

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository PENGARUH EKSTRAK DAUN KELOR (*Moringa oleifera*) TERHADAP
PANJANG BADAN, KADAR MALONDIALDEHID DAN INTERLEUKIN-6 PADA
LARVA ZEBRAFISH (*Danio rerio*) MODEL STUNTING YANG DIINDUKSI
DENGAN ROTENON

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh
Gelar Magister Ilmu Biomedik

TESIS



Oleh:

ALBERT CHRISTIANTO
156070122011001

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KONSENTRASI IMUNOLOGI, MIKROBIOLOGI DAN PARASITOLOGI

PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

| | |
|--|------------|
| HALAMAN JUDUL | DAFTAR ISI |
| HALAMAN PENGESAHAN | Halaman i |
| PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS | iii |
| IDENTITAS TIM PENGUJI | iv |
| PERNYATAAN KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH | v |
| KATA PENGANTAR | vi |
| RINGKASAN | viii |
| SUMMARY | ix |
| DAFTAR ISI | x |
| DAFTAR TABEL | xvi |
| DAFTAR GAMBAR | xviii |
| DAFTAR SINGKATAN | xx |
| BAB 1 PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang Masalah | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 5 |
| 1.2.1 Umum | 5 |
| 1.2.2 Khusus | 5 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 6 |
| 1.3.1 Tujuan Umum | 6 |
| 1.3.2 Tujuan Khusus | 6 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 6 |
| 1.4.1. Manfaat Teoritis | 6 |
| 1.4.2 Manfaat Praktis | 7 |

| | | |
|---|----------------------------------|----------------------------------|
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA | | |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 2.1 <i>Stunting</i> | 8 | 8 |
| 2.1.1 Definisi <i>Stunting</i> | 8 | 8 |
| 2.1.2 Epidemiologi <i>Stunting</i> | 9 | 9 |
| 2.1.3 Etiologi <i>Stunting</i> | 10 | 10 |
| 2.1.4 Patofisiologi <i>Stunting</i> | 12 | 12 |
| 2.1.5 Dampak <i>Stunting</i> | 16 | 16 |
| 2.1.6 Pencegahan <i>Stunting</i> | 16 | 16 |
| 2.2 Rotenon | 17 | 17 |
| 2.2.1 Struktur Fisik dan Kimia Rotenon | 18 | 18 |
| 2.2.2 Mekanisme Aksi Rotenon | 18 | 18 |
| 2.2.3 Toksisitas Rotenon | 21 | 21 |
| 2.3 Peroksidasi Lipid | 23 | 23 |
| 2.3.1 Malondialdehide | 27 | 27 |
| 2.3.2 Peran Peroksidasi Lipid yang diinduksi Stres Oksidatif terhadap Inflamasi | 31 | 31 |
| 2.3.3 Interleukin 6 | 33 | 33 |
| 2.3.3.1 Peran IL-6 pada Pertumbuhan Tulang | 35 | 35 |
| 2.3.3.2 Peran IL-6 pada Hormon Pertumbuhan | 37 | 37 |
| 2.4 Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) | 39 | 39 |
| 2.4.1 Morfologi dan Taksonomi Zebrafish | 39 | 39 |
| 2.4.2 Perkembangan Zebrafish | 41 | 41 |
| 2.4.3 Zebrafish sebagai Model Penelitian | 45 | 45 |
| 2.5 Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) | 46 | 46 |
| 2.5.1 Kandungan dan Manfaat Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) | 47 | 47 |
| 2.5.2 Toksisitas Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) | 52 | 52 |

| | |
|--|----|
| BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN | 53 |
| 3.1 Kerangka Teori Penelitian | 53 |
| 3.2 Kerangka Konsep Penelitian | 56 |
| 3.3 Hipotesis Penelitian | 58 |
| 3.3.1 Hipotesis Umum | 58 |
| 3.3.2 Hipotesis Khusus | 58 |
| BAB 4 METODE PENELITIAN | 60 |
| 4.1 Rancangan Penelitian | 60 |
| 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian | 60 |
| 4.2.1 Populasi Penelitian | 60 |
| 4.2.2 Sampel Penelitian | 61 |
| 4.2.3 Kriteria Sampel | 61 |
| 4.2.3.1 Kriteria Inklusi | 61 |
| 4.2.3.2 Kriteria Eksklusi | 61 |
| 4.2.3.3 Kriteria <i>Dropout</i> | 61 |
| 4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian | 61 |
| 4.3.1 Lokasi Penelitian | 61 |
| 4.3.2 Waktu Penelitian | 61 |
| 4.4 Variabel Penelitian | 62 |
| 4.4.1 Variabel Bebas | 62 |
| 4.4.2 Variabel Tergantung | 62 |
| 4.5 Definisi Operasional | 62 |
| 4.6 Instrumen Penelitian | 63 |
| 4.6.1 Pemeliharaan Indukan Zebrafish, Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio Zebrafish | 63 |
| 4.6.2 Pembuatan Larutan Rotenon | 64 |

