

PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP LOKOMOTOR, OSIFIKASI TULANG KERAS, EKSPRESI SIRTUIN 1 (SIRT1), DAN APOPTOSIS LARVA ZEBRAFISH YANG DIPAPAR ALUMINIUM

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



OLEH:

RIZKY FEBRIYANTI SUPRIADI

176070400111021

**PROGRAM STUDI MAGISTER KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

TESIS

PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP LOKOMOTOR, OSIFIKASI TULANG KERAS, EKSPRESI SIRTUIN 1 (SIRT1), DAN APOPTOSIS LARVA ZEBRAFISH YANG DIPAPAR ALUMINIUM

OLEH:
RIZKY FEBRIYANTI SUPRIADI
176070400111021

Dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 25 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PEMBIMBING



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



Prof. Dr. dr. Mohammad Muljohadi Ali, Sp. FK
NIK. 171047692
Anggota

Malang, 02 AUG 2019

Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,



Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med, SpA(K)
NIP. 197307262005011008

TESIS

PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP LOKOMOTOR, OSIFIKASI TULANG KERAS, EKSPRESI SIRTUIN 1 (SIRT1), DAN APOPTOSIS LARVA ZEBRAFISH YANG DIPAPAR ALUMINIUM

OLEH:
RIZKY FEBRIYANTI SUPRIADI
176070400111021

Dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 25 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PENGUJI



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



Prof. Dr. dr. Mohammad Muljohadi Ali, Sp. FK
NIK. 171047692
Anggota Penguji



Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med, SpA(K)
NIP. 197307262005011008
Anggota Penguji



Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc
NIP. 195502011985032001
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, 25 Juli 2019

Mahasiswa,



Nama : Rizky Febriyanti Supriadi
NIM : 176070400111021
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran UB

RINGKASAN

Rizky Febriyanti Supriadi

Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Lokomotor, Osifikasi Tulang Keras, Ekspresi Sirtuin 1 (SIRT1), dan Apoptosis Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium. Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Ketua Komisi Pembimbing: Dr. dr. Nurdiana, M.Kes; Anggota Prof. Dr. dr. Mohammad Muljohadi Ali, Sp.FK.

Aluminium merupakan logam yang paling banyak terdapat di kerak bumi dan penggunaannya dalam kehidupan sehari-hari tidak terelakkan. Aluminium yang berada di lingkungan maupun bahan-bahan olahan bisa masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan maupun saluran olfaktorik dan terakumulasi di semua jaringan mamalia, terutama di ginjal, hati, jantung, tulang dan otak. Aluminium yang terakumulasi di otak dan organ lain mengakibatkan disfungsi dan toksisitas dan merupakan faktor etiologi penting dari beberapa gangguan neurodegeneratif seperti penyakit Alzheimer, Parkinson dan penyakit neurodegeneratif kronis lainnya. Aluminium juga menjadi penyebab gangguan motorik, anemia, osteomalasia dan dementia. WHO telah menetapkan nilai ambang batas kadar aluminium di dalam minuman ialah sebesar 0,2 mg/L. Aluminium yang terakumulasi di dalam tubuh secara kronis menyebabkan munculnya penyakit dan gangguan perkembangan, namun keterpaparan pada logam ini masih dianggap remeh. Aluminium masuk menyebabkan gangguan homeostasis logam dalam tubuh dan menginduksi peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) yang berlebihan. Peningkatan ROS ini mengakibatkan beberapa disfungsi dalam tubuh termasuk kematian sel atau apoptosis. Apoptosis pada sel yang berlebihan pada masa kehamilan dapat mempengaruhi proses pertumbuhan dan perkembangan. Struktur dan fungsi tubuh yang terganggu misalnya seperti gangguan osifikasi tulang dan gangguan aktivitas lokomotor. Apoptosis pada sel osteoblast menyebabkan proses osifikasi tulang menurun. Sedangkan apoptosis berlebihan terjadi pada sel dopaminergik menyebabkan gangguan pada proses lokomotor. Sirtuin 1 (SIRT1) adalah NAD⁺ kelas III *histone deacetylase independent* yang memperpanjang masa hidup sel dengan mengontrol penuaan sel, proliferasi sel, dan apoptosis sel. Sirtuin 1 bekerja dengan melakukan deasetilasi protein faktor transkripsi *forkhead box O* (FOXO), membuatnya menjadi *inactive* sehingga mencegah apoptosis sel. Pegagan adalah tanaman yang mengandung metabolit golongan triptepan dan mengandung flavonoid yang berperan sebagai antioksidan langsung atau modulator enzim yang membatasi pembentukan ROS. Tujuan penelitian ini ialah untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap lokomotor, osifikasi tulang keras, ekspresi SIRT1, dan apoptosis larva zebrafish yang dipapar aluminium. Ekstrak etanol pegagan diharapkan dapat mencegah efek aluminium menyebabkan gangguan pertumbuhan dan perkembangan yang dilihat dari fungsi lokomotor dan osifikasi tulang keras melalui peningkatan SIRT1 untuk mencegah apoptosis berlebihan.

Desain penelitian ini adalah *true experimental* dengan *post test control group design only* yang dilakukan pada larva zebrafish usia 2 *hpf* hingga 6 *dpf*. Embrio yang terpilih dikelompokkan ke dalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif tanpa perlakuan apapun, kelompok kontrol positif yang diberikan AlCl₃ 50 µM, kelompok perlakuan 1 yang diberikan AlCl₃ 50 µM dan pegagan 1,25 µg/ml, kelompok perlakuan 2 yang diberikan AlCl₃ 50 µM dan pegagan 2,5 µg/ml, dan kelompok perlakuan 3 yang diberikan AlCl₃ 50 µM dan pegagan 5 µg/ml. Paparan diberikan sejak usia 2 *hpf* dan dipertahankan hingga larva usia 3 *dpf*. Pengukuran lokomotor dilakukan pada usia 4, 5 dan 6 *dpf*. Pengukuran osifikasi tulang menggunakan pewarnaan *alizarin red* dilakukan pada usia 6 *dpf* dan dianalisis menggunakan *software ImageJ*. Pengukuran SIRT1 dilakukan pada larva usia 6 *dpf* menggunakan metode RT-PCR setelah larva dihomogenkan dan diisolasi RNA. Untuk pengukuran apoptosis dilakukan pada usia 3 *dpf* dengan pewarnaan *acridine orange* dan difoto menggunakan mikroskop fluoresens dengan filter berwarna hijau. Data yang ada dianalisis menggunakan program SPSS v.25.0 dengan uji normalitas *saphiro-wilk*, uji homogenitas menggunakan *Levene Test*, uji *one-way ANNOVA* dan uji korelasi *Pearson*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa adanya penurunan lokomotor dan osifikasi tulang pada larva zebrafish yang dipapar aluminium ditunjukkan dengan adanya perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Ekspresi SIRT1 pada larva yang dipapar aluminium juga mengalami penurunan meskipun secara statistik tidak signifikan. Apoptosis yang meningkat diamati pada larva yang dipapar aluminium pada usia 3 dpf dan berbeda signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Ada hubungan yang signifikan, sangat kuat dan searah antara osifikasi tulang dan aktivitas lokomotor larva zebrafish.

Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa aluminium dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan dan perkembangan yang dilihat dari penurunan osifikasi tulang dan penurunan aktivitas lokomotor melalui penurunan SIRT1 dan peningkatan apoptosis sel. Aluminium masuk dan secara kompetitif menggantikan posisi logam yang dibutuhkan oleh tubuh seperti besi dan kalsium dan memicu peningkatan ROS dan apoptosis. Pegagan memiliki bahan aktif yang dapat menekan produksi ROS berlebih dalam tubuh. Pegagan dengan bahan aktifnya *asiatic acid* dan *quaracetin* dapat meningkatkan ekspresi SIRT1 melalui peningkatan NAD⁺/NADH dan AMPK. *Quaracetin* juga berfungsi sebagai kelator yang dapat langsung mengikat logam sebelum memasuki sel dan dibawa untuk dieksresikan dari tubuh.

Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah penurunan lokomotor, penurunan osifikasi tulang keras, penurunan ekspresi SIRT1, dan peningkatan apoptosis larva zebrafish yang dipapar aluminium.



SUMMARY

Rizky Febriyanti Supriadi

Effect of *Centella asiatica* Ethanolic Extract on Locomotor, Bone Ossification, Sirtuin 1 Expression (SIRT1), and Apoptosis of Aluminum-Induced Zebrafish Larvae. Midwifery Masters Study Program, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. Chair of Supervisory Commission: Dr. dr. Nurdiana, M.Kes; Member: Prof. Dr. dr. Mulyohadi Ali, Sp.FK.

Aluminum is the most abundant metal in the earth's crust and its use in everyday life is inevitable. Aluminum in the environment and processed materials can enter the body through the digestive tract and olfactory tract and accumulates in all mammalian tissues, especially in the kidneys, liver, heart, bones and brain. Aluminum which accumulates in the brain and other organs results in dysfunction and toxicity and is an important etiological factor of several neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and other chronic neurodegenerative diseases. Aluminum is also a cause of motor disorders, anemia, osteomalacia and dementia. WHO has determined the threshold value of aluminum content in drinks is equal to 0.2 mg/L. Aluminum which accumulates in the body chronically causes disease and developmental disorders, but exposure to this metal is still underestimated. Aluminum entry causes a disruption of metal homeostasis in the body and induces an increase in reactive oxygen species (ROS) that resulted in several dysfunctions in the body including cell death or apoptosis. Excessive cell apoptosis during pregnancy can affect the growth and development process. The disrupted structure and function of the body, for example, is a disorder of bone ossification and impaired locomotor activity. Apoptosis in osteoblast cells causes the process of bone ossification to decrease. Whereas excessive apoptosis occurs in dopaminergic cells causing disruption in the locomotor process. Sirtuin 1 (SIRT1) is an independent NAD⁺ class III histone deacetylase that extends cell life by controlling cell aging, cell proliferation, and cell apoptosis. Sirtuin 1 works by deacetylation of the transcription factor O forkhead box (FOXO) protein, making it inactive to prevent cell apoptosis. Gotu Kola is a plant that contains a tryptophan group of metabolites and contains flavonoids which act as direct antioxidants or enzyme modulators which limit the formation of ROS. The purpose of this study was to determine the effect of *Centella asiatica* ethanol extract on locomotor, ossification, SIRT1 expression, and apoptosis of zebrafish larvae exposed to aluminum. Ethanolic extract of *Centella asiatica* is expected to prevent the effects of aluminum causing disruption of growth and development seen from locomotor function and bone ossification through increased SIRT1 to prevent excessive apoptosis.

This study design is true experimental with post test control group design only carried out on zebrafish larvae aged 2 hpf to 6 dpf. The selected embryos were grouped into 5 groups, namely the negative control group without any treatment; the positive control group given AlCl₃ 50 µM; treatment group 1, given AlCl₃ 50 µM and *Centella asiatica* 1.25 µg/ml; treatment group 2, given AlCl₃ 50 µM and *Centella asiatica* 2.5 µg/ml; and treatment group 3, given 50 µM AlCl₃ and 5 µg/ml *gotu kola*. Exposure is given since 2 hpf and is maintained until the larva is 3 dpf. Locomotor measurements were carried out at ages 4, 5 and 6 dpf. Bone ossification measurements using alizarin red was performed at 6 dpf and analyzed using ImageJ software. SIRT1 measurements were performed on 6 dpf using the RT-PCR method after the larvae were homogenized and the RNA was isolated. The measurement of apoptosis was carried out at 3 dpf with acridine orange staining and photographed using a fluorescent microscope with a green filter. The existing data were analyzed using SPSS v.25.0 program with saphiro-wilk normality test, homogeneity test, one-way ANNOVA test and Pearson correlation test.

The results showed decreased in locomotor activity and bone ossification in zebrafish larvae exposed to aluminum. This was indicated by the significant difference between the control group and the treatment group. SIRT1 expression in aluminum-exposed larvae also decreased even though it was not statistically significant. Increased apoptosis was observed in aluminum-exposed larvae at the age of 3 dpf and differed significantly between the control group and the treatment group. There is a significant and very strong relationship between bone ossification and locomotor activity of zebrafish larvae.

Based on these results it is known that aluminum can cause disruption of growth and development seen from a decrease in bone ossification and a decrease in locomotor activity through decreased SIRT1 and increased cell apoptosis. Aluminum enters and competitively replaces the metal needed by the body such as iron and calcium and triggers an increase in ROS and apoptosis. *Centella asiatica* has active ingredients that can suppress excess ROS production in the body. *Asiatic acid* and quarcetin can increase SIRT1 expression through increased NAD⁺/NADH and AMPK. Quarcetin also functions as a chelator that can directly bind metals before entering the cell or in the cell and carried to be excreted from the body.

The conclusion of this study is that ethanol extract of Pegagan (*Centella asiatica*) can prevent locomotor declined, decreased bone ossification, decreased SIRT1 expression, and increased apoptosis of zebrafish larvae exposed to aluminum.



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayat-Nya sehingga penulis dapat menyajikan tulisan tesis yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Lokomotor, Osifikasi Tulang Keras, Ekspresi Sirtuin 1 (SIRT1) dan Apoptosis Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium”.

Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi aluminium, permasalahan yang timbul akibat paparan aluminium, pertumbuhan dan perkembangan yang meliputi lokomotor, osifikasi tulang keras, Sirtuin1 (SIRT1), apoptosis, tumbuhan pegagan dan manfaatnya, dan pengaruhnya dalam pengobatan akibat paparan logam berat.

Dengan selesainya tesis ini penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR, MS selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med, SpA(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, atas izin yang diberikan selama penulis menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan selaku Penguji I yang bersedia memberi masukan dalam pelaksanaan tesis ini kedepannya.
3. 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 di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4. Dr. dr. Nurdiana, M.Kes, selaku Ketua Komisi Pembimbing yang bersedia membimbing dan memberi masukan dalam penyusunan tesis ini dan Kepala Laboratorium Farmakologi yang telah memberikan bimbingan dan masukan selama proses penyusunan tesis serta memberikan ijin dalam pelaksanaan penelitian.
5. Prof. Dr. dr. Mohammad. Muljohadi Ali, Sp.FK., selaku Anggota Pembimbing yang bersedia membimbing dalam penyusunan tesis ini.
6. Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc, selaku Penguji II yang bersedia membimbing dan memberi masukan dalam pelaksanaan tesis ini kedepannya.
7. Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes selaku Pembimbing yang telah membimbing selama proses penyusunan tesis.
8. Teman-teman Kelompok penelitian logam berat dan teman-teman Program Studi Magister Kebidanan yang telah membantu dan memberikan semangat dalam menyelesaikan tesis ini.
9. Orang tua, adik-adik dan sahabat yang selalu mendoakan dan memberikan dukungan untuk menyelesaikan tesis ini.
10. Semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung sehingga tercapainya penyelesaian tesis ini.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, oleh karena itu, penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Juli 2019

Penulis

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Klasifikasi Sistematis (Taksonomi) Pegagan	33
Tabel 2.2	Kandungan Triterpenoid dari Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	35
Tabel 2.3	Kandungan Zat Nutrisi dalam Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) ...	35
Tabel 2.4	Klasifikasi Sistematis (Taksonomi) Zebrafish	38
Tabel 2.5	Tahapan Perkembangan Zebrafish	40
Tabel 4.1	Definisi Operasional	52
Tabel 4.2	Pemberian Larutan AlCl ₃ dan Pegagan	59
Tabel 4.3	Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap Ekspresi SIRT1 Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium Klorida (AlCl ₃) Usia 6 dpf	65
Tabel 4.4	Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap Apoptosis Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium Klorida (AlCl ₃) Usia 3 dan 6 dpf	66
Tabel 4.5	Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap Osifikasi Tulang Keras Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium Klorida (AlCl ₃) Usia 9 dpf	66
Tabel 4.6	Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap Lokomotor Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium Klorida (AlCl ₃)	66
Tabel 4.7	Kekuatan dan Arah Korelasi	68
Tabel 5.1	Representasi Pola Gerakan Lokomotor dan Rerata Aktivitas Lokomotor Pada Larva Zebrafish Usia 4, 5, dan 6 dpf	71
Tabel 5.2	Representasi Hasil Pewarnaan Osifikasi Tulang Keras dan Rerata Densitas Tulang Larva Zebrafish Usia 6 dpf	75
Tabel 5.3	Representasi Kuantifikasi Hasil Gel Doc Ekspresi SIRT1 Larva Zebrafish Usia 6 dpf	78
Tabel 5.4	Hasil Uji Korelasi Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) dengan Lokomotor, Osifikasi Tulang Keras, Apoptosis Bagian Kepala dan Badan, Apoptosis Bagian Ekor Larva Zebrafish	83

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur 2 Dimensi Aluminium Klorida	9
Gambar 2.2	Jalur utama transport aluminium.....	14
Gambar 2.3	Fungsi Sirtuin 1.....	25
Gambar 2.4	Peran FoxO dan SIRT1 pada sel as.....	26
Gambar 2.5	Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	34
Gambar 2.6	Perbedaan Zebrafish Jantan dan Betina	39
Gambar 3.1	Kerangka Teori	44
Gambar 3.2	Kerangka Konsep	45
Gambar 4.1	Lingkaran Pola Lokomotor	60
Gambar 4.2	Alur Penelitian	69
Gambar 5.1	Gerakan Lokomotor Larva Zebrafish pada Seluruh Kelompok Usia 4, 5, dan 6 dpf	72
Gambar 5.2	Rerata Aktivitas Lokomotor Lokomotor Larva Zebrafish pada Seluruh Kelompok Usia 4, 5, dan 6 dpf	73
Gambar 5.3	Perbandingan Rerata Densitas Tulang Keras Larva Zebrafish pada Usia 6 dpf	76
Gambar 5.4	Hasil PCR Ekspresi SIRT1 dan β -Actin Zebrafish Usia 6 dpf	78
Gambar 5.5	Perbandingan Rerata Ekspresi SIRT1 Larva Zebrafish usia 6 dpf	79
Gambar 5.6	Apoptosis Larva Zebrafish usia 3 dpf menggunakan pewarnaan <i>Acridine Orange</i> (AO)	80
Gambar 5.7	Perbandingan Rerata Densitas Apoptosis Bagian Kepala dan Badan dan Bagian Ekor Larva Zebrafish Usia 3 dpf	81

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Surat Keterangan Kelaikan Etik	110
Lampiran 2	Surat Keterangan Bebas Plagiasi	111
Lampiran 3	Determinasi Tanaman <i>Centella asiatica</i> (Pegagan)	112
Lampiran 4	Laporan Hail Analisa Zebrafish	113
Lampiran 5	Data Aktivitas Lokomotor Larva Zebrafish Usia 4, 5, dan 6 dpf	114
Lampiran 6	Data Osifikasi Tulang Keras Larva Zebrafish Usia 6 dpf.....	115
Lampiran 7	Data Ekspresi SIRT1 Larva Zebrafish Usia 6 dpf	116
Lampiran 8	Data Apoptosis Bagian Kepala dan Badan Larva Zebrafish Usia 3 dpf	117
Lampiran 9	Data Apoptosis Bagian Ekor Larva Zebrafish Usia 3 dpf	118
Lampiran 10	Hasil Analisis Statistik Perbandingan Ekstrak Etanol Pegagan dan Aktivitas Lokomotor Usia 4, 5 dan 6 dpf	119
Lampiran 11	Hasil Analisis Statistik Perbandingan Ekstrak Etanol Pegagan dan Osifikasi Tulang Keras Usia 6 dpf	123
Lampiran 12	Hasil Analisis Statistik Perbandingan Ekstrak Etanol Pegagan dan Ekspresi SIRT1 Usia 6 dpf	125
Lampiran 13	Hasil Analisis Statistik Perbandingan Ekstrak Etanol Pegagan dan Apoptosis Bagian Kepala dan Badan Usia 3 dpf	126
Lampiran 14	Hasil Analisis Statistik Perbandingan Ekstrak Etanol Pegagan dan Apoptosis Bagian Ekor Usia 3 dpf	128
Lampiran 15	Hasil Analisis Statistik Hubungan Ekstrak Etanol Pegagan dengan aktivitas lokomotor, osifikasi tulang, ekspresi SIRT1, dan apoptosis pada Larva Zebrafish yang dipapar Aluminium	130
Lampiran 16	Publikasi Jurnal	133
Lampiran 17	Dokumentasi Penelitian	134

DAFTAR SINGKATAN

ABD	: <i>Adynamic Bone Disease</i>
Al	: Aluminium
AlCl ₃	: Aluminium Klorida
AMPK	: AMP-activated protein kinase
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
APP	: Amyloid precursor protein
BBB	: <i>Blood Brain Barrier</i>
CaM	: Calmodulin
CAT	: <i>Catalase</i>
dpf	: <i>day post fertilization</i>
Fe	: Besi
FOXO	: <i>Forkhead Box O</i>
hpf	: <i>hour post fertilization</i>
IAP	: Inhibitor Protein Apoptosis
LPO	: <i>Lipid Peroxidation</i>
MLR	: <i>Mesenphalic Locomotor Region</i>
MPT	: <i>Mitochondrial Potential Transmembrane</i>
NAD	: Nikotinamida adenine dinukleotida
PKC	: Protein Kinase C
ppb	: <i>part per billion</i>
ppm	: <i>part per million</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RS	: Sel Retikulospinal
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
SIRT1	: <i>Silent mating-type information regulation 2 homolog 1</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
SOD2	: <i>Superoxide Dismutase 2</i>
TF	: <i>Transcription Factor</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Aluminium (Al) adalah salah satu logam yang ditemukan melimpah di permukaan bumi. Logam ini terdapat di udara, air, dan tanah. Aluminium ditemukan di kerak bumi dalam bentuk bauksit dan juga bebatuan lainnya dengan produksi hingga 30 juta ton per tahunnya. Aluminium sangat reaktif sehingga sangat jarang ditemukan dalam bentuk logam bebas karena berikatan dengan unsur lainnya (Shakhashiri, 2012). Aluminium digunakan pada berbagai produk makanan, peralatan memasak, pengolahan dan pemurnian air, produk medis, dan kosmetik. Distribusi elemen yang luas ini memfasilitasi potensi paparan manusia. Aluminium yang masuk ke dalam tubuh akan terakumulasi di semua jaringan mamalia, terutama di ginjal, hati, jantung, tulang dan otak. Tulang merupakan tempat utama penyimpanan aluminium, dengan persentase sekitar 54%, diikuti oleh jaringan lunak (otot 14%, jaringan adiposa 5%, jaringan ikat 3%, jumlah keseluruhan 22%), kulit 13%, hati 3%, usus 2% dan otak 1% (Crisponi *et al.*, 2013). Telah dilaporkan bahwa aluminium yang terakumulasi di otak dan organ lain mengakibatkan disfungsi dan toksisitas. Aluminium merupakan faktor etiologi penting dari beberapa gangguan neurodegeneratif seperti penyakit Alzheimer, penyakit Parkinson dan penyakit neurodegeneratif kronis lainnya. Hal ini dibuktikan dengan ditemukan kadar aluminium yang tinggi pada penderita penyakit alzheimer (Ghorbel *et al.*, 2016; Husain *et al.*, 2016). Aluminium juga menjadi penyebab gangguan motorik, anemia, dan dementia (Crisponi *et al.*, 2013). Pada tulang, aluminium menghambat mineralisasi dan dihubungkan dengan penyakit osteomalasia (Chappard *et al.*, 2016).

Kadar aluminium yang terdapat di perairan alami biasanya mencapai $< 1,0$ mg/L (Effendi, 2003) dan *World Health Organization* (WHO) telah menetapkan nilai ambang batas kadar aluminium di dalam minuman ialah sebesar 0,2 mg/L (WHO, 2003). Aluminium yang terakumulasi di dalam tubuh selama bertahun-tahun menyebabkan munculnya penyakit dan gangguan perkembangan, namun keterpaparan pada logam ini masih dianggap remeh (Exley, 2013).

Wanita hamil berpotensi terpapar aluminium yang terkandung dalam makanan, dalam air minum dan dalam beberapa obat (Ghorbel *et al.*, 2016). Janin dan neonatus lebih rentan terhadap paparan toksik karena fungsi perlindungan tubuh yang belum sempurna, sehingga memerlukan perhatian khusus selama periode kritis sejak dalam kandungan, neonatal dan selama masa bayi. Setiap toksisitas perkembangan dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan dengan konsekuensi cacat seumur hidup; disfungsi minimal dapat berdampak negatif terhadap kualitas hidup dengan meningkatkan risiko masalah kesehatan (Dórea, 2015).

Pada perkembangan embrio, tiga lapisan pada tahap gastrulasi akan berdiferensiasi untuk membentuk organ atau sistem organ. Misalnya, pada lapisan ektoderm akan berdiferensiasi dan membentuk sistem saraf dan sensorik, lapisan mesoderm akan membentuk sistem muskuloskeletal, dan lapisan endoderm akan membentuk sistem pernafasan (Sadler, 2012). Paparan Aluminium secara kronis dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan yang dimulai ketika proliferasi dan diferensiasi, dan organogenesis sejak awal kehidupan.

Aluminium dapat masuk ke sistemik lewat saluran pencernaan, kulit, dan juga saluran olfaktorik. Aluminium akan mimikri seperti logam lain yang ada di tubuh dan berikatan dengan reseptor atau transporter untuk diedarkan di seluruh tubuh. Meskipun dikeluarkan dari dalam tubuh, aluminium yang tersisa akan tersimpan di dalam tubuh, terutama pada organ target seperti tulang, ginjal, otak, dan jantung

(Lima *et al.*, 2011; Exley, 2013). Aluminium yang masuk ini telah diamati akan meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS). Jumlah ROS yang berlebihan dapat mengaktifasi proses kematian sel seperti apoptosis (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016).

Apoptosis pada sel yang berlebihan pada masa kehamilan dapat mempengaruhi proses pertumbuhan dan perkembangan. Salah satu struktur pertumbuhan yang terhambat ialah proses osifikasi tulang keras. Apoptosis pada sel osteoblast menyebabkan proses osifikasi menurun (Cao *et al.*, 2016).

Sedangkan pada perkembangan, fungsi yang dapat terhambat ialah lokomotor karena apoptosis berlebihan terjadi di otak khususnya pada sel dopaminergik yang akan menghasilkan dopamin sebagai neurotransmitter pada proses lokomotor. Aluminium diketahui memiliki efek menurunkan lokomotor sebagai parameter perilaku pada zebrafish (Senger *et al.*, 2011).

Tubuh memiliki sistem pertahanan untuk melawan jumlah ROS yang berlebih untuk menghindari kondisi toksik. Salah satunya ialah dengan aktivasi *Silent mating-type information regulation 2 homolog 1* (sirtuin 1 atau SIRT1).

SIRT1 adalah NAD⁺ kelas III *histone deacetylase independent* yang memperpanjang masa hidup sel dengan mengontrol penuaan sel, proliferasi sel, dan apoptosis sel. Sirtuin 1 bekerja dengan melakukan deasetilasi protein faktor transkripsi *forkhead box O* (FOXO), membuatnya menjadi *inactive* sehingga mencegah apoptosis sel. FOXO juga dapat menghambat ROS dengan menginduksi produksi enzim detoksifikasi ROS seperti superoksida dismutase 2 (SOD2/MnSOD) dan katalase (Circu & Aw, 2010; Hori *et al.*, 2013). Namun pada peningkatan ROS yang berlebihan, SIRT1 dapat ditekan sehingga tubuh membutuhkan aktivator SIRT1 dari luar tubuh (Cantó dan Auwerx, 2009; Chong *et al.*, 2012).

Pegagan adalah tanaman yang mengandung metabolit golongan triptepan dan mengandung flavonoid yang berperan sebagai antioksidan langsung atau modulator enzim yang membatasi pembentukan ROS (Afiqoh *et al.*, 2017).

Pegagan juga mengandung zat gizi mikro dan makro, dan zat bioaktif seperti *triterpenoid Asiaticosida* mampu menangkal senyawa radikal bebas. Dianita, *et al.*, (2017) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak pegagan 2,5 µg/ml dan 5 µg/ml pada embrio zebrafish usia 2 *hpf* - 3 *dpf* (masa intrauterin) terbukti dapat meningkatkan panjang badan dan meningkatkan osifikasi tulang pada model *stunting* larva zebrafish yang dipapar rotenon 12,5 ppb (Xu *et al.*, 2018).

Zebrafish dipilih sebagai model penelitian, karena *zebrafish* memiliki keunggulan utama dapat memberikan informasi genetik yang mirip dengan manusia sebesar 70%, sehingga hasil-hasil penemuan dari penelitian dengan model *zebrafish* kemungkinan besar dapat diaplikasikan pada manusia (Kalueff dan Cachat, 2011; Spence, 2011; Selderslaghs *et al.*, 2013). Menurut Sorribes *et al.*, (2013) usia larva *zebrafish* dapat dianalogikan dengan usia manusia yaitu 3 *day post fertilization* (dpf) sama dengan bayi baru lahir dan 6 dpf setara dengan usia 2 tahun pada manusia.

Penelitian terdahulu yang telah dilakukan antara lain efek aluminium terhadap SIRT1 pada tikus dapat mempengaruhi memori jangka panjang (Yan *et al.*, 2017), penelitian oleh Oğuz (2012) melihat efek aluminium pada penurunan perkembangan otak melalui peningkatan ROS. Efek Aluminium pada pekerja industri ialah kehilangan koordinasi, kehilangan memori, dan masalah pada keseimbangan (Krewski *et al.*, 2007). Pereira (2013) menyebutkan dalam penelitiannya, aluminium menyebabkan dampak kerusakan pada aktivitas reparasi DNA yang lebih tinggi dibandingkan dengan kadmium. Penelitian-penelitian di atas belum spesifik pada arah pertumbuhan dan perkembangan dan tidak mengamati efek terjadi pada tahap perkembangan apa.

Penelitian ini merupakan penelitian bersama mengenai efek ekstrak pegagan terhadap paparan logam berat dengan tujuan pencegahan. Pegagan diberikan bersamaan dengan aluminium pada larva zebrafish usia 2 hpf atau pada periode blastula awal dimana belum terjadi diferensiasi organ. Dilakukan pada telur zebrafish karena telurnya transparan dan pembuahan terjadi diluar tubuh sehingga mudah diamati perkembangannya. Paparan aluminium terutama pada masa proliferasi, diferensiasi dan organogenesis dapat meningkatkan ROS berlebihan sehingga menimbulkan dampak berupa gangguan perkembangan.

Konsentrasi aluminium yang digunakan dalam penelitian ini didasarkan pada studi pendahuluan yang dilakukan sebelumnya yaitu konsentrasi 50 μM atau 0,03 ppm, dimana pada konsentrasi ini tidak ditemukan adanya kelainan morfologi atau efek teratogenik pada larva zebrafish namun telah memberikan efek pada fungsi tubuh larva zebrafish. Konsentrasi ini 7 kali lebih rendah dibandingkan dengan nilai ambang batas yang telah ditentukan. Diharapkan pegagan dapat meningkatkan ekspresi SIRT1 dan mencegah apoptosis sehingga dapat mencegah efek dari aluminium. Dalam penelitian ini variabel yang diukur untuk mewakili perkembangan ialah aktivitas lokomotor dan osifikasi tulang. Penelitian lain yang dilakukan bersama ialah melihat efek aluminium terhadap dopamin, tirosin hidroksilase, DRD1 dan DRD2, dan *heart rate*.

Berdasarkan paparan tersebut, maka peneliti ingin membuktikan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap lokomotor, osifikasi tulang keras, ekspresi SIRT1 dan apoptosis larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah penelitian adalah: “Bagaimana pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap lokomotor, osifikasi tulang keras, ekspresi SIRT1, dan apoptosis larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium?”

Sub masalah yang berdasarkan rumusan masalah di atas ialah:

1. Apakah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan aktivitas lokomotor larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium?
2. Apakah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan osifikasi tulang larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium?
3. Apakah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi SIRT1 pada larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium?
4. Apakah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah apoptosis sel larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium?
5. Apakah ada hubungan antara pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap lokomotor, osifikasi tulang keras, ekspresi SIRT1, dan apoptosis pada larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan pengaruh pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap lokomotor, osifikasi tulang keras, ekspresi Sirtuin 1 (SIRT1), dan apoptosis larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan bahwa ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan aktivitas lokomotor larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium.
2. Membuktikan bahwa ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan osifikasi tulang larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium.
3. Membuktikan bahwa ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi SIRT1 pada larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium.

4. Membuktikan bahwa ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah apoptosis sel larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium
5. Membuktikan bahwa ada hubungan antara pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap lokomotor, osifikasi tulang keras, ekspresi SIRT1, dan apoptosis pada larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Penelitian ini dapat menambah wawasan dan pemahaman tentang mekanisme terjadinya toksisitas akibat paparan aluminium efeknya terhadap perkembangan larva *zebrafish*.
2. Penelitian ini dapat memberikan wawasan lebih luas dan pemahaman akan manfaat ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dalam mengatasi toksisitas akibat paparan aluminium.
3. Penelitian ini dapat digunakan sebagai bahan rujukan penelitian lain dan mendukung teori mengenai dampak negatif akumulasi aluminium dan efek preventif oleh pegagan yang telah dilakukan sebelumnya.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Hasil penelitian dapat dipergunakan masyarakat untuk mengetahui pengaruh aluminium yang terdapat di lingkungan memiliki dampak negatif terhadap perkembangan janin dan dampak pada neurodevelopment di kemudian hari,
2. Dapat dijadikan sebagai acuan untuk pemanfaatan tanaman herbal pegagan (*Centella asiatica*) di layanan kesehatan terutama pencegahan radikal bebas.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Aluminium

Aluminium atau terkadang disebut juga aluminium (disimbolkan dengan Al) adalah salah satu unsur kimia golongan IIIA bernomor atom 13. Aluminium ialah elemen yang ditemukan paling banyak di bumi setelah oksigen dan silikon.

Aluminium sangat reaktif sehingga sangat jarang ditemukan dalam bentuk logam bebas karena berikatan dengan unsur lainnya. Aluminium ditemukan di kerak bumi dalam bentuk bauksit dan juga bebatuan lainnya dengan produksi hingga 30 juta ton per tahunnya. Senyawa aluminium yang biasanya didapatkan di bauksit antara lain $\text{Al}(\text{OH})_3$, Al_2O_3 , $\alpha\text{-AlO}(\text{OH})$, dan $\gamma\text{-AlO}(\text{OH})$ (Shakhashiri, 2012).

1.1.1 Sifat dan karakteristik Aluminium

Aluminium (Al) adalah logam berwarna putih silver yang mempunyai massa atom 26,98 gr/mol, titik lebur $660,4^\circ\text{C}$, dan titik didih 2470°C . Aluminium ialah salah satu logam hidrolisis yang kuat, secara umum tidak larut pada pH 7,0 (netral), asam ataupun alkali, dan dalam larutan anorganik atau ligan organik. Aluminium memiliki tingkat densitas yang lebih rendah dari logam baja yaitu sekitar $2,7\text{ g/cm}^3$ sehingga membuatnya lebih ringan dibandingkan dengan logam lain namun tidak mengurangi kekuatannya yaitu sekitar 700 MPa. Berkebalikan dengan sifat baja, kekuatan aluminium meningkat pada suhu rendah dan menurun pada suhu tinggi. Aluminium yang merupakan salah satu bahan non magnetik juga merupakan konduktor pada dan listrik yang sangat baik. Aluminium bersifat tahan terhadap karat karena akan bereaksi dengan udara dan membentuk oksida tipis yang melapisi dan memberi perlindungan terhadap korosi (Shakhashiri, 2012).

