

PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI TIROSIN HIDROKSILASE (TH), DOPAMIN (DA), AKTIVITAS LOKOMOTOR DAN FREKUENSI DENYUT JANTUNG LARVA ZEBRAFISH YANG DIPAPAR ALUMINIUM

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH:
TESZA REZKY PERMATA
176070400111004**

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





TESIS

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI TIROSIN
HIDROKSILASE (TH), DOPAMIN (DA), AKTIVITAS
LOKOMOTOR DAN DENYUT JANTUNG LARVA
ZEBRAFISH YANG DIPAPAR ALUMINIUM**

**OLEH:
TESZA REZKY PERMATA
176070400111004**

**Dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal : 23 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat**

KOMISI PEMBIMBING

**Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes
NIP. 195505121987012001
Ketua**

**Prof. Dr. dr. M. Muljohadi Ali, SpFK
NIK. 171047692
Anggota**

**Malang,
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,**

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

TESIS

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI TIROSIN
HIDROKSILASE (TH), DOPAMIN (DA), AKTIVITAS
LOKOMOTOR DAN DENYUT JANTUNG LARVA
ZEBRAFISH YANG DIPAPAR ALUMINIUM**

OLEH:
TESZA REZKY PERMATA
176070400111004

Dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal : 23 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PENGUJI

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

Ketua

Prof. Dr. dr. M. Mulyohadi Ali, SpFK
NIK. 171047692

Anggota Penguji

dr. Brigitta Ida RVC, SpA(K), M.Kes
NIP. 197810162014102001

Anggota Penguji

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

Anggota Penguji



23 Juli 2019

Nama : Tesza Rezky Permata
NIM : 176070400111004
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran UB

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Kadar Tirosin Hidroksilase (TH), Dopamin (Da), Aktivitas Lokomotor dan Denyut Jantung Larva Zebrafish yang Dipapar Alumunium”

Penulis menyampaikan rasa hormat dan 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 di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med, SpA(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas izin yang diberikan sehingga penulis dapat menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Dr. dr. Bambang Rahardjo, SpOG(K) selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
4. Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes selaku ketua komisi pembimbing yang telah memberikan ilmu, bimbingan, arahan dan motivasi dalam penyusunan tesis ini.
5. Prof. Dr. dr. Muljohadi Ali, SpFK selaku anggota pembimbing yang telah memberikan ilmu, bimbingan, arahan dan motivasi dalam penyusunan tesis ini.

6. Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes yang telah memberikan ide, ilmu, arahan, dan motivasi dalam penyusunan tesis ini.

7. Seluruh Dosen Program Studi Kebidanan dan Staf Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

8. Orang tua yang telah memberikan dukungan, motivasi dan doa kepada penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

9. Seluruh pihak yang telah membantu dalam penyelesaian tesis ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dan keterbatasan pada tesis ini. Oleh karenanya, penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun demi kesempurnaan tesis ini.

Malang, Juli 2019

Penulis





*Karya ilmiah ini kutujukan kepada
Ayahanda dan Ibunda tercinta,
Yusmadi dan Rida Wiji Astuti*

RINGKASAN

Tesza Rezky Permata

Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Tirosin Hidroksilase (TH), Dopamin (Da), Aktivitas Lokomotor dan Denyut Jantung Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium. Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Ketua Komisi Pembimbing : Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes; Anggota : Prof. Dr. dr. Mohammad Muljohadi Ali, Sp.FK

Aluminium (Al) adalah elemen terbanyak ketiga setelah oksigen dan silikon di kerak bumi. Aluminium memiliki potensi efek neurotoksik jika terakumulasi di dalam tubuh. Waktu yang paling rentan terhadap toksisitas kimia pada manusia adalah pada periode kritis perkembangan, dimulai dari embrio hingga usia 2 tahun. Paparan aluminium pada janin berasal dari lingkungan maternal ibu. Setelah lahir, bayi masih terpapar Al melalui ASI atau susu formula. Paparan pada masa proliferasi akan berdampak luas karena kerusakan mengikuti proses selanjutnya yaitu diferensiasi dan organogenesis. Penilaian lokomotor dan denyut jantung dapat mewakili baik atau tidaknya perkembangan pada awal kehidupan. Karena luasnya paparan Al maka perlu dilakukan upaya pencegahan atau intervensi spesifik untuk mengatasi kerusakan akibat Al.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek ekstrak etanol *Centella asiatica* terhadap lokomotor, denyut jantung, ekspresi tirosin hidroksilase (TH) dan dopamin (DA) pada larva zebrafish yang dipapar aluminium. Selain itu juga untuk mengetahui hubungan ekspresi TH dengan dopamin, hubungan dopamin dan lokomotor serta hubungan dopamin dan denyut jantung.

Penelitian ini menggunakan zebrafish 2 hpf (hour post fertilization) – 6 dpf (day post fertilization) yang terdiri dari 5 kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif yang dipapar aluminium 50 µM, kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3) yang dipapar aluminium 50 µM mulai 2 hpf – 3 dpf dan ditambahkan ekstrak etanol *Centella asiatica* 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml dan 5 µg/ml secara berturut-turut. Paparan dimulai sejak 2 hpf hingga 3 dpf. Pengukuran denyut jantung dimulai 3 dpf hingga 6 dpf, pengukuran lokomotor dimulai 4 dpf hingga 6 dpf, kemudian pengukuran ekspresi TH menggunakan PCR dan kadar dopamin menggunakan ELISA dilakukan pada 6 dpf. Analisis statistik dilakukan dengan ANOVA menggunakan SPSS versi 24.0 kemudian dilanjutkan dengan LSD dengan tingkat kepercayaan 5%.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar semua kelompok pada 4 dpf, 5 dpf, dan 6 dpf. Paparan aluminium menyebabkan penurunan lokomotor yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* pada kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3) menunjukkan peningkatan lokomotor. Hal ini didukung hasil Post Hoc LSD yang menunjukkan lokomotor pada kelompok perlakuan lebih tinggi secara signifikan dibandingkan kelompok aluminium dan tidak berbeda signifikan dengan kontrol. Pada denyut jantung terdapat perbedaan yang signifikan pada semua kelompok kecuali denyut jantung 5 dpf. Kelompok aluminium secara signifikan menurunkan denyut jantung dibandingkan kelompok kontrol. Sedangkan pada kelompok perlakuan yang ditambahkan *Centella asiatica* menunjukkan peningkatan denyut jantung dibandingkan kelompok aluminium dan kelompok P3 tidak berbeda signifikan dengan kontrol. Terjadi penurunan ekspresi TH yang signifikan akibat paparan aluminium. Pemberian *Centella asiatica* mampu meningkatkan ekspresi TH pada konsentrasi pegagan di P3 yang menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan dibandingkan kontrol, walaupun konsentrasi P1 dan P2 masih belum menunjukkan peningkatan yang signifikan dibanding kelompok aluminium. Kadar dopamin menurun secara signifikan pada kelompok aluminium jika dibandingkan dengan kontrol. Secara signifikan pemberian *Centella asiatica* meningkatkan kadar dopamin yang didukung hasil LSD yang menunjukkan kelompok perlakuan tidak berbeda secara signifikan dibandingkan kontrol. Hasil korelasi menunjukkan terdapat hubungan yang positif dan sangat kuat antara TH dan dopamin. Hubungan antara dopamin dan lokomotor menunjukkan arah positif dan kuat sedangkan dopamin dan denyut jantung tidak signifikan berhubungan.

Kesimpulan pada penelitian ini adalah *Centella asiatica* dapat mencegah toksisitas aluminium pada lokomotor, frekuensi denyut jantung, ekspresi TH dan kadar dopamin pada larva zebrafish.



SUMMARY

Tesza Rezky Permata

The Effect of Pegagan Ethanol Extract (*Centella asiatica*) on The Levels of Tyrosine Hydroxylase (TH), Dopamine (Da), Locomotor Activity and Heart Rate of Zebrafish Larvae Induced Aluminum. Master of Midwifery Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Chair of Supervisory Commission : Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes; Member : Prof. Dr. dr. Mohammad Muljohadi Ali, Sp.FK

Aluminum (Al) is the third most abundant element after oxygen and silicon in the earth's crust. Aluminum has the potential for neurotoxic effects if it accumulates in the body. The most vulnerable period to chemical toxicity in humans is in the critical period of development, starting from the embryo to the age of 2 years. Aluminum exposure to the fetus comes from the maternal environment. After birth, babies are still exposed to Al through breast milk or formula milk. Exposure during proliferation stage will bring a wide impact because the damage follows the next process, that is differentiation and organogenesis. Locomotor and heart rate assessment can represent whether the development is appropriate at the beginning of life. Because of the extent of Al exposure, prevention efforts or specific interventions are needed to overcome Al toxicity.

The purpose of this study was to investigate the effect of *Centella asiatica* extract on locomotor, heart rate, tyrosine hydroxylase (TH) level and dopamine (DA) in aluminum induced zebrafish larvae. Determine the correlation between TH and dopamine, dopamine and locomotor and dopamine and heart rate.

This study used zebrafish 2 hpf (hour post fertilization) - 6 dpf (day post fertilization) consisting of 5 groups, negative control groups, positive controls exposed to 50 μ M aluminum, treatment groups (P1, P2, and P3) exposed to 50 μ M aluminum and added *Centella asiatica* ethanol extract 1.25 μ g / ml, 2.5 μ g / ml and 5 μ g / ml respectively. Exposure starts from 2 hpf to 3 dpf. Heart rate measurements began from 3 dpf to 6 dpf, locomotor measurements began 4 dpf to 6 dpf, then measurement of TH levels using PCR and dopamine levels using ELISA was performed on the sixth day. Statistical analysis was performed by ANOVA from SPSS version 24.0 then continued by LSD with 5% confidence level.

The results showed that there were significant differences between all groups at 4 dpf, 5 dpf, and 6 dpf. Aluminum exposure caused a significant locomotor reduction compared to the control group. The administration of *Centella asiatica* extract in the treatment group (P1, P2 and P3) showed locomotor increase. This was supported by the results of Pos Hoc LSD which showed that locomotor in the treatment group was significantly higher than the aluminum group and was not significantly different from the control. At heart rate there were significant differences in all groups except for a heart rate of 5 dpf. The aluminum group significantly lowered heart rate compared to the control group. Whereas in the treatment group added *Centella asiatica* showed an increase in heart rate compared to the aluminum group and the P3 group did not differ significantly from the control. Significant reduction in TH expression due to aluminum exposure. *Centella asiatica* administration was able to increase the expression of TH at P3 concentration which showed no significant difference compared to the control, although the concentration of P1 and P2 was still not showed a significant increase compared to the aluminum group. Dopamine levels decreased significantly in the aluminum group when compared to controls. Significantly the administration of *Centella asiatica* increased dopamine levels supported by LSD results which showed that the treatment group was not significantly different compared to controls. The correlation results show that there is a positive and very strong relationship between TH and dopamine. The relationship between dopamine and locomotor shows a positive and strong direction while dopamine and heart rate are not significantly related. The conclusion of this study is that *Centella asiatica* can prevent locomotor aluminum toxicity, heart rate frequency, TH expression and dopamine levels in zebrafish larvae.

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	iv
HALAMAN PERUNTUKAN	v
KATA PENGANTAR	vi
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Alumunium	9
2.3.1 Karakteristik	9
2.3.2 Paparan Alumunium	9
2.3.3 Farmakokinetik Aluminium	10
2.3.4 Farmakodinamik	15
2.3.5 Efek Kesehatan dari Aluminium	18
2.2 Perkembangan	18
2.2.1 Konsep Dasar Tumbuh Kembang	18
2.2.2 Tahapan Tumbuh Kembang	19
2.2.3 Ciri-ciri Perkembangan	21
2.2.4 Aktivitas Lokomotor	22
2.2.5 Denyut Jantung	24
2.4 Radikal Bebas	25
2.4.1 Pengertian	25
2.4.2 Reactive Oxygen Species (ROS)	26
2.4.3 Sumber ROS	29
2.5 Dopamin	29
2.5.1 Pengertian	29
2.5.2 Fungsi Dopamin	30
2.5.3 Sintesis Dopamin	32

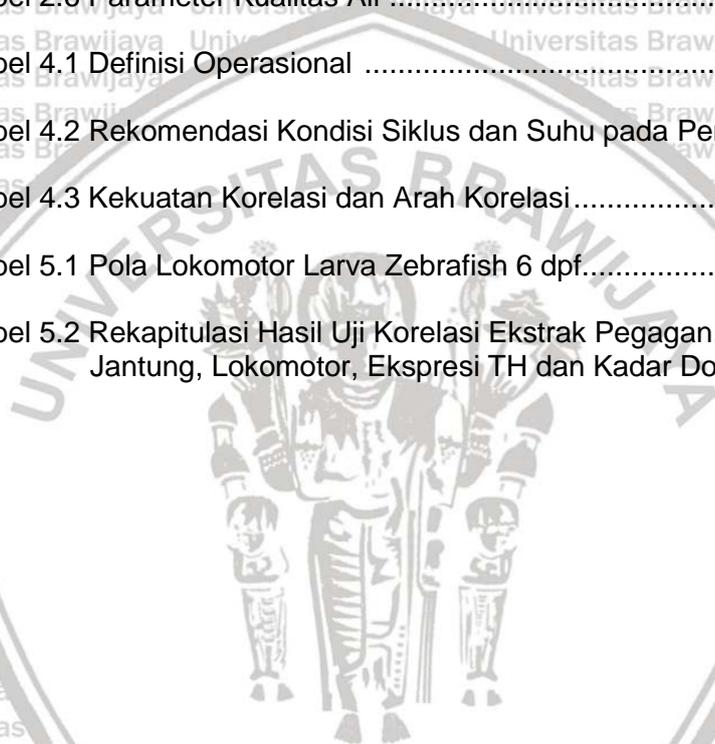


2.5.4	Tirosin Hidroksilase	33
2.5.5	Dopamin dan Lokomotor	35
2.5.6	Dopamin dan Detak Jantung	36
2.6	Pegagan	36
2.6.1	Deskripsi Tanaman	36
2.6.2	Klasifikasi	37
2.6.3	Kandungan Kimia	36
2.6.4	Manfaat Pegagan pada Kesehatan	37
2.7	Zebrafish	42
2.7.1	Sejarah dan Siklus Kehidupan	42
2.7.2	Perkembangan Zebrafish	43
2.7.3	Perawatan Zebrafish	45
BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN		47
3.1	Kerangka Teori	47
3.2	Kerangka Konsep	48
3.2	Penjelasan Kerangka Konsep	49
3.3	Hipotesis	50
BAB 4 METODE PENELITIAN.....		52
4.1	Jenis dan Desain Penelitian	52
4.2	Populasi dan Sampel	52
4.2.1	Populasi Penelitian	52
4.2.2	Sampel Penelitian	52
4.3	Kriteria Inklusi dan Eksklusi	54
4.3.1	Kriteria Inklusi	54
4.3.2	Kriteria Eksklusi	54
4.3.3	Kriteria Dropout	54
4.4	Tempat dan Waktu Penelitian	54
4.4.1	Tempat	54
4.4.2	Waktu Penelitian	54
4.5	Variabel Penelitian	54
4.6	Definisi Operasional	55
4.7	Alat dan Bahan	55
4.7.1	Alat dan Bahan Pemeliharaan Zebrafish	56
4.7.2	Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Pegagan	56
4.7.3	Alat dan Bahan Pembuatan Larutan Aluminium	56
4.7.4	Alat dan Bahan Pembuatan Medium Embrionik	56
4.7.2	Alat dan Bahan Pengukuran Motilitas dan Lokomotor	56
4.7.2	Alat dan Bahan Pengukuran Denyut Jantung	56
4.8	Prosedur Penelitian	56
4.8.1	Persiapan Fertilisasi dan Pemeliharaan Embrio	56
4.8.2	Pembuatan Medium Embrionik	57
4.8.3	Pembuatan Larutan Aluminium	54
4.8.4	Pembuatan Ekstrak Pegagan	58
4.8.5	Pembuatan Larutan Pegagan	59
4.8.6	Perlakuan pada Setiap Kelompok	60
4.8.7	Pengukuran Aktivitas Lokomotor	61
4.8.8	Pengukuran Denyut Jantung	61
4.8.9	Pengukuran Ekspresi TH dan Dopamin	62
4.9	Pengolahan dan Analisis Data	66
4.10	Alur Penelitian	68

BAB 5 Hasil Penelitian dan Analisis Data	69
5.1 Pengaruh Pegagan terhadap Lokomotor Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium	69
5.2 Pengaruh Pegagan terhadap Denyut Jantung Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium	73
5.3 Pengaruh Pegagan terhadap Ekspresi TH Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium	75
5.4 Pengaruh Pegagan terhadap Kadar Dopamin Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium	78
5.5 Hasil Uji Korelasi	79
BAB 6 Pembahasan	81
6.1 Pengaruh Pegagan terhadap Lokomotor Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium	81
6.2 Pengaruh Pegagan terhadap Denyut Jantung Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium	83
6.3 Pengaruh Pegagan terhadap Ekspresi TH Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium	87
6.4 Pengaruh Pegagan terhadap Kadar Dopamin Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium	89
6.5 Hubungan Lokomotor, Frekuensi Denyut Jantung, ekspresi TH, dan Kadar Dopamin	90
6.6 Implikasi Hasil Penelitian dalam Asuhan Kebidanan	91
BAB 7 Kesimpulan dan Saran	93
7.1 Kesimpulan	93
7.2 Saran	93
DAFTAR PUSTAKA	94
LAMPIRAN	101
RIWAYAT HIDUP	128

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Daftar ROS Hasil Metabolisme	27
Tabel 2.2 Jalur Dopamin dan Fungsi Utamanya	32
Tabel 2.3 Klasifikasi Tanaman Pegagan	38
Tabel 2.4 Kandungan Mikronutrien pada Pegagan	40
Tabel 2.5 Tahapan Perkembangan Zebrafish	44
Tabel 2.6 Parameter Kualitas Air	43
Tabel 4.1 Definisi Operasional	55
Tabel 4.2 Rekomendasi Kondisi Siklus dan Suhu pada Pemeriksaan PCR	64
Tabel 4.3 Kekuatan Korelasi dan Arah Korelasi	67
Tabel 5.1 Pola Lokomotor Larva Zebrafish 6 dpf	69
Tabel 5.2 Rekapitulasi Hasil Uji Korelasi Ekstrak Pegagan, Denyut Jantung, Lokomotor, Ekspresi TH dan Kadar Dopamin	69



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Kimia $AlCl_3$ 9

Gambar 2.2 Lima Rute Utama Jalur Transportasi Aluminium..... 12

Gambar 2.3 Rute aktivitas pro oksidan aluminium dengan memicu reaksi Fenton..... 16

Gambar 2.4 Struktur Kimia Dopamin 30

Gambar 2.5 Jalur Sistem Dopaminergik di Otak Manusia..... 32

Gambar 2.5 Skema reaksi hidroksilasi yang dikatalisasi oleh tirosin hidroksilase (TH) 34

Gambar 2.6 Perbedaan Zebrafish Jantan dan Betina 43

Gambar 3.1 Kerangka Teori 47

Gambar 3.2 Kerangka Konsep..... 48

Gambar 4.1 Gradien Standar Pemeriksaan ELISA 65

Gambar 4.2 Alur Penelitian 68

Gambar 5.1 Grafik Perkembangan Lokomotor Larva Zebrafish 4 – 6 dpf. . 70

Gambar 5.2 Perbandingan Rerata Lokomotor Larva Zebrafish 4 – 6 dpf .. 71

Gambar 5.3 Grafik Perkembangan Denyut Jantung Larva Zebrafish 3 – 6 dpf 73

Gambar 5.4 Grafik Perbandingan Dneyut Jantung Larva Zebrafish Larva Zebrafish 3– 6 dpf 74

Gambar 5.5 Ekspresi TH pada Larva Zebrafish 6 dpf 76

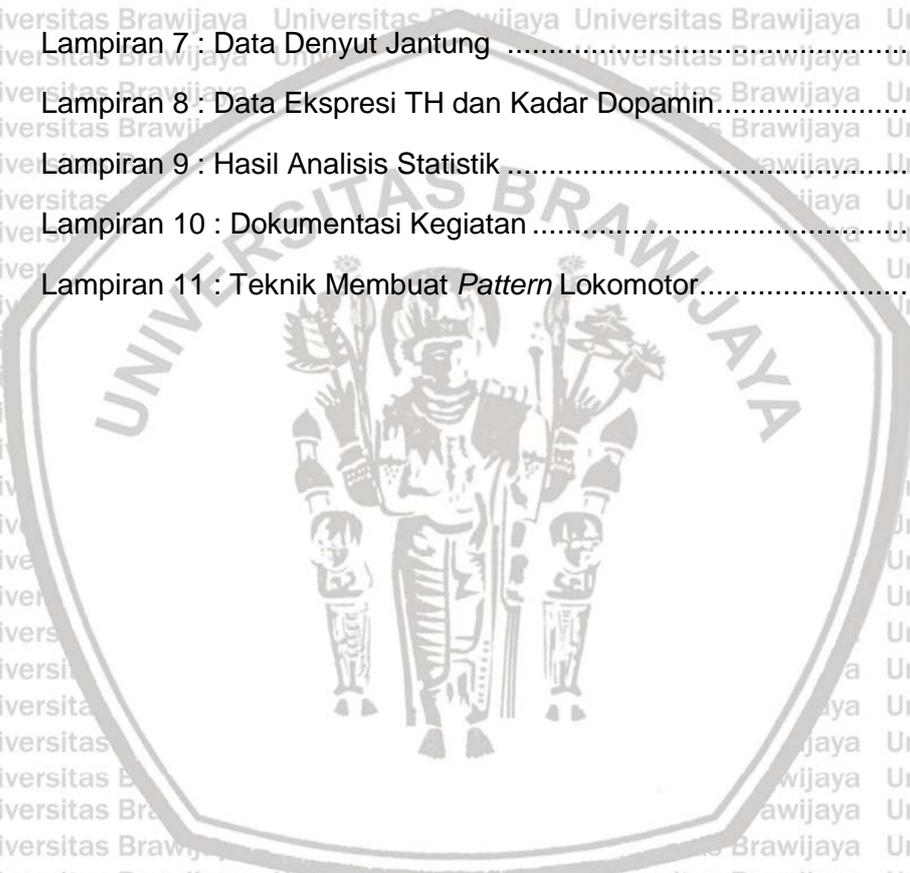
Gambar 5.6 Rerata Ekspresi TH Larva Zebrafish 6 dpf 77

Gambar 5.7 Rerata Kadar Dopamin Larva Zebrafish 6 dpf 78



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 : Surat Keterangan Kelayakan Etik	101
Lampiran 2 : Bukti <i>Published</i> Jurnal	102
Lampiran 3 : Surat Keterangan Bebas Plagiasi	103
Lampiran 4 : Determinasi Tanaman Pegagan	104
Lampiran 5 : Laporan Hasil Analisis Zebrafish	105
Lampiran 6 : Data Lokomotor	106
Lampiran 7 : Data Denyut Jantung	107
Lampiran 8 : Data Ekspresi TH dan Kadar Dopamin	108
Lampiran 9 : Hasil Analisis Statistik	109
Lampiran 10 : Dokumentasi Kegiatan	125
Lampiran 11 : Teknik Membuat <i>Pattern</i> Lokomotor	127



DAFTAR SINGKATAN

- Al : Aluminium
- ADHD : *Attention-Deficit Hyperactivity Disorder*
- ASI : Air Susu Ibu
- ATP : *Adenosine Triphosphate*
- BBB : *Blood Brain Barrier*
- BH4 : *Tetrahydrobioprotein*
- CA : *Centella asiatica*
- DA : Dopamin
- DNA : *Deoxyribonucleic acid*
- DPF : *Day Post Fertilization*
- EFSA : *European Food Safety Authority*
- HPF : *Hour Post Fertilization*
- H₂O₂ : *Hidrogen Peroksida*
- IDAI : Ikatan Dokter Anak Indonesia
- mRNA : *Messenger Ribonucleic Acid*
- NADH : *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*
- OH⁻ : Hidroksil
- O₂⁻ : Superoksida
- qPCR : *Quantitative Polymerase Chain Reaction*
- RNS : *Reactive Nitrogen Species*
- ROS : *Reactive Oxygen Species*
- TH : Tirosin Hidroksilase
- USG : *Ultrasound Sonography Test*

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Toksisitas logam berat telah terbukti menjadi ancaman utama dan menyebabkan beberapa risiko kesehatan. Beberapa di antaranya merusak fungsi otak, paru-paru, ginjal, hati, komposisi darah dan organ penting lainnya. (Jaishankar *et al.*, 2014). Waktu yang paling rentan terhadap toksisitas kimia pada manusia adalah pada periode kritis perkembangan, dimulai dari embrio hingga usia 2 tahun. Pada periode ini terjadi pertumbuhan cepat dan perkembangan otak yang melibatkan proses proliferasi, diferensiasi lapisan stratum germinativum (ektoderm, mesoderm, dan endoderm) dan organogenesis pada delapan minggu pertama kehidupan. Oleh karena itu, paparan bahan kimia neurotoksik dari lingkungan selama periode kritis kehidupan awal membutuhkan perhatian khusus (Maekawa *et al.*, 2017; Nurliyana *et al.*, 2016; Dórea, 2015; Sadler, 2012).

Wanita hamil dan janin sensitif terhadap efek paparan zat beracun lingkungan seperti logam berat. Meskipun plasenta dapat bertindak sebagai transporter selektif yang mencegah berlalunya zat berpotensi *toxic* ke janin yang sedang berkembang, beberapa kontaminan lingkungan dapat melintasi *barrier* plasenta (Wai *et al.*, 2017). Dalam penelitian Maekawa (2017) pada wanita hamil di Jepang ditemukan beberapa logam berat pada darah ibu dan cairan amnion, salah satu di antaranya adalah aluminium. Aluminium (Al) adalah elemen terbanyak ketiga setelah oksigen dan silikon di kerak bumi. Berbeda dengan logam yang tersebar luas lainnya seperti besi, mangan, dan zinc, aluminium tidak memiliki peran fisiologis dalam tubuh manusia (Klotz *et al.*, 2017). Al digunakan secara luas dalam kehidupan sehari-

hari. Paparan aluminium pada manusia tidak dapat dihindari. Pada penelitian Klotz (2017) aluminium ditemukan di dalam darah dan air seni semua manusia.

Sumber paparan aluminium berasal dari makanan, udara, tanah, air, bahan utama dalam peralatan memasak dan produk konsumsi. Penelitian Weidenhamer (2016) tentang potensial risiko kesehatan karena penggunaan peralatan masak aluminium di negara berkembang salah satunya Indonesia menunjukkan rata-rata paparan aluminium dari peralatan masak adalah 125 mg per *serving*, enam kali lebih besar dari *Provisional Tolerable Weekly Intake* (PTWI) yang ditetapkan WHO yaitu 2 mg/kg berat badan (WHO, 2011).

Selama kehamilan, paparan Al ke janin tidak hanya dipengaruhi lingkungan maternal dan makanan ibu tetapi juga penggunaan obat-obatan yang mengandung Al. Selain itu, konsumsi bersama minuman yang mengandung sitrat oleh wanita hamil secara signifikan meningkatkan penyerapan Al dalam usus. Setelah lahir, bayi terus mengonsumsi Al dari ASI atau susu formula bayi. Kandungan Al dalam ASI manusia berkisar antara 15 µg/L hingga 30 µg/L. Sedangkan kandungan Al dalam susu formula bayi terutama yang berbasis kedelai telah ditemukan beberapa kali lebih tinggi, yaitu sekitar 100 µg/L hingga 900 µg/L (Geyikoglu *et al.*, 2013; Exley, 2016; Röllin *et al.*, 2018).

Aluminium memiliki potensi efek neurotoksik jika terakumulasi di dalam tubuh seperti penyakit Alzheimer dan Parkinson (Klotz *et al.*, 2017; Geyikoglu *et al.*, 2013). Efek neurotoksik disebabkan peningkatan Al di otak yang masuk secara endositosis dimediasi reseptor transferrin melintasi *blood brain barrier* (BBB) (Yokel, 2001). Beberapa penelitian menunjukkan aluminium berpengaruh pada fungsi syaraf melalui stress oksidatif karena produksi spesies oksigen reaktif (ROS) yang berlebihan (Erazi *et al.*, 2011). Al meningkatkan pembentukan ROS dengan cara mengganggu langsung fungsi mitokondria atau dengan meningkatkan aktivitas redoks Fe²⁺ melalui reaksi Fenton (VanDuyn *et al.*, 2013).

