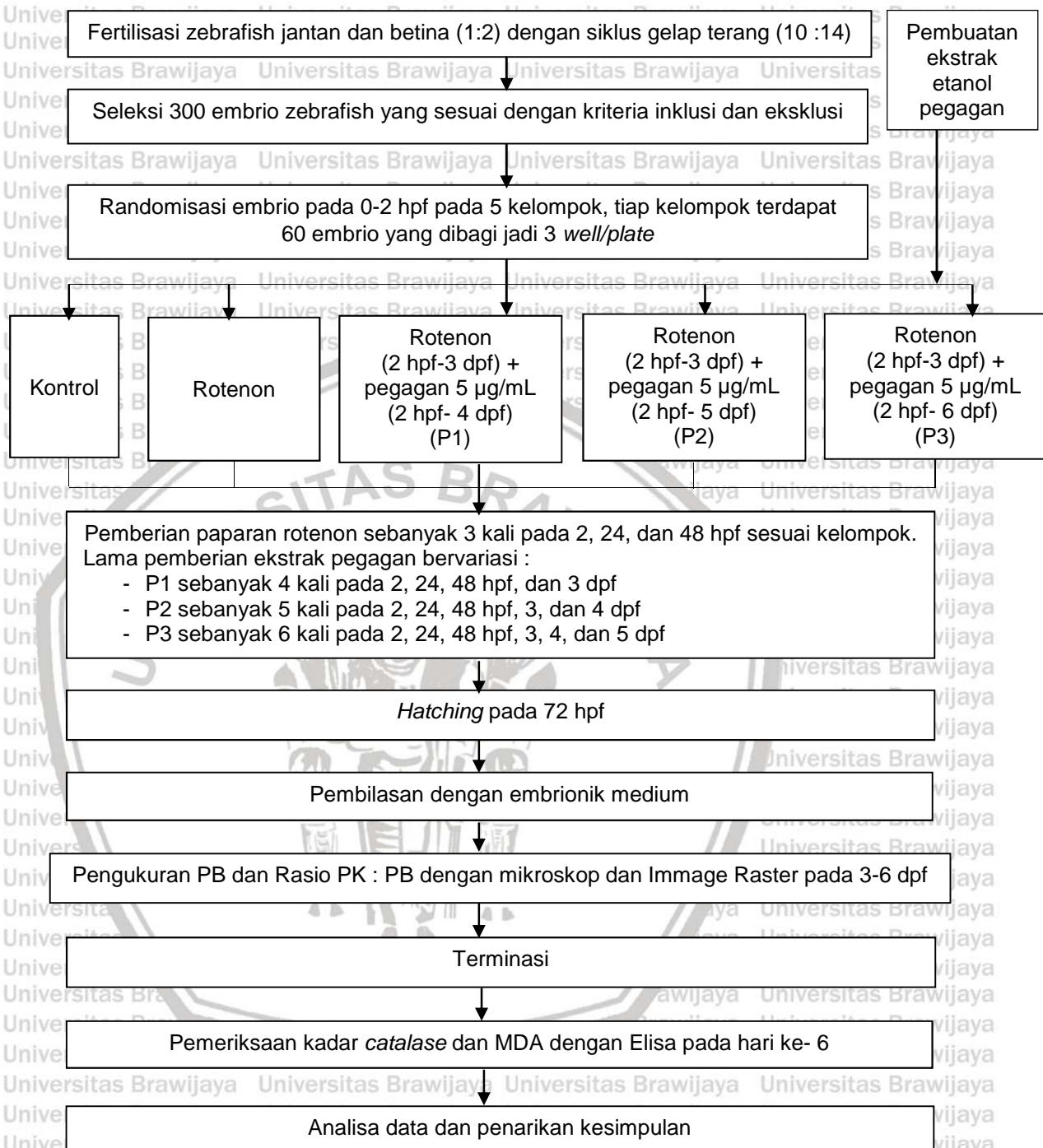
Interpretasi uji hipotesis berdasarkan kekuatan korelasi dan arah korelasi dapat dilihat pada tabel 4.3

**Tabel 4.3 Kekuatan Korelasi dan Arah Korelasi**

No	Parameter	Nilai	Interpretasi
1	Kekuatan korelasi ( $r$ )	0,00-0,199	Sangat lemah
		0,20-3,99	Lemah
		0,40-5,99	Sedang
		0,60-0,799	Kuat
		0,80-1,000	Sangat kuat
2	Arah korelasi	+ (positif)	Searah, semakin besar nilai satu variabel semakin besar pula nilai variabel lainnya.
		- (negatif)	Berlawanan arah, semakin besar nilai satu variabel, semakin kecil nilai variabel lainnya.

(Dahlan, 2011).

#### 4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur penelitian

## METODE PENELITIAN

#### **4.1 Jenis dan Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah eksperimen murni (*true experiment*) yang menggunakan *post test only control group design* dengan random alokasi. Dalam penelitian ini terdapat kelompok eksperimen dan kelompok kontrol, dimana penentuan sampel ke dalam setiap kelompok dilakukan secara acak dengan membagi langsung ke dalam masing-masing kelompok.

## 4.2 Populasi dan Sampel

#### **4.2.1 Populasi Penelitian**

Populasi penelitian ini adalah embrio sampai larva zebrafish usia 0-6 dpf yang diperoleh dari hasil fertilisasi zebrafish *wild type* antara induk jantan dan betina dengan perbandingan 1:2. Zebrafish yang dipilih memiliki ciri strip horizontal berwarna biru tua kehitaman yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang serta telah teruji dan tersertifikasi di Laboratorium Hidrologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang (Khotimah et al., 2015).

#### **4.2.2 Sampel Penelitian**

Sampel dalam penelitian ini adalah embrio sampai larva zebrafish pada usia 0-6 dpf. Pengambilan sampel dilakukan secara random alokasi, dimana penentuan sampel pada masing-masing kelompok dilakukan secara acak.

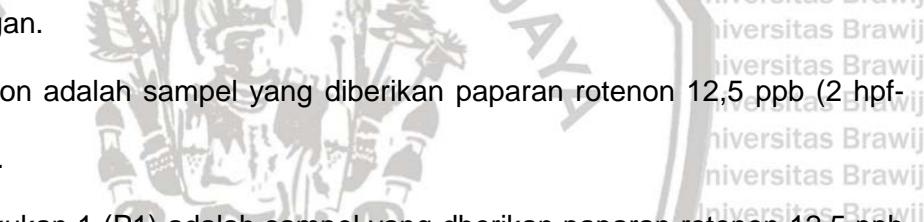
Penentuan jumlah replikasi menggunakan rumus :

(t-1) (r-1) 15

(5-1) (r-1) 15

(4) (r-1) 15

Pembagian kelompok tersebut adalah :

- 
  1. Kontrol adalah sampel yang tidak diberikan paparan rotenon dan ekstrak pegagan.
  2. Rotenon adalah sampel yang diberikan paparan rotenon 12,5 ppb (2 hpf-3 dpf).
  3. Perlakukan 1 (P1) adalah sampel yang dberikan paparan rotenon 12,5 ppb (2 hpf-3 dpf) dan konsentrasi pegagan 5 $\mu$ g/mL pada 2 hpf-4 dpf.
  4. Perlakukan 2 (P2) adalah sampel yang dberikan paparan rotenon 12,5 ppb (2 hpf-3 dpf) dan konsentrasi pegagan 5 $\mu$ g/mL pada 2 hpf-5 dpf.
  5. Perlakukan 3 (P3) adalah sampel yang dberikan paparan rotenon 12,5 ppb (2 hpf-3 dpf) dan konsentrasi pegagan 5 $\mu$ g/mL pada 2 hpf-6 dpf.

## 4.3 Kriteria Inklusi dan Ekslusi

#### 4.3.1 Kriteria Inklusi

Embrio zebrafish berusia 0-2 hpf, berwarna jernih transparan, tidak terdapat serabut putih atau jamur saat dilihat di bawah mikroskop optilab, dan embrio yang kosong (tidak terbuahi).

### 4.3.2 Kriteria Eksklusi

Embrio zebrafish yang *hatching* atau menetas sebelum 3 dpf, embrio yang cacat.

### 4.3.3 Kriteria Dropout

Embrio yang mati sebelum penelitian selesai dilaksanakan.

## 4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

### 4.4.1 Tempat Penelitian

1. Pemeliharaan zebrafish, pembuatan ekstrak pegagan dan larutan rotenon,

serta pengukuran panjang badan dilakukan di Laboratorium Farmakologi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

2. Pemeriksaan kadar Catalase dan kadar *Malondialdehyde* (MDA) dilakukan

di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Malang.

### 4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari – Maret 2018.

## 4.5 Variabel Penelitian

1. Variabel *Independent* : ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) *pre hatching* sampai dengan *post hatching*.

2. Variabel *Dependent* : panjang badan, kadar catalase dan kadar MDA.

3. Variabel kendali : konsentrasi rotenon, embrionik medium, kebersihan well plate dan inkubator, dan suhu

$28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

## 4.6 Definisi Operasional

**Tabel 4.1 Definisi Operasional**

Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Data
Ekstrak etanol pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) pre sampai dengan post hatching	Waktu paparan ekstrak pegagan dengan konsentrasi 5 µg/mL yang diberikan pada masing-masing kelompok perlakuan dimulai dari masa pre sampai dengan post hatching	Pemberian	Rasio
Stunting	Panjang atau tinggi badan menurut umur dimana nilai z-score <-2 SD dan rasio PK: PB = 1:5	< -2 Standar Deviasi	Rasio
Panjang badan larva zebrafish	Pengukuran panjang badan dari ujung hidung sampai pangkal sirip (snout-fin) pada usia 3-6dpf, yang diamati dengan mikroskop stereometri (Olympus SZ61), kemudian gambar diambil menggunakan Optilab versi 2.0, dan panjang badan diukur menggunakan software Immage Raster versi 3 yang telah dikalibrasi.	Panjang badan (mm)	Rasio
Rasio panjang kepala dan panjang badan	Pengukuran panjang kepala dari snout ke operkulum dibandingkan dengan panjang badan larva keseluruhan (snout-fin).	PK : PB	Rasio
Kadar catalase	Kadar catalase larva zebrafish usia 6 hari setelah dilakukan terminasi yang diukur menggunakan Rat Catalase Elisa Kit- Bioassay Technology Laboratory di Laboratorium Biomedik FKUB Malang.	Kadar catalase zebrafish ng/ml	Rasio
Kadar MDA	Kadar MDA larva zebrafish usia 6 hari setelah dilakukan terminasi yang diukur menggunakan Rat Malondialdehyde Elisa Kit- Bioassay Technology Laboratory di Laboratorium Biomedik FKUB Malang.	Kadar MDA zebrafish nmol/ml	Rasio
Konsentrasi rotenon	Rotenon Sigma (R8875) dengan kemurnian 95% dilarutkan dengan dimethyl sulfoxide 1%	Konsentrasi 12,5 ppb	Rasio
Medium embrionik	Larutan medium dari bahan CaCl 0,25 gr; KCl 0,15 gr; NaCl 5 gr; dan MgSO4 0,815 gr dan 500 ml aquadest dengan kepekatan 10 kali dan disimpan pada suhu 2-8 °C	mL	Rasio
Suhu	Suhu inkubator yang dipertahankan pada 28 °C ± 1 °C	°C	Interval

## 4.7 Alat dan Bahan

### 4.7.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Zebrafish

1. Alat : aquarium dengan kapasitas 60 L, filtrasi dan aerasi air, pH meter, alat pengukur suhu, tempat penakaran telur ikan, *well plate* berisi 6 sumuran, pipet plastik, mikropipet dan tip (*blue, yellow, white*), inkubator suhu  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , mikroskop, laptop, *software optilab* dan *image raster*.
2. Bahan : air aqua, medium embrionik, dan pakan ikan (tetramin).

### 4.7.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Pegagan

1. Alat : timbangan, oven, blender, gelas erlenmeyer, evaporator, corong gelas, labu penampung etanol, *rotary evaporator*, *water pump*, selang *water pump*, *water bath*, *vaccum pump*, botol tempat hasil ekstraksi, dan lemari pendingin.
2. Bahan : tanaman pegagan, pelarut etanol, kertas saring, dan *alumunium foil*.

### 4.7.3 Alat dan Bahan Pembuatan Medium Embrionik

1. Alat : tabung reaksi 500 mL, timbangan digital (Metter Toledo), dan alat pengaduk.
2. Bahan : CaCl 0,25 gr, KCl 0,15 gr, NaCl 5 gr, MgSO<sub>4</sub> 0,815 gr, dan aquadest 500 mL.

### 4.7.4 Alat dan Bahan Pengukuran Kadar Catalase

1. Alat : *Rat Catalase ELISA Kit- Bioassay Technology Laboratory, pre-coated ELISA plate*, *plate sealer*, mikropipet dan tip, *ependorft* 1,5 mL, *vortex centrifuge*, inkubator dan *microplate reader*.
2. Bahan : *standard solution*, *standartd diluent*, *streptavidin HRP*, *substrat solution A*, *substrat solution B*, *stop solution*, *wash buffer*, *Biotin Conjugate Anti -Rat CAT Antibody*.

#### 4.7.5 Alat dan Bahan Pengukuran Kadar MDA

1. Alat : *Rat Malondialdehyde Elisa Kit- Bioassay Technology Laboratory, precoated ELISA plate, plate sealer, mikropipet dan tip, eppendorf 1,5 mL, vortex, centrifuge, inkubator dan microplate reader.*

2. Bahan : *standard solution, standard diluent, streptavidin HRP, substrat solution A, substrat solution B, stop solution, wash buffer, Biotin Conjugate Anti -Rat MDA Antibody.*

#### 4.8 Prosedur Penelitian

##### 4.8.1 Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio

Zebrafish dipelihara di lingkungan air tawar dalam aquarium dengan kapasitas 60 liter. Air yang digunakan adalah air aqua pada suhu 26-28,5 °C, dan pH 6,8-7,5 (Avdesh *et al.*, 2012). Jenis pakan yang diberikan adalah tetramin dengan frekuensi 3 kali sehari (Khotimah *et al.*, 2015). Pembibitan zebrafish disesuaikan dengan siklus gelap : terang (10 jam : 14 jam) (Advesh *et al.*, 2012) pada lingkungan yang tenang dan terhindar dari stress lingkungan.

Siklus gelap-terang dapat diatur sesuai dengan keinginan peneliti. Pembibitan zebrafish diawali dengan siklus terang selama 14 jam. Setelah zebrafish diberi makan, tempat penangkaran telur (trap) dipasang, dan siklus gelap selama 10 jam dapat dimulai. Trap diangkat 30 menit setelah lampu dinyalakan untuk memberikan kesempatan fertilisasi dan peletakan telur pada tempat trap yang dipasang (Advesh *et al.*, 2012). Setelah trap diangkat, embrio dipindahkan ke cawan petri dan dibersihkan menggunakan air aqua hingga tidak ada kotoran dan jamur. Setelah embrio diperiksa menggunakan mikroskop stereo (Olympus SZ61), dipindahkan ke well plate 6 serta diberikan perlakuan yang sesuai untuk masing-masing kelompok. Kemudian well plate dimasukkan ke

dalam inkubator dengan suhu 28 °C. Prosedur ini dilakukan dengan cepat sebelum embrio berusia 2 hpf.

#### 4.8.2 Pembuatan Medium Embriонik

Pembuatan 500 ml larutan stok medium embrionik dengan kepekatan 10 kali menggunakan bahan CaCl 0,25 gr; KCl 0,15 gr; NaCl 5 gr; dan MgSO<sub>4</sub> 0,815 gr dan 500 mL aquadest yang dimasukkan dalam tabung reaksi (Modified from

Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2011). Larutan stok disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 2-8 °C. Saat akan digunakan, medium embrionik ditambahkan air aqua dengan perbandingan medium embrionik dan air aqua adalah 1:9.

#### 4.8.3 Pembuatan Larutan Rotenon

Rotenon sigma (R8875) dengan kemurnian 95% dalam bentuk serbuk dilarutkan dengan DMSO (dimethyl sulfoxide 1%) sehingga didapatkan konsentrasi stok sebesar  $2 \times 10^3 \mu\text{g/L}$  (Khotimah *et al.*, 2015). Untuk membuat rotenon 12,5 ppb sebanyak 5 mL (1 sumuran) dari konsentrasi stok  $2 \times 10^3 \mu\text{g/L}$  menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 2 \times 10^3 \mu\text{g/L} &= 5 \text{ mL} \times 12,5 \text{ ppb} \\ V_1 &= \frac{5 \text{ mL} \times 12,5 \text{ ppb}}{2 \times 10^3 \mu\text{g/L}} \\ &= 62,5 \text{ mL} \\ &= \frac{62,5 \text{ mL}}{2 \times 10^3} \\ &= 31,25 \times 10^{-3} \text{ mL} \\ &= 31,25 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Keterangan :

$V_1$  = Volume awal

$M_1$  = Konsentrasi stok

$V_2$  = Volume yang diinginkan

$M_2$  = Konsentrasi akhir yang dinginkan

1 ppb = 1  $\mu\text{g/L}$

Jadi, sebanyak 31,25  $\mu\text{L}$  stok rotenon diambil menggunakan mikropipet dan ditambahkan medium embrionik sampai 5 mL.

#### 4.8.4 Pembuatan Ekstrak Pegagan

Pegagan yang digunakan diperoleh dari UPT Material Medica Batu Jawa Timur yang telah bersertifikat. Khotimah *et al.* (2015) menyatakan terdapat zat aktif *asiatocosida* sebesar 0,29% pada *Centella asiatica* yang diukur menggunakan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) (*Thermo Scientific, Accela*). Bagian dari tanaman yang digunakan untuk pembuatan ekstrak adalah bagian atas tanpa stolon dan akar (Khotimah *et al.*, 2015c).