Aluminium klorida/Trichloroalumane (AlCl_3) adalah senyawa kimia dengan bahan utama aluminium dan klorin. Aluminium Klorida mengadopsi struktur yang

bentuk dan komposisi sebagai komponen utama aerosol baik di daerah yang berudara bersih seperti di Antartika atau daerah pusat perkembangan industri seperti di Cina. Bila 100 ng Al per m³ didapatkan terkandung dalam udara yang bersih, maka paparan aluminium melalui pernapasan normal ialah sekitar 1,4 µg per hari. Nilai ini dapat meningkat menjadi 1000 kali lipat lebih banyak pada daerah industri. Aluminium juga merupakan bahan penting dalam pembuatan antiperspirant atau deodoran, yang penggunaan yang rutin dapat meningkatkan paparan aluminium melalui rute ini (Exley, 2013).

Makanan merupakan kontributor terbesar masuknya aluminium ke dalam tubuh melalui sistem pencernaan/per oral. Jumlah aluminium yang masuk melalui makanan bervariasi dari 1 hingga 20 mg per harinya, bila tidak memperhatikan faktor yang mempengaruhi kontaminasi makanan seperti cara memasak atau peralatan memasak. Data ini juga tidak mempertimbangkan pola makan seseorang dimana beberapa produk atau jenis makanan yang ada seperti *junk food* atau makanan cepat saji dapat mempengaruhi konsumsi terhadap makanan yang terkontaminasi aluminium. Aluminium juga banyak terdapat dalam bahan makanan lain seperti suplementasi makanan seperti vitamin, atau obat-obatan. (Exley, 2013; Klotz *et al.*, 2017).

Kosmetik atau produk kecantikan untuk rambut dan tabir surya yang diaplikasikan secara topikal juga merupakan sumber paparan aluminium. Penggunaan antiperspiran dengan cara dioleskan di kulit berkontribusi dalam memaparkan aluminium sekitar 2 g di kulit setiap harinya. Penggunaan tabir surya atau *sunblock* menyumbang sekitar 5 g aluminium dalam 1 kali pengaplikasian.

Banyak produk kecantikan dan perawatan kulit lainnya yang mengandung aluminium dapat menjadi salah satu rute masuknya aluminium ke dalam tubuh karena diaplikasikan setiap hari (Exley, 2013).

Penggunaan aluminium juga diaplikasikan pada obat-obatan seperti antasida, *buffered aspirin*, sebagai adjuvant dalam vaksinasi dan penanganan alergi. Penggunaan berlebihan dan penggunaan dalam waktu yang lama tentu mempengaruhi penumpukan aluminium di dalam tubuh (Exley, 2013).

Jika muatan aluminium yang signifikan melebihi kapasitas ekskresi tubuh, kelebihanannya disimpan di berbagai jaringan, termasuk tulang, otak, hati, jantung, limpa, dan otot. Akumulasi ini menyebabkan morbiditas dan mortalitas melalui berbagai mekanisme (Bernardo, 2012).

1.1.3 Toksisitas Aluminium

Efek toksik tergantung pada jumlah logam yang dicerna, laju masuk, distribusi jaringan, konsentrasi yang dicapai, dan laju ekskresi. Mekanisme toksisitas meliputi penghambatan aktivitas enzim dan sintesis protein, perubahan fungsi asam nukleat, dan perubahan permeabilitas membran sel (Bernardo, 2012).

Aluminium menyebabkan beberapa toksisitas pada tubuh. Analisis pertama dari gambaran klinis yang terkait keracunan aluminium kronis atau akut pada manusia menunjukkan bahwa toksisitas logam terutama berefek pada sistem neurologis, pada sel-sel tulang dan pada sistem hematologis. Aluminium adalah pro-oksidan yang kuat karena pembentukan kation radikal semi-tereduksi aluminium superoksida (AlO_2^{2+}). Aktivitas pro-oksidan aluminium ini signifikan pada konsentrasi aluminium yang umumnya ditemukan di seluruh tubuh. Selain itu bukti kerusakan eksitotoksik umum terjadi pada model hewan dengan intoksikasi aluminium dan eksitotoksitas oleh aluminium berhubungan dengan penyakit neurodegeneratif manusia. Aluminium terakumulasi di daerah sensitif pada otak seperti hippocampus dan korteks frontal dan dianggap sebagai faktor yang berkontribusi dalam patogenesis penyakit tersebut. Ciri umum dari eksitotoksik yang terjadi ialah peningkatan kalsium bebas intraseluler yang konsisten misalnya

pada penyakit Alzheimer. Aluminium juga berkaitan dengan inflamasi dimana aktivitas inflamasi aluminium dimediasi melalui berbagai mekanisme termasuk aktivitasnya sebagai pro-oksidan dan mediator berbagai macam pro-inflamasi dan biomarker. Aluminium juga diketahui bersifat imunogenik sehingga sering digunakan sebagai bahan pembantu dalam vaksinasi dan terapi alergi dalam bentuk garam aluminium meskipun mekanisme aksinya belum diketahui secara pasti. Aluminium pun telah diakui sebagai mutagen, karsinogen, dan teratogen pada manusia meskipun penelitiannya lebih banyak berfokus pada tingkat sel (Crisponi *et al.*, 2013; Exley, 2013; Maya *et al.*, 2016).

Karena ditemukannya peran aluminium dalam beberapa penyakit, muncul banyak perhatian mengenai efek logam ini. Pada pasien-pasien dengan osteomalacia, telah terjadi ensefalopati dialisis yang berkaitan erat oleh endapan aluminium di otak. Konsentrasi aluminium di otak harus lebih rendah dari 2 µg/g. Peningkatan konsentrasi aluminium 10 kali lipat dilaporkan pada pasien dengan keracunan aluminium melalui penggunaan larutan hemodialisis dengan kadar aluminium yang tinggi (Bernardo, 2012).

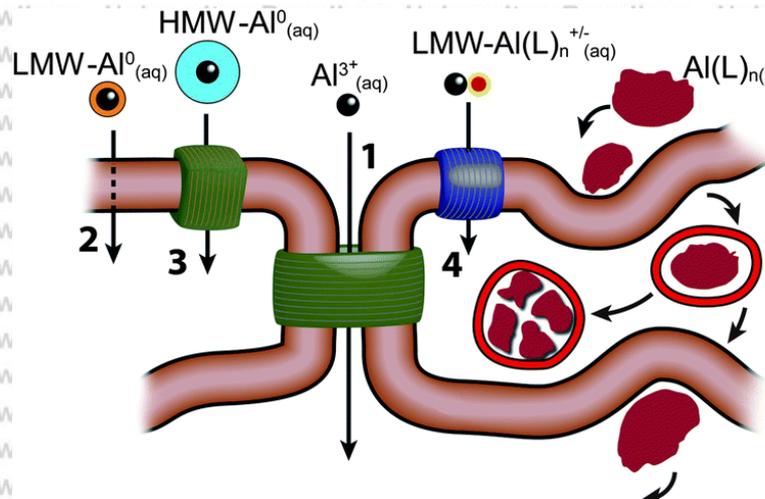
Paparan kronik aluminium dapat menyebabkan penyakit neurodegeneratif seperti Alzheimer dimana aluminium terakumulasi pada sel yang bergantung padalogam besi hingga mencapai level toksik dan mengganggu regulasi keseimbangan besi sehingga menjadi penyebab mengempisnya mikrotubulus yang akhirnya menyebabkan perubahan seperti terputusnya aferen dan eferen neuron, kehilangan fungsi dan atrofi regional (Walton, 2014). Individu yang terpapar aluminium secara kronis memiliki resiko 71% untuk menderita penyakit Alzheimer (Wang *et al.*, 2016). Selain itu aluminium menyebabkan gangguan fungsi mitokondria yang juga bertanggung jawab dalam pembentukan ROS dan gangguan sistem pertahanan antioksidan tubuh diamati pada tikus setelah paparan selama 12 minggu (Kumar *et al.*, 2008). Terjadi juga penurunan

imunoreaktivitas tirosin hidroksilase di substansia nigra pada tikus yang dipapar aluminium selama 4 bulan melalui air minum sehingga menyebabkan gangguan pada transmisi saraf dopamine dan gangguan aktivitas lokomotor yang berhubungan dengan penyakit Parkinson (Laabdar *et al.*, 2016).

Paparan aluminium secara akut pada tikus yang diberi aluminium melalui injeksi di intraperitoneal dengan dosis 50 mg/kg BB, dapat menyebabkan gangguan memori jangka pendek dan jangka panjang yang signifikan, penurunan lokomotor, penghambatan aktivitas asetilkolinesterase dan penekanan enzim antioksidan (katalase, glutathione reduktase dan glutathione peroksidase) dan glutathione. Selain itu aluminium menyebabkan peningkatan level *lipid peroxidation* di otak besar dan otak kecil (Tair *et al.*, 2016). Penelitian oleh Gouda (2018) pada tikus dengan dosis sub letal 2 mg/Kg BB menyebabkan munculnya gangguan disfungsi jantung yang jelas. Toksisitas akut pada manusia masih sangat jarang karena umumnya kerusakan yang dihasilkan luas dan tidak spesifik. Dialysis ensefalopati adalah contoh paparan aluminium secara akut pada manusia (Exley, 2016).

1.1.4 Farmakokinetik Aluminium

Kulit, hidung, paru-paru dan sistem pencernaan merupakan jalur masuk aluminium ke dalam tubuh. Untuk masuk ke dalam sel, transport aluminium melalui membran sel, sel epitel atau endotelium sel dapat diilustrasikan seperti Gambar 2.2 (Exley, 2013).



Gambar 2.2 Jalur utama transport aluminium

Keterangan: Jalur utama transport aluminium melalui membrane sel, epithelia sel atau endotelia sel. 1) paracelular, pada aluminium dengan kation trivalent terlarut bebas ($Al^{3+}_{(aq)}$); 2) transeluler, pada aluminium dengan berat molekul rendah, netral, *soluble complex* ($LMW-Al^0_{(aq)}$); 3) transport aktif, pada aluminium dengan berat molekul tinggi, netral, *soluble complex* ($HMW-Al^0_{(aq)}$); 4) channel, pada aluminium dengan berat molekul rendah, bermuatan, *soluble complex* ($LMW-Al(L)_n^{+/-}_{(aq)}$); 5) endositosis adsorptif atau dimediasi reseptor, pada aluminium partikel nano dan mikro ($Al(L)_n(s)$) (Exley, 2013).

Bagian luar epidermis dari kulit (*stratum corneum*) adalah sebuah lapisan sel yang kaya akan keratin ditahan dalam matriks interseluler dominan lipid.

Transpor aluminium yang diaplikasikan secara topikal seperti antiperspiran dan tabir surya melalui lapisan ini akan berdifusi pasif baik melalui jalur transelular atau paraselular namun hanya dalam jumlah yang kecil. Namun, *stratum corneum* yang diselingi oleh kelenjar keringat *apoeccrine* dan *eccrine* dan juga folikel rambut dapat memungkinkan aluminium mencapai epidermis, dermis dan hipodermis.

Hanya sedikit dari aluminium ini memasuki aluminium darah dan akan diekskresikan melalui ginjal, namun bukan berarti pengaplikasian aluminium secara topikal terus-menerus setiap hari secara teratur dalam jumlah yang sama tidak meninggalkan sisa aluminium baik secara local maupun sistemik (Exley, 2013).

Paparan melalui jalur pernapasan terbatas pada kelompok risiko pekerjaan tertentu dan untuk kondisi lingkungan yang keras tertentu, namun paparan melalui jalur ini efektif. Aluminium yang masuk melalui rute ini mungkin memiliki akses langsung ke otak melalui penyerapan melalui sistem penciuman dan dapat menimbulkan masalah tambahan karena tidak mengalami proses eliminasi sistemik. Ketika aluminium memasuki rongga hidung, contohnya ketika terhirup oleh aerosol antiperspirant, akan masuk ke dalam epitel pernafasan atau epitel olfaktori dan suplai neuronal ke rongga hidung. Aluminium yang mencapai epitel pernafasan akan terlarut ke dalam lapisan lendir yang melapisi epitel atau akan diangkut ke bagian belakang tenggorokan oleh silia oleh pembersihan mukosiliar yang nantinya akan memindahkan aluminium ke usus. Aluminium yang berada di lendir akan tetap berada dalam epitel pernafasan dan menjadi sumber bioavailabilitas baik lokal maupun sistemik. Epitel olfaktori pada umumnya tersambung dengan syaraf dan bulbus olfaktori yang menjadi rute pengambilan aluminium ke otak (Nayak, 2012; Exley, 2013).

Area dalam paru-paru cukup besar untuk interaksi aluminium yang terbawa udara. Saluran pernafasan dan epitel alveoli dilapisi oleh lendir yang membantu mengeluarkan aluminium dari paru-paru dan juga substrat yang dapat menangkap dan melarutkan aluminium dan mengubahnya menjadi bentuk yang labil. Epitel paru-paru beragam dalam hal komposisi jenis sel yang berbeda. Dalam epitel alveoli terdapat berbagai transpor protein dan *channel*. Sifat sangat dinamis dari epitel paru-paru ini dapat menjadi tempat akumulasi aluminium dan permukaan untuk penyerapan aluminium ke dalam jaringan paru-paru dan akses ke sirkulasi sistemik (Exley, 2013).

Aluminium yang secara langsung dimasukkan ke dalam sirkulasi, melalui obat intravena atau nutrisi parenteral, tidak mengalami hambatan distribusi di dalam tubuh dan seharusnya dihilangkan dari peredaran dengan cepat. Namun,

apabila tingkat peredaran darah aluminium tetap tinggi dapat menimbulkan ancaman terakumulasi dalam organ yang rentan dan tidak mudah dihilangkan (Nayak, 2012).

Saluran pencernaan adalah penerima langsung aluminium yang dicerna dan aluminium yang dikeluarkan dari sistem pernafasan. Sistem pencernaan merupakan lapisan sel yang menjadi pertahanan terhadap iritan dan substansi antigen tetapi juga menjadi organ dengan fungsi penting yaitu penyerapan dan sekresi. Sebagian besar senyawa Aluminium relatif tidak larut pada pH fisiologis, membatasi penyerapan Aluminium melalui saluran pencernaan atau inhalasi (hanya 0,06% hingga 0,1% diserap). Pada subyek sehat, hanya 0,3% aluminium yang diberikan secara oral diserap melalui saluran gastrointestinal (GI), dan ginjal secara efektif menghilangkan aluminium dari tubuh manusia. Penyerapan aluminium oleh usus tergantung pada spesiasi intraluminal, kuantitas intraluminal, dan ada/tidaknya ion yang bersaing, seperti zat besi dan kalsium atau zat pengompleks seperti sitrat, laktat, dan pH intraluminal. Sistem pencernaan menyajikan spektrum luas paparan lingkungan untuk aluminium, yang secara signifikan dipengaruhi oleh perbedaan pH luminal, dan dengan demikian mempermudah penyerapan aluminium, retensi dalam jaringan atau mukosa ataupun eliminasi di feses (Bernardo, 2012; Nayak, 2012; Maya *et al.*, 2016).

Aluminium masuk ke dalam sistemik melalui darah atau jaringan limfatik. Aluminium dalam darah berikatan dengan transferrin menggantikan besi dan diedarkan ke seluruh tubuh atau secara kinetik melibatkan ligan berat molekul rendah seperti sitrat dan fosfat dalam distribusi aluminium antara darah dan jaringan seperti yang dijelaskan pada Gambar 2.2. Ada banyak jalur aluminium untuk meninggalkan darah selain berikatan dengan transferrin dan mekanisme-mekanisme lain ini bertanggung jawab mengarahkan distribusi aluminium ke semua jaringan dan organ utama termasuk otak (Exley, 2013).

Beberapa data menunjukkan penumpukan aluminium di beberapa organ manusia. Pada populasi yang tidak sengaja atau tidak mengetahui bahwa diri mereka terpapar aluminium, yang menjadi penyerapan sistemik adalah paru-paru dan tulang, diikuti oleh hati, ginjal dan otak. Aluminium telah diukur dalam berbagai cairan tubuh termasuk urin, cairan serebrospinal, keringat dan cairan seminal membuktikan bahwa aluminium terdapat di seluruh jaringan tubuh meskipun tidak dalam jumlah yang homogen (Exley, 2013). Data kandungan aluminium di berbagai organ dan jaringan manusia telah dikumpulkan oleh Komisi Internasional untuk Perlindungan Radiologis (ICRP). Tulang mewakili bagian utama dari jaringan aluminium, dengan persentase sekitar 54%, diikuti oleh jaringan lunak (otot 14%, jaringan adiposa 5%, jaringan ikat 3%, jumlah keseluruhan 22%), kulit 13%, hati 3%, usus 2% dan otak 1%. Aluminium yang menumpuk di banyak jaringan manusia termasuk tulang, menyebabkan pelunakan tulang dan kehilangan massa tulang, yang mengakibatkan osteomalacia. Banyak ion logam divalen dan trivalen, termasuk aluminium, terutama tersimpan dalam tulang. Deposit di tulang mewakili reservoir untuk retensi jangka panjang dari aluminium di dalam tubuh manusia, dengan waktu paruh 10 - 20 tahun. (Crisponi *et al.*, 2013).

Aluminium dikeluarkan dari tubuh melalui feses, urin, keringat, kulit, rambut, kuku, sebum dan semen. Penyerapan aluminium di saluran pencernaan kurang dari 1% dari aluminium yang tertelan sehingga 99% diekskresikan dalam feses, namun beberapa penelitian menunjukkan hasil yang bervariasi. Begitu pula melalui urin, tidak ada rentang yang jelas mengenai jumlah aluminium yang diekskresikan. Sekitar 95% dari muatan aluminium terikat pada transferin dan albumin secara intravaskular dan kemudian dieliminasi melalui ginjal. Sebuah penelitian menunjukkan ekskresi aluminium melalui urin pada 20 individu sehat rata-rata ialah 27 µg per 24 jam. Feses dianggap sebagai rute utama ekskresi aluminium secara non sistemik sementara urin merupakan rute utama ekskresi

aluminium sistemik. Eksresi aluminium melalui keringat dianggap sebagai jalur efisien (Bernardo, 2012; Exley, 2013).

Otak merupakan salah satu target utama aluminium. *Blood Brain Barrier* (BBB) melindungi otak dari akses yang mudah oleh zat-zat yang tidak diinginkan.

Sehingga kehadiran aluminium di otak dianggap berbahaya. Masuknya aluminium di dalam otak tanpa penyebab fisiologis. Ion trivalen bebas tidak pernah dipompa melintasi membran biologis, dan unsur-unsur yang memiliki kimia trivalen biologis yang bermanfaat, seperti besi dan kobalt, umumnya dipompa ke dalam sel sebagai

ion divalent sedangkan tidak ada bentuk divalen untuk aluminium. Dengan demikian, masuknya aluminium ke otak sama sekali tidak dimaksudkan atau ditargetkan. Aluminium masuk ke otak terutama melalui transportasi yang dimediasi oleh transporter seperti transferrin dan sistem transpor aktif oleh aluminium untuk melintasi sistem membran dan memasuki otak. Aluminium menimbulkan gangguan integritas struktural BBB sehingga aluminium dapat masuk dengan cepat dan mudah. Seharusnya aluminium yang mudah masuk ke otak ini juga mudah dikeluarkan dari otak, namun ternyata aluminium bertahan dalam waktu yang cukup lama dengan waktu paruh mencapai 150 hari. Ketika aluminium masuk ke dalam cairan ekstraseluler otak, aluminium dengan mudah berinteraksi dengan kepala polar membran fosfolipid atau pindah ke dalam intraseluler sehingga mengurangi ketersediaan aluminium untuk dikeluarkan dari otak (Nayak, 2012).

1.1.5 Farmakodinamik Aluminium

Aluminium tidak memiliki peran fisiologis yang diketahui. Konsekuensi neurologis dari paparan aluminium toksik termasuk ensefalopati, kejang, degenerasi neuron motorik, Parkinson dan kematian. Regenerasi saraf termediasi yang mengakibatkan disfungsi kognitif telah dikaitkan dengan peningkatan

ekspresi protein prekursor amiloid (APP), deposisi amiloid β ($A\beta$), gangguan proyeksi kolinergik, dan kematian neuron (apoptosis) (Maya *et al.*, 2016).

Toksistas aluminium umumnya disebabkan oleh gangguan homeostasis logam seperti magnesium, kalsium, dan zat besi. Aluminium meniru fungsi biologis logam ini dan memicu banyak perubahan biokimiawi. Aluminium menggunakan genotoksitas langsung dalam sel neuron primer manusia dan menginduksi neurodegenerasi, melalui peningkatan akumulasi besi dan produksi spesies reaktif oksigen (ROS). Aluminium menginduksi neurotoksitas terutama dengan memicu stres oksidatif yang memengaruhi sejumlah besar kaskade pensinyalan dan akhirnya menyebabkan kematian sel (Maya *et al.*, 2016).

Paparan aluminium dapat mengganggu homeostasis Ca^{2+} di intraseluler. Paparan kronik aluminium menurunkan pengeluaran Ca^{2+} dari sel dengan menghambat Ca^{2+} -ATPase yang bergantung pada kalmodulin (CaM) sehingga menghasilkan akumulasi Ca^{2+} intraseluler. Selain itu, aluminium memblokir antiporter Na^+/Ca^{2+} dan meningkatkan Ca^{2+} di sitosol dan mitokondria.

Peningkatan konsentrasi Ca^{2+} intraseluler adalah salah satu peristiwa yang menyebabkan kerusakan sel. Kedua saluran gerbang Ca^{2+} yang bertegangan (*voltage-gated*) dan memiliki ligan digunakan untuk masuknya Ca^{2+} ke dalam sel ditunda penutupan salurannya oleh aluminium, sementara pelepasan Ca^{2+} dari intraseluler juga dapat menjadi sumber peningkatan Ca^{2+} intraseluler. Peningkatan metabolisme juga meningkat, peningkatan kadar Ca^{2+} dalam keadaan istirahat dan level Ca^{2+} puncak dalam sitoplasma neuron, masuknya Ca^{2+} lebih sedikit, penghambatan sederhana hidrolisis fosfatidylinositol

4,5-bisfosfat (PIP₂) oleh fosfolipase C spesifik (phosphatidylinositol spesifik C) (PI-PLC) di jalur pensinyalan fosfoinositida, menghasilkan lebih sedikit formasi Inositol trisphosphate (IP₃), lebih sedikit aktivasi Protein Kinase C (PKC), dan laju pelepasan Ca^{2+} yang lebih lambat dari sitoplasma. Aluminium juga dapat

meningkatkan masuknya Ca^{2+} dengan mempromosikan oligomerisasi protein amiloid β dan memfasilitasi penggabungan saluran ion. Perubahan kritis pada homeostasis Ca^{2+} dan pensinyalan Ca^{2+} dapat terjadi dari akumulasi aluminium yang terus menerus dalam neuron dan menyebabkan gangguan yang lebih luas (Nayak, 2012; Maya *et al.*, 2016).

Stres oksidatif adalah proses biokimia yang menghasilkan ROS dalam rantai transpor elektron. Otak dianggap paling sensitif terhadap kerusakan oksidatif karena tingginya tingkat konsumsi oksigen jaringan. Dalam beberapa penelitian ditemukan peningkatan generasi ROS selama paparan aluminium (Kumar & Gill, 2014). Waktu paruh eliminasi aluminium dari otak manusia adalah 7 tahun sehingga dapat mengakibatkan kerusakan kumulatif melalui gangguan elemen dengan transpor neurofilamen aksonal dan perakitan neurofilamen (Bernardo, 2012).

Aluminium mempercepat lipid peroksidasi (LPO) melalui reaksi fenton dan hasilnya ialah kerusakan oksidatif dengan peningkatan konsentrasi zat besi redoks aktif di otak. Reaksi Fenton adalah proses katalitik yang mengubah hidrogen peroksida, produk respirasi oksidatif mitokondria, menjadi radikal bebas hidroksil yang sangat beracun. Peningkatan radikal oksidasi dan hilangnya homeostasis seluler menyebabkan stres oksidatif yang mengarah pada neurotoksisitas. Terutama di bawah kondisi stres oksidatif, *Super Oxide Dismutase* (SOD) bertindak sebagai pertahanan lini pertama terhadap *superoxide* (O_2^-) karena mengubahnya menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) yang kemudian dikonversi menjadi H_2O oleh katalase (CAT) dan oksigen (O_2). Aluminium dapat berikatan dengan fosfolipid otak bermuatan negatif, yang tersusun dari asam lemak tak jenuh ganda dan rentan diserang oleh ROS seperti O_2^- , H_2O_2 , dan OH (Maya *et al.*, 2016).

Kerusakan oksidatif yang diinduksi aluminium terhadap protein selama stres oksidatif merupakan mediator potensial dari apoptosis dan protein dengan

sensitivitas spesifik terhadap oksidasi dapat mengatur peristiwa pensinyalan seluler, termasuk apoptosis (Kumar & Gill, 2014). Setelah memasuki mitokondria, aluminium berinteraksi dengan protein Fe-S kompleks I dan III, dan menghambat aktivitas rantai transpor elektron, menghasilkan elektron berlebih dan produksi masif ROS mitokondria. Protein Fe-S adalah kofaktor impotensi kompleks I dan III dalam rantai transpor elektron mitokondria, dan memainkan peran penting dalam sistem transpor elektron. Bentuk paling sederhana dari pusat Fe – S adalah kluster [2Fe – 2S] klasterik. Dalam beberapa protein Fe-S kompleks ini, logam lain seperti molibdenum, vanadium, atau nikel dapat menggantikan salah satu ion Fe atau dapat terdapat sebagai tambahan pada ion Fe. Proses ini disebut juga proses reaksi fenton. Ion Al dan Fe memiliki kesamaan tinggi dalam karakter kimianya, dan dalam beberapa kasus Al dapat menggantikan Fe dalam protein yang mengandung Fe dan transporter Fe. Aluminium secara langsung menghancurkan struktur atau menghentikan sintesis dan perakitan protein Fe-S. Aluminium melalui interaksi langsungnya dengan protein Fe-S, menyebabkan kerusakan kompleks I dan III, menghasilkan ledakan oksidatif mitokondria. Selanjutnya, generasi ROS secara langsung atau mungkin melalui proses mediasi lainnya, menginduksi *Mitochondrial Potential Transmembrane* (MPT), sehingga mempromosikan permeabilisasi membran dalam mitokondria dan menyebabkan pembengkakan mitokondria, pecahnya membran luar mitokondria, dan kemudian pelepasan sitokrom c yang mengaktifkan jalur caspase-3 dan akhirnya menyebabkan apoptosis (Li & Xing, 2010).

Siklus aluminium dalam tulang dimulai dengan transfer ion logam dari transferrin dalam aliran darah ke permukaan tulang, di mana aluminium menjadi melekat. Dalam tulang, ion aluminium pertama kali disimpan pada permukaan tulang, termasuk permukaan endosteal internal dan periosteal eksternal, permukaan trabekuler dan permukaan saluran pembuluh darah yang menembus

tulang padat. Selanjutnya, ion-ion aluminium dapat ditransfer ke osteoklas, sel-sel penyerap tulang berinti banyak berinti, atau tergabung dalam matriks tulang. Osteoklas telah terbukti melepaskan aluminium ke makrofag di sumsum tulang. Makrofag dapat bertindak sebagai penyimpan sementara ion aluminium, sebelum melepaskan logam atau mentransfer ion logam ke sel lain, yang memungkinkan aluminium untuk masuk kembali ke aliran darah (Crisponi *et al.*, 2013).

Ketika jumlah aluminium yang cukup menumpuk, proses pembentukan tulang terganggu dan osteodistrofi atau *Adynamic Bone Disease* (ABD) berkembang. Pasien yang terkena ABD biasanya mengalami fraktur spontan. Aluminium tidak terdeposit dalam osteoid, suatu matriks tidak termineralisasi yang mendahului pembentukan tulang dan yang meningkat pada ABD, tetapi dengan cepat bermigrasi menembusnya untuk mengendap di bagian mineralisasi, yang biasa disebut '*lamina limitans*'. Kehadiran ion aluminium di situs ini menghambat mineralisasi matriks osteoid, yang mengarah ke osteomalacia. Aluminium yang dikirim melalui transferin ke osteoblas, karena ekspresi reseptor transferin yang tinggi pada permukaannya, memberikan efek antiproliferatif pada osteoblas, diikuti oleh pergantian tulang yang rendah dan osteomalacia. Kompleks aluminium-transferin juga diambil oleh sel paratiroid, sehingga mengurangi sekresi hormon paratiroid dan hipoparatiroidisme, yang berperan penting dalam perkembangan ABD. Mekanisme aluminium mengganggu sekresi hormon paratiroid belum jelas. Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa subunit neurofilamen yang terkait sitoskeleton dan terlarut menunjukkan kerentanan yang nyata terhadap paparan aluminium. Selain itu, aluminium telah terbukti mengikat sejumlah protein granula sekretori, mengganggu proses eksositosis dan, khususnya, menghalangi pelepasan hormon paratiroid yang mengandung butiran sekretori sekretori, menyebabkan hipoparatiroidisme dan ABD (Crisponi *et al.*, 2013).

Sel-sel fungsional pembentukan tulang adalah osteoblast, dan aluminium menginduksi proses apoptosis pada osteoblas. Apoptosis diinduksi oleh peningkatan konsentrasi ion kalsium intraseluler (Ca^{2+} intraseluler). Peningkatan Ca^{2+} intraseluler memediasi apoptosis sel. Calmodulin (CaM) adalah protein pengikat Ca^{2+} kecil dan mediator utama sinyal Ca^{2+} dalam sel eukariotik. Konformasinya berubah ketika mengikat Ca^{2+} yang kemudian membentuk kompleks $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ yang memfosforilasi dan mengaktifkan *calmodulin-dependent kinase II* (CaMK-II) (Cao *et al.*, 2016).

1.2 Sirtuin1 (SIRT1)

Sirtuin (*silent mating type information regulation 2 homolog*) 1 atau disingkat dengan SIRT1 adalah suatu protein deasetilase yang tergantung pada *nicotinamide adenosine dinucleotide* (NAD), yang pada manusia dikodekan oleh gen SIRT1. SIRT1 diekspresikan di mana-mana di semua jaringan termasuk otak. SIRT1 dikenal sebagai protein *nuclear*, yang sebagian besar diekspresikan dalam neuron (Donmez & Outeiro, 2013).

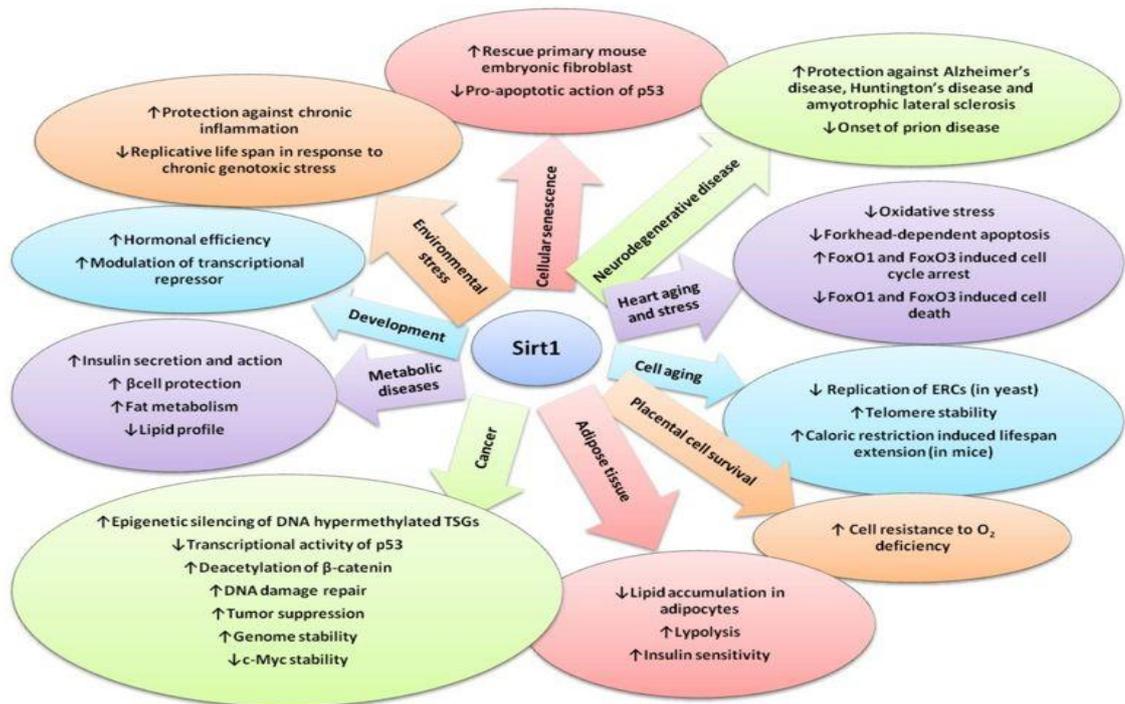
1.2.1 Fungsi SIRT1

SIRT1 adalah anggota keluarga protein sirtuin, homolog dari gen *Sir2* di *S. cerevisiae*. SIRT1 merupakan protein deasetilase histone kelas III NAD^+ yang dapat memperpanjang umur banyak organisme. SIRT1 memainkan peran kunci dalam kontrol metabolisme pada tingkat seluler, jaringan, dan seluruh tubuh melalui deasetilasi berbagai faktor transkripsi responsif-stres (TFs), *coregulator*, dan enzim. Sirtuin mengatur proses penuaan sel dan kerjanya diatur oleh pola makan dan tekanan dari lingkungan (Rahman & Islam, 2011; Chang & Guarente, 2014).

Sirtuin 1 berperan dalam metabolisme khususnya sebagai regulator homeostasis energi dalam menanggapi ketersediaan nutrisi. SIRT1 di hati

mengatur homeostasis lipid dengan secara positif mengatur reseptor yang diaktifkan proliferasi peroksisom α (PPAR α). Fungsi lain SIRT1 dalam metabolisme adalah dengan meningkatkan sensitivitas insulin, yang memiliki implikasi terhadap pertahanan tubuh pada resistensi insulin dan diabetes tipe 2 (Rahman & Islam, 2011). Sirtuin 1 memiliki peran ganda dalam pertumbuhan sel kanker, dimana SIRT1 berperan sebagai promotor tumor dan juga sebagai suppressor (Deng, 2009; Rahman & Islam, 2011). Peran SIRT1 dalam *anti-aging* sel jantung ialah dengan mengatur penuaan dan stres oksidatif di kardiomyosit dan sel endotel. Ekspresi SIRT1 yang berlebih pada tikus yang diberi paraquat melindungi tikus dari stres jantung dan apoptosis, dan menunda timbulnya disfungsi jantung karena pengaruh usia (Rahman & Islam, 2011; Hori *et al.*, 2013).