Tirosin hidroksilase (TH) merupakan salah satu target yang dapat dirusak oleh ROS (Haavik dan Toska, 1998).

Tirosin Hidroksilase (TH) merupakan enzim yang berfungsi mengkatalisis levo-DOPA (L-DOPA) dari asam amino tirosin. TH dianggap sebagai enzim pertama dalam sintesis dopamin (DA) (Erazi *et al.*, 2011). Dopamin merupakan salah satu *neurotransmitter* utama di otak yang memberikan efek luas pada neuron. Dopamin memainkan peran kunci dalam kontrol gerak, kognitif, emosi dan sekresi neuroendokrin (Ayano, 2016; Drozak *et al.*, 2005). Pada penelitian Erazi (2011) ditemukan penurunan yang signifikan pada aktivitas lokomotor tikus yang keracunan aluminium klorida. Selain itu, dopamin menghasilkan efek *chronotropic* dan *inotropic* positif pada miokardium sehingga mempengaruhi frekuensi denyut jantung.

Beberapa alternatif terapi preventif toksisitas aluminium memanfaatkan efek antioksidan dan anti inflamasi seperti suplementasi asam lemak Omega 3, fosfatidilkolin eksogen, dan zinc (Anandhan *et al.*, 2013; Oda, 2016; Khafaga, 2017). Terapi kuratif menggunakan deferoxamine mesylate sebagai *chelating agent* untuk mengurangi penumpukan Al di jaringan dan organ. Namun deferoxamine mesylate memiliki efek samping seperti mual dan penurunan berat badan (Hernandez dan Johnson, 1990; Kruck *et al.*, 1990).

Centella asiatica (CA) merupakan tanaman yang mengandung nutrisi penting yaitu makronutrien, mikronutrien dan fitonutrien yang memiliki aktivitas antioksidan dan anti inflamasi tinggi. Antioksidan dapat melindungi organisme dari kerusakan yang disebabkan oleh ROS di dalam tubuh (Chandrika dan Prasad Kumara, 2015). Selain itu, penelitian Salim (2013) menunjukkan CA dapat berperan sebagai chelator logam berat. Peran ini didapatkan dari aktivitas antioksidan polifenol terutama quarcetin (Symonowicz dan Kolanek, 2012). Kandungan vitamin C dari CA juga dapat menstabilkan tetrahydrobiopterin (BH4)

yang merupakan kofaktor enzim TH. Sifat antioksidan CA memiliki peranan penting dalam melindungi syaraf dopaminergik. Pada penelitian Husnul (2018) ekstrak metanol *Centella asiatica* mampu meningkatkan kadar dopamin sehingga memperbaiki aktivitas lokomotor pada zebrafish dewasa yang dipapar rotenon. Penelitian Rollin (2018) menunjukkan aluminium bersifat toksik pada semua tahap perkembangan di dalam kandungan dengan mengganggu elemen esensial selama kehamilan seperti mangan (Mn) dan Tembaga (Cu). Lebih lanjut Kovřížnych (2013) membuktikan paparan aluminium menyebabkan prematur hatching pada awal kehidupan embrio zebrafish. Monaco (2017) melakukan penelitian dampak paparan aluminium 48 jam terhadap kemampuan survive dan gangguan jantung embrio larva zebrafish tetapi tidak memberikan alternatif pencegahan. Penelitian Rather (2018) menguji efek neuroprotektif *Centella asiatica* terhadap tikus dewasa yang dipapar aluminium dapat memperbaiki peningkatan ekspresi sitokin pro inflamasi (IL-1 β , IL-4, IL-2, IL-6 dan TNF α).

Peneliti tertarik untuk meneliti peran *Centella asiatica* pada efek paparan aluminium selama kehamilan terhadap pertumbuhan dan perkembangan anak selama 1000 hari pertama kehidupan. Konsentrasi aluminium yang digunakan adalah 50 μ M yang setara dengan 0,03 ppm. Nilai ambang batas yang ditetapkan WHO adalah 0,1 ppm, artinya paparan yang diberikan hanya 0,3 kali ambang batas. Paparan aluminium diberikan pada blastula dini embrio zebrafish yang merupakan fase proliferasi. Paparan pada fase ini akan berdampak pada fase berikutnya yaitu fase differensiasi dan organogenesis, sehingga efeknya akan masif dan mengenai semua organ. Penilaian lokomotor dan denyut jantung dapat mewakili baik atau tidaknya perkembangan awal dari lapisan germinativum pada kehidupan awal embrio karena lokomotor melibatkan otot, otak, rangka dan syaraf, sedangkan denyut jantung melibatkan otot jantung, pembuluh darah, dan syaraf yang berasal dari lapisan ektoderm dan mesoderm.

Gangguan klinis tersebut dipengaruhi sintesis dopamin yang melibatkan enzim tirosin hidroksilase sebagai enzim pertama, proses transport dopamin yang dipengaruhi reseptor dopamin D1 dan D2 (DRD1 dan DRD2), keberadaan sirtuin 1 (SIRT1) sebagai neuroprotektif dan apoptosis sel neuron. Namun penelitian ini hanya menganalisis pengaruh *Centella asiatica* terhadap gangguan sintesis dopamin akibat paparan Al dan pengaruhnya terhadap lokomotor dan denyut jantung.

Paparan pada blastula dini sulit dilakukan pada hewan coba mamalia dikarenakan embrio berada di dalam kandungan dan usia 0 pada embrio tidak bisa ditentukan secara tepat. Sedangkan pada zebrafish, telur berada di luar kandungan sehingga pengamatan dapat dilakukan sejak 0 hpf (*hour post fertilization*). Penentuan 0 hpf berdasarkan siklus terang dan gelap yang sudah diatur sebelumnya atau dengan menggunakan mikroskop karena embrio zebrafish transparan. Truong (2017) menyatakan zebrafish memiliki kemiripan yang tinggi dalam struktur seluler, proses pensinyalan, anatomi fisiologi sistem syaraf pusat dan tepi serta jantung pada awal perkembangan. Penelitian Primihastuti (2017) menunjukkan periode kritis perkembangan (0 - 2 tahun) setara dengan 0 - 6 *day post fertilization* (dpf) pada zebrafish.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Umum

Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah toksisitas aluminium pada lokomotor dan frekuensi denyut jantung melalui penurunan ekspresi TH dan kadar Dopamin pada larva zebrafish?

1.2.2 Khusus

1. Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah penurunan lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar aluminium (Al)?

2. Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah penurunan frekuensi denyut jantung pada larva zebrafish yang dipapar aluminium (Al)?
3. Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah penurunan ekspresi tirosin hidroksilase (TH) pada larva zebrafish yang dipapar aluminium?
4. Apakah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah penurunan kadar dopamin pada larva zebrafish yang dipapar aluminium?
5. Apakah terdapat hubungan antara tirosin hidroksilase dengan dopamin pada larva zebrafish terpapar aluminium yang diberikan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*)?
6. Apakah terdapat hubungan antara dopamin dengan lokomotor pada larva zebrafish terpapar aluminium yang diberikan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*)?
7. Apakah terdapat hubungan antara dopamin dengan frekuensi denyut jantung pada larva zebrafish terpapar aluminium yang diberikan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*)?

1.3 Tujuan

1.3.1 Umum

Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap pencegahan toksisitas aluminium pada lokomotor dan frekuensi denyut jantung melalui penurunan ekspresi tirosin hidroksilase dan kadar dopamin pada larva zebrafish.

1.3.2 Khusus

1. Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap penurunan lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar aluminium (Al).
2. Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap pencegahan penurunan frekuensi denyut jantung pada larva zebrafish yang dipapar aluminium (Al).
3. Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap pencegahan penurunan ekspresi tirosin hidroksilase (TH) pada larva zebrafish yang dipapar aluminium.
4. Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap pencegahan penurunan kadar dopamin (DA) pada larva zebrafish yang dipapar aluminium.
5. Menganalisis hubungan antara tirosin hidroksilase dengan dopamin pada larva zebrafish terpapar aluminium yang diberikan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*).
6. Menganalisis hubungan antara dopamin dengan lokomotor pada larva zebrafish terpapar aluminium yang diberikan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*).
7. Menganalisis hubungan antara dopamin dengan frekuensi denyut jantung pada larva zebrafish terpapar aluminium yang diberikan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*).

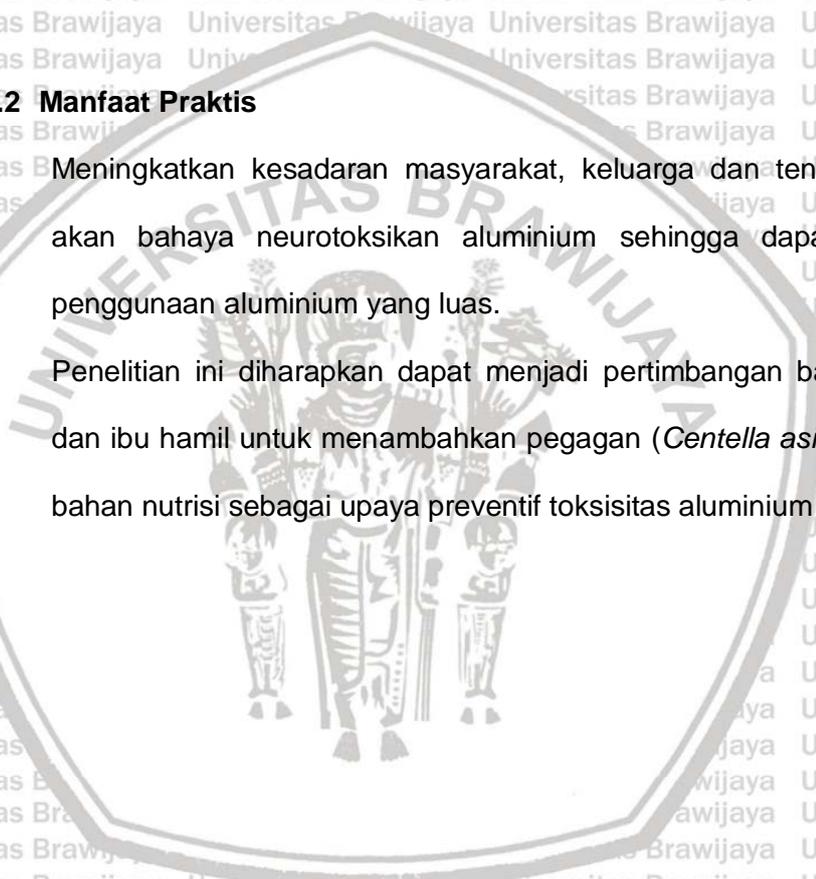
1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Penelitian ini dapat digunakan untuk mendukung ilmu pengetahuan dan pemahaman tentang patofisiologi neurotoksisitas akibat induksi aluminium serta kandungan pegagan dalam pencegahannya.
2. Sebagai tambahan informasi bagi pengembangan penelitian berikutnya tentang neurotoksisitas.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Meningkatkan kesadaran masyarakat, keluarga dan tenaga kesehatan akan bahaya neurotoksikan aluminium sehingga dapat diminimalisir penggunaan aluminium yang luas.
2. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi pertimbangan bagi masyarakat dan ibu hamil untuk menambahkan pegagan (*Centella asiatica*) ke dalam bahan nutrisi sebagai upaya preventif toksisitas aluminium.



BAB 2

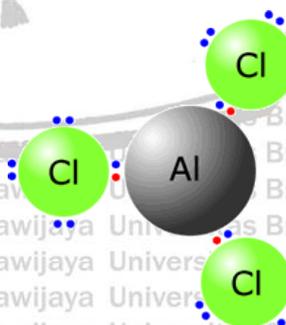
TINJAUAN PUSTAKA

1.2 Aluminium

2.3.1 Karakteristik

Aluminium adalah unsur kimia dengan simbol Al dan nomor atom 13. Logam aluminium ringan dan berwarna putih keperakan. Al sangat reaktif secara alami sebagai logam bebas dan berkombinasi dengan lebih dari 270 mineral yang berbeda. Paling umum Al ditemukan berikatan dengan oksigen, silikon dan florida. Senyawa ini ditemukan di tanah, mineral (safir, rubi, pirus), batu (terutama batuan beku) dan tanah liat (ATSDR, 2008; Shakhashiri, 2000).

Aluminium klorida (AlCl₃) dengan berat molekul 133,34 merupakan senyawa yang umum digunakan untuk membuat sediaan paparan aluminium. Suhu penyimpanan 2 – 8°C dengan titik leleh 194°C dan titik didih 180°C. Berbentuk serbuk berwarna kuning keabuan yang dapat larut di dalam air, ethanol, chloroform, dan ether. Reaksi AlCl₃ dengan air menghasilkan Aluminium hidroksida dan HCl (Chemicalbook, 2017).



Gambar 2.1 Struktur Kimia AlCl₃

2.3.2 Farmakokinetik Aluminium

1. Absorpsi

Aluminium (Al) merupakan unsur terbesar ketiga di kerak bumi dan secara alami ada di lingkungan, bahan makanan dan air minum (Klotz *et al.*, 2017). Karena aluminium tersebar luas, manusia terus menerus akan terpapar secara oral, inhalasi, dermal dan parenteral. Namun, hanya sebagian kecil aluminium yang diserap tubuh dari paparan tersebut. Umumnya populasi terpapar aluminium secara oral melalui konsumsi bahan makanan, meskipun paparan kecil dapat terjadi melalui konsumsi air minum dan inhalasi udara (ATSDR, 2008).

Aluminium ditemukan dalam obat-obatan yang dijual bebas, seperti antasida dan aspirin. Al digunakan sebagai aditif makanan dan dalam sejumlah produk konsumsi yang diaplikasikan secara topikal seperti antiperspirant. Konsentrasi aluminium dalam makanan dan minuman sangat bervariasi, tergantung pada produk makanan, jenis pengolahan yang digunakan, dan area geografis di mana tanaman pangan ditanam (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2008). Konsentrasi setinggi 1,8 mM Al dapat terbentuk dalam jus yang dihasilkan dari buah asam yang diproses peralatan masak aluminium. Bentuk yang paling umum dari paparan Al adalah melalui saluran gastrointestinal. Tingkat penyerapannya sekitar 0,2% (Bondy, 2014). Penyerapan bentuk aluminium sitrat dapat mencapai 0,5-5% (ATSDR, 2008).

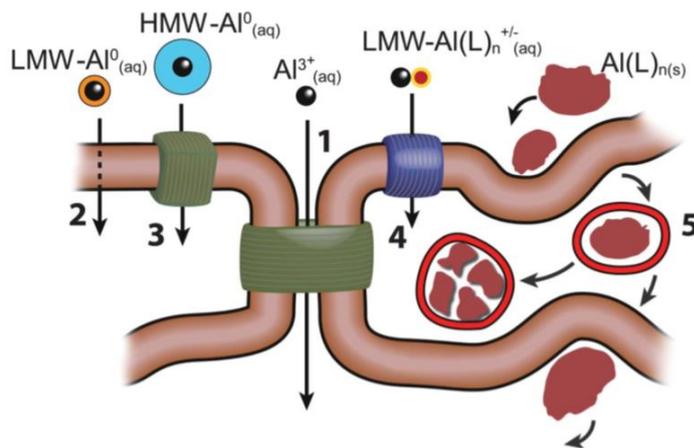
Paparan aluminium secara inhalasi yang didapatkan dari aerosol antiperspirant atau partikel yang ada di udara dapat menyebabkan peningkatan level aluminium di serum, jaringan dan urin (Exley, 2013). Level aluminium di lingkungan bervariasi tergantung pada lokasi dan tempat pengambilan sampel.

Secara umum, level aluminium di atmosfer rendah, berkisar antara 0,005 hingga 0,18 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Level yang jauh lebih tinggi ada di lokasi perkotaan dan industri

(Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2008). Ketika masuk ke rongga hidung, aluminium secara langsung menuju epitel pemapasan atau penciuman dan neuron rongga hidung. Aluminium akan larut ke dalam lapisan lendir yang melapisi epitel. Epitel penciuman akan meneruskan aluminium ke saraf penciuman yang dapat menjadi rute absorpsi aluminium ke otak (Exley, 2013). Sedangkan paparan dermal didapatkan dari bahan tambahan pada *antiperspirant spray* atau *sunscreen*. Aluminium masuk secara difusi pasif melalui rute transeuler dan paraseuler. Sekitar 0,012% dari penggunaan aluminium secara dermal akan diserap melalui kulit (Exley, 2013; ATSDR, 2008).

Paparan aluminium secara parenteral melalui injeksi intramuskuler aluminium hidroksida atau aluminium phosphate yang digunakan sebagai adjuvan vaksin. Aluminium dari kedua larutan tersebut akan terserap dan ada di dalam darah 1 jam setelah penyuntikan (ATSDR, 2008).

Aluminium dapat membentuk senyawa dengan banyak molekul di dalam tubuh (asam organik, asam amino, nukleotida, fosfat, karbohidrat dan makromolekul). Aluminium dapat berikatan dengan protein besar seperti transferrin dan molekul kecil larut air seperti sitrat. Bioavailabilitas aluminium tergantung dari bentuk aluminium saat dicerna dan keberadaan bahan konsumsi lain yang dapat mengikat logam seperti asam sitrat and lactic. Agen yang dianggap paling penting adalah asam sitrat karena ada pada banyak makanan dan di usus dalam konsentrasi yang tinggi. Telah banyak penelitian baik di manusia maupun hewan yang menunjukkan peningkatan konsentrasi aluminium di darah dan jaringan yang disebabkan penambahan asam sitrat (ATSDR, 2008).



Gambar 2.2 Lima Rute Utama Jalur Transportasi Aluminium (Exley, 2013)

Keterangan : Ada 5 bentuk aluminium di dalam tubuh yaitu kation trivalen mudah larut ($Al^{3+}_{(aq)}$), senyawa berat molekul rendah, netral, dan larut (LMW- $AlO_{(aq)}$); senyawa berat molekul tinggi, netral, larut (HMW- $AlO_{(aq)}$); senyawa berat molekul rendah, bermuatan, larut (LMW- $Al(L)_n^{+/-}_{(aq)}$); partikel nano dan mikro ($Al(L)_n(s)$). Rute masuk ke dalam sel melalui transport berikut : 1. Paraseluler, 2. Transeluler, 3. Transport Aktif, 4. Channel, 5. Adsorptif atau endositosis yang dimediasi reseptor.

Aluminium terutama diserap sebagai senyawa netral secara difusi pasif melalui jalur *intercellular tight junction* (paracellular channel). Transportasi transelular juga cenderung merupakan proses pasif. Mekanisme yang terlibat pada transport transelular yaitu endositosis yang dimediasi sel, difusi senyawa aluminium yang netral dan lipofilik dan difusi yang difasilitasi kanal cation-specific. Transport aktif Al^{+3} melalui jalur penyerapan besi juga berperan dalam penyerapan aluminium. Rute transportasi utama aluminium di sel dapat dilihat pada gambar 2.2 (Exley, 2013; ATSDR, 2008).

2. Distribusi

Aluminium secara normal ada di semua jaringan tubuh manusia. Total *body burden* aluminium pada individu sehat adalah sekitar 30 – 50 mg. Dari total *body burden* tersebut, setengahnya ada di tulang dan sekitar seperempatnya ada di paru-paru. Sumber lain menunjukkan tulang dapat mengandung sekitar 70% dari total Al dalam tubuh. Kebutuhan fisiologis tubuh untuk Al belum teridentifikasi. Hampir semua kemungkinan berasal dari asupan makanan. Aluminium juga

ditemukan di kulit, saluran pencernaan, adrenal, kelenjar paratiroid dan organ lainnya (VanDuyn *et al.*, 2013; ATSDR, 2008).

Pada paparan aluminium dan senyawanya secara inhalasi, paru-paru mendistribusikan dan menyimpan material berdasarkan ukuran partikel. Sebagian dari partikel dihembuskan, sebagian terperangkap di nasofaring dan saluran pernapasan atas. Aluminium kemudian akan diendapkan di saluran pencernaan oleh gerakan mukosa dan aksi mukosiliar. Partikel aluminium yang sangat kecil (diameter $<5 \mu\text{m}$) dapat masuk ke paru-paru. Sebagian aluminium dapat mencapai alveoli di mana mereka bisa ditransfer ke darah (terutama untuk senyawa larut) atau diatasi oleh makrofag alveolar melalui fagositosis (ATSDR, 2008).

Darah merupakan jaringan distribusi utama aluminium secara sistemik. Ada data yang menunjukkan konsentrasi aluminium yang signifikan di keringat yang menunjukkan bahwa sistem limfatik memiliki peran dalam transportasi aluminium ke seluruh tubuh. Aluminium ditemukan dalam darah baik di serum maupun sel darah. Di dalam serum, aluminium berikatan dan dibawa transferrin yaitu protein pembawa zat besi. Ligan dengan berat molekul rendah seperti sitrat dan fosfat berperan dalam distribusi aluminium dari darah ke jaringan. Aluminium tidak didistribusikan secara rata ke seluruh tubuh. Akumulasi aluminium secara khusus lebih tinggi di paru-paru dan tulang kemudian diikuti liver, ginjal dan otak. (Exley, 2013).

Penyerapan aluminium secara seluler terjadi dari ikatan aluminium dengan transferrin. Densitas reseptor transferrin yang berbeda-beda pada organ mempengaruhi distribusi aluminium pada organ. Di dalam sel, aluminium terakumulasi di lisosom, nukleus, dan kromatin. Pada beberapa organ, keseimbangan terjadi antara akumulasi aluminium dengan eliminasi sel yang

mati. Sel yang mengandung akumulasi aluminium paling banyak adalah sel postmitotik yang besar dan berumur panjang seperti neuron (ATSDR, 2008).

Aluminium juga dapat melalui plasenta dan terakumulasi di jaringan fetus.

Selain itu Al disebarkan ke air susu pada ibu menyusui. Air Susu Ibu (ASI) mengandung Al sekitar 15 µg/L hingga 30 µg/L. Pada pemberian aluminium hidroksida atau aluminium fosfat yang terkandung di dalam vaksin secara intramuskuler, peningkatan konsentrasi aluminium ditemukan pada ginjal, limpa, jantung, liver, dan otak (Röllin *et al.*, 2018; ATSDR, 2008).

3. Metabolisme

Sebagai elemen, aluminium selalu berikatan dengan bahan kimia lain dan afinitasnya dapat berubah di dalam tubuh. Ion bebas (Al^{+3}) dapat dengan mudah berikatan dengan banyak bahan dan struktur sehingga sangat tergantung pada afinitasnya pada ligand, jumlah relatif dan metabolisme. Aluminium juga ada dalam bentuk senyawa *low-weight* yang dapat berikatan dengan asam organik, asam amino, nukleotida, fosfat dan karbohidrat. Karena aluminium memiliki afinitas yang tinggi dengan protein, polinukleotida, dan glycosaminoglycan, kebanyakan aluminium ada dalam tubuh dalam bentuk senyawa makromolekul yang berikatan secara fisik. Senyawa makromolekul ini tidak lebih aktif dari senyawa *low-weight*. Aluminium dalam bentuk makromolekul juga stabil dan tidak dapat diubah, misalnya pada ikatan aluminium dengan nukleus dan kromatin (ATSDR, 2008).

4. Eliminasi dan Eksresi

Aluminium dikeluarkan dari tubuh melalui sejumlah rute, di antaranya adalah melalui feces, urin, keringat, kulit, rambut, kuku, sebum dan semen.

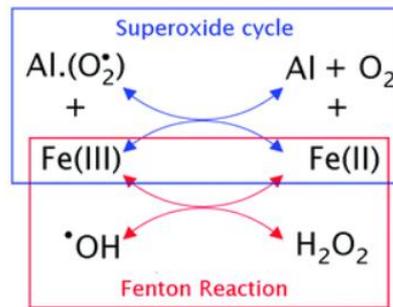
Eksresi aluminium yang masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan akan dikeluarkan melalui feces untuk aluminium yang belum terserap dan urin untuk aluminium yang sudah ada di dalam darah (Exley, 2013; ATSDR, 2008).

2.3.3 Farmakodinamik

Paparan Al terhadap sel dapat meningkatkan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) dengan cara mengganggu langsung fungsi mitokondria (VanDuyn *et al.*, 2013). Aluminium menunjukkan perubahan pada mitokondria yaitu penurunan kapasitas maksimum kompleks II yang terkait jalur respiratory, penurunan efisiensi respirasi, dan penurunan aktivitas kompleks III dan V. Aluminium juga dapat berikatan dengan membran dalam mitokondria dan menyebabkan terbukanya *membrane permeability transition pore* (mPTP) (Iglesias-González *et al.*, 2017). Terbukanya mPTP menyebabkan perubahan struktural protein yang ada di dalam membran mitokondria.

Aluminium yang memiliki muatan tinggi dan volume kecil membuat logam ini memiliki ikatan asam Lewis yang kuat. Afinitas Al tinggi terhadap gugus yang mengandung oksigen dan bermuatan negatif seperti gugus fosfat atau karboksilat. Oleh karena itu, aluminium memiliki kemampuan potensial untuk berinteraksi kuat dengan protein, fosfolipid, ATP, NADH, RNA, DNA, dan lain-lain (Mujika *et al.*, 2018).

Kemampuan pro-oksidan aluminium merupakan salah satu efek toksisitas utama dari aluminium. Aktivitas pro-oksidan ini disebabkan oleh pembentukan senyawa aluminium-superoksida yang kuat, yang mengarah pada peningkatan masa hidup spesies radikal superoksida. Pembentukan kompleks aluminium-superoksida dalam larutan dimulai dari berbagai jenis aluminium hidrolitik. Senyawa aluminium-superoksida ini dapat meningkatkan stress oksidatif di lingkungan biologis dengan memicu reaksi Fenton (Mujika *et al.*, 2018).



Gambar 2.3 Rute aktivitas pro-oksidan aluminium dengan memicu reaksi fenton (Mujika *et al.*, 2018).

Meskipun sebagian besar aluminium terdapat dalam bentuk senyawa dalam bioenvironment, sejumlah nanomolar aluminium secara efektif bersaing dan menggantikan logam esensial, khususnya magnesium, besi dan calcium. Aluminium memiliki kapasitas untuk berinteraksi dengan situs pengikatan Ca^{+2} sehingga mengganggu homeostasis Ca^{+2} intraseluler. Aluminium menggantikan magnesium sebagai pengatur enzim dan carboxylic yang merupakan tempat banyak logam tertimbun. Aluminium juga bersaing secara efektif dengan iron ferri, karena muatannya dan jari-jari ionik yang sama. Sifat-sifat ini memungkinkan aluminium untuk meniru besi dan mengikat protein pengangkut zat besi seperti transferrin dan untuk protein mRNA pengatur besi yang dapat mengakibatkan gangguan metabolisme besi dalam sel (Ruipérez *et al.*, 2012).

Transportasi molekul dasar Al ke dalam neuron dan antar kompartemen intraseluler adalah dengan membentuk ikatan dengan protein dan membran plasma sehingga berpotensi memasuki sel secara difusi. Persamaan fisiokimia antara Fe^{2+} dan Al^{3+} menunjukkan bahwa Al^{3+} dapat berikatan dengan protein yang mengandung Fe^{2+} dan transporter Fe^{+2} seperti transferrin (VanDuyn *et al.*, 2013). Setelah Al masuk ke sistem vaskular dalam darah, sebagian besar logam terikat pada transferrin. Al^{3+} dapat memasuki sistem saraf melewati *blood brain barrier* menggunakan endositosis yang dimediasi reseptor transferrin. Sekitar

0,005% kompleks aluminium-protein memasuki otak dengan cara ini (Bondy, 2014).

Penelitian Pavandi (2014) menunjukkan aluminium berinteraksi dengan transferrin dan menyebabkan menurunnya asupan zat besi dan mangan dengan menghambat permukaan reseptor *oligodendrocytes*. Karena tirosin hidroksilase adalah enzim logam yang mengandung zat besi, pengurangan asupan zat besi dapat mengganggu aktivitas enzim dan menghambat sintesis dopamin. Selain itu, aluminium dapat menghambat sintesis BH4 secara *in vitro* dan penambahan transferin ke dalam media membalikkan efek ini. Karena BH4 adalah ko-enzim untuk tirosin hidroksilase yang merupakan enzim kunci sintesis dopamin, sehingga penghambatan efek aluminium pada produksi dopamin juga dapat terjadi melalui mekanisme ini (Pavandi *et al.*, 2014).