Prosedur pembuatan ekstrak pegagan adalah sebagai berikut :

1. Pegagan dicuci bersih kemudian dikeringkan dengan cara dianginkan dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40 °C.
2. Pegagan yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender.
3. 100 gram serbuk pegagan dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer dan direndam dalam 900 mL larutan ethanol 98%. Kemudian diaduk selama ± 30 menit dan didiamkan sampai mengendap selama 24 jam.
4. Lapisan atas rendaman serbuk pegagan (campuran etanol dan zat aktif) diambil dan disaring menggunakan corong buncher.
5. Proses evaporasi dilakukan menggunakan *rotary evaporator* dengan cara memasukkan filtrat ke dalam labu evaporasi 1L dan dipasang pada evaporator. *Water bath* diisi sampai penuh, dan dipanaskan hingga suhu 70 °C. Proses evaporasi berlangsung ± 1,5-2 jam.
6. Hasil ekstraksi ditimbang dan dimasukkan dalam botol plastik dan disimpan pada lemari pendingin (*freezer*) (Selvi *et al.*, 2012).

#### 4.8.5 Pembuatan Larutan Pegagan

Konsentrasi pegagan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 µg/mL.

Pembuatan konsentrasi stok pegagan didapatkan dengan perhitungan :

$$\underline{10 \text{ mg pegagan}} = 1 \text{ mg/mL} = 1000 \mu\text{g/mL}$$

$$10 \text{ ml aquades}$$

Untuk membuat larutan pegagan dengan konsentrasi 5  $\mu\text{g/mL}$  sebanyak 5 mL (1 sumuran) dari konsentrasi stok 1000  $\mu\text{g/mL}$  menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 1000 \mu\text{g/mL} &= 5 \text{ mL} \times 5 \mu\text{g/mL} \\ V_1 &= \underline{\underline{5 \text{ mL} \times 5 \mu\text{g/mL}}} \\ &\quad 1000 \mu\text{g/mL} \\ &= 25 \times 10^{-3} \text{ mL} \\ &= 25 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Keterangan :

$V_1$  = Volume awal

$M_1$  = Konsentrasi stok

$V_2$  = Volume yang diinginkan

$M_2$  = Konsentrasi akhir yang dinginkan

Jadi, sebanyak 25  $\mu\text{L}$  stok pegagan diambil menggunakan mikropipet dan ditambahkan medium embrionik sampai 5 mL.

#### 4.8.6 Perlakuan pada Setiap Kelompok

##### 1. Kontrol

Untuk kontrol diberikan 5 mL medium embrionik pada setiap sumuran.

##### 2. Rotenon

Larutan rotenon 12,5 ppb diberikan pada usia 2 hpf-3 dpf hpf dengan penggantian medium setiap 24 jam.

##### 3. Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2), dan Perlakuan 3 (P3)

Cara membuat campuran larutan rotenon 12,5 ppb + pegagan 5  $\mu\text{g/mL}$  untuk 1 sumuran (5 mL) diperoleh dengan mencampurkan 31,25  $\mu\text{L}$  stok rotenon dan 25  $\mu\text{L}$  stok pegagan kemudian ditambahkan medium embrionik sampai 5 mL. Lama pemberian rotenon dan ekstrak etanol pegagan dapat dilihat pada tabel 4.2

**Tabel 4.2 Lama Pemberian Rotenon dan Pegagan**

<b>Kelompok</b>	<b>Usia Larva</b>			
	<b>2 hpf – 3 dpf</b>	<b>4 dpf</b>	<b>5 dpf</b>	<b>6 dpf</b>
Kontrol				
Rotenon				
P1				
P2				
P3				
<b>Keterangan :</b>				
Universitas Brawijaya	: Medium Embrionik			
Universitas Brawijaya	: Rotenon 12,5 ppb			
Universitas Brawijaya	: Rotenon 12,5 ppb + pegagan 5 µg/mL			
Universitas Brawijaya	: Pegagan 5 µg/mL			

Pemberian paparan rotenon pada zebrafish dilakukan sebelum *hatching* (2hpf-3 dpf) yang diasumsikan masih di dalam kandungan (inta uterin).

Pemberian paparan pegagan juga dimulai sejak intra uterin, dan dilanjutkan sampai ekstra uterin, dimana terdapat perbedaan lama paparan antara kelompok P1 (sampai 4 dpf), P2 (sampai 5 dpf), dan P3 (sampai 6 dpf).

Setelah selesai pemberian pegagan pada masing-masing kelompok, larva dibilas dengan medium embrionik sebanyak 3 kali dan selanjutnya diberikan medium embrionik saja. Semua medium diganti setiap hari untuk menghindari kontaminasi.

#### 4.8.7 Pengukuran Panjang Badan dan Rasio Panjang Kepala

Pengukuran panjang badan dan rasio panjang kepala : panjang badan dilakukan pada usia 3-6 dpf. Panjang badan diukur dari ujung hidung (*tip of the snout*) sampai pangkal sirip ekor (*caudal fin*) yang dikenal dengan *snout-fin* (Spence et al., 2008). Satuan yang digunakan adalah milimeter. Rasio panjang kepala dan pajang badan dilakukan dengan membandingkan ukuran panjang kepala dari *snout* ke *operculum* dengan panjang badan larva keseluruhan (*snout-fin*). Larva zebrafish diletakkan pada *object glass* dalam keadaan lurus, diam dan tidak bergerak, kemudian diamati menggunakan mikroskop stereometri.

(Olympus SZ61). Pengambilan gambar dilakukan menggunakan Optilab versi 2.0, dan panjang badan diukur menggunakan software Immage Raster versi 3 yang telah dikalibrasi sebelumnya.

#### 4.8.8 Pengukuran Kadar Catalase

Persiapan sampel dilakukan dengan cara homogenisasi jaringan dengan cara :

1. Larva zebrafish dieutanasia dengan cara dimasukkan pada air es dengan

komposisi 5 bagian es dan 1 bagian air selama 40 menit. Suhu air es dipertahankan pada suhu 0 °C yang dipantau menggunakan termometer

(Strykowski & Schech, 2015).

2. Larva zebrafish ( $n = 30$  larva/kelompok) dihomogenisasi dengan 500  $\mu\text{L}$

Ripa Buffer menggunakan homogenizer kaca. Homogenate disentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 2,500 rpm selama 20 menit. Supernatan diambil untuk dilakukan prosedur pemeriksaan.

Kadar catalase dari jaringan yang telah disiapkan diukur menggunakan

Rat Catalase ELISA Kit merk Bioassay Technology Laboratory (Cat.No

E0869Ra) dengan langkah sebagai berikut:

1. Semua reagen, larutan standar, sampel dan pre-coated ELISA plate disiapkan.

2. Standar disiapkan secara bertingkat dengan mengambil 120  $\mu\text{L}$  original standar ditambah 120  $\mu\text{L}$  standard diluent untuk standar 5. Kemudian mengambil 120  $\mu\text{L}$  ditambah 120  $\mu\text{L}$  standard diluent untuk standar 4 dan seterusnya.

3. 50  $\mu\text{L}$  standar dimasukkan ke dalam well standar.

4. 40  $\mu\text{L}$  sampel dimasukkan ke dalam *well* sampel, kemudian ditambahkan 10  $\mu\text{L}$  antibodi anti-CAT. Selanjutkan dishaker dan diinkubasi beberapa menit.
5. 50  $\mu\text{L}$  streptavidin-HRP ditambahkan ke dalam *well* sampels dan *well* standar (kecuali *blank well*). Kemudian ditutup dengan sealer.
6. Selanjutnya dishaker beberapa menit, dan diinkubasi selama 60 menit pada 37 °C.
7. Sealer dilepaskan dan *plate* dicuci sebanyak 3 kali menggunakan 0,35 ml *wash buffer* dan *well* direndam selama 30 detik untuk setiap kali pencucian.
8. 50  $\mu\text{L}$  substrat solution A dimasukkan ke masing-masing *well* dilanjutkan penambahan 50  $\mu\text{L}$  larutan substrat B. *Plate* ditutup kemudian dishaker dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit dalam kondisi gelap.
9. 50  $\mu\text{L}$  *stop solution* ditambahkan ke masing-masing *well*, warna biru akan berubah menjadi kuning.
10. *Optical Density* dibaca menggunakan *microplate reader* set pada 450 nm.

#### 4.8.9 Pengukuran Kadar MDA

Persiapan sampel dilakukan seperti persiapan sampel pada pemeriksaan kadar *catalase*. Kadar MDA dari jaringan yang telah disiapkan diukur menggunakan *Rat Malondialdehyde ELISA Kit* merk *Bioassay Technology Laboratory* (Cat.No.E0156Ra) dengan langkah sebagai berikut:

1. Semua reagen, larutan standar, sampel dan *pre-coated ELISA plate* disiapkan.
2. Standar disiapkan secara bertingkat dengan mengambil 120  $\mu\text{L}$  *original standard* ditambah 120  $\mu\text{L}$  *standard diluent* untuk standar 5. Kemudian mengambil 120  $\mu\text{L}$  ditambah 120  $\mu\text{L}$  *standard diluent* untuk standar 4 dan seterusnya.
3. 50  $\mu\text{L}$  standar dimasukkan ke dalam *well* standar.

4. 40  $\mu\text{L}$  sampel dimasukkan ke dalam *well* sampel, kemudian ditambahkan 10  $\mu\text{L}$  antibodi anti-MDA. Selanjutkan dishaker dan diinkubasi beberapa menit.
5. 50  $\mu\text{L}$  streptavidin-HRP ditambahkan ke dalam *well* sampels dan *well* standar (kecuali *blank well*). Kemudian ditutup dengan sealer.
6. Selanjutnya dishaker beberapa menit, dan diinkubasi selama 60 menit pada 37 °C.
7. Sealer dilepaskan dan *plate* dicuci sebanyak 3 kali menggunakan 0,35 ml *wash buffer* dan *well* direndam selama 30 detik untuk setiap kali pencucian.
8. 50  $\mu\text{L}$  substrat solution A dimasukkan ke masing-masing *well* dilanjutkan penambahan 50  $\mu\text{L}$  larutan substrat B. *Plate* ditutup kemudian dishaker dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit dalam kondisi gelap.
9. 50  $\mu\text{L}$  *stop solution* ditambahkan ke masing-masing *well*, warna biru akan berubah menjadi kuning.
10. *Optical Density* dibaca menggunakan *microplate reader* set pada 450 nm.

#### 4.9 Pengolahan dan Analisis Data

Pengolahan data akan dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 23.0.

Tingkat kepercayaan yang digunakan adalah 95% dengan nilai  $p < 0,05$ . Data akan dianalisis dengan menggunakan uji statistik, yaitu:

1. Uji normalitas data dilakukan dengan uji *Sapiro Wilk*. Data dikatakan berdistribusi normal jika *pvalue* > 0,05.
2. Uji homogenitas data dilakukan dengan uji *t*-levene. Jika *pvalue* > 0,05, maka data memiliki varians yang sama (homogen).
3. Untuk menguji adanya perbedaan paparan ekstrak etanol pegagan terhadap panjang badan, catalase, dan MDA antar masing-masing kelompok (Kontrol, Rotenon, P1, P2, dan P3) dilakukan uji One Way

*ANOVA*. Jika  $p\text{-value} < 0,05$ , maka dapat diinterpretasikan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok sehingga dilanjutkan dengan analisis *Post-Hoc LSD (Least Significant Difference)*. Tujuan uji *Post-Hoc* adalah untuk mengetahui pada kelompok manakah terdapat perbedaan yang bermakna, sehingga dapat diketahui paparan ekstrak pegagan pada kelompok mana yang berpengaruh pada masing-masing variabel dependen yang diuji.

4. Uji korelasi dilakukan menggunakan uji korelasi Pearson. Jika  $p\text{-value} < 0,05$  maka dapat diinterpretasikan terdapat korelasi yang bermakna antara dua variabel yang diuji.

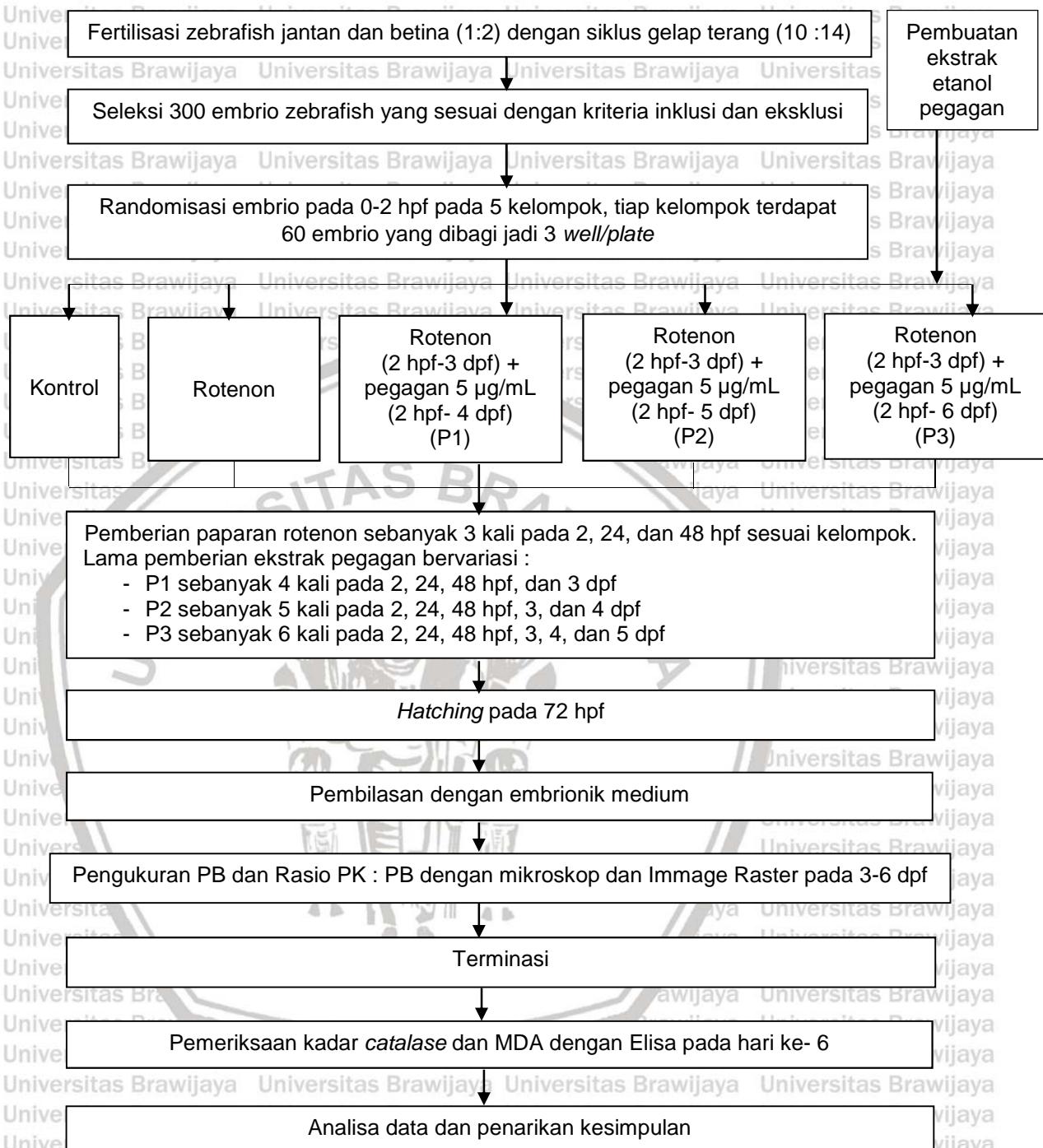
Interpretasi uji hipotesis berdasarkan kekuatan korelasi dan arah korelasi dapat dilihat pada tabel 4.3

**Tabel 4.3 Kekuatan Korelasi dan Arah Korelasi**

No	Parameter	Nilai	Interpretasi
1	Kekuatan korelasi ( $r$ )	0,00-0,199	Sangat lemah
		0,20-3,99	Lemah
		0,40-5,99	Sedang
		0,60-0,799	Kuat
		0,80-1,000	Sangat kuat
2	Arah korelasi	+ (positif)	Searah, semakin besar nilai satu variabel semakin besar pula nilai variabel lainnya.
		- (negatif)	Berlawanan arah, semakin besar nilai satu variabel, semakin kecil nilai variabel lainnya.

(Dahlan, 2011).