SIRT1 memiliki peran sebagai pelindung terhadap oksidatif. SIRT1 mengurangi stres oksidatif seluler secara tidak langsung melalui deasetilasi FOXO3a (deasetilasi FOXO3a mengarah ke pengaturan regulasi katalase dan MnSOD). Aktivasi SIRT1 berefek pada fungsi FoxO1 yaitu menghambat kemampuan FoxO1 dan FoxO3 untuk menginduksi kematian sel. Sehingga SIRT1 dapat meningkatkan umur panjang organisme dengan menghambat apoptosis melalui jalur FOXO (Cantó & Auwerx, 2009; Rahman & Islam, 2011; Hori *et al.*, 2013). Adapun ragam fungsi dari SIRT1 dapat dilihat dari gambaran berikut:



Gambar 2.3 Fungsi Sirtuin 1

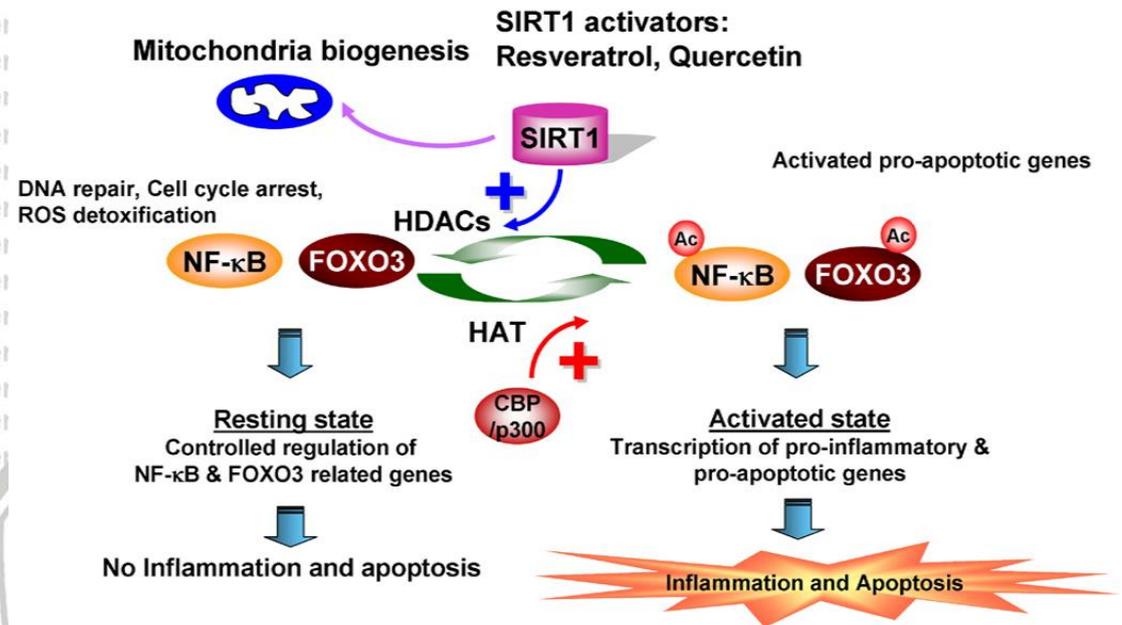
Keterangan: Aktivasi dan penghambatan banyak proses seluler oleh SIRT1. Sirtuin 1 (SIRT1) memiliki peran dalam melawan penyakit neurodegenerative, penekanan pada stres oksidatif, menekan apoptosis, penuaan sel, pertahanan sel plasenta, peningkatan sensitivitas insulin, penekanan perkembangan kanker, penyakit mebolisme, peningkatan efisiensi hormone dalam perkembangan, dan pertahanan terhadap *environmental stress* (Rahman & Islam, 2011).

1.2.2 Mekanisme

Sirtuin 1 akan diaktivasi oleh AMPK (*AMP-activated protein Kinase*) yang merupakan enzim yang mengaktifkan pengambilan glukosa dan asam lemak dan oksidasi ketika energi seluler rendah. Peningkatan level NAD⁺ dan rasio NAD⁺/NADH oleh karena aktivitas AMPK yang dirangsang melalui pemberian *activator* (contohnya resveratrol, quercetin, atau flavonoid), pembatasan kalori, dan olah raga dapat mengaktivasi SIRT1 (Ruderman *et al.*, 2010).

Sirtuin 1 mengatur berbagai proses yang mengubah respons sel terhadap genotoksisitas, termasuk detoksifikasi ROS dengan aktivasi enzim antioksidan, mekanisme perbaikan DNA (cyclin D, GADD45, p27/Kip1) dan sensitivitas sel terhadap apoptosis dengan deasetilasi dan aktivasi faktor transkripsi FOXO

(FoxO1, FoxO3a, dan FoxO4). Sirtuin 1 mengatur kemampuan FoxO3a untuk menginduksi *cell cycle arrest*, dan aktivitas SIRT1 yang tinggi meningkatkan kelangsungan hidup sel dengan mencegah apoptosis dan menuju ketahanan terhadap stres (Hori *et al.*, 2013).



Gambar 2.4 Peran FoxO dan SIRT1 pada sel

Keterangan: Faktor transkripsi FoxO mengatur pensinyalan seluler yang terlibat dalam perbaikan DNA, siklus sel, stres oksidatif, dan apoptosis. Asetilasi FoxO dikaitkan dengan aktivasi sel inflamasi dan apoptosis seluler. Inflamasi dan apoptosis dicegah melalui deasetilasi oleh SIRT1 (Hori *et al.*, 2013).

Deasetilasi FoxO1, FoxO3a dan FoxO4 oleh SIRT1, dapat merangsang ekspresi antioksidan seperti Katalase, MnSOD, SOD2 dan Trx. Sirtuin 1/FoxO adalah jalur survival yang terpelihara secara evolusioner yang mengatur respon seluler terhadap perubahan metabolik dan stres oksidatif (Chong *et al.*, 2012; Hori *et al.*, 2013; Salminen *et al.*, 2013).

1.3 Apoptosis

1.3.1 Pengertian dan Fungsi

Apoptosis adalah proses kematian sel terprogram yang terjadi pada semua organisme multiseluler. Apoptosis memberi manfaat bagi siklus hidup seluler.

Adapun fungsi apoptosis antara lain ialah (Cole & Kramer, 2016; Blanco & Blanco, 2017):

1. Pengeliminasian sel-sel yang tidak perlu atau rusak, atau sel-sel yang membawa perubahan yang membuatnya berpotensi berbahaya bagi tubuh (misal, sel-sel yang telah diserang oleh virus atau sel kanker).
2. Atrofi jaringan tertentu pada organ yang mengalami perubahan siklik yang disebabkan oleh hormon (misal, kelenjar susu pada akhir laktasi).
3. Pembuangan sel-sel dari sistem kekebalan yang tidak mencapai rekombinasi gen yang memuaskan atau yang spesifisitas antigennya membuat mereka berpotensi reaktif terhadap struktur jaringan sendiri.
4. Regresi struktur embrionik, yang seharusnya tidak bertahan dalam kehidupan pascanatal (missal pemisahan jari tangan dan kaki pada embrio manusia terjadi karena sel-sel ini apoptosis. Pada manusia, 50-70 miliar sel mati setiap hari karena apoptosis).

1.3.2 Mekanisme

Semua sel dalam tubuh manusia mengalami apoptosis atau mengganti diri dengan laju yang berbeda. Mitokondria mengendalikan apoptosis dengan menghasilkan SMACs (*small mitochondria-derived activator of caspases*) yang dilepaskan ke dalam sitoplasma seluler di mana mereka mengikat dan menghambat inhibitor protein apoptosis (IAP) dan menonaktifkannya. Setelah sel menerima rangsangan IAP, sel tersebut mengalami degradasi organel seluler oleh caspases proteolitik teraktivasi, yang mengakibatkan penyusutan sel dan organel menjadi padat. Kromatin I dalam nukleus menjadi terkondensasi dan DNA menjadi terfragmentasi. Sel pecah menjadi beberapa vesikel yang disebut tubuh apoptosis. Apoptosis terjadi cepat dan produk-produknya dengan cepat dilisis dan dihilangkan (Cole & Kramer, 2016).

Tidak semua caspase terlibat dalam apoptosis sel. Caspase 2, 8, 9, dan 10 terlibat dalam kematian sel terprogram dan berfungsi sebagai caspase inisiator.

Di sisi lain, caspase 3, 6, dan 7 berfungsi sebagai caspase efektor. Caspase 1, 4, 5, dan 12 berpartisipasi dalam pemrosesan sitokin proinflamasi, caspase 13 khusus untuk sapi dan caspase 14 hanya diekspresikan dalam jaringan embrionik (Blanco & Blanco, 2017).

Banyak penyakit yang berhubungan dengan gangguan dalam pengaturan apoptosis. Sebagai contoh, pada penyakit Alzheimer dan penyakit neurodegeneratif lainnya, apoptosis abnormal mengarah pada kerusakan neuron yang diperparah di daerah otak tertentu (Blanco & Blanco, 2017).

1.4 Lokomotor

1.4.1 Pengertian

Lokomotor adalah aktivitas gerak dengan proses perpindahan tubuh dari satu tempat ke tempat lain. Contoh gerakan lokomotor pada manusia seperti berlari, melompat, berjalan, merayap, dan lainnya (Endang, 2007; Ozmun & Gallahue, 2016). Gerakan dasar lokomotor termasuk dari gerakan dasar fundamental (*fundamental basic movement*) (Logan *et al.*, 2012; Ozmun & Gallahue, 2016).

1.4.2 Proses Lokomotor

Lokomotor adalah fungsi motorik dasar yang dihasilkan dan dikendalikan oleh jaringan saraf. Pola sinergi otot dihasilkan di sumsum tulang belakang, sedangkan pusat saraf terletak di atas sumsum tulang belakang di batang otak dan otak depan sangat penting untuk memulai dan mengendalikan gerakan lokomotor. Salah satu pusat kontrol alat gerak di batang otak adalah daerah *mesencephalic locomotor region* (MLR) (Giladi *et al.*, 2007; Le Ray *et al.*, 2011).

Beberapa Penelitian telah mempelajari mekanisme seluler di mana wilayah

lokomotor beroperasi di lamprey. Lamprey MLR adalah wilayah yang dibatasi dengan baik yang terletak di persimpangan antara otak tengah dan otak belakang. Stimulasi MLR menginduksi gerak dengan intensitas yang meningkat dengan kekuatan stimulasi. Input monosinaptik glutamatergik dan kolinergik dari MLR bertanggung jawab untuk eksitasi sel retikulospinal (RS) yang pada gilirannya mengaktifkan jaringan lokomotor tulang belakang. Stimulasi MLR di satu sisi memunculkan input rangsang simetris dalam sel RS di kedua sisi, dan ini terkait dengan proyeksi bilateral MLR ke sel RS. Akhirnya, gerbang MLR input sensorik ke batang otak melalui mekanisme muskarinik. Karena itu, MLR tidak hanya mengendalikan aktivitas alat gerak, tetapi juga menyaring gelombang masuk indra selama gerak (Le Ray *et al.*, 2011).

Bagian lokomotor mesencephalic menerima masukan dari ganglia basal, hipotalamus lateral, dan hipotalamus medial melalui materi abu-abu periaqueductal. MLR mamalia terdiri dari dua nukleus, nukleus cuneiformis (CN) dan nukleus pedunculopontine (PPN). Stimulasi listrik atau kimia MLR menginduksi serangan penggerak melalui aktivasi jalur reticulospinal (RS) (Le Ray *et al.*, 2011).

Lokomotor sangat bergantung pada sistem muskuloskeletal untuk pelaksanaannya. Tulang yang kuat dengan sambungan fleksibel dan tulang belakang sangat penting untuk pergerakan yang efektif. Otot yang kuat juga bertanggung jawab untuk mempertahankan postur yang benar dan menggerakkan tulang secara harmonis untuk menciptakan gerakan yang sempurna (Giladi *et al.*, 2007).

1.4.3 Lokomotor Pada Zebrafish

Aktivitas lokomotor larva zebrafish sangat penting untuk penelitian biomedis, *behavior*, dan modifikasi genetik. Perilaku lokomotor memainkan peran

integral dalam aktivitas makan, sosial, dan defensif ikan zebra sepanjang umurnya. Pada 18 *hour post fertilization* (hpf), kontraksi otot spontan dimulai pada embrio, dan pada 24 hpf stimulasi mekanik akan menyebabkan embrio berkedut. Dengan 48 hpf, embrio mampu melakukan respons berbalik ketika ujung ekor disentuh serta respons berenang dengan cepat ketika disentuh di kepala. Aktivitas alat gerak pada zebrafish yang kuat muncul pada 5 *day post fertilization* (dpf) (Colwill dan Creton, 2011). Penelitian oleh Thirumalai dan Cline (2008) menyatakan bahwa jarak total yang dicakup oleh larva 5 dpf jauh lebih besar daripada yang dicakup oleh larva 3 dpf.

1.5 Osifikasi Tulang

Osifikasi tulang adalah suatu proses pembentukan tulang yang meliputi kejadian perubahan proses pengerasan tulang rawan menjadi tulang sejati. Proses osifikasi pada manusia dimulai sejak dalam kandungan (fetus) hingga setelah lahir. Sedangkan perkembangan tulang panjang dapat berlanjut hingga dewasa (Djuwita *et al.*, 2012).

Perkembangan sel prekursor tulang terbagi dalam tahapan perkembangan yaitu pertama, *mesenchymal stem cells* (MSC) atau sel mesenkim dimana sel ini dapat berdiferensiasi menjadi tulang rawan dan tulang keras, dapat pula menjadi jaringan lemak yang berfungsi dalam pembentukan jaringan otot. Sel MSC ini akan menjadi Sel-sel osteoprogenitor saat berdiferensiasi, berproliferasi, mengalami pematangan pada matrik, dan mineralisasi. Salah satu sel osteoprogenitor adalah pre-osteoblas yang akan menjadi osteoblast nantinya untuk pembentukan sel tulang osteosit yang matang sebagai komponen utama tulang dewasa. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan tulang diantaranya keturunan, asupan nutrisi, hormon, dan penggunaan atau tekanan pada tulang (Scalon & Sanders, 2007)

Osifikasi tulang terdiri dari proses modeling dan remodeling terjadi sepanjang kehidupan mulai dari janin usia 6-7 minggu sampai dengan usia lanjut.

Proses pembentukan dan penyerapan mencapai keseimbangan usia 30-40 tahun, pada keadaan fisiologis keseimbangan pada wanita terganggu saat memasuki usia menopause sedangkan pada laki-laki pada usia 60 tahun, proses pembentukan tulang (osifikasi) terjadi selama masa pertumbuhan (Resnick *et al.*, 2002). Pertumbuhan tulang mencerminkan modifikasi pada struktur tulang saat pembentukan rangka, pertumbuhan dan maturasi (Morvan *et al.*, 2005).

1.5.1 Proses Osifikasi

Ada dua jenis osifikasi, yaitu osifikasi intramembran dan osifikasi endokondral. Osifikasi intramembran terjadi pada sel mesenkim yang berubah menjadi osteoblas tanpa membentuk kartilago sebelumnya. Osifikasi endokondral berkebalikan dari osifikasi intramembran dimana didahului dengan dibentuknya kartilago (Leeson *et al.*, 1996; Kanczler & Oreffo, 2008). Pada proses osifikasi intramembran contohnya pada pembentukan tulang pipih pada kepala, sel mesenkim berproliferasi pada jaringan penghubung embrionik membentuk kepadatan sel atau pusat osifikasi utama pada daerah dengan aliran pembuluh darah dengan suplai oksigen yang tinggi. Sel ini kemudian mensintesis matriks tulang di daerah perifer dan berdiferensiasi menjadi osteoblas. Hal ini berulang kemudian, tulang kembali terbentuk dan diganti hingga membentuk tulang dewasa yang matang. Selain itu, hampir semua sel tulang lain terbentuk dengan proses osifikasi endokondral yang terjadi secara tidak langsung (didahului pembentukan kartilago) seperti misalnya pada pembentukan tulang panjang. Kartilago yang terbentuk akan meluas setelah proliferasi kondrosit dan mengerasnya matriks kartilago hingga menjadi pusat osifikasi utama, tempat terjadinya proses penulangan untuk pertama kalinya. Kondrosit pada daerah tengah kartilago

mengalami pematangan menjadi hypertropic kondrosit. Kartilago digantikan terus menerus hingga menjadi tulang dewasa (Leeson *et al.*, 1996; Morvan *et al.*, 2005).

1.5.2 Remodeling Tulang

Pada remodeling tulang, proses dimulai dari permukaan endosteal saat pertumbuhan terhenti atau massa tulang terpenuhi. Proses remodeling tulang ialah proses yang terjadi terus menerus, yaitu pemecahan atau resorpsi tulang lama oleh osteoklas dan pembentukan tulang baru oleh osteoblas. Osteoklas akan melakukan pemecahan tulang, dan membuat rongga (*Lacuna Howship*) di tulang trabekular atau *cutting cone* di tulang kortikal. Osteoblast akan membentuk tulang pada rongga tersebut setelah pemecahan selesai dan membentuk suatu matriks yang disebut osteoid. Proses selanjutnya ialah proses mineralisasi primer dan sekunder hingga terbentuk tulang keras (Leeson *et al.*, 1996; Kanczler dan Oreffo, 2008)

Umumnya, pemecahan dan pembentukan tulang berlangsung bersamaan sehingga massa tulang seimbang dan tetap. Proses ini terjadi terus menerus sepanjang kehidupan. Mulanya, pada awal pertumbuhan dan perkembangan, transformasi tulang terjadi lebih cepat bila dibanding dengan pemecahannya, sehingga tulang menjadi lebih padat, lebar, dan berat (Sihombing *et al.*, 2012).

1.6 Pegagan (*Centella asiatica*)

1.6.1 Klasifikasi Pegagan

Pegagan (*Centella asiatica*) atau yang sering juga disebut Gotu Kola, merupakan tanaman dari family *Umbeliferae* yang telah digunakan sejak dulu sebagai pengobatan atau menjadi santapan lalapan. Pegagan merupakan tanaman *herbaceous* yang berasal dari daerah tropis seperti Sri Lanka, Bangladesh, India, Australia utara, Indonesia, Iran, Malaysia, Papua Nugini, dan bagian lain di Asia. Sebagai pengobatan, tanaman ini digunakan untuk

meningkatkan vitalitas atau ketahanan tubuh dan di klaim dapat membersihkan darah dan memelihara kesehatan pencernaan (Jahan *et al.*, 2012; Kristina *et al.*, 2015).

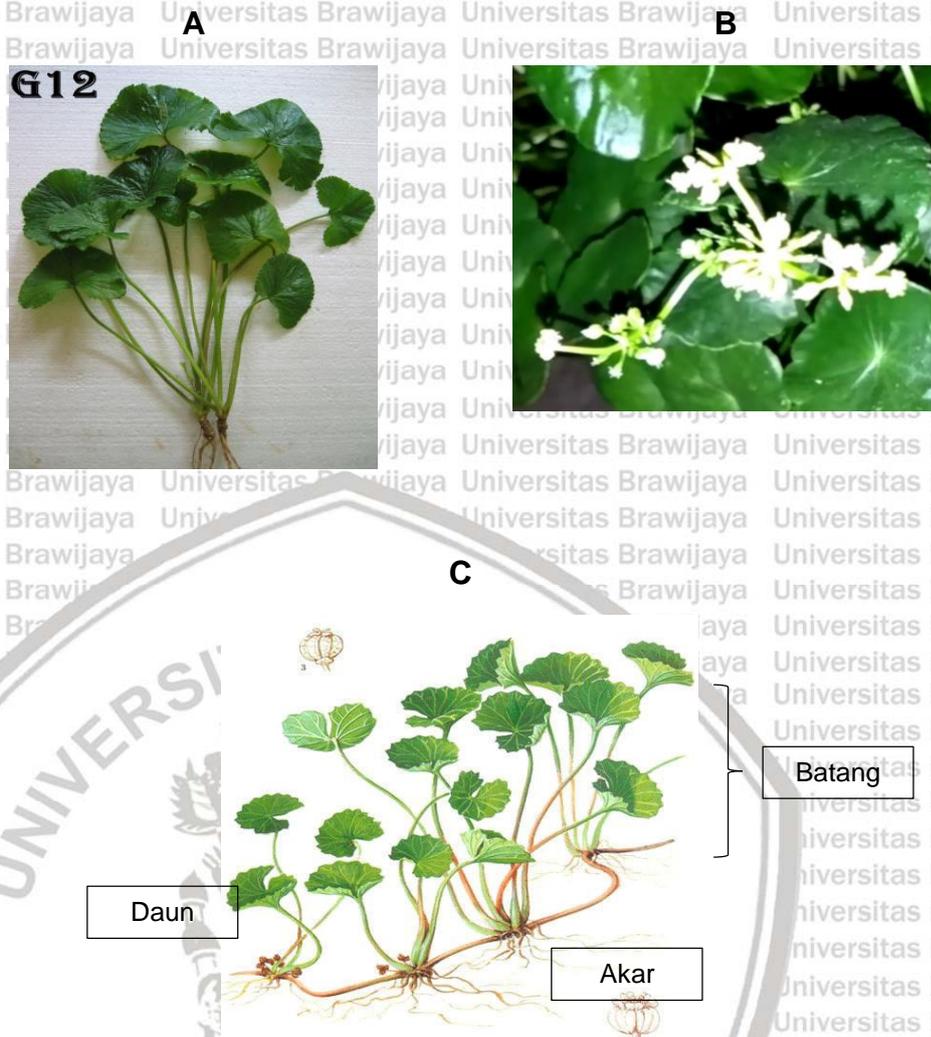
Adapun klasifikasi pegagan menurut Jahan *et al.* (2012) ialah sebagai berikut:

Tabel. 2.1 Klasifikasi Sistematis (Taksonomi) Pegagan

Klasifikasi	Nama
Kingdom	<i>Eukaryota</i>
Subkingdom	<i>Embryophyta</i>
Divisi	<i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	<i>Angiospermae</i>
Kelas	<i>Dicotyledoneae</i>
Subkelas	<i>Rosidae</i>
Superorder	<i>Aralianae</i>
Order	<i>Araliales (Umbelliflorae)</i>
Famili	<i>Apiaceae atau Umbelliferae</i>
Subfamili	<i>Hydrocotyle</i>
Genus	<i>Centella</i>
Spesies	<i>Centella asiatica</i>

1.6.2 Morfologi Pegagan

Pegagan memiliki bentuk daun bulat seperti ginjal, berbatang lunak beruas dan menjalar. Pada tiap ruasnya, ditumbuhi akar dan juga daun. Panjang tangkai daun mencapai 5 – 15 cm. Daun pegagan sedikit berambut pada permukaannya dan tepinya bergerigi, bergaris tengah 1–7 cm, dengan tinggi tangkai daunnya hingga 50 mm. Bunga tanaman pegagan tumbuh kearah ujung daun, berupa bunga majemuk jennis payung tunggal, sebanyak 3 – 5 bunga. Mahkota bunganya memiliki warna merah padam, panjangnya 1 - 1,5 mm dan lebarnya mencapai 0,75 mm. Buah pegagan berukuran kecil, pipih dengan panjang ± 3 mm dan lebar ± 7 mm, berlekuk dua, berusuk, dengan warna kuning kecoklatan dan dengan dinding sedikit tebal. Tinggi tanaman pegagan ialah sekitar 5,39 – 13,3 cm dan akarnya berwarna putih dengan rimpang/rizoma pendek dan batang beupa stolon merayap hingga 10 – 80 cm (BPOM RI, 2010; Chandrika & Kumara, 2015; Kristina *et al.*, 2015).



Gambar 2.5 Pegagan (*Centella asiatica*)

Keterangan: A. Morfotipe Pegagan (*Centella asiatica*). Pegagan memiliki bentuk daun bulat seperti ginjal, beruas dan menjalar. Panjang tangkai daun mencapai 5 – 15 cm, tinggi tangkai daun hingga 50 mm; B. Bunga pegagan. Bunga tanaman pegagan berupa bunga majemuk jennis payung tunggal, sebanyak 3 – 5 bunga dengan panjang 1 - 1,5 mm dan lebar 0,75 mm; C. Bagian-bagian tanaman Pegagan (Chandrika & Kumara, 2015)

1.6.3 Kandungan Pegagan

Terdapat sejumlah nutrisi dan bahan kimia yang memiliki efek terapeutik pada pegagan. Komponen kimia yang ada pada pegagan adalah saponin, alkaloid, flavonoid, resin, pectin, tanin, steroid, triterpenoid dan glikosida. Sedangkan zat kimia dalam pegagan antara lain asiaticosida, asiatic asid, madekasid dan madekasosid, sitosterol dan stigmasterol dari golongan steroid, vallerin,

brahmosida, brahminosida dari golongan saponin (Kristina *et al.*, 2015). Zat aktif dalam pegagan ditunjukkan pada tabel berikut:

Tabel 2.2 Kandungan Triterpenoid dari Pegagan (*Centella asiatica*) (Hashim *et al.*, 2011)

Jenis Triterpenoid	Waktu Retensi (min)	Konsentrasi Triterpene dalam ekstrak pegagan (mg/mL)
Madecassoside	6,313	3,10 ± 4,58
Asiaticoside	7,997	1,97 ± 2,65
Madecassic Acid	12,199	0,55 ± 2,99
Asiatic Acid	13,573	0,55 ± 0,89

Pegagan juga mengandung makronutrien, mikronutrien, protein dan vitamin. Komposisi zat nutrisi yang terkandung di dalam pegagan terangkum:

Tabel 2.3 Kandungan Zat Nutrisi dalam Pegagan (*Centella asiatica*)

Zat Nutrisi	Jumlah
Kalori	37 kkal
Makronutrien	
Karbohidrat	6,7%
Protein	2%
Lemak	87,7%
Serat	1,6%
Air	0,2%
Mikronutrien	
Kalium	391 mg
Kalsium	171 mg
Natrium	21 mg
Fosfor	32 mg
Magnesium	87 mg
Sodium	5,6 mg
Zat Besi	5,6 mg
Vitamin	
B-Caroten	3,9 mg
Vitamin C	48,5 mg
Vitamin A	0,44 mg
Vitamin B1 (Tiamin)	0,09 mg
Vitamin B2 (Riboflavin)	0,19 mg
Vitamin B3 (Niasin)	0,1 mg

Keterangan: Jumlah zat gizi yang terkandung di dalam 100 gram pegagan (*Centella asiatica*) (Hashim *et al.*, 2011)

1.6.4 Manfaat Pegagan

Ada banyak keuntungan dari pegagan untuk kesehatan sehingga digunakan sebagai salah satu tanaman herbal. Penjelasan secara rinci mengenai manfaat pegagan dapat dikategorikan sebagai berikut:

1. Antioksidan

Reactive Oxygen Species (ROS) dihasilkan dari oksigen molekuler sebagai hasil metabolisme seluler normal. ROS dapat dibagi menjadi 2 kelompok: radikal bebas dan non-radikal. Molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tak berpasangan sehingga reaktif terhadap molekul lain disebut radikal bebas. ROS yang mempunyai signifikansi fisiologis adalah anion *superoxide* (O_2^-), hidroksil (OH^\cdot), dan hidrogen peroksida (H_2O_2).

Tubuh manusia dilengkapi berbagai antioksidan yang berfungsi untuk mengimbangi efek oksidan. Jumlah oksidan di dalam tubuh yang berlebihan akibat paparan bahan toksik menyebabkan stress oksidatif dan membutuhkan antioksidan dari luar untuk memperbaiki kerusakan akibat oksidan di dalam tubuh (Birben *et al.*, 2012). Senyawa polifenol, flavonoid, β -karoten, tanin, dan vitamin C yang terkandung dalam pegagan berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan. Karotenoid dapat berubah menjadi vitamin A, salah satu antioksidan yang kuat. Selain itu triterpenoid, flavonoid dalam pegagan memainkan peran utama sebagai antioksidan dan sebagai kelator. Antioksidan dalam *Centella* (84%) sebanding dengan vitamin C (88%) dan ekstrak biji anggur (83%) (Hashim *et al.*, 2011; Chandrika & Kumara, 2015).

2. Anti Inflamasi

Ekstrak pegagan memberikan efek anti-inflamasi dengan mengurangi reaksi radiasi akut pada tikus. Ekstrak asiaticoside aktifnya memiliki sifat anti-inflamasi yang disebabkan oleh penghambatan sintesis oksida nitrat.

Ekstrak pegagan menunjukkan aktivitas anti-inflamasi pada tikus dengan edema kaki yang diinduksi prostaglandin E2. Efek anti-inflamasi lainnya misalnya pada inhibisi proliferasi sel limfosit, menekan pembentukan enzim siklooksigenase dan produksi prostaglandin, menurunkan pengeluaran

tumour necrosis factor (TNF α) dan interleukin (IL) 6. Asam terpena bioaktif seperti *asiatic acid* dan *madecassic acid* yang terkandung dalam pegagan berperan dalam aktivitas anti-inflamasi ini (BPOM RI, 2010; Chandrika dan Kumara, 2015). Penelitian sebelumnya juga membuktikan pegagan memiliki efek anti-inflamasi dengan meningkatkan mediator anti-inflamasi IL-10 melalui kandungan aktif asiaticosida (Zahara, 2018).

3. Kardioprotektif

Efek kardioprotektif pegagan secara bermakna mengurangi kadar enzim pada marker diagnostik yang menandakan adanya disfungsi jantung seperti laktat dehidrogenase, kreatin posfokinase, glutamat oksaloasetat transaminase dan glutamat piruvat transaminase. Senyawa aktif dalam pegagan yang terlibat dalam aktivitas ini adalah asiaticosida dan asam arjunolat (BPOM RI, 2010).

4. Neuroprotektif

Pegagan melindungi sel-sel dari kerusakan oksidatif dengan menghancurkan radikal bebas berlebih, dan menjaga keseimbangan stress oksidatif dalam tubuh. Pegagan memberikan efek perlindungan saraf yang signifikan dan terbukti manjur dalam melindungi otak tikus terhadap kerusakan oksidatif. *Asiatic acid* memberikan efek neuroprotektif yang signifikan pada sel kortikal yang dikultur dengan potensiasi dari mekanisme pertahanan oksidatif seluler. Pegagan mempercepat regenerasi saraf setelah pemberian oral dan mengandung beberapa fraksi aktif yang meningkatkan perpanjangan neurit in vitro, menunjukkan bahwa komponen dalam herbal mungkin berguna untuk mempercepat perbaikan neuron yang rusak (Chandrika & Kumara, 2015).

5. Manfaat lain dari pegagan adalah antidiabetik, antimikrobal, anti lepra, anti sipilis, astrigensia dan tonikum. Pegagan juga dikenal memelihara

kesuburan wanita. Di Australia, pegagan digunakan sebagai anti pikun dan stress. Pegagan juga mampu meningkatkan daya ingat dan mencegah kerusakan kulit (Chandrika dan Kumara, 2015; Kristina *et al.*, 2015; BPOM RI, 2010).

1.7 Zebrafish

1.7.1 Karakteristik Zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) adalah ikan *teleost cyprinid* kecil yang berasal dari Sungai Gangga di India Timur, Bangladesh, dan Burma. Klasifikasi zebrafish dapat dilihat pada tabel 2.6 (Spence, 2011).

Tabel. 2.4 Klasifikasi Sistematis (Taksonomi) Zebrafish

Klasifikasi	Nama
Kingdom	<i>Animal</i>
Filum	<i>Chordata</i>
Kelas	<i>Actynoptergii</i>
Ordo	<i>Cypriniformes</i>
Famili	<i>Cyprinidae</i>
Subfamili	<i>Rasborine</i>
Genus	<i>Brachydanio</i>
Species	<i>Brachydanio rerio</i>

Zebrafish ditemukan di kolam-kolam dangkal yang berlumpur, sawah, dan di pinggiran aliran sungai yang lambat. Zebrafish memiliki daftar perilaku alami yang kaya. Mereka dikenal berburu dan menangkap mangsa hidup, mengembangkan hierarki dominasi, memilih dan mempertahankan tempat bertelur, membentuk timbunan lumpur, dan menghindari pemangsa (Colwill & Creton, 2011).

Zebrafish hidup berkelompok dan dapat hidup antara 2 – 5 tahun dalam pemeliharaan dan perawatan yang baik. Zebrafish dewasa berusia 90 dpf dengan panjang tubuh berkisar antara 2 – 3 cm, pada usia 2 hingga 3 tahun dapat mencapai panjang 4 – 5 cm (Kalueff & Cachat, 2011). Zebrafish dewasa memiliki

garis-garis putih dan hitam atau biru membujur dari bagian sirip hingga ekor (*caudal fin*) sehingga menyerupai zebra. Zebrafish jantan dan betina dibedakan dari bentuk tubuh dan warna garis di tubuh (Spence, 2011).



Gambar 2.6 Perbedaan Zebrafish Jantan dan Betina

Keterangan: A. Zebrafish Jantan, memiliki bentuk tubuh memanjang dengan garis berwarna biru dan emas terutama pada sirip dubur; B. Zebrafish Betina, memiliki perut yang lebih besar, bagian perut berwarna putih dan terdapat garis-garis berwarna perak pada sisi tubuhnya (Spence, 2011; Avdesh *et al.*, 2012).

1.7.2 Perkembangan Zebrafish

Zebrafish menunjukkan pola aktivitas diurnal yang sesuai dengan siklus terang/gelap dan siklus makan. Zebrafish mulai bertelur dimulai pada menit pertama pemaparan cahaya setelah kegelapan, berlanjut selama sekitar satu jam.

Zebrafish bertelur sebanyak 200 telur dalam 2 – 3 hari. Pembuahan telur terjadi di luar tubuh dan zebrafish betina melepaskan antara 5 – 20 telur dalam satu waktu (Spence, 2011).

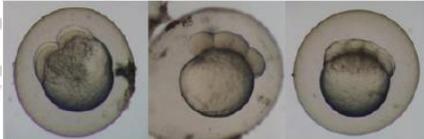
Periode perkembangan awal zebrafish dimulai dari zigot, *cleavage* atau pembelahan sel, blastula, gastrula, segmentasi, pharingula, dan kemudian masa *hatching*/menetas, larva, dan zebrafish dewasa. Dikatakan embrio zebrafish yaitu sejak berbentuk telur sampai menetas pada usia 72 hpf (Kimmel *et al.*, 1995).

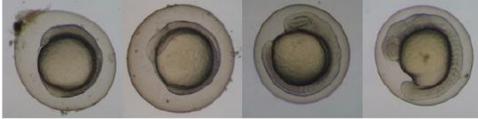
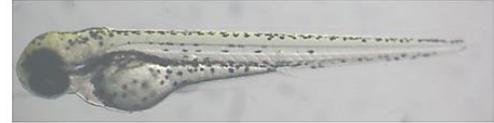
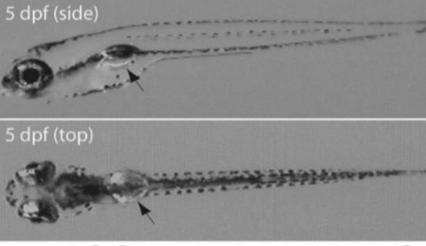
Post embryonic development adalah periode perumbuhan dan perkembangan dari bentuk tubuh serta morfogenesis menuju zebrafish dewasa setelah embryogenesis. Pertumbuhan dan perkembangan ini diawali dari larva.

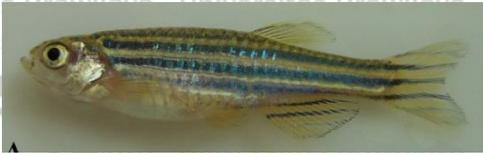
Larva adalah fase antara embrio dan *juvenile* (usia 4 minggu sampai 6 – 12 minggu post fertilisasi). Pada periode ini, karakteristik sama dengan dewasa yaitu lipatan pada sirip larva sudah menghilang namun maturitas seksual belum terjadi.

Zebrafish dewasa adalah ikan yang sudah mampu memproduksi gamet dan telah menunjukkan karakteristik seksual sekunder saat kawin (Budi *et al.*, 2011).