Efek neurotoksik aluminium juga bisa disebabkan oleh efek interaksinya dengan lipid spesifik dari membran sel. Mekanisme transisi ion logam yang menyebabkan peroksidasi lipid adalah dekomposisi H_2O_2 dan homolisis hidroperoksida endogen secara langsung. Pada level rendah H_2O_2 , Fe^{2+} menginduksi dekomposisi lipid peroksida, menghasilkan radikal *peroxyl* dan *alkoxyl* dan menyebabkan peroksidasi lipid. Hasil ini menunjukkan bahwa timbulnya efek stimulasi Fe^{2+} pada peroksidasi lipid disebabkan produksi spesies oksigen reaktif melalui oksidasi Fe^{2+} dengan ROOH endogen. Aluminium menurut efek besi pada peroksidasi lipid dalam membran sel dan dapat mengakibatkan kerusakan neuron dan penurunan produksi dopamin (Pavandi *et al.*, 2014).

Mekanisme lain penghambatan sintesis dopamin yaitu melalui efek penghambatan aluminium pada masuknya kalsium ke sinaptosom.

Penghalangan kalsium masuk ke dalam sinaptosom dapat menyebabkan hambatan pelepasan dopamin karena kalsium merupakan *messenger* sekunder

yang memainkan peran penting dalam pelepasan dopamin (Pavandi *et al.*, 2014).

2.3.4 Efek Aluminium terhadap Kesehatan

Beberapa indikasi efek samping dapat terjadi akibat penggunaan jangka panjang dari obat-obatan yang mengandung aluminium pada individu yang sehat. Ada sejumlah laporan kasus perubahan skeletal (misalnya, osteomalasia) pada orang dewasa dan anak-anak dengan fungsi ginjal normal karena penggunaan antasida jangka panjang untuk pengobatan gangguan gastrointestinal (ATSDR, 2008).

Sindrom ensefalopati dialisis merupakan akibat dari akumulasi aluminium di otak. Ensefalopati dialisis merupakan sindrom neurologis degeneratif yang ditandai dengan hilangnya fungsi motorik, bicara, dan kognitif. Efek neurologis lain yang dihubungkan dengan paparan aluminium adalah penyakit Alzheimer. Efek merugikan lainnya yang diamati pada hewan secara oral terkena aluminium termasuk gangguan eritropoiesis pada tikus yang terpapar, kerusakan eritrosit dan penurunan berat badan anak tikus (ATSDR, 2008).

Ada bukti kuat yang menunjukkan paparan Al selama kehamilan dan/atau menyusui dapat menyebabkan efek pada perkembangan bayi. Paparan selama kehamilan dan/atau laktasi dapat menyebabkan penurunan yang signifikan pada kenaikan berat badan tikus dan mencit. Selain itu juga terjadi keterlambatan pematangan fisik, khususnya keterlambatan pembukaan vagina, penurunan testis, dan erupsi gigi seri terjadi pada paparan 53 mg Al / kg / hari (ATSDR, 2008).

2.2 Perkembangan

2.2.1 Konsep Dasar Tumbuh Kembang

Pertumbuhan adalah bertambahnya ukuran dan jumlah sel serta jaringan interseluler, berarti bertambahnya ukuran fisik dan struktur tubuh baik sebagian

maupun keseluruhan. Jadi bersifat kuantitatif sehingga dapat diukur dengan satuan panjang atau berat. Sedangkan perkembangan adalah bertambahnya kemampuan struktur dan fungsi tubuh yang lebih kompleks, jadi bersifat kualitatif yang pengukurannya lebih sulit daripada pengukuran pertumbuhan (IDAI, 2002).

2.2.2 Tahapan Tumbuh Kembang

Tumbuh kembang anak berlangsung secara teratur, saling berkaitan, dan berkesinambungan dimulai sejak konsepsi sampai dewasa. Walaupun terdapat beberapa variasi akan tetapi setiap anak akan melewati suatu pola tertentu yang merupakan tahapan pertumbuhan dan perkembangan sebagai berikut (IDAI, 2002) :

1. Masa Pranatal atau intra uterin (masa janin dalam kandungan). Masa ini dibagi menjadi dua periode yaitu :

a. Periode embrionik

Periode embrionik dimulai ketika terjadi fertilisasi sel telur oleh sel sperma, kemudian terjadi perkembangan yang sangat cepat hingga fase perkembangan morfologi. Fase ini terjadi pada 8 minggu pertama kehidupan.

Ovum yang telah dibuahi dengan cepat membelah menjadi zigot, morula, blastokista kemudian gastrula. Proses paling khas yang terjadi selama minggu ketiga kehamilan adalah proses pembentukan ketiga lapisan germinativum (ektoderm, endoderm, dan mesoderm) pada mudigah.

Lapisan germinativum yang terdiri dari ektoderm, mesoderm dan endoderm kemudian membentuk sejumlah jaringan dan organ spesifik. Lapisan germinativum ektoderm membentuk organ-organ dan struktur-struktur yang mempertahankan kontak dengan dunia luar seperti sistem saraf pusat, sistem saraf tepi, epitel sensorik pada telinga, hidung dan mata, serta kulit yang mencakup rambut dan kuku. Selain itu, juga membentuk kelenjar subkutis, kelenjar mamaria, hipofisis, dan enamel gigi. Lapisan germinativum mesoderm

akan membentuk miotom (jaringan otot), sklerotom (kartilago dan tulang) dan dermatom (dermis kulit). Mesoderm juga membentuk sistem vaskular yaitu jantung, arteri, vena, pembuluh limfe, dan seluruh sel darah dan limfe. Lebih lanjut mesoderm membentuk sistem urogenital (ginjal, saluran kemih dan gonad). Sedangkan lapisan endoderm membentuk saluran cerna, epitel yang melapisi saluran nafas, parenkim tiroid, paratiroid, hati dan pankreas, stroma retikular tonsil dan timus, epitel yang melapisi kandung kemih, uretra, kavitas timpanika dan tuba auditiva (Sadler, 2012).

b. Periode fetal

Periode ini dimulai sejak umur 9 minggu sampai dengan kelahiran. Masa fetus dini dimulai sejak 9 minggu hingga trimester kedua kehidupan intrauterin, terjadi percepatan pertumbuhan, alat tubuh sudah terbentuk, dan mulai berfungsi. Masa fetus lanjut terjadi pada trimester akhir, pertumbuhan dan perkembangan fungsi berlangsung pesat.

2. Masa postnatal terdiri dari beberapa periode, yaitu :

a. Masa neonatal (0-28 hari), terjadi adaptasi terhadap lingkungan dan terjadi perubahan sirkulasi darah, serta mulai berfungsinya organ-organ tubuh lainnya.

b. Masa bayi yang dibagi menjadi dua bagian yaitu masa bayi dini (1 – 12 bulan) dan masa bayi akhir (1 – 2 tahun). Pada masa bayi dini terjadi pertumbuhan yang pesat dan proses pematangan berlangsung secara terus menerus terutama fungsi sistem saraf. Sedangkan pada masa bayi akhir, kecepatan pertumbuhan mulai menurun dan terdapat kemajuan dalam perkembangan motorik dan fungsi eksresi.

c. Masa prasekolah (2 – 6 tahun), pertumbuhan berlangsung stabil dan terjadi perkembangan dengan aktivitas jasmani, keterampilan dan proses berfikir.

d. Masa sekolah atau masa pubertas, pertumbuhan lebih cepat dibandingkan masa prasekolah, keterampilan dan intelektual semakin berkembang, senang bermain kelompok dengan jenis kelamin yang sama.

e. Masa remaja, merupakan transisi dari periode anak ke dewasa. Pada masa ini terjadi percepatan pertumbuhan berat badan dan tinggi badan yang sangat pesat.

2.2.3 Ciri – ciri perkembangan

Perkembangan merupakan sederetan perubahan fungsi organ tubuh yang berkelanjutan, teratur dan saling berkait. Perkembangan memiliki ciri-ciri tertentu dan merupakan hasil interaksi kematangan susunan saraf pusat dengan organ yang dipengaruhinya, antara lain perkembangan sistem neuromuskuler, bicara, emosi dan sosial (IDAI, 2002).

Ciri – ciri perkembangan adalah :

1. Perkembangan melibatkan perubahan

Karena perkembangan terjadi bersamaan dengan pertumbuhan, maka setiap pertumbuhan disertai dengan perubahan fungsi.

2. Perkembangan awal menentukan pertumbuhan selanjutnya

Seseorang tidak bisa melewati satu tahap perkembangan sebelum ia melewati tahapan sebelumnya. Misalnya kemampuan berjalan bisa didapatkan jika sebelumnya sudah bisa berdiri. Karena itu perkembangan awal merupakan masa kritis karena akan menentukan perkembangan selanjutnya.

3. Perkembangan mempunyai pola tetap

Perkembangan fungsi organ tubuh terjadi secara tetap yaitu perkembangan terjadi lebih dahulu di daerah kepala kemudian menuju ke arah kaudal (sefokaudal) dan perkembangan terjadi lebih dahulu di daerah proksimal

(gerakan kasar) lalu berkembang ke bagian distal seperti jari-jari (gerakan halus).

2.2.4 Aktivitas Lokomotor

Motilitas atau respon taktil merupakan respon terhadap stimulus yang mempengaruhi sensorik di kulit dan kinestetik yang merupakan rangsangan pada ekstremitas. Kedua stimulus ini berkontribusi terhadap perkembangan dan pertumbuhan perilaku (Symington dan Pinelli, 2006). Perilaku motorik meliputi semua gerakan baik gerakan refleks maupun gerakan sadar yang memiliki tujuan. Locomotor pada dasarnya membutuhkan pembentukan dan pengendalian kekuatan fisik. Kedua hal itu tidak hanya melibatkan otot dan biomekanik tetapi juga *adaptive control* yang bergantung pada fungsi fisiologis di setiap tahap perkembangan. Persepsi dan kognisi diperlukan untuk merencanakan dan memandu gerakan. Faktor sosial dan budaya juga dapat berpengaruh pada perilaku motorik. Oleh karena itu, perilaku motorik dapat menggambarkan persepsi, kognisi dan sosial interaksi (Adolph dan Franchak, 2018).

Aktivitas lokomotor telah ada sejak periode janin dan neonatal yaitu dalam bentuk gerak refleks. Ketika kaki bayi baru lahir diletakkan di atas permukaan keras, kakinya akan bergerak dalam pola bergantian seperti berjalan. Gerakan ini disebut reflek stepping karena gerakan terjadi ketika terjadi kontak dengan permukaan lantai dan tidak membutuhkan kontrol kortikal. Gerakan ini akan menghilang saat bayi berusia 2 bulan. Perkembangan lokomotor terjadi pada usia 8 – 18 bulan. Setiap bayi menemukan solusi unik untuk membentuk langkah pertamanya. Aktivitas lokomotor dan motilitas sangat berkaitan erat dengan fungsi sistem saraf pusat. Pada awal perkembangan persepsi dan kognitif memainkan peranan penting agar lokomotor sesuai dengan keadaan sekitar, rintangan dan lingkungan sehari-hari (Adolph dan Franchak, 2018).

Lokomotor dan motilitas melibatkan struktur dan fungsi dari otot, otak, rangka dan syaraf. Pada embrio, struktur dan fungsi dari jaringan tubuh tersebut bergantung pada perkembangan lapisan germinativum pada 8 minggu pertama pembelahan. Sistem saraf pusat, sistem saraf tepi, epitel sensorik pada telinga, hidung dan mata, serta kulit merupakan turunan dari lapisan ektoderm sedangkan otot merupakan turunan lapisan mesoderm (Sadler, 2012). Sehingga dapat disimpulkan penilaian motilitas dan lokomotor dapat mewakili baik atau tidaknya perkembangan awal dari lapisan germinativum pada kehidupan awal embrio.

Lokomotor zebrafish yang berumur satu minggu bisa tersegmentasi secara alami menjadi pola yang berbeda-beda seiring waktu (Orger *et al.*, 2018). Zebrafish berenang dengan pola gerakan berenang singkat diselingi meluncur pasif. Peralihan perkembangan pada pola lokomotor dari berenang panjang menjadi pendek tampak pada usia 3 dan 4 dpf. Pada saat ini juga terjadi peningkatan gerakan karena muncul insting mencari makan pada larva (Lambert *et al.*, 2012).

Pada zebrafish, respon taktil muncul saat larva menetas pada usia 3 dpf karena DDT (Dopaminergic diencephalospinal tract) belum memberikan efek pada alat gerak (Lambert *et al.*, 2012). Larva yang baru menetas bila diberikan stimulus pada ekornya akan bergerak lurus ke depan menjauhi stimulus yang diberikan. Sedangkan bila diberikan stimulus pada bagian kepala, larva akan berputar 180 derajat dan berenang menjauh dari stimulus. Pada zebrafish, gerak lokomotor muncul pada 4 dpf yang ditandai dengan kemampuan dari larva untuk berenang bebas dan mengubah arah renangnya secara spontan (Granato *et al.*, 1996).

2.2.5 Denyut Jantung

Jantung adalah salah satu organ vital manusia. Perkembangan kardiovaskular pada embrio manusia terjadi antara 3 dan 6 minggu setelah ovulasi. Fungsi jantung adalah tanda pertama aktivitas jantung independen yang dapat dieksplorasi dengan teknik non-invasif seperti USG Doppler. Pada akhir minggu ke-4 kehamilan, denyut jantung pertama embrio dimulai. Denyut jantung (beat/menit) merupakan pengukuran yang dapat dilakukan sejak awal perkembangan (saat jantung pertama kali berdenyut) melalui tahapan embrionik dan janin hingga persalinan dan kelahiran (Valenti *et al.*, 2011).

Perkembangan jantung pada awal perkembangannya memiliki kontraksi yang cepat dan tidak teratur yang mampu memompa darah di dalam pembuluh. Pada periode ini, sistem peredaran darah yang berkembang memungkinkan pertukaran nutrisi dan gas ibu ke janin melalui embriionik di vilus korionik. Pada janin yang sehat, denyut jantung meningkat dari 110 bpm pada minggu ke-5 kehamilan menjadi 170 bpm pada minggu ke-9 kehamilan. Sejak saat itu, ada pengurangan bertahap pada denyut jantung yang mencapai nilai rata-rata 150 bpm pada minggu ke-13 kehamilan. Peningkatan awal denyut jantung bertepatan dengan perkembangan morfologis jantung dan penurunan selanjutnya bertepatan dengan pematangan fungsional sistem saraf parasimpatis (Valenti *et al.*, 2011).

Pemeriksaan denyut jantung pada awal perkembangan penting karena dapat menunjukkan kondisi perkembangan fungsi jantung sebagai organ vital embrio sehingga dapat dilakukan tindakan pencegahan sedini mungkin.

Penelitian menunjukkan hubungan antara bradikardia embriionik yang parah dan kematian janin. Pada trimester pertama, kelainan kromosom adalah penyebab paling umum dari kematian janin. Denyut jantung yang melambat pada trimester awal dapat disebabkan oleh perkembangan jantung yang tidak normal atau

terhambatnya perkembangan sistem konduktif. Perkembangan ini kemungkinan besar disebabkan oleh anomali kromosom dan berisiko untuk mengalami keguguran (Oztekin *et al.*, 2009).

Jantung merupakan organ pertama yang terbentuk di zebrafish. Pada tahap awal pengembangan (24 hpf), *linier tube* mengalami proses *remodelling* (perulangan), yang berakhir dengan pembentukan dua ruang (satu atrium dan satu ventrikel tunggal), dipisahkan oleh katup atrio-ventrikel, yang mencegah aliran balik darah. Denyut jantung merupakan parameter yang penting untuk mengetahui perkembangan fungsi jantung pada kehidupan awal zebrafish. Hal ini berguna untuk mengetahui efek kardi toksik dan neurotoksik dari senyawa farmakologis dalam penemuan alternatif pencegahan dan pengobatan (De Luca *et al.*, 2014).

Pada zebrafish, denyut jantung embrionik normal sangat mirip dengan manusia, yaitu pada 120-180 denyut per menit. Kontraksi jantung Zebrafish meningkat seiring perkembangan embrionik untuk memastikan perfusi semua jaringan embrio yang tumbuh (De Luca *et al.*, 2014).

2.4 Radikal Bebas

2.4.1 Pengertian

Radikal bebas merupakan produk normal hasil metabolisme seluler. Radikal bebas adalah atom atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan dan dapat berdiri sendiri. Jumlah ganjil elektron membuat radikal bebas tidak stabil, berumur pendek dan sangat reaktif. Karena reaktivitasnya yang tinggi, radikal bebas dapat memisahkan elektron dari senyawa lain untuk mencapai stabilitas. Jadi molekul yang diserang kehilangan elektronnya dan menjadi radikal bebas itu sendiri, memulai kaskade reaksi berantai yang akhirnya merusak sel hidup. Baik *Reactive Oxygen Species* (ROS)

maupun *Reactive Nitrogen Species* (RNS) secara kolektif membentuk radikal bebas dan spesies reaktif non radikal lainnya. ROS/RNS memainkan peran ganda sebagai senyawa menguntungkan dan toksik. Pada tingkat sedang atau rendah, ROS/RNS memiliki efek menguntungkan dan terlibat dalam berbagai fungsi fisiologis seperti fungsi kekebalan, sejumlah jalur pensinyalan seluler dan regulasi redoks. Tetapi pada konsentrasi yang lebih tinggi, ROS dan RNS menghasilkan stres oksidatif dan nitrosatif yang menyebabkan potensi kerusakan pada biomolekulnya. Stres oksidatif dan nitrosatif berkembang ketika ada kelebihan produksi ROS/RNS dan kekurangan antioksidan. Kelebihan ROS juga dapat merusak integritas berbagai biomolekul termasuk lipid, protein dan DNA yang merupakan penyebab berbagai penyakit manusia seperti diabetes mellitus, penyakit neurodegeneratif, rheumatoid arthritis, katarak, penyakit kardiovaskular, penyakit pernapasan serta dalam proses penuaan (Phaniendra *et al.*, 2015).

2.4.2 Reactive Oxygen Species (ROS)

Radikal bebas terpenting yang dihasilkan selama reaksi metabolisme adalah radikal yang berasal dari oksigen yaitu ROS. ROS dapat diklasifikasikan menjadi dua kelompok senyawa yaitu; radikal dan non-radikal. Radikal adalah spesies yang mengandung setidaknya satu elektron tidak berpasangan dalam kulit di sekitar inti atom dan mampu eksis secara mandiri. Molekul oksigen itu sendiri adalah radikal, dan karena keberadaan dua elektron yang tidak berpasangan itu disebut biradikal. Contoh-contoh untuk radikal termasuk Superoksida (O_2^-), Hidroksil (OH^\cdot), Alkoxyradikal (RO^\cdot), Radikal peroksil (ROO^\cdot) seperti yang terdapat pada tabel 3 (Phaniendra *et al.*, 2015).

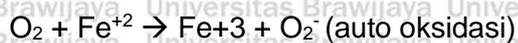
Tabel 2.1 Daftar ROS Hasil Metabolisme

Radikal bebas	Simbol	Half-life
Radikal		
Superoxide	O_2^-	10^{-6} s
Hydroxyl	OH ⁻	10^{-10} s
Alkoxy radical	RO ⁻	10^{-6} s
Peroxy radical	ROO ⁻	17 s
Non radikal		
Hydrogen peroxide	H ₂ O ₂	Stabil
Singlet oxygen	¹ O ₂	10^{-6} s
Ozone	O ₃	Stabil
Organic peroxide	ROOH	Stabil
Hypochlorous acid	HOCl	Stabil
Hypobromous acid	HOBr	Stabil

Reaktivitas tinggi dari radikal-radikal tersebut dikarenakan adanya satu elektron tidak berpasangan yang cenderung menyumbangkan atau memperoleh elektron lain untuk mencapai stabilitas. Walau spesies non radikal seperti hidrogen peroksida (H₂O₂), asam hipoklorat (HOCl), asam hipobrom (HOBr), ozon (O₃), oksigen singlet (¹O₂), peroksida organik (ROOH) bukan radikal bebas tetapi dapat dengan mudah menyebabkan reaksi radikal bebas pada organisme hidup (Phaniendra *et al.*, 2015).

Radikal anion superoksida merupakan ROS yang penyebarannya paling penting. superoksida dibentuk dari proses enzimatik, reaksi autooksidasi dan reaksi transfer elektron nonenzimatik. Sebagian besar diproduksi di dalam mitokondria dan reaktivitas dengan biomolekulnya rendah. Enzim yang dapat menghasilkan superoksida adalah xanthine oxidase, lipooksigenase,

siklooksigenase dan NADPH oksidase dependent. Superoksida ada dalam dua bentuk yaitu O_2^- atau radikal hidroperoksil (HO_2) pada pH rendah (Phaniendra *et al.*, 2015).

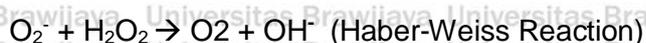


Radikal superoksida bereaksi dengan radikal superoksida dalam reaksi dismutasi, dimana satu radikal yang teroksidasi menjadi oksigen dan lainnya menjadi hidrogen peroksida.

Cu, Mn, Zn -SOD



Radikal hidroksil yang merupakan bentuk netral dari ion hidroksida adalah radikal bebas yang sangat reaktif. Ini bisa sangat reaktif terhadap molekul organik dan anorganik termasuk DNA, protein, lipid, dan karbohidrat dan menyebabkan kerusakan parah ke sel dibandingkan ROS lainnya. Hidroksil terbentuk dari reaksi Fenton. H_2O_2 bereaksi dengan ion logam (Fe^{+2} atau Cu^{+2}) yang sering terikat dalam kompleks dengan protein yang berbeda seperti ferritin (protein intraseluler yang menyimpan zat besi) dan seruloplasmin (protein plasma pembawa tembaga) atau molekul lain. Di dalam kondisi stres, kelebihan O_2^- melepaskan besi bebas dari ikatannya dengan ferritin dan besi bebas yang dilepaskan ikut serta dalam reaksi Fenton membentuk OH^- . Hidroksil juga dibentuk oleh reaksi antara radikal superoksida dan H_2O_2 dalam reaksi Haber-Weiss (Phaniendra *et al.*, 2015).



2.4.3 Sumber ROS

ROS bersumber dari produksi secara endogen dan sumber eksogen.

Sumber endogen ROS berasal dari organ seluler yang tinggi konsumsi oksigen seperti mitokondria, peroksisom dan retikulum endoplasma. Sedangkan sumber eksogen terdiri dari paparan polusi air dan udara, alkohol, asap rokok, transisi logam, logam berat, pestisida, suhu tinggi, sinar ultraviolet dan obat-obatan (Phaniendra *et al.*, 2015).

2.5 Dopamin

2.5.1 Pengertian

Dopamin (DA) merupakan salah satu neurotransmitter katekolamin di otak. DA berasal dari Tirosin dan merupakan prekursor norepinephrine dan epinephrine. Dopamin adalah neurotransmitter utama dalam sistem ekstrapiramidal otak dan penting dalam mengatur gerakan. DA memiliki formula molekul $C_8H_{11}NO_2$ dengan berat molekul 153.181 g/mol (PubChem, 2018). Dopamin diproduksi di neuron dopaminergik di daerah tegmental ventral dari substantia nigra, otak tengah, dan arkuata nukleus hipotalamus. Selain itu juga diproduksi di perifer. Dopamin ditemukan di ginjal berfungsi untuk vasodilatasi ginjal, diuresis, dan natriuresis. Neuron dopamin lebih banyak didistribusikan daripada monamin lain dan ditemukan di hipotalamus, bulb olfaktorius, area substansia nigra dan ventral otak bagian tengah, serta di daerah abu-abu periaqueductal dan retina (Ayano, 2016).



Gambar 2.4 Struktur Kimia Dopamin

2.5.2 Fungsi DA

Dopamin memberikan efek luas baik pada neuronal (sebagai neurotransmitter) dan jaringan non-neuronal (sebagai agen autokrin atau parakrin). Dalam sistem saraf pusat, dopamin berikatan dengan reseptor membran spesifik yang ada di neuron dan memainkan peran kunci dalam kontrol gerak, belajar, memori kerja, kognisi, dan emosi. Sistem dopamin otak terlibat dalam berbagai gangguan neurologis dan psikiatris seperti penyakit parkinson, skizofrenia, dan kecanduan amfetamin dan kokain. Dengan demikian, sistem ini adalah target utama obat yang diterapkan dalam pengobatan penyakit neuropsikiatri (Drożak *et al.*, 2005).

Ada empat jalur utama untuk sistem dopaminergik di otak (Ayano, 2016), yaitu :

1. Jalur Nigro-Stiatal, serat berasal dari substantia nigra (pars compacta) dan didistribusikan secara luas di ganglia basal (nukleus kaudat dan putamen).

Pada jalur ini dopamin memainkan peran penting dalam *movement* (kontrol fungsi motorik dan mempelajari keterampilan motorik baru). Degenerasi sistem nigrostriatal dapat menyebabkan penyakit Parkinson. Badan sel

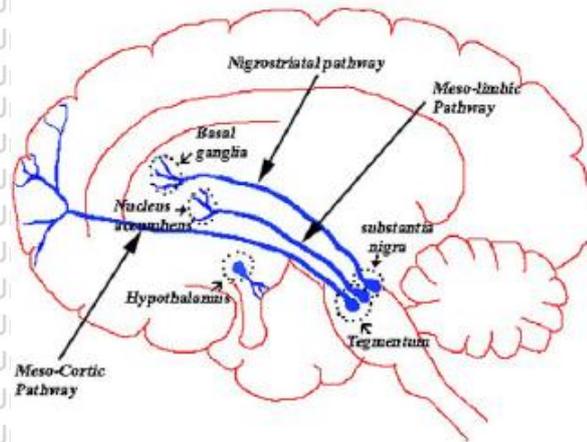
dopamin di bagian compact pars mengirimkan proyeksi naik ke striatum dorsal dan memodulasi kontrol motorik.

2. Jalur Mesolimbik, proyeksi dopaminergik berasal dari daerah tegmental ventral, kemudian menyebar ke amigdala, korteks piriform, nukleus septum lateral dan nukleus accumbens. Dalam jalur ini dopamin berfungsi dalam sistem emosi dan harga diri. Dopamin mesolimbik memediasi kebahagiaan di otak. DA dilepaskan pada situasi yang menyenangkan dan merangsang seseorang untuk menemukan aktivitas atau pekerjaan yang menyenangkan.

Hal ini menunjukkan makanan, seks, dan beberapa obat untuk korban kekerasan juga merupakan stimulan pelepasan dopamin di otak, khususnya pada area seperti nucleus accumbens dan korteks prefrontal. Selain itu dopamin memainkan peran utama dalam mengobati kecanduan di jalur ini. Semua penyalahgunaan obat mengaktifkan jalur mesolimbik. Obat antipsikotik yang mengurangi gejala skizofrenia dengan memblok reseptor dopamine pada jalur mesolimbik.

3. Jalur mesokortikal, serat dopaminergik muncul dari wilayah A10 (daerah tegmental ventral) dan memproyeksikan ke korteks frontal dan daerah septohippocampal. Dopamin mesokortikal memediasi perilaku kognitif dan emosional. Tingkat dopamin di otak, terutama korteks prefrontal, membantu meningkatkan memori kerja dan pemusatan perhatian. Namun, keseimbangan harus terjaga karena penambahan atau pengurangan ke tingkat abnormal dapat berpengaruh pada memori.

4. Jalur Tuberoinfundibular yang berasal dari nukleus arkuata di hipotalamus hingga ke kelenjar hipofisis. Dopamin di jalur ini menghambat pelepasan prolaktin. Obat antipsikotik memblok reseptor dopamin di hipofisis agar prolaktin kembali dapat dilepaskan. Dopamin merupakan neuroendokrin utama penghambat sekresi prolaktin dari kelenjar hipofisis anterior kelenjar.