#### 4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur penelitian

BAB 5

## HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

**5.1as Pengaruh Pegagan terhadap Panjang Badan pada Larva Zebrafish Stunting**  
Panjang badan larva zebrafish diukur menggunakan software *image raster* versi 3. Rerata panjang badan antara kelompok kontrol, kelompok rotenon dan kelompok perlakuan yang diberikan rotenon 12,5 ppb (2 hpf - 3 dpf) ditambah pegagan 5 µg/mL dengan lama paparan sampai 4, 5 dan 6 dpf secara berurutan, dapat dilihat pada Tabel 5.1

**Tabel 5.1 Rerata Panjang Badan dan Rasio Panjang Kepala : Panjang Badan pada Larva Zebrafish Usia 3 dan 6 Dpf antara Kelompok Kontrol, Rotenon, dan Rotenon Ditambah Pegagan dengan Lama Paparan yang Berbeda.**

Keterangan:

## Keterangan :

Kontrol Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

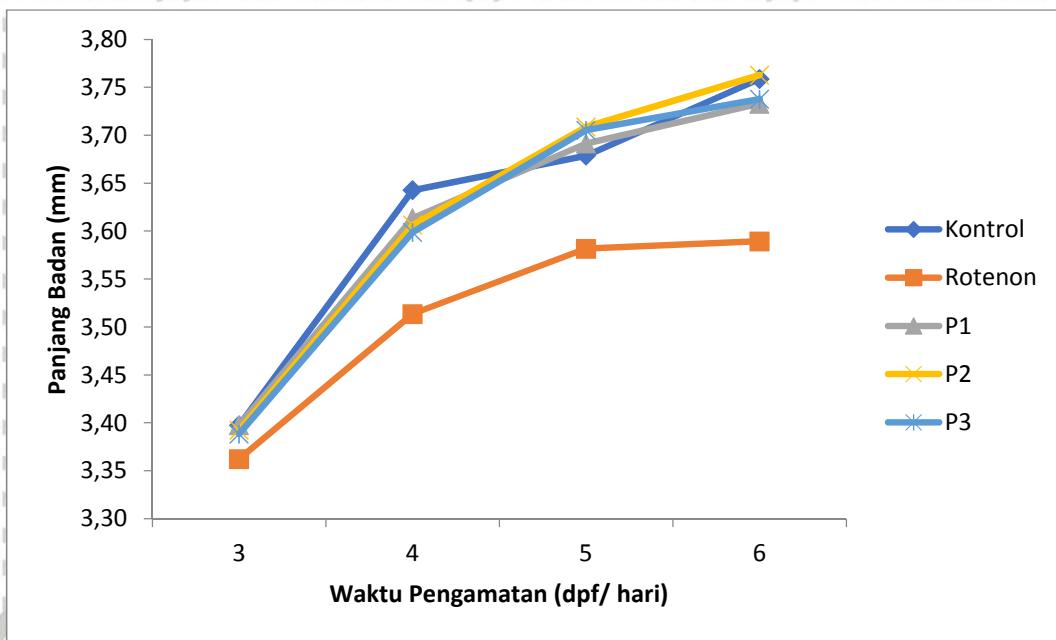
P1 tas B: Rotenon + Pedagan (2 bpf = 3 dpf) dilanjutkan Pedagan sampai 4 hari awal jawa

P10as B: Rotenon + Pegagan (2 hpf - 3 dpi) dilanjutkan Pegagan sampai 4 hari

P2 as B: Rotenon + Pegagan (2 hpf - 3 dpi) dilanjutkan Pegagan sampai 5 hari

PS Kas B: Roteron + Pegagan (2 tpi = 3 dpi) dilanjutkan Pegagan sampai 6 hari

Grafik pertumbuhan panjang badan antar kelompok dapat dilihat pada gambar 5.1 berikut ini :



**Gambar 5.1 Rerata panjang badan larva zebrafish usia 3-6 dpf.**

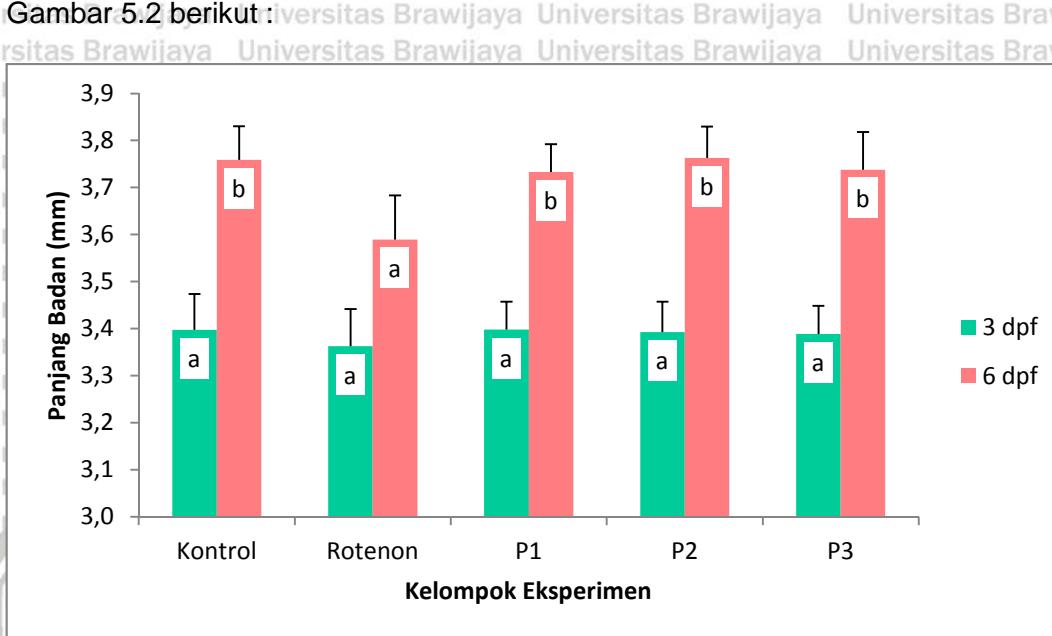
Keterangan : Kelompok rotenon menunjukkan rerata panjang badan yang lebih pendek dibandingkan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Garis pertumbuhan panjang badan pada kelompok P1, P2, dan P3 mendekati garis pertumbuhan kelompok kontrol.

Berdasarkan Tabel 5.1 dapat diketahui bahwa pada usia 3 dpf, tidak ada perbedaan rata-rata panjang larva zebrafish antar semua kelompok. Pada usia ini, grafik pertumbuhan menunjukkan titik-titik yang berdekatan pada kelima kelompok. Setelah usia 3 dpf, kelompok rotenon menunjukkan rata-rata panjang badan yang paling pendek dibandingkan kelompok kontrol dan perlakuan. Sedangkan kelompok P1, P2, dan P3 menunjukkan garis pertumbuhan yang mendekati garis pertumbuhan kelompok kontrol sampai hari ke-6.

Selanjutnya data panjang badan dianalisis statistik dengan ANOVA menggunakan SPSS versi 23.0. Sebelumnya dilakukan pengujian asumsi normalitas menggunakan uji Sapiro-Wilk dan homogenitas ragam menggunakan uji Levene. Data pada variabel panjang badan 3 dpf dan 6 dpf

berdistribusi normal dan homogen, dimana pada masing-masing uji didapatkan p-value >0,05.

Perbandingan panjang badan pada usia 3 dan 6 dpf dapat dilihat pada Gambar 5.2 berikut :



**Gambar 5.2 Perbandingan rerata panjang badan usia 3 dan 6 dpf.**

Keterangan : Rerata panjang badan larva zebrafish ( $n=30$ ) usia 3 dpf tidak berbeda signifikan antar semua kelompok. Kelompok P1, P2, dan P3 mampu menghasilkan panjang badan 6 dpf lebih tinggi dari pada kelompok rotenon dan tidak signifikan dengan kontrol. Huruf berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ).

Berdasarkan Gambar 5.2, hasil analisis perbandingan panjang badan usia 3 dpf didapatkan p-value sebesar 0,247 ( $p>0,05$ ). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan panjang badan 3 dpf antar semua kelompok.

Berdasarkan Tabel 5.1 dapat dilihat, pada usia 6 dpf yang analog dengan anak usia 2 tahun, kelompok rotenon memiliki rata-rata panjang badan lebih pendek dibandingkan kontrol dengan selisih 0,17 mm. Selisih panjang badan lebih besar dari 2 standar deviasi ( $2 SD=0,14$  mm) sehingga memenuhi kriteria *stunting*. Selain panjang badan, yang menjadi indikator *stunting* adalah proporsi panjang kepala dan panjang badan. Pada Tabel 5.1 dapat dilihat bahwa terdapat

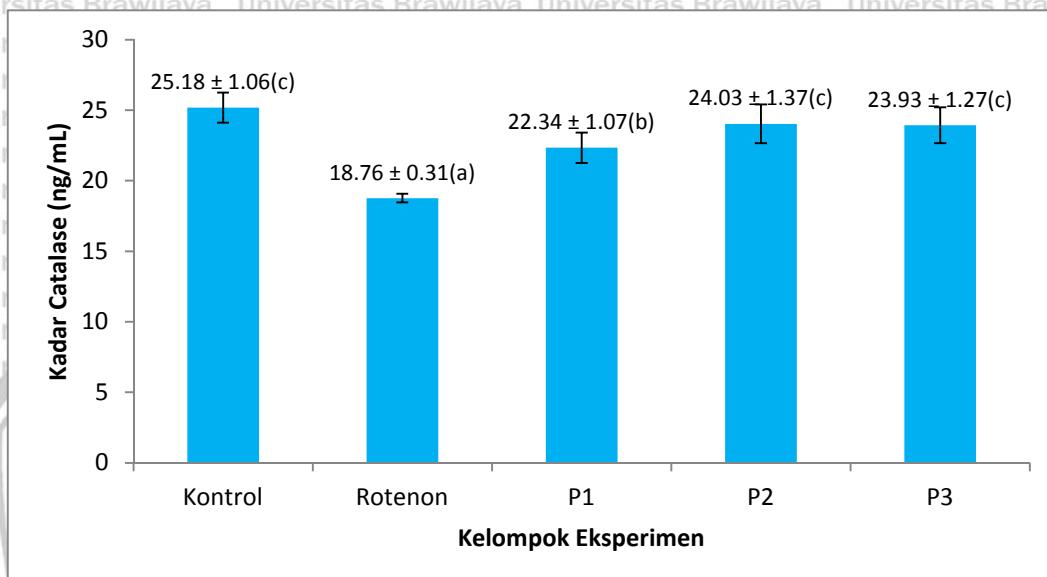
proporsi pertumbuhan yang sama antara kelompok rotenon dengan kelompok kontrol pada usia 3 dan 6 dpf dengan rasio 1 : 5. Hal ini juga sesuai dengan kriteria *stunting*. Hasil analisis panjang badan 6 dpf menggunakan ANOVA, didapatkan *p-value* sebesar 0,000 ( $p<0,05$ ). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan panjang badan pada usia 6 dpf antara semua kelompok. Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 % pada gambar 5.2, ditunjukkan bahwa kelompok rotenon memiliki rata-rata panjang badan 6 dpf paling rendah yakni sebesar  $3,59 \pm 0,09$  jika dibandingkan dengan kontrol, dimana secara statistik ditunjukkan perbedaan signifikan.

Rata-rata panjang badan 6 dpf pada semua kelompok perlakuan lebih tinggi dari pada kelompok rotenon. Perbandingan antara kelompok rotenon dengan perlakuan, pada semua kelompok perlakuan didapatkan *p-value*  $<0,05$ . Hal ini membuktikan bahwa terdapat perbedaan signifikan panjang badan 6 dpf antara kelompok rotenon dengan semua kelompok perlakuan.

Perbandingan panjang badan antara kelompok kontrol dengan perlakuan pada semua kelompok perlakuan didapatkan *p-value*  $>0,05$ . Hal ini membuktikan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan panjang badan 6 dpf antara kontrol dengan semua kelompok perlakuan. Kelompok P1, P2, dan P3 menghasilkan panjang badan yang relatif sama dengan kontrol dengan koreksi panjang badan sebesar 99,6%. Jumlah larva yang memiliki panjang badan normal adalah 42,2% (33,3% kelompok P1, 63,3% kelompok P2, dan 30% kelompok P3). Walaupun tidak terdapat perbedaan antara P1, P2, dan P3, namun kelompok P2 menunjukkan rata-rata panjang badan paling tinggi yang sama dengan rata-rata kontrol. Persentase tertinggi larva zebrafish yang memiliki panjang badan normal juga terdapat pada kelompok P2 sebesar 63,3%. Sehingga disimpulkan lama pemberian pegagan yang paling baik adalah pada kelompok P2 (5 hari).

## 5.2 Pengaruh Pegagan terhadap Kadar Catalase pada Larva Zebrafish Stunting

Hasil pengujian asumsi normalitas dan homogenitas ragam pada variabel kadar catalase didapatkan p-value >0,05 sehingga dapat disimpulkan data kadar catalase berdistribusi normal dan homogen. Perbandingan kadar catalase pada usia 6 dpf dapat dilihat pada Gambar 5.3 berikut :



Gambar 5.3 Perbandingan rerata kadar Catalase.

Keterangan : Terdapat perbedaan yang signifikan kadar Catalase antar semua kelompok ( $n=5$ ) dengan p-value 0,000. Ekstrak *Centella asiatica* mampu meningkatkan kadar Catalase pada larva zebrafish. Huruf berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ).

Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0,000 ( $p<0,05$ ). Sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan kadar catalase antar kelompok. Berdasarkan hasil uji LSD 5 % pada Gambar 5.3 menunjukkan bahwa pada kelompok rotenon terjadi penurunan kadar catalase yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol.

Pada perbandingan antar kelompok perlakuan, menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar catalase akibat pemberian ekstrak pegagan 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  selama 4, 5, dan 6 hari yang signifikan berbeda dengan kelompok rotenon. Perbandingan antara P1 dengan P2 dan P3 didapatkan p-value <0,05 yang

artiya pemberian ekstrak pegagan selama 5 dan 6 hari menghasilkan kadar *catalase* yang lebih tinggi dibandingkan pemberian selama 4 hari. Sedangkan perbandingan P2 dan P3 menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan yang mengindikasikan pemberian ekstrak pegagan selama 5 dan 6 hari menghasilkan kadar *catalase* secara signifikan tidak berbeda.

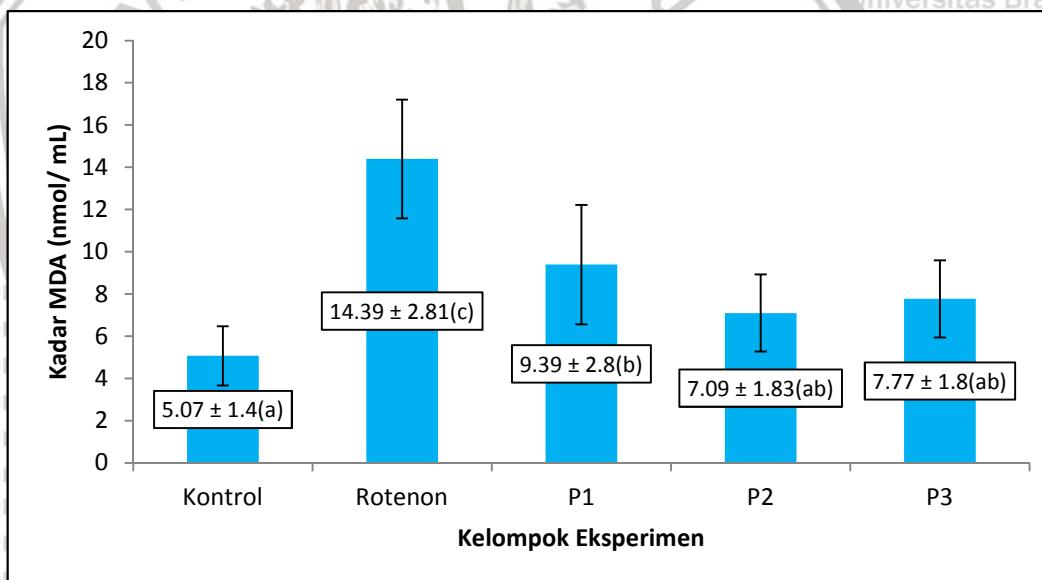
### 5.3 Pengaruh Pegagan terhadap Kadar *Malondialdehyde* pada Larva Zebrafish Stunting

Hasil pengujian asumsi normalitas dan homogenitas ragam pada variabel

kadar MDA didapatkan p-value >0,05 sehingga dapat disimpulkan data kadar

MDA berdistribusi normal dan homogen. Perbandingan kadar MDA pada usia 6

dpf dapat dilihat pada Gambar 5.4 berikut :



**Gambar 5.4 Perbandingan rerata kadar MDA.**

Keterangan : Terdapat perbedaan yang signifikan kadar MDA antara semua kelompok (n=5) dengan p-value 0.000. Ekstrak *Centella asiatica* mampu menurunkan kadar MDA pada larva zebrafish. Huruf berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ).

Hasil analisis perbandingan kadar MDA dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0,000 ( $p<0,05$ ). Sehingga dapat disimpulkan terdapat perbedaan yang signifikan kadar MDA antar semua kelompok.

Berdasarkan hasil uji LSD 5 % pada Gambar 5.4 menunjukkan bahwa rotenon mampu meningkatkan kadar MDA secara signifikan jika dibandingkan kelompok kontrol. Pada semua kelompok perlakuan terjadi penurunan MDA, dimana yang terendah terdapat pada kelompok P2. Hasil uji LSD pada perbandingan semua kelompok perlakuan dengan rotenon didapatkan  $p<0,05$  yang menunjukkan bahwa pemberian ekstrak pegagan selama 4, 5, dan 6 hari dapat menurunkan kadar MDA secara signifikan dibandingkan kelompok rotenon. Perbandingan antara sesama kelompok perlakuan diperoleh  $p>0,05$  yang menunjukkan pemberian ekstrak pegagan dengan berbagai lama paparan menghasilkan kadar MDA yang secara signifikan tidak berbeda.

#### **5.4 Hubungan Pegagan dengan Panjang Badan, Catalase, dan Malondialdehyde pada Larva Zebrafish Stunting.**

Untuk mengetahui hubungan antara dua variabel dilakukan pengujian dengan menggunakan uji Korelasi Pearson. Berdasarkan hasil analisis, didapatkan hasil uji korelasi sebagai berikut:

**Tabel 5.2 Hasil Uji Hubungan Pegagan dengan Panjang Badan, Catalase, dan Malondialdehyde**

Hubungan	p-value	Koefisien Korelasi	Keterangan
Pegagan dengan Panjang Badan	0.000	0.636	Kuat
Pegagan dengan Kadar Catalase	0.000	0.895	Sangat kuat
Pegagan dengan Kadar MDA	0.000	-0.779	Kuat

Hasil pengujian korelasi antara lama pemberian pegagan dengan panjang badan didapatkan koefisien korelasi bernilai 0.636 menunjukkan tingkat keeratan hubungan yang kuat, dimana peningkatan lama pemberian pegagan akan diikuti oleh peningkatan panjang badan. Pada pengujian korelasi antara lama pemberian pegagan dengan kadar catalase, didapatkan koefisien korelasi

sebesar 0.895 mengindikasikan terdapat tingkat keeratan hubungan yang sangat kuat, dimana pemberian pegagan yang semakin lama akan meningkatkan kadar catalase. Pada pengujian korelasi antara lama pemberian pegagan dengan kadar BMDA didapatkan koefisien korelasi sebesar  $r=0.779$  yang berarti peningkatan lama pemberian pegagan akan diikuti dengan penurunan kadar MDA.