Tabel 2.5 Tahapan Perkembangan Zebrafish

Periode	Usia	Panjang Badan	Keterangan	Gambar
Zygot	0 hpf		Telur yang telah dibuahi dan akan segera menyelesaikan siklus zigot yang pertama	 <p>zygote 1-cell 2-cell</p>
Pembelahan (Cleavage)	$\frac{3}{4}$ hpf		Terjadi pembelahan 2 sel hingga 7 sel dengan cepat dan serempak	 <p>4-cell 8-cell 16-cell</p>
Blastula	$2 \frac{1}{4}$ hpf		Fase cepat, siklus pembelahan sel <i>matasinkronous</i> , epiboly mulai terbentuk dan berubahnya blastokist menjadi blastoderm	 <p>16-cell 32-cell 64-cell</p>
Gastrula	$5 \frac{1}{4}$ hpf		Sudah terbentuknya epiboly dengan sempurna. Terbentuk <i>primary germ cell</i> embrionik axis dan <i>tail bud</i>	 <p>1K-cell 2K-cell oblong</p> <p>80% epiboly 90% epiboly tailbud 2-somite</p>

Periode	Usia	Panjang Badan	Keterangan	Gambar
Segmentasi	10 hpf	0,9 – 1,6 mm	Terbentuk lengkungan faring promordia, perkembangan neuron, terjadi tahap organogenesis serta adanya gerakan awal pada bagian ekor	 <p>5-somite 10-somite 12-somite 14-somite</p>  <p>17-somite 18-somite 20-somite</p>
Faringula	24 hpf	1,9 – 2,9 mm	Tahap <i>phylotypic embyo</i> , sumbu tubuh lurus dari lengkung <i>yolksack</i> , sudah terbentuk sirkulasi dan sirip	 <p>prim-5 prim-11</p>
Hatching	48 hpf	3,1 – 3,5 mm	Sistem organ terbentuk sempurna, sirip pectoral dan kartilago kepala terjadi perkembangan dalam persiapan penetasan	 <p>48-hour 72-hour</p>
Larva Muda	3 dpf	3,5 mm	Embrio keluar dari korion, dapat berenang aktif, mampu bergerak menjauh jika disentuh	 <p>72hpf</p>
	5 dpf	3,9 mm	Sudah memiliki 6 gigi dan aktif makan	 <p>5 dpf (side) 5 dpf (top)</p>
	7 dpf	4,5 mm	Sudah memiliki 8 gigi dan tulang rawan di belakang sudah tumbuh	 <p>1-week larva</p>

Periode	Usia	Panjang Badan	Keterangan	Gambar
Mild Larva	14 dpf	6,2 mm	Sudah memiliki 10 gigi, neuron dan syaraf terbentuk sempurna	
	21 dpf	7 – 7,7 mm	Tulang faringeal dorsal dan tulang sirip anal terbentuk	
Juvenile	30 dpf	9 – 10 mm	Sudah memiliki 12 gigi, terdapat pigmentasi dan garis pada tubuh	
	45 dpf	12,5 – 14 mm		
Dewasa	90 dpf	2 cm	Sudah terdapat maturasi seksual dan siap bereproduksi	
	1000 dpf	4 - 4,5 cm	Mulai terdapat kematian	

Keterangan: Tahapan perkembangan zebrafish mulai dari zygot hingga menjadi zebrafish dewasa; *hpf* (hour post fertilization); *dpf* (day post fertilization).

Usia pada zebrafish dapat dianalogikan pada usia manusia berdasarkan ontogeni siklus bangun tidur. Usia 3 dpf, 6 dpf, dan 9 dpf pada zebrafish analog dengan bayi baru lahir, anak umur 2 tahun, dan 8 tahun pada manusia (Sorribes *et al.*, 2013). Pernyataan ini didukung dalam penelitian Dianita (2017), yang menganalogikan usia 3 dpf pada zebrafish setara dengan bayi baru lahir dan usia 6 dpf setara dengan anak usia 2 tahun.

1.7.3 Zebrafish sebagai Model Penelitian

Banyak keutamaan mengapa peneliti lebih memilih untuk melakukan penelitian pada zebrafish. Zebrafish merupakan salah satu organisme model vertebrata yang paling penting dalam genetika, biologi perkembangan, neurofisiologi, dan biomedis karena memiliki sejumlah atribut yang membuatnya sangat mudah digunakan untuk manipulasi eksperimental. Zebrafish merupakan ikan yang kecil dan kuat, sehingga dapat disimpan dalam jumlah besar dengan

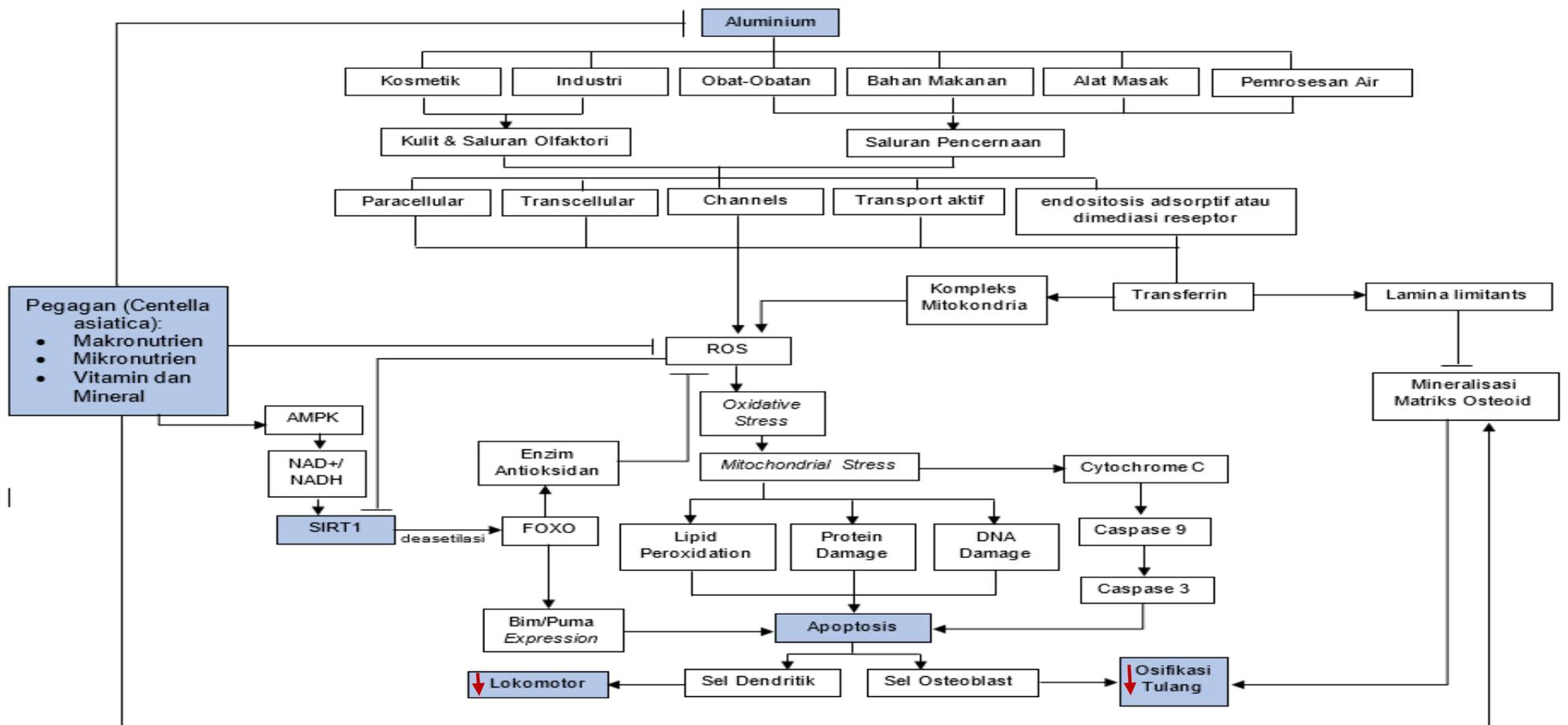
mudah dan murah di laboratorium. Telur yang dihasilkan banyak dan dalam waktu yang singkat. Telur zebrafish berukuran besar dibandingkan dengan telur ikan lainnya (dengan diameter 0,7 mm pada saat pembuahan), transparan, dan pembuahannya terjadi di luar tubuh ikan sehingga telur dapat dimanipulasi dan dapat dengan mudah diamati perkembangannya melalui mikroskop (Spence, 2011). Zebrafish juga memiliki kesamaan genetic dengan manusia dimana sekitar 70% gen penyakit manusia homolog dengan zebrafish (Santoriello & Zon, 2012).



BAB 3

KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN

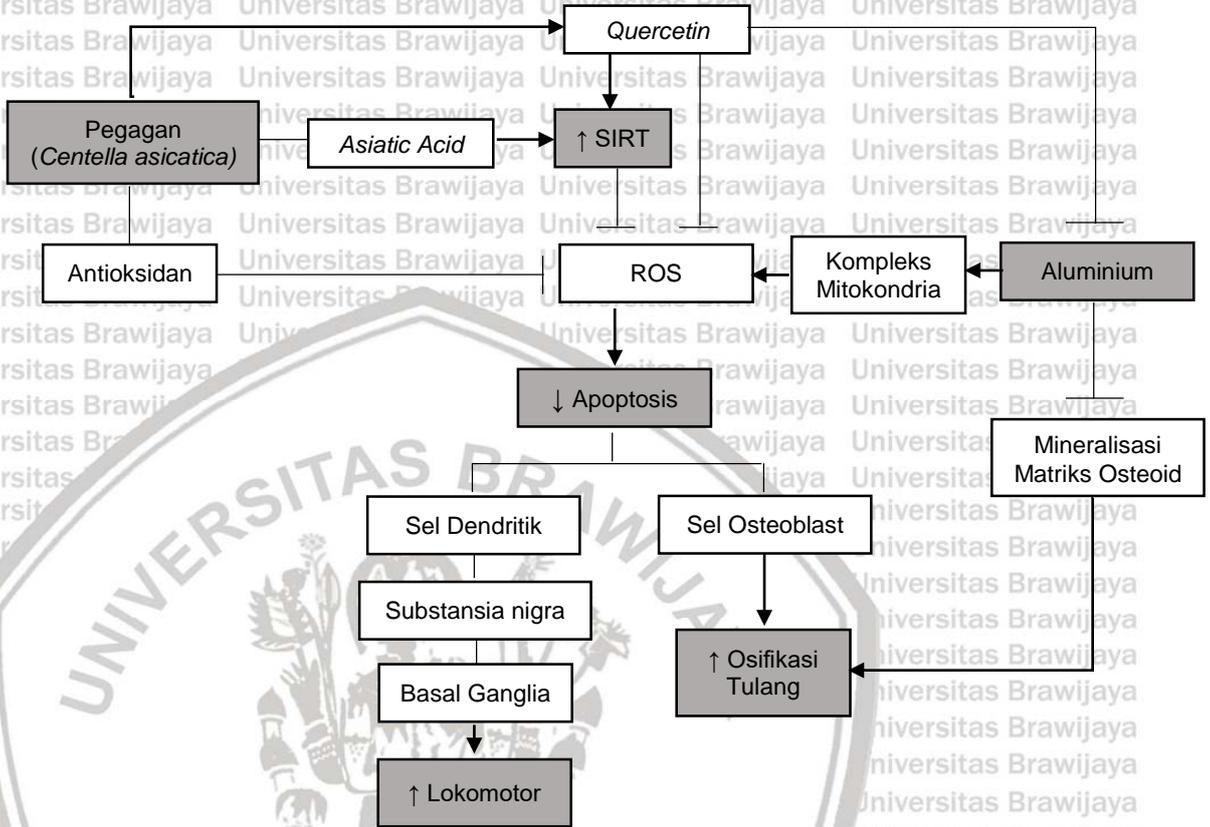
2.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1 Kerangka Teori

2.2 Kerangka Konsep

Maka untuk fokus penelitian ini dapat dibuat kerangka konsep sebagai berikut:



Gambar 3.2 Kerangka Konsep

Keterangan:

- : Variabel yang diteliti
- : Variabel yang tidak diteliti
- : Menstimulasi/menginduksi
- | : Menghambat

Variabel dependen: aluminium dan pegagan (*Centella asiatica*)

Variabel independen: SIRT1, Apoptosis, Lokomotor, Osifikasi Tulang Keras

Aluminium yang terpapar pada manusia melalui kulit, saluran olfaktori dan saluran pencernaan akan masuk ke dalam tubuh dan terakumulasi dengan target organ terutama di ginjal, hati, jantung, tulang dan otak (Lima *et al.*, 2011).

Aluminium dapat masuk ke dalam sel dan sistemik secara transport paraselular,

transselular, melalui kanal/*channel*, dengan transport aktif atau melalui endositosis adsorptif atau dimediasi reseptor contohnya seperti transferrin. Transferrin adalah suatu plasma protein yang berikatan dengan besi dan mengedarkannya ke seluruh tubuh. Aluminium bersaing dengan besi dan dapat menggantikannya berikatan dengan transferrin.

Aluminium masuk ke dalam sel dan menyebabkan produksi ROS dengan menghambat kerja kompleks mitokondria. Jumlah produksi ROS yang berlebihan ini akan menyebabkan kerusakan pada sel terutama pada DNA melalui peningkatan peroksidasi lipid dan dapat menginduksi terjadinya apoptosis.

Apoptosis adalah suatu peristiwa kematian sel yang terprogram dengan tujuan mengurangi jumlah pertumbuhan sel yang berlebihan atau mengeliminasi sel yang rusak akibat toksik. Apoptosis sel yang berlebihan akibat toksisitas dari aluminium dapat berpengaruh dalam pertumbuhan dan perkembangan secara struktur dan fungsi. Apoptosis sel secara umum baik pada sel-sel syaraf maupun muskuloskeletal akan mempengaruhi proses pertumbuhan, contohnya seperti proses osifikasi tulang yang juga dapat dipengaruhi langsung oleh inhibisi aluminium pada proliferasi osteoblas dan inhibisi mineralisasi matriks osteoid, dan juga mempengaruhi proses perkembangan contohnya ialah aktivitas lokomotor atau upaya pergerakan untuk berpindah tempat dari satu tempat ke tempat lain.

Untuk mengurangi efek peningkatan stress oksidatif oleh aluminium, tubuh memiliki mekanisme pertahanan diri. Sirtuin 1 (SIRT1)/*Silent Mating Type Information Regulation 2 Homolog 1* adalah suatu protein deacetylase yang tergantung pada NAD. SIRT1 berfungsi dalam regulasi sel dan salah satunya dengan merangsang ekspresi antioksidan dan memperpanjang masa hidup sel.

SIRT1 memodulasi dua faktor penting yang mempengaruhi masa hidup dan kematian dari sel, salah satunya ialah FOXO (*Forkhead Box O Transcription Factor*). FOXO dapat menginduksi apoptosis melalui produksi Bim/PUMA, protein

pro-apoptosis. Dengan melakukan deasetilasi pada FOXO, SIRT1 dapat mencegah apoptosis.

Centella asiatica mengandung Asiatic acid yang dapat meningkatkan aktivitas adenosine 5 monophosphate kinase (AMPK), enzim yang memfasilitasi penyerapan glukosa seluler dan oksidasi asam lemak, sehingga terjadi peningkatan produksi NAD⁺/NADH yang dapat mengaktifasi SIRT1. *Centella asiatica* juga memiliki zat antioksidan yang dapat menghambat pembentukan ROS. Pemberian tambahan antioksidan dari luar tubuh diharapkan dapat mencegah efek buruk dari peningkatan ROS yang berlebihan yaitu terjadinya apoptosis yang mempengaruhi proses pertumbuhan dan perkembangan tubuh.

1.3 Hipotesis

Hipotesis utama dalam penelitian ini adalah: "Ada pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap lokomotor, dan osifikasi tulang keras, ekspresi Sirtuin1 (SIRT1), apoptosis sel larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium".

Sub hipotesis dari penelitian ini adalah:

1. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan aktivitas lokomotor pada larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium.
2. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan osifikasi tulang keras larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium.
3. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi SIRT1 larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium.
4. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah apoptosis larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium.
5. Ada hubungan antara pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap lokomotor, osifikasi tulang keras, ekspresi SIRT1, dan apoptosis pada larva *zebrafish* yang dipapar Aluminium.

BAB 4

METODE PENELITIAN

1.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental murni (*true experiment*) dan *posttest control group design* dengan pemberian perlakuan pada larva *zebrafish* (*Danio Rerio*). Ada beberapa kelompok *zebrafish* yang diberi perlakuan dalam desain penelitian ini dan diikuti perkembangannya mulai dari 0 *hour post fertilization* (*hpf*) hingga 6 *day post fertilization* (*dpf*) yang penentuan sampelnya dilakukan secara acak. Embrio *zebrafish* dalam penelitian ini dikategorikan menjadi 5 kelompok yaitu:

1. Kelompok Kontrol
2. Kelompok Aluminium Klorida konsentrasi 50 μM
3. Kelompok Aluminium Klorida konsentrasi 50 μM dan ekstrak etanol Pegagan konsentrasi 1,25 μM
4. Kelompok Aluminium Klorida konsentrasi 50 μM dan ekstrak etanol Pegagan konsentrasi 2,5 μM
5. Kelompok Aluminium Klorida konsentrasi 50 μM dan ekstrak etanol Pegagan konsentrasi 5 μM

1.2 Populasi dan Sampel

1.2.1 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah embrio yang dibiakkan hingga larva *zebrafish* dengan usia 0 – 6 *dpf* dari hasil fertilisasi *zebrafish wild type* jantan dan betina dengan perbandingan jumlah *zebrafish* betina 2 ekor dan jantan 1 ekor.

Induk *zebrafish* dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. *Zebrafish* yang digunakan dalam penelitian ini sebagai

hewan coba memiliki ciri strip biru tua horizontal dengan warna dasar perak pada tubuhnya. *Zebrafish* telah diuji dan diidentifikasi oleh Laboratorium Hidrologi Fakultas Ilmu Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya (Khotimah et al., 2015).

1.2.2 Sampel Penelitian

Penggunaan sampel pada penelitian ini dibagi menjadi beberapa sampel tergantung jenis pemeriksaan yang akan dilakukan. Untuk mengetahui *survival rate* dan *hatching rate* diukur pada 2 *hpf* hingga 3 *dpf*, jumlah embrio yang menjadi sampel ialah 30 dengan tripikasi sehingga jumlah keseluruhan ialah 90 embrio (Monaco et al., 2017). Untuk pemeriksaan lokomotor sampel yang digunakan ialah sebanyak 5 ekor larva *zebrafish* (García-camero et al., 2015), dan osifikasi tulang didasarkan pada penelitian oleh Zahara (2018), yaitu sebanyak 5 ekor larva *zebrafish*. Untuk pemeriksaan SiRT pada masing-masing kelompok diambil sebanyak 20 larva pada hari ke-6 (Deng et al., 2009). Untuk pemeriksaan apoptosis, larva *zebrafish* yang menjadi sampel ialah sebanyak 5 ekor per kelompok perlakuan (Kurnianingsih et al., 2016).

Embrio yang dibiakkan hingga larva *zebrafish* dengan usia 0 – 6 *dpf* yang dibagi menjadi 5 kelompok dengan rincian kelompok sampel sebagai berikut:

1. Kontrol negatif (KN) adalah embrio *zebrafish* yang dibiakkan hingga menjadi larva, tidak diberi perlakuan menggunakan aluminium ataupun ekstrak etanol pegagan dan hanya diberikan medium embrionik.
2. Kontrol Positif (KP) adalah embrio *zebrafish* yang dibiakkan hingga menjadi larva, diberi perlakuan menggunakan AlCl_3 dengan konsentrasi 50 μM yang dicampur dengan medium embrionik namun tidak diberi ekstrak etanol pegagan.
3. Perlakuan 1 (P1) adalah embrio *zebrafish* yang dibiakkan hingga menjadi larva, diberi perlakuan menggunakan AlCl_3 dengan konsentrasi 50 μM dan

ekstrak etanol pegagan konsentrasi 1,25 μM yang dicampur dengan medium embrionik.

4. Perlakuan 2 (P2) adalah embrio *zebrafish* yang dibiakkan hingga menjadi larva, diberi perlakuan menggunakan AlCl_3 dengan konsentrasi 50 μM dan ekstrak etanol pegagan konsentrasi 2,5 μM yang dicampur dengan medium embrionik.

5. Perlakuan 3 (P3) adalah embrio *zebrafish* yang dibiakkan hingga menjadi larva, diberi perlakuan menggunakan AlCl_3 dengan konsentrasi 50 μM dan ekstrak etanol pegagan konsentrasi 5 μM yang dicampur dengan medium embrionik.

1.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Pemilihan sampel embrio *zebrafish* telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

1. Kriteria Inklusi

Embrio *zebrafish* berusia 2 *hpf* yang masih memiliki korion berwarna bening transparan tanpa jamur saat dilihat dengan menggunakan mikroskop.

2. Kriteria Eksklusi

Embrio *zebrafish* berwarna putih dan tidak dibuahi, mati, tidak berbentuk bulat, berlekatan dengan telur dan kotoran lainnya, berjamur, dan terjangkit *paramecium*.

1.4 Tempat dan Waktu Penelitian

1.4.1 Tempat Penelitian

1. Tempat pemeliharaan *zebrafish*, pembiakan embrio *zebrafish*, pembuatan larutan AlCl_3 , larutan embrionik, larutan ekstrak etanol pegagan (*Centella*

asiatica) dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

2. Pemeriksaan dan pengukuran lokomotor dan osifikasi *zebrafish* dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

3. Pemeriksaan Ekspresi SIRT1 dilakukan di Laboratorium UIN Malang.

4. Pemeriksaan apoptosis dilakukan di Laboratorium Institut Biosains Universitas Brawijaya Malang.

1.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan sejak bulan Januari hingga Juni 2019.

1.5 Variabel Penelitian

1. Variabel Independent (Independent)

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

2. Variabel Dependent (Terikat)

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah lokomotor, osifikasi, ekspresi SIRT1 dan apoptosis sel.

3. Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah konsentrasi $AlCl_3$, konsentrasi ekstrak etanol pegagan, medium embrionik, kebersihan well plate, suhu inkubator penyimpanan embrio dan larva *zebrafish*, pakan ikan dan air filtrasi pembiakan ikan *zebrafish*.

1.6 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel. 4.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Data
Ekstrak etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	Pemberian ekstrak etanol pegagan dengan konsentrasi 1,25 μM , 2,5 μM , dan 5 μM pada masing-masing kelompok dimulai dari usia embrio 2 hpf hingga 3 dpf (Primiastuti, 2017).	Ada 5 kelompok perlakuan yang terdiri dari kelompok kontrol (KN), AlCl_3 dan Pegagan dosis 1,25 μM (P1), AlCl_3 dan Pegagan dosis 2,5 μM (P2), AlCl_3 dan Pegagan dosis 5 μM (P3).	Ratio
Larutan Aluminium Klorida (AlCl_3)	Merupakan pemberian larutan Aluminium Klorida (AlCl_3) dengan konsentrasi 50 μM mulai dari embrio berusia 2 hpf hingga usia 3 dpf.	Pemberian aluminium pada kelompok Al, P1, P2, dan P3 sebanyak 50 μM	Ratio
Kadar Sirtuin1 (SIRT1)	SIRT1 merupakan suatu enzim regulator antioksidan pada larva <i>zebrafish</i> yang dipapar aluminium dan ekstrak etanol pegagan pada hari ke-6. Ekspresi SIRT1 diukur menggunakan RT-PCR (Sheng <i>et al.</i> , 2018).	ng/mL	Ratio
Apoptosis Sel Larva Zebrafish	Apoptosis yang terjadi pada larva <i>zebrafish</i> yang diberikan yang dipapar aluminium dan ekstrak etanol pegagan pada usia 3 dpf. Apoptosis diukur dengan menggunakan mikroskop fluoresens dengan pewarnaan <i>acridine orange</i> kemudian dianalisis menggunakan <i>software</i> ImageJ (Deng <i>et al.</i> , 2009; Mathias <i>et al.</i> , 2014; Rahma <i>et al.</i> , 2017).	pixels	Ratio
Lokomotor Larva Zebrafish	Jumlah gerakan lokomotor larva <i>zebrafish</i> yang dipapar aluminium dan ekstrak etanol pegagan pada usia 4, 5, dan 6 dpf dalam 1 menit (Pratama, 2017). Gerakan lokomotor yang dihitung ialah jumlah gerakan <i>zebrafish</i> melintasi garis pola (Goody & Henry, 2012) dan juga pola pergerakan <i>zebrafish</i> yang akan dianalisis menggunakan <i>software</i> ImageJ (Ingebretson & Masino, 2013; Selvaraj & Santhakumar, 2017).	Kali per menit, pola pergerakan	Ratio
Osifikasi Tulang Larva Zebrafish	Osifikasi tulang keras larva <i>zebrafish</i> yang dipapar aluminium dan ekstrak etanol pegagan pada usia 6 dpf. Pemeriksaan diukur dengan <i>software</i> ImageJ pada <i>zebrafish</i> yang diwarnai menggunakan <i>alizarin red</i> (Primiastuti, 2017).	Densitas tulang (pixels)	Ratio

1.7 Alat dan Bahan Penelitian

1. Pemeliharaan *zebrafish* dan perolehan telur (*spawning*)

Alat: untuk pemeliharaan *zebrafish* menggunakan alat penyaring air (filter), pompa air, aerosol, kapas filter, pengatur suhu aquarium (*heater*), aquarium kapasitas 60 liter, lampu aquarium dan pH meter. Untuk perolehan telur menggunakan alat kotak berbahan plastic untuk tempat penangkaran telur, tanaman/bunga plastik hias, inkubator suhu $28^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, *well plate* dengan 6 sumuran, pipet plastic ukuran 2 mL, mikropipet dan tip (*blue* dan *white*), mikroskop, kamera digital, *software Optilab* dan *Image Raster*), alat gerus (*homogenizer*), dan sentrugasi dingin 4°C .

Bahan: air untuk aquarium, anti klorin, *methylene blue*, pakan ikan (*tetramin flakes*).

2. Pembuatan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*)

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

Bahan: simpliasi pegagan (*Centella asiatica*) dan etanol.

3. Pembuatan medium embrionik

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

Bahan: aquades, CaCl, NaCl, KCl, dan MgSO₄.

4. Pengukuran ekspresi SIRT1

Alat: *Reverse Transcriptase PCR* (RT-PCR)

Bahan: RNA *isolation kit*, RT-PCR *kit*, primer (*Forward*: CAAGGAAATCTACCCCGGACAGT, *Reverse*: CAGTGTGTCGATATTCTGCGTGT)

5. Pengukuran apoptosis

Alat: mikroskop *fluorescent*, jarum, *microplate* dengan 24 *well*/sumuran, eppendorf, pipet, *object glass*, *micropipete*, timbangan digital

Bahan: *acridine orange*, aquadest, ethanol 96%, tricaine, PTU

6. Pengukuran lokomotor

Alat: pipet, *microplate* dengan 24 *well*/sumuran, kamera digital, pola pengukuran lokomotor yang telah dicetak

Bahan: medium embrionik

1.8 Prosedur Penelitian

1.8.1 Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio

Zebrafish jenis *wild-type* dewasa dipelihara di dalam aquarium yang berisikan 60 liter air tawar yang telah dicampur dengan larutan antiklorin dalam suhu 26°C – 28,5°C, pH air 6,8 – 7,5 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Aquarium telah dilengkapi dengan pompa air dan filter beserta selangnya, dan aerator untuk menjaga kebutuh oksigen *zebrafish*. Jumlah *zebrafish* di setiap aquarium ialah sekitar 25 – 30 ekor *zebrafish* dengan perbandingan 2 ekor betina dan 1 ekor jantan. Aquarium dikuras dan dibersihkan setiap 1 minggu sekali atau 3 – 4 hari sebelum dilakukan breeding/fertilisasi *zebrafish*. Kapas filter aquarium diganti setiap 2 hari sekali.

Pemberian pakan ikan *zebrafish* berupa pakan ikan *tetramin flakes* dilakukan sebanyak 3 kali sehari yaitu pada pagi hari pukul 07.00, siang hari pukul 12.00, dan sore pukul 15.00.

Untuk fertilisasi atau breeding *zebrafish* dilakukan dengan menyesuaikan siklus gelap terang (perbandingan 10:14, yaitu kondisi gelap selama 10 jam dan kondisi terang selama 14 jam) (Hermsen *et al.*, 2011; Truong *et al.*, 2011; Selderslaghs *et al.*, 2013) dan dengan cara meletakkan kotak plastik/*trap* yang telah dimodifikasi untuk menampung telur/embrio *zebrafish*, dan meletakkan hiasan berupa bunga plastik di atas kotak tersebut. *Trap* diangkat 30 menit setelah kondisi terang dan embrio dipindahkan ke dalam cawan untuk dibersihkan dari kotoran dan jamur menggunakan air aqua, kemudian direndam sebentar dalam larutan *methylene blue*. Pembersihan telur/embrio ini dilakukan tidak lebih dari 2 *hpf*. Setelah selesai pembersihan, embrio yang ada akan melalui tahap penyeleksian sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Embrio yang telah terseleksi ini dipindahkan ke dalam *microplate 6 well*/sumuran berisi medium embrionik sebanyak 5 ml per *well*. Setiap *well* diisi sebanyak 30 embrio dan disimpan dalam inkubator bersuhu $28^{\circ}\text{C}\pm 1$ (Selderslaghs *et al.*, 2013). Larva *zebrafish* tidak diberi pakan hingga berusia 6 *dpf*.

1.8.2 Pembuatan Medium Embrionik

Pembuatan medium embrionik modifikasi dari Cold Spring Harbor Laboratory Press (2011) dalam Khotimah (2018), untuk 10 kali kepekatan dibutuhkan CaCl 0.25 gr, KCl 0.15 gr, NaCl 5 gr, MgSO₄ 0.815 gr yang dicampur dan ditambahkan dengan aquadest hingga 500 ml. Stok embrionik medium ini disimpan di kulkas pada suhu 2°C hingga 8°C. Sebelum digunakan pada *zebrafish*, medium embrionik ini terlebih dahulu ditambahkan dengan air dengan perbandingan embrionik medium 1 bagian dan air 9 bagian (1 : 9) (Zahara, 2018).

1.8.3 Pembuatan Larutan Aluminium Klorida (AlCl₃)

Sediaan Aluminium Klorida (AlCl₃) merk MERCK-Schuchardt berbentuk serbuk sebanyak 66,67 mg dalam aquadest 2 ml (0,25 M) yang kemudian

dilartukan kembali dengan aquadest sebanyak 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi $2,5 \times 10^3 \mu\text{M}$ yang selanjutnya digunakan sebagai stock. Untuk pembuatan larutan aluminium klorida dengan konsentasi $50 \mu\text{M}$ dan kebutuhan volume sebanyak 15 ml (5 ml per sumuran) dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

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

$$V_1 \times 2,5 \times 10^3 = 15 \times 50 \mu\text{M}$$

$$V_1 = \frac{750}{2,5 \times 10^3} = 0,3 \text{ mL} = 300 \mu\text{L}$$

Keterangan:

V1 : Konsentrasi awal

M1 : Konsentrasi stok

V2 : Volume yang dibutuhkan

M2 : Konsentrasi akhir yang diinginkan

Cara pembuatan larutan aluminium klorida dengan konsentrasi $50 \mu\text{M}$ ialah dengan cara mengambil stok larutan aluminium klorida konsentasi $2,5 \times 10^3 \mu\text{M}$ sebanyak $300 \mu\text{L}$ Kemudian ditambahkan aquadest hingga 15 ml. Penggunaan konsentrasi $50 \mu\text{M}$ pada penelitian ini didasarkan pada hasil studi pendahuluan sebelumnya dimana pada konsentrasi ini tidak menimbulkan efek toksik hingga kematian zebrafish.

1.8.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*)

Simplisa pegagan yang akan dibuat menjadi ekstrak etanol pegagan diperoleh dari Materi Medica Kota Batu. Bagian yang digunakan adalah daun dan batang dari pegagan yang berada di atas tanah (Khotimah, Yuliyani, *et al.*, 2018).

Adapun prosedur pembuatan pegagan ialah sebagai berikut:

1. Pegagan dibersihkan dengan cara dicuci, dipotong menjadi ukuran yang kecil dan dikeringkan menggunakan oven bersuhu 40°C .
2. Pegagan yang telah kering ini dihaluskan dengan cara ditumbuk atau diblender, kemudian disaring.

3. Pegagan sebanyak 100 g direndam menggunakan 900 ml metanol 98% dan dikocok selama ± 30 menit sampai tecampur dengan baik kemudian didiamkan selama satu malam hingga mengendap.
4. Rendaman tersebut yang telah didiamkan selama 24 jam selanjutnya diambil bagian lapisan atasnya yang merupakan campuran dari etanol dan zat aktif pegagan), lalu disaring menggunakan kertas saring dan corong *buncher*.
5. Proses evaporasi dilakukan untuk memisahkan larutan etanol dan zat aktif hingga didapatkan ekstrak kental pegagan dengan bantuan alat *rotary evaporator* pada suhu 70°C. Hasil rendaman yang telah disaring dimasukkan ke dalam labu evaporasi berukuran 1 liter, kemudian disambungkan pada *evaporator*. Untuk menghabiskan 1 liter (900 ml) pegagan dalam labu ini dibutuhkan waktu sekitar 1,5 hingga 2 jam.
6. Hasil ekstraksi sebanyak 10 gr disimpan di *freezer*.

1.8.5 Pembuatan Larutan Pegagan (*Centella asiatica*)

Larutan stok pegagan sebanyak 1 mg/ml (1000 µg/ml) dibuat dengan cara menimbang hasil ekstraksi etanol pegagan sebanyak 100 mg dan kemudian ditambahkan aquadest 10 ml. Dari stok tersebut, pegagan diencerkan kembali menggunakan aquadest untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan. Konsentrasi pegagan yang dibutuhkan dalam penelitian ini ialah sebanyak 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, dan 5 µg/ml (Primiastuti, 2017). Untuk mengetahui jumlah volume pengencer pada masing-masing konsentrasi digunakan rumus berikut:

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

$$V_1 \times 1.10^3 \mu\text{g/ml} = 15 \text{ ml} \times 1,25 \mu\text{g/ml}$$

$$V_1 = 0.01875 \text{ ml} = 18,75 \mu\text{l}$$

Keterangan:

V1 : Konsentrasi awal

M1 : Konsentrasi stok

V2 : Volume yang dibutuhkan

M2 : Konsentrasi akhir yang diinginkan

Berdasarkan rumus di atas, maka volume yang dibutuhkan untuk membuat larutan pegagan untuk konsentrasi 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, dan 5 µg/ml secara berturut-turut adalah 18,75 µl, 37,5 µl dan 75 µl. Volume yang dibutuhkan ini diambil dari stock dan ditambahkan larutan embrionik hingga mencapai 15 ml.

1.8.6 Pembuatan dan Pemberian Larutan Aluminium Klorida (AlCl₃) dan Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*)

Pada kelompok zebrafish diberikan larutan aluminium klorida dan ekstrak etanol pegagan dengan pembagian sebagai berikut:

1. Kontrol Positif (AlCl₃)

Larutan Aluminium Klorida (AlCl₃) dengan konsentrasi 50 µM yang telah diencerkan dengan larutan embrionik diberikan sebanyak 5 ml pada masing-masing *well*/sumuran ketika embrio *zebrafish* berusia 2 *hpf*, 24 *hpf*, dan 48 *hpf*. Saat embrio *zebrafish* berusia 72 *hpf*, embrio dibilas menggunakan larutan medium embrionik minimal sebanyak 3 kali untuk menghilangkan bekas paparan larutan AlCl₃ yang ada di *well*. Selanjutnya, embrio hanya diberikan larutan medium embrionik hingga usia 6 *dpf* yang diganti setiap hari.

2. Kelompok Perlakuan P1, P2, dan P3 (AlCl₃ dan Pegagan)

Pemberian larutan Aluminium Klorida (AlCl₃) dengan konsentrasi 50 µM dan Pegagan dengan konsentrasi untuk masing-masing kelompok P1, P2, dan P3 (1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, dan 5 µg/ml) pada embrio *zebrafish* usia 2 *hpf*, 24 *hpf*, dan 48 *hpf* dilakukan secara bersamaan. Pada usia 72 *hpf*, embrio dibilas menggunakan larutan medium embrionik minimal 3 kali untuk menghilangkan bekas paparan yang ada di *well*. Sama seperti kelompok kontrol positif, dimulai pada 72 *dpf* hingga embrio berusia 144

hpf (6 *dpf*), embrio hanya diberikan medium embrionik yang diganti tiap harinya.