Gambar 2.5 Jalur Sistem Dopaminergik di Otak Manusia

Adapun jalur dopamin dan fungsi utamanya dapat dilihat pada table 2.2

Tabel 2.2 Jalur Dopamin dan Fungsi Utamanya

No	Jalur	Fungsi
1	Nigrostriatal	Pergerakan dan sensori stimuli
2	Mesolimbic	Kebahagiaan dan penghargaan pencarian kebiasaan, ketergantungan, emosi dan persepsi
3	Mesocortical	Kognisi, memori, perhatian dan kemampuan belajar
4	Tuberoinfundibular	Kontrol sistem endokrin pituitari hipotalamus, menghambat sekresi prolaktin

2.5.3 Sintesis Dopamin

Dopamin disintesis dari asam amino tirosin yang dibawa ke otak melalui mekanisme transportasi aktif. Tirosin diproduksi di hati dari fenilalanin melalui aksi fenilalanin hidroksilase. Tirosin kemudian diangkut ke neuron yang mengandung dopamin tempat terjadinya serangkaian reaksi untuk mengubah tirosin tersebut menjadi dopamin. Tirosin hidroksilase di neuron katekolaminergik mengkatalisasi penambahan gugus hidroksil ke posisi meta tirosin untuk

menghasilkan L-dopa. Langkah terbatas ini dalam sintesis katekolamin merupakan subjek yang dapat dihambat oleh tingkat katekolamin yang tinggi (hambatan produk akhir). Karena normalnya tirosin hidroksilase jenuh dengan substrat, manipulasi kadar tirosin tidak langsung berdampak tingkat sintesis katekolamin. Setelah terbentuk, L-dopa secara cepat dikonversi menjadi dopamin oleh dopa decarboxylase, yang terletak di sitoplasma. Saat ini telah diakui enzim ini bekerja tidak hanya pada L-dopa tetapi juga pada semua asam L-amino aromatik yang terjadi secara alami termasuk triptofan, oleh karena itu lebih tepat disebut decarboxylase asam amino aromatik (Ayano, 2016).

2.5.4 Tirosin Hidroksilase

1. Pengertian

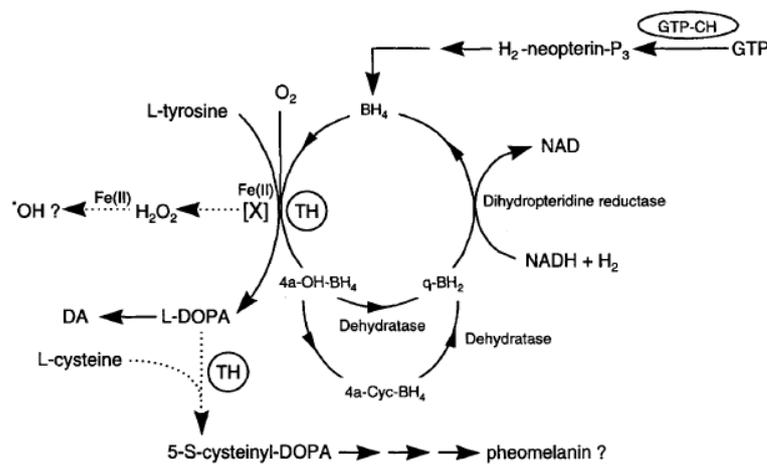
Tirosin hidroksilase (TH) adalah enzim yang membatasi laju sintesis katekolamin. Fungsi utamanya adalah mengkatalisasi asam amino L-tirosin menjadi L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). TH adalah keluarga enzim yang mengandung asam amino aromatik hidroksilase (AAAH) seperti fenilalanin hidroksilase (PheH) dan triptofan hidroksilase (TrpH). Ketiga enzim ini melakukan hidroksilasi aromatik cincin asam amino dengan menggunakan molekul oksigen diatomik (O_2) dan iron (Fe^{2+}) serta tetrahydrobiopterin sebagai kofaktor. Dopamin, katekolamin, epinefrin dan norepinefrin adalah produk dari jalur ini yang penting sebagai hormon dan neurotransmitter di sistem saraf pusat dan perifer. Monoamin katekol ini berperan dalam banyak fungsi otak, seperti perhatian, memori, kognisi, dan emosi (Daubner *et al.*, 2012).

2. Reaksi

Tirosin hidroksilase adalah protein besi non-heme yang mengkatalisis reaksi L-Tyrosine dihidroksilasi dalam posisi meta. Enzim ini merupakan oksigenase yang artinya menggunakan satu molekul dioksigen untuk menghidroksilat asam aminonya dan substrat tetrahydropterin menjadi asam

amino hidroksi dan 4a-hydroxytetrahydropterins. 4a-hidroksi-tetrahydropterin selanjutnya mendehidrasi dan meregenerasi dibantu oleh enzim NADH-dependent dihydropteridine reduktase yang sering disebut kofaktor untuk hidroksilase yang bergantung pteridin. BH₄ adalah tetrahydropterin yang tidak terkonjugasi paling banyak di dalam jaringan mamalia dan dianggap substrat tetrahydropterin alami untuk enzim ini. Masing-masing dari empat subunit di TH dikoordinasikan dengan satu atom besi (II) yang ada di situs aktif. Keadaan oksidasi atom besi ini penting untuk pergantian katalitik dalam reaksi enzimatik.

Jika besi dioksidasi menjadi Fe (III), enzim tidak aktif (Haavik dan Toska, 1998)



Gambar 2.5 Skema reaksi hidroksilasi yang dikatalisasi oleh tirosin hidroksilase (TH) (Haavik dan Toska, 1998).

3. Ketergantungan Besi pada TH

Konsentrasi seluler besi sangat penting untuk fungsi sejumlah proses biokimia, termasuk biosintesis katekolamin. Karena TH sepenuhnya tergantung pada Fe (II) dan memiliki hubungan langsung antara konsentrasi zat besi dengan aktivitas enzim, aktivasi TH oleh Fe (II) bahkan dapat menjadi uji biokimia untuk mengukur konsentrasi besi bebas dalam sel. Jika enzimnya benar-benar tergantung pada tingkat mikromolar bebas Fe (II) intraseluler, kadar zat besi yang

tinggi juga dapat menjadi faktor risiko stres oksidatif di neuron katekolaminergik oleh mekanisme lainnya (Haavik dan Toska, 1998)

2.5.5 Dopamin dan Lokomotor

Salah satu peran utama dopamin adalah pada perubahan perilaku dalam transisi dari pola motorik yang cepat ke lambat. Pada zebrafish kekurangan dopamin dapat memperlambat lokomotor (Vidal-Gadea dan Pierce-Shimomura, 2012). Hal ini sejalan dengan penelitian Khotimah (2018) yang menunjukkan peningkatan neurotransmitter dopamin menyebabkan peningkatan aktivitas lokomotor dan sebaliknya penurunan neurotransmitter dopamin menyebabkan penurunan aktivitas lokomotor. Penurunan tingkat dopamin dapat disebabkan sintesis oleh tirosin hidroksilase (TH) atau degradasi dopamin oleh radikal bebas.

2.5.6 Dopamin dan Denyut Jantung

Dopamin adalah prekursor norepinefrin pada saraf noradrenergik dan juga merupakan neurotransmitter di area tertentu dari sistem saraf pusat.

Dopamin dapat dikonversi menjadi norepinefrin oleh enzim dopamin hidroksilase.

Dopamin menghasilkan efek *chronotropic* dan *inotropic* positif pada miokardium, menghasilkan peningkatan denyut jantung dan kontraktilitas jantung. Aksi ini terjadi secara langsung dengan mengerahkan aksi agonis pada beta-adrenoceptors dan secara tidak langsung dengan menyebabkan pelepasan norepinefrin dari tempat penyimpanan di ujung saraf simpatis (Harris dan Van Petten, 1978).

Dopamin terbukti menyebabkan kontraksi strip aorta pada kelinci saat diberikan diatas 4 µg. Efek infus dopamin intravena pada manusia menunjukkan perbedaan dari levarterenol. Dopamin terutama meningkatkan tekanan darah sistolik, sedangkan levarterenol meningkatkan baik tekanan sistolik maupun diastolik. Hasil tersebut menunjukkan bahwa dopamin menghasilkan peningkatan

tekanan darah dengan meningkatkan curah jantung daripada dengan vasokonstriksi pembuluh darah (Holmes dan Fowler, 1962). Penelitian (Holmes dan Fowler, 1962) pada anjing menunjukkan dopamin memiliki efek *inotropik* dan *chronotropic* jantung yang signifikan selama rentang dosis yang diteliti.

2.6 Pegagan

Centella asiatica atau dikenal dengan nama pegagan di Indonesia merupakan tanaman obat tropis dari keluarga *Apiaceae*. Tumbuhan ini adalah tanaman asli negara-negara Asia Tenggara seperti India, Sri Lanka, Cina, Indonesia, dan Malaysia termasuk juga Afrika Selatan dan Madagaskar (Chandrika dan Prasad Kumara, 2015). Nama umum lainnya dari tanaman ini adalah Asiatic Pennywort, Indian Pennywort, Pennywort berdaun tebal, dan Gotu Kola. Tumbuhan ini biasa digunakan untuk mengobati masalah kulit, menyembuhkan luka dan merevitalisasi syaraf dan sel otak sehingga dikenal juga sebagai "*Brain Food*" di India (Surbakti, 2003).

Pegagan merupakan tumbuhan yang memiliki daerah penyebaran sangat luas, terutama di daerah tropis dan subtropis. Pegagan menyebar liar dan dapat tumbuh subur di atas tanah dengan ketinggian 1 – 2500 meter dari permukaan laut. Tumbuhan ini sering tumbuh di tempat terbuka dan menyukai tempat yang basah seperti selokan, areal persawahan, tepian jalan, padang rumput bahkan tepian tembok atau pagar (Surbakti, 2003).

2.6.1 Deskripsi Tanaman

Pegagan merupakan tanaman yang tumbuh merayap menutupi tanah, tidak berbatang, tinggi tanaman 10 – 50 cm, memiliki daun satu helaian yang tersusun dalam roset akar dan terdiri dari 2 – 10 helai daun. Daun berwarna hijau, berbentuk seperti kipas, buah pinggang, atau ginjal. Permukaan dan punggung daun licin, tepinya melengkung ke atas, bergerigi dan kadang-kadang

berambut. Tulang daun berpusat di pangkal dan tersebar ke ujung. Diameter daun 1 – 7 cm (Surbakti, 2003).

Tangkai daun berbentuk seperti pelepah, agak panjang, berukuran 5 – 15 cm tergantung dari kesuburan tempat tumbuhnya. Sepanjang tangkai daun beralur dan di pangkalnya terdapat daun sisik yang sangat pendek, licin, tidak berbulu, berpadu dengan pangkal tangkai daun (Surbakti, 2003).

Tangkai bunga pegagan sangat pendek, keluar dari ketiak daun, tersusun dalam karangan seperti payung, berwarna putih sampai merah muda atau agak kemerah-merahan. Jumlah tangkai bunga antara 1 – 5. Bentuk bunga bundar lonjong, cekung, dan runcing ke ujung dengan ukuran sangat kecil. Kelopak bunga tidak bercuping serta tajuk bunga berbentuk bulat telur dan meruncing ke bagian telur (Surbakti, 2003).

Buah pegagan berukuran kecil, panjang 2 – 2,5 mm, lebar 7 mm, berbentuk lonjong atau pipih, menggantung, baunya wangi, rasanya pahit, berdinding agak tebal, kulitnya keras, berwarna kuning. Sementara itu akarnya rimpang dengan banyak stolon, berkelompok dan lama kelamaan meluas hingga menutupi tana, merayap dan berbuku-buku. Warna akar kemerahan. Perkembangbiakan pegagan dari stolon dan biji (Surbakti, 2003).

2.6.2 Klasifikasi

Tanaman pegagan dapat diklasifikasikan seperti tabel 2.3 berikut ini (Surbakti, 2003).

Tabel 2.3 Klasifikasi Tanaman Pegagan

No	Klasifikasi	Keterangan
1	Ordo	Monocotyledoneae
2	Family	Umbelliferae (Apiaceae)
3	Genus	Centella
4	Spesies	Centella asiatica L. (urban), Hydrocotile asiatica L. Pes. Equines Rumph
5	Nama daerah	Daun kaki kuda, daun aga, pegagan, pegaga, rumput kaki kuda, pegago ambun, pugago (Sumatera)
6	Nama asing	Gotu kola (Amerika); indian pennywort; thick leaved pennywort (Inggris);pegaga ular (Malaysia)

2.6.3 Kandungan Kimia

Makronutrien yang ditemukan pada pegagan umumnya adalah protein, karbohidrat dan serat. Adapun pegagan mengandung protein yang rendah (2,4%), karbohidrat (6,7%), dan lemak (0,2%). Pegagan juga diketahui mengandung sekitar 87,7% kelembaban, 5,4% serat tidak larut, 0,49% serat larut, 17 mg/100 gr fosfor, dan 14,9 mg/100 gr besi. Nilai-nilai tersebut bervariasi tergantung pada metode analitik dan faktor biotik dan abiotik (Chandrika dan Prasad Kumara, 2015).

Centella asiatica mengandung beberapa turunan flavonoid seperti quercetin, kaempferol, patuletin, rutin, apigenin, castilliferol castillicetin dan myricetin. Flavonoid memainkan peran penting sebagai antioksidan melalui proses pembersihan atau chelating (Chandrika dan Prasad Kumara, 2015). Ikatan flavonoid dapat mengurangi keberadaan logam beracun di dalam tubuh. Misalnya, ikatan quercetin dengan aluminium (III) dapat mengurangi kelebihan

aluminium dari asupan makanan. Quercetin sebagai ligand aktif secara biologis dapat menjadi chelator dan berperan sebagai penetral pada keracunan logam berat (Symonowicz dan Kolanek, 2012).

Senyawa penting yang merupakan kandungan kimia utama dari CA adalah saponin triterpenoid. Saponin dapat mencapai 1% hingga 8% dari total unsur CA (Bylka *et al.*, 2013). Saponin triterpenoid terdiri dari aglikon triterpenoid dan gugus oligosakarida. Gabungan aglikon yang hidrofilik dan molekul gula yang hidrofilik membuat saponin triterpenoid sangat amphipathic. Senyawa saponin triterpenoid yang penting karena aktivitas farmakologisnya adalah asiaticoside, madecassoside, asam asiatik dan asam madecassic. Fungsi perlindungan dari senyawa saponin triterpenoid antara lain meregulasi proliferasi sel, nasib kehidupan sel dan jalur sinyal transduksi. Senyawa ini merupakan agen permeabilisasi membran sel yang kuat. Selain itu juga sebagai anti-inflammatory, hipokolesterolemia, anti karsinogenik, immunostimulatory, anti mikroba, anti protozoa, dan anti oksidan (Moses *et al.*, 2014). Kandungan saponin triterpenoid dari CA dapat dilihat pada tabel 2.4.

Centella asiatica juga sumber yang kaya mineral termasuk zat besi, kalsium, potasium, dan magnesium serta vitamin, termasuk vitamin K, C, E, dan banyak vitamin B. Kandungan kimia lainnya adalah berbagai fitonutrien termasuk β -karoten, lutein, neoxanthin, dan zeaxanthin, yang melindungi sel dari kerusakan. Adapun kandungan mikronutrien pegagan dapat dilihat pada tabel 2.4 (Chandrika dan Prasad Kumara, 2015).

Tabel 2.4 Kandungan Mikronutrien pada Pegagan

No	Kandungan	Jumlah
1	Vitamin C	48,5 mg/100 g
2	Thiamin (B1)	0,09 mg/100 g
3	Riboflavin (B2)	0,19 mg/100 g
4	Niacin (B3)	0,1 mg/100 g
5	Carotene	2649 µg/100 g
6	Vitamin A	442 µg/100 g
7	Saponin Triterpenoid	
	Asiatic acid	1,29 mg/g
	Asiaticoside	2,07 mg/g
	Madecassic acid	2,96 mg/g
	Madecassoside	2,92 mg/g

2.6.4 Manfaat Pegagan pada Kesehatan

1. Aktivitas Antioksidan

Antioksidan adalah pengangkut radikal bebas yang melindungi organisme dari kerusakan yang disebabkan oleh spesies oksigen reaktif. Meskipun hampir semua organisme memiliki sistem pertahanan dan perbaikan antioksidan, sistem ini tidak cukup untuk mengatasi seluruh kerusakan. Karena itu, suplementasi antioksidan dari makanan dapat memperkuat pertahanan antioksidan dan sistem perbaikan. Polifenol, flavonoid, β-karoten, tanin, vitamin C, dan senyawa DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) merupakan kandungan pegagan yang berkontribusi pada aktivitas antioksidan yang secara signifikan lebih tinggi di tanaman ini. Aktivitas antioksidan polifenol terutama karena sifat redoks, sehingga dapat berperan sebagai agen pereduksi, donor hidrogen, oxygen

singlet quencher dan *chelators* logam (Chandrika dan Prasad Kumara, 2015; Mijanur et al., 2013).

2. Aktivitas Neuroprotektif

Kandungan farmakologis dari pegagan secara tradisional dan secara ilmiah sudah lama berkembang. Pegagan dikonsumsi sebagai *brain tonic* atau obat anti lupa untuk orang dewasa dan manula (manusia usia lanjut). Pegagan dapat merevitalisasi pembuluh darah sehingga peredaran darah ke otak menjadi lancar. Dengan demikian, ada penambahan kapasitas kerja neurotransmitter yang berfungsi untuk meningkatkan kerja otak, mempertajam ingatan, serta menyembuhkan pasien yang mengalami gangguan jiwa. Ekstrak pegagan dapat memperbaiki jaringan otak yang mengatur proses interaksi di dalam otak, sehingga dapat diberikan pada penderita insomnia, penderita stres, dan penderita kelelahan mental. Pegagan juga baik digunakan untuk terapi terhadap anak-anak penderita keterbelakangan mental dan hiperaktif (Surbakti, 2003).

Penggunaan pegagan sebagai neuroproteksi didapatkan karena pegagan mampu melindungi sel-sel dari kerusakan oksidatif, menghancurkan kelebihan radikal bebas, dan menjaga keseimbangan stres oksidatif. Sebagai antioksidan yang kuat, pegagan memberikan efek neuroprotektif yang signifikan dan terbukti mampu melindungi otak tikus dari kerusakan oksidatif yang disebabkan penuaan. Asam asiatic memberikan efek neuroprotektif yang signifikan pada sel kortikal yang dikultur oleh potensiasi mekanisme pertahanan oksidatif seluler. Karena itu, itu pegagan terbukti berkhasiat dalam melindungi neuron dari kerusakan oksidatif yang ditimbulkan dengan paparan glutamat berlebihan. Tanaman mempercepat regenerasi saraf pada pemberian oral dan mengandung beberapa fraksi aktif yang meningkatkan pemanjangan neurit (Chandrika dan Prasad Kumara, 2015).

3. Stabilisasi BH4

Kandungan asam askorbat (Vitamin C) pada pegagan dapat membantu menstabilisasi tetrahydrobioprotein (BH4) terutama melalui efek antioksidan. BH4 merupakan kofaktor esensial tirosin hidroksilase dalam sintesis neurotransmitter dopamin. Selain menstabilisasi BH4, vitamin C juga melindungi pembentukan BH2 dari BH3 radikal dengan memfasilitasi daur ulang menjadi BH4.

2.7 Zebrafish

Zebrafish adalah ikan akuarium air tawar umum yang selama 40 tahun terakhir menjadi model yang kuat dan populer untuk penelitian genetika vertebrata, perkembangan, regenerasi, dan toksikologi. Beberapa keistimewaan utama yang menyebabkan zebrafish tumbuh secara cepat sebagai model penelitian adalah kemudahan perawatan, produktivitas, perkembangan yang cepat, ukuran kecil, dan kemudahan manipulasi (Meyers, 2018).

2.7.1 Sejarah dan Siklus Kehidupan

Zebrafish adalah ikan yang merupakan bagian dari keluarga Cyprinidae, berasal dari India, Pakistan, Nepal dan Bangladesh. Genus *Danio* memiliki lebih dari 40 spesies terkait. Zebrafish pertama kali ada dalam literatur yang berasal dari survei flora dan fauna Asia Selatan oleh dokter dan naturalis Skotlandia Francis Hamilton (Meyers, 2018).

Zebrafish lebih memilih air yang relatif jernih, bergerak lambat, hangat dengan sedikit tumbuh-tumbuhan dan pasir di bagian bawah, meskipun ditemukan juga di berbagai lingkungan yang berbeda menunjukkan bahwa jangkauan lingkungan kehidupannya cukup luas. Sebagai contoh, meskipun sebagian besar zebrafish di laboratorium dipelihara pada suhu sekitar 28°C, zebrafish liar hidup dalam suhu mulai dari 24,6°C hingga 38,6°C tanpa tanda-tanda stres panas di lingkungan yang lebih panas menunjukkan toleransi suhu

yang luas. Makanan alami zebrafish terutama serangga, nematoda dan zooplankton lainnya (Meyers, 2018).

Zebrafish bertelur sepanjang tahun dan sering terjadi pada musim hujan yaitu pada bulan April hingga Agustus. Zebrafish betina dapat melepaskan ratusan hingga lebih dari seribu oosit. Telur-telur yang dibuahi tenggelam dan seringkali cepat dikonsumsi oleh zebrafish dewasa, karenanya sebagian besar strategi perkembangbiakan di laboratorium memisahkan orang tua dari telur yang tenggelam dengan jaring atau penghalang berlubang (Meyers, 2018).

Perbedaan zebrafish jantan dan betina dapat diamati dari perut yang lebih ramping pada pejantan sementara betina memiliki perut yang lebih penuh dan bulat. Ilustrasi perbedaan betina dan jantan dapat dilihat pada gambar 2.6. Umur rata-rata ikan zebra tergantung pada ketegangan dan pemeliharaan, tetapi mereka dapat hidup 3 sampai 4 tahun meskipun mereka mulai menunjukkan tanda-tanda penuaan sekitar 2 tahun kehidupan (Meyers, 2018)



Gambar 2.6 Perbedaan Zebrafish Jantan dan Betina

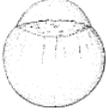
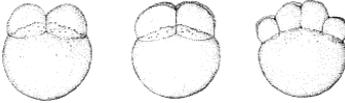
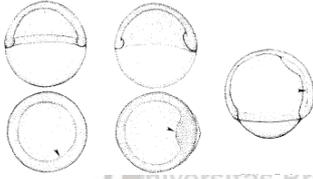
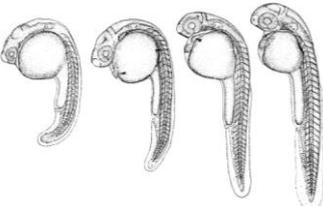
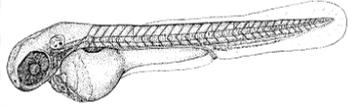
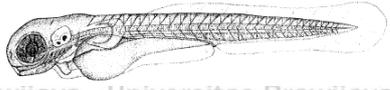
2.7.2 Perkembangan Zebrafish

Perkembangan embrionik ikan zebra pesat pada 28°C. Transparansi sel dan korion di sekelilingnya memudahkan pengamatan dan penahapan perkembangan. Fase pembelahan (45 menit hingga 1,30 jam), blastula (4 jam), gastrulasi (10 jam), segmentasi (10,30-20 jam), periode pharyngula (24 hingga

36 jam) dan hatching (48 hingga 96 jam) (Sharmili V dan Angelin A., 2015).

Tahap perkembangan tersebut dapat dilihat pada tabel 2.5.

Tabel 2.5 Tahapan Perkembangan Zebrafish

Periode	Usia (jam)	Deskripsi	Gambar
Zygote	0	Telur baru yang telah dibuahi akan melengkapi siklus sel zigot yang pertama	
Cleavage	3/4	Siklus dari 2 sel hingga 7 sel terjadi secara cepat dan serentak	
Blastula	2 1/4	Perkembangan siklus sel metasinkronus (8,9) yang cepat, mulai memanjang yang asinkron di transisi midblastula; epibola mulai terbentuk	
Gastrula	5 3/4	Pergerakan morfogenetik dari involusi, konvergensi, dan ekstensi dari epiblast, hipoblas, dan sumbu embrionik; sampai akhir epiboly	
Segmentation	10	Terjadi perkembangan lengkung faring primer, dan saraf; organogenesis primer; gerakan paling awal; ekor muncul	
Pharyngula	24	Embrio fase filotipik; sumbu tubuh mulai lurus dari kelengkungan awal mengikuti kuning telur; perkembangan sirkulasi, pigmentasi, dan sirip dimulai.	
Hatching	48	Morfogenesis yang cepat dari sistem organ primer telah lengkap. Terjadi perkembangan kartilage di kepala dan sirip dada dan penetasan	
Early larva	72	Kandung kemih mengembang, aktif mencari makanan dan perilaku penghindaran aktif	

Sumber : (Kimmel *et al.*, 1995)

2.7.3 Perawatan Zebrafish

1. Zebrafish disimpan dalam akuarium dengan sirkulasi yang terus-menerus menyaring air untuk menjaga kualitas air yang diperlukan untuk lingkungan akuatik yang sehat. Sistem sirkulasi juga membantu menyaring kelebihan makanan dan kotoran ikan. Lingkungan yang bersih dan sistem akuarium yang berjalan dengan baik penting untuk zebrafish berada dalam kondisi sehat. Sistem filter diubah secara teratur sehingga akuarium menerima aliran air yang layak dan bersih. Idealnya, sekitar 10% air aquarium harus diganti setiap hari untuk menjaga kualitas air yang baik. Parameter seperti alkalinitas, pH, suhu, kekerasan, amonia, oksigen terlarut, salinitas, dan konduktivitas diperiksa secara teratur sebagai faktor penting yang menunjukkan kualitas air akuarium (Avdesh *et al.*, 2012).

Tabel 2.6 Parameter Kualitas Air

No	Parameter	Optimum range
1	Alkalinitas	50-150 mg/L CaCO ₃
2	pH	6.8-7.5 (6.0-8.5 tolerated)
3	Suhu	26-28.5 °C
4	Hardness	50-100 mg/L CaCO ₃
5	Un-ionized Ammonia	<0.02 mg/L
6	Nitrate (NO ³⁻)	<50 mg/L
7	Nitrate (NO ²⁻)	<0.1 mg/L
8	Dissolved oxygen	>6.0 mg/L
9	Salinitas	0.5-1 g/L
10	Konduktivitas	300 -1,500 µS

2. Suhu akuarium dipertahankan antara 26°C - 28,5°C dan kondisi pencahayaan 14 : 10 jam terang gelap.

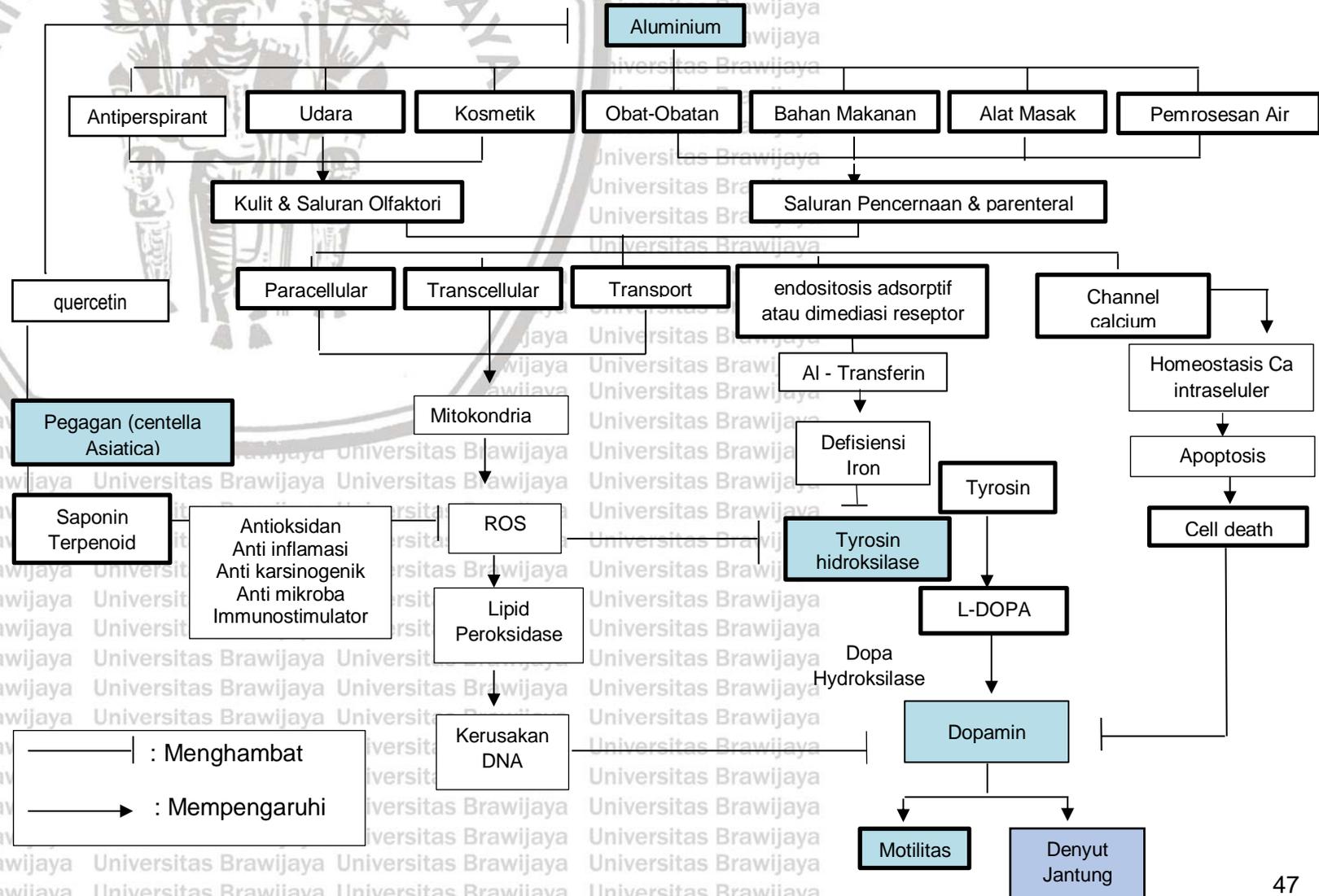
3. Air deklorinasi digunakan dalam akuarium zebrafish. Air dapat dideklorinasi dengan cara mediamkan selama setidaknya 48 jam. Dalam kondisi ideal, air harus disimpan dalam reservoir dengan pompa yang mengedarkan air agar tetap hangat, dan mempercepat deklorinasi.