| | | | |
|--|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 4.6.3 Pembuatan Medium Embrionik | 64 | 64 | 64 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 4.6.4 Pembuatan Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) | 64 | 64 | 64 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 4.7 Prosedur Penelitian..... | 64 | 64 | 64 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 4.7.1 Pemeliharaan indukan zebrafish, Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio Zebrafish..... | 64 | 64 | 64 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 4.7.2 Pembuatan Larutan Rotenon (Sigma R8875) | 66 | 66 | 66 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 4.7.3 Pembuatan Medium Embrionik | 66 | 66 | 66 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 4.7.4 Pembuatan Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) | 67 | 67 | 67 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 4.7.5 Pemberian Paparan Rotenon dan Ekstrak Daun Kelor, Penggantian Medium dan Pemberian Pakan Larva | 69 | 69 | 69 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 4.7.6 Pengukuran Panjang Badan | 70 | 70 | 70 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 4.7.7 Pengukuran Kadar MDA dan IL-6 | 70 | 70 | 70 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 4.7.8 Bagan Alur Penelitian..... | 72 | 72 | 72 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 4.8 Analisis Data..... | 74 | 74 | 74 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

| | | | |
|--|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 5.1 Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) terhadap Panjang Badan pada Larva Zebrafish Model Stunting | 75 | 75 | 75 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 5.1.1 Pengaruh Induksi Rotenon Terhadap Larva Zebrafish | 75 | 75 | 75 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 5.1.2 Pengaruh Paparan Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish Model Stunting | 76 | 76 | 76 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 5.1.3 Pengaruh Paparan Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish Tanpa Induksi Rotenon | 78 | 78 | 78 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |
| 5.2 Pengaruh Paparan Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) terhadap Kadar MDA pada Larva Zebrafish Model Stunting | 79 | 79 | 79 |
| Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya | Repository Universitas Brawijaya |

| | |
|--|-----------|
| 5.3 Pengaruh Paparan Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) terhadap Kadar IL-6 pada Larva Zebrafish Model Stunting | 81 |
| 5.4 Hubungan antara Panjang Badan dengan Kadar MDA pada Larva Zebrafish Model Stunting | 83 |
| 5.5 Hubungan antara Panjang Badan dengan Kadar IL-6 pada Larva Zebrafish Model Stunting | 83 |
| 5.6 Hubungan antara Kadar MDA dengan Kadar IL-6 pada Larva Zebrafish Model Stunting | 84 |
| BAB 6 PEMBAHASAN | 85 |
| 6.1 Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) terhadap Panjang Badan pada Larva Zebrafish Model Stunting | 85 |
| 6.1.1 Pengaruh Induksi Rotenon Terhadap Larva Zebrafish | 85 |
| 6.1.2 Pengaruh Paparan Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish Model Stunting | 87 |
| 6.1.3 Pengaruh Paparan Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish Tanpa Induksi Rotenon | 88 |
| 6.2 Pengaruh Paparan Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) terhadap Kadar MDA pada Larva Zebrafish Model Stunting | 88 |
| 6.3 Pengaruh Paparan Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) terhadap Kadar IL-6 pada Larva Zebrafish Model Stunting | 90 |
| 6.4 Hubungan antara Panjang Badan dengan Kadar MDA pada Larva Zebrafish Model Stunting | 92 |
| 6.5 Hubungan antara Panjang Badan dengan Kadar IL-6 pada Larva Zebrafish Model Stunting | 92 |