Adapun pemberian larutan $AlCl_3$ dan pegagan pada masing-masing Kelompok perlakuan terangkum pada tabel di bawah ini:

Tabel 4.2 Pemberian Larutan $AlCl_3$ dan Pegagan

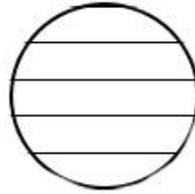
Kelompok	Konsentrasi $AlCl_3$ (μM)	Konsentrasi Pegagan ($\mu g/ml$)	Stok $AlCl_3$ ($2,5 \times 10^3 \mu M$)	Stok Pegagan (1) (mg/ml)	Medium Embrionik (ml)	Jumlah well	Volume tiap well (ml)
P1	50	1,25	0,3	18,75	15	3	15
P2	50	2,5	0,3	37,5	15	3	15
P3	50	5	0,3	75	15	3	15

1.9 Pengukuran Lokomotor

Sebanyak 5 Sampel dari tiap kelompok dipilih secara acak untuk diperiksa lokomotornya (Rihel *et al.*, 2010; Lambert *et al.*, 2012) menggunakan modifikasi pengukuran lokomotor oleh prosedur Goody & Henry (2012) dan pengukuran jarak atau pola (*pattern*) renang zebrafish pada saat yang bersamaan (Selvaraj & Santhakumar, 2017). Adapun prosedur pengukurannya ialah sebagai berikut:

1. Kertas pola yang telah dicetak diletakkan dibawah *microplate* 12 *well*/sumuran dan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran yang telah ditentukan sebelumnya.
2. *Zebrafish* diletakkan di dalam *well* yang berisi cairan embrionik menggunakan pipet plastik.
3. Rekam video proses pengukuran saat *zebrafish* dalam posisi diam.
4. Lakukan pengukuran dengan tahap sebagai berikut:
 - a. Pada usia 3 *dpf*, sentuh ekor *zebrafish* secara perlahan dan lembut menggunakan ujung jarum (*needle*)/*poker*.
 - b. Pada usia 4, 5, dan 6 *dpf*, dilakukan perekaman selama 1 menit (Pratama, 2017).

5. Lakukan penilaian dan perhitungan gerakan *zebrafish* berapa kali melewati garis pola.



Gambar 4.1 Lingkaran Pola Lokomotor

6. Untuk pengukuran pola renang *zebrafish* dianalisis menggunakan *software* ImageJ versi 1.8.0 (Ingebretson & Masino, 2013; Selvaraj & Santhakumar, 2017).

1.10 Pengukuran Osifikasi Tulang

Larva *zebrafish* yang berusia 6 *dpf* diterminasi dan diperiksa osifikasi tulang dengan menggunakan pewarnaan *Alizarin red* (Art. 6279 Alizarinrot S.).

Prosedur pewarnaan *Alizarin red* oleh Jonathan Knight (2009) dalam Dianita (2017) dengan modifikasi ialah sebagai berikut:

1. Larva *zebrafish* difiksasi menggunakan alkohol 96% selama 12 jam.
2. Kemudian larva direndam dalam aquadest selama semalam.
3. Larva direndam dalam KOH 1% dengan Hodrogen peroksida 3% (sekitar 5 ml 3% H₂O₂ dalam larutan KOH 1% 100 ml) selama 15 menit. Pigmen hitam *zebrafish* harus berubah menjadi warna coklat hingga coklat muda. Langkah ini tidak dilakukan melebihi waktu yang ditentukan karena dapat merusak jaringan *zebrafish*.
4. Larva kemudian dibilas bersih dengan aquadest selama 10 menit.
5. Selanjutnya larva direndam dengan pewarna alizarin red 1 mg/ml selama 3 hari.
6. Setelah 3 hari, larva *zebrafish* dibilas bersih menggunakan air aquadest.

7. Larva yang telah diwarnai dengan *alizarin red* diamati dibawah mikroskop dan diukur densitas warnanya (*integrated density*) menggunakan *software imageJ* versi 1.8.0.

1.11 Pengukuran Kadar Sirtuin1 (SIRT1)

Sampel diukur menggunakan RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). *Reverse Transcription* PCR adalah teknik laboratorium yang menggabungkan transkripsi terbalik RNA menjadi DNA (dalam konteks ini disebut DNA komplementer atau cDNA) dan amplifikasi target DNA spesifik menggunakan reaksi rantai polimerase (PCR). Primer SIRT1 yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Forward*: CAAGGAAATCTACCCCGGACAGT, *Reverse*: CAGTGTGTCGATATTCTGCGTGT (Sheng *et al.*, 2018).

Reaksi umumnya dijalankan sebanyak 40 siklus. Ada tiga langkah utama dalam pembentukan tiap siklus pada reaksi PCR real-time yaitu, 1) Tahapan pertama, denaturasi dsDNA yaitu 'pelehan' DNA pada suhu 95°C untuk memisahkan untaian DNA sehingga menjadi untaian tunggal; 2) Tahapan kedua ialah *annealing*, agar primer dapat mengikat pada untaian tunggal DNA, suhu diturunkan perlahan untuk memulai reaksi menghasilkan rantai yang baru. Suhu yang sesuai digunakan berdasarkan suhu leleh, dihitung dari primer yang digunakan (5°C lebih rendah daripada suhu leleh primer); 3) Tahap ketiga ialah *elongation* atau amplifikasi PCR dimana DNA diperpanjang menggunakan primer (Fraga *et al.*, 2014; Sheng *et al.*, 2018).

Total RNA diekstraksi dari larva zebrafish usia 6 dpf menggunakan *Total RNA Mini Kit* oleh Geneaid dengan prosedur dilakukan sesuai pada yang tertera dalam protocol (Geneaid, 2013). Adapun langkahnya ialah sebagai berikut:

1. Menyiapkan sampel untuk isolasi RNA. Pindahkan sampel ke dalam eppendorf

2. Menyiapkan bahan untuk isolasi RNA

- Mengencerkan ethanol 100 % sebanyak 100 ml dengan di tambahkan *wash buffer* sebanyak 25 ml

- Membuat ethanol 70 % dengan cara menambahkan 21 ml ethanol 100% dengan 9 ml aquadest

3. Ekstraksi RNA

- Sentrifugasi eppendorf yang berisi sampel dengan kecepatan 14.000 rpm
- Buang cairan yang masih terdapat dalam eppendorf

4. Cell lysis

- Tambahkan 400 μ l buffer dalam masing-masing eppendorf lalu homogenisasi dengan micropestel lalu masukkan 4 μ l 2-mercaptoethanol pada masing-masing eppendorf

- Vortex sampel

- Pindahkan sampel ke dalam filter coloum untuk mendapatkan pellet lalu sentrifugasi 30 detik dengan kecepatan 1000 rpm

- Pindahkan supernatan dalam *tube* baru lalau di tambah 400 μ l ethanol 70% ke dalam masing-masing *tube*. Kemudian pindahkan dalam *RB Column* dan di *sentrifuge* selama 1 menit dengan kecepatan 14.000-16.000 rpm

- Ambil peletnya lalau tambahkan W1 sebanyak 400 μ l kemudian *sentrifuge* kembali selama 30 detik dengan kecepatan 14.000

- Buang cairan lalau tambahkan *wash buffer* yang telah di campur ethanol sebanyak 600 μ l/tube, *sentrifuge* selama 30 detik dengan kecepatan 14.000 rpm dan buang cairan. Langkah ini dilakukan sebanyak 2 kali.

- Keringkan *Rb Column* dengan cara mensentrifugasi selama 3 menit

- Pindahkan filter *Rb Column* dalam ependorf lalu tambahkan 50 μ l *Rnase Free water* lalu diamkan selama 2 menit.
 - Sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 14.000 rpm
5. Mengukur tingkat kemurnian isolasi RNA
- Masukkan 2 μ l hasil isolasi Rna dalam nanodrop spektrofotometri
 - Kemurnian yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1.8 – 2.0

Kemudian dilakukan sintesis cDNA sebagai berikut:

1. Menghitung stok agar semua sampel dalam konsentrasi yang sama
2. Mereaksikan gDNA dengan cara mencampur 264 4x DNA *Master Mix* dengan 5,4 gDNA
3. Memasukkan stok yang kemudian di tambah *diasetilasi water* dengan total volume 10 μ l
4. Denaturasi sampel selama 5 menit pada suhu 65°C lalu letakkan di atas es
5. Tambahkan 20 μ l reaksi gDNA (pada langkah 2) dan 50 μ l *Nuclease water free*
6. Inkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit
7. Tambahkan 20 μ l 5x RT Mix II lalu sentrifugasi
8. Inkubasi sampe pada suhu 37°C selama 15 menit, pada suhu 50°C selama 5 menit dan suhu 98 °C selama 5 menit
9. Simpan sampel dalam suhu 4°C hingga – 20°C.

Kemudian dilakukan *running PCR* dan pembacaan pada agar elektroforesis dengan langkah sebagai berikut:

1. Letakkan sampel diatas es
2. Ambil *water nuklease free*
3. Encerkan primer menjadi 100 pmol dari sediaan 100 gr.
4. Campur antara *water nuklease free* dan primer.

5. Ambil 1 μ l dari stok primer *reverse dan forward*, jadikan satu dalam PCR *tube*.
6. Tambahkan PCR mix 12,5 μ L.
7. Tambahkan sampel 3 μ L.
8. Tambahkan 7,5 μ L *water nuclease free* sehingga total 25 μ L.
9. Tutup PCR *tube*.
10. Masukkan dalam tempat inkubasi dengan suhu 55°C.
11. Masukkan kedalam mesin running PCR.
12. Suhu annealing untuk primer SIRT1 yang digunakan dalam penelitian ini ialah 60°C.
13. Buat agarose 1,5 %
14. Pindahkan gel beserta cetakannya ke dalam *DNA electrophoresis chamber*
15. Masukkan sampel ke masing-masing well, total volume 6 μ L (dengan perbandingan sampel dan loading dye = 5 μ L sampel + 1 μ L loading dye)
16. Gunakan marker 100 bp. Masukkan DNA ladder kedalam well dengan volume 3 μ L di tambah loading dye dengan volume 1 μ L
17. Running electrophoresis pada tegangan 80 V selama 40 menit
18. Visualisasi DNA dengan menggunakan program GelDoc.

1.12. Pengukuran Apoptosis

Pengukuran apoptosis sel pada larva *zebrafish* menggunakan metode yang umum dan cukup mudah dilakukan yaitu *detection of apoptosis in whole mount*. *Zebrafish* pada hari ke-3 diwarnai dengan *acridine orange* (AO) sehingga sel yang mengalami apoptosis akan terlihat berpendar bila diamati menggunakan mikroskop fluorescence (panjang gelombang 460 – 530 nm). *Acridine Orange* adalah pewarnaan metakromatik selektif asam nukleat yang berguna untuk mempelajari pola apoptosis (Deng *et al.*, 2009). Embrio *zebrafish* diinkubasi dengan PTU 0,003% untuk mencegah pembentukan pigmen sejak 2 *hpf*.

Adapun langkah pengukuran apoptosis dengan pewarnaan *acridine orange* ialah sebagai berikut (Mathias *et al.*, 2014; Kurnianingsih *et al.*, 2016; Rahma *et al.*, 2017):

1. Larva zebrafish diinkubasi dalam PTU 0,003% sejak usia 2 *hpf*, dipertahankan hingga usia 72 *hpf*.
2. Larva dibilas dengan menggunakan medium embrionik sebanyak 3 kali.
3. Larva zebrafish diinkubasi di dalam medium embrionik yang mengandung AO dengan konsentrasi 5 µg/ml selama 60 menit dalam kondisi gelap (tertutup alumunium foil)
4. Larva dibilas dengan medium embrionik
5. Sampel dianastesi menggunakan tricaine 0,016 %
6. Larva ditempatkan pada *object glass*
7. Larva difoto menggunakan mikroskop *fluorescence*
8. Hasil gambar/foto dianalisis menggunakan *software* ImageJ untuk mengetahui nilai *integrated density*

1.13 Pengolahan dan Analisis Data

Untuk analisis data, seluruh data yang diperoleh sebelumnya dimasukkan ke dalam *dummy table* seperti dibawah ini:

1. Lokomotor

Tabel 4.3 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Lokomotor Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium Klorida (AlCl₃)

Usia	4 dpf				5 dpf				6 dpf			
	AI	P1	P2	P3	AI	P1	P2	P3	AI	P1	P2	P3
Lokomotor (Kali/Menit)												
Rata-Rata												

2. Osifikasi Tulang Keras

Tabel 4.4 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Osifikasi Tulang Keras Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium Klorida ($AlCl_3$) Usia 6 dpf

Kelompok	Densitas Tulang (pixels)
KN	
KP	
P1	
P2	
P3	

3. Ekspresi SIRT1

Tabel 4.5 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi SIRT1 Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium Klorida ($AlCl_3$) Usia 6 dpf

Kelompok	Ekspresi SIRT1 (pixels)
KN	
KP	
P1	
P2	
P3	

4. Apoptosis

Tabel 4.6 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella Asiatica*) Terhadap Apoptosis Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium Klorida ($AlCl_3$) Usia 3 dpf

Kelompok	Apoptosis (pixels)
KN	
KP	
P1	
P2	
P3	

Analisis data menggunakan bantuan program SPSS versi 25.0 dengan tingkat kepercayaan sebesar 95% dan *p value* < 0,05. Adapun uji statistika yang akan digunakan ialah:

1. Uji normalitas data dengan uji *saphiro-wilk*, dengan ketentuan jika *p value* > 0,05, maka dinyatakan data memiliki distribusi yang normal.
2. Uji homogenitas data dilakukan dengan *levene's test*, dengan ketentuan jika *p value* > 0,05, dinyatakan data homogenus atau memiliki varian yang sama.

3. Untuk menganalisa perbedaan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella Asiatica*) terhadap ekspresi SIRT1, apoptosis dan osifikasi tulang keras pada larva *zebrafish* yang dipapar aluminium klorida ($AlCl_3$) untuk masing-masing kelompok (KN, KP, P1, P2, dan P3), maka uji statistik yang akan digunakan ialah uji *One Way ANOVA*. Bila hasil $p\ value < 0,05$, dapat disimpulkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok. Uji statistika selanjutnya ialah *Post-Hoc LSD (Least Significant Difference)* yang bertujuan mengetahui perbedaan paling bermakna terdapat pada kelompok apa, sehingga dapat diketahui berapa dosis ekstrak pegagan yang paling memiliki efek terhadap masing-masing variabel dependen yang diuji.
4. Untuk menganalisa perbedaan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap lokomotor larva *zebrafish* yang dipapar aluminium klorida ($AlCl_3$) untuk masing-masing kelompok (KN, KP, P1, P2, dan P3), maka uji statistik yang akan dilakukan ialah uji *Repeated ANOVA*. Bila hasil $p\ value < 0,05$, dapat disimpulkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok. Selanjutnya dilakukan uji statistika *Post-Hoc LSD (Least Significant Difference)*.
5. Bila data tidak memenuhi persyaratan uji *One Way ANOVA*, maka uji statistika yang akan dilakukan adalah uji *Kruskal-Walis*.
6. Uji statistika Pearson dilakukan untuk menguji korelasi antar variabel. Bila hasil $p\ value < 0,05$, maka dapat diinterpretasi bahwa ada perbedaan yang signifikan antar variabel yang diuji.

Interpretasi kekuatan dan arah korelasi dalam uji hipotesis ini dapat dirumuskan ke dalam tabel berikut:

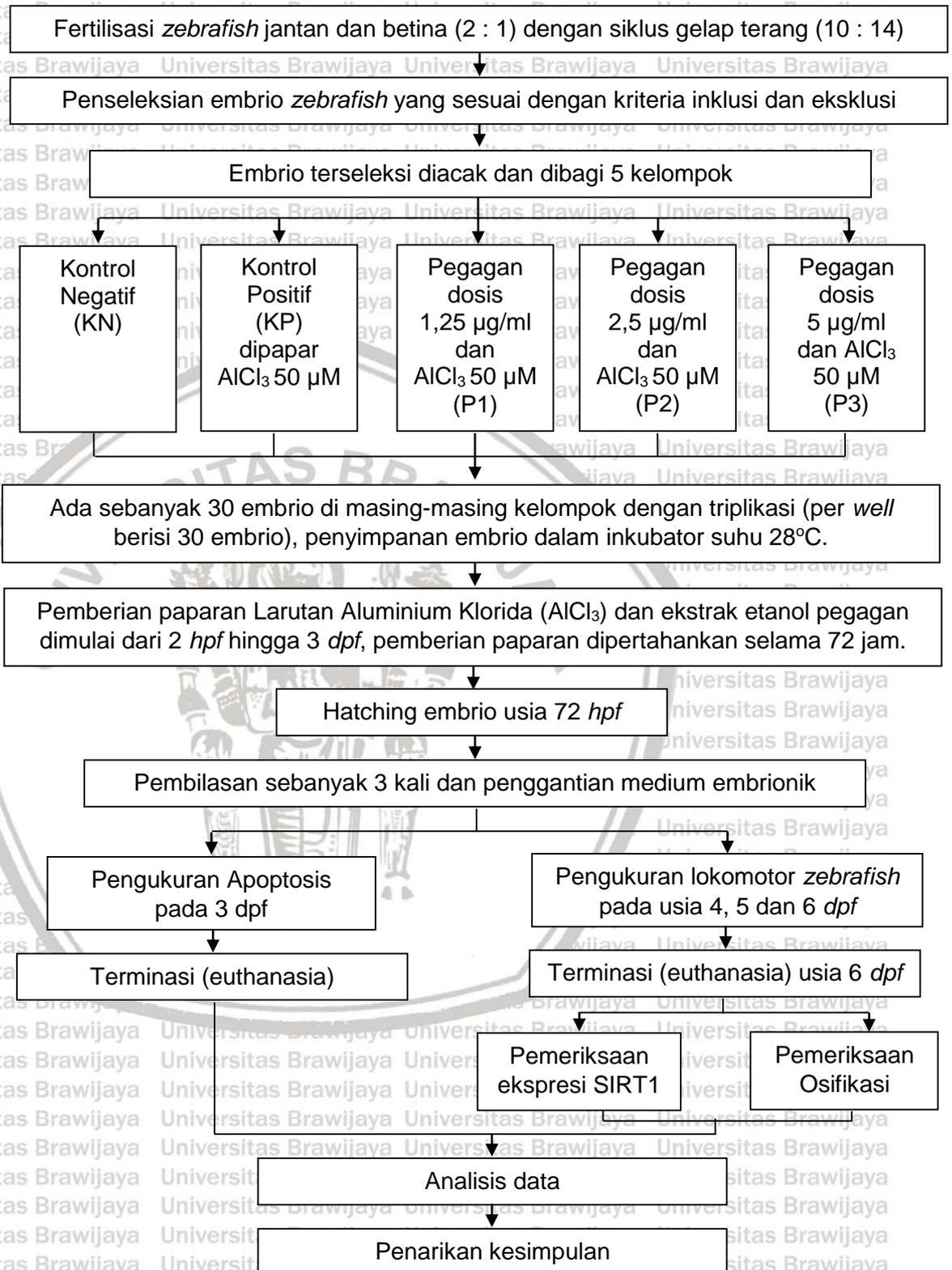
Tabel 4.7 Kekuatan dan Arah Korelasi

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, maksudnya semakin tinggi besaran suatu variabel maka semakin tinggi pula besaran variabel lainnya.
		- (negatif)	Berlawanan arah, maksudnya semakin tinggi besaran suatu variabel, maka semakin rendah besaran variabel lainnya.

Keterangan: Interpretasi uji hipotesis korelatif (Dahlan, 2011).



1.14 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

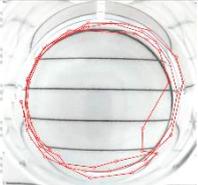
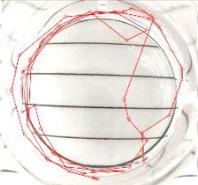
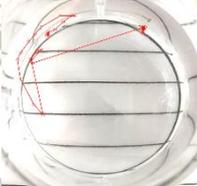
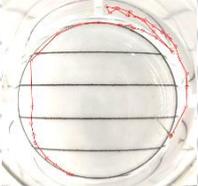
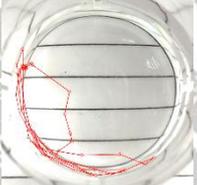
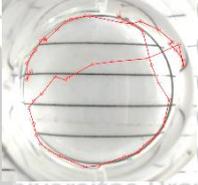
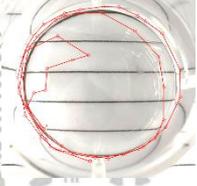
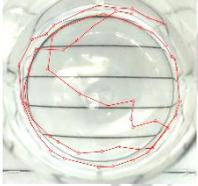
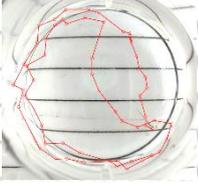
Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, Laboratorium UIN Malang, dan Institut Biosains Universitas Brawijaya pada model hewan coba zebrafish dengan parameter yang diukur ialah aktivitas lokomotor, osifikasi tulang keras, ekspresi Sirtuin 1 (SIRT1), dan apoptosis sel.

1.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Lokomotor Zebrafish yang Dipapar Aluminium

Pengukuran aktivitas lokomotor zebrafish dilakukan dengan merekam video pergerakan larva zebrafish selama 1 menit. Jarak tempuh larva zebrafish ditentukan dengan menghitung berapa kali gerakan larva melewati garis dalam waktu 1 menit tersebut dan gerakannya ditelusuri menggunakan *software ImageJ*.

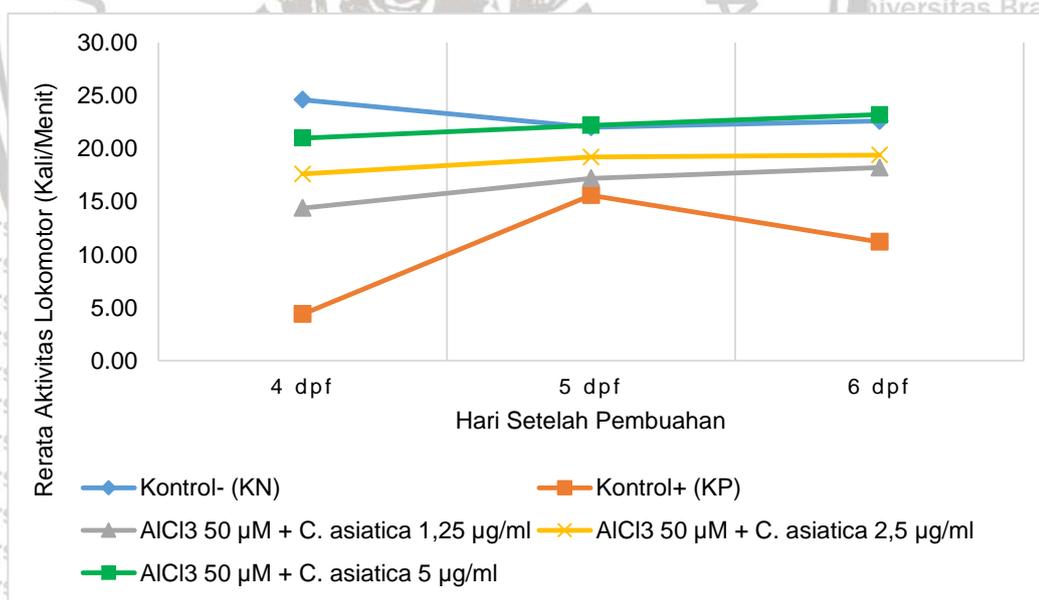
Berikut aktivitas, rerata dan standar deviasi lokomotor larva zebrafish yang diukur pada usia 4, 5 dan 6 *dpf* (*day post fertilization*):

Tabel 5.1 Representasi Pola Gerakan Lokomotor dan Rerata Aktivitas Lokomotor Pada Larva Zebrafish Usia 4, 5 dan 6 dpf

Kelompok	Usia Larva Zebrafish		
	4 dpf	5 dpf	6 dpf
Kontrol Negatif (KN)			
Rerata (kali/menit) ± Standar Deviasi	24.60 ± 3.44	22.00 ± 4.74	22.60 ± 5,37
Kontrol Positif (KP) (AlCl ₃ 50 µM)			
Rerata (kali/menit) ± Standar Deviasi	4.40 ± 4.16	15.60 ± 2.70	11.20 ± 3.90
Perlakuan 1 (P1) (AlCl ₃ 50 µM + Pegagan 1,25 µg/ml)			
Rerata (kali/menit) ± Standar Deviasi	14.40 ± 3.29	17.20 ± 4.76	18.20 ± 1.79
Perlakuan 2 (P2) (AlCl ₃ 50 µM + Pegagan 2,5 µg/ml)			
Rerata (kali/menit) ± Standar Deviasi	17.60 ± 3.85	19.20 ± 4.21	19.40 ± 2.70
Perlakuan 3 (P3) (AlCl ₃ 50 µM + Pegagan 5 µg/ml)			
Rerata (kali/menit) ± Standar Deviasi	21.00 ± 2.00	22.20 ± 1.64	23.20 ± 2.39

Keterangan: Pada pola gerakan lokomotor yang direkam selama 1 menit ditelusuri *trace gerakan* menggunakan *software ImageJ* dan diberi warna merah. Dapat dilihat terjadi pada kelompok kontrol positif mengalami penurunan pola gerakan ditandai dengan lebih sedikitnya garis berwarna merah bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Terjadi peningkatan pola gerakan seiring dengan penambahan konsentrasi pegagan baik pada hari ke-4, ke-5 dan ke-6, ditandai dengan penambahan garis berwarna merah.

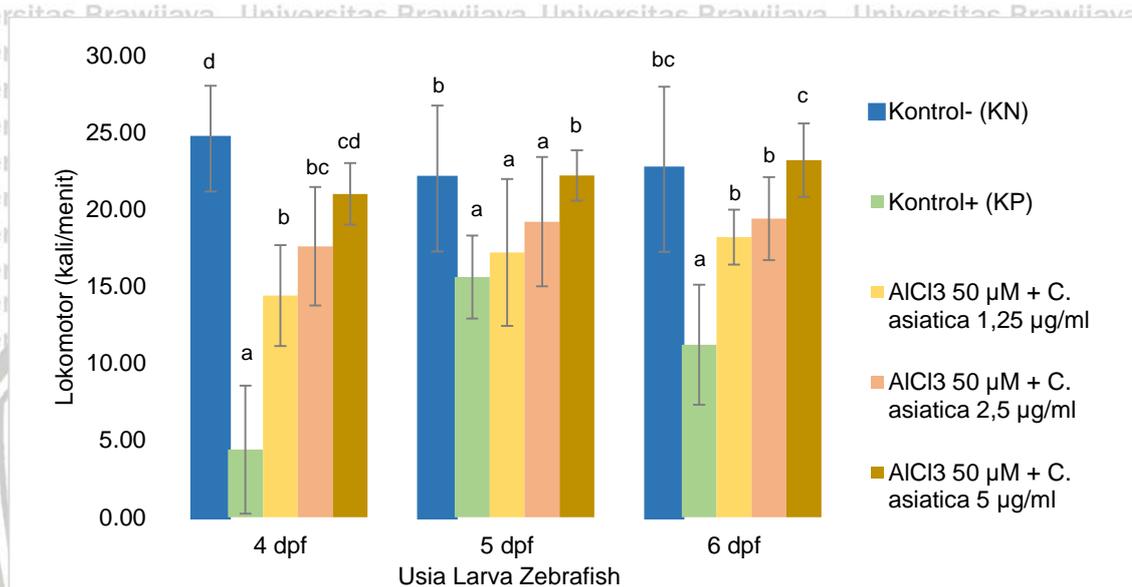
Pada gambar di tabel 5.1, terlihat terjadi penurunan gerakan lokomotor. Pada kelompok kontrol positif (KP), terlihat perbedaan aktivitas dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (KN), dimana terjadi penurunan aktivitas lokomotor baik pada 4 dpf, 5 dpf, maupun 6 dpf yang menunjukkan bahwa logam aluminium dapat menyebabkan penurunan aktivitas lokomotor. Hal ini juga terlihat dari penurunan rerata aktivitas lokomotor pada kelompok KP dibandingkan dengan kelompok KN. Pada kelompok perlakuan P1, P2, dan P3, terjadi peningkatan lokomotor yang dapat dilihat dengan bertambahnya kepadatan pergerakan di dalam sumuran. Bila membandingkan antara kelompok KP dan kelompok perlakuan P1, P2 dan P3, maka dapat dilihat terjadinya perbaikan aktivitas lokomotor terutama P3 dimana pola pergerakannya hampir mendekati kelompok KN, sehingga dapat disimpulkan pegagan dapat mencegah penurunan aktivitas lokomotor oleh aluminium.



Gambar 5.1 Gerakan Locomotor Larva Zebrafish Usia 4, 5, dan 6 dpf

Keterangan: Gerakan lokomotor diukur secara manual berapa kali larva zebrafish berenang melewati garis dalam waktu 1 menit. Grafik di atas menunjukkan gerakan lokomotor pada zebrafish 4, 5 dan 6 dpf (n=5). Terjadi penurunan lokomotor pada kelompok zebrafish yang dipapar dengan AICl₃ 50 µM (KP) dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Terjadi peningkatan gerakan lokomotor seiring dengan penambahan konsentrasi pegagan. Gerakan lokomotor larva zebrafish pada konsentrasi pegagan 5 µg/ml meningkat hingga nilainya mendekati kelompok kontrol.

Dari grafik di atas dapat dilihat dengan jelas bahwa aktivitas lokomotor kelompok KP selalu berada di bawah kelompok KN maupun kelompok P1, P2, dan P3. Pada usia 3 dan 4 dpf, aktivitas lokomotor kelompok KN dan kelompok perlakuan P3 nilainya mendekati atau tidak terlalu berbeda. Berikut perbandingan lokomotor larva zebrafish berdasarkan nilai rata-rata pada usia 4, 5 dan 6 dpf.



Gambar 5.2 Rerata Aktivitas Locomotor Larva Zebrafish pada Seluruh Kelompok Usia 4, 5, dan 6 dpf

Keterangan: Pada Grafik ini menunjukkan aktivitas lokomotor pada zebrafish usia 4, 5 dan 6 dpf (n=5). Terjadi penurunan aktivitas lokomotor pada kelompok zebrafish yang dipapar dengan AICl₃ 50 µM dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Ada perbedaan yang signifikan antara kelompok dengan notasi huruf yang berbeda. Kelompok KP menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok KN. Pada kelompok perlakuan dengan konsentrasi pegagan 5 µg/ml menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan dengan kelompok kontrol, menunjukkan konsentrasi optimal pegagan terdapat pada kelompok ini.

Aktivitas lokomotor pada larva zebrafish pada tiap kelompok terlihat berbeda sejak 4 dpf. Terjadi penurunan aktivitas lokomotor kelompok KP dan peningkatan aktivitas lokomotor pada kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 yang terjadi seiring dengan peningkatan dosis. Makin tinggi dosis pegagan yang diberikan, maka perbaikan aktivitas lokomotor yang terjadi makin baik. Data rerata

aktivitas lokomotor ini diuji analisis menggunakan *software* SPSS v.25. Pada uji normalitas *Saphiro-Wilk* didapatkan hasil data berdistribusi normal pada hari ke 4, 5 dan 6 dengan *p value* > 0.05. Hasil uji lavene menunjukkan *p value* sebesar 0.470 pada 4 *dpf*, 0.054 pada 5 *dpf*, dan 0.030 pada 6 *dpf*, sehingga diambil kesimpulan bahwa data pada 4 dan 5 *dpf* memiliki varian yang sama sedangkan pada hari ke-6 data memiliki varian yang berbeda. Kemudian dilakukan uji *One Way ANOVA* pada tiap data tersebut dilanjutkan dengan uji Post Hoc LSD.

Uji statistic *One Way Annova* menunjukkan adanya perbedaan setidaknya pada satu kelompok pada tiap kelompok baik pada usia 4 *dpf*, 5 *dpf*, maupun 6 *dpf* dengan nilai signifikansi pada usia 4 *dpf* sebesar 0.000, pada usia 5 *dpf* sebesar 0.048 dan pada 6 *dpf* sebesar 0.000. Dengan demikian dapat ditarik kesimpulan adanya perbedaan signifikan aktivitas lokomotor larva zebrafish usia 4 *dpf*, 5 *dpf*, maupun 6 *dpf* pada tiap kelompok.

1.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Osifikasi Tulang Keras Zebrafish yang Dipapar Aluminium

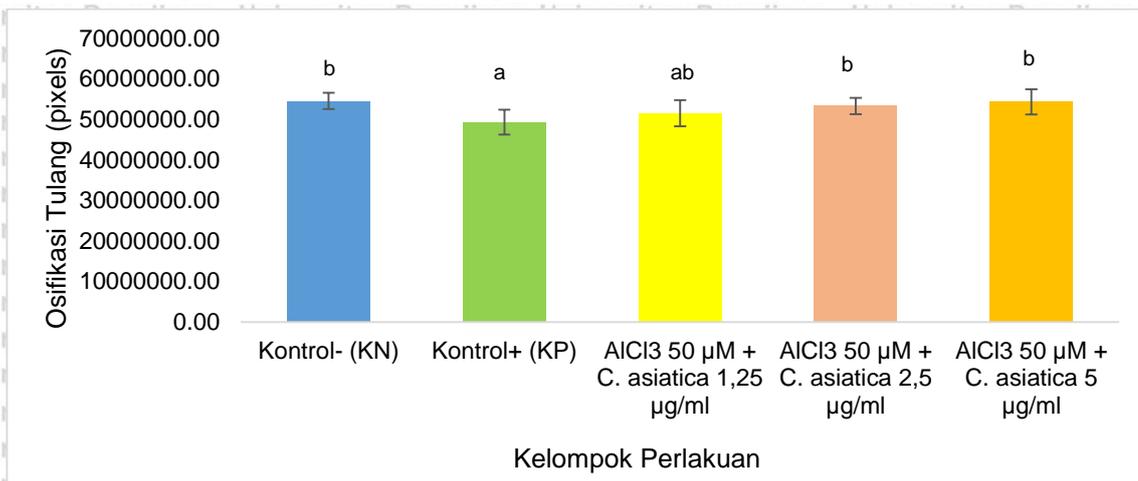
Osifikasi tulang keras larva zebrafish diukur dengan pewarnaan menggunakan *alizarin red* terhadap larva zebrafish pada usia 6 *dpf*. Larva yang telah diwarnai difoto menggunakan mikroskop dan kamera *optilab*, kemudian dianalisis densitasnya menggunakan *software* ImageJ. Berikut adalah representasi larva zebrafish dari tiap kelompok yang telah diwarnai menggunakan *alizarin red*.

Tabel 5.2 Representasi Hasil Perwarnaan Osifikasi Tulang Keras dan Rerata Densitas Tulang Larva Zebrafish Usia 6 dpf

Kelompok	Osifikasi Tulang
Kontrol Negatif (KN)	
Rerata ± Standar Deviasi	54556630.20 ± 2017114.61 pixels
Kontrol Positif (KP) (AlCl ₃ 50 µM)	
Rerata ± Standar Deviasi	49286800.40 ± 3079870.93 pixels
Perlakuan 1 (P1) (AlCl ₃ 50 µM + Pegagan 1,25 µg/ml)	
Rerata ± Standar Deviasi	51525122.80 ± 3206572.71 pixels
Perlakuan 2 (P2) (AlCl ₃ 50 µM + Pegagan 2,5 µg/ml)	
Rerata ± Standar Deviasi	53299809.60 ± 2034837.64 pixels
Perlakuan 3 (P3) (AlCl ₃ 50 µM + Pegagan 5 µg/ml)	
Rerata ± Standar Deviasi	54348298.40 ± 3114017.74 pixels

Keterangan: Representasi hasil pewarnaan tulang keras menggunakan Alizarin Red (Art. 6279 Alizarinrot S) pada usia 6 dpf difoto dengan mikroskop okuler dengan pembesaran 3 kali dan kamera optilab advance (PT Miconos). Tulang Keras terwarnai merah. Dapat dilihat terjadi penurunan osifikasi tulang pada kelompok KP ditandai dengan lebih pudarnya warna merah. Densitas tulang keras dianalisis menggunakan software imageJ.

Densitas dari tiap larva zebrafish usia 6 dpf pada kelompok KN, KP, P1, P2, dan P3 kemudian di rerata dan dituangkan pada grafik sebagai berikut:



Gambar 5.3 Perbandingan Rerata Densitas Tulang Keras Larva Zebrafish pada Usia 6 dpf

Keterangan: Pada Grafik ini menunjukkan osifikasi tulang keras pada zebrafish usia 6 dpf (n=5). Terjadi penurunan osifikasi tulang keras pada kelompok zebrafish yang dipapar dengan AICl₃ 50 µM dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Terjadi peningkatan osifikasi tulang seiring dengan peningkatan konsentrasi pegagan. Ada perbedaan yang signifikan antara kelompok dengan notasi huruf yang berbeda. Kelompok KP menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok KN. Pada kelompok perlakuan dengan konsentrasi pegagan 5 µg/ml menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan dengan kelompok kontrol, menunjukkan konsentrasi optimal pegagan terdapat pada kelompok ini.