4. PH air sistem harus diperiksa setiap hari dan dipertahankan antara 6,8 dan 7,5. Bila perlu, natrium bikarbonat harus digunakan untuk meningkatkan pH.
5. Akuarium ikan harus dibersihkan secara teratur. Kotoran dan pertumbuhan alga akan terlihat jelas di bagian bawah dan samping tangki.
6. Zebrafish dapat diberi makan dengan makanan kering (ukuran makanan dari 100 mikron untuk larva dan 300/400 mikron untuk ikan dewasa) atau makanan hidup (udang air asin). Telur udang air asin (*Artemia sp.*) tersedia di toko hewan peliharaan setempat dan dapat ditetaskan di laboratorium. Zebrafish tidak boleh makan berlebihan karena dapat meningkatkan kadar nitrat di dalam air sehingga mempengaruhi produktivitas dan kelayakan hidup. Makanan dalam akuarium sebaiknya selesai dalam waktu 10 menit. Saat memberi makan pada akuarium, pompa air dan pompa udara sebaiknya dimatikan untuk memungkinkan ikan memakan makanan selama 10 menit. Hal ini mengurangi jumlah makanan yang dicuci ke filter.
7. Pembibitan harus dilakukan secara berkala bahkan jika telur tidak diperlukan. Proses ini akan memastikan siklus pemeliharaan ikan tetap terjaga.

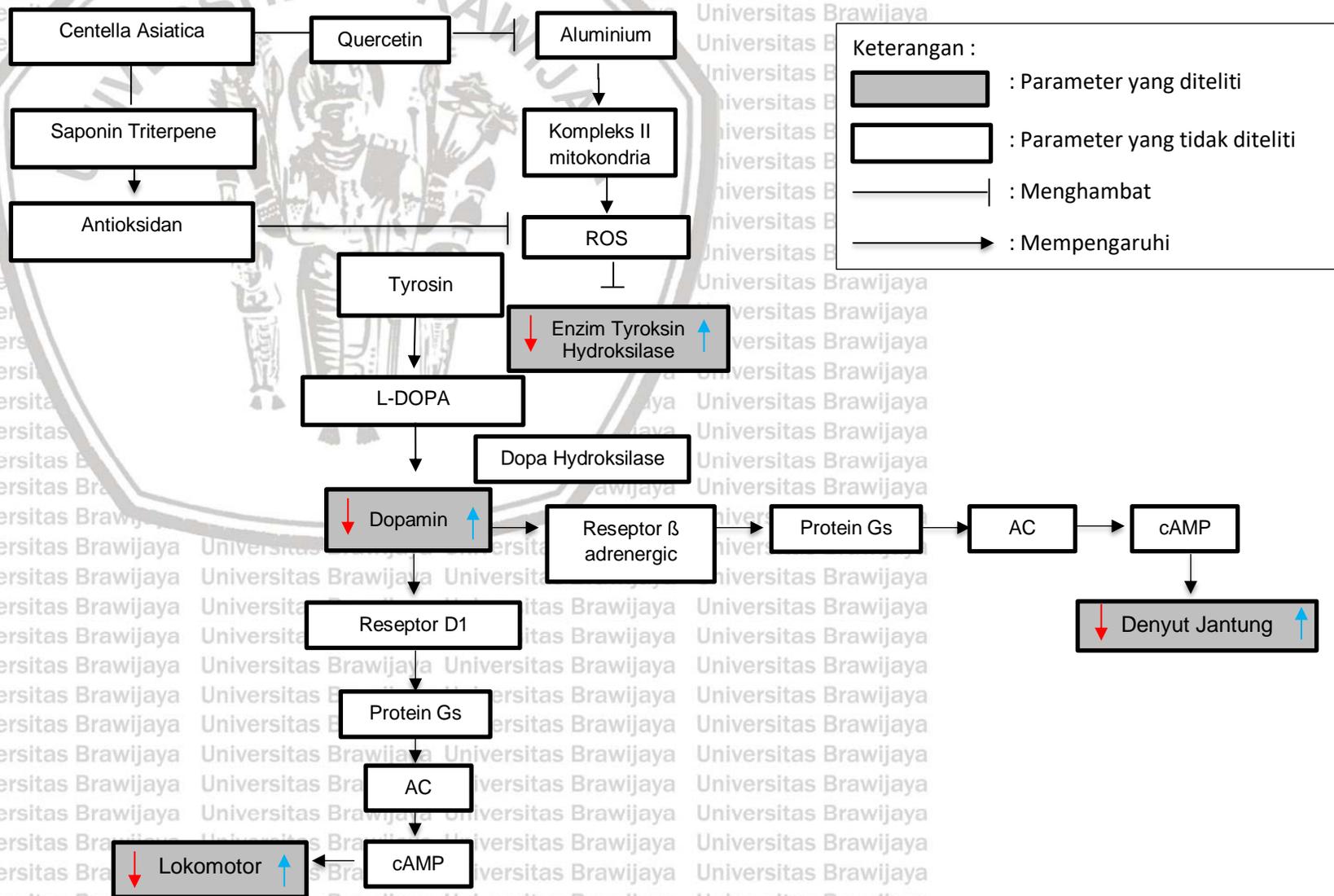
BAB 3

KERANGKA TEORI DAN KONSEP

3.1 Kerangka Teori



3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep

3.1 Penjelasan Kerangka Konsep

Alumunium merupakan logam terbesar di kerak bumi dan memiliki paparan yang luas. Al dapat masuk ke dalam sel melalui difusi pasif, transport aktif, kanal kalsium atau berikatan dengan protein seperti transferrin. Di dalam sel, Al meningkatkan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) dengan mengganggu langsung fungsi mitokondria kompleks II. Aluminium memiliki afinitas yang kuat dengan superoksida (O_2^-) membentuk senyawa aluminium superoksida (AlO_2^-).

Senyawa tersebut meningkatkan masa hidup spesies radikal superoksida dan memicu reaksi fenton yang menghasilkan radikal hidroksil.

Produksi ROS yang meningkat dapat merusak BH4 yang merupakan kofaktor tirosin hidroksilase atau secara langsung mengoksidasi enzim tirosin hidroksilase. TH adalah enzim yang berfungsi mengkatalisasi asam amino L-tyrosin menjadi L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). Sebagai enzim pertama dalam sintesis dopamin, gangguan pada TH berpengaruh terhadap pembentukan dopamin. Dopamin (DA) merupakan salah satu neurotransmitter katekolamin di otak yang berperan dalam mengatur gerak dan memiliki efek pada denyut jantung.

Pegagan dikonsumsi sebagai *brain tonic* atau obat anti lupa untuk orang dewasa dan manula (manusia usia lanjut). Penggunaan pegagan sebagai neuroproteksi didapatkan karena pegagan mampu melindungi sel-sel dari kerusakan oksidatif, menghancurkan kelebihan radikal bebas, dan menjaga keseimbangan stres oksidatif. Kandungan bioaktif dominan di pegagan adalah saponin triterpene yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Saponin triterpene memiliki sifat amphipathic yaitu hidropobik dan hidrofilik sehingga dapat dengan mudah menembus membran sel. Antioksidan sangat penting pada toksisitas aluminium karena dapat melindungi sel dari kerusakan yang disebabkan ROS. Selain itu terdapat penelitian yang menunjukkan kandungan

polifenol yaitu quercetin pada CA dapat berperan sebagai chelator logam berat aluminium. Hal ini dapat menjadikan CA sebagai tanaman pencegah toksisitas Al sebelum Al bereaksi menyebabkan peningkatan ROS.

3.3 Hipotesis

Hipotesis umum dalam penelitian ini adalah “pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah toksisitas aluminium pada lokomotor dan frekuensi denyut jantung melalui penurunan ekspresi TH dan kadar Dopamin pada larva zebrafish”.

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

1. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah penurunan lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar aluminium (Al).
2. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah penurunan frekuensi denyut jantung pada larva zebrafish yang dipapar aluminium (Al).
3. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah penurunan ekspresi tirosin hidroksilase (TH) pada larva zebrafish yang dipapar aluminium.
4. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah penurunan kadar dopamin (DA) pada larva zebrafish yang dipapar aluminium.
5. Terdapat hubungan antara tirosin hidroksilase dengan dopamin pada larva zebrafish terpapar aluminium yang diberikan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*).
6. Terdapat hubungan antara dopamin dengan lokomotor pada larva zebrafish terpapar aluminium yang diberikan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*).

7. Terdapat hubungan antara dopamin dengan frekuensi denyut jantung pada larva zebrafish terpapar aluminium yang diberikan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*).



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

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

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah embrio sampai larva zebrafish usia 0 – 6 dpf yang diperoleh dari hasil fertilisasi zebrafish *wild type* dengan perbandingan 1 : 2 antara induk jantan dan betina. Sebelum perlakuan, zebrafish dirawat di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang menggunakan prosedur standar, diberi makan tiga kali sehari (Tetramin flakes) dengan siklus 14:10 terang-gelap. Suhu air dipertahankan antara 28 ± 1 °C (Avdesh *et al.*, 2012). Zebrafish yang dipilih telah teruji dan tersertifikasi di Laboratorium Hidrologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

4.2.2 Sampel Penelitian

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

Penentuan jumlah sampel juga berdasarkan penelitian zebrafish sebelumnya yaitu sebanyak 20 – 30 embrio per kelompok untuk menilai survival

dan hatching rate (Lucitt *et al.*, 2008). Pengukuran aktivitas lokomotor menggunakan 5 larva zebrafish sedangkan denyut jantung menggunakan 10 larva zebrafish. Pengukuran TH dan Dopamin masing-masing menggunakan 20 larva per kelompok (Hostelley *et al.*, 2017; Monaco *et al.*, 2017)

Adapun pembagian kelompok yaitu :

1. Kontrol, yaitu kelompok sampel tanpa paparan aluminium maupun ekstrak pegagan.
2. Kontrol positif, yaitu kelompok sampel yang diberikan paparan aluminium dari garam aluminium klorida ($AlCl_3$) 50 μM (2 hpf – 3 dpf). Paparan diberikan 3 kali pada 2 hpf, 24 hpf dan 48 hpf.
3. Perlakuan 1 (P1), yaitu kelompok sampel yang diberikan paparan aluminium dari garam aluminium klorida ($AlCl_3$) 50 μM (2 hpf – 3 dpf) ditambahkan ekstrak pegagan 1,25 $\mu g/mL$ (0 hpf – 3 dpf). Paparan diberikan 3 kali pada 2 hpf, 24 hpf dan 48 hpf.
4. Perlakuan 2 (P2), yaitu kelompok sampel yang diberikan paparan aluminium dari garam aluminium klorida ($AlCl_3$) 50 μM (2 hpf – 3 dpf) ditambahkan ekstrak pegagan 2,5 $\mu g/mL$ (2 hpf – 3 dpf). Paparan diberikan 3 kali pada 2 hpf, 24 hpf dan 48 hpf.
5. Perlakuan 3 (P3), yaitu kelompok sampel yang diberikan paparan aluminium dari garam aluminium klorida ($AlCl_3$) 50 μM (2 hpf – 3 dpf) ditambahkan ekstrak pegagan 5 $\mu g/mL$ (2 hpf – 3 dpf). Paparan diberikan 3 kali pada 2 hpf, 24 hpf dan 48 hpf.

4.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.3.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah embrio zebrafish yang telah dibuahi usia 0 – 2 hpf (*hour post fertilization*), berwarna jernih transparan, tanpa jamur atau selaput putih saat dilihat dengan mikroskop.

4.3.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi dalam penelitian ini adalah embrio kosong (tidak dibuahi) dan tampak cacat secara struktural.

4.3.3 Kriteria Dropout

Embrio yang mati sebelum penelitian selesai dilaksanakan.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

4.4.1 Tempat

1. Perawatan zebrafish, pembuatan larutan logam aluminium dan ekstrak pegagan, serta pengukuran motilitas larva akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Pemeriksaan kadar Tirosin Hidroksilase (TH) dan Dopamin (DA) dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Februari – Juni 2019.

4.5 Variabel Penelitian

1. Variabel *Independent* : larutan logam aluminium dan ekstrak etanol pegagan.
2. Variabel *Dependent* : lokomotor dan frekuensi denyut jantung larva zebrafish
3. Variabel Antara : Tirosin Hidroksilase (TH) dan Dopamin (DA)

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Data
Ekstrak etanol pegagan	Konsentrasi paparan ekstrak pegagan ada tiga yaitu 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL dan 5 µg/mL yang diberikan pada masing-masing kelompok perlakuan mulai 2 hpf hingga 72 hpf.	Konsentrasi pemberian etanol (µg/mL)	Rasio ekstrak pegagan
Konsentrasi Aluminium	Aluminium klorida dilarutkan dalam aquadest 50 µM	50 µM	Rasio
Aktivitas Lokomotor	Pengukuran aktivitas lokomotor pada usia 4 – 6 dpf dilakukan dengan merekam gerakan larva zebrafish selama 1 menit dimana dalam 1 well berisi 1 larva. Kemudian dihitung berapa banyak pergerakan larva melintasi garis. Selain jumlah, pola lokomotor larva akan divisualisasikan menggunakan software <i>image j</i> .	Lokomotor (kali/menit)	Rasio
Denyut Jantung	Pengukuran frekuensi denyut jantung dilakukan pada usia 3, 4, 5 dan 6 dpf dengan merekam denyut jantung larva zebrafish selama 15 detik menggunakan mikroskop. Kemudian diukur jumlah denyut jantung dalam 1 menit.	Denyut jantung (kali/menit)	Rasio
Ekspresi Tirosin Hidrosilase	Pengukuran ekspresi TH diukur pada larva 6 dpf setelah dilakukan terminasi menggunakan qPCR di Laboratorium Biomedik FKUB Malang	Ekspresi TH dalam au	Rasio
Kadar Dopamin	Pengukuran kadar Dopamin diukur pada larva 6 dpf setelah dilakukan terminasi menggunakan ELISA di Laboratorium Biomedik FKUB Malang	Kadar DA dalam ng/ml	Rasio

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Zebrafish

- Alat : akuarium 60 L, termometer, heater air, aerator, filtrasi air, PH meter, mikroskop stereometri (Olympus SZ61), laptop, optilab, tempat penampungan telur ikan, inkubator, microplate 6 well dan 24 well, pipet plastik 2 ml, mikro pipet dan tip, Cawan Petri, Object Glass.
- Bahan : Zebrafish dewasa, air tawar, anti chlorin, anti lch, medium embrionik, pakan ikan (tetramin flakes), aquadest, alkohol 96%.

4.7.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Pegagan

1. Alat : timbangan, oven, blender, erlenmeyer glass, evaporator, corong gelas, labu penampungan etanol, rotary evaporator, water pump, selang water pump, water bath, botol tempat hasil ekstraksi, dan kulkas.

2. Bahan : pegagan, etanol, kertas saring dan aluminium foil

4.7.3 Alat dan Bahan Pembuatan Larutan Aluminium

1. Alat : timbangan digital, tabung reaksi, endorff dan kulkas.

2. Bahan : aluminium dan aquadest

4.7.4 Alat dan Bahan Pembuatan Medium Embrionik

1. Alat : Timbangan digital, tabung reaksi 500 mL dan pengaduk

2. Bahan : Aquadest 500 mL, CaCl 0,25 gr, KCL 0,15 gr, NaCl 5 gr dan MgSO₄ 0,815 gr.

4.7.5 Alat dan Bahan Pengukuran Lokomotor

1. Alat : pipet plastik 2 ml, kamera, *embryo poker tool*, kertas transparan yang telah dibuat garis membagi plate ukuran 3x4 menjadi 5, image J.

2. Bahan : medium embrionik

4.7.6 Alat dan Bahan Pengukuran Denyut Jantung

1. Alat : mikroskop stereotip (Olympus SZ61), Optilab versi 2.0, stopwatch, dan *object glass*.

2. Bahan : larutan medium embrionik

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Persiapan Fertilisasi dan Pemeliharaan Embrio

Zebrafish dipelihara di lingkungan air tawar dalam akuarium 60 L. Air yang digunakan adalah air Perusahaan Air Minum Daerah (PDAM) yang telah didiamkan semalaman setelah ditambahkan anti klorin. Aerasi dan filtrasi air dijaga agar tetap hidup untuk menyaring dan menjaga kualitas air. Air dijaga suhunya pada 26 – 28,5°C, pH 6,8 – 7,5 (Avdesh *et al.*, 2012). Pakan diberikan

dua kali sehari dengan tetramin flakes dan diberikan 3 kali ketika akan *trapping* telur.

Pembiakan zebrafish mengikuti siklus gelap terang dengan perbandingan siklus gelap : terang 10 : 14. Pembiakan zebrafish diawali dengan siklus terang selama 14 jam. Setelah itu zebrafish diberi makan 1 jam sebelum siklus gelap dimulai. Tempat penampungan telur (trap) diletakkan selama siklus gelap dan diangkat 30 menit setelah siklus terang dimulai untuk memberikan waktu fertilisasi dan peletakan telur. Setelah trap diangkat, telur – telur ikan kemudian dipilih dan dibersihkan menggunakan air aqua tidak lebih dari 2 jam. Setelah dibersihkan dari kotoran dan jamur, telur diamati di mikroskop untuk dipastikan telur –telur yang sehat antara lain jernih, bening, dan tidak berjamur. Kemudian diletakkan ke microplate 6 well untuk kemudian diberikan perlakuan sesuai kelompoknya. Microplate kemudian disimpan di dalam inkubator dengan suhu 28°C hingga 6 dpf. Larutan embrionik dan perlakuan diganti setiap hari.

4.8.2 Pembuatan Medium Embrionik

Pembuatan 500 ml larutan stok medium embrionik dengan kepekatan 10 kali menggunakan bahan CaCl 0,25 gr, KCl 0,15 gr, NaCl 5 gr, dan MgSO₄ 0,815 gr dan 500 ml aquadest yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Larutan stok disimpan di dalam lemari pendingin suhu 2 – 8°C. Saat akan digunakan, larutan stok diencerkan dengan aqua dengan perbandingan 1 : 9.

4.8.3 Pembuatan Larutan Aluminium

Larutan aluminium dibuat dari garam AlCl₃ dalam bentuk serbuk dilarutkan dengan aquadest sehingga didapatkan stok 2,5 x 10³ µM. Untuk membuat stok 50 µM sebanyak 15 ml (3 well) dari konsentrasi 2,5 x 10³ µM menggunakan rumus sebagai berikut :

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

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

$$V_1 = \frac{15 \text{ ml} \times 50 \mu\text{M}}{2,5 \times 1000 \mu\text{M}} = 0,3 \text{ ml} = 300 \mu\text{L}$$

Keterangan :

V_1 = Volume awal

M_1 = Konsentrasi stok

V_2 = Volume yang diinginkan

M_2 = Konsentrasi akhir yang diinginkan

Jadi untuk membuat 15 mL konsentrasi 50 μM , 300 μL dari stok aluminium 2,5 x $10^3 \mu\text{M}$ ditambahkan larutan embrionik hingga 15 mL.

4.8.4 Pembuatan Ekstrak Pegagan

Pegagan yang digunakan diperoleh dari UPT Material Medica Batu Jawa Timur yang telah bersertifikat. Bagian tanaman yang digunakan untuk pembuatan ekstrak adalah bagian atas tanpa stolon dan akar (Khotimah, Sumitro, *et al.*, 2018).

Prosedur pembuatan ekstrak pegagan adalah sebagai berikut :

1. Pegagan dicuci bersih kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan dimasukkan ke dalam oven 40°C.
2. Pegagan yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender.
3. 100 gram serbuk pegagan dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer dan direndam dalam 900 ml larutan etanol 98%. Kemudian diaduk selama \pm 30 menit dan didiamkan sampai mengendap 24 jam.
4. Lapisan atas rendaman serbuk pegagan (campuran etanol dan zat aktif) diambil dan disaring menggunakan corong buncher.
5. Proses evaporasi dilakukan menggunakan rotary evaporator dengan cara memasukkan filtrat ke dalam labu evaporasi 1 L dan dipasang pada

evaporator. Water bath diisi sampai penuh dan dipanaskan hingga suhu 70°C. Proses evaporasi ± 1,5 – 2 jam.

6. Hasil ekstraksi ditimbang dan dimasukkan ke dalam botol plastik dan disimpan dalam lemari pendingin (freezer) (Selvi *et al.*, 2012)

4.8.5 Pembuatan Larutan Pegagan

Konsentrasi pegagan yang digunakan pada penelitian ini adalah 1,25 µM, 2,5 µM, dan 5 µM. Pembuatan stok pegagan 1 mg/ml dihitung menggunakan rumus :

$$\frac{10 \text{ mg pegagan}}{10 \text{ ml aquades}} = 1 \text{ mg/ml} = 1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Pembuatan larutan pegagan 5 µg/ml sebanyak 5 mL (1 well) dari stok 1 mg/ml dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

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

$$V_1 \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 5 \text{ ml} \times 5 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$V_1 = \frac{5 \text{ ml} \times 5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{1000 \text{ } \mu\text{g/ml}} = 25 \times 10^{-3} \text{ ml} = 25 \text{ } \mu\text{L}$$

Jadi, sebanyak 25 µL dari stok 1000 µg/ml diambil menggunakan mikropipet dan ditambahkan larutan medium embrionik hingga 5 ml. Pembuatan pegagan 2,5 µg/ml sebanyak 5 mL (1 well) diambil dari stok 5 µg/ml yang dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

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

$$V_1 \times 5 \text{ } \mu\text{g/ml} = 2,5 \text{ ml} \times 5 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$V_1 = \frac{2,5 \text{ ml} \times 5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{5 \text{ } \mu\text{g/ml}} = 2,5 \text{ ml}$$

Jadi, sebanyak 2,5 ml dari stok 5 µg/ml diambil menggunakan spuit dan ditambahkan larutan medium embrionik hingga 5 ml. Pembuatan larutan pegagan 1,25 µg/ml sebanyak 5 mL (1 well) diambil dari stok 2,5 µg/ml yang dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\begin{aligned}V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\V_1 \times 2,5 \mu\text{g/mL} &= 1,25 \text{ ml} \times 5 \mu\text{g/mL} \\V_1 &= \frac{1,25 \text{ ml} \times 5 \mu\text{g/mL}}{2,5 \mu\text{g/mL}} = 2,5 \text{ ml}\end{aligned}$$

Keterangan :

V_1 = Volume awal

M_1 = Konsentrasi stok

V_2 = Volume yang diinginkan

M_2 = Konsentrasi akhir yang diinginkan

4.8.6 Perlakuan pada Setiap Kelompok

1. Kontrol

Pada kontrol negatif, embrio zebrafish hanya diberikan larutan medium embrionik 5 mL di setiap well.

2. Logam aluminium

Pada kelompok logam aluminium diberikan larutan aluminium 50 μM pada usia 2 hpf hingga 3 dpf dan larutan diganti setiap hari pada jam yang sama.

3. Perlakuan 1 (P1)

Pada perlakuan 1, embrio zebrafish diberikan campuran larutan pegagan 1,25 $\mu\text{g/mL}$ dan larutan aluminium 50 μM yang ditambahkan larutan medium embrionik sampai 5 mL (satu sumur).

4. Perlakuan 2 (P2)

Pada perlakuan 2, embrio zebrafish diberikan campuran larutan pegagan 2,5 $\mu\text{g/mL}$ dan larutan aluminium 50 μM yang ditambahkan larutan medium embrionik sampai 5 mL (satu sumur).

5. Perlakuan 3 (P3)

Pada perlakuan 3, embrio zebrafish diberikan campuran larutan pegagan 5 µg/mL dan larutan aluminium 50 µM yang ditambahkan larutan medium embrionik sampai 5 mL (satu sumur).

Lama pemberian paparan Aluminium pada zebrafish dilakukan sebelum hatching (2 hpf – 3 dpf) yang diasumsikan di dalam kandungan embrio sudah terpapar aluminium. Pemberian pegagan juga diberikan pada embrio intrauterin dengan perbedaan konsentrasi antara kelompok P1 (1,25 µg/ml), P2 (2,5 µg/ml), dan P3 (5 µg/ml). Setelah perlakuan pada masing-masing kelompok, larva dibilas sebanyak 3 kali menggunakan larutan medium embrionik, kemudian selanjutnya hanya menggunakan larutan medium embrionik.

4.8.7 Pengukuran Aktivitas Lokomotor

Untuk setiap kelompok, 5 embrio yang berbeda dipilih secara acak. Pengukuran motilitas dilakukan pada usia embrio 4 hingga 6 dpf dengan meletakkan ikan pada well plate yang berukuran 3 x 4 yang digaris menjadi 5 bagian. Setelah itu dilakukan perekaman menggunakan kamera selama 1 menit, kemudian kuantifikasi berapa jumlah garis yang dilewati larva. Pengukuran dilakukan pada semua kelompok (Pratama, 2017).

4.8.8 Pengukuran Denyut Jantung

Untuk setiap kelompok, 10 embrio yang berbeda dipilih secara acak. Pengukuran denyut jantung dilakukan pada usia embrio 3, 4, 5 dan 6 dpf dengan meletakkan ikan pada *object glass* dengan embrionik medium minimal. Setelah itu dilakukan perekaman menggunakan mikroskop dan optilab selama 15 detik, kemudian kuantifikasi berapa jumlah detak per menit. Pengukuran dilakukan pada semua kelompok (Monaco *et al.*, 2017).

4.8.9 Pengukuran Ekspresi TH

Persiapan sampel dan isolasi RNA dilakukan dengan cara (Hostelley *et al.*, 2017) :

1. Larva zebrafish usia 6 dpf dieuthanasia dengan cara dimasukkan ke dalam air es dengan komposisi 5 bagian es dan 1 bagian air (0 – 4°C) selama 20 menit.
2. Sejumlah 20 larva dipindahkan ke dalam tube microcentrifuge 1,5 mL yang telah diberi label. Media embrionik dikeluarkan dari tube microcentrifuge dan larva dibilas menggunakan aquadest. Selanjutnya aquadest dikeluarkan dari tube.
3. RB Buffer 400 μ L dan β -mercaptoethanol ditambahkan ke dalam tube microcentrifuge 1,5 mL yang berisi 20 larva. Larva dihomogenisasi secara mekanik menggunakan micropestle. Kemudian sampel divortex.
4. Filter column diletakkan pada collection tube 2 mL. Kemudian sampel dipindahkan ke dalam filter column dan disentrifugasi selama 30 detik pada kecepatan 1000 x g.
5. Supernatan dipindahkan secara perlahan ke dalam microcentrifuge tube 1,5 mL yang baru.
6. Sejumlah 400 μ L etanol 70% ditambahkan ke dalam microcentrifuge tube kemudian dicampur perlahan.
7. RB Column diletakkan pada collection tube 2 ml kemudian larutan dipindahkan ke RB Column untuk dilakukan sentrifugasi 14.000 – 16.000 x g selama 1 menit.
8. Cairan dibuang kemudian RB Column diletakkan kembali ke collection tube 2 mL.
9. Sejumlah 400 μ L W1 Buffer ditambahkan ke RB Column kemudian disentrifugasi pada 14.000 – 16.000 x g selama 30 detik.