**BAB 6**

## **PEMBAHASAN**

**6.1. Pengaruh Pegagan terhadap Panjang Badan pada Larva Zebrafish Stunting**

*Stunting merupakan gangguan pertumbuhan dimana panjang badan sesuai umur <-2 SD berdasarkan grafik pertumbuhan anak WHO (de Onis & Branca, 2016). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan panjang badan antar semua kelompok pada usia 3 dpf yang analog dengan bayi baru lahir. Pada usia 6 dpf yang analog dengan 2 tahun pada anak, terdapat selisih panjang badan antara kelompok kontrol dan rotenon sebesar 0,17 mm. Selisih panjang badan ini lebih besar dari 2 standar deviasi ( $2\text{ SD}=0,14$ ), sehingga memenuhi kriteria *stunting*. Pengukuran rasio panjang kepala : panjang badan pada usia 3 dan 6 dpf memiliki rasio yang sama pada semua kelompok yaitu 1 : 5. Hal ini juga mendukung kriteria *stunting*, dimana pada anak *stunting* ditemukan panjang badan yang normal saat lahir, tidak ada kelainan kongenital, dan memiliki proporsi tubuh yang sama dengan anak normal (Picasso, 2016).*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rotenon dapat menghambat pertumbuhan panjang badan. Rotenon menghambat kompleks I mitokondria yang mengakibatkan peningkatan produksi ROS dan penurunan jumlah ATP (Li *et al.*, 2003). Pada pertumbuhan tulang, ROS dapat menghambat diferensiasi osteoblas dan merangsang osteoklastogenesis dengan meningkatkan ekspresi RANKL (Wauquier *et al.*, 2009), sehingga terjadi ketidakseimbangan pada proses formasi dan resorbsi tulang (Ha *et al.*, 2004). Selain itu peningkatan ROS menyebabkan gangguan pada *Insulin Growth Factor-I* (Backeljau *et al.*, 2010). IGF-I berperan dalam memediasi pertumbuhan dan perkembangan sel somatik, termasuk pada otot dan tulang saat prenatal dan postnatal (Wood *et al.*, 2005).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa, pemberian ekstrak pegagan 5 µg/ml dengan lama paparan sampai 4, 5 dan 6 dpf secara signifikan meningkatkan panjang badan pada larva zebrafish yang dipapar rotenon, dengan koreksi panjang badan sebesar 99,6%. Pegagan mengandung fitonutrien berupa triterpenoid, karotenoid, flavonoid, alkaloid, glikosida, dan minyak atsiri (Chandrika & Kumarab, 2015).

Kandungan triterpen yang tinggi dalam *Centella asiatica* berperan sebagai antioksidan (Rahman et al., 2013). Jenis triterpenoid dalam *Centella asiatica* terdiri dari madecassoside, asiaticoside, madecassic acid, dan asiatic acid (Hashim et al., 2011). Khotimah et al. (2015a) membuktikan terdapat kandungan asiaticoside pada *Centella asiatica* sebesar 2.9 ppm yang diperiksa dengan *Liquid Chromatography-Mass Spectrophotometri* (LCMS). Ekstrak etanol *Centella asiatica* pada penelitian ini berasal dari simplia yang sama dengan penelitian sebelumnya (Khotimah et al., 2015a), sehingga diasumsikan memiliki kandungan asiaticoside yang sama. Selain itu flavonoid dan karotenoid yang terkandung dalam *Centella asiatica* dapat berperan sebagai antioksidan penting (Chandrika & Kumarab, 2015), sehingga dapat menurunkan produksi ROS, yang pada penelitian ini diduga sebagai faktor awal dalam menginduksi terjadinya *stunting*. Peningkatan ROS dapat dapat menyebabkan kerusakan oksidatif dan disfungsi jaringan (Meo, 2016).

*Centella asiatica* mengandung makronutrien seperti karbohidrat, protein, dan serat (Joshi and Caturvedi, 2013) yang diperlukan dalam menunjang pertumbuhan linier (Uauy, 2013). 100 gram *Centella asiatica* mengandung mineral berupa 171 mg kalsium dan 32,51 mg zinc (Lohoues et al., 2014). Peran Kalsium pada awal kehidupan mempengaruhi perkembangan tulang (Flynn, 2003). Gibson et al. (2007), mengungkapkan kemungkinan terjadi defisiensi zinc

sebagai faktor yang menghambat pertumbuhan linier pada anak usia sekolah yang mengalami *stunting*. Cory'ah et al. (2017) menyatakan bahwa pemberian ekstrak etanol pegagan 5 µg/mL dapat meningkatkan panjang badan melalui peningkatan ekspresi IGF-1. IGF-1 dengan IGF-1R berperan menstimulasi ikatan OPG dan RANKL terhadap osteoblas untuk memproduksi osteocalcin yang berperan dalam formasi dan osifikasi tulang. Hal ini sejalan dengan penelitian satu tim, dimana *Centella asiatica* dapat meningkatkan osifikasi tulang rawan dan tulang keras melalui penurunan IL-6 dan peningkatan IL-10 (Nuraenah et al., 2018). Ariyati et al. (2017) membuktikan bahwa pegagan dapat meningkatkan panjang badan melalui peningkatan ekspresi OPG sebagai reseptör osteoblas dan penurunan ekspresi RANKL sebagai indikator osteoklastogenesis (penyerapan tulang). Ikatan OPG dan RANKL menghambat ikatan antara RANKL dengan RANK sehingga menghambat osteoklastogenesis (Ha et al., 2004).

Hasil penelitian menunjukkan, terdapat peningkatan panjang badan yang

signifikan pada kelompok P1, P2, dan P3 dibandingkan rotenon. Pada perbandingan antar kelompok perlakuan, tidak terdapat perbedaan panjang badan antar P1, P2, dan P3. Pemberian pegagan sampai 5 dpf paling optimal meningkatkan panjang badan dibandingkan P1 dan P3, dimana rata-rata panjang badan P2 sama dengan kontrol. Persentase tertinggi larva zebrafish yang memiliki panjang badan normal juga terdapat pada kelompok P2 sebesar 63,3%.

Rata-rata panjang badan pada kelompok P3 lebih rendah dibandingkan

P2. Hal ini sebanding dengan hasil kadar catalase dan MDA, dimana pada kelompok P3 terjadi penurunan catalase dan peningkatan MDA. Jika ditinjau hasil penelitian satu tim menunjukkan bahwa pada kelompok P3 terjadi peningkatan kadar IL-6 sebagai mediator proinflamasi yang signifikan dibandingkan P2 (Nuraenah et al., 2018). Hal ini memunculkan dugaan bahwa

pemberian ekstrak pegagan 5  $\mu\text{g/mL}$  selama 6 hari dapat menimbulkan efek bifasik.

**6.2 Pengaruh Pegagan terhadap Kadar Catalase pada Larva Zebrafish Stunting**

Rotenon secara signifikan dapat menurunkan kadar catalase dibandingkan kelompok kontrol. Kebocoran pada kompleks I akibat hambatan rotenon mengakibatkan banyak elektron bebas yang bereaksi dengan molekul oksigen menghasilkan superoksida ( $\text{O}_2^-$ ) (Sanders & Greenamyre, 2013). Ketika terjadi peningkatan radikal bebas, tubuh akan merespon dengan memproduksi antioksidan endogen seperti SOD, catalase, dan HPx untuk menetralkan radikal bebas (Makker et al., 2009). Radikal superoksida secara cepat dikonversi oleh enzim SOD menjadi hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dan  $\text{O}_2$  (Nimse & Pal, 2015). Hidrogen peroksida akan dikatalisis oleh enzim antioksidan catalase menjadi  $\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{O}_2$  (Birben et al., 2012). Tingginya  $\text{H}_2\text{O}_2$  di dalam tubuh memungkinkan terjadinya penurunan kadar catalase karena telah bekerja dalam menetralisir  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak etanol pegagan pada kelompok P1, P2, dan P3 dapat meningkatkan kadar catalase yang signifikan berbeda dibandingkan kelompok rotenon. Pemberian pegagan selama 5 dan 6 hari menghasilkan kadar catalase yang lebih tinggi dibandingkan pemberian selama 4 hari. Raju et al. (2012) membuktikan bahwa fenol dan flafonoid yang terkandung dalam *Centella asiatica* berperan dalam menstabilkan radikal bebas. Selain itu, *Centella asiatica* juga menunjukkan aktivitas  $\text{H}_2\text{O}_2$  scavenging. Ekstrak *Centella asiatica* juga dapat meningkatkan aktivitas SOD, Catalase, dan glutathione peroxidase, dan glutathione reductase (Chen et al., 2016). Dalam penelitian satu tim, pemberian pegagan 5  $\mu\text{g/mL}$  selama 4, 5, dan

hari juga dapat meningkatkan kadar SOD (Yuliyani *et al.*, 2018). Gray *et al.* (2016) menyatakan, *Centella asiatica* dapat meningkatkan ekspresi gen Nrf2. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) merupakan faktor transkripsi yang dapat meningkatkan regulasi ekspresi gen yang mengkode protein antioksidan (Jung & Kwak, 2010). Dong *et al.* (2008) membuktikan bahwa *Nrf2 signaling* terlibat dalam menginduksi enzim antioksidan dan detoksifikasi pada embrio tikus yang terpapar etanol, salah satunya adalah enzim *catalase*.

### 6.3 Pengaruh Pegagan terhadap Kadar *Malondialdehyde* Larva Zebrafish Stunting

Rotenon secara signifikan dapat meningkatkan kadar MDA dibandingkan kelompok kontrol. Terganggunya sistem transport elektron akibat rotenon menyebabkan kurangnya oksigenasi dan peningkatan kadar hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang merupakan tanda terjadinya stress oksidatif (Li *et al.*, 2003). Hidrogen peroksida bersifat tidak reaktif (Raju *et al.*, 2015), namun  $H_2O_2$  dapat berubah menjadi radikal hidroksil ( $OH^-$ ) melalui reaksi Haber-Weiss dan Fenton dengan adanya logam  $Fe^{2+}$  atau  $Cu^{2+}$ .  $OH^-$  juga bisa terbentuk akibat reaksi  $O_2^-$  dengan  $H_2O_2$  (Birben *et al.*, 2012).

Radikal hidroksil bersifat sangat reaktif dan dapat menyerang *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) melalui proses peroksidasi lipid membentuk hidroperoksida (Burton & Jauniaux, 2011). Salah satu aldehid sekunder yang dihasilkan peroksidasi lipid adalah *Malondialdehyde* (MDA) (Ayala, *et al.*, 2014). *Malondialdehyde* (MDA) merupakan aldehid reaktif yang menyebabkan stress toksik pada sel (Ebenhardt, 2001). Hal ini sesuai dengan penelitian, dimana pada anak stunting terjadi peningkatan kadar MDA dan penurunan jumlah antioksidan seperti *Catalase*, SOD dan GSH (Aly *et al.* 2014).

Pemberian ekstrak etanol pegagan selama 4, 5, dan 6 hari secara signifikan dapat menurunkan kadar MDA dibandingkan kelompok rotenon. Hal ini sesuai dengan penelitian Giribabu, *et al.* (2014) yang membuktikan bahwa *Centella asiatica* secara signifikan dapat menurunkan kadar MDA dan meningkatkan kadar enzim antioksidan seperti superokksida dismutase, catalase dan glutation peroksidase.

Pemeriksaan radikal bebas secara tidak langsung dapat dilakukan dengan memeriksa kadar MDA (Winarsi, 2011). *Centella asiatica* berpotensi sebagai *scavenger* radikal bebas superokksida, hidrogen peroksid, nitrit oksida (Sugunabai *et. al.*, 2015), dan hidroksil (Shinomol & Muralidhara, 2008). Aktivitas *scavenger* ini akan menurunkan produksi ROS di dalam tubuh, yang akan berdampak pada penurunan kadar MDA. *Malondialdehyde* (MDA) merupakan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh oleh radikal bebas dan merupakan metabolit komponen sel yang dihasilkan oleh radikal bebas (Devlin, 2002).

#### 6.4 Hubungan Pegagan dengan Catalase, Malondialdehyde, dan Panjang Badan Larva Zebrafish Stunting

Korelasi antara pemberian ekstrak pegagan dengan masing-masing variabel dependen menunjukkan bahwa, nilai korelasi terbesar terdapat pada hubungan pegagan dengan kadar catalase, dimana koefisien korelasi bernilai 0,895 (sangat kuat). Hal ini mungkin karena catalase berperan di barisan pertama sebagai enzim antioksidan. Catalase merupakan enzim antioksidan kedua setelah superokksida dismutase yang berperan dalam mengkatalisis  $H_2O_2$  menjadi air dan oksigen. Peningkatan catalase dapat disebabkan karena terjadi peningkatan ekspresi Nrf2 dan gen tagetnya dengan pemberian *Centella asiatica* (Gray at all., 2015) yang merupakan faktor transkripsi yang meregulasi respon antioksidan (Li & Kong, 2009). Husin *et al.* (2007) membuktikan bahwa tikus yang

menerima ekstrak dan bubuk *Centella asiatica* signifikan memiliki kadar *catalase* yang lebih tinggi dari tikus normal.  $H_2O_2$  merangsang proliferasi progenitor osteoklas dan memperpanjang umur osteoklas dewasa yang bertanggung jawab terhadap resorpsi matriks tulang. Peningkatan *catalase* akibat FoxOs dapat menurunkan jumlah osteoklas dan resorpsi tulang melalui penurunan  $H_2O_2$ . Percobaan *catalase overexpressing* pada mitokondria osteoklas, dapat meningkatkan aktivitas *catalase* sebesar tiga kali lipat serta meningkatkan BMD kanselus dan volume tulang di bagian femur tikus (Bartell *et al.*, 2014). Jalur lain terkait stres oksidatif adalah Nrf2, yang dapat menetralisir ROS selular melalui transkripsi geni dari beberapa enzim antioksidan seperti SOD, *catalase*, GPx, dan lain-lain, sehingga fungsi osteoblas tidak dihambat (Tian *et al.*, 2017).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pegagan 5 µg/mL pada masa *pre-hatching* sampai dengan *post hatching* (sampai 4, 5, dan 6 dpf) mampu meningkatkan panjang padan pada usia 6 dpf melalui penurunan aktifitas radikal bebas dengan koreksi panjang badan sebesar 99,6%. Jumlah larva zebrafish yang memiliki panjang badan normal adalah 42,2% (33,3% kelompok P1, 63,3% kelompok P2, dan 30% kelompok P3). Tingkat koreksi ini lebih tinggi dibandingkan penelitian Cory'ah *et al.* (2017), dimana pemberian pegagan 5 µg/mL pada masa *pre-hatching* saja (sampai 3 dpf) dapat meningkatkan panjang badan dengan tingkat koreksi sebesar 96,4%.

Upaya intervensi gizi spesifik untuk balita pendek difokuskan pada kelompok 1.000 Hari Pertama Kehidupan (HPK), yaitu ibu hamil, ibu menyusui, dan anak 0-23 bulan, karena penanggulangan balita pendek yang paling efektif dilakukan pada periode tersebut (Kemenkes RI, 2016). Bueno *et al.* (2017), melaporkan dari 75 anak usia 6-48 bulan dengan HAZ < -2 yang dirawat selama 41 bulan, 18 anak (24%) pulih dari *stunting* dengan indikator HAZ > -1.

Perawatan khusus yang dilakukan berupa pemberian makanan seimbang, pendidikan gizi, pemantauan pertumbuhan dan perkembangan, dan perawatan penyakit secara dini. Pada penelitian mereka, anak yang dirawat mulai usia < 24 bulan, menunjukkan keberhasilan yang lebih tinggi untuk pulih dari *stunting*. Hal ini menunjukkan intervensi anak *stunting* harus dimulai lebih awal. Sebuah studi kohort di Peru, dari 2052 anak-anak usia 6-18 bulan yang diikuti selama 4 tahun, didapatkan bahwa 380 anak mengalami *stunting* ( $HAZ <-2$ ) di awal dan 140 (36,8%) pulih dari *stunting* ( $HAZ >-2$ ) pada penilaian akhir (Crookston *et al.*, 2010).

## 6.5 Implikasi Hasil Penelitian dalam Asuhan Kebidanan

Pemantauan pertumbuhan dan perkembangan anak yang dilakukan sejak dini akan menentukan kualitas hidup individu di masa depan (Prendergast & Humprey, 2014). 1000 hari pertama kehidupan yang dimulai dari konsepsi sampai anak usia 2 tahun adalah periode kritis untuk pertumbuhan dan perkembangan anak (Victora *et al.*, 2008). *Stunting* merupakan kegagalan dalam mencapai pertumbuhan linear pada balita (Sudirman, 2008). Paparan pestisida menjadi salah satu faktor lingkungan yang dapat menyebabkan terjadinya *stunting* (Paudel, 2013).

Rotenon sebagai model pestisida pada penelitian ini yang diberikan pada masa *pre hatching* dapat menginduksi terjadinya *stunting* pada larva zebrafish.

Masa *pre hatching* pada zebrafish analog dengan intra uterine pada ibu hamil. Sehingga perlu menjadi perhatian bagi ibu hamil agar berada pada lingkungan yang bebas dari toksik seperti pestisida. *Stunting* dapat dicegah dengan meningkatkan akses terhadap air bersih dan fasilitas sanitasi, serta menjaga kebersihan lingkungan. Bidan perlu memberikan penyuluhan tentang gerakan

perilaku hidup bersih dan sehat pada ibu hamil dan masyarakat agar dapat menurunkan kejadian infeksi yang berdampak pada pertumbuhan.

Pemberian pegagan sebagai model intervensi *stunting* pada penelitian ini karena memiliki kandungan makronutrien berupa protein dan karbohidrat serta mikronutrien seperti vitamin dan mineral. Selain itu pegagan mengandung bahan aktif yang berperan sebagai antioksidan. Pegagan diberikan pada 2 hpf-6 dpf

yang analog dengan hamil sampai anak usia 2 tahun.

Bidan berperan dalam memantau kebutuhan nutrisi ibu hamil. Ibu hamil disarankan untuk mengkonsumsi menu seimbang yang berasal dari aneka ragam pangan termasuk sayur dan buah dengan kandungan vitamin, mineral, dan antioksidan yang tinggi. Bidan juga perlu memperhatikan kebutuhan zat gizi mikro seperti asam folat, tablet besi, vitamin B, vitamin C, dan kalsium. Pada masa nifas dan menyusui, bidan dapat menggalakkan ASI ekslusif sampai usia 6 bulan dengan cara memberikan edukasi dan demonstrasi mengenai ASI ekslusif.