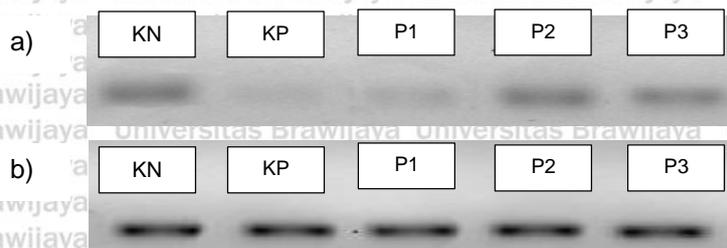
Pada kelompok KP yang diberikan aluminium dengan konsentrasi 50 µM, terjadi penurunan osifikasi tulang bila dibandingkan dengan kelompok KN. Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa aluminium yang diberikan sejak 2 hpf (*hour post fertilization*) ini dapat menyebabkan penurunan osifikasi tulang keras pada larva zebrafish. Sementara itu pada kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 yang diberi paparan AICl₃ ditambah pegagan dengan konsentrasi 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml dan 5 µg/ml berturut-turut, mengalami peningkatan osifikasi tulang seiring dengan pertambahan konsentrasi pegagan. Makin tinggi konsentrasi pegagan, maka makin tinggi pula densitas tulang keras bila dibandingkan dengan kelompok yang hanya dipapar aluminium saja. Pada kelompok P3, peningkatan densitas tulang keras nilainya mendekati kelompok KN. Kemudian data rerata densitas atau osifikasi tulang keras ini dianalisis secara statistik dengan uji *One Way Anova*.

Untuk memenuhi syarat pengujian tersebut, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas data dengan uji *Levene*. Data dinyatakan berdistribusi normal dengan nilai $p = 0.685$ ($p > 0.05$) dan homogen dengan nilai $p = 0.355$ ($p > 0.05$). Hasil tes *One Way Anova* menunjukkan adanya perbedaan osifikasi tulang keras yang signifikan ($p < 0.05$) pada tiap kelompok dengan p value 0.034. Karena adanya perbedaan yang signifikan, dilakukan uji *Post Hoc* LSD. Kelompok KN secara signifikan memiliki perbedaan dengan kelompok KP (p value = 0.007), sedangkan KP mempunyai perbedaan yang signifikan terhadap kelompok perlakuan P2 (p value = 0.032) dan kelompok perlakuan P3 (p value = 0.009) meskipun antar kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 tidak ditemukan perbedaan yang signifikan (p value > 0.05).

Berdasarkan uji analisis di atas, maka dapat disimpulkan bahwa pegagan dapat mencegah terjadinya penurunan osifikasi tulang keras pada larva zebrafish yang dipapar dengan aluminium. Terjadi peningkatan osifikasi tulang keras larva zebrafish pada tiap kelompok yang diberi paparan ekstrak etanol pegagan yang bertambah sesuai dengan penambahan konsentrasi meskipun perbedaannya tidak signifikan secara statistik.

1.3 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi Sirtuin 1 (SIRT1) pada Zebrafish yang Dipapar Aluminium

Pemeriksaan ekspresi Sirtuin 1 (SIRT1) pada larva zebrafish dilakukan pada usia 6 dpf dengan metode *Reverse Transcriptase PCR* (RT-PCR). Hasil dari densitas yang diukur direratakan untuk semua kelompok.



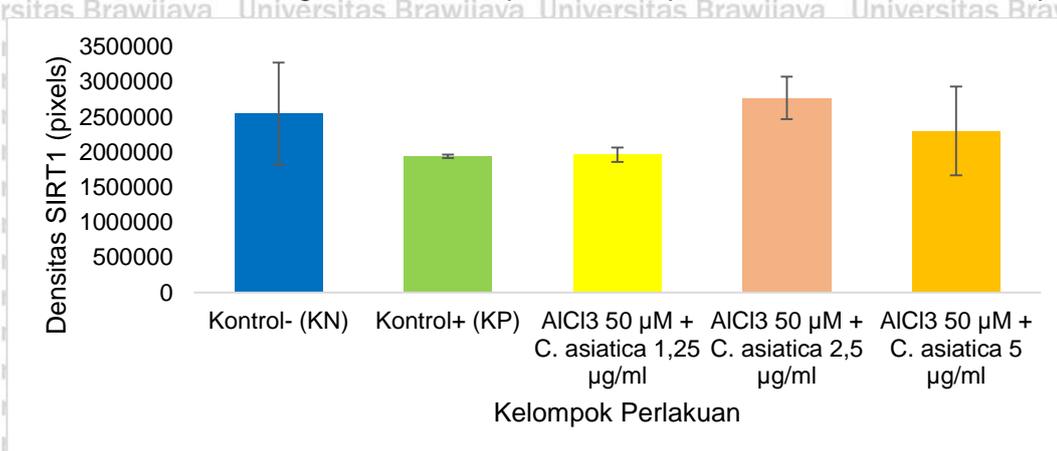
Gambar 5.4 Hasil PCR Ekspresi SIRT1 dan β -Actin Zebrafish Usia 6 dpf

Keterangan: Grafik ini menunjukkan ekspresi SIRT1 pada zebrafish usia 6 dpf setelah pemeriksaan dengan metode RT-PCR. (a) Hasil PCR SIRT1, *Band* 1 menunjukkan Kelompok KN; *Band* 2 menunjukkan Kelompok KP; *Band* 3 menunjukkan Kelompok P1; *Band* 4 menunjukkan Kelompok P2; *Band* 5 menunjukkan Kelompok P3, Tampak penurunan ekspresi SIRT1 yang ditandai dengan lebih pudarnya warna hitam pada kelompok KP bila dibandingkan dengan kelompok KN. Terjadi peningkatan ekspresi SIRT1 pada kelompok yang diberikan pegagan dengan konsentrasi 2,5 dan 5 μ g/ml. (b) Hasil PCR β -Actin. *Band* 1 menunjukkan kelompok KN; *Band* 2 menunjukkan KP; *Band* 3 menunjukkan Kelompok P1; *Band* 4 menunjukkan Kelompok P2; *Band* 5 menunjukkan Kelompok P3. Dapat dilihat bahwa ekspresi β -Actin tetap pada seluruh kelompok.

Tabel 5.3 Representasi Kuantifikasi Hasil Gel Doc Ekspresi SIRT1 Larva Zebrafish Usia 6 dpf

Kelompok	Kuantifikasi Hasil Gel Doc
Kontrol Negatif (KN)	
Kontrol Positif (KP) (AlCl ₃ 50 μ M)	
P1 (AlCl ₃ 50 μ M + Pegagan 1,25 μ g/ml)	
P2 (AlCl ₃ 50 μ M + Pegagan 2,5 μ g/ml)	
P3 (AlCl ₃ 50 μ M + Pegagan 5 μ g/ml)	

Berikut adalah grafik rerata ekspresi SIRT1 pada larva zebrafish usia 6 dpf.



Gambar 5.5 Perbandingan Rerata Ekspresi SIRT1 Zebrafish pada Usia 6 dpf

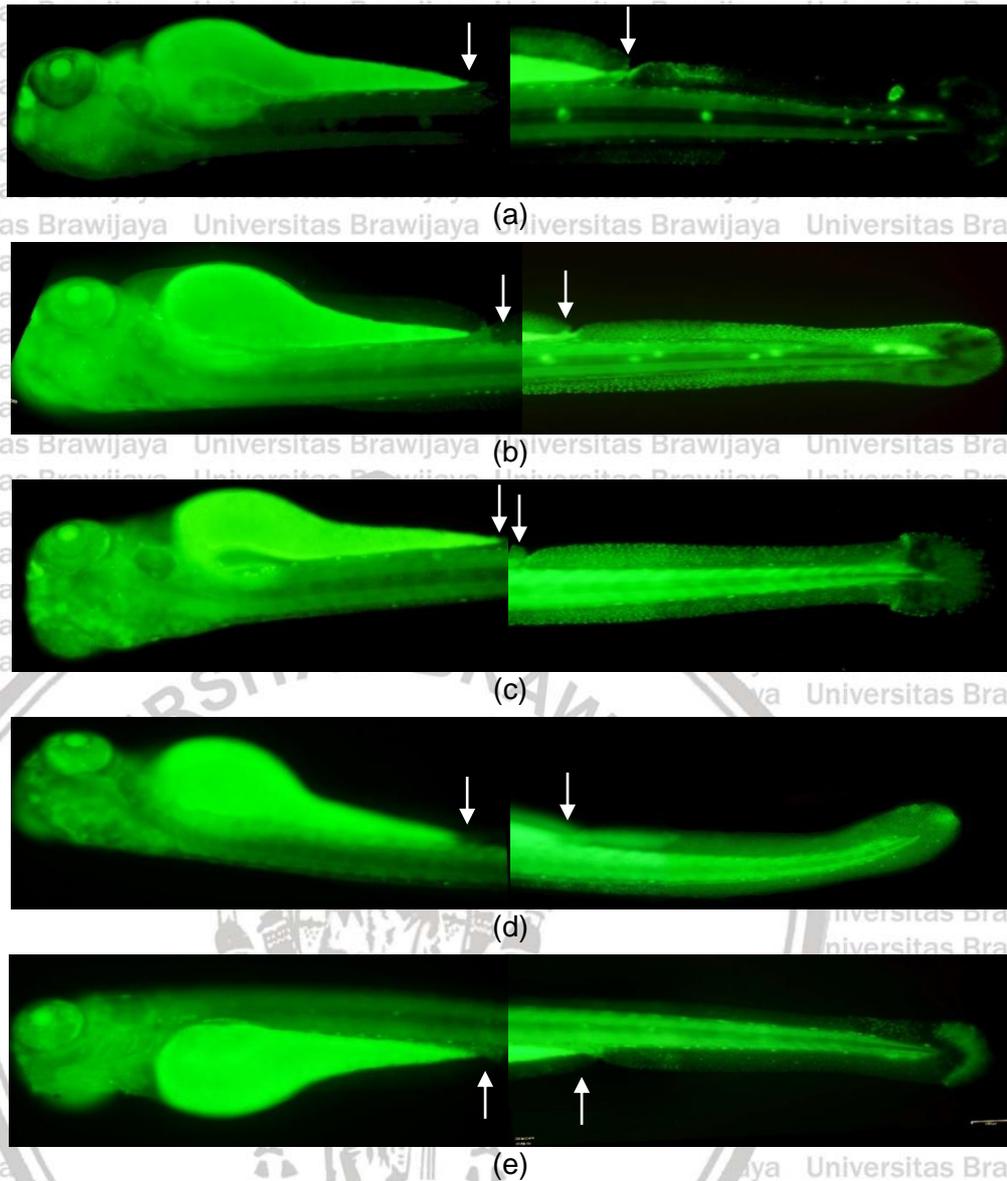
Keterangan: Pada Grafik ini menunjukkan ekspresi SIRT1 pada zebrafish usia 6 dpf setelah pemeriksaan dengan metode RT-PCR. Terjadi penurunan ekspresi SIRT1 pada larva zebrafish yang dipapar aluminium, namun pada larva yang diberikan pegagan mengalami peningkatan ekspresi SIRT1 khususnya pada konsentrasi 2,5 µg/ml, namun menurun kembali mendekati nilai kelompok KN pada konsentrasi 5 µg/ml.

Gambar 5.5 menunjukkan penurunan ekspresi SIRT1 pada kelompok KP dibandingkan dengan kelompok KN. Pada kelompok perlakuan P1 dan P2 juga terjadi peningkatan ekspresi SIRT1, meskipun pada kelompok P3 terjadi penurunan, nilainya telah mendekati nilai kelompok KN.

Uji normalitas data dengan *Saphiro Wilk* menyatakan data terdistribusi normal dengan nilai signifikansi 0.063 ($p > 0.05$) dan uji homogenitas dengan uji *Levene Test* menunjukkan data homogeny dengan nilai signifikansi 0.059 ($p > 0.05$). Hasil Uji *One Way ANNOVA* diperoleh nilai signifikansi 0.184 yang berarti tidak ada perbedaan ekspresi SIRT1 larva zebrafish antar kelompok yang bermakna ($p < 0.05$).

1.4 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Apoptosis sel Zebrafish yang Dipapar Aluminium

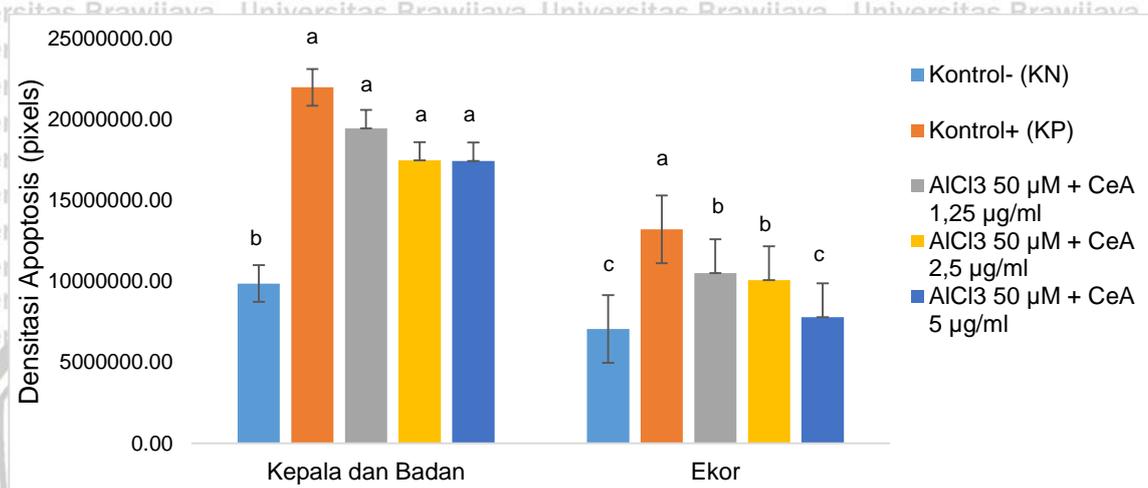
Pemeriksaan apoptosis dilakukan pada larva zebrafish usia 3 dpf dengan pewarnaan *Acridine Orang* (AO) difoto menggunakan mikroskop fluoresens pembesaran 40 kali dan dianalisa densitas warna menggunakan *software ImageJ*.



Gambar 5.6 Apoptosis Zebrafish Usia 3 dpf dengan pewarnaan Acridine Orange (AO)

Keterangan: Gambar di atas menunjukkan apoptosis pada larva zebrafish usia 3 dpf yang ditandai dengan pendaran warna hijau oleh pewarnaan *acridine orange* (AO) difoto menggunakan mikroskop fluoresens (Olympus, FSX100) pembesaran 40 kali. Pengambilan foto pada larva zebrafish dibagi menjadi dua bagian, yaitu bagian kepala dan badan dan bagian ekor dengan tanda panah berwarna putih menunjukkan daerah anus yang menjadi batas pengukuran. Pendaran terang menyala warna hijau yang tertangkap pada hasil imaging menunjukkan adanya apoptosis sel yang terjadi. Densitas warna hijau dianalisis menggunakan *software* ImageJ. (a) Kontrol Negatif (KN), (b) Kontrol Positif (KP), (c) Kelompok Perlakuan P1, (d) Kelompok Perlakuan P2, (e) Kelompok Perlakuan P3. Pada gambar di atas dapat dilihat terjadi peningkatan pendaran hijau pada kelompok KP dibandingkan dengan KN. Terjadi penurunan pendaran hijau pada kelompok yang diberi pegangan seiring dengan bertambahnya konsentrasi pegangan yang diberikan.

Pada bagian kepala dan badan, diamati terdapat pendaran terang pada daerah *yolk sac*. Terjadi pula apoptosis yang ditandai dengan pendaran terang hijau tadi pada daerah kepala dan dada. Larva zebrafish ini di ukur menggunakan imageJ untuk didapatkan nilai densitasnya. Berikut adalah perbandingan rerata densitas apoptosis oleh pewarnaan *acridine orange* (AO) pada bagian kepala dan badan:



Gambar 5.7 Perbandingan Rerata Densitas Apoptosis Bagian Kepala dan Badan dan Bagian Ekor Larva Zebrafish Pada Usia 3 dpf

Keterangan: Pada Grafik ini menunjukkan rerata densitas apoptosis pada bagian kepala dan badan zebrafish usia 3 dpf setelah pemeriksaan dengan pewarnaan *acridine orange* (AO). Terjadi peningkatan apoptosis larva zebrafish yang dipapar aluminium, dan penurunan apoptosis pada zebrafish yang terpapar aluminium dan diberi ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) baik pada bagian kepala dan badan maupun pada bagian ekor. Ada perbedaan yang signifikan antara kelompok dengan notasi huruf yang berbeda. Kelompok KP menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok KN. Pada bagian ekor, kelompok perlakuan dengan konsentrasi pegagan 5 µg/ml menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan dengan kelompok kontrol, menunjukkan konsentrasi optimal pegagan terdapat pada kelompok ini.

Dari grafik 5.9, dapat diamati adanya peningkatan apoptosis sel pada kelompok kontrol positif atau kelompok yang diberi aluminium dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan apa-apa. Terjadi penurunan apoptosis pada kelompok larva zebrafish yang dipapar aluminium dan diberikan terapi ekstrak etanol pegagan secara bertahap bila dibandingkan dengan kelompok yang hanya dipapar aluminium saja. Makin besar dosis yang diberikan,

maka apoptosis yang terjadi akan semakin menurun. Namun penurunan apoptosis di bagian kepala dan badan pada kelompok P3 dengan konsentrasi pegagan 5 µg/ml belum mendekati kelompok kontrol negatif. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pegagan yang diberikan dapat mencegah apoptosis pada larva zebrafish yang terpapar aluminium. Secara statistik, densitas apoptosis larva zebrafish pada bagian kepala dan badan memiliki distribusi data normal pada uji normalitas data *Saphiro-Wilk* dengan nilai signifikansi 0.199 ($p\ value > 0.05$) dan homogen pada uji *Lavene* dengan nilai signifikansi 0.456 ($p\ value > 0.05$). Maka, syarat uji *One Way ANNOVA* terpenuhi dan setelah diuji, secara signifikan ada perbedaan apoptosis pada kelompok larva zebrafish yang dipapar aluminium dan diberikan terapi ekstrak etanol pegagan (nilai signifikansi 0.001, $p\ value < 0.05$). Selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc LSD*, didapatkan hasil adanya beda yang signifikan antara kelompok KN dengan semua kelompok (KP, P1, P2, dan P3) dengan nilai signifikansi < 0.05 , namun tidak adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok KP dengan seluruh kelompok P1, P2, dan P3 maupun perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan P1, P2, dan P3.

Peningkatan apoptosis sel juga terjadi di bagian ekor pada kelompok KP atau kelompok yang diberi aluminium bila dibandingkan dengan kelompok KN yang tak diberikan perlakuan apa-apa. Terjadi penurunan apoptosis pada kelompok larva zebrafish yang dipapar aluminium dan diberikan terapi ekstrak etanol pegagan secara bertahap bila dibandingkan dengan kelompok yang hanya dipapar aluminium saja. Makin besar dosis yang diberikan, maka apoptosis yang terjadi akan semakin menurun. Tetapi penurunan apoptosis pada kelompok P2 tidak jauh berbeda dengan penurunan apoptosis pada kelompok P1. Sedangkan penurunan apoptosis kelompok P3 dengan konsentrasi pegagan 5 µg/ml sudah mendekati kelompok KN. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pegagan yang

diberikan dapat mencegah apoptosis pada larva zebrafish yang terpapar aluminium.

Secara statistik, densitas apoptosis larva zebrafish pada bagian ekor memiliki distribusi data normal pada uji normalitas data *Saphiro-Wilk* dengan nilai signifikansi 0.400 ($p \text{ value} > 0.05$) dan homogen pada uji *Lavene* dengan nilai signifikansi 0.107 ($p \text{ value} > 0.05$). Maka, syarat uji *One Way ANNOVA* terpenuhi dan setelah diuji, secara signifikan ada perbedaan apoptosis pada kelompok larva zebrafish yang dipapar aluminium dan diberikan terapi ekstrak etanol pegagan (nilai signifikansi 0.000, $p \text{ value} < 0.05$). Dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD (Least Significant Difference)*, adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok KP, P1, dan P2 namun tak berbeda signifikan dengan kelompok P3 ($p \text{ value} < 0.05$), dan adanya perbedaan bermakna antara kelompok KP dengan seluruh kelompok lainnya (P1, P2, P3).

1.5 Korelasi Antara Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) dengan Lokomotor, Osifikasi Tulang Keras, dan Apoptosis sel Zebrafish

Korelasi antara pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap aktivitas lokomotor, osifikasi tulang keras, dan apoptosis diuji menggunakan *Pearson Correlation*. Berikut hasil uji korelasi:

Tabel 5.4 Hasil Uji Korelasi Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) dengan Lokomotor, Osifikasi Tulang Keras, dan Apoptosis Sel Larva Zebrafish

Korelasi	Distribusi Data	Uji Korelasi	$p\text{-value}$	Keterangan
Pegagan	Lokomotor	Pearson	0.000	Hubungan yang sangat kuat
	Osifikasi Tulang Keras	Pearson	0.009	Hubungan yang sedang
	SIRT1	Spearman	0.019	Hubungan yang sangat kuat
	Apoptosis Kepala dan Badan	Pearson	0.037	Hubungan yang sedang
	Apoptosis Ekor	Spearman	0.000	Hubungan yang sangat kuat
Osifikasi Tulang Keras	Normal	Pearson	0.000	Hubungan yang sangat kuat

Berdasarkan tabel 5.2, ada hubungan yang bermakna antara pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap aktivitas lokomotor, osifikasi tulang keras, apoptosis sel bagian kepala dan badan, dan apoptosis sel bagian ekor pada larva zebrafish. Untuk hubungan antara pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap aktivitas lokomotor, nilai koefisien 0.830 (hubungan yang sangat kuat) dengan arah korelasi positif. Artinya, makin tinggi konsentrasi pegagan yang diberikan, maka semakin tinggi pula aktivitas lokomotor larva zebrafish. Hubungan antara pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap osifikasi tulang keras, nilai koefisien 0.566 (hubungan yang sedang) dengan arah korelasi positif atau searah. Artinya, makin tinggi konsentrasi pegagan yang diberikan, maka semakin tinggi nilai osifikasi tulang keras larva zebrafish. Hubungan antara pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi SIRT1, nilai koefisien 0.947 (hubungan yang sedang) dengan arah korelasi positif atau searah. Artinya, makin tinggi konsentrasi pegagan yang diberikan, maka semakin tinggi ekspresi SIRT1 larva zebrafish. Begitu pula hubungan antara pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap apoptosis sel bagian kepala dan badan dan apoptosis bagian ekor larva zebrafish, nilai koefisien berturut-turut 0.470 (hubungan sedang) dan 0.969 dengan (hubungan sangat kuat). Pada hubungan variabel pegagan dan apoptosis baik pada bagian kepala dan badan maupun bagian ekor, ditemukan arah korelasi negatif. Artinya, semakin besar konsentrasi pegagan yang diberikan, maka semakin kecil apoptosis sel larva zebrafish yang terjadi. Hubungan antara variabel osifikasi tulang keras dengan variabel aktivitas lokomotor menunjukkan adanya hubungan yang bermakna dengan nilai koefisien 0.839 (hubungan sangat kuat) dan arah korelasi positif. Maksudnya, makin tinggi osifikasi tulang keras larva zebrafish maka makin tinggi pula aktivitas lokomotor larva zebrafish.

BAB 6

PEMBAHASAN

1.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Lokomotor Zebrafish yang Dipapar Aluminium

Pada gambar 5.1 dapat dilihat adanya penurunan aktivitas lokomotor pada kelompok kontrol positif (KP) yaitu kelompok yang dipapar aluminium 50 μM yang merupakan kelompok dengan aktivitas lokomotor yang paling rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (KN), Kelompok Perlakuan 1 (P1), Kelompok Perlakuan 2 (P2), Kelompok Perlakuan 3 (P3). Perbedaan aktivitas lokomotor ini telah diamati sejak usia 4 *day post fertilization* (*dpf*). Pada 5 dan 6 *dpf*, kelompok KN merupakan kelompok dengan aktivitas lokomotor yang paling tinggi dan kelompok perlakuan P3 aktivitas lokomotornya telah mendekati kelompok KN.

Berdasarkan uji statistik *One Way Anova*, terbukti adanya perbedaan aktivitas lokomotor yang signifikan antara kelompok KN, kelompok KP, kelompok P1, kelompok P2, kelompok P3 baik pada 4 *dpf*, 5 *dpf*, maupun 6 *dpf* dengan *p value* < 0.05. Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa paparan aluminium sejak 2 *hpf* (*hour post fertilization*) atau pada masa blastula yang kemudian dipertahankan selama 72 jam atau hingga larva zebrafish berusia 3 *dpf* dapat menurunkan aktivitas lokomotor dan ekstrak etanol pegagan dapat mencegah efek penurunan aktivitas lokomotor oleh aluminium tersebut. Hal ini pun didukung dengan gambaran aktivitas lokomotor larva zebrafish dimana terjadi penurunan pergerakan tampak pada analisis *trace* menggunakan *software ImageJ*.

Penelitian yang telah dilakukan Capriello (2019) sebelumnya dimana lokomotor sebagai salah satu uji untuk menilai *behavior analysis* zebrafish ini pun menunjukkan bahwa paparan logam khususnya aluminium dapat berefek pada

penurunan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish. Capriello melakukan penelitian pada aluminium dan kadmium yang diketahui berperan dalam penyakit-penyakit neurodegeneratif dan penyakit neuromuskular. Zebrafish dipapar aluminium ketika berusia 6 *hour post fertilization (hpf)* dengan dosis 50, 100 dan 200 mM selama 72 jam. Aluminium dapat menyebabkan gangguan aktivitas lokomotor dan renang larva zebrafish pada awal perkembangan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Bila Capriello memberikan aluminium sejak embrio berusia 6 *hpf* yaitu pada masa gastrulasi, dalam penelitian kami embrio diberikan aluminium sejak usia 2 *hpf* atau ketika embrio memasuki periode blastula. Jika pada periode blastula terjadi fase cepat pembelahan, pada masa gastrulasi telah terjadi diferensiasi sel dan terbentuknya lapisan germinativum yaitu lapisan ektoderm, lapisan mesoderm dan lapisan endoderm (Sadler, 2012). Lapisan ini nantinya akan berdiferensiasi menjadi berbagai macam jaringan dan organ. Pemberian paparan aluminium pada penelitian ini telah dimulai sebelum periode gastrulasi, sehingga dapat diketahui dengan jelas bahwa aluminium menimbulkan dampak sebelum lapisan germinal terbentuk yang artinya belum terjadi diferensiasi organ. Efek ini akan mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan struktur maupun fungsi organ tubuh larva zebrafish.

Pada lokomotor sebagai salah satu gerak dasar yang fundamental (Logan *et al.*, 2012; Ozmun & Gallahue, 2016), membutuhkan kendali oleh jaringan syaraf (Le Ray *et al.*, 2011) dan juga sistem muskuloskeletal untuk pergerakan yang efektif (Giladi *et al.*, 2007). Jaringan syaraf terbentuk dari lapisan ektoderm pada periode gastrulasi, sedangkan sistem muskulosteletal dan peredaran darah berasal dari lapisan mesoderm (Sadler, 2012)

Pada zebrafish yang dipapar dengan aluminium dan mengalami penurunan aktivitas lokomotor, salah satu penyebab yang mungkin terjadi ialah gangguan saat lapisan-lapisan ini berdiferensiasi.

Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Senger (2011), pada zebrafish dewasa dengan paparan aluminium selama 96 jam dengan konsentrasi 50 µg/L.

Aluminium pada dosis subletal ini menyebabkan gangguan pada parameter perilaku yaitu lokomotor pada zebrafish dengan mengganggu aktivitas neurotransmitter pada otak zebrafish.

Penurunan aktivitas lokomotor dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor.

Contohnya, ialah gangguan aktivitas neurotransmitter yang merupakan basis komunikasi neuron dan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan, juga ingatan dan proses belajar. Horzmann (2016) menjelaskan neurotransmitter utama seperti glutamate, GABA, dopamin, norepinephrin, serotonin, asetilkolin, dan histamin, yang mengalami gangguan dapat menyebabkan gangguan pada lokomotor bila terpapar oleh obat-obatan, logam dan atau pestisida. Begitu pula bila terjadi gangguan pada reseptor dopamin D1 dan D2 yang sangat berperan dalam proses lokomotor. Penelitian Oliveri (2019) menyebutkan bahwa pemberian antagonis reseptor D1 dan D2 pada larva zebrafish usia 5 *hpf* hingga 5 *dpf* menyebabkan gangguan pada perilaku lokomotor dan secara rinci menyebabkan hiperaktivitas pada siklus gelap dan hipoaktivitas pada siklus terang.

Pada penelitian ini diketahui pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah terjadinya gangguan penurunan lokomotor tersebut. Pada penelitian kami sebelum ini juga telah dibuktikan bahwa pegagan dapat melindungi aktivitas lokomotor, osifikasi tulang, denyut jantung dari efek paparan logam aluminium (Supriadi *et al.*, 2019). Hal ini didukung oleh penelitian oleh Trisnawati (2019) dan Wardani (2018) yang menunjukkan adanya peningkatan aktiitas lokomotor pada zebrafish yang diberi pegagan. Bahan aktif *madecassoside* and *asiaticoside* dapat mencegah penurunan lokomotor pada tikus model Parkinson. Aktivitas lokomotor juga berhubungan dengan jumlah dopamine dimana pemberian bahan aktif ini dapat

melindungi syaraf dopaminergic melalui peningkatan glutathione (GSH) (Xu *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013).

1.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Osifikasi Tulang Zebrafish yang Dipapar Aluminium

Berdasarkan analisis uji statistik, terdapat perbedaan densitas tulang keras yang signifikan antar kelompok (nilai signifikansi 0.034, p value < 0.05), terutama pada kelompok kontrol negatif (KN) secara signifikan memiliki perbedaan dengan kelompok kontrol positif (KP) (p value = 0.007), sedangkan KP berbeda signifikan terhadap kelompok P2 (p value = 0.032) dan kelompok perlakuan P3 (p value = 0.009) meskipun antar kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 tidak ditemukan berbeda signifikan (p value > 0.05). Artinya, pegagan dapat mencegah efek gangguan osifikasi tulang keras pada larva zebrafish yang dipapar aluminium.

Dapat dilihat pada gambar 5.5, kelompok KN merupakan kelompok dengan densitas tulang keras tertinggi, dan pemberian perlakuan ekstrak etanol pegagan dengan konsentrasi 5 µg/ml (P3) nilai densitasnya dapat mendekati kelompok KN.

Peningkatan densitas bergantung pada konsentrasi pegagan karena makin besar konsentrasi pegagan yang diberikan, maka makin besar pula densitas tulang kerasnya. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu dimana telah dibuktikan bahwa pegagan dapat meningkatkan osifikasi tulang keras pada larva zebrafish yang dipapar rotenone (Zahara *et al.*, 2018), dan penelitian kami sebelumnya yang menyatakan pegagan dapat melindungi gangguan osifikasi tulang keras pada larva zebrafish yang dipapar dengan aluminium selama 72 jam (Supriadi *et al.*, 2019).

Aluminium dapat menyebabkan gangguan osifikasi tulang dengan mengganggu mineralisasi tulang karena menggantikan kalsium untuk tersimpan di dalam tulang (Chappard *et al.*, 2016) atau menginduksi kematian sel atau

apoptosis dengan peningkatan ROS yang berlebihan pada sel osteoblast yang berperan penting dalam proses osifikasi tulang (Cao *et al.*, 2016).

Osifikasi tulang yang terganggu juga merupakan salah satu proses gangguan pada tumbuh kembang. Misalnya pada lokomotor yang sangat bergantung pada sistem muskuloskeletal. Tulang yang kuat dan padat, fleksibel, dan pertumbuhan tulang belakang sangat penting untuk menimbulkan pergerakan yang efektif (Giladi *et al.*, 2007). Pada penelitian ini telah kita buktikan aluminium dapat menyebabkan gangguan atau alterasi pada aktivitas lokomotor.

Pembentukan tulang yang sempurna tentunya merupakan salah satu faktor selain gangguan pada neurotransmitter yang telah ditimbulkan sebelumnya.

Kandungan antioksidan pada pegagan seperti polifenol, flavonoid, triterpenoid, β -karoten, tannin dan vitamin C dapat menekan peningkatan ROS (Hashim *et al.*, 2011; Chandrika & Kumara, 2015) akibat paparan aluminium.

Pegagan juga memiliki kandungan kalsium (Hashim *et al.*, 2011) yang diduga dapat memperbaiki gangguan mineralisasi akibat aluminium. Selain itu bahan aktif *quercetin* dalam pegagan bersifat sebagai *chelator* yang dapat mengikat logam sebelum logam memasuki sel (Bhuiyan *et al.*, 2017; Horniblow *et al.*, 2017; Jomova *et al.*, 2017). Antioksidan di dalam Penelitian oleh He (2019), menyebutkan *asiaticoside* dapat menghambat pembentukan osteoklas yang memungkinkan salah satu bahan aktif dari pegagan ini dapat menjadi anti-resorpsi agen pada penyakit tulang osteolitik yang berkaitan dengan osteoklas.

1.3 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Ekspresi Sirtuin 1 (SIRT1) Zebrafish yang Dipapar Aluminium

Menurut hasil penelitian, ekspresi SIRT1 pada larva zebrafish yang dipapar aluminium mengalami penurunan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Analisis statistik menunjukkan tidak ada perbedaan ekspresi SIRT1 yang signifikan

antar kelompok dengan nilai signifikansi 0.184 (p value < 0.05). Namun, apabila diperhatikan pada gambar 5.7, dapat dilihat ada perbedaan antara kelompok KN dengan kelompok KP dimana pada kelompok KP yang dipapar aluminium terjadi penurunan ekspresi SIRT1. Pada kelompok perlakuan P1, tidak ada perbedaan yang signifikan dengan kelompok KP, namun pada kelompok P2, terjadi peningkatan ekspresi SIRT1 secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok KP atau P1. Pada kelompok P3 terjadi penurunan ekspresi SIRT1 meskipun nilainya masih lebih tinggi daripada kelompok KP dan P1. Hal ini sesuai dengan penelitian oleh Yan (2017), yang meneliti pemberian aluminium subkronik pada tikus dapat menyebabkan penurunan ekspresi SIRT1.

Aluminium dapat menurunkan ekspresi SIRT1 dilihat dari grafik pada gambar 5.7, meskipun secara statistik tidak signifikan. Dari grafik tersebut dapat dilihat juga bahwa pada konsentrasi pegagan 2,5 $\mu\text{g/ml}$ dapat menyebabkan peningkatan SIRT1. Pernyataan ini didukung penelitian oleh Yan (2017) yang mengamati adanya penurunan SIRT1 pada tikus yang dipapar aluminium secara subkronik.

Sirtuin 1 (SIRT1) berperan dalam regulator homeostasis energy dan juga sebagai pelindung dalam oksidatif. Namun pada kondisi ROS berlebih, SIRT1 ini dapat ditekan sehingga membutuhkan activator untuk dapat meningkat kembali (Cantó dan Auwerx, 2009; Chong *et al.*, 2012). Peningkatan SIRT1 dapat mencegah apoptosis melalui deasetilasi protein faktor transkripsi *forkhead box O* (FOXO), membuatnya menjadi *inactive*. Pada keadaan seperti pemberian dosis pegagan 5 $\mu\text{g/ml}$ dalam penelitian ini menyebabkan penurunan SIRT1 mendekati nilai SIRT1 pada kelompok kontrol negatif dapat dikarenakan beberapa hal.