10. Cairan kemudian dibuang dan RB Column diletakkan kembali ke collection tube 2 ml.

11. Sejumlah 600 μ L wash Buffer ditambahkan ke RB Column kemudian disentrifugasi pada 14.000 – 16.000 x g selama 30 detik.

12. Cairan kemudian dibuang dan RB Column diletakkan kembali ke collection tube 2 ml.

13. Sejumlah 600 μ L wash Buffer ditambahkan ke RB Column kemudian disentrifugasi pada 14.000 – 16.000 x g selama 30 detik.

14. Cairan kemudian dibuang dan RB Column diletakkan kembali ke collection tube 2 ml.

15. Dilakukan sentrifugasi 14.000 – 16.000 x g selama 3 menit untuk mengeringkan matrix column.

16. Column RB yang telah kering diletakkan pada microcentrifuge tube 1,5 mL.

17. Sejumlah 50 μ L Rnase-free water ditambahkan pada tengah column matrix.

18. Column matrix didiamkan selama 2 menit untuk memastikan Rnase-free water terserap pada matrix.

19. Sentrifugasi pada 14.000 – 16.000 x g selama 1 menit.

20. Uji kemurnian dan konsentrasi dilakukan menggunakan mesin nano drop menggunakan 2 μ L sampel.

21. Selanjutnya sampel disimpan pada suhu -60°C .

Persiapan sintesis cDNA dilakukan dengan cara (Toyobo, n.d.) :

1. Template RNA disiapkan dari masing-masing sampel yang mengandung total RNA 30 ng/ μ L.

2. Sejumlah 4x DN Master mix dan gDNA Remover dicampurkan dengan perbandingan 1 : 50 ke dalam sampel.

3. Denaturasi RNA dilakukan dengan inkubasi pada suhu 65°C selama 5 menit kemudian diletakkan pada es atau alumunium plate.

4. Sampel kemudian ditambahkan 20 μL dan 50 μL Nuclease-free water.
5. Inkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit.
6. Ditambahkan 5x master mix II 20 μL .
7. Inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit kemudian dilanjutkan inkubasi pada suhu 50°C selama 5 menit.
8. Sampel kemudian dipanaskan pada suhu 98°C selama 5 menit.
9. Sampel disimpan pada suhu 4°C - 20°C

Reverse transcriptase PCR untuk mengukur Ekspresi TH dilakukan dengan cara (Meritet *et al.*, 2017) :

1. Master mix PCR di vorteks dan sentrifugasi setelah diletakkan di suhu ruang beberapa saat.
2. Tabung PCR diletakkan di atas alumunium plate yang telah didinginkan dan campurkan bahan-bahan PCR master mix 12,5 μL , primer forward dan reverse masing-masing 1 μL , template DNA 5 μL , dan 5,5 μL water nuclease free.
3. Campuran kemudian divortex dan dilakukan PCR mengikuti rekomendasi kondisi siklus suhu berikut :

Tabel 4.2 Rekomendasi Kondisi Siklus dan Suhu pada Pemeriksaan PCR

Langkah	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Waktu	Jumlah Siklus
Pra Denaturasi	95	1-3 menit	1
Denaturasi	95	30 detik	
Annealing	Tm-5	30 detik	25 – 40
Extension	72	1 menit	
Final Extension	72	5 – 15 menit	1

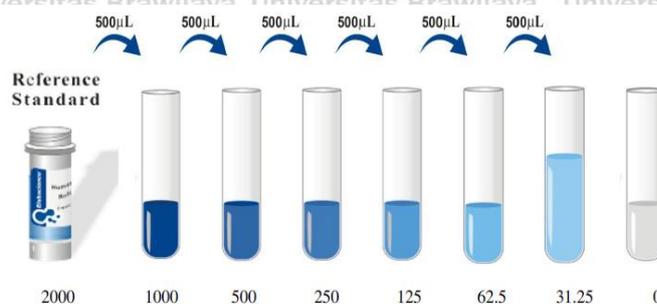
Hasil dari proses PCR kemudian dilakukan elektroforesis dengan cara :

1. Gel agarose dipersiapkan terlebih dahulu.
2. Sampel sejumlah 3 μL ditambahkan loading dye 2 μL kemudian dimasukkan ke gel agarose.
3. Gel agarose yang sudah berisi sampel kemudian di running selama 30 menit dengan dialiri listrik 100 V.
4. Hasil agarose dibaca pada mesin gel doc untuk melihat ekspresi gen.

4.8.10 Pengukuran Kadar Dopamin

Pengukuran kadar dopamin dilakukan dengan ELISA. Langkah awal pemeriksaan ELISA adalah persiapan reagen yang dilakukan dengan cara :

1. Semua reagen dibawa ke suhu kamar (18 – 25°C) sebelum digunakan.
2. Wash buffer diencerkan yaitu 30 mL konsentrat wash buffer dicampurkan 720 mL air deionisasi. Jika terbentuk kristal maka cairan dihangatkan dalam rendaman air 40°C dan diaduk hingga larut.
3. Standard disentrifugasi pada 10000 x g selama 1 menit. Kemudian 1 mL reference standard dan sample diluent ditambahkan dan didiamkan selama 10 menit, setelah itu diaduk ringan dengan pipet. Hasilnya akhirnya adalah working solution 2000 pg/ml. Kemudian diencerkan secara gradient yaitu 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, dan 0 pg/ml seperti pada gambar 4.1 berikut.



Gambar 4.1 Gradien Standar Pemeriksaan ELISA

Pemeriksaan ELISA kemudian dilakukan dengan menggunakan prosedur berikut ini :

1. Cairan standard working ditambahkan pada dua well pertama. Sampel ditambahkan pada well lain (masing-masing 50 μ L). Kemudian Biotinylated Detection Antibody working solution ditambahkan 50 μ L pada setiap well. Plate kemudian ditutup dan diinkubasi selama 45 menit pada suhu 37°C.
2. Larutan dituang dari masing-masing well kemudian larutan buffer 350 μ L ditambahkan pada masing-masing well. Kemudian dilakukan perendaman selama 1 – 2 menit dan cairan dituang kembali dari masing-masing plate sambil ditepuk-tepuk di atas kertas penyerap bersih. Langkah ini diulangi 3 kali.
3. HRP Conjugate Working ditambahkan pada masing-masing well sebanyak 100 μ L kemudian ditutup dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
4. Larutan dituang dari masing-masing well kemudian proses pencucian diulang sebanyak 5 kali.
5. Substrat reagen ditambahkan sebanyak 90 μ L pada masing-masing well, kemudian ditutup dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C sambil dilindungi dari cahaya.
6. Stop solution ditambahkan pada masing-masing well.
7. Langkah terakhir dilakukan pengukuran optical density (OD) pada masing-masing well dengan microplate reader.

4.9 Pengolahan dan Analisis Data

Pengolaan data akan dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 24.0 dengan tingkat kepercayaan adalah 95% dan nilai $p < 0,05$. Data akan dianalisis dengan menggunakan uji statistik yaitu :

1. Uji Normalitas dilakukan dengan uji Shapiro Wilk. Data berdistribusi normal jika $p \text{ value} > 0,05$.

2. Uji homogenitas data dilakukan dengan uji levene. Jika p value > 0,05 maka data memiliki varian yang sama (homogen).

3. Untuk menguji adanya perbedaan paparan ekstrak etanol pegagan terhadap motilitas, detak jantung, ekspresi tirosin hidroksilase, dan kadar dopamin antar masing-masing kelompok (kontrol, aluminium, P1, P2 dan P3) dilakukan uji One Way Annova. Jika p value < 0,05, maka dapat diinterpretasikan ada perbedaan yang signifikan antar kelompok sehingga dilanjutkan dengan analisis Post-Hoc LSD (*Least Significant Difference*).

Tujuan uji Post-Hoc LSD untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan yang bermakna, sehingga dapat diketahui konsentrasi pegagan pada kelompok mana yang berpengaruh pada variabel dependen yang diuji.

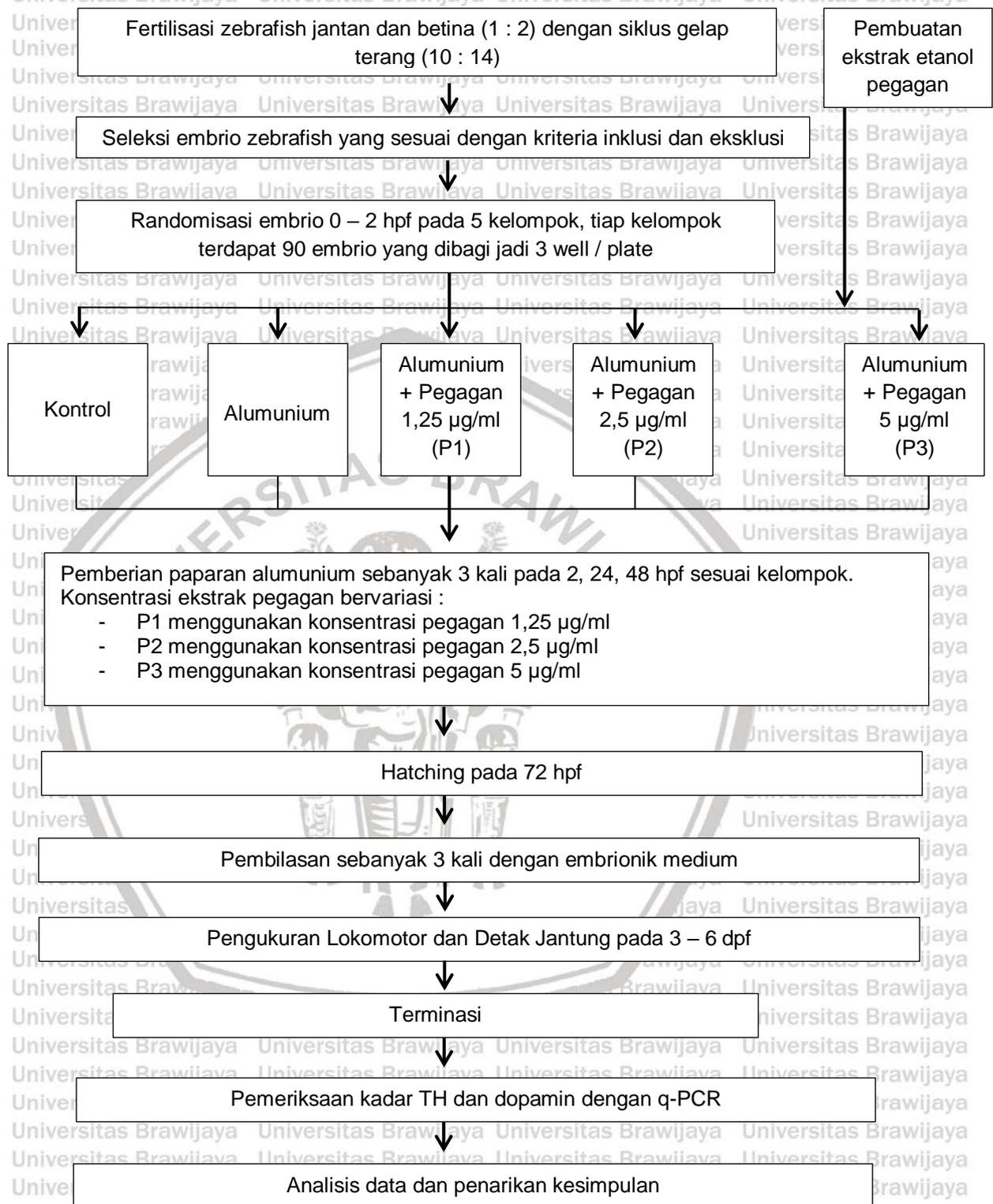
4. Uji korelasi dilakukan menggunakan uji korelasi Pearson. Jika p value < 0,05 maka dapat diinterpretasikan terdapat korelasi yang bermakna antara dua variabel yang diuji.

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

Tabel 4.3 Kekuatan Korelasi dan Arah Korelasi

No	Parameter	Nilai	Interpretasi
1	Kekuatan Korelasi (r)	0.00 - 0.199	Sangat lemah
		0.20 - 0.399	Lemah
		0.40 - 0.599	Sedang
		0.60 - 0.799	Kuat
		0.80 - 1.00	Sangat Kuat
2	Arah	+	Searah, semakin besar nilai suatu variabel makin besar pula nilai variabel lainnya
		-	Berlawanan arah, semakin besar nilai suatu variabel makin kecil nilai variabel lainnya

4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

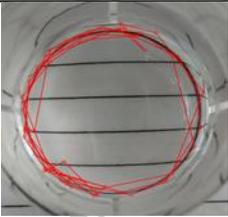
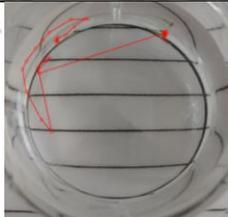
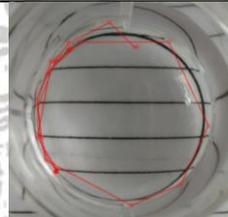
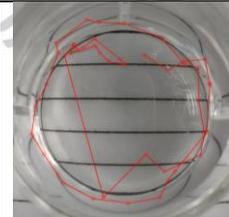
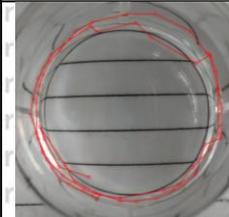
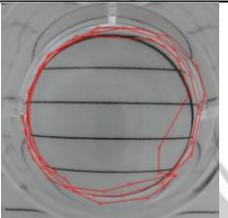
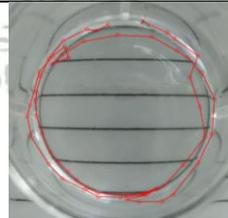
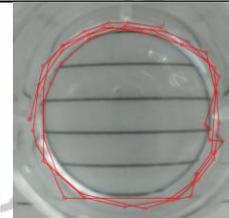
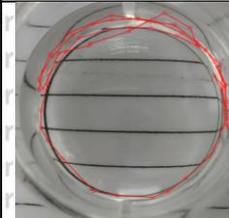
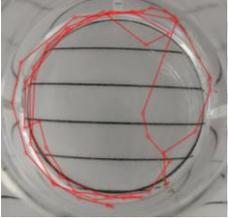
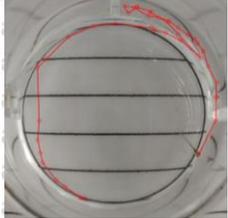
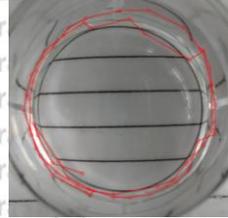
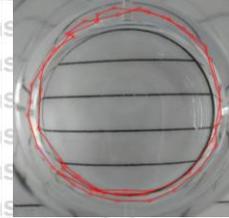
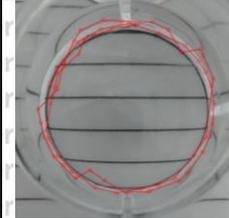
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

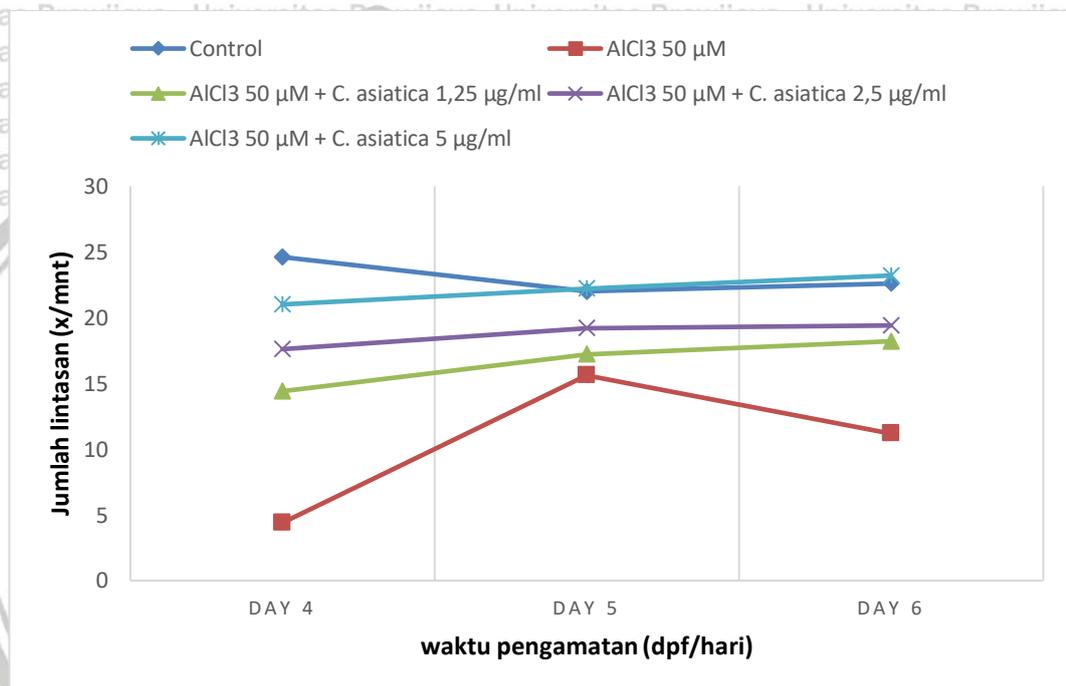
5.1 Pengaruh Pegangan terhadap Lokomotor Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium (Al)

Lokomotor larva zebrafish direkam menggunakan kamera selama 1 menit dan diukur jumlah lintasan larva per menit. Selain itu pengamatan terhadap pola lokomotor juga dilakukan menggunakan software image J. Adapun pola lokomotor dapat dilihat pada tabel 5.1 berikut.

Tabel 5.1 Pola Lokomotor Larva Zebrafish

Usia	Kelompok				
	KN	KP	P1	P2	P3
4 dpf					
Mean ± std	24.60 ± 3.44	4.40 ± 4.16	14.40 ± 3.29	17.60 ± 3.85	21 ± 2
5 dpf					
Mean ± std	22 ± 4.74	15.60 ± 2.70	17.20 ± 4.76	19.20 ± 4.21	22.20 ± 1.64
6 dpf					
Mean ± std	22.60 ± 5.37	11.20 ± 3.90	18.20 ± 1.79	19.40 ± 2.70	23.20 ± 2.39

Pelacakan pola aktivitas lokomotor menunjukkan penurunan akibat paparan aluminium namun dengan penambahan ekstrak pegagan dapat memperbaikinya secara bertahap seiring peningkatan konsentrasi. Selanjutnya, Grafik perkembangan lokomotor antara kelompok kontrol, kelompok negatif yang ditambahkan Aluminium 50 μM dan kelompok perlakuan yang diberikan Aluminium 50 μM ditambah pegagan berturut-turut 1,25 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ dan 5 $\mu\text{g/ml}$ dapat dilihat pada gambar 5.1 berikut ini :



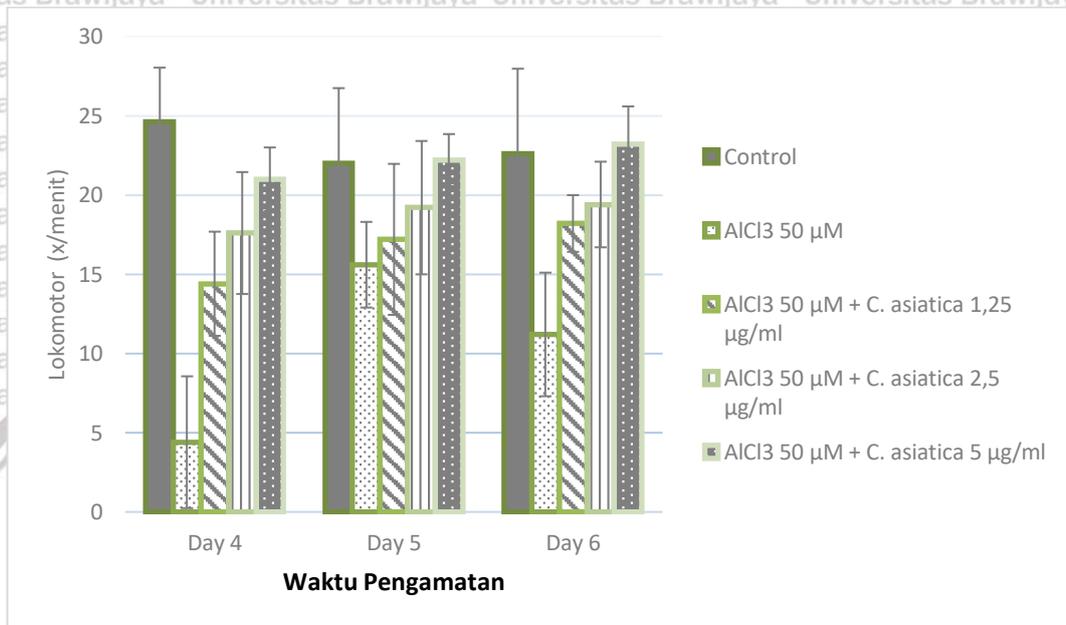
Gambar 5.1 Grafik perkembangan lokomotor larva zebrafish 4 – 6 dpf

Keterangan : Kelompok positif yang dipapar Aluminium 50 μM menunjukkan rata-rata lokomotor paling rendah dibandingkan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan selama 3 hari pengamatan. Garis lokomotor pada kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 mendekati lokomotor kelompok kontrol secara berturut-turut.

Data lokomotor selanjutnya dianalisis statistik dengan ANOVA menggunakan SPSS 24.0. Sebelumnya dilakukan pengujian distribusi data menggunakan uji Shapiro-Wilk dan uji variasi menggunakan uji Levene. Data lokomotor 4 dpf, 5 dpf dan 6 dpf berdistribusi normal ($p > 0.05$). Sedangkan pada uji homogenitas

menunjukkan data lokomotor 4 dpf dan 5 dpf homogen sedangkan lokomotor 6 dpf tidak homogen.

Perbedaan rerata lokomotor 4, 5 dan 6 dpf dapat dilihat pada gambar 5.2 berikut :



Gambar 5.2 Perbandingan rerata lokomotor larva zebrafish 4 – 6 dpf

Keterangan : Rerata lokomotor larva zebrafish 4 dpf, 5 dpf dan 6 dpf berbeda secara signifikan antara semua kelompok. Penambahan pegangan pada kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3) mampu meningkatkan aktivitas lokomotor akibat paparan logam berat Aluminium.

Berdasarkan gambar 5.2, analisis perbandingan lokomotor 4 dpf menunjukkan perbedaan yang signifikan antar semua kelompok dengan p value sebesar 0.000 ($P < 0.05$). Hal yang sama juga ditunjukkan pada lokomotor 5 dpf ($p = 0.048$) dan 6 dpf ($p = 0.000$). Sehingga dari hasil uji ANOVA dapat disimpulkan terdapat perbedaan yang signifikan lokomotor 4, 5 dan 6 dpf antar semua kelompok.

Data lokomotor 4 dpf kemudian diuji menggunakan Post Hoc LSD. Hasil Post Hoc LSD 5% menunjukkan lokomotor 4 dpf pada kelompok yang terpapar aluminium memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol (p

= 0.000). Adapun rerata lokomotor kelompok alumunium yaitu $4,40 \pm 4,16$ dibandingkan dengan kelompok kontrol yang memiliki rerata $24,60 \pm 3,44$.

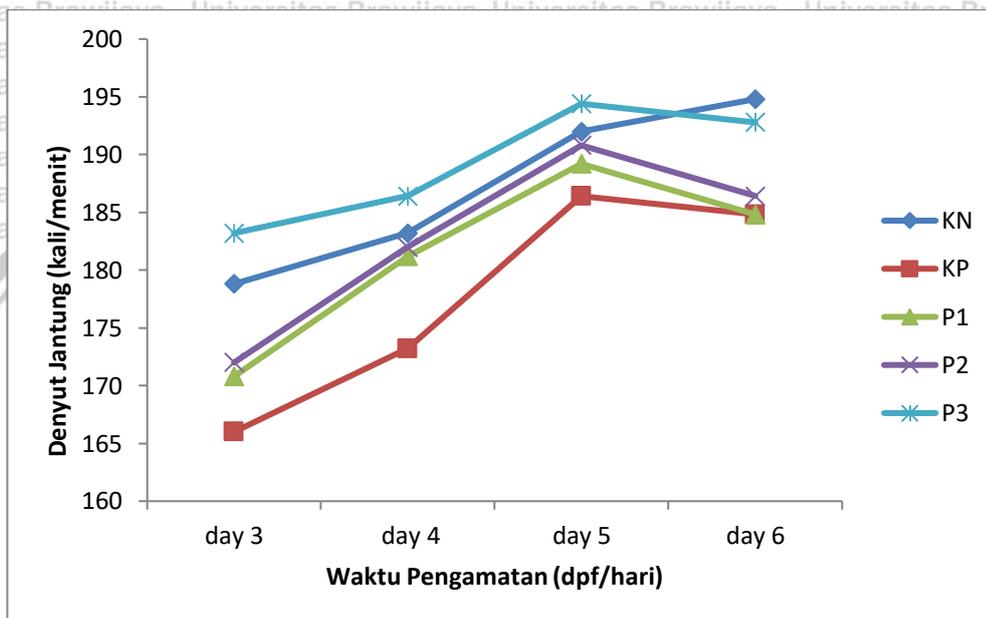
Kelompok kontrol juga berbeda secara signifikan dengan kelompok perlakuan 1 ($p = 0.000$) dan perlakuan 2 ($p = 0.004$). Kelompok perlakuan yang ditambahkan pegagan dengan konsentrasi paling tinggi yaitu P3 menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Secara berurutan, rerata lokomotor kelompok perlakuan meningkat mendekati kelompok kontrol seiring peningkatan konsentrasi pegagan. Adapun rerata kelompok P1 : $14,40 \pm 3,29$, P2 : $17,60 \pm 3,85$ dan P3 : 21 ± 2 .

Hasil uji Pos Hoc LSD 5% pada lokomotor 5 dpf masih menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok alumunium ($p=0.015$). Dari gambar 5.2 dapat diketahui paparan alumunium menyebabkan penurunan lokomotor dibandingkan kelompok kontrol. Sedangkan kelompok perlakuan, lokomotor meningkat mendekati normal. Hal ini juga diperkuat dengan hasil Pos Hoc LSD yang menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 ($p>0.05$).

Peningkatan lokomotor karena penambahan pegagan pada larva zebrafish yang dipapar alumunium juga terlihat pada lokomotor 6 dpf yang setara usia 2 tahun pada manusia. Hasil uji Post Hoc LSD menunjukkan kelompok alumunium memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Sama seperti 4 dan 5 dpf, kelompok yang dipapar alumunium menunjukkan penurunan lokomotor dibandingkan kelompok kontrol. Sedangkan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p>0.05$).

5.2 Pengaruh Pegagan terhadap Denyut Jantung Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium (Al)

Pengukuran denyut jantung larva zebrafish dilakukan selama 4 hari dimulai pada usia 3 dpf hingga 6 dpf. Perekaman dilakukan menggunakan mikroskop dan kamera optilab selama 15 detik. Kemudian dihitung jumlah denyut jantung selama 1 menit. Perkembangan jumlah denyut jantung antara kelompok kontrol, kelompok aluminium dan kelompok perlakuan dapat dilihat pada grafik 5.3.



Gambar 5.3 Grafik perkembangan denyut jantung larva zebrafish 3 – 6 dpf

Keterangan : Denyut jantung menunjukkan penurunan setelah dipapar aluminium ditunjukkan dengan rerata paling rendah dibandingkan kelompok lain. Kelompok perlakuan menunjukkan peningkatan denyut jantung mendekati kelompok kontrol.