Setelah usia 6 bulan bayi diberikan MPASI yang bergizi guna menunjang asupan nutrisi anak pada periode tumbuh kembangnya. ASI terus diberikan sampai anak berusia 2 tahun (MCA Indonesia, 2013; Kemenkes RI, 2016).

Pemantauan panjang badan larva zebrafish pada penelitian ini dilakukan pada usia 3-6 dpf yang analog dengan bayi baru lahir sampai anak usia 2 tahun.

Pertumbuhan yang tercepat ditemukan pada larva zebrafish usia 3-4 dpf. Bidan juga berperan dalam memantau pertumbuhan dan perkembangan anak melalui kegiatan Posyandu. Pemeriksaan antropometri tidak hanya dengan menilai berat badan saja, namun juga mengukur panjang badan/ tinggi badan dengan teknik yang benar. Hasil pengukuran dapat didokumentasikan pada grafik pertumbuhan

anak. Jika grafik pertumbuhan anak tidak naik mengikuti kurva normal, maka harus segera diatasi. Skrining yang dilakukan bidan sangat penting untuk mengetahui gangguan pertumbuhan sehingga dapat ditangani sejak dini.

Intervensi lebih awal pada anak *stunting* menunjukkan keberhasilan yang lebih tinggi untuk pulih. Upaya pencegahan *stunting* pada periode kritis pertumbuhan dan perkembangan ini harus dilakukan secara berkelanjutan.

**6.6 Keterbatasan Penelitian**

Penelitian ini hanya menilai satu antioksidan endogen yaitu *catalase*, sedangkan antioksidan yang lain tidak diukur. Pemantauan pengaruh pegagan terhadap *catalase*, MDA, dan panjang badan pada zebrafish hanya dilakukan sampai usia 6 dpf saja.



**BAB 7****KESIMPULAN DAN SARAN****7.1. Kesimpulan**

1. Ekstrak etanol pegagan *pre* sampai dengan *post hatching* dapat meningkatkan panjang badan pada larva zebrafish *stunting* di usia 6 dpf.
2. Ekstrak etanol pegagan *pre* sampai dengan *post hatching* dapat meningkatkan kadar *Catalase* pada larva zebrafish *stunting* di usia 6 dpf.
3. Ekstrak etanol pegagan *pre* sampai dengan *post hatching* dapat menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada larva zebrafish *stunting* di usia 6 dpf.
4. Terdapat hubungan yang kuat dan positif antara ekstrak etanol pegagan dengan panjang badan pada larva zebrafish *stunting*.
5. Terdapat hubungan yang sangat kuat dan positif antara ekstrak etanol pegagan dengan *Catalase* pada larva zebrafish *stunting*.
6. Terdapat hubungan yang kuat dan negatif antara ekstrak etanol pegagan dengan *Malondialdehyde* (MDA) pada larva zebrafish *stunting*.

**7.2. Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak etanol pegagan terhadap antioksidan lain seperti *glutathione peroxidase* (GPx) dan *glutathione transferase* (GST).
2. Perlu pemantauan lanjutan hingga usia 9 dpf untuk mengetahui aktivitas radikal bebas dan panjang badan pada larva zebrafish.
3. Perlu dilakukan uji klinis untuk mengetahui farmakologi klinik dari pegagan yang akan dimanfaatkan sebagai alternatif Pencehan *stunting*.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Abele, J., Savin, D. Z., Medina, T. V., Miyamoto, S., De Almeida, E. A., Noguera, L., & De Mdeiros, M. H. G. 2011. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems: Evaluation of Malondialdehyde Levels*. Wiley-Blackwell. USA.
- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., & Rezaie, A. 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*, **10**(6): 141-147.
- Agarwal, A., Mellado, A. A., Premkumar, B. J., Shaman, A., & Gupta, S. 2012. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **10**(49): 1-31.
- Agoes, A. 2010. *Tanaman Obat Indonesia* (Buku 1). Salemba Medika. Jakarta.
- Al-Shanti, N., & Stewart, C. E. 2012. Inhibitory effects of IL-6 on IGF-1 activity skeletal myoblast could be mediated by the activation of SOC-3. *Journal of Biochemistry*, **113**(3): 923-933.
- 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.
- Ariyati, L. I. P., Ali, M., & Kalsum, U. 2017. Pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap terhadap ekspresi Osteoprotegri (OPG) dan Receptor Activator Nuclear Kappa- Ligan (RANKL) pada stunting larva zebrafish (*Danio rerio*) yang diinduksi rotenon. [Tesis]. Universitas Brawijaya.
- Astuti, S. 2008. Isoflavon Kedelai dan potensinya sebagai penangkap radikal bebas. *Teknologi Industri Dan Hasil Pertanian Universitas Lampung*, **13**(2): 126-136.
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., Groth, D. M., Verdile, G., & Martins, R. N. 2012. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: An introduction. *Journal of Visualized Experiments*, **69**: 1-8.
- 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.
- Backeljauw, P., Bang, P., Dunger, D. B., Juul, A., Le Bouch, Y., & Rosenfeld, R. 2010. Insulin-like growth factor-I in growth and metabolism. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, **23**(1-2): 3-16.
- Badan POM RI. 2010. *Pegagan-Centella asiatica (L) Urban*. Direktorat Obat Asli. Jakarta.
- Bahr, S. M. E. 2013. Riview Article Biochemistry of Free Radicals and Oxidative Stress. *Science International*, **1**(5): 111-117.

- Bartell, S. M., Kim, H., Ambrogini, E., Han, L., Lyer, S., Ucer, S.S., & Almeida, M. 2014. FoxO proteins restrain osteoclastogenesis and bone resorption by attenuating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation. *Nature Communications*, **2014**: 1-12.
- Berk, L. E. 2012. *Child Development*, 9/e. *Child Development*. International Child Art Foundation. Washington DC.
- Birben, E., Murat, U., Sahiner, M. D., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, **5**: 9–19.
- Black, R. E., Victora, C. G., Walker, S. P., Bhutta, Z. A., Christian, P., de Onis, M., Ezzati, M., McGregor, S. G., Katz, J., Martorell, R., & Uauy, R. 2013. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *The Lancet*, **382**(9890): 427–451.
- Briend, A., Khara, T., & Dolan, C. 2015. Wasting and stunting-similarities and differences: Policy and programmatic implications. *Food and Nutrition Bulletin*, **36**(1): S15–S23.
- 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*, **1**-21.
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. 2011. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, **25**(3): 287–299.
- Bylka, W., Awi e , P. Z., Sroka, E. S., Pazdrowska, A. D., & Brzeziska, M. 2014. Centella asiatica in Dermatology: An Overview. *Phytotherapy Research*, **28**: 1117–1124.
- Cabezas, R., Avila, M. F., Torrente, D., El-bachá, R. S., Morales, L. Gonzles, J., & Baretto, G. E. 2013. Astrocytes Role in Parkinson: A Double-Edged Sword. *Neurodegenerative Diseases*, **20**: 492–517.
- Cahill, G. F. 2006. Fuel Metabolism in Starvation. *Annual Review of Nutrition*, **26**(1): 1–22.
- Cairns, D. 2009. *Intisari Kimia Farmasi Edisi 2*. EGC. Jakarta.
- Campbell, N. A., Ree, J. B., Urry, L. A., & Michael, L. 2010. *Biologi*. Edisi Kedelapan. Erlangga. Jakarta.
- Casacchia, T., Sofo, A., Toscano, P., Sebastianelli, L., & Perri, E. 2009. Persistence and effects of rotenone on oil quality in two Italian olive cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, **47**(1): 214–219.
- Caulfield, L. E., Richard, S. A., Rivera, J. A., Musgrove, P., & Black, R. E. 2006. Stunting , wasting , and micronutrient deficiency disorders. *Disease Control Priorities in Developing Countries*, 551-567.
- Chandrika, U. G., & Kumarab, P. A. A. S. P. 2015. Gotu Kola (*Centella asiatica*): Nutritional Properties and Plausible Health Benefits. *Advances in Food and Nutrition Research*, **76**(1): 125-157.

- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**(2): 192–208.
- Chen, C. L., Tsai, W. H., Chen, C. J., & Pan, T. M. 2016. *Centella asiatica* extract protects against amyloid  $\beta$ -induced neurotoxicity in neural cells by activating the antioxidant defence system. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, **6**: 362-369.
- Cheng, J. P., Flahaut, E., & Cheng, S. H. 2007. Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Toxicol Chem*, **26**(4): 708–716.
- Cheng, J., Wu, X., & Zhuge, L. 2004. Intense yellow photoluminescence from silicon oxynitride films prepared by dual ion beam sputtering. *Plasma Science and Technology*, **6**(2): 2237–2240.
- Chippada, S. C., & Vangalapati, M. 2011. Antioxidant, an anti-inflammatory and anti-arthritis activity of *Centella asiatica* extracts. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, **1**(2): 260–269.
- Colosio, C., Tiramani, M., & Maroni, M. 2003. Neurobehavioral Effects of Pesticides: State of the Art. *NeuroToxicology*, **24**: 577–591.
- Cory'ah, F. A. N., Khotimah, H., & Nurdiana. 2017. Pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap panjang badan, Insulin like Growth Factor-1 (IGF-1) dan Insulin Reseceptor Substrat (IRS) pada larva zebrafish (*Danio rerio*) model stunting dengan induksi rotenon. [Tesis]. Univertitas Brawijaya.
- Crookston, B. T., Penny, M. T., Alder, S. C., Dickerson, T. T., Merrill, R. M., Stanford, J. B., Porucznik, C. A., & Dearden, K. A. 2010. Children who recover from early stunting and children who are not stunted demonstrate similar levels of cognition. *The Journal of Nutrition*, **140** (11): 1996-2001.
- Dahlan, M. S. 2011. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Edisi 5. Salemba Medika. Jakarta.
- De Benedetti, F., Rucci, N., Del Fattore, A., Peruzzi, B., Paro, R., Longo, M., Vivarelli, M., Muratori, F., Berni, S., Ballanti, P., Ferrari, S., & Teti, A. 2006. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: A model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis and Rheumatism*, **54**(11): 3551–3563.
- de Onis, M., & Branca, F. 2016. Childhood stunting: A global perspective. *Maternal and Child Nutrition*, **12**: 12–26.
- de Onis, M., Dewey, K. G., Borghi E., Onyango, A. W., Blössner, M., Daelmans B., Piwoz, E., & Branca, F. 2013. The World Health Organization's global target for reducing childhood stunting by 2025: rationale and proposed actions. *Maternal & Child Nutrition*, **9**(2): 6-26.

- de Onis M., Onyango A.W., Van den Broeck J., Chumlea, W.C., & Martorell, R. 2004. Measurement and standardization protocols for anthropometry used in the construction of a new international growth reference. *Food and Nutrition Bulletin*, 25(1): 27–36.
- Devlin, M. T. 2002. Bioenergetic and Oxidative Metabolism in Biochemistry with Clinical Correlations. 5 th ed. Wiley-liss. Canada. p.590-592.
- Dewey, K. G., & Mayers, D. R. 2011. Early child growth: How do nutrition and infection interact? *Maternal and Child Nutrition*, 7(3): 129–142.
- Dhanasekaran, M., Holcomb, L. A., Hitt, A. R., Tharakan, B., Porter, J. W., Young, K. A., & Manyam, B. V. 2009. Centella asiatica Extract Selectively Decreases Amyloid Levels in Hippocampus of Alzheimer's Disease Animal Model. *Phytotherapy Research*, 23: 14–19.
- Dong, S., Sulik, K. K., & Chen, S. 2008. Nrf2-Mediated Transcriptional Induction of Antioxidant Response in Mouse Embryos Exposed to Ethanol *in vivo*: Implications for the Prevention of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(12): 2023-2033.
- Ebenhardt, M. K. 2001. *Reactive Oxygen Metabolites*. 2nd Edition. CRC Press. Washington DC.
- Eimon, P. M., & Ashkenazi, A. 2010. The zebrafish as a model organism for the study of apoptosis. *Apoptosis*, 15(3): 331–349.
- EPA. (2007). Reregistration Eligibility Decision for Rotenon. United States: Environmental Protection Agency.
- Flynn, A. 2003. The role of dietary calcium in bone health. *Proceedings of The Nutrition Society*, 62(4): 851-858.
- Gibson, R. S., Manger, M. S., Krittaphol, W., Pongcharoen, T., Gowachirapant, S., Bailey, K. B., & Winichagoon, P. 2007. Does zinc deficiency play a role in stunting among primary school children in NE thailand?. *British Journal of Nutrition*, 97(1): 167-175.
- Giribabu, N., Srinivasarao, N., Swapna Rekha, S., Muniandy, S., & Salleh, N. 2014. Centella asiatica Attenuates Diabetes Induced Hippocampal Changes in Experimental Diabetic Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014: 1–10.
- Gnanapragasam, A., Ebenezar, K. K., Sathish, V., Govindaraju, P., & Devaki, T. 2004. Protective effect of Centella asiatica on antioxidant tissue defense system against adriamycin induced cardiomyopathy in rats. *Life Sciences*, 76(5): 585–597.
- Gnanapragasam, A., Yogeeta, S., Subhashini, R., Ebenezar, K. K., Sathish, V., & Devaki, T. 2007. Adriamycin induced myocardial failure in rats: Protective role of Centella asiatica. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 294: 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. *Journal of Ethnopharmacology*, **180**: 78–86.
- Grotto, D., Maria, L. S., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., & Garcia, C. 2009. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim. Nova*, **32**(1): 169–174.
- Gubaljevic, J. G., & Eausevic, A. 2013. Monitoring changes in serum 8-isoprostane concentration as a possible marker of oxidative stress in pregnancy. *Journal of Health Sciences*, **3**(3): 227–231.
- Ha, H., Kwak, H. B., Lee, S. W., Jin, H. M., Kim, H. M., Kim, H. H., & Lee, Z. H. 2014. Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclast. *Experimental Cell Research*, **301**(2): 119–127.
- Hällare, A. V., Köhler, H. R., & Triebeskorn, R. 2004. Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere*, **56**(7): 659–666.
- Hamid, A. A., Aiyelaagbe, O. O., Usman, L. A., Ameen, O. M., & Lawal, A. 2010. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, **4**(8): 142–151.
- Hanafia, K. A. 2016. Rancangan Percobaan Teori & Aplikasi. PT RajaGrafindo Persada. Jakarta. p.9-10.
- Hashim, P., Sidek, H., Helan, M. H. M., Sabery, A., Palanisamy, U. D., & Ilham, M. 2011. Triterpene composition and bioactivities of centella asiatica. *Molecules*, **16**(2): 1310–1322.
- Hien, P. P., Gortnizka, H., & Kraemer, R. 2003. Rotenone - Potential And Prospect For Sustainable Agriculture. *Omonrice*, **11**, 83–92.
- Hosen, M. J., Vanakker, O. M., Willaert, A., Huysseune, A., Coucke, P., & De Paepe, A. 2013. Zebrafish models for ectopic mineralization disorders: practical issues from morpholino design to post-injection observations. *Frontiers in Genetics / Systems Biology*, **4**(74): 1–17.
- Hovsepian, E., Penas, F., Siffo, S., Mirkin, G. A., & Goren, N. B. 2013. IL-10 Inhibits the NF- $\kappa$ B and ERK/MAPK-Mediated production of pro-inflammatory mediators by up-regulation of SOCS-3 in trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes. *Plos One*, **8**(11): e79445.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., & Stemple, D. L. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, **496**(7446): 498–503.
- Hussin, M., Abdul-Hamid, A., Mohamad, S., Saari, N., Ismail, M., & Bejo, M. H. 2007. Protective effect of Centella asiatica extract and powder on oxidative stress in rats. *Food Chemistry*, **100**: 535–541.

- Hu, Y., Rosen, D. G., Zhou, Y., Feng, L., Yang, G., Liu, J., & Huang, P. 2005. Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: Role in cell proliferation and response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47): 39485–39492.
- IDAI. 2015. *Kurva Pertumbuhan WHO*. PT Virtudraft Intermedia Telematika. Jakarta.
- Incandela, L., Cesarone, M. R., Chacchio, M., De Sanctis, M. D., Santavenere, C., D'Auro, M. G., Bucci, M., & Belcaro, G. 2001. Total triterpenic fraction of Centella asiatica in chronic venous insufficiency and in high-perfusion microangiopathy. *Angiology*, 52(2): 9–13.
- Irwin, M. H., Parameshwaran, K., & Pinkert, C. A. 2014. Mouse models mittochondrial complex I disfungtion. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(1): 34–40.
- Jin, Y., Zheng, S., Pu, Y., Shu, L., Sun, L., Liu, W., & Fu, Z. 2011. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 82(3): 398–404.
- 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 Sciences*, 4(1): 135–149.
- Jung, K., & Kwak, M. 2010. The Nrf2 System as a Potential Target for the Development of Indirect Antioxidants. *Molecules*, 15: 7266-7291.
- Karsenty, G. 2006. Convergence between bone and energy homeostases : Leptin regulation of bone mass, *Cell Metabolism*, 4: 341–348.
- Kemenkes RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar 2013*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Jakarta.
- Kemenkes RI. 2016. *Situasi Balita Pendek*. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Khotimah, H., Sumitro, S. B., Ali, M., & Widodo, M. A. 2015a. Standardized *Centella Asiatica* Increased Brain- Derived Neurotrophic Factor and Decreased Apoptosis of Dopaminergic Neuron in Rotenone- Induced Zebrafish. *GSTF Journal of Psychology*, 2(1): 22–27.
- Khotimah, H., Sumitro, S. B., & Widodo, M. A. 2015b. Zebrafish Parkinson's Model: Rotenone decrease motility, Dopamine, and increase -synuclein Aggregation and Apoptosis of Zebrafish Brain. *International Journal of PharmTech Research*. 8(4): 614–621.
- Khotimah, H., Widodo, A., Ali, M., & Sumitro, S. B. 2015c. Efek protektif ekstral pegagan (*Centella asiatica*) pada ikan zebra (*Danio rerio*) model parkinson melalui stabilitas lokomotor dan dopamin, penurunan apoptosis neuron domaniergik dan agregasi -synuclein serta peningkatan signal brain-derived neurotrophic factor. [Disertasi]. Universitas Brawijaya.

- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dinamiyics*, **203**(3): 253–310.
- Kumar, A., Dogra, S., & Prakash, A. 2009. Neuroprotective Effects of *Centella asiatica* against Intracerebroventricular Colchicine-Induced Cognitive Impairment and Oxidative Stress. *International Journal of Alzheimer's Disease*, **2009**, 1-8.
- Li, H., Gong, X., Zhang, L., Zhang, Z., Luo, F., & Zhou, Q. 2009. Madecassoside attenuates inflammatory response on collagen-induced arthritis in DBA / 1 mice. *Phytomedicine*, **16**: 538–546.
- Li, W., & Kong, A. N. 2009. Moleculer of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog*, **48**(2): 91-104.
- 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. *Science for Conservation*, **211**: 1–40.
- Llurba, E., Gratacos, E., Gallan, P. M., Cabero, L., & Dmoinguez, C. 2004. A comprehensive study of oxidative stress and antioxidant status in preeclampsia and normal pregnancy, *Free Radical Biology & Medicine*, **37**(4): 557–570.
- Lohoues, E. E. C., Trebissou, J. N. D., Adje, F., Konan, A. M. L., Yapo, A. F., Yapi, H F., & Djaman, A. J. 2014. Determination of trace elements and antioxidant compounds contained in the aqueous extract of leaves of *Centella asiatica* (Apiacee). *International Journal of Current Research and Academic Review*, **2**(6): 67-73.
- Lucitt, M. B., Price, T. S., Pizarro, A., Wu, W., Yocom, A. K., Seiler, C., Seiler, C., Pack, M.A., Blair, I.A., FitzGerald, G. A., & Grosser, G. 2008. Analysis of the Zebrafish Proteome during Embryonic Development. *Molecular & Cellular Proteomics*, **7**(5): 981–994.
- Mader, S. S., Windelspecht, M., & Cox, D. 2007. *Essentials of biology*. McGraw-Hill Higher Education. New York.
- Makker, K., Agarwal, A., & Sharma, R. 2009. Oxidative stress and male infertility. *Indian Journal of Medical Research*, **129**: 357-367.
- Marmol, F., Rodriguez, C., Sanchez, J., & Chamizo, V. D. 2015. Anti-oxidative effects produced by environmental enrichment in the hippocampus and cerebral cortex of male and female rats. *Brain Research*, **1613**: 120–129.
- Mayden, R. J., Tang, K. I., Conway, K. A., Freyhof, J., Chamberlain, S., Haskins, M., Schneider, L., Sudkamp, M., Wood, R. M., Agnew, M., Bufalino, A., Sulaiman, Z., Miya, M., Saitoh, K., & He, S. 2007. Phylogenetic

- Universitas Brawijaya. 2013. Relationships of Danio Within the Order Cypriniformes: A Framework for Comparative and Evolutionary Studies of a Model Species. *Journal Of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)*, **308**(B): 642–654.
- MCA Indonesia. 2013. Stunting dan Masa Depan Indonesia. *Millennium Challenge Account - Indonesia*, 2–5.
- Melo, K. M., Oliveira, R., Grisolia, C. K., Domingues, I., Pieczarka, J. C., de Souza Filho, J., & Nagamachi, C. Y. 2015. Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**(18): 13926–13938.
- Meo, S. D., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2016**: 1-44.
- Muchtadi, D. 2013. *Antioksidan dan Kiat Sehat di Usia Reproduktif*. Alfabeta. Bandung.
- Murphy, M. P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, **417**(1): 1–13.
- Musarofah. 2015. *Tumbuhan Antioksidan*. PT. Remaja Rosdakarya. Bandung.
- Niki, E. 2009. Free Radical Biology & Medicine Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*, **47**(5): 469–484.
- Nimse, S. B., & Pal, D. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, **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.
- Nurjanah, N. N. 2008. *Studi Karakter Agronomi pada Aksesi Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)*. Institut Pertanian Bogor.
- Nusslein, V. C., & Dahm, R. 2002. *Zebrafish*. Oxford University Press. Oxford.
- Ott, K. C. 2006. Rotenone. A Brief Review of its Chemistry, Environmental Fate, and the Toxicity of Rotenone Formulations. New Mexico Council of Trout Unlimited. Mexico. 1-8.
- Padilla, S., Corum, D., Padnos, B., Hunter, D. L., Beam, A., Houck, K. A., Sipes, N., Kleinstreuer, N., Knudsen, T., Dix, D. J., & Reif, D. M. 2012. Zebrafish developmental screening of the ToxCast™ Phase I chemical library. *Reproductive Toxicology*, **33**(2): 174–187.
- Paudel, R., Pradhan, B., Wagle, R. R., Pahari, D. P., & Onta, S. R. 2013. Risk factors for stunting among children: a community based case control study.

- in Nepal. *Kathmandu University Medical Journal*, **10**(3): 18-24.
- Picasso, B.C. 2016. A public health approach to undernutrition in children under five and infants in Ethiopia: An Overview. The University of Arizona.
- Prendergast, A. J., & Humphrey, J. H. 2014. The stunting syndrome in developing countries. *Paediatrics 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.
- Protocol Zebrafish embryo medium. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2011. [http://cshprotocols.cshlp.org/content/2011/8/pdb.rec12478.full?text\\_only=true](http://cshprotocols.cshlp.org/content/2011/8/pdb.rec12478.full?text_only=true). Accessed January 3, 2018.
- Pyron, M. 2003. Female preferences and male-male interactions in zebrafish (*Danio rerio*). *Canadian Journal of Zoology*, **81**(1): 122–125.
- Rahman, M., Hossain, S., Rahaman, A., Fatima, N., Nahar, T., & Uddin, B. 2013. Antioxidant Activity of *Centella asiatica* ( Linn .) Urban : Impact of Extraction Solvent Polarity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **1**(6): 27–32.
- Raju D.C, Victoria T.D, Biji N, & Nikitha G. Evaluation of Antioxidant Potential of Ethanolic Extract of *Centella asiatica* L. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2015; **8**(9): 1289-1293.
- Richards, J. G. 2011. *BONY FISHES! Zebrafish*. University of British Columbia, Canada.
- Rodrigo, R. 2009. *Oxidative Stress and antioxidant. Their Role in Human Disease*. Nova Science Publisher, New York.
- Sanders, L. H., & Greenamyre, J. T. 2013. 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.
- Santoriello, C., & Zon, L. I. 2012. Science in medicine Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *The Journal of Clinical Investigation*, **122**(7): 2337–2343.
- Santoso, L. M., & Santri, D. J. 2016. *Biologi Molekuler Sel*. Salemba Teknika, Jakarta.

- Sawaya, A. L., Martins, P. A., Martins, V. J. B., Florencio, T. T., Hoffman, D., Franco, M. C. P., & Neves, J. 2009. Malnutrition, long-term health and the effect of nutritional recovery. *Emerging Societies—Coexistence of Childhood Malnutrition and Obesity*, **63**: 95-108.
- Scibior, D., & Czeczot, H. 2006. Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig Med Dosw*, **60**: 170–180.
- Selvi, P., Kumar, M., Rajesh, R., & Kathirava, T. 2012. Antidepressant activity of ethanolic extract of leaves of Centella asiatica. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science*, **2**(2): 76–79.
- Sherer, T. B., Betarbet, R., Testa, C. M., Seo, B. B., Richardson, J. R., Kim, J. H., Miller, G. W., Yagi, T., Yagi, A. M., & Greenamyre, J. T. 2003. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **23**(34): 10756–10764.
- Shinomol, G. K., & Muralidhara. 2008. Effect of Centella asiatica leaf powder on oxidative markers in brain regions of prepubertal mice in vivo and its in vitro efficacy to ameliorate 3-NPA- induced oxidative stress in mitochondria. *Phytomedicine*, **15**: 971–984.
- Singh, P. B., & Singh, V. 2008. Cypermethrin induced histological changes in gonadotrophic cells , liver , gonads , plasma levels of estradiol-17 b and 11-ketotestosterone, and sperm motility in *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Chemosphere*, **72**: 422–431.
- Slanchev, K., Stebler, J., Mendez, G. D. C., & Raz, E. 2005. Development without germ cells: The role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *The National Academy of Sciences of the USA*, **102**(11): 4074–4079.
- Soetjiningsih. (1995). *Tumbuh Kembang anak*. EGC. Jakarta.
- Sorribes, A., Þorsteinsson, H., Arnardóttir, H., Jóhannesdóttir, I., Þ., Sigurgeirsson, B., de Polavieja, G.G., & Karlsson, K. ÅE. 2013. The ontogeny of sleep–wake cycles in zebrafish: a comparison to humans. *Frontiers in Neural Circuits*, **7**: 178.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish , *Danio rerio*. *Biological Reviews*, **83**(1): 13–34.
- Stein, P.T., Scholl, T.O., Schluter, M.D., Leskiw, M.J., Chen, X., Spur, B.W., & Rodriguez, A. 2008. Oxidative stress early in pregnancy and pregnancy outcome. *Free Radic Res*, **42**(10): 841–848.
- Stewart, C. P., Iannotti, L., Dewey, K. G., Michaelsen, K. F., & Onyango, A. W. 2013. Contextualising complementary feeding in a broader framework for stunting prevention. *Maternal and Child Nutrition*, **9**(S2): 27–45.
- Strykowski, J. L., and Schech, J. M. 2015. Effectiveness of recommended euthanasia methods in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, **54**(1): 81-84.

- Subban, R., Veerakumar, A., Manimaran, R., Hashim, K. M., & Balachandran, I. 2008. Two new flavonoids from Centella asiatica (Linn.). *Jurnal of Natural Medicine*, 62(3): 369–373.
- Sudirman, H. 2008. Stunting atau pendek: Awal perubahan patologis atau adaptasi karena perubahan sosial ekonomi yang berkepanjangan? *Media Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan*, 8(1): 33–43.
- Sugunabai, J., Jeyaraj, M., & Karpagam, T. 2015. Analysis of Functional compounds and antioxidant activity of centella asiatica. *World Journal Of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(8): 1982–1993.
- Suhartono. 2014. Dampak pestisida terhadap kesehatan. *Prosiding Seminar Nasional Pertanian Organik*, 15–23.
- Sulastry, F. 2019. Uji Toksisitas Akut yang Diukur dengan Penentuan LD50 Ekstrak Daun Pegagan (Centella asiatica (L.) Urban) Terhadap Mencit Balb/C. Universitas Diponegoro.
- Sullivan. 2017. *Breeding Method For Maximal Embryo Production*. Chapter 2. University of Oregon. Oregon.
- Tandon, V., Gupta, B. M., & Tandon, R. 2005. Free radicals/ reactive oxygen species. *JK-Practitioner*, 12(3): 143–148.
- Tian, Y., Ma, X., Yang, C., Su, P., Yin, C., & Qian, A. The Impact of Oxidative Stress on the Bone System in Response to the Space Special Environment. *International Journal of Molecular Sciences*, 18: 1–9.
- Uauy, R. 2013. Improving linear growth without excess body fat gain in women and children. *Food and Nutrition Bulletin*, 34(2): 259–262.
- United Nations Children's Fund, World Health Organization, & The World Bank 2014. *UNICEF–WHO–World Bank: joint child malnutrition estimates*. UNICEF. New York; WHO. Geneva; The World Bank. Washington, DC.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 44–84.
- van Stuijvenberg, M. E., Nel, J., Schoeman, S. E., Lombard, C. J., du Plessis, L. M., & Dhansay, M. A. 2015. Low intake of calcium and vitamin D, but not zinc, iron or vitamin A, is associated with stunting in 2- to 5-year-old children. *Nutrition*, 31(6): 841–846.
- Victora, C. G., Adair, L., Fall, C., Hallal, P. C., Martorell, R., Richter, L., & Sachdev, H. S. 2008. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *The Lancet*, 371(9609): 340–357.
- Wardani, D. W. K. K., Nurdiana., & Khotimah, H. 2017. Pengaruh ekstrak etanol pegagan (Centella asiatica) terhadap ekspresi vascular endothelial growth factor dan vascular endothelial growth factor receptor-2 pada larva zebrafish.

- (*Danio rerio*) model stunting akibat induksi rotenon. [Tesis]. Universitas Brawijaya.
- Wauquier, F., Leotoing, L., Coxam, V., Guicheux, J., & Wittrant, Y. 2009. Oxidative stress in bone remodeling and disease. *Trends in molecular medicine*, **15**(10): 468-477.
- WHO. 2008. *Training course on child growth assessment*. World Health Organization. Geneva.
- WHO. 2012. *Nutrition Landscape Information System (NLIS). Country profile indicators: Interpretation guide*. World Health Organization. Geneva.
- Wilson, C. 2012. Aspects of Larval Rearing. *ILAR Journal*, **53**(2): 169–178.
- Winarsi, H. 2011. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius. Yogyakarta.
- Winarto, I. W., & Surbakti, I. M. 2003. *Khasiat & Manfaat Tanaman Penambah Daya Ingat*. Agromedia. Jakarta.
- Wood, A. W., Duan, C., & Bern, H. A. 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish. *International Review of Cytology*, **243**: 215-285.
- Wolny, S., McFarland, R., Chinnery, P., & Cheetham, T. 2009. Abnormal growth in mitochondrial disease. *Acta Paediatrica*, **98**(3): 553–554.
- Yuliyani, T., Ali, M., & Kalsum, U. 2018. Pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pre sampai post hatching terhadap panjang badan, Superoksid dismutase, dan Malondialdehyde larva zebrafish stunting. [Tesis]. Universitas Brawijaya.
- Zakiah., Kalsum, U., & Khotimah, H. 2017. Pengaruh pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) melalui ekspresi extracellular signal-regulated kinase 1/2 dan protein Ki-67 pada larva zebrafish (*Danio rerio*) model stunting dengan induksi rotenon. [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 - 65-45, Jawa Timur - Indonesia

Telp. (0341) 531611 Ext. 108; 567117; 567192 - Fax. (0341) 204755

<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 ( <i>Centella asiatica</i> ) pada Masa Pre sampai dengan Post Hatching Meningkatkan Osifikasi, Memperbaiki Inflamasi, dan Menurunkan Stress Oksidatif Larva Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) Stunting.
PENELITI UTAMA	: Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes
ANGGOTA	: Tri Yullyani Een Nuraenah Darwitra Evi Zahara
UNIT / LEMBAGA	: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
TEMPAT PENELITIAN	: Laboratorium Biomedik dan Farmakologi Universitas Brawijaya Malang.

#### DINYATAKAN LAIK ETIK.



07 DEC 2017

Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr.H.  
NIK. 160746683

#### Catatan :

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan  
Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diberikan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Armandemen 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) 5516111 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 : 184 /LN10.F08.08/PN/2018

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

Judul : Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Pada Masa Pre sampai dengan Post Hatching Terhadap Panjang Badan, Catalase dan Malondialdehyde Larva Zebrafish (*Danio rerio*) Stunting.  
Penulis : Darwiti  
NIM : 166070400111003  
Jumlah Halaman: 85  
Jenis Artikel : Tesis (Program Studi Magister Kebidanan )  
Kemiripan : 2%

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

12 APR 2018

Ketua Badan Penerbitan Jurnal,

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

Lampiran 3 B  
Universitas Brawijaya

**kti Accepted Jurnal**

Universitas Brawijaya



## ACCEPTANCE LETTER

Biomedical & Pharmacology Journal

Published by ORIENTAL SCIENTIFIC PUBLISHING CO.

#### **Country Addresses**

54, Near Post Office, Iman Street,  
Shahjahanabad, Bhopal - 462 001, INDIA.  
Contact No.: +91-9833809167, 9993222456  
E-mail : micro\_drkhan@yahoo.com

Dr. S.A. Tqbal

S.R.O. RP1/2025/1B  
M/s. Receiver on 10/04/2018

HUSNUL KHOTIMAH

Dear Dr. HONGKI KOTJAHAN  
Laboratory of Pharmacology,  
Medical Faculty, Brawijaya University,  
Indonesia

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

has been accepted for publication in BIOMEDICAL & PHARMACOLOGY JOURNAL Vol ..... 11  
No. .... 2 ..... 21-18

(3) To expedite the process of publication please send your subscription charges and of your co-authors subscription charges ..... **DARWITRI, TRI YULIYANTI, EEN NURAENAH,** .....  
..... **EVI ZAHARA, UMI KALSUM, NURDIANA, MOHAMMAD MULJOKA**

Datec ..... 16-05-2018

For : Executive Editor/Publisher

Authoritative Business Law

**Lampiran 4 Determinasi Tanaman Pegagan**

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

Nomor	:	074 / 014 /B/ 101.8 / 2013
Sifat	:	Biasa
Perihal	:	<u>Determinasi Tanaman Pegagan</u>
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	:	<i>Centella asiatica</i> ( Linn ). Urban
Sinonim	:	<i>Hydrocotyle asiatica</i> Linn. = <i>Pasequinus</i> , Rumph.
Pegagan, Gagan-gagan, Rendeng, Kerok batok (Jawa); Daun kaki kuda (Indonesia). Pegaga (Ujung Pandang); Antanan gede, Antanan rambat (Sunda). Dau tungke (Bugis); Kos tekosan (Madura), Kori-kori (Halmahera)		
Kunci determinasi : 1b -2b - 3b - 4b- 6b- 7b- 9b-10b- 11b - 12b - 13b-14b – 16a-239b- 243b- 244b-248b- 249b-250b-266b-267a- 268a -269a- 2b- 3		
2. Morfologi	:	Pegagan merupakan terna menahun tanpa batang, tetapi dengan rimpang pendek dan stolon-stolon yang merayap dengan panjang 10 cm - 80 cm, akar keluar dari setiap bonggol, banyak bercabang yang membentuk tumbuhan baru. Helai daun tunggal, bertangkai panjang sekitar 5 cm - 15 cm berbentuk ginjal. Tepinya bergerigi atau beringgit, dengan penampang 1 cm - 7 cm tersusun dalam roset yang terdiri atas 2 - 10 helai daun, beringgit-kadang agak berambut. Bunga berwarna putih atau merah muda, tersusun dalam karangan berupa payung, tunggal atau 3-5 bersama-sama keluar dari ketiak daun. Tangkai bunga 5 mm - 50 mm. Buah kecil bergantung yang bentuknya lonjong/pipih panjang 2 - 2,5 mm, baunya wangi dan rasanya pahit.
3. Nama Simpilisasi	:	Centellae Folium/ daun pegagan
4. Kandungan kimia	:	Asiaticoside, thankuniside, isothankuniside, madecassoside, brahmoside, brahminoside, brahmic acid, madasiatic acid, meso-inositol, centellose, carotenoids, garam-garam mineral seperti garam kalium, natrium, magnesium, kalsium, besi, vellarine, zat samak. Senyawaan glikosida triterpenoida yang disebut asiaticoside dan senyawaan sejenis, mempunyai kastat anti lepra (Morbus Hansen). Daun kaki kuda mengandung senyawa glikosida trigegerpenoida, alkaloid hidrokotolin, steroid, tanin, minyak atsiri, gula pereduksi dan garam-garam mineral seperti garam-garam mineral seperti garam kalium, natrium, magnesium, kalsium dan besi
5. Penggunaan	:	Penelitian
6. Daftar Pustaka	:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anonim, <i>Materia Medica Indonesia " Jilid 1 "</i> , 1977,Departemen Kesehatan Republik Indonesia</li> <li>- Anonim , <i>Serial Tanaman Obat " PEGAGAN "</i> , 2007, Badan POM Republik Indonesia</li> <li>- Anonim , <a href="http://www.ipacknet.co.id/pegagan">http://www.ipacknet.co.id/pegagan</a>, diakses tanggal 29 oktober 2010</li> <li>- Steenis,C.G.G.J Van Dr. , <i>FLORA</i> , 2008, Pradnya Paramita . Jakarta</li> <li>- Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johny Ria 1991, <i>Inventaris Tanaman Obat Indonesia 1</i> , Departemen Kesehatan Republik Indonesia - Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan</li> </ul>

Demikian determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagai rujukan mestinya.