Pegagan memiliki bahan aktif yang dapat mengikat logam diluar sel sehingga logam tidak dapat masuk dan menyebabkan peningkatan ROS.

Penelitian oleh Xu (2018), bahwa bahan aktif *Asiatic acid* yang terkandung dalam pegagan dapat menginduksi fosforilasi AMPK dan memperbaiki metabolisme asam lemak. Sedangkan AMPK sendiri menurut Ruderman (2010), SIRT1 akan diaktivasi oleh AMPK melalui peningkatan NAD⁺/NADH. Sehingga, dapat diambil kesimpulan pemberian ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan ekspresi SIRT1 melalui peningkatan AMPK. Bahan aktif *quercetin* juga dapat meningkatkan ekspresi SIRT1 (Chung *et al.*, 2010; Hung *et al.*, 2015) selain sebagai kelator logam.

1.4 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Apoptosis Sel Zebrafish yang Dipapar Aluminium

Berdasarkan gambar 5.8, peningkatan apoptosis sel terjadi pada kelompok kontrol positif (KP) secara signifikan baik pada bagian kepala dan badan maupun pada bagian ekor. Perbedaan signifikan juga terdapat antara kelompok KN terhadap kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 baik pada bagian kepaladan badan maupun pada bagian ekor. Hal ini menunjukkan bahwa aluminium dapat menginduksi terjadinya apoptosis sel yang sesuai dengan pernyataan Maya (2016) bahwa aluminium dapat menginduksi terjadinya apoptosis dan penelitian oleh Cheraghi (2017) pada tikus yang dipapar aluminium selama 28 hari.

Pada kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 terjadi penurunan apoptosis seiring dengan penambahan konsentrasi pegagan baik pada bagian kepala dan badan maupun pada bagian ekor. Makin tinggi konsentrasi pegagan, makin menurun apoptosis yang terjadi pada sel larva zebrafish yang dipapar aluminium.

Pada bagian kepala, kelompok perlakuan P3 dengan konsentrasi pegagan 5 µg/ml tidak menurunkan apoptosis secara signifikan namun terjadi penurunan apoptosis yang signifikan pada kelompok P3 di bagian ekor hingga mendekati nilai apoptosis kelompok KN. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak etanol pegagan dapat

menurunkan apoptosis akibat paparan logam aluminium yang didukung penelitian oleh Khotimah (2018), dimana pegagan dengan bahan aktif triterpenoid saponin yaitu *asiaticoside* dapat menurunkan apoptosis dan meningkatkan BDNF pada zebrafish dewasa.

Paparan aluminium dapat mengganggu homeostasis logam lain yang memang dibutuhkan dalam pelaksanaan fungsi sel, contohnya, kalsium atau Ca^{2+} . Homeostasis Ca^{2+} di intraseluler akan terganggu karena Ca^{2+} aluminium menghambat Ca^{2+} -ATPase yang bergantung pada kalmodulin sehingga akumulasi Ca^{2+} di intraseluler terjadi. Peningkat ini menyebabkan penurunan ATP yang dapat menyebabkan kerusakan sel dan kematian sel (Nayak, 2012).

Bahan aktif *madecassoside* juga dapat menurunkan apoptosis dengan mengurangi kerusakan pada sel endotel akibat stres oksidatif melalui peningkatan ekspresi glutathione, penurunan kadar dehydrogenase dan malondialdehyde karena H_2O_2 , mencegah aktivasi caspase 3 dan memberikan proteksi pada membrane mitokondria (Bian *et al.*, 2012).

1.5 Korelasi Antara Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) dengan Lokomotor, Osifikasi Tulang Keras, dan Apoptosis sel Zebrafish

Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan korelasi antara pemberian ekstrak etanol pegagan dengan aktivitas lokomotor, osifikasi tulang keras, dan apoptosis sel larva zebrafish. Untuk hubungan pemberian ekstrak etanol pegagan dengan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish ditemukan hubungan yang sangat kuat. Makin besar konsentrasi ekstrak etanol pegagan yang diberikan, makin tinggi pula aktivitas lokomotor larva zebrafish. Hal yang sama ditemukan pada hubungan antara pemberian ekstrak etanol pegagan dengan osifikasi tulang keras larva zebrafish meskipun hubungan yang ditemukan tidak sekuat seperti hubungan antara pemberian pegagan dan lokomotor. Penelitian kami yang terdahulu

mendukung temuan ini dengan hasil yang sama yaitu terjadi peningkatan pada aktivitas lokomotor dan osifikasi tulang keras seiring dengan penambahan konsentrasi pegagan (Supriadi *et al.*, 2019). Pada hubungan antara pemberian ekstrak etanol pegagan dengan apoptosis sel larva zebrafish ditemukan hubungan yang sangat kuat dengan korelasi berlawanan arah. Makin besar konsentrasi ekstrak etanol pegagan yang diberikan, makin rendah apoptosis yang terjadi pada larva zebrafish.

Aluminium yang masuk ke dalam tubuh menyebabkan berbagai macam gangguan melalui berbagai macam jalur. Aluminium yang masuk ke dalam tubuh dapat bersumber dari alam langsung maupun dari olahan seperti bahan makanan, alat masak, obat-obatan, industri, penggunaan dalam kosmetik dan deodorant, ataupun penggunaan dalam pemrosesan air (Exley, 2013; Klotz *et al.*, 2017).

Paparan aluminium tersebut dapat masuk melalui saluran pencernaan maupun saluran olfaktori (Nayak, 2012; Exley, 2013). Untuk dapat teredar di sistemik atau masuk melalui membran sel, ada beberapa jalur utama transport aluminium, diantaranya ialah secara paraseluler untuk aluminium dengan kation trivalent terlarut bebas ($Al^{3+}_{(aq)}$), secara transeluler, pada aluminium dengan berat molekul rendah, netral, *soluble complex* ($LMW-Al^0_{(aq)}$), secara transport aktif, pada aluminium dengan berat molekul tinggi, netral, *soluble complex* ($HMW-Al^0_{(aq)}$), melalui *channel*, pada aluminium dengan berat molekul rendah, bermuatan, *soluble complex* ($LMW-Al(L)_{n}^{+/-}_{(aq)}$) dan dengan endositosis adsorptif atau dimediasi reseptor, pada aluminium partikel nano dan mikro ($Al(L)_{n(s)}$) (Exley, 2013). Untuk masuk ke sistemik melalui darah misalnya, aluminium akan menggantikan Fe berikatan dengan transferrin karena sifatnya yang mirip.

Aluminium akan berkompetisi dengan logam lain yang memang dibutuhkan oleh tubuh seperti besi dan kalsium (Maya *et al.*, 2016). Aluminium yang menggantikan Fe berikatan dengan transporter transferrin akan menyebabkan

penumpukan jumlah Fe di dalam tubuh (Exley, 2013). Penumpukan yang terjadi di dalam sel dapat menyebabkan terjadinya *ferrous reaction*. Reaksi Fenton adalah proses katalitik yang mengubah hidrogen peroksida, produk respirasi oksidatif mitokondria, menjadi radikal bebas hidroksil yang sangat beracun. Reaksi fenton ini dapat mempercepat proses lipid peroksidase. Kerusakan oksidatif yang diinduksi aluminium terhadap protein selama stres oksidatif merupakan mediator potensial dari apoptosis dan protein dengan sensitivitas spesifik terhadap oksidasi dapat mengatur peristiwa pensinyalan seluler, termasuk apoptosis (Kumar & Gill, 2014).

Apoptosis juga diinduksi oleh peningkatan konsentrasi ion kalsium intraseluler (Ca^{2+} intraseluler). Peningkatan Ca^{2+} intraseluler memediasi apoptosis sel. Calmodulin (CaM) adalah protein pengikat Ca^{2+} kecil dan mediator utama sinyal Ca^{2+} dalam sel eukariotik (Cao *et al.*, 2016).

Apoptosis pada sel-sel selama proses paparan aluminium dapat menyebabkan gangguan fungsional dalam pertumbuhan dan perkembangan. Hal ini dapat dilihat dari adanya perubahan fungsi alat gerak yang dilihat dari aktivitas lokomotor meskipun tidak ditemukannya gangguan struktur seperti kecacatan pada penelitian ini. Apoptosis pada sel dendritik misalnya dapat mengganggu proses pembentukan dopamine sebagai salah satu neurotransmitter yang penting dalam proses pergerakan. Apoptosis pada sel osteoblast dapat menyebabkan terganggunya proses osifikasi tulang yang merupakan salah satu komponen penting untuk menciptakan pergerakan yang efektif. Dalam penelitian ini ditemukan hubungan adanya hubungan antara densitas tulang keras dengan aktivitas lokomotor dimana semakin tinggi densitas tulang larva zebrafish, maka semakin baik pula lah aktivitas lokomotor yang diciptakan.

SIRT1 memiliki peran sebagai pelindung terhadap oksidatif. SIRT1 mengurangi stres oksidatif seluler secara tidak langsung melalui deasetilasi

FOXO3a (deasetilasi FOXO3a mengarah ke pengaturan regulasi katalase dan MnSOD). Aktivasi SIRT1 berefek pada fungsi FoxO1 yaitu menghambat kemampuan FoxO1 dan FoxO3 untuk menginduksi kematian sel. Sehingga SIRT1 dapat meningkatkan umur panjang organisme dengan menghambat apoptosis melalui jalur FOXO (Cantó & Auwerx, 2009; Rahman & Islam, 2011; Hori *et al.*, 2013).

Terdapat sejumlah nutrisi dan bahan kimia yang memiliki efek terapeutik pada pegagan. Komponen kimia yang ada pada pegagan adalah saponin, alkaloid, flavonoid, resin, pectin, tanin, steroid, triterpenoid dan glikosida. Sedangkan zat kimia dalam pegagan antara lain asiaticosida, asiatic asid, madekasid dan madekasosid, sitosterol dan stigmasterol dari golongan steroid, vallerin, brahmosida, brahminosida dari golongan saponin (Kristina *et al.*, 2015). Dalam penelitian ini pegagan mampu menurunkan aktivitas lokomotor yang berlebih akibat paparan aluminium, dan meningkatkan osifikasi tulang keras melalui peningkatan ekspresi SIRT1 dan pencegahan apoptosis pada larva zebrafish.

Konsentrasi pegagan yang efektif dalam penelitian ini ditemukan pada konsentrasi 5 µg/ml. Pada konsentrasi ini, pemeriksaan aktivitas lokomotor, osifikasi tulang keras, ekspresi SIRT1 dan apoptosis yang dilakukan menunjukkan nilainya mendekati kelompok kontrol negatif. Adapun konsentrasi toksik pegagan ditemukan bervariasi pada berbagai penelitian sebelumnya. Pada penelitian yang dilakukan oleh Deshpande (2015), mengemukakan bahwa konsentrasi 1000 mg/kg and 2000 mg/kg tidak berefek letal maupun menimbulkan efek samping.

Chivapat (2011) memberikan ekstrak pegagan pada tikus per oral dengan dosis 10 g/Kg BB secara akut dan dosis 10 mg/Kg hingga 1000 mg/Kg untuk menilai toksisitas subkronik namun kedua dosis dan pemaparan ini juga tidak menunjukkan adanya tanda-tanda toksisitas.

Konsentrasi aluminium yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sebesar 50 μM atau setara dengan 0.03 ppm, yang berarti 7 kali lebih rendah daripada nilai ambang batas kadar aluminium pada air minum yang telah ditetapkan oleh WHO sebelumnya yaitu 0,2 mg/L. Ketentuan penggunaan konsentrasi ini didasarkan atau studi pendahuluan yang telah dilakukan dimana konsentrasi ini tidak menimbulkan efek teratogenik namun telah menunjukkan dampak perubahan pada fungsi organ. Ini membuktikan bahwa pemberian paparan pada awal kehidupan yaitu pada masa pembelahan periode blastula dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan dan perkembangan. Konsentrasi ini sangat kecil namun karena zygote yang bersifat sangat peka, dapat memberikan efek yang besar.

1.6 Implikasi Hasil Penelitian Dalam Asuhan Kebidanan

Pertumbuhan dan perkembangan merupakan hal yang telah disadari menjadi sangat penting sebagai salah satu indikator kesehatan. Kemajuan generasi muda penerus bangsa haruslah memiliki bibit, bebet dan bobot yang berkualitas. Pertumbuhan dan perkembangan ini sangat mempengaruhi perkembangan kesejahteraan masyarakat dikemudian harinya. Seiring dengan peningkatan ilmu dan teknologi, mulai ditemukan unsur-unsur yang tadinya dianggap tidak berbahaya dan digunakan untuk kebutuhan luas ternyata menyebabkan berbagai macam gangguan di kemudian hari. Aluminium merupakan logam paling melimpah hasil dari bumi dan merupakan unsur ketiga terbesar dalam kerak bumi. Penggunaan aluminium dalam kehidupan sehari-hari bukanlah hal yang biasa. Aluminium bisa terdapat di udara karena *anti-perspirant spray*, digunakan di kulit sebagai kosmetik, bercampur dengan bahan makanan karena kontaminasi air atau tanah atau karena cara pengolahan menggunakan alat-alat masak berbahan aluminium, penggunaannya dalam pemurnian air minum, hingga penggunaan adjuvan imunisasi. Pada masa reproduksi, wanita

hamil dapat dengan mudah terpapar aluminium. Efeknya terhadap janin lebih rentan pada trimester awal dibandingkan dengan trimester lanjut.

Efek aluminium yang dari berbagai penelitian adalah munculnya gangguan pada memori jangka-panjang, gangguan dalam belajar, penurunan perkembangan otakgangguan koordinasi gerak tubuh dan keseimbangan, hingga kehilangan memori. Gangguan-gangguan ini tentunya menyebabkan pertumbuhan dan perkembangan yang tidak sempurna yang mengancam kesejahteraan masyarakat dan menghambat kemajuan bangsa.

Bidan merupakan salah satu ujung tombak dalam mewujudkan program 1000 hari demi peningkatan kualitas bangsa untuk dapat bersaing di era global pada masa depan. Perwujudan program ini lebih menekankan pada program preventif dan promotif dapat melalui puskesmas, posyandu, maupun kunjungan rumah. Bidan juga harus dapat melakukan deteksi dini adanya tanda-tanda bahaya dalam kehamilan sehingga penanganan yang tepat, cepat dan akurat dapat segera diterapkan. Pada program 1000 hari kehidupan yang terhitung sejak bayi berada dalam kandungan hingga bayi menyusui usia 2 tahun, harus tercapai optimalisasi pertumbuhan dan perkembangan. Bidan harus dapat mengetahui dampak lingkungan yang buruk terhadap perkembangan janin ibu dan melakukan intervensi yang tepat. Pemberian nutrisi yang optimal dan seimbang dapat meningkatkan daya tahan tubuh anak terhadap paparan lingkungan sekitar.

Penggunaan tanaman herbal ialah salah satu langkah yang dapat dilakukan sebagai pencegahan efek berbahaya dari unsur-unsur yang apabila terakumulasi dalam tubuh menyebabkan gangguan tumbuh kembang. Pegagan sebagai salah satu tanaman tradisional ternyata dapat digunakan sebagai tanaman herbal atau tanaman obat keluarga dan membantu menurunkan radikal bebas yang berada di dalam tubuh, khususnya karena paparan logam dan mencegah hambatan pada pertumbuhan dan perkembangan.

Pemberian pegagan pada manusia sebagai upaya preventif efek paparan logam aluminium ini dapat segera diterapkan mengingat pegagan sendiri merupakan salah satu jenis sayuran yang sering disantap sebagai lalapan dalam kehidupan sehari-hari.

1.7 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan yang ditemukan selama pelaksanaannya. Adanya keterbatasan ini diarpkan dapat menjadi acuan sebagai penelitian selanjutnya.

Pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan *atomic absorbance spectrophotometry* (AAS) atau Spektrofotometri Serapan Atom yang digunakan untuk mengetahui konsentrasi aluminium dalam medium embrionik. Alat ini yang merupakan salah satu jenis analisa spektrofometri dimana dasar pengukurannya adalah pengukuran serapan suatu sinar oleh suatu atom, sinar yang tidak diserap, diteruskan dan diubah menjadi sinyal listrik yang terukur. Sehingga tidak diketahui berapa konsentrasi logam yang tersisa di dalam medium embrionik setelah diberikan bersamaan dengan konsentrasi pegagan untuk mengetahui efek kelator dari pegagan tersebut.

Pada penelitian ini juga tidak meneliti gen atau DNA yang penting dalam pertumbuhan dan perkembangan yang mungkin menjadi target intoksikasi aluminium dikarenakan kurangnya waktu penelitian yang dibutuhkan. Namun pada penelitian ini telah dapat dilihatnya ada perubahan fungsi setelah pemaparan aluminium yang mungkin mencerminkan terjadinya perubahan tingkat seluler.

Pengukuran lokomotor yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan alat yang sederhana seperti kamera biasa dan dianalisis menggunakan *software* ImageJ. Untuk menganalisis jejak/*trace* dari aktivitas lokomotor perlu adanya peralatan yang lebih canggih seperti *danoscope*.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

1.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian di atas, dapat ditarik kesimpulan bahwa secara umum pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) memberikan pengaruh terhadap aktivitas lokomotor, osifikasi tulang keras larva zebrafish, ekspresi SIRT1, dan apoptosis larva zebrafish yang dipapar aluminium.

Kesimpulan secara khusus dapat diuraikan sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan aktivitas lokomotor larva zebrafish yang dipapar Aluminium.
2. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan osifikasi tulang larva zebrafish yang dipapar Aluminium.
3. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi SIRT1 pada larva zebrafish yang dipapar Aluminium.
4. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah apoptosis larva zebrafish yang dipapar Aluminium
5. Terdapat hubungan searah atau positif yang sangat kuat antara pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap lokomotor, osifikasi tulang keras, dan hubungan berlawanan arah atau negatif yang kuat antara pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dan apoptosis pada larva zebrafish.

1.2 Saran

Asapun saran yang diberikan oleh peneliti adalah:

1. Perlu dilakukannya penelitian lanjutan pada tingkat DNA dan target gen toksisitas untuk menilai kerusakan akibat aluminium khususnya pada tahapan awal pertumbuhan dan perkembangan.
2. Perlu dilakukan pemeriksaan *atomic absorbance spectrophotometry* untuk menilai kadar logam dalam medium setelah diberikan bersamaan dengan pegagan.
3. Untuk pemeriksaan lokomotor pada larva zebrafish dapat dilengkapi dengan *danioscope*.
4. Menghimbau pada pemerintah untuk meninjau kembali nilai ambang batas kadar aluminium dalam air minum.



DAFTAR PUSTAKA

- Afiqoh, A.N., Fidianingsih, I. dan Handayani, E.S., 2017. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Gambaran Histopatologi Limpa Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Sodium Nitrit Sub Akut. *Jurnal Kedokteran Universitas Lampung*, 1(3), hal.457–462.
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M.T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., et al., 2012. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (69).
- Bernardo, J.F., 2012. Aluminum toxicity. *Medscape Reference*.
- Bhuiyan, M.N.I., Mitsushashi, S., Sigetomi, K. dan Ubukata, M., 2017. Quercetin inhibits advanced glycation end product formation via chelating metal ions, trapping methylglyoxal, and trapping reactive oxygen species. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 81(5), hal.882–890.
- Bian, D., Liu, M., Li, Y., Xia, Y., Gong, Z. dan Dai, Y., 2012. Madecassoside, a triterpenoid saponin isolated from *Centella asiatica* herbs, protects endothelial cells against oxidative stress. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 26(10), hal.399–406.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S. dan Kalayci, O., 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), hal.9.
- Blanco, A. dan Blanco, G., 2017. Apoptosis. In: *Medical Biochemistry*. hal. 791–796.
- B POM RI, 2010. *Serial Data Terkini Tumbuhan Obat Pegagan (Centella asiatica L)*, Direktorat Obat Asli Indonesia, Jakarta.
- Budi, E.H., Patterson, L.B. dan Parichy, D.M., 2011. Post-embryonic nerve-associated precursors to adult pigment cells: genetic requirements and dynamics of morphogenesis and differentiation. *PLoS Genetics*, 7(5), hal.e1002044.
- Cantó, C. dan Auwerx, J., 2009. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(7), hal.325–331.
- Cao, Z., Liu, D., Zhang, Q., Sun, X. dan Li, Y., 2016. Aluminum chloride induces osteoblasts apoptosis via disrupting calcium homeostasis and activating Ca²⁺/CaMKII signal pathway. *Biological trace element research*, 169(2), hal.247–253.
- Capriello, T., Grimaldi, M.C., Cofone, R., D’Aniello, S. dan Ferrandino, I., 2019. Effects of aluminium and cadmium on hatching and swimming ability in developing zebrafish. *Chemosphere*, 222, hal.243–249. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.140>.
- Chandrika, U.G. dan Kumara, P.A.A.S.P., 2015. Gotu kola (*Centella asiatica*): nutritional properties and plausible health benefits. In: *Advances in food and nutrition research*. Elsevier, hal. 125–157.

Chang, H.-C. dan Guarente, L., 2014. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(3), hal.138–145.

Chappard, D., Bizot, P., Mabilieu, G. dan Hubert, L., 2016. Aluminum and bone: review of new clinical circumstances associated with Al³⁺ deposition in the calcified matrix of bone. *Morphologie*, 100(329), hal.95–105.

Cheraghi, E., Golkar, A., Roshanaei, K. dan Alani, B., 2017. Aluminium-induced oxidative stress, apoptosis and alterations in testicular tissue and sperm quality in wistar rats: Ameliorative effects of curcumin. *International Journal of Fertility and Sterility*, 11(3), hal.166–175.

Chivapat, S., Chavalittumrong, P. dan Tantisira, M.H., 2011. Acute and sub-chronic toxicity studies of a standardized extract of *Centella asiatica* ECA 233. *Thai J. Pharm. Sci*, 35, hal.55–64.

Chong, Z.Z., Shang, Y.C., Wang, S. dan Maiese, K., 2012. SIRT1: new avenues of discovery for disorders of oxidative stress. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16(2), hal.167–178.

Chung, S., Yao, H., Caito, S., Hwang, J., Arunachalam, G. dan Rahman, I., 2010. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Archives of biochemistry and biophysics*, 501(1), hal.79–90.

Circu, M.L. dan Aw, T.Y., 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(6), hal.749–762.

Cold Spring Harbor Laboratory, 2011. *Zebrafish embryo medium* [Daring]. Available at: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2011/8/pdb.rec12478>.

Cole, L. dan Kramer, P.R., 2016. Apoptosis, Growth, and Aging. In: *Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine*. hal. 63–66.

Colwill, R.M. dan Creton, R., 2011. Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Behavioural processes*, 86(2), hal.222–229.

Crisponi, G., Fanni, D., Gerosa, C., Nemolato, S., Nurchi, V.M., Crespo-Alonso, M., Lachowicz, J.I. dan Faa, G., 2013. The meaning of aluminium exposure on human health and aluminium-related diseases. *Biomolecular concepts*, 4(1), hal.77–87.

Dahlan, M.S., 2011. *Statistik untuk kedokteran dan kesehatan*, Penerbit Salemba.

Deng, C.-X., 2009. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? *International journal of biological sciences*, 5(2), hal.147.

Deng, J., Yu, L., Liu, C., Yu, K., Shi, X., Yeung, L.W.Y., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S. dan Zhou, B., 2009. Hexabromocyclododecane-induced developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos. , 93, hal.29–36.

Deshpande, P.O., Mohan, V. dan Thakurdesai, P., 2015. Preclinical safety assessment of standardized extract of *Centella asiatica* (L.) urban leaves. *Toxicology international*, 22(1), hal.10.

Djuwita, I., Pratiwi, I.A., Winarto, A. dan Sabri, M., 2012. Proliferasi dan diferensiasi sel tulang tikus dalam medium kultur in vitro yang mengandung ekstrak

- batang *Cissus quadrangula* Salisb.(sipatah-patah). *Jurnal Kedokteran Hewan-Indonesian Journal of Veterinary Sciences*, 6(2).
- Donmez, G. dan Outeiro, T.F., 2013. SIRT1 and SIRT2: emerging targets in neurodegeneration. *EMBO molecular medicine*, 5(3), hal.344–352.
- Dórea, J., 2015. Exposure to mercury and aluminum in early life: developmental vulnerability as a modifying factor in neurologic and immunologic effects. *International journal of environmental research and public health*, 12(2), hal.1295–1313.
- Effendi, H., 2003. *Telaah kualitas air, bagi pengelolaan sumber daya dan lingkungan perairan*, Kanisius.
- Endang, R.S., 2007. *Diktat Perkembangan Motorik*, FIK UNY, Yogyakarta.
- Exley, C., 2013. Human exposure to aluminium. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15(10), hal.1807–1816.
- Exley, C., 2016. The toxicity of aluminium in humans. *Morphologie*, 100(329), hal.51–55. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.morpho.2015.12.003>.
- Fraga, D., Meulia, T. dan Fenster, S., 2014. Real-time PCR. *Current protocols essential laboratory techniques*, 8(1), hal.10–13.
- García-camero, J.P., García-cortés, H., Valcárcel, Y. dan Catalá, M., 2015. Environmental concentrations of the cocaine metabolite benzoylecgonine induced sublethal toxicity in the development of plants but not in a zebrafish embryo – larval model. *Journal of Hazardous Materials*, 300, hal.866–872. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.08.019>.
- Geneaid, 2013, *Total RNA Mini Kit (Tissue)* [Daring]. Available at: https://shop.midsci.com/protocols/IB47300-01-02-03_protocol.pdf.
- Ghorbel, I., Amara, I. Ben, Ktari, N. dan Elwej, A., 2016. Aluminium and Acrylamide Disrupt Cerebellum Redox States, Cholinergic Function and Membrane-Bound ATPase in Adult Rats and Their Offspring. *Biological Trace Element Research*, hal.335–346. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-016-0716-1>.
- Giladi, N., Bloem, B.R. dan Hausdorff, J.M., 2007. Gait disturbances and falls. In: *Neurology and Clinical Neuroscience*. Elsevier, hal. 455–470.
- Goody, M.F. dan Henry, C.A., 2012. Motility assay for zebrafish embryos. *PLOS Biology*.
- Gouda, A.S., El-Nabarawy, N.A. dan Ibrahim, S.F., 2018. Moringa oleifera extract (Lam) attenuates Aluminium phosphide-induced acute cardiac toxicity in rats. *Toxicology reports*, 5, hal.209–212.
- Hashim, P., Sidek, H., Helan, M.H.M., Sabery, A., Palanisamy, U.D. dan Ilham, M., 2011. Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica*. *Molecules*, 16(2), hal.1310–1322.
- He, L., Hong, G., Zhou, L., Zhang, J., Fang, J., He, W., Tickner, J., Han, X., et al., 2019. Asiaticoside, a component of *Centella asiatica* attenuates RANKL-induced osteoclastogenesis via NFATc1 and NF- κ B signaling pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 234(4), hal.4267–4276.

Hermesen, S.A.B., Brandhof, E. Van Den, Ven, L.T.M. Van Der dan Piersma, A.H., 2011. Toxicology in Vitro Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. *Toxicology in Vitro*, 25(3), hal.745–753. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.005>.

Hori, Y.S., Kuno, A., Hosoda, R. dan Horio, Y., 2013. Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 modulators under oxidative stress. *PLoS One*, 8(9), hal.e73875.

Horniblow, R.D., Henesy, D., Iqbal, T.H. dan Tselepis, C., 2017. Modulation of iron transport, metabolism and reactive oxygen status by quercetin–iron complexes in vitro. *Molecular nutrition & food research*, 61(3), hal.1600692.

Horzmann, K. dan Freeman, J., 2016. *Zebrafish Get Connected: Investigating Neurotransmission Targets and Alterations in Chemical Toxicity*.

Hung, C., Chan, S., Chu, P. dan Tsai, K., 2015. Quercetin is a potent anti-atherosclerotic compound by activation of SIRT1 signaling under oxLDL stimulation. *Molecular nutrition & food research*, 59(10), hal.1905–1917.

Husain, S., Rizvi, M., Parveen, A., Ahmad, I., Ahmad, I., Verma, A.K. dan Mahdi, A.A., 2016. Aluminum Activates PERK-EIF2 α Signaling and Inflammatory Proteins in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Biological Trace Element Research*, hal.108–119. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-015-0553-7>.

Ingebretson, J.J. dan Masino, M.A., 2013. Quantification of locomotor activity in larval zebrafish : considerations for the design of high-throughput behavioral studies. , 7(June), hal.1–9.

Jahan, R., Hossain, S., Seraj, S., Nasrin, D., Khatun, Z., Das, P.R., Islam, M.T., Ahmed, I. dan Rahmatullah, M., 2012. Centella asiatica (L.) Urb.: Ethnomedicinal uses and their scientific validations. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, hal.261–271.

Jomova, K., Lawson, M., Drostinova, L., Lauro, P., Poprac, P., Brezova, V., Michalik, M., Lukes, V. dan Valko, M., 2017. Protective role of quercetin against copper (II)-induced oxidative stress: A spectroscopic, theoretical and DNA damage study. *Food and chemical toxicology*, 110, hal.340–350.

Jonathan, K., 2009. *A Simple Whole-Mount Staining Protocol for Bone and or Cartilage in Adults and Larvae*. Zebrafish. Witten, P., (ed.), The institute of Aquaculture Research in Sunndalsora, Norway, Canada.

Kalueff, A. V dan Cachat, J.M., 2011. *Zebrafish models in neurobehavioral research*, Springer.

Kanczler, J.M. dan Oreffo, R.O., 2008. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*, 15(2), hal.100–114.

Khotimah, H., Sumitro, S.B., Ali, M. dan Widodo, M.A., 2018. Standardized Centella Asiatica Increased BrainDerived Neurotrophic Factor and Decreased Apoptosis of Dopaminergic Neuron in RotenoneInduced Zebrafish. *GSTF Journal of Psychology (JPpsych)*, 2(1).

- Khotimah, H., Yuliyani, T., Nuraenah, E., Zahara, E. dan Umi Kalsum, N., 2018. Centella asiatica increased the body length through the modulation of antioxidant in rotenone-induced zebrafish larvae. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 11(2), hal.827–833.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. dan Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203(3), hal.253–310.
- Klotz, K., Weistenhöfer, W., Neff, F., Hartwig, A., van Thriel, C. dan Drexler, H., 2017. The health effects of aluminum exposure. *Deutsches Ärzteblatt International*, 114(39), hal.653.
- Krewski, D., Yokel, R.A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., Kacew, S., Lindsay, J., et al., 2007. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 10(S1), hal.1–269.
- Kristina, N.N., Kusumah, E.D. dan Lailani, P.K., 2015. Analisis fitokimia dan penampilan polapita protein tanaman pegagan (*Centella asiatica*) hasil konservasi in vitro. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*, 20(1), hal.11–20.
- Kumar, V., Bal, A. dan Gill, K.D., 2008. Impairment of mitochondrial energy metabolism in different regions of rat brain following chronic exposure to aluminium. *Brain research*, 1232, hal.94–103.
- Kumar, V. dan Gill, K.D., 2014. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicity and its amelioration: a review. *Neurotoxicology*, 41, hal.154–166.
- Kurnianingsih, N., Utami, J.P., Lyrawati, D., Science, B. dan Kurnianingsih, N., 2016. Monosodium Glutamate Exposure At Early Developmental Stage Increases Apoptosis And Stereotypic Behavior Risks On Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. , 27(3), hal.128–138.
- Laabdar, W., Elgot, A. dan Gamrani, H., 2016. The protective effect of curcumin on dopaminergic system after chronic aluminium intoxication: Possible link with Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 22, hal.e188.
- Lambert, A.M., Bonkowsky, J.L. dan Masino, M.A., 2012. The conserved dopaminergic diencephalospinal tract mediates vertebrate locomotor development in zebrafish larvae. *Journal of Neuroscience*, 32(39), hal.13488–13500.
- Leeson, C.R., Leeson, T.S. dan Paparo, A.A., 1996. Buku ajar histologi. *Alih bahasa Yan Tambayong. Jakarta: EGC*.
- Li, Z. dan Xing, D., 2010. Mechanistic study of mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminium phytotoxicity using fluorescence techniques. *Journal of experimental botany*, 62(1), hal.331–343.

Lima, P.D.L., Vasconcellos, M.C. dan Montenegro, R.C., 2011. Genotoxic effects of aluminum, iron and manganese in human cells and experimental systems: A review of the literature. *Toxicology and Environmental Health*, 30(10), hal.1435–1444.

Logan, S.W., Robinson, L.E., Wilson, A.E. dan Lucas, W.A., 2012. Getting the fundamentals of movement: a meta-analysis of the effectiveness of motor skill interventions in children. *Child: care, health and development*, 38(3), hal.305–315.

Mathias, J.R., Zhang, Z., Saxena, M.T. dan Mumm, J.S., 2014. Enhanced cell-specific ablation in zebrafish using a triple mutant of Escherichia coli nitroreductase. *Zebrafish*, 11(2), hal.85–97.

Maya, S., Prakash, T., Madhu, K. Das dan Goli, D., 2016. Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, hal.746–754.

Monaco, A., Grimaldi, M.C. dan Ferrandino, I., 2017. Aluminium chloride-induced toxicity in zebrafish larvae. *Journal of fish diseases*, 40(5), hal.629–635.

Morvan, G., Basseur, J. dan Sans, N., 2005. Superficial US of superficial bones. *Journal de radiologie*, 86(12 Pt 2), hal.1892–1903.

National Center for Biotechnology Information, 2019, *Trichloroaluminum | AlCl3 - PubChem* [Daring]. Available at: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/aluminum_chloride#section=Top [Diakses: 22 Januari 2019].

Nayak, P., 2012. Conjecturable role of aluminum in pathophysiology of stroke. In: *Metal Ion in Stroke*. Springer, hal. 649–680.

Oğuz, E.O., Enli, Y., Şahin, B., Gönen, C. dan Turgut, G., 2012. Aluminium sulphate exposure increases oxidative stress and suppresses brain development in Ross broiler chicks. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 18(3), hal.BR103.

Oliveri, A.N. dan Levin, E.D., 2019. Dopamine D 1 and D 2 receptor antagonism during development alters later behavior in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 356(July 2016), hal.250–256. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.08.028>.

Ozmun, J.C. dan Gallahue, D.L., 2016. Motor development. *Adapted Physical Education and Sport E*, 6, hal.375.

Pereira, S., Cavalie, I., Camilleri, V., Gilbin, R. dan Adam-Guillermin, C., 2013. Comparative genotoxicity of aluminium and cadmium in embryonic zebrafish cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 750(1–2), hal.19–26.

Pratama, D., 2017. *Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (Moringa Oleifera) Terhadap Aktivitas Lokomotor Dan Motilitas Larva Zebrafish (Danio Rerio) Yang Dipapar Dengan Etanol*. Universitas Brawijaya.

Primihastuti, D., 2017. *Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (Centella Asiatica) Pada Osifikasi Tulang Dan Osteoklastogenesis Pada Model Stunting Larva Zebrafish (Danio Rerio) Yang Diinduksi Rotenon*. Universitas Brawijaya.

Rahma, K., Kishida, M., Prasetyawan, S. dan Aulanni'am, A., 2017. Neuroprotection of 17 β -Estradiol Against D-Glucose Exposure Effect on Tyrosine Hydroxylase Expression and Apoptotic Cells in Zebrafish (*Danio rerio*) Brain During Early Development.

Rahman, S. dan Islam, R., 2011. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. *Cell Communication and Signaling*, 9(1), hal.11.

Le Ray, D., Juvin, L., Ryczko, D. dan Dubuc, R., 2011. Supraspinal control of locomotion: the mesencephalic locomotor region. In: *Progress in brain research*. Elsevier, hal. 51–70.

Redza-Dutordoir, M. dan Averill-Bates, D.A., 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(12), hal.2977–2992.

Resnick, D., Manolagas, S., Niwayama, G. dan Fallon, M.D., 2002. Histogenesis, anatomy and physiology of bone. *Diagnosis of bone and joint disorders. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company*, hal.648–654.