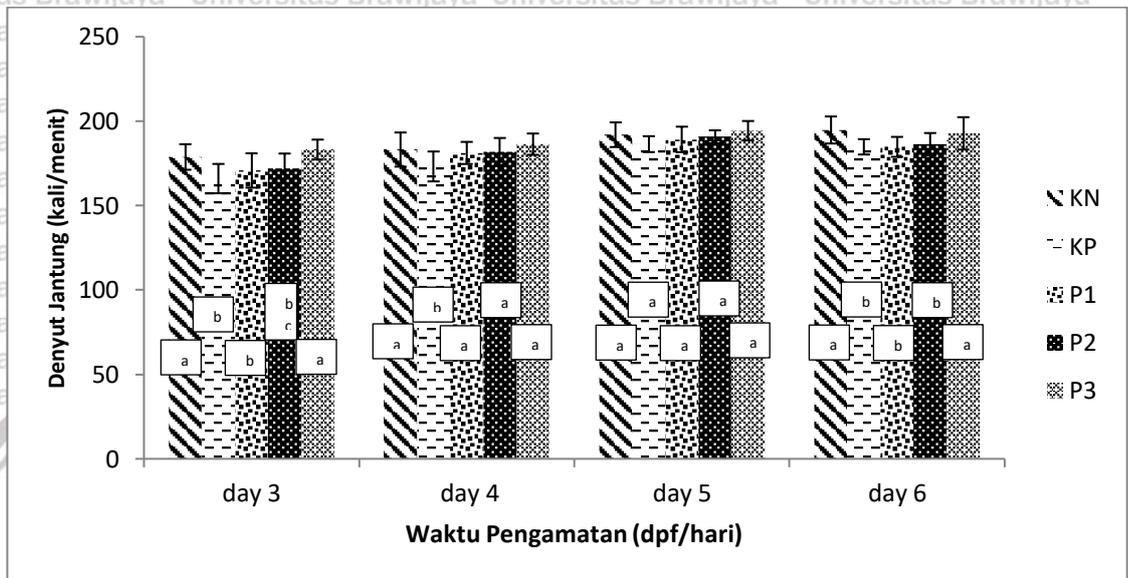
Berdasarkan gambar 5.1 dapat diketahui denyut jantung larva zebrafish pada semua kelompok mengalami peningkatan sejak 3 dpf hingga 5 dpf. Pada hari keenam kelompok perlakuan P1 dan P2 mendekati titik kelompok aluminium sedangkan kelompok perlakuan P3 mendekati titik kelompok kontrol.

Garis perkembangan denyut jantung kelompok aluminium merupakan garis yang paling rendah dibandingkan kelompok lain.

Hasil pengujian asumsi normalitas data menggunakan uji Shapiro-Wilk menunjukkan data denyut jantung 3, 4, 5 dan 6 dpf berdistribusi normal ($p > 0.05$).

Pengujian asumsi homogenitas menggunakan uji Levene didapatkan semua data homogen dengan p value > 0.05 .

Perbandingan rerata denyut jantung pada usia 3 dpf hingga 6 dpf dapat dilihat pada grafik 5.4 berikut.



Gambar 5.4 Grafik perbandingan denyut jantung larva zebrafish 3 – 6 dpf

Keterangan: Rerata denyut jantung larva zebrafish usia 3 dpf, 4 dpf dan 6 dpf memiliki perbedaan yang signifikan. Paparan aluminium menyebabkan penurunan denyut jantung dibandingkan kelompok kontrol. Penambahan pegagan pada kelompok perlakuan dapat memperbaiki penurunan denyut jantung yang diakibatkan paparan aluminium. Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan.

Hasil analisis ANOVA untuk membandingkan rerata denyut jantung antar kelompok usia 3 dpf menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol, aluminium, P1, P2, dan P3 dengan nilai $p = 0.000$ ($p < 0.05$). Uji Post Hoc LSD 5% menunjukkan perbedaan signifikan terjadi antara kelompok kontrol dengan kelompok aluminium dengan nilai $p = 0,001$. Dari grafik 5.4 dapat dilihat terjadi perbedaan yang signifikan dari rerata denyut jantung kelompok kontrol $178,8 \pm 7,5$ ke kelompok aluminium $166 \pm 8,7$. Perbedaan yang signifikan juga ditunjukkan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1 ($p = 0.038$).

Sedangkan antara kelompok kontrol dengan perlakuan 2 dan 3 tidak ada perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$). Kelompok aluminium menunjukkan

perbedaan yang signifikan jika dibandingkan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan P3 ($p < 0.05$).

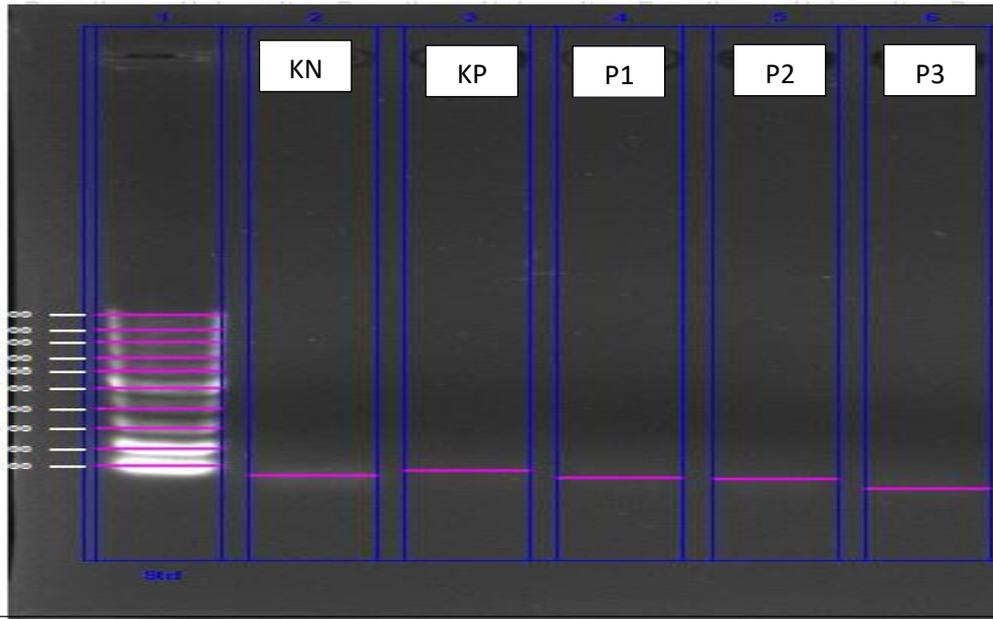
Analisis ANOVA juga dilakukan pada data lokomotor 4 dpf yang menunjukkan ada perbedaan signifikan antar semua kelompok dengan nilai p sebesar 0.012. Namun lokomotor 5 dpf menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok dengan nilai $p = 0.55$.

Grafik 5.4 menunjukkan penurunan rerata denyut jantung 6 dpf pada semua kelompok kecuali kelompok kontrol dibandingkan rerata denyut jantung 5 dpf.

Hasil uji ANOVA didapatkan nilai p sebesar 0.004 ($p < 0.05$) yang menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok pada 6 dpf. Kelompok P3 memiliki rerata yang paling mendekati rerata kelompok kontrol pada 6 dpf. Hal ini didukung oleh hasil Pos Hoc LSD yang menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 3.

5.3 Pengaruh Pegagan terhadap Ekspresi Tirosin Hidroksilase (TH) pada Larva Zebrafish yang Dipapar Alumunium (Al)

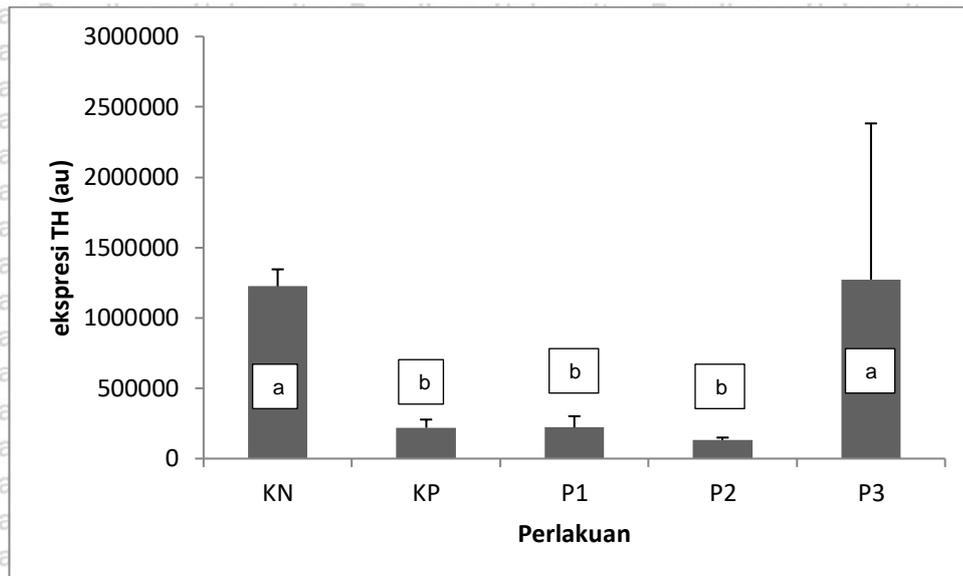
Ekspresi Tirosin Hidroksilase (TH) diukur saat usia larva 6 dpf menggunakan metode PCR. Hasil PCR kemudian di elektroforesis dan divisualisasikan menggunakan gel doc. Adapun hasil visualisasi ekspresi TH dapat dilihat pada gambar 5.5 berikut.



Gambar 5.5 Ekspresi TH pada larva zebrafish 6 dpf

Keterangan : Kelompok KN menunjukkan density band yang paling terang, sedangkan yang paling samar adalah kelompok KP. Ekspresi TH direplikasi 3 kali untuk kemudian diuji secara statistik.

Hasil uji Shapiro-wilk menunjukkan data ekspresi Tirosin Hidroksilase normal pada semua kelompok berdistribusi normal ($p > 0.05$). Sedangkan uji levene untuk menguji homogenitas menunjukkan data homogen ($p = 0.054$). Adapun rerata *density band* ekspresi TH dapat dilihat pada gambar 5.5.



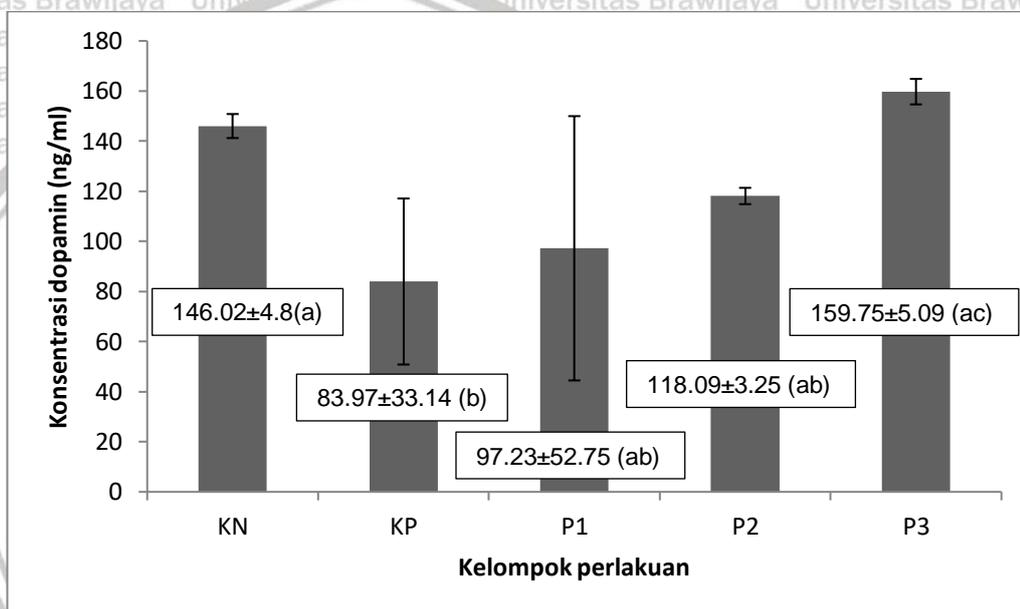
Gambar 5.6 Rerata Ekspresi TH Larva Zebrafish 6 dpf Kelompok Kontrol, Kontrol Positif Aluminium, dan Kelompok Perlakuan Pegagan

Keterangan: Rerata ekspresi TH larva zebrafish usia 6 dpf memiliki perbedaan yang signifikan antar kelompok dengan nilai $p = 0,034$. Paparan aluminium secara signifikan menurunkan ekspresi TH dibandingkan kelompok kontrol. Penambahan pegagan pada kelompok perlakuan dapat meningkatkan ekspresi TH sehingga mendekati kelompok kontrol. Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

Hasil uji Anova menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok dengan nilai p sebesar $0,034$ ($p < 0,05$). Berdasarkan hasil uji LSD 5%, kelompok yang dipapar aluminium menunjukkan penurunan yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol ($p = 0,034$). Pemberian pegagan pada konsentrasi $1,25 \mu\text{g/ml}$ dan $2,5 \mu\text{g/ml}$ tidak menunjukkan perubahan ekspresi TH. Hal ini didukung dengan hasil Pos Hoc LSD 5% yang menunjukkan ekspresi TH pada kelompok aluminium tidak berbeda signifikan dengan kelompok P1 dan P2. Berdasarkan gambar 5.5 dapat dilihat kelompok P3 menyebabkan peningkatan ekspresi TH yang paling mendekati kelompok kontrol. Hal ini didukung dengan hasil Pos Hoc LSD yang menghasilkan nilai $p = 0,909$ ($p > 0,05$) antara kelompok P3 dengan kelompok kontrol yang artinya tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan P3.

5.4 Pengaruh Pegagan terhadap Kadar Dopamin (DA) pada Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium (Al)

Hasil uji Shapiro-Wilk untuk melihat distribusi data kadar dopamin 6 dpf didapatkan nilai $p > 0.05$ pada semua kelompok. Sehingga dapat disimpulkan data dopamin berdistribusi normal. Sedangkan uji homogenitas menggunakan uji Levene yang menghasilkan p value sebesar 0.70 ($p > 0.05$). Hal ini menunjukkan data homogen. Adapun rerata kadar dopamin larva zebrafish 6 dpf dapat dilihat pada gambar 5.7.



Gambar 5.7 Rerata kadar dopamin larva zebrafish 6 dpf

Keterangan: Rerata kadar dopamin larva zebrafish usia 6 dpf memiliki perbedaan yang signifikan antar kelompok dengan nilai $p = 0,037$. Penambahan pegagan pada kelompok perlakuan dapat meningkatkan kadar dopamin sehingga mendekati kelompok kontrol. Huruf berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Hasil uji Anova didapatkan nilai p sebesar 0,037 ($p < 0,05$), hal ini menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok. Berdasarkan hasil uji LSD 5%, kelompok yang dipapar aluminium menunjukkan penurunan yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol ($p=0.022$). Pemberian pegagan secara berturut-turut dapat meningkatkan kadar dopamin pada larva zebrafish.

Perlakuan 3 yang diberikan konsentrasi pegagan paling tinggi menunjukkan perbedaan signifikan terhadap kelompok alumunium. Berdasarkan gambar 5.5 dapat dilihat kelompok P3 meningkatkan kadar dopamin akibat paparan alumunium.

5.5 Hasil Uji Korelasi

Analisis untuk menguji hubungan antar variabel dilakukan dengan menggunakan uji korelasi Pearson jika data berdistribusi normal. Jika data tidak bersidtribusi normal maka digunakan uji korelasi Spearman. Berdasarkan hasil analisis, didapatkan hasil uji korelasi sebagai berikut :

Tabel 5.2 Rekapitulasi hasil uji korelasi ekstrak pegagan, denyut jantung, lokomotor, ekspresi Th dan kadar dopamin

Hubungan	Uji Korelasi	P-value	Koefisien Korelasi		
			Nilai	Interpretasi	
Ekstrak Pegagan	Lokomotor	Spearman	0.869	Sangat Kuat	
	Denyut Jantung	Spearman	0.345	Lemah	
	Ekspresi TH	Spearman	0.738	Kuat	
Kadar Dopamin	Spearman	0.003	0.777	Kuat	
		0.001	0.811	Sangat Kuat	
Tirosin Hidroksilase	Dopamin	Spearman	0.811	Sangat Kuat	
Dopamin	Lokomotor	Pearson	0.024	0.643	Kuat
	Denyut Jantung	Pearson	0.263		Tidak Signifikan

Keterangan : Nilai p kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) menunjukkan terdapat hubungan yang signifikan. Nilai positif pada koefisien korelasi menunjukkan arah korelasi. Nilai koefisien korelasi menunjukkan kekuatan korelasi (0.00 – 0.199 sangat lemah, 0.20 – 3.99 Lemah, 0.40 – 5.99 Sedang, 0.60 – 0.799 Kuat dan 0.80 – 1.00 Sangat kuat)

Secara umum dari tabel 5.1 dapat diketahui bahwa semua hubungan antar parameter memiliki nilai $p < 0.05$ yang berarti memiliki hubungan yang signifikan, kecuali hubungan antara parameter Dopamin dengan denyut jantung. Hubungan

dopamin dan denyut jantung diuji menggunakan uji korelasi Pearson karena data berdistribusi normal. Adapun nilai p yang dihasilkan yaitu 0.263 ($p > 0.05$). Hal ini bermakna bahwa dopamin tidak memiliki hubungan yang signifikan dengan frekuensi denyut jantung larva zebrafish 6 dpf.

Koefisien korelasi yang menunjukkan hubungan sangat kuat adalah hubungan antara pemberian pegagan dengan lokomotor dan hubungan ekspresi TH dengan dopamin. Sedangkan korelasi antara pemberian ekstrak pegagan dengan TH dan kadar dopamin signifikan dan menunjukkan hubungan yang kuat dilihat dari nilai koefisien korelasinya. Arah korelasi positif yang bermakna semakin tinggi konsentrasi ekstrak pegagan yang diberikan maka akan semakin tinggi ekspresi TH, kadar dopamin dan lokomotor. Pemberian ekstrak pegagan juga memiliki hubungan yang signifikan dengan frekuensi denyut jantung. Adapun nilai koefisien korelasinya yaitu 0.345 yang bermakna hubungannya lemah. Arah korelasi positif menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak pegagan dapat meningkatkan denyut jantung yang menurun akibat paparan aluminium.

Kadar dopamin juga menunjukkan memiliki hubungan yang signifikan dengan lokomotor ($p = 0.024$). Koefisien korelasi yang dihasilkan menunjukkan hubungan antara dopamin dan lokomotor kuat. Tanda positif menunjukkan arah korelasi yang bermakna semakin tinggi kadar dopamin maka akan semakin meningkat lokomotor.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Pegangan terhadap Lokomotor Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium (Al)

Lokomotor pada dasarnya membutuhkan pembentukan dan pengendalian kekuatan fisik. Kedua hal itu tidak hanya melibatkan otot dan biomekanik tetapi juga *adaptive control* yang bergantung pada fungsi fisiologis di setiap tahap perkembangan (Adolph dan Franchak, 2018). Adapun lokomotor melibatkan struktur dan fungsi organ otot, otak, syaraf dan tulang yang membentuk rangka.

Sehingga dapat disimpulkan penurunan lokomotor disebabkan gangguan pada organ-organ tersebut yang merupakan hasil dari proses proliferasi, diferensiasi dan organogenesis pada masa awal kehidupan.

Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan efek aluminium terhadap organ-organ yang berperan pada lokomotor larva zebrafish. Supriyadi (2019) menunjukkan paparan logam berat aluminium menyebabkan perubahan struktur larva zebrafish melalui gangguan panjang badan zebrafish 5 dpf dan 6 dpf.

Selain itu terjadi penurunan osifikasi tulang pada larva zebrafish 9 dpf (Febriyanti Supriyadi *et al.*, 2019).

Fungsi motorik yang sempurna pada otot rangka memerlukan kerjasama antara sistem piramidal dan ekstrapiramidal. Sistem ekstrapiramidal mengantarkan impuls yang menimbulkan perubahan koordinasi otonom pada tonus dan gerakan otot skeletal pada gerakan motorik kasar serta pada postur tubuh yang sesuai untuk menghasilkan gerak halus. Asetilkolin merupakan neurotransmitter yang berperan dalam menyampaikan impuls pada sel otot skeletal sehingga dihasilkan gerakan motorik bertujuan (Ariani, 2012).

Neurotransmitter selalu dalam keadaan seimbang. Jika ada gangguan dalam pembentukan atau kerusakan salah satu neurotransmitter maka akan muncul

manifestasi klinis (Ariani, 2012). Keseimbangan antara dopamin dan asetilkolin diperlukan untuk menghasilkan gerak yang normal. Pada penelitian ini aluminium secara signifikan menyebabkan penurunan dopamin yang akan dibahas pada sub bab selanjutnya.

Pengamatan lokomotor pada zebrafish pada penelitian ini dimulai pada saat larva berusia 4 dpf. Karena pada saat ini terjadi peralihan perkembangan pola lokomotor dari gerakan refleks menjadi gerakan lokomotor. Hal ini ditandai dengan munculnya kemampuan larva untuk berenang bebas dan mengubah secara spontan arah berenangnya (Granato *et al.*, 1996). Pada usia ini juga terjadi peningkatan gerakan yang disebabkan adanya insting mencari makan (Lambert *et al.*, 2012). Pengukuran dilakukan hingga usia larva 6 dpf yang analog dengan usia 2 tahun pada manusia (Primihastuti, 2017).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan lokomotor 4 dpf, 5 dpf, dan 6 dpf antar semua kelompok. Secara berturut-turut dari usia 4 dpf hingga 6 dpf, penambahan aluminium 50 μM menyebabkan penurunan lokomotor. Konsentrasi aluminium yang digunakan tersebut setara 0,03 ppm, dimana batas ambang aluminium berdasarkan rekomendasi WHO untuk air minum adalah 0,1 – 0,2 ppm (Guidelines dan Quality, 2010). Hal ini menunjukkan paparan aluminium di bawah ambang batas sudah dapat menyebabkan perubahan *behavior* pada zebrafish.

Penurunan lokomotor akibat paparan aluminium sejalan dengan penelitian Senger (2011) yang juga menunjukkan gangguan aktivitas lokomotor dilihat dari penurunan jumlah lintasan, jarak tempuh dan kecepatan gerak zebrafish.

Perubahan behavior ini akan berpengaruh terhadap kelangsung hidup zebrafish ketika dewasa karena aktivitas lokomotor berperan penting ketika mencari makan, menghindari musuh, bereproduksi dan migrasi (Senger *et al.*, 2011).

Pemberian *Centella asiatica* dengan konsentrasi bertingkat 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml dan 5 µg/ml dapat memperbaiki penurunan lokomotor dibandingkan kelompok aluminium. Adapun pemberian dilakukan dimulai blastula dini hingga hatching (0 – 3 dpf). Hasil korelasi menunjukkan hubungan yang kuat dan positif yang menunjukkan semakin besar konsentrasi peganan yang diberikan maka akan semakin tinggi lokomotor. Hasil penelitian ini juga sejalan dengan penelitian Hanum (2016) yang membandingkan 3 konsentrasi *Centella asiatica* yaitu 2,5 µg/ml, 5 µg/ml dan 10 µg/ml. Adapun penelitian tersebut menunjukkan pemberian *Centella asiatica* dapat memperbaiki lokomotor dengan konsentrasi paling efektif 5 µg/ml.

Centella asiatica memiliki kandungan flavonoid yang berperan penting sebagai antioksidan dan aktivitas chelating (Chandrika dan Prasad Kumara, 2015). Salah satu flavonoid yang penting dalam membersihkan aluminium adalah quercetin. Quercetin sebagai ligand aktif secara biologis dapat menjadi chelator dan berperan sebagai penetral pada keracunan logam berat. Ikatan quercetin dengan aluminium (III) dapat mengurangi kelebihan aluminium dari asupan makanan (Symonowicz dan Kolanek, 2012). Sehingga *Centella asiatica* mampu mencegah kerusakan akibat paparan aluminium. Selain itu kandungan nutrisi seperti makronutrien, miktonutrien dan fitonutrien dibutuhkan pada awal perkembangan untuk menghasilkan lokomotor yang normal (Chandrika dan Prasad Kumara, 2015).

6.2 Pengaruh Peganan terhadap Frekuensi Denyut Jantung Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium (Al)

Sistem kardiovaskular merupakan sistem organ pertama yang terbentuk dan berfungsi pada embrio yang sedang berkembang. Selama proses perkembangan, jantung harus mempertahankan kontraksi ritmis melalui aktivasi miokardium yang terkoordinasi. Faktor-faktor yang berperan dalam sistem ini

antara lain sinoatrial (SA) node, atrioventrikular (AV) node, dan pathway konduksi ventrikular (VCP). Pada zebrafish progenitor jantung mulai terbentuk pada 5 hour post fertilization (hpf) kemudian diikuti dengan proses pembentukan katup pada 48 hpf. Di sisi lain, progenitor jantung manusia mulai terbentuk 15 sampai 16 hari di dalam kandungan dan proses pembentukan sekat dan katup dimulai pada hari ke 28 (Boullin dan Morgan, 2005). Perkembangan jantung merupakan proses sensitif yang dapat dipengaruhi oleh paparan molekul toksik selama perkembangan embrionik (Sarmah dan Marrs, 2016).

Denyut jantung dapat diukur dari awal perkembangan (saat jantung pertama kali berdenyut) melalui tahapan embrionik dan janin hingga persalinan dan kelahiran. Pemeriksaan denyut jantung pada awal perkembangan penting dilakukan untuk menilai kondisi perkembangan fungsi jantung sebagai organ vital embrio agar tindakan pencegahan dini dapat diupayakan (Oztekin *et al.*, 2009). Pada janin yang sehat, terjadi peningkatan denyut jantung dari 110 bpm (beat/menit) menjadi 170 bpm pada minggu ke-9 kehamilan (Valenti *et al.*, 2011). Kemudian terjadi penurunan menjadi 150 bpm pada usia kehamilan 13 minggu. Peningkatan awal denyut jantung bertepatan dengan perkembangan morfologis jantung dan penurunan selanjutnya bertepatan dengan pematangan fungsional sistem saraf parasimpatis (Valenti *et al.*, 2011).

Secara anatomi jantung zebrafish berbeda dengan jantung manusia. Jantung manusia terdiri dari 4 ruang yang terpisah oleh sekat dan katup. Sedangkan jantung zebrafish terdiri dari satu atrium dan satu ventrikel yang dipisahkan oleh katup atrioventrikuler. Namun, diluar perbedaan anatomi tersebut, zebrafish memiliki mekanisme seluler dan molekuler dari perkembangan jantung yang sangat mirip dengan manusia (Sarmah dan Marrs, 2016). Selain itu, denyut jantung embrionik normal zebrafish sangat mirip dengan manusia, yaitu pada 120-180 bpm (De Luca *et al.*, 2014). Jumlah ini sangat berbeda pada model

hewan lain seperti tikus yang memiliki denyut jantung 300 bpm (Sarmah dan Marrs, 2016).

Hasil penelitian ini menunjukkan perbedaan yang signifikan denyut jantung 3 dpf, 4 dpf, dan 6 dpf antar semua kelompok. Secara umum dapat disimpulkan denyut jantung usia 3 dpf hingga 6 dpf pada zebrafish menurun akibat paparan alumunium yang diberikan pada 2 hpf – 3 dpf. Pada usia 3 dpf denyut jantung menurun dari 179 bpm pada kelompok kontrol menjadi 166 bpm pada kelompok paparan. Hal ini juga ditunjukkan pada hari keenam yaitu 194 bpm pada kelompok kontrol menurun menjadi 185 bpm pada kelompok alumunium.

Temuan pada penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh Monaco (2017) yang fokus pada toksisitas jantung akibat paparan alumunium.

Penelitian tersebut menunjukkan penurunan denyut jantung yang signifikan dan terjadinya pericardial oedema. Pengamatan dilakukan satu kali yaitu setelah paparan alumunium selama 48 jam. Monaco (2017) menyatakan bahwa toksisitas jantung akibat alumunium masih belum banyak diteliti.

Stimulus kontraksi jantung dapat berasal dari dalam jantung atau dari luar jantung. Salah satu stimulus dari luar jantung dapat berupa rangsangan saraf.

Persarafan jantung dipengaruhi baik oleh saraf simpatis maupun parasimpatis dari sistem saraf otonom. Saraf parasimpatis menyebabkan penurunan denyut jantung, sedangkan simpatis meningkatkan denyut jantung dan kekuatan kontraksi otot jantung. Mekanisme ini melibatkan dua reseptor α -adrenergic dan β -adrenergic. Aksi reseptor β -adrenergic berhubungan dengan saraf simpatis menyebabkan stimulasi jantung (Sved, 2009).

Jantung memiliki reseptor β_1 and β_2 adrenergic, walaupun reseptor yang dominan baik dari segi jumlah maupun fungsi adalah β_1 adrenergic. Reseptor ini akan berikatan dengan norepinefrin dan epinefrin yang beredar di darah. Reseptor β -adrenergic kemudian akan berikatan dengan Gs-Protein yang akan mengaktifkan

adenylyl cyclase untuk membentuk cAMP-dependent protein kinase (PK-A) yang memfosforilasi L-type calcium channel. Hal ini menyebabkan kalsium yang masuk ke dalam sel meningkat. Peningkatan kalsium yang masuk ke dalam sel selama aksi potensial menyebabkan pengeluaran kalsium dari sarcoplasmic retikulum yang ada di jantung. Aksi ini meningkatkan inotropy (kontraktilitas) (Klabunde, 2011).