Batu, 1 Oktober 2018.  
 Kepala UPT Materia Medica Batu  
  
 Drs. Herry RM, Apt, MKy,  
 NIP. 19611402 199105 1 001



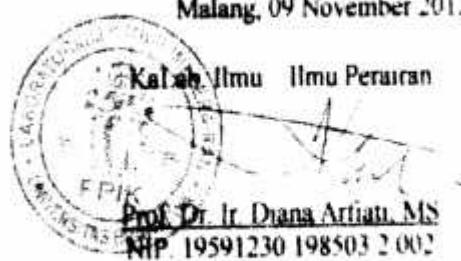
**KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
JL. VETERAN TELP. (0341) 575838 MALANG 65145**

## LAPORAN HASIL ANALISA

NO : 02/LAB-IP/HA/FPIK/2012

- |                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| 1. Data Konsumen :                    |   |
| Nama Konsumen                         | Husnul Khotimah S.Si, M.Kes                                 |
| Instansi                              | Program Doktor Fakultas Kedokteran<br>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                           | <i>Danio rerio</i>  |
| Warna                                 | Kuning strip hitam  |
| 4. Prosedur Analisa                   | Dari Lab. Ilmu – Ilmu Perairan FPIK UB                      |
| 5. Penyampaian Laporan Hasil Analisis | Dikirim sendiri   |
| 6. Tanggal Terima Sampel              | 05 November 2012  |
| 7. Analis                             | Nuriyani  |
| 8. Data Hasil Analisa                 | terlampir pada buku kerja                                   |

Malang, 09 November 2012



## Lampiran 6 Dokumentasi Penelitian

### Laboratorium Farmakologi (Hewan Coba Zebrafish)



### Pemeliharaan Ikan



### Ekstraksi Pegagan



## Pembuatan Embrionik Medium



## Pembuatan Larutan Rotenon dan Pegagan

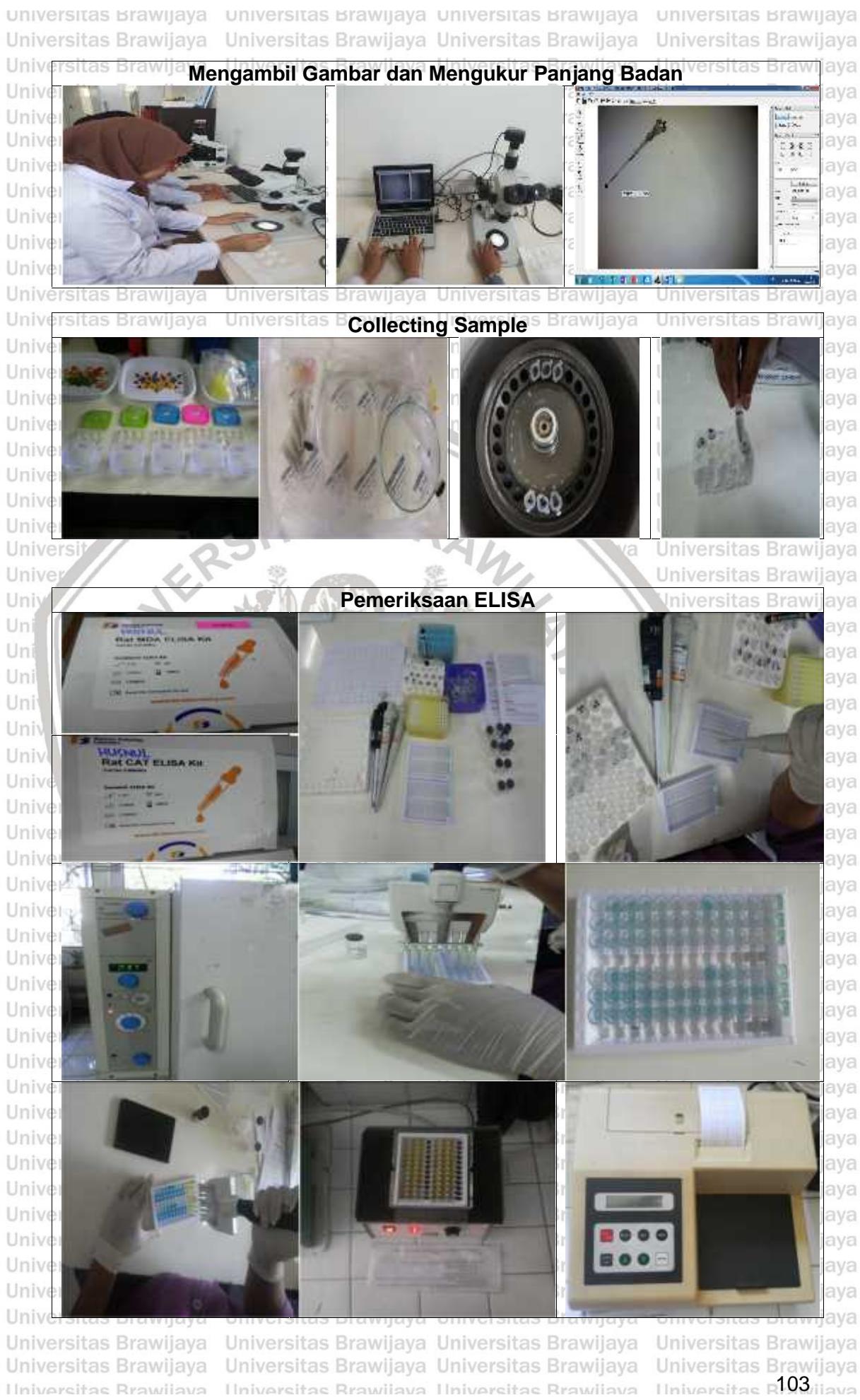


## **Peneluran Ikan**



Identifikasi Telur, Perlakuan, dan Menempatkan Telur dalam Inkubator





**Lampiran 7 Data Panjang Badan****Data Panjang Badan larva Zebrafish Usia 3 dfp**

Nomor Sampel	Kelompok				
	Kontrol	Rotenon	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
1	3,35	3,20	3,32	3,40	3,38
2	3,34	3,33	3,29	3,34	3,25
3	3,32	3,36	3,35	3,27	3,33
4	3,18	3,36	3,33	3,33	3,34
5	3,37	3,33	3,43	3,38	3,24
6	3,42	3,24	3,31	3,25	3,26
7	3,44	3,22	3,40	3,24	3,31
8	3,31	3,26	3,33	3,39	3,41
9	3,38	3,34	3,38	3,39	3,41
10	3,36	3,36	3,34	3,41	3,44
11	3,50	3,45	3,49	3,43	3,47
12	3,34	3,40	3,49	3,46	3,39
13	3,38	3,32	3,44	3,38	3,47
14	3,46	3,34	3,40	3,50	3,44
15	3,30	3,38	3,43	3,45	3,42
16	3,46	3,38	3,33	3,43	3,42
17	3,35	3,37	3,38	3,48	3,45
18	3,38	3,29	3,44	3,45	3,46
19	3,46	3,35	3,40	3,38	3,37
20	3,40	3,48	3,35	3,42	3,37
21	3,35	3,53	3,43	3,36	3,39
22	3,48	3,26	3,44	3,48	3,40
23	3,41	3,45	3,47	3,44	3,40
24	3,49	3,44	3,45	3,34	3,39
25	3,39	3,39	3,44	3,35	3,38
26	3,39	3,36	3,43	3,41	3,40
27	3,53	3,36	3,31	3,38	3,40
28	3,41	3,43	3,47	3,36	3,42
29	3,42	3,40	3,47	3,47	3,40
30	3,55	3,49	3,39	3,40	3,44

**Data Panjang Badan larva Zebrafish Usia 4 dpf**

Nomor Sampel	Kelompok				
	Kontrol	Rotenon	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
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

### Data Panjang Badan larva Zebrafish Usia 5 dpf

<b>Nomor Sampel</b>	<b>Kelompok</b>				
	<b>Kontrol</b>	<b>Rotenon</b>	<b>Perlakuan 1</b>	<b>Perlakuan 2</b>	<b>Perlakuan 3</b>
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	3,70
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	3,70	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	3,70	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

**Data Panjang Badan larva Zebrafish Usia 6 dpf**

Nomor Sampel	Kelompok				
	Kontrol	Rotenon	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
1	3,88	3,67	3,80	3,84	3,86
2	3,75	3,69	3,72	3,70	4,00
3	3,79	3,54	3,79	3,87	3,71
4	3,90	3,63	3,78	3,85	3,75
5	3,78	3,60	3,68	3,81	3,72
6	3,88	3,73	3,74	3,75	3,76
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

**Lampiran 8 Data Kadar Catalase dan Malondialdehyde**

Kelompok Sampel	Nomor Sampel	Kadar MDA (nmol/ml)	Kadar Catalase (ng/ml)
Kontrol	1	3,986	26,390
	2	6,014	25,708
	3	6,689	25,456
	4	3,311	23,609
	5	5,338	24,717
Rotenon	1	11,419	18,710
	2	12,095	19,207
	3	16,149	18,588
	4	14,122	18,895
	5	18,176	18,406
Perlakuan 1	1	12,095	20,846
	2	12,770	22,551
	3	8,041	23,149
	4	6,689	21,682
	5	7,365	23,455
Perlakuan 2	1	6,014	25,540
	2	5,338	24,077
	3	7,365	22,923
	4	6,689	22,403
	5	10,068	25,207
Perlakuan 3	1	10,743	24,156
	2	8,041	23,532
	3	7,365	24,798
	4	6,689	25,207
	5	6,014	21,967

## Lampiran 9 Hasil Analisis Statistik

## 1. Perbandingan Panjang Badan Usia 3 dpf dengan ANOVA

## A. Asumsi Normalitas

## Tests of Normality

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for PB_3dpf	.080	150	.021	.988	150	.201

#### a. Lilliefors Significance Correction

## B. Asumsi Homogenitas

## Test of Homogeneity of Variances

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

## C. ANOVA

## ANOVA

Panjang Badan 3 df					
	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 dfp						
LSD						
(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Rotenon	.03500	.01769	.050	.0000	.0700
	P1	-.00033	.01769	.985	-.0353	.0346
	P2	.00500	.01769	.778	-.0300	.0400
	P3	.00900	.01769	.612	-.0260	.0440
Rotenon	Kontrol	-.03500	.01769	.050	-.0700	.0000
	P1	-.03533	.01769	.048	-.0703	-.0004
	P2	-.03000	.01769	.092	-.0650	.0050
	P3	-.02600	.01769	.144	-.0610	.0090
P1	Kontrol	.00033	.01769	.985	-.0346	.0353
	Rotenon	.03533	.01769	.048	.0004	.0703
	P2	.00533	.01769	.763	-.0296	.0403
	P3	.00933	.01769	.599	-.0256	.0443

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

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

## 2. Perbandingan Panjang Badan Usia 6 dpf dengan ANOVA

### A. Asumsi Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for PB_6dpf	.046	150	.200	.986	150	.138

a. Lilliefors Significance Correction

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

### B. Asumsi 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 LSD****Multiple Comparisons**Panjang Badan 6 dfp  
LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Rotenon	.16933*	.01946	.000	.1309	.2078
	P1	.02567	.01946	.189	-.0128	.0641
	P2	-.00400	.01946	.837	-.0425	.0345
	P3	.02100	.01946	.282	-.0175	.0595
Rotenon	Kontrol	-.16933	.01946	.000	-.2078	-.1309
	P1	-.14367	.01946	.000	-.1821	-.1052
	P2	-.17333	.01946	.000	-.2118	-.1349
	P3	-.14833	.01946	.000	-.1868	-.1099
P1	Kontrol	-.02567	.01946	.189	-.0641	.0128
	Rotenon	.14367	.01946	.000	.1052	.1821
	P2	-.02967	.01946	.130	-.0681	.0088
	P3	-.00467	.01946	.811	-.0431	.0338
P2	Kontrol	.00400	.01946	.837	-.0345	.0425
	Rotenon	.17333	.01946	.000	.1349	.2118
	P1	.02967	.01946	.130	-.0088	.0681
	P3	.02500	.01946	.201	-.0135	.0635
P3	Kontrol	-.02100	.01946	.282	-.0595	.0175
	Rotenon	.14833	.01946	.000	.1099	.1868
	P1	.00467	.01946	.811	-.0338	.0431
	P2	-.02500	.01946	.201	-.0635	.0135

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

**3. Perbandingan Kadar Catalase dengan ANOVA****A. Asumsi Normalitas****Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for Catalase	.094	25	.200*	.953	25	.289

a. Lilliefors Significance Correction

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

**B. Asumsi Homogenitas****Test of Homogeneity of Variances**

Catalase

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.872	4	20	.155

universitas brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya  
 universitas brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya  
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya  
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya  
 Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya

### C. ANOVA

Kadar Catalase

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	124.776	4	31.194	26.581	.000
Within Groups	23.471	20	1.174		
Total	148.247	24			

### D. Post Hoc LSD

Kadar Catalase  
LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Rotenon	6.414800*	.685145	.000	4.98561	7.84399
	P1	2.839400*	.685145	.001	1.41021	4.26859
	P2	1.146000	.685145	.110	-.28319	2.57519
	P3	1.244000	.685145	.084	-.18519	2.67319
Rotenon	Kontrol	-6.414800*	.685145	.000	-7.84399	-4.98561
	P1	-3.575400*	.685145	.000	-5.00459	-2.14621
	P2	-5.268800*	.685145	.000	-6.69799	-3.83961
	P3	-5.170800*	.685145	.000	-6.59999	-3.74161
P1	Kontrol	-2.839400*	.685145	.001	-4.26859	-1.41021
	Rotenon	3.575400*	.685145	.000	2.14621	5.00459
	P2	-1.693400*	.685145	.023	-3.12259	-.26421
	P3	-1.595400*	.685145	.030	-3.02459	-.16621
P2	Kontrol	-1.146000	.685145	.110	-2.57519	.28319
	Rotenon	5.268800*	.685145	.000	3.83961	6.69799
	P1	1.693400*	.685145	.023	.26421	3.12259
	P3	.098000	.685145	.888	-1.33119	1.52719
P3	Kontrol	-1.244000	.685145	.084	-2.67319	.18519
	Rotenon	5.170800*	.685145	.000	3.74161	6.59999
	P1	1.595400*	.685145	.030	.16621	3.02459
	P2	-.098000	.685145	.888	-1.52719	1.33119

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

### 4. Perbandingan Kadar MDA dengan ANOVA

#### A. Asumsi Normalitas

##### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for MDA	.144	25	.196	.935	25	.112

a. Lilliefors Significance Correction

**B. Asumsi Homogenitas****Test of Homogeneity of Variances**

Kadar MDA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.747	4	20	.179

**C. ANOVA****ANOVA**

Kadar MDA

Universitas Brawijaya	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 LSD****Multiple Comparisons**Kadar MDA  
LSD

(I) Kelompok	(J) 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
	P1	-4.324400	1.400460	.006	-7.24571	-1.40309
	P2	-2.027200	1.400460	.163	-4.94851	.89411
	P3	-2.702800	1.400460	.068	-5.62411	.21851
Rotenon	Kontrol	9.324600	1.400460	.000	6.40329	12.24591
	P1	5.000200	1.400460	.002	2.07889	7.92151
	P2	7.297400	1.400460	.000	4.37609	10.21871
	P3	6.621800	1.400460	.000	3.70049	9.54311
P1	Kontrol	4.324400	1.400460	.006	1.40309	7.24571
	Rotenon	-5.000200	1.400460	.002	-7.92151	-2.07889
	P2	2.297200	1.400460	.117	-6.2411	5.21851
	P3	1.621600	1.400460	.261	-1.29971	4.54291
P2	Kontrol	2.027200	1.400460	.163	-.89411	4.94851
	Rotenon	-7.297400	1.400460	.000	-10.21871	-4.37609
	P1	-2.297200	1.400460	.117	-5.21851	.62411
	P3	-.675600	1.400460	.635	-3.59691	2.24571
P3	Kontrol	2.702800	1.400460	.068	-.21851	5.62411
	Rotenon	-6.621800	1.400460	.000	-9.54311	-3.70049
	P1	-1.621600	1.400460	.261	-4.54291	1.29971
	P2	.675600	1.400460	.635	-2.24571	3.59691