Rihel, J., Prober, D.A., Arvanites, A., Lam, K., Zimmerman, S., Jang, S., Haggarty, S.J., Kokel, D., et al., 2010. Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science*, 327(5963), hal.348–351.

Ruderman, N.B., Xu, X.J., Nelson, L.E., Cacicedo, J.M., Saha, A.K., Lan, F. dan Ido, Y., 2010. AMPK and SIRT1: a longstanding partnership? *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*.

Sadler, T.W., 2012. *Embriologi Kedokteran Langman 12 ed.*, Lippincott Williams & Wilkins/Wolter Kluwers Inc., Jakarta.

Salminen, A., Kaarniranta, K. dan Kauppinen, A., 2013. Crosstalk between oxidative stress and SIRT1: impact on the aging process. *International journal of molecular sciences*, 14(2), hal.3834–3859.

Santoriello, C. dan Zon, L.I., 2012. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *The Journal of clinical investigation*, 122(7), hal.2337–2343.

Scalon, C.V. dan Sanders, T., 2007. *Essentials of Anatomy and Physiology*.

Selderslaghs, I.W.T., Hooyberghs, J., Blust, R. dan Witters, H.E., 2013. Neurotoxicology and Teratology Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebra fish embryos and larvae. *Neurotoxicology and Teratology*, 37(2013), hal.44–56. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2013.01.003>.

Selvaraj, V. dan Santhakumar, K., 2017. Analyzing locomotor activity in Zebrafish larvae using wrMTck. *Zebrafish*, 14(3), hal.287–291.

Senger, M.R., Seibt, K.J., Ghisleni, G.C., Dias, R.D., Bogo, M.R. dan Bonan, C.D., 2011. Aluminum exposure alters behavioral parameters and increases acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Cell Biology and Toxicology*, 27(3), hal.199–205.

Shakhashiri, B.Z., 2012. Chemical of the Week: Aluminum. *University of*

- Wisconsin: SciFun. org.
- Sheng, W., Lu, Y., Mei, F., Wang, N., Liu, Z.-Z., Han, Y.-Y., Wang, H.-T., Zou, S., et al., 2018. Effect of Resveratrol on Sirtuins, OPA1, and Fis1 Expression in Adult Zebrafish Retina. *Investigative ophthalmology & visual science*, 59(11), hal.4542–4551.
- Sihombing, I., Wangko, S. dan Kalangi, S.J.R., 2012. Peran estrogen pada remodeling tulang. *Jurnal Biomedik*, 4(3).
- Sorribes, A., Porsteinsson, H., Arnardóttir, H., Jóhannesdóttir, I.H., Sigurgeirsson, B., De Polavieja, G.G. dan Karlsson, K., 2013. The ontogeny of sleep-wake cycles in zebrafish: a comparison to humans. *Frontiers in neural circuits*, 7, hal.178.
- Spence, R., 2011. Zebrafish ecology and behaviour. In: *Zebrafish models in neurobehavioral research*. Springer, hal. 1–46.
- Supriadi, R.F., Permata, T.R., Norisa, N., Khotimah, H., Ali, M., Widodo, M.A., Kalsum, U. dan Nurdiana, 2019. Centella asiatica protect the development of aluminum-induced zebrafish larvae. , 020030(June), hal.020030. Available at: <http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.5110005>.
- Tair, K., Kharoubi, O., Tair, O.A., Hellal, N., Benyettou, I. dan Aoues, A., 2016. Aluminium-induced acute neurotoxicity in rats: Treatment with aqueous extract of Arthrophytum (Hammada scoparia). *Journal of Acute Disease*, 5(6), hal.470–482.
- Thirumalai, V. dan Cline, H.T., 2008. Endogenous dopamine suppresses initiation of swimming in pre-feeding zebrafish larvae. *Journal of neurophysiology*.
- Trisnawati, A., Anasrulloh, A., Rianawati, S.B., Khotimah, H., Ali, M. dan Susetya, B., 2019. COMPARISON EFFECT BETWEEN PEGAGAN (Centella asiatica) EXTRACT AND PRAMIPEXOLE TOWARD LOCOMOTOR ACTIVITIES, α -SYNUCLEIN, AND NRF2 EXPRESSION IN ZEBRAFISH PARKINSON MODEL. *MNJ (Malang Neurology Journal)*, 5(1), hal.5–13. Available at: <http://mnj.ub.ac.id/index.php/mnj/article/view/291>.
- Truong, L., Harper, S.L. dan Tanguay, R.L., 2011. NIH Public Access. , (8), hal.1–8.
- Walton, J.R., 2014. Chronic aluminum intake causes Alzheimer's disease: applying Sir Austin Bradford Hill's causality criteria. *Journal of Alzheimer's Disease*, 40(4), hal.765–838.
- Wang, Z., Wei, X., Yang, J., Suo, J., Chen, J., Liu, X. dan Zhao, X., 2016. Chronic exposure to aluminum and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Neuroscience letters*, 610, hal.200–206.
- Wardani, D.W.K.K., Ali, M., Khotimah, H., Nurdiana, Riawan, W., Primihastuti, D., Cory'ah, F.A.N., Puspita, L.I., et al., 2018. The effect of Centella asiatica to the vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 on the rotenone induced zebrafish larvae (Danio rerio) stunting model. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 5(2), hal.088–095.
- WHO, 2003. *Aluminium in drinking-water: Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality*, World Health Organization.

Xu, C.-L., Qu, R., Zhang, J., Li, L.-F. dan Ma, S.-P., 2013. Neuroprotective effects of madecassoside in early stage of Parkinson's disease induced by MPTP in rats. *Fitoterapia*, 90, hal.112–118.

Xu, C.-L., Wang, Q.-Z., Sun, L.-M., Li, X.-M., Deng, J.-M., Li, L.-F., Zhang, J., Xu, R. dan Ma, S.-P., 2012. Asiaticoside: attenuation of neurotoxicity induced by MPTP in a rat model of Parkinsonism via maintaining redox balance and up-regulating the ratio of Bcl-2/Bax. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 100(3), hal.413–418.

Xu, G., Sun, W., Guo, X., Wu, L., Hou, Y., Ma, X., Qin, L., Gao, M. dan Liu, T., 2018. Asiatic acid promotes liver fatty acid metabolism in diabetic models. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE*, 11(11), hal.11837–11845.

Yan, D., Jin, C., Cao, Y., Wang, L., Lu, X., Yang, J., Wu, S. dan Cai, Y., 2017. Effects of Aluminium on Long-Term Memory in Rats and on SIRT 1 Mediating the Transcription of CREB-Dependent Gene in Hippocampus. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 121(4), hal.342–352.

Zahara, E., 2018. *Efek Ekstrak Etanol Pegagan (Centella asiatica) Pada Masa Pre Sampai Dengan Post Hatching Terhadap IL-6, IL-10 dan Osifikasi Tulang Rawan Pada Larva Zebrafish (Danio Rerio) Stunting*. Universitas Brawijaya.

Zahara, E., Nuraenah, E., Yuliyani, T., Khotimah, H., Kalsum, U., Wiyasa, I.W.A., Ramli, N., Al-Rahmad, A.H. dan Ali, M., 2018. Ekstrak Ethanol Pegagan (Centella asiatica) Meningkatkan Osifikasi Tulang dan Panjang Badan Larva Zebrafish (Danio rerio) Model Stunting Usia 9 Hari Pasca Fertilisasi. , 3(3), hal.95–102.

Lampiran 1. Surat Keterangan Kelaikan Etik



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

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

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 95 / EC / KEPK / 03 / 2019

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

JUDUL : Toksisitas PbSO₄, CdCl₂, dan AlCl₃ pada Larva Zebrafish yang Diberikan Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*).

PENELITI UTAMA : Dr. Husnul Khotimah, S.Si.,M.Kes

ANGGOTA : Nanda Norisa
Tessa Rezky Permata
Damal Noviasari
Fitria Edni Wari
Yuyun Diestika
Rizky Febriyanti Supriadi
Risnawati
Amrina Octaviana

UNIT / LEMBAGA : Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya Malang.

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Farmakologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang
Ketua



Prof. Dr. Moch. Latief ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr(Hk)
NIPK. 20180246951611001

Catatan :

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



Lampiran 2. Surat Keterangan Bebas Plagiasi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN

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

SURAT KETERANGAN

Nomor : 425 /UN10.F08.08/PN/2019

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

Judul : Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Lokomotor, Oksifasi Tulang Keras, Ekspreso Sirtuin 1 (SIRT1) Dan Apoptosis Larva Zebrafish Yang Dipapar Alumunium

Penulis : Rizky Febriyanti Supriadi

NIM : 176070400111021

Jumlah Halaman : 92

Jenis Artikel : Tesis (Program Studi Magister Kebidanan)

Kemiripan : 4 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

25 JUL 2019

Ketua Badan Penerbitan Jurnal,



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



Lampiran 3. Determinasi Tanaman *Centella Asiatica* (Pegagan)



DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR UPT MATERIA MEDICA

Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313)

KOTA BATU

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

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

1. Perihal determinasi tanaman Pegagan

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Umbellales
Suku : Umbelliferae
Marga : *Centella*
Jenis : *Centella asiatica* (Linn). Urban
Sinonim : *Hydrocotyle asiatica* Linn. = *Pasequinus*, Rumph.

Pegagan, Gagan-gagan, Rendeng, Kerok batok (Jawa); Daun kaki kuda (Indonesia), Pegaga (Ujung Pandang); Antanan gede, Antanan rambat (Sunda), Dau tungke (Bugis); Kos tekosan (Madura), Kori-kori (Halmahera)

Kunci determinasi : 1b -2b - 3b - 4b- 6b- 7b- 9b-10b- 11b - 12b - 13b-14b - 16a-239b- 243b- 244b-248b- 249b-250b-266b-267a- 268a -269a- 2b- 3

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

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

4. **Kandungan kimia** : Asiaticoside, thankuniside, isothankuniside, madecassoside, brahmoside, brahminoside, brahmic acid, 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 kasiat anti lepra (Morbus Hansen). Daun kaki kuda mengandung senyawa glikosida trigergepnoida, alkaloid hidrokotilin, steroid, tanin, minyak atsiri, gula pereduksi dan garam-garam mineral seperti garam kalium, natrium, magnesium, kalsium dan besi

5. **Penggunaan** : Penelitian

6. **Daftar Pustaka**

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

Demikian determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 14 Januari 2015
Kepala UPT Materia Medica Batu

Dr. Husni RM. Apt. MKes.
NIP. 19611102 199103 1 003



Lampiran 4: Laporan Hasil Analisa Zebrafish



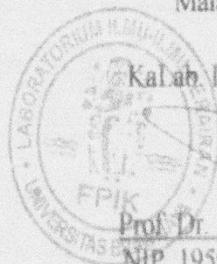
KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
JL. VETERAN TELP. (0341) 575838 MALANG 65145

LAPORAN HASIL ANALISA

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

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

Malang, 09 November 2012



Ka. Lab. Ilmu – Ilmu Perairan

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



Lampiran 5: Data Aktivitas Locomotor Larva Zebrafish Usia 4, 5 dan 6 dpf

Kelompok	Usia			
	4 dpf	5 dpf	6 dpf	
KN	1	23	19	16
	2	20	20	22
	3	28	26	19
	4	28	17	28
	5	24	28	28
Rata-rata		24.60	22.00	22.60
Standar Deviasi		3.44	4.74	5.37
KP	1	0	16	13
	2	7	20	14
	3	0	14	15
	4	6	15	7
	5	9	13	7
Rata-rata		4.16	2.70	3.90
P1	1	19	11	18
	2	15	22	18
	3	10	16	16
	4	13	22	21
	5	15	15	18
Rata-rata		14.40	17.20	18.20
Standar Deviasi		3.29	4.76	1.79
P2	1	20	15	19
	2	18	18	17
	3	12	16	19
	4	22	25	18
	5	16	22	24
Rata-rata		17.60	19.20	19.40
Standar Deviasi		3.85	4.21	2.70
P3	1	22	23	26
	2	23	20	22
	3	20	21	20
	4	18	24	25
	5	22	23	23
Rata-rata		21.00	22.20	23.20
Standar Deviasi		2.00	1.64	2.39

Lampiran 6: Data Osifikasi Larva Zebrafish Usia 6 dpf

Kelompok		<i>Integrated Density</i>
KN	1	56935732
	2	53825358
	3	52949817
	4	56472282
	5	52599962
Rata-rata		54556630.2
Standar Deviasi		2017114.61
KP	1	48006786
	2	47233382
	3	46076624
	4	52126857
	5	52990353
Rata-rata		49286800.4
Standar Deviasi		3079870.93
P1	1	54319191
	2	55404808
	3	50542524
	4	49424374
	5	47934717
Rata-rata		51525122.8
Standar Deviasi		3206572.71
P2	1	53899445
	2	52571700
	3	52133178
	4	51351898
	5	56542827
Rata-rata		53299809.6
Standar Deviasi		2034837.64
P3	1	53073623
	2	53411234
	3	56363725
	4	50433705
	5	58459205
Rata-rata		54348298.4
Standar Deviasi		3114017.74

Lampiran 7: Data Ekspresi SIRT1 Larva Zebrafish

Kelompok		Integrated Density
KN	1	2179729
	2	3385802
	3	2079523
Rata-rata		726982.14
Standar Deviasi		2017114.61
KP	1	1915822
	2	1941574
	3	1967326
Rata-rata		25752.00
Standar Deviasi		3079870.93
P1	1	1859044
	2	1963428
	3	2067812
Rata-rata		104384.00
Standar Deviasi		3206572.71
P2	1	2469791
	2	2772265.5
	3	3074740
Rata-rata		302474.50
Standar Deviasi		2034837.64
P3	1	1670722
	2	2932307
	3	1649794
Rata-rata		2301514.5
Standar Deviasi		630792.50

Lampiran 8: Data Apoptosis Bagian Kepala Larva Zebrafish Usia 3 dpf

Kelompok		<i>Integrated Density</i>
KN	1	8892903
	2	7058711
	3	5661545
	4	12869841
	5	14885295
Rerata		9873659
Standar Deviasi		3896194.326
KP	1	24203888
	2	24690293
	3	20528861
	4	20439041
	5	20085134
Rerata		21989443.4
Standar Deviasi		2256202.356
P1	1	19684029
	2	12965917
	3	22893400
	4	18436624
	5	23283604
Rerata		19452714.8
Standar Deviasi		4173683.001
P2	1	18007775
	2	15000700
	3	10682915
	4	20230081
	5	23428326
Rerata		17469959.4
Standar Deviasi		4888017.571
P3	1	15848644
	2	15855994.5
	3	15863345
	4	18491425
	5	21119505
Rerata		17435782.7
Standar Deviasi		2354330.636

Lampiran 9: Data Apoptosis Bagian Ekor Larva Zebrafish Usia 3 dpf

Kelompok		<i>Integrated Density</i>
KN	1	5394528
	2	6681135
	3	8483213
	4	7382134
	5	7418108
Rerata		7071823.6
Standar Deviasi		1137341.591
KP	1	11932563
	2	12711971
	3	12733456
	4	14340723
	5	14389422
Rerata		13221627
Standar Deviasi		1092687.876
P1	1	10296195
	2	10326751
	3	10445367
	4	10585897
	5	10895181
Rerata		10509878.2
Standar Deviasi		243718.5272
P2	1	10025835
	2	10037733
	3	10095588
	4	10142831
	5	10147647
Rerata		10089926.8
Standar Deviasi		56996.65919
P3	1	7787036
	2	7798438
	3	8176009
	4	8372853
	5	6815801
Rerata		7790027.4
Standar Deviasi		599554.885

Lampiran 10: Hasil Analisis Statistik

Perbandingan Aktivitas Lokomotor Usia 4, 5 dan 6 dpf

1. Uji Normalitas

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Lokomotor 4 dpf	.142	25	.200*	.942	25	.167
Lokomotor 5 dpf	.130	25	.200*	.978	25	.837
Lokomotor 6 dpf	.112	25	.200*	.958	25	.372

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

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances						
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
Lokomotor 4 dpf	Based on Mean	.922	4	20	.470	
	Based on Median	.474	4	20	.755	
	Based on Median and with adjusted df	.474	4	17.990	.754	
	Based on trimmed mean	.930	4	20	.466	
Lokomotor 5 dpf	Based on Mean	2.801	4	20	.054	
	Based on Median	.972	4	20	.445	
	Based on Median and with adjusted df	.972	4	15.577	.451	
	Based on trimmed mean	2.764	4	20	.056	
Lokomotor 6 dpf	Based on Mean	3.353	4	20	.030	
	Based on Median	1.759	4	20	.177	
	Based on Median and with adjusted df	1.759	4	15.245	.189	
	Based on trimmed mean	3.371	4	20	.029	

3. Uji Annova

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Lokomotor 4 dpf	Between Groups	1189.200	4	297.300	25.324	.000
	Within Groups	234.800	20	11.740		
	Total	1424.000	24			

Lokomotor 5 dpf	Between Groups	168.960	4	42.240	2.897	.048
	Within Groups	291.600	20	14.580		
	Total	460.560	24			
Lokomotor 6 dpf	Between Groups	461.040	4	115.260	9.573	.000
	Within Groups	240.800	20	12.040		
	Total	701.840	24			

4. Post Hoc LSD 4 dpf

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Lokomotor 4 dpf						
LSD						
(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kn	Kp	20.20000*	2.16703	.000	15.6797	24.7203
	P1	10.20000*	2.16703	.000	5.6797	14.7203
	P2	7.00000*	2.16703	.004	2.4797	11.5203
	P3	3.60000	2.16703	.112	-.9203	8.1203
Kp	Kn	-20.20000*	2.16703	.000	-24.7203	-15.6797
	P1	-10.00000*	2.16703	.000	-14.5203	-5.4797
	P2	-13.20000*	2.16703	.000	-17.7203	-8.6797
	P3	-16.60000*	2.16703	.000	-21.1203	-12.0797
P1	Kn	-10.20000*	2.16703	.000	-14.7203	-5.6797
	Kp	10.00000*	2.16703	.000	5.4797	14.5203
	P2	-3.20000	2.16703	.155	-7.7203	1.3203
	P3	-6.60000*	2.16703	.006	-11.1203	-2.0797
P2	Kn	-7.00000*	2.16703	.004	-11.5203	-2.4797
	Kp	13.20000*	2.16703	.000	8.6797	17.7203
	P1	3.20000	2.16703	.155	-1.3203	7.7203
	P3	-3.40000	2.16703	.132	-7.9203	1.1203
P3	Kn	-3.60000	2.16703	.112	-8.1203	.9203
	Kp	16.60000*	2.16703	.000	12.0797	21.1203
	P1	6.60000*	2.16703	.006	2.0797	11.1203
	P2	3.40000	2.16703	.132	-1.1203	7.9203

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

5. Post Hoc LSD 5 dpf

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Lokomotor 5 dpf						
LSD						
(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kn	Kp	6.40000*	2.41495	.015	1.3625	11.4375
	P1	4.80000	2.41495	.061	-.2375	9.8375
	P2	2.80000	2.41495	.260	-2.2375	7.8375
	P3	-.20000	2.41495	.935	-5.2375	4.8375
Kp	Kn	-6.40000*	2.41495	.015	-11.4375	-1.3625
	P1	-1.60000	2.41495	.515	-6.6375	3.4375
	P2	-3.60000	2.41495	.152	-8.6375	1.4375
	P3	-6.60000*	2.41495	.013	-11.6375	-1.5625
P1	Kn	-4.80000	2.41495	.061	-9.8375	.2375
	Kp	1.60000	2.41495	.515	-3.4375	6.6375
	P2	-2.00000	2.41495	.417	-7.0375	3.0375
	P3	-5.00000	2.41495	.052	-10.0375	.0375
P2	Kn	-2.80000	2.41495	.260	-7.8375	2.2375
	Kp	3.60000	2.41495	.152	-1.4375	8.6375
	P1	2.00000	2.41495	.417	-3.0375	7.0375
	P3	-3.00000	2.41495	.229	-8.0375	2.0375
P3	Kn	.20000	2.41495	.935	-4.8375	5.2375
	Kp	6.60000*	2.41495	.013	1.5625	11.6375
	P1	5.00000	2.41495	.052	-.0375	10.0375
	P2	3.00000	2.41495	.229	-2.0375	8.0375

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

6. Post Hoc LSD 6 dpf

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Lokomotor 6 dpf						
LSD						
(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kn	Kp	11.40000*	2.19454	.000	6.8223	15.9777
	P1	4.40000	2.19454	.059	-.1777	8.9777
	P2	3.20000	2.19454	.160	-1.3777	7.7777
	P3	-.60000	2.19454	.787	-5.1777	3.9777
Kp	Kn	-11.40000*	2.19454	.000	-15.9777	-6.8223
	P1	-7.00000*	2.19454	.005	-11.5777	-2.4223
	P2	-8.20000*	2.19454	.001	-12.7777	-3.6223
	P3	-12.00000*	2.19454	.000	-16.5777	-7.4223
P1	Kn	-4.40000	2.19454	.059	-8.9777	.1777
	Kp	7.00000*	2.19454	.005	2.4223	11.5777
	P2	-1.20000	2.19454	.591	-5.7777	3.3777
	P3	-5.00000*	2.19454	.034	-9.5777	-.4223
P2	Kn	-3.20000	2.19454	.160	-7.7777	1.3777
	Kp	8.20000*	2.19454	.001	3.6223	12.7777
	P1	1.20000	2.19454	.591	-3.3777	5.7777
	P3	-3.80000	2.19454	.099	-8.3777	.7777
P3	Kn	.60000	2.19454	.787	-3.9777	5.1777
	Kp	12.00000*	2.19454	.000	7.4223	16.5777
	P1	5.00000*	2.19454	.034	.4223	9.5777
	P2	3.80000	2.19454	.099	-.7777	8.3777

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

Lampiran 11: Hasil Analisis Statistik

Perbandingan Osifikasi Tulang Keras Usia 6 dpf

1. Uji Normalitas

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Osifikasi Tulang Keras	.121	25	.200 [*]	.972	25	.685
*. This is a lower bound of the true significance.						
a. Lilliefors Significance Correction						

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Osifikasi Tulang Keras	Based on Mean	1.166	4	20	.355
	Based on Median	.363	4	20	.832
	Based on Median and with adjusted df	.363	4	17.906	.832
	Based on trimmed mean	1.152	4	20	.361

3. Uji Annova

ANOVA					
Osifikasi Tulang Keras					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	97536397876583.940	4	24384099469145.984	3.236	.034
Within Groups	150696542235253.160	20	7534827111762.658		
Total	248232940111837.100	24			

4. Post Hoc LSD

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Osifikasi Tulang Keras						
LSD						
(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kn	Kp	5269829.80000*	1736067.63829	.007	1648456.1646	8891203.4354
	P1	3031507.40000	1736067.63829	.096	-589866.2354	6652881.0354
	P2	1256820.60000	1736067.63829	.477	-2364553.0354	4878194.2354
	P3	208331.80000	1736067.63829	.906	-3413041.8354	3829705.4354
Kp	Kn	-5269829.80000*	1736067.63829	.007	-8891203.4354	-1648456.1646
	P1	-2238322.40000	1736067.63829	.212	-5859696.0354	1383051.2354
	P2	-4013009.20000*	1736067.63829	.032	-7634382.8354	-391635.5646
	P3	-5061498.00000*	1736067.63829	.009	-8682871.6354	-1440124.3646
P1	Kn	-3031507.40000	1736067.63829	.096	-6652881.0354	589866.2354
	Kp	2238322.40000	1736067.63829	.212	-1383051.2354	5859696.0354
	P2	-1774686.80000	1736067.63829	.319	-5396060.4354	1846686.8354
	P3	-2823175.60000	1736067.63829	.120	-6444549.2354	798198.0354
P2	Kn	-1256820.60000	1736067.63829	.477	-4878194.2354	2364553.0354
	Kp	4013009.20000*	1736067.63829	.032	391635.5646	7634382.8354
	P1	1774686.80000	1736067.63829	.319	-1846686.8354	5396060.4354
	P3	-1048488.80000	1736067.63829	.553	-4669862.4354	2572884.8354
P3	Kn	-208331.80000	1736067.63829	.906	-3829705.4354	3413041.8354
	Kp	5061498.00000*	1736067.63829	.009	1440124.3646	8682871.6354
	P1	2823175.60000	1736067.63829	.120	-798198.0354	6444549.2354
	P2	1048488.80000	1736067.63829	.553	-2572884.8354	4669862.4354

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

Lampiran 12: Hasil Analisis Statistik

Perbandingan Ekspresi SIRT1 Larva Zebrafish Usia 3 dpf

1. Uji Normalitas

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
SIRT1	.195	15	.131	.897	15	.084

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
SIRT1	Based on Mean	3.258	4	10	.059
	Based on Median	.851	4	10	.524
	Based on Median and with adjusted df	.851	4	3.498	.567
	Based on trimmed mean	3.036	4	10	.070

3. Uji ANNOVA

ANOVA					
SIRT1					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1687553738220.167	4	421888434555.042	2.024	.167
Within Groups	2084781222201.667	10	208478122220.167		
Total	3772334960421.833	14			

Lampiran 13: Hasil Analisis Statistik

Perbandingan Apoptosis Sel Bagian Kepala dan Badan Larva Zebrafish

Usia 3 dpf

1. Uji Normalitas

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Apoptosis Bagian Kepala dan Badan	.117	25	.200 [*]	.946	25	.199
*. This is a lower bound of the true significance.						
a. Lilliefors Significance Correction						

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances						
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
Apoptosis Bagian Kepala dan Badan	Based on Mean	.950	4	20	.456	
	Based on Median	.671	4	20	.620	
	Based on Median and with adjusted df	.671	4	19.036	.620	
	Based on trimmed mean	.923	4	20	.470	

3. Uji ANNOVA

ANOVA					
Apoptosis Bagian Kepala dan Badan					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	409037091774039.600	4	102259272943509.900	7.617	.001
Within Groups	268503990422206.000	20	13425199521110.300		
Total	677541082196245.600	24			

4. Post Hoc LSD

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Apoptosis Bagian Kepala dan Badan						
LSD						
(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kn	Kp	-12115784.40000*	2317343.26513	.000	-16949677.7458	-7281891.0542
	P1	-9579055.80000*	2317343.26513	.001	-14412949.1458	-4745162.4542
	P2	-7596300.40000*	2317343.26513	.004	-12430193.7458	-2762407.0542
	P3	-7562123.70000*	2317343.26513	.004	-12396017.0458	-2728230.3542
Kp	Kn	12115784.40000*	2317343.26513	.000	7281891.0542	16949677.7458
	P1	2536728.60000	2317343.26513	.287	-2297164.7458	7370621.9458
	P2	4519484.00000	2317343.26513	.065	-314409.3458	9353377.3458
	P3	4553660.70000	2317343.26513	.063	-280232.6458	9387554.0458
P1	Kn	9579055.80000*	2317343.26513	.001	4745162.4542	14412949.1458
	Kp	-2536728.60000	2317343.26513	.287	-7370621.9458	2297164.7458
	P2	1982755.40000	2317343.26513	.402	-2851137.9458	6816648.7458
	P3	2016932.10000	2317343.26513	.394	-2816961.2458	6850825.4458
P2	Kn	7596300.40000*	2317343.26513	.004	2762407.0542	12430193.7458
	Kp	-4519484.00000	2317343.26513	.065	-9353377.3458	314409.3458
	P1	-1982755.40000	2317343.26513	.402	-6816648.7458	2851137.9458
	P3	34176.70000	2317343.26513	.988	-4799716.6458	4868070.0458
P3	Kn	7562123.70000*	2317343.26513	.004	2728230.3542	12396017.0458
	Kp	-4553660.70000	2317343.26513	.063	-9387554.0458	280232.6458
	P1	-2016932.10000	2317343.26513	.394	-6850825.4458	2816961.2458
	P2	-34176.70000	2317343.26513	.988	-4868070.0458	4799716.6458

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

Lampiran 14: Hasil Analisis Statistik

Perbandingan Apoptosis Sel Bagian Ekor Larva Zebrafish Usia 3 dpf

1. Uji Normalitas

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Apoptosis Bagian Ekor	.149	25	.155	.959	25	.400

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Apoptosis Bagian Ekor	Based on Mean	4.796	4	20	.007
	Based on Median	1.943	4	20	.142
	Based on Median and with adjusted df	1.943	4	10.208	.178
	Based on trimmed mean	4.772	4	20	.007

3. Uji ANNOVA

ANOVA					
Apoptosis Bagian Ekor					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	118791951629862.000	4	29697987907465.500	51.034	.000
Within Groups	11638504358550.000	20	581925217927.500		
Total	130430455988412.000	24			

4. Post Hoc LSD

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Apoptosis Bagian Ekor						
LSD						
(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kn	Kp	-6149803.40000*	482462.52411	.000	-7156202.5900	-5143404.2100
	P1	-3438054.60000*	482462.52411	.000	-4444453.7900	-2431655.4100
	P2	-3018103.20000*	482462.52411	.000	-4024502.3900	-2011704.0100
	P3	-718203.80000	482462.52411	.152	-1724602.9900	288195.3900
Kp	Kn	6149803.40000*	482462.52411	.000	5143404.2100	7156202.5900
	P1	2711748.80000*	482462.52411	.000	1705349.6100	3718147.9900
	P2	3131700.20000*	482462.52411	.000	2125301.0100	4138099.3900
	P3	5431599.60000*	482462.52411	.000	4425200.4100	6437998.7900
P1	Kn	3438054.60000*	482462.52411	.000	2431655.4100	4444453.7900
	Kp	-2711748.80000*	482462.52411	.000	-3718147.9900	-1705349.6100
	P2	419951.40000	482462.52411	.394	-586447.7900	1426350.5900
	P3	2719850.80000*	482462.52411	.000	1713451.6100	3726249.9900
P2	Kn	3018103.20000*	482462.52411	.000	2011704.0100	4024502.3900
	Kp	-3131700.20000*	482462.52411	.000	-4138099.3900	-2125301.0100
	P1	-419951.40000	482462.52411	.394	-1426350.5900	586447.7900
	P3	2299899.40000*	482462.52411	.000	1293500.2100	3306298.5900
P3	Kn	718203.80000	482462.52411	.152	-288195.3900	1724602.9900
	Kp	-5431599.60000*	482462.52411	.000	-6437998.7900	-4425200.4100
	P1	-2719850.80000*	482462.52411	.000	-3726249.9900	-1713451.6100
	P2	-2299899.40000*	482462.52411	.000	-3306298.5900	-1293500.2100

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

Lampiran 15: Hasil Analisis Statistik

Hubungan Ekstrak Etanol Pegagan dengan aktivitas lokomotor, osifikasi tulang, ekspresi SIRT1, dan apoptosis pada Larva Zebrafish yang dipapar Aluminium

1. Uji Normalitas

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Lokomotor 6 dpf	.153	12	.200*	.877	12	.080
Osifikasi Tulang Keras	.162	12	.200*	.948	12	.604
Ekspresi SIRT1	.265	12	.020	.857	12	.044
Apoptosis Bagian Kepala dan Badan	.129	12	.200*	.945	12	.564
Apoptosis Bagian Ekor	.242	12	.050	.834	12	.023

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

a. Lilliefors Significance Correction

2. Korelasi Ekstrak Etanol Pegagan Terhadap Locomotor usia 6 dpf

Correlations			
		Kelompok Perlakuan	Lokomotor 6 dpf
Kelompok Perlakuan	Pearson Correlation	1	.830**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	20	20
Lokomotor 6 dpf	Pearson Correlation	.830**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

3. Korelasi Ekstrak Etanol Pegagan Terhadap Osifikasi Tulang usia 6 dpf

Correlations			
		Kelompok Perlakuan	Osifikasi Tulang Keras
Kelompok Perlakuan	Pearson Correlation	1	.566**
	Sig. (2-tailed)		.009
	N	20	20
Osifikasi Tulang Keras	Pearson Correlation	.566**	1
	Sig. (2-tailed)	.009	
	N	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

4. Korelasi Ekstrak Etanol Pegagan Terhadap Ekspresi SIRT1

Correlations				
			Kelompok Perlakuan	Ekspresi SIRT1
Spearman's rho	Kelompok Perlakuan	Correlation Coefficient	1.000	-.019
		Sig. (2-tailed)	.	.947
		N	20	15
Spearman's rho	Ekspresi SIRT1	Correlation Coefficient	-.019	1.000
		Sig. (2-tailed)	.947	.
		N	15	15

5. Korelasi Ekstrak Etanol Pegagan Terhadap Apoptosis Bagian Kepala dan Badan usia 3 dpf

Correlations			
		Kelompok Perlakuan	Apoptosis Bagian Kepala dan Badan
Kelompok Perlakuan	Pearson Correlation	1	-.470*
	Sig. (2-tailed)		.037
	N	20	20
Apoptosis Bagian Kepala dan Badan	Pearson Correlation	-.470*	1
	Sig. (2-tailed)	.037	
	N	20	20

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

6. Korelasi Ekstrak Etanol Pegagan Terhadap Apoptosis Bagian Ekor usia 3 dpf

Correlations				
			Kelompok Perlakuan	Apoptosis Bagian Ekor
Spearman's rho	Kelompok Perlakuan	Correlation Coefficient	1.000	-.969**
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	20	20
	Apoptosis Bagian Ekor	Correlation Coefficient	-.969**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

7. Korelasi Lokomotor Terhadap osifikasi Tulang Keras usia 6 dpf

Correlations			
		Lokomotor 6 dpf	Osifikasi Tulang Keras
Lokomotor 6 dpf	Pearson Correlation	1	.839**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	20	20
Osifikasi Tulang Keras	Pearson Correlation	.839**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 16: Publikasi Jurnal

AIP Conference Proceedings



Centella asiatica protect the development of aluminum-induced zebrafish larvae

Cite as: AIP Conference Proceedings 2108, 020030 (2019); <https://doi.org/10.1063/1.5110005>
 Published Online: 04 June 2019

Rizky Febriyanti Supriadi, Tesza Rezky Permata, Nanda Norisa, Husnul Khotimah, Mulyohadi Ali, M. Aris Widodo, Umi Kalsum, and Nurdiana



ARTICLES YOU MAY BE INTERESTED IN

[Development of cadmium-induced zebrafish larvae improved by Centella asiatica](#)
 AIP Conference Proceedings 2108, 020032 (2019); <https://doi.org/10.1063/1.5110007>

[Effect of Centella asiatica to developmental process of lead-induced zebrafish larvae](#)
 AIP Conference Proceedings 2108, 020033 (2019); <https://doi.org/10.1063/1.5110008>

[Efficacy studies of Treg activation using dsDNA desensitization inhibits immune function without side effect in lupus mice model](#)
 AIP Conference Proceedings 2108, 020037 (2019); <https://doi.org/10.1063/1.5110012>

AIP | Conference Proceedings
 Get 30% off all print proceedings!
 Enter Promotion Code **PDF30** at checkout

AIP Conference Proceedings 2108, 020030 (2019); <https://doi.org/10.1063/1.5110005>

2108, 020030

© 2019 Author(s).

RIWAYAT HIDUP

Rizky Febriyanti Supriadi, Lahir di Samarinda, 24 Februari 1990, anak pertama dari empat bersaudara, putri dari Bapak Supriadi, BA dan Ibu Rahmawati, M.Kes. Lulus di SD Negeri 065 Loa Bakung Samarinda tahun 2001. Lulus SMP Negeri 1 Samarinda tahun 2004, dan lulus SMA Negeri 1 Samarinda tahun 2007. Tahun 2007 melanjutkan pendidikan D-III Kebidanan di Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Kalimantan Timur, Samarinda, lulus tahun 2010. Melanjutkan pendidikan D-IV Kebidanan tahun 2011 di Program Studi D-IV Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung, lulus tahun 2012. Pada tahun 2017 mengambil pendidikan program studi Magister Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tahun 2010 sampai tahun 2017, penulis bekerja di Jurusan Kebidanan Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Kalimantan Timur.