Dopamin merupakan β -adrenoceptor agonis dan prekursor norepinefrin. Pada sel yang mengandung norepinefrin, dopamin akan dihidroksilasi oleh dopamin- β -hidroksilase untuk mensintesis norepinefrin. Di dalam adrenal medulla, norepinefrin kemudian diubah menjadi epinefrin. Sehingga dapat disimpulkan dopamin mempengaruhi denyut jantung secara tidak langsung melalui sintesis norepinefrin dan secara langsung sebagai β agonis (Lei, 2014).

Penurunan denyut jantung akibat paparan aluminium dapat disebabkan oleh penurunan dopamin yang signifikan pada penelitian ini dan akan dijelaskan pada sub bab selanjutnya. Mekanisme lain yaitu melalui gangguan homeostasis kalsium yang merupakan 1 dari 3 ion penting untuk kontraksi jantung. Al^{3+} bersaing secara langsung dengan Ca^{2+} pada channel Ca^{2+} di membran sel dan molekul dalam matriks sitoplasma (Walton, 2012).

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok perlakuan dengan tambahan pegagan dibandingkan kelompok aluminium. Secara konsisten pemberian pegagan mulai 3 dpf hingga 6 dpf memperbaiki penurunan denyut jantung akibat paparan aluminium. Korelasi antara pemberian ekstrak pegagan dengan denyut jantung menunjukkan hubungan yang lemah dan positif. Arah korelasi positif menunjukkan semakin besar konsentrasi pegagan yang diberikan maka akan semakin meningkat denyut jantung mendekati normal. Hal ini sesuai dengan penelitian Jamil (2007)

yang menunjukkan pegagan memiliki efek kardioprotektif melalui aktivitas antioksidan pada kerusakan jantung tikus yang dipapar adriamycin.

6.3 Pengaruh Pegagan terhadap Ekspresi TH Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium (Al)

Tirosin hidroksilase (TH) merupakan enzim pertama dalam sintesis dopamin yang mengubah tirosin menjadi L-DOPA (Erazi *et al.*, 2011). Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai biokatalisator yaitu mempercepat laju suatu reaksi kimia tanpa terlibat dalam reaksi tersebut. Komponen utama penyusun enzim adalah protein. Namun beberapa enzim, salah satunya TH terdiri dari protein yang mengikat besi.

Aluminium dapat masuk ke dalam tubuh melalui setiap permukaan eksternal tubuh terutama kulit, hidung, paru-paru dan saluran pencernaan. Darah merupakan jaringan distribusi utama untuk aluminium secara sistemik. Di dalam darah, aluminium berikatan dengan serum dan sel darah. Di serum, aluminium berikatan dengan transferrin sedangkan sitrat dan fosfat mendistribusikan aluminium dari darah ke jaringan (Exley, 2013). Ikatan aluminium dengan transferrin dapat mengganggu penyerapan besi, dimana besi merupakan salah satu logam yang berperan dalam pembentukan enzim tirosin hidroksilase (TH) (VanDuyn *et al.*, 2013). Aluminium juga menghambat sintesis ko-enzim TH lainnya yaitu BH₄. Gangguan pada kofaktor pembentukan enzim TH dapat mengganggu proses pembentukannya. Hal ini menjelaskan hasil penelitian yang menunjukkan perbedaan signifikan ekspresi TH pada semua kelompok ($p < 0.05$). Paparan aluminium secara signifikan menurunkan ekspresi TH dengan nilai $p = 0.032$.

Paparan Al terhadap sel dapat meningkatkan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) dengan cara mengganggu langsung fungsi mitokondria (VanDuyn *et al.*, 2013). Selain itu aluminium juga memiliki afinitas tinggi terhadap

superoksida yang dapat meningkatkan stress oksidatif melalui reaksi Fenton (Mujika *et al.*, 2018). Tingginya kadar ROS dapat menyebabkan proksidasi lipid yaitu dekomposisi H_2O_2 dan homolisis hidroperoksida endogen secara langsung (Pavandi *et al.*, 2014). Proses ini dapat menyebabkan kerusakan DNA. Peningkatan ROS akibat paparan Alumunium juga dapat mengganggu langsung ikatan enzim tersebut (Haavik dan Toska, 1998).

Pemberian ekstrak *Centella asiatica* meningkatkan ekspresi TH secara konsisten seiring peningkatan konsentrasi yang diberikan. Kelompok perlakuan 1 belum menunjukkan peningkatan yang signifikan dibandingkan kelompok alumunium. Namun pada perlakuan 2 dan 3 sudah menunjukkan peningkatan yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Kemudian dari P2 dan P3 yang paling mendekati normal adalah P3 didukung uji Pos Hoc LSD yang menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antara P3 dengan kelompok kontrol. Korelasi antara pemberian pegagan dan ekspresi TH menunjukkan hubungan yang sangat kuat dan positif sehingga semakin besar konsentrasi pegagan yang diberikan maka akan semakin tinggi ekspresi TH.

Aktivitas antioksidan tinggi yang dimiliki *Centella asiatica* dapat mengangkut radikal bebas hasil paparan alumunium sehingga dapat melindungi sel dari kerusakan akibat ROS (Chandrika dan Prasad Kumara, 2015; Mijanur *et al.*, 2013). Pada akhirnya sel akan terlindung dari peroksidasi lipid dan kerusakan DNA. Hal ini juga sejalan dengan penelitian Hanum (2016) yang menunjukkan terdapat hubungan yang signifikan antara TH dan konsentrasi pegagan. Semakin tinggi dosis pegagan maka akan diikuti dengan peningkatan ekspresi TH. Demikian sebaliknya, semakin rendah konsentrasi pegagan maka akan diikuti ekspresi TH yang lebih rendah.

6.4 Pengaruh Pegagan terhadap Kadar Dopamin Larva Zebrafish yang Dipapar Aluminium (Al)

Dopamin merupakan neurotransmitter utama dalam sistem ekstrapiramidal otak dan penting dalam mengatur gerakan (PubChem, 2018). Dopamin memiliki peran kunci dalam kontrol gerak, belajar, memori kerja, kognisi, dan emosi (Drożak *et al.*, 2005). Dopamin dibentuk dari asam amino tirosin dengan bantuan tirosin hidroksilase (Ayano, 2016). Sehingga gangguan pada ekspresi TH dapat mengganggu sintesis dopamin.

Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan kadar dopamin yang signifikan antar semua kelompok pada larva zebrafish 6 dpf ($p = 0.037$). Paparan aluminium menurunkan kadar dopamin dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini dapat disebabkan karena paparan aluminium menyebabkan gangguan ekspresi TH. Mekanisme lain gangguan dopamin terhadap kadar dopamin juga dari penghambatan masuknya kalsium ke sinaptosom. Hambatan ini mengakibatkan hambatan pelepasan dopamin karena kalsium merupakan messenger sekunder dalam pelepasan dopamin (Pavandi *et al.*, 2014).

Pemberian ekstrak etanol pegagan dengan konsentrasi 1,25 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ dan 5 $\mu\text{g/ml}$ secara signifikan tidak memiliki perbedaan dibandingkan kelompok kontrol. Korelasi antara pemberian ekstrak pegagan dengan kadar dopamin juga menunjukkan hubungan yang kuat dan positif. Peningkatan kadar dopamin konsisten meningkat seiring dengan penambahan konsentrasi pegagan pada kelompok perlakuan. Hal ini sesuai penelitian Khotimah (Khotimah, Sumitro, *et al.*, 2018) yang menunjukkan penambahan ekstrak pegagan pada zebrafish yang dipapar rothenon dapat meningkatkan kadar dopamin dengan konsentrasi optimal 10 $\mu\text{g/L}$.

6.5 Hubungan Lokomotor, Frekuensi Denyut Jantung, Ekspresi TH dan Kadar Dopamin

Hasil uji korelasi ekspresi TH dan kadar dopamin menunjukkan ada hubungan yang signifikan. Arah korelasi positif dengan koefisien korelasi 0.811 yang menunjukkan hubungan yang sangat kuat. Semakin tinggi ekspresi TH maka akan semakin tinggi kadar dopamin. Enzim TH berperan dalam sintesis dopamin, yaitu mengkatalisasi asam amino L-tyrosin menjadi L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA).

Hasil uji korelasi dopamin dan lokomotor menunjukkan ada hubungan yang signifikan. Arah korelasi positif dengan nilai koefisien korelasi 0,643 yang menunjukkan hubungan yang kuat antara dua variabel tersebut. Hal ini sesuai dengan penelitian Vidal-Gadea (2012) yang menunjukkan kekurangan neurotransmitter dopamin pada zebrafish dapat mengganggu lokomotor. Selain itu penelitian Khotimah (2018) juga menunjukkan hasil yang sejalan yaitu peningkatan dopamin menyebabkan peningkatan lokomotor dan sebaliknya. Dopamin merupakan neurotransmitter yang memberikan efek luas pada neuronal. Dalam sistem saraf pusat, dopamin akan berikatan dengan membran spesifik di neuron dan bertanggung jawab dalam kontrol gerak (Drożak *et al.*, 2005).

Dopamin bekerja dengan mengaktifkan reseptor D1. Reseptor D1 kemudian berpasangan dengan protein G_s dan menstimulasi aktivitas adenyl cyclase (AC). Pengaktifan AC kemudian akan meningkatkan produksi cyclic cAMP dan meningkatkan aktivitas protein kinase A (PK-A). Rangkaian mekanisme inilah yang kemudian menghasilkan aktivitas lokomotor pada organisme.

Selain memberikan efek terhadap lokomotor, dopamin juga mempengaruhi denyut jantung. Dopamin merupakan prekursor norepinefrin dengan bantuan enzim dopamin hidroksilase. Selain itu dopamin menghasilkan efek *chronotropic*

dan *inotropic* positif pada miokardium sehingga terjadi peningkatan denyut jantung. Namun, hasil uji korelasi dopamin dan denyut jantung menunjukkan tidak ada hubungan yang signifikan antara dopamin dan denyut jantung (Harris dan Van Petten, 1978). Hal ini dikarenakan kontraksi ritmis denyut jantung dipengaruhi banyak faktor antara lain sinoatrial (SA) node, atrioventrikular (AV) node, dan pathway konduksi ventrikular (VCP) (Boullin dan Morgan, 2005). Sehingga dapat disimpulkan dopamin merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi tetapi tidak cukup signifikan berhubungan dengan denyut jantung disebabkan faktor lain yang mempengaruhinya.

6.6 Implikasi Hasil Penelitian dalam Asuhan Kebidanan

Anak memiliki ciri khas yaitu selalu tumbuh dan berkembang sejak saat konsepsi sampai berakhir masa remaja. Tumbuh kembang anak berlangsung secara teratur, saling berkaitan, dan berkesinambungan (IDAI, 2002). Apabila dihitung sejak hari pertama konsepsi, kelahiran bayi sampai anak usia 2 tahun, maka periode ini disebut 1000 hari pertama kehidupan manusia. Karena menentukan kualitas kehidupan, maka sering juga disebut periode emas atau periode kritis (Bapennas, 2013).

Pada masa pranatal, janin akan tumbuh dan berkembang melalui penambahan berat dan panjang badan, perkembangan otak serta organ-organ lainnya seperti jantung, hati, dan ginjal. Janin mempunyai plastisitas yang tinggi yaitu kemampuan menyesuaikan diri terhadap perubahan lingkungan. Hal ini dapat bersifat menguntungkan maupun merugikan karena jika terjadi perubahan, maka akan sulit kembali ke keadaan semula (Bapennas, 2013).

Aluminium sebagai unsur terbanyak ketiga di kerak bumi memiliki paparan luas dari lingkungan, bahan makanan dan air minum (Klotz *et al.*, 2017). Paparan terjadi secara oral, inhalasi, dermal dan parenteral pada semua orang termasuk ibu hamil dan anak-anak (ATSDR, 2008). Periode kritis perkembangan

yaitu 1000 HPK sensitif terhadap efek paparan aluminium yang termasuk logam berat. Meskipun selama masa pranatal plasenta menjadi barrier untuk mencegah masuknya *toxic*, aluminium tetap dapat melintasinya (Wai *et al.*, 2017). Al terus masuk ke tubuh bayi melalui ASI dan susu formula dan mengganggu masa perkembangan di periode kritis (Röllin *et al.*, 2018).

Bidan memiliki peranan penting bagi perempuan pada masa kehamilan, persalinan serta pada masa bayi baru lahir dan anak-anak. Pelayanan bidan dinilai masyarakat sebagai sesuatu yang bermanfaat dengan pendekatan yang holistik. Pada 1000 HPK, bidan tidak hanya melakukan asuhan pemantauan tumbuh kembang janin dan anak, tetapi juga meningkatkan pengetahuan ibu dan keluarga untuk pencegahan kelainan tumbuh kembang sedini mungkin (Riyanti, 2019).

Gangguan pertumbuhan dan perkembangan tidak hanya terjadi setelah ada perubahan fenotip, tetapi sebelum itu telah terjadi perubahan molekuler. Pencegahan sebelum terjadi perubahan fenotip diharapkan dapat mencegah gangguan jangka panjang pada masa yang akan datang. Bidan berperan dalam pelayanan kesehatan preventif dan promotif melalui pemberdayaan masyarakat.

Pegagan merupakan tanaman asli negara-negara tropis seperti Indonesia (Chandrika dan Prasad Kumara, 2015). Masyarakat mengonsumsi pegagan dengan cara dilalap, disayur atau diolah dengan berbagai cara lainnya. Telah ada beberapa penelitian yang menunjukkan keistimewaan pegagan pada 1000 HPK seperti penelitian Khotimah (2018) sebelumnya untuk pencegahan kelainan pertumbuhan. Karena pegagan dikonsumsi oleh masyarakat, bidan perlu memberdayakan masyarakat melalui peningkatan pengetahuan mengenai manfaat pegagan dan budi daya pegagan di rumah. Selain itu, pegagan perlu dikemas dengan baik agar dapat dikonsumsi secara luas. Untuk itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan dosis dan keamanannya.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah penurunan lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar aluminium (Al).
2. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah penurunan frekuensi denyut jantung pada larva zebrafish yang dipapar aluminium (Al).
3. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah penurunan ekspresi tirosin hidroksilase (TH) pada larva zebrafish yang dipapar aluminium.
4. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah penurunan kadar dopamin (DA) pada larva zebrafish yang dipapar aluminium.
5. Terdapat hubungan yang kuat dan positif antara ekspresi TH dengan kadar dopamin pada larva zebrafish yang dipapar aluminium.
6. Terdapat hubungan yang kuat dan positif antara kadar dopamin dengan lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar aluminium.
7. Tidak terdapat hubungan signifikan antara kadar dopamin dengan denyut jantung pada larva zebrafish yang dipapar aluminium.

7.2 Saran

1. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mendalami efek toksisitas aluminium pada tingkat DNA agar toksisitas dapat dicegah sedini mungkin.
2. Nilai ambang batas aluminium perlu diturunkan karena paparan 0,3 kali dari nilai ambang batas WHO pada fase proliferasi sudah dapat menyebabkan gangguan.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut konsentrasi ekstrak pegagan yang optimal jika paparan aluminium tidak hanya selama masa embrionik, tetapi berlanjut sampai masa anak-anak.

DAFTAR PUSTAKA

- Adolph, K.E. dan Franchak, J.M., 2018. The development of motor behavior. , hal.1–30.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2008. *Toxicological Profile for Aluminum*,
- Ahmad Rather, M. et al., 2018. Neuroprotective role of Asiatic acid in aluminium chloride induced rat model of Alzheimer's disease. *Front Biosci (Schol Ed)*, 10, hal.262–275.
- Anandhan, R., Hemalatha, S., Kavitha, V. dan Bhuyan, G., 2013. I NTERNATIONAL J OURNAL OF P HARMACY & L IFE S CIENCES Effect of aluminium on development of Zebrafish , *Brachydanio.* , 4(4), hal.2541–2547.
- Ariani, T.A., 2012. Sistem Neurobehaviour. Salemba Medika : Jakarta
- Avdesh, A. et al., 2012. Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (&em>Danio rerio) Laboratory: An Introduction. *Journal of Visualized Experiments*, (69). Available at: <http://www.jove.com/video/4196/regular-care-maintenance-zebrafish-danio-rerio-laboratory-an>.
- Ayano, G., 2016. Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *Journal of Mental Disorders and Treatment*, 2(2), hal.2–5. Available at: <https://www.omicsgroup.org/journals/dopamine-receptors-functions-synthesis-pathways-locations-andmental-disorders-review-of-literatures-2471-271X-1000120.php?aid=78997>.
- Bapennas, 2013. Kerangka Kebijakan (Gerakan 1000 HPK). In: Republik Indonesia, hal. 9–10.
- Bondy, S.C., 2014. Prolonged exposure to low levels of aluminum leads to changes associated with brain aging and neurodegeneration. *Toxicology*, 315(1), hal.1–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2013.10.008>.
- Boullin, J. dan Morgan, J.M., 2005. The development of cardiac rhythm. , hal.874–875.
- Bylka, W., Znajdek-Awizeń, P., Studzińska-Sroka, E. dan Brzezińska, M., 2013. Centella asiatica in cosmetology. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 30(1), hal.46.
- Chandrika, U.G. dan Prasad Kumara, P.A.A.S., 2015. *Gotu Kola (Centella asiatica): Nutritional Properties and Plausible Health Benefits* 1 ed., Elsevier Inc.
- Chemicalbook, 2017, *Aluminium chloride Basic information* [Daring]. Available at: https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB6247076_EN.htm.
- Dahlan, S., 2013. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*, Salemba Medika,

Jakarta.

Daubner, S.C., Le, T. dan Wang, S., 2012. NIH Public Access. *Arch Biochem Biophys*, 508(1), hal.1–12.

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.

Drożak, J., Bryła, J. dan Metabolizmu, Z.R., 2005. Dopamina—nie tylko neuroprzekaźnik* Dopamine: not just a neurotransmitter. *Postepy Hig Med Dosw.(online)*, 59, hal.405–420.

Erazi, H., Ahboucha, S. dan Gamrani, H., 2011. Neuroscience Letters Chronic exposure to aluminum reduces tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and locomotor performance in rats. *Neuroscience Letters*, 487(1), hal.8–11. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.09.053>.

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.

Febriyanti Supriadi, R. et al., 2019. *Centella asiatica protect the development of aluminum-induced zebrafish larvae*,

Geyikoglu, F., Türkez, H., Bakir, T.O. dan Cicek, M., 2013. The genotoxic, hepatotoxic, nephrotoxic, haematotoxic and histopathological effects in rats after aluminium chronic intoxication. *Toxicology and Industrial Health*, 29(9), hal.780–791.

Granato, M. et al., 1996. Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. *Development*, 123(1), hal.399–413.

Guidelines, W.H.O. dan Quality, D., 2010. Aluminium in drinking-water.

Haavik, J. dan Toska, K., 1998. Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*, 16(3), hal.285–309.

Hanum, S., 2016. Pengaruh Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Tirosin Hidroksilase (TH) serta Aktivitas Lokomotor Ikan Zebra (*Danio rerio*) The Effect of *Centella Asiatica* ' s Extract towards the Expression of Tyrosine Hydroxylase (TH) and Locomot. , 29(2), hal.99–103.

Harris, W.H. dan Van Petten, G.R., 1978. The effects of dopamine on blood pressure and heart rate of the unanesthetized fetal lamb. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 130(2), hal.211–215. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378\(78\)90368-X](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378(78)90368-X).

Hernandez, P. dan Johnson, C.A., 1990. Deferoxamine for aluminum toxicity in dialysis patients. *ANNA journal*, 17(3), hal.224–228.

Holmes, J.C. dan Fowler, N.O., 1962. Direct cardiac effects of dopamine. *Circulation research*, 10, hal.68–72.

Hostelley, T.L., Nesmith, J.E. dan Zaghoul, N.A., 2017. Sample Preparation and Analysis of RNASeq-based Gene Expression Data from Zebrafish. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (128).

IDAI, 2002. *Tumbuh Kembang Anak dan Remaja 1* ed., CV Sagung Seto, Jakarta.

Iglesias-González, J. et al., 2017. Effects of aluminium on rat brain mitochondria bioenergetics: an in vitro and in vivo study. *Molecular neurobiology*, 54(1), hal.563–570.

Jaishankar, M. et al., 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary toxicology*, 7(2), hal.60–72.

James, J. dan Dubery, I., 2011. Identification and quantification of triterpenoid centelloids in *Centella asiatica* (L.) Urban by densitometric TLC. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 24(1), hal.82–87. Available at: <http://www.akademai.com/doi/abs/10.1556/JPC.24.2011.1.16>.

Jamil, S.S., Nizami, Q. dan Salam, M., 2007. *Centella asiatica* (Linn.) Urban—a review.

Khafaga, A.F., 2017. Exogenous phosphatidylcholine supplementation retrieve aluminum-induced toxicity in male albino rats.

Khotimah, H., Yuliyani, T., et al., 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.

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 (JPsych)*, 2(1).

Kimmel, C.B. et al., 1995. *CB_et_al-1995-Developmental_Dynamics*, 10.

Klabunde, R., 2011. *Cardiovascular physiology concepts*, Lippincott Williams & Wilkins.

Klotz, K. et al., 2017. The health effects of aluminum exposure. *Deutsches Ärzteblatt International*, 114(39), hal.653.

Kovřížnych, J.A. et al., 2013. Acute toxicity of 31 different nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) tested in adulthood and in early life stages - Comparative study. *Interdisciplinary Toxicology*, 6(2), hal.67–73.

Kruck, T.P.A., Fisher, E.A. dan McLachlan, D.R.C., 1990. Suppression of deferoxamine mesylate treatment—induced side effects by coadministration of isoniazid in a patient with Alzheimer's disease subject to aluminum removal by ionspecific chelation. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 48(4), hal.439–446.

Lambert, A.M., Bonkowsky, J.L. dan Masino, M.A., 2012. The Conserved Dopaminergic Diencephalospinal Tract Mediates Vertebrate Locomotor Development in Zebrafish Larvae. , 32(39), hal.13488–13500.

Lei, S., 2014. Cross interaction of dopaminergic and adrenergic systems in neural modulation. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*, 6(3), hal.137.

De Luca, E. et al., 2014. ZebraBeat: a flexible platform for the analysis of the cardiac rate in zebrafish embryos. *Scientific reports*, 4, hal.4898.

Lucitt, M.B. et al., 2008. Analysis of the Zebrafish Proteome during Embryonic Development. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(5), hal.981–994. Available at: <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M700382-MCP200>.

Maekawa, R. et al., 2017. Evidence of exposure to chemicals and heavy metals during pregnancy in Japanese women. *Reproductive medicine and biology*, 16(4), hal.337–348.

Meritet, D.M., Mulrooney, D.M., Kent, M.L. dan Löhr, C. V, 2017. Development of Quantitative Real-Time PCR Assays for Postmortem Detection of Mycobacterium spp. Common in Zebrafish (Danio rerio) Research Colonies. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 56(2), hal.131–141.

Meyers, J.R., 2018. Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, 16(1), hal.1–26.

Mijanur, R. et al., 2013. Antioxidant activity of Centella asiatica (Linn.) Urban: Impact of extraction solvent polarity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6), hal.27–32.

Mohd Salim, R.J. et al., 2013. Statistical Analysis of Metal Chelating Activity of Centella asiatica and Erythroxylum cuneatum Using Response Surface Methodology. *Biotechnol Res Int*, 2013, hal.137851. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23533781>.

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.

Moses, T., Papadopoulou, K.K. dan Osbourn, A., 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(6), hal.439–462.

Mujika, J.I., Dalla Torre, G. dan Lopez, X., 2018. Aluminum and Fenton reaction: how can the reaction be modulated by speciation? A computational study using citrate as a test case. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(23), hal.16256–16265.

Nurliyana, A.R. et al., 2016. Early nutrition, growth and cognitive development of infants from birth to 2 years in Malaysia: A study protocol. *BMC Pediatrics*, 16(1), hal.1–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12887-016-0700-0>.

Oda, S.S., 2016. The influence of Omega3 fatty acids supplementation against aluminum-induced toxicity in male albino rats. *Environmental Science and Pollution Research*, hal.14354–14361. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-6578-4>.

Orger, M.B., Rita, F. dan Orger, M.B., 2018. Structure of the Zebrafish Locomotor Repertoire Revealed with Unsupervised Behavioral Clustering Article Structure of the Zebrafish Locomotor Repertoire Revealed with Unsupervised Behavioral Clustering. , hal.1–15.

Oztekin, D. et al., 2009. Embryonic heart rate as a prognostic factor for chromosomal abnormalities. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 28(5), hal.609–614.

Pavandi, M., Messripour, M. dan Moshtaghi, A.A., 2014. Effect of Aluminium and Copper on Dopamine Synthesis in Striatal Synaptosomes of Rat's Brain. *BEPLS Bull. Env. Pharmacol. Life Sci*, 38(3), hal.12–16. Available at: http://www.bepls.com/july_2014/3.pdf.

Phaniendra, A., Jestadi, D.B. dan Periyasamy, L., 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), hal.11–26.

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

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

PubChem, 2018, *Dopamine* [Daring]. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/681>.

Riyanti, S.S.T.M.K., 2019. *ETIKOLEGAL DALAM PRAKTIK KEBIDANAN*, WINEKA MEDIA.

Röllin, H.B. et al., 2018. Prenatal exposure to aluminum and status of selected essential trace elements in rural South African women at delivery. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(7), hal.1–16.

Ruipérez, F. et al., 2012. Pro-oxidant activity of aluminum: Promoting the Fenton reaction by reducing Fe(III) to Fe(II). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117, hal.118–123. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.09.008>.

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

Sarmah, S. dan Marrs, J.A., 2016. Zebrafish as a Vertebrate Model System to Evaluate Effects of Environmental Toxicants on Cardiac Development and Function.

Selvi, P.T., Kumar, M.S., Rajesh, R. dan Kathiravan, T., 2012. Antidepressant

- activity of ethanolic extract of leaves of *Centella asiatica*. Linn by In vivo methods. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science*, 2(2), hal.76–79.
- Senger, M.R. et al., 2011. Aluminum exposure alters behavioral parameters and increases acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. , hal.199–205.
- Shakhashiri, 2000. Chemical of the week Aluminium. *General Chemistry*, 2(1), hal.2–3.
- Surbakti, W.P.W. dan M., 2003. *Khasiat dan manfaat pegagan : tanaman penambah daya ingat*, Agromedia.
- Sved, A.F., 2009. Cardiovascular Function : Central Nervous System Control. , hal.599–604.
- Symington, A.J. dan Pinelli, J., 2006. Developmental care for promoting development and preventing morbidity in preterm infants. *Cochrane database of systematic reviews*, (2).
- Symonowicz, M. dan Kolanek, M., 2012. Flavonoids and their properties to form chelate complexes. , 76(1).
- Toyobo, ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover. , (86).
- Truong, L. dan Tanguay, R.L., 2017. Evaluation of Embryotoxicity Using the Zebrafish Model. In: *Drug Safety Evaluation*. Springer, hal. 325–333.
- V, S.S. dan J, A.A., 2015. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish *Danio rerio* (Hamilton). *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 3(6), hal.6–11.
- Valenti, O. et al., 2011. Fetal cardiac function during the first trimester of pregnancy. *Journal of prenatal medicine*, 5(3), hal.59.
- VanDuyn, N. et al., 2013. The metal transporter SMF-3/DMT-1 mediates aluminum-induced dopamine neuron degeneration. *Journal of neurochemistry*, 124(1), hal.147–157.
- Vidal-Gadea, A.G. dan Pierce-Shimomura, J.T., 2012. Conserved role of dopamine in the modulation of behavior. *Communicative & integrative biology*, 5(5), hal.440–447.
- Wai, K.M. et al., 2017. Prenatal heavy metal exposure and adverse birth outcomes in Myanmar: a birth-cohort study. *International journal of environmental research and public health*, 14(11), hal.1339.
- Walton, J.R., 2012. Aluminum disruption of calcium homeostasis and signal transduction resembles change that occurs in aging and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 29(2), hal.255–273.
- Weidenhamer, J.D. et al., 2016. Science of the Total Environment Metal exposures from aluminum cookware : An unrecognized public health risk in developing countries. *Science of the Total Environment*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.023>.

WHO, 2011. *Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants: Seventy-Fourth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*,

Yokel, R.A. 2001. Aluminum and the Blood-Brain Barrier. (DoUken 1898), hal.233–260.