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

## 5. Analisis Korelasi

### A. Hubungan Lama Pemberian Pegagan dengan Panjang Badan

Correlations

		Lama Pegagan	Panjang Badan 6 dpf
Lama Pegagan	Pearson Correlation	1	.636**
	Sig. (1-tailed)		.000
	N	120	120
Panjang Badan 6 dpf	Pearson Correlation	.636**	1
	Sig. (1-tailed)	.000	
	N	120	120

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

### B. Hubungan Lama Pemberian Pegagan dengan Kadar Catalase

Correlations

		Lama Pegagan	Kadar Catalase
Lama Pegagan	Pearson Correlation	1	.895**
	Sig. (1-tailed)		.000
	N	20	20
Kadar Catalase	Pearson Correlation	.895**	1
	Sig. (1-tailed)	.000	
	N	20	20

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

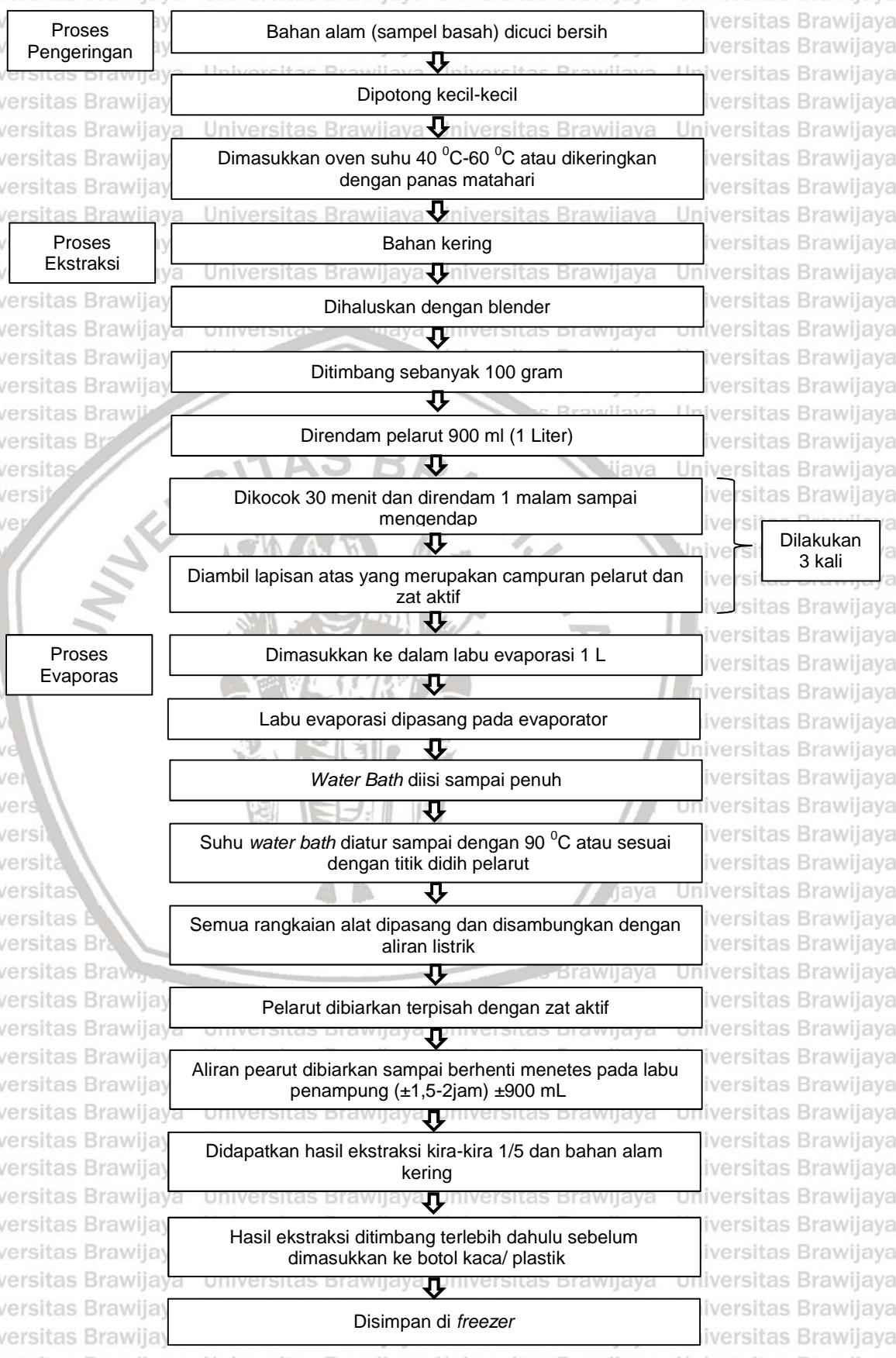
### C. Hubungan Lama Pemberian Pegagan dengan Kadar MDA

Correlations

		Lama Pegagan	Kadar MDA
Lama 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).

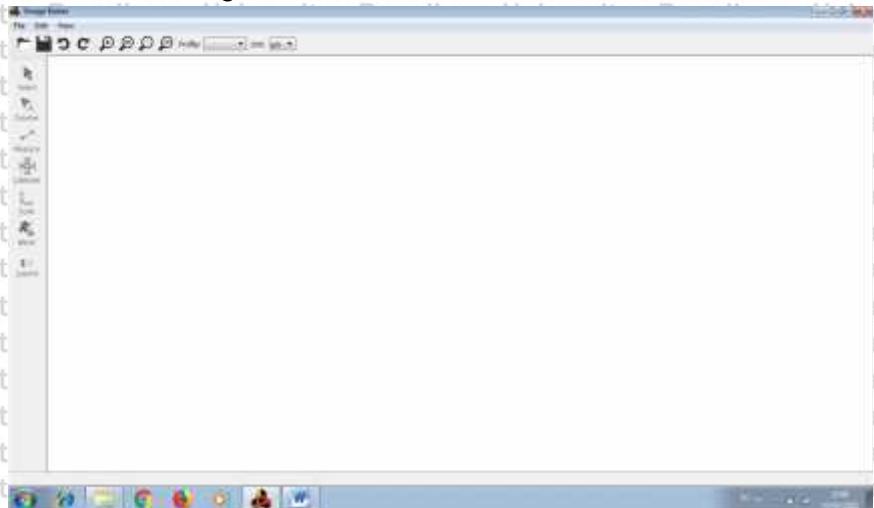
## Lampiran 10 Diagram Alur Ekstraksi Pegagan



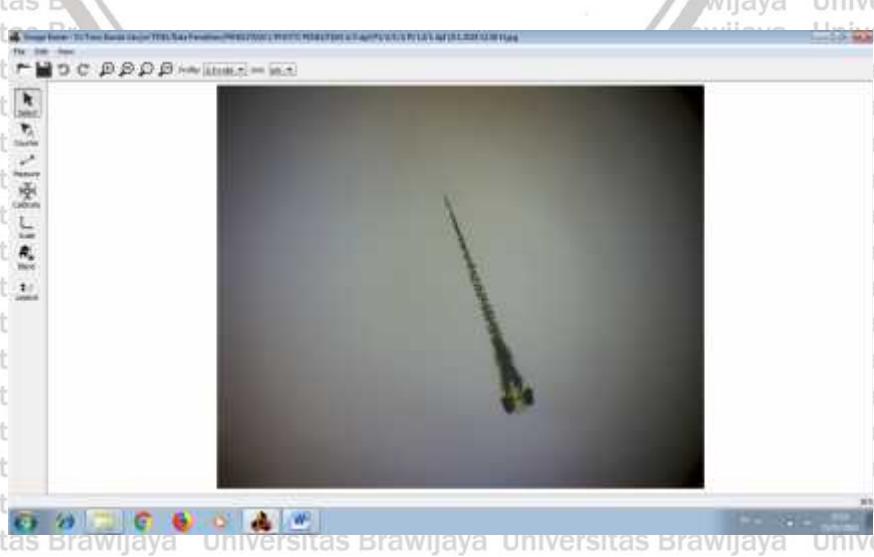
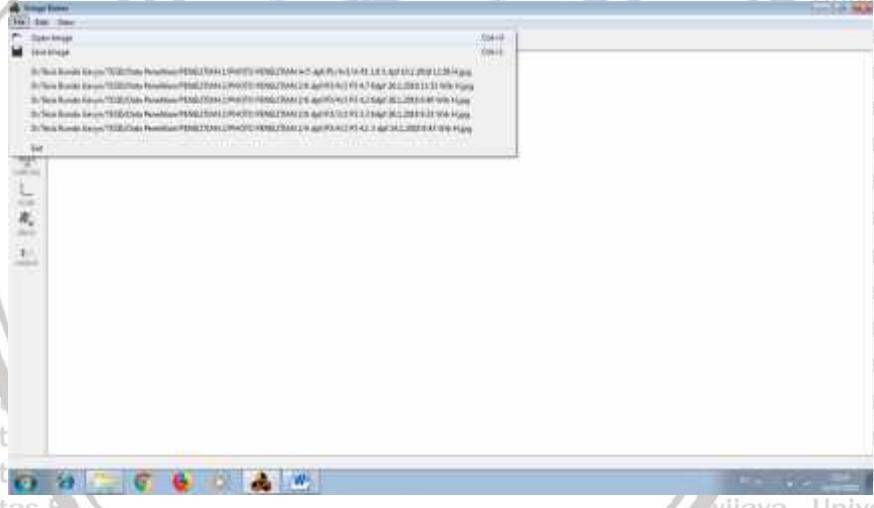
**Lampiran 11 Diagram Alur Prosedur ELISA**

## Lampiran 12 Cara Menggunakan Software Image Raster

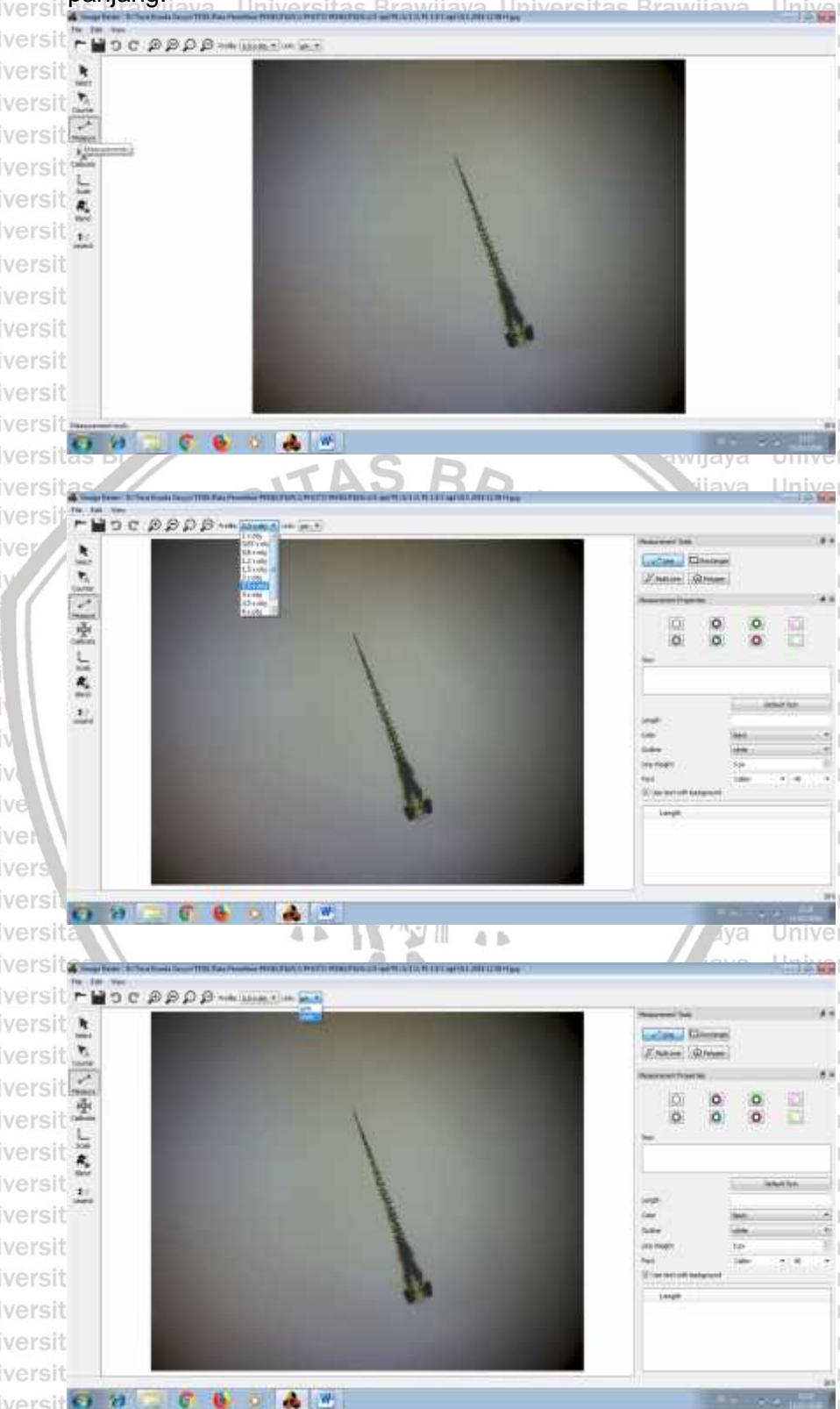
1. Buka laman image rasters



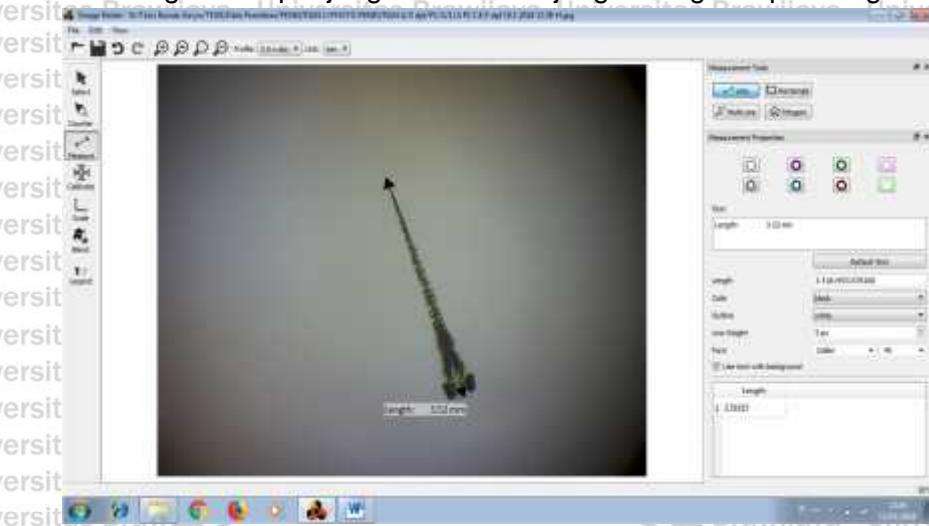
2. Buka gambar hasil foto zebrafish yang akan diukur panjangnya dengan klik menu open hingga muncul objek yang akan diukur



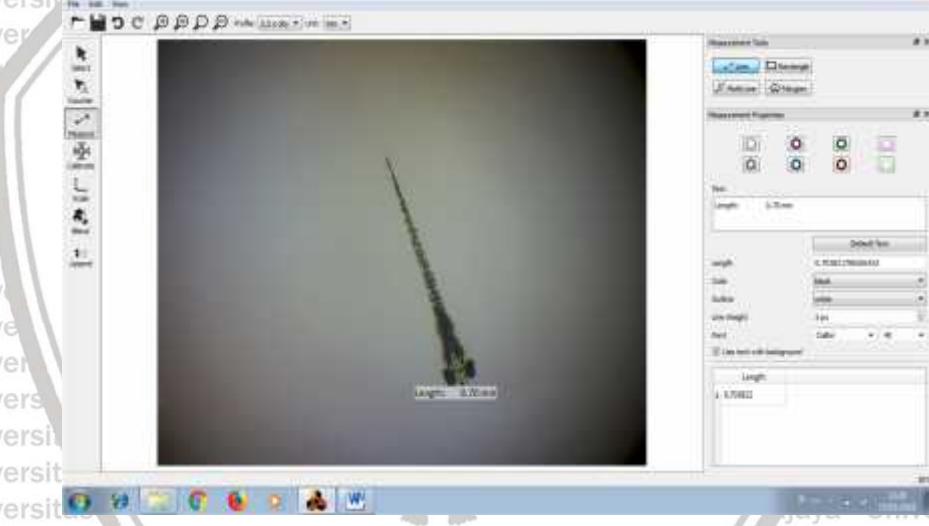
3. Klik Measure pada sisi kiri laman, muncul cara pengukuran pada sisi kanan, sesuaikan dengan skala pada mikroskop serta sesuaikan satuan ukuran panjang.



4. Ukur panjang badan sesuai prosedur penelitian  
a. Pengukuran panjang badan dari ujung hidung sampai dengan sirip ekor.



- b. Pengukuran panjang kepala dari ujung hidung sampai operkulum.



**RIWAYAT HIDUP**

Darwitri, lahir di Medan 05 Mei 1984. Anak ketiga dari tiga bersaudara, putri dari Bapak Jasli (Alm) dan Ibu Irma Zarni. Lulus SD Negeri 035 Tiga Alua tahun 1996, lulus SLTP Negeri 4 IV Angkat Candung tahun 1999 dan lulus SMU Negeri 1 Bangkinang Tahun 2002. Tahun 2002 melanjutkan pendidikan D III Kebidanan di Politeknik Kesehatan Pekanbaru, lulus tahun 2005. Melanjutkan pendidikan D IV Bidan Pendidik tahun 2010 di Universitas Padjadjaran, lulus tahun 2011. Pada tahun 2016 mengambil pendidikan Program Studi Magister Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tahun 2006 sampai sekarang penulis bekerja sebagai dosen di Program Studi Kebidanan Politeknik Kesehatan Kemenkes Tanjungpinang.