DAFTAR TABEL

| | |
|---|----|
| Tabel 2.1 Struktur Rotenon..... | 18 |
| Tabel 2.2 Toksisitas Akut Rotenon | 22 |
| Tabel 2.3 Taksonomi Zebrafish..... | 39 |
| Tabel 2.4 Tahap perkembangan embrio <i>Danio rerio</i> hingga 72 hpf..... | 41 |
| Tabel 2.5 Tahap perkembangan <i>Danio rerio</i> mulai larva hingga dewasa..... | 43 |
| Tabel 2.6 Taksonomi Kelor (<i>Moringa oleifera</i>)..... | 47 |
| Tabel 2.7 Kandungan mineral daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) beberapa negara..... | 48 |
| Tabel 2.8 Kandungan Daun Kelor..... | 49 |
| Tabel 2.9 Konstituen Fitokimia dalam Ekstrak Metanol <i>Moringa oleifera</i> | 50 |
| Tabel 2.10 Kandungan Antioksidan dalam Ekstrak Metanol <i>Moringa oleifera</i> | 51 |
| Tabel 5.1 Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish Kelompok Kontrol dan Kelompok Rotenon (mm) | 75 |
| Tabel 5.2 Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish Model Stunting antara Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan..... | 76 |
| Tabel 5.3 Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish | 78 |
| Tabel 5.4 Rerata Kadar MDA Larva Zebrafish Model Stunting pada Usia 6 dfp | 80 |
| Tabel 5.5 Rerata Kadar IL-6 Larva Zebrafish Model Stunting pada Usia 6 dfp | 81 |
| Tabel 5.6 Hasil Uji Korelasi Panjang Badan dengan Kadar MDA pada Larva Zebrafish Model Stunting | 83 |

Tabel 5.7 Hasil Uji Korelasi Panjang
Zebrafish Model Stunting

Tabel 5.7 Hasil Uji Korelasi Panjang Badan dengan Kadar IL-6 pada Larva Zebrafish Model Stunting 83

Zebrafish Model Stunting 83

Tabel 5.8 Hasil Uji Korelasi Kadar MDA dengan Kadar IL-6 pada Larva

Zebrafish model Stunting 84

Sidan dengan Kadar IL-6 pada Larva 83

A dengan Kadar IL-6 pada Larva 84

DAFTAR GAMBAR

| | |
|---|----|
| Gambar 2.1 Persentase <i>Stunting</i> di Indonesia Tahun 2007, 2010 dan 2013..... | 9 |
| Gambar 2.2 Persentase <i>Stunting</i> di Indonesia Tahun 2015..... | 10 |
| Gambar 2.3 WHO <i>Conceptual Framework</i> pada <i>Stunting</i> | 13 |
| Gambar 2.4 Growth Hormone Mengaktivasi Sinyal Intraseluler..... | 15 |
| Gambar 2.5 Struktur Kimia Rotenon | 18 |
| Gambar 2.6 Mekanisme Aksi Rotenon..... | 19 |
| Gambar 2.7 Reactive Oxygen Species (ROS) | 20 |
| Gambar 2.8 Reaksi Fenton dan Haber-Weiss..... | 24 |
| Gambar 2.9 Proses Peroksidasi Lipid | 26 |
| Gambar 2.10 Pembentukan dan Metabolisme Malondialdehyde (MDA) | 29 |
| Gambar 2.11 Regulasi Persinyalan Inflamasi yang Diinduksi oleh Lipid Aldehid | 32 |
| Gambar 2.12 Sistem reseptor IL-6 | 34 |
| Gambar 2.13 Diagram Skematis Regulasi IL-6/sIL-6R dan Aktivitas Osteoklas yang Diinduksi RANKL..... | 36 |
| Gambar 2.14 Model Konseptual Pengaruh Inflamasi terhadap Regulasi Axis GH-IGF-1..... | 37 |
| Gambar 2.15 Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) | 39 |
| Gambar 2.16 Anatomi zebrafish | 40 |
| Gambar 2.17 Zebrafish jantan (atas) dan zebrafish betina (bawah) | 40 |
| Gambar 2.18 Tahap perkembangan embrio <i>Danio rerio</i> hingga 72 hpf..... | 44 |
| Gambar 2.19 (a) Pohon Kelor; (b) Bunga dan Daun Kelor | 47 |
| Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian | 56 |
| Gambar 4.1 Alur Penelitian (0 hpf hingga 3 dpf) | 72 |
| Gambar 4.2 Alur Penelitian (3 dpf hingga 9 dpf) | 73 |

| | |
|--|----|
| Gambar 5.1 Rerata Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> antara Kelompok Kontrol dan Kelompok Rotenon | 75 |
| Gambar 5.2 Rerata Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> model <i>Stunting</i> antara Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan..... | 76 |
| Gambar 5.3 Rerata Perbedaan Rerata Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> model <i>Stunting</i> pada 6 dan 9 dpf | 77 |
| Gambar 5.4 Rerata Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> antara Kelompok Kontrol dan Kelompok Ekstrak Daun Kelor (<i>Moringa oleifera</i>) Tanpa Induksi Rotenon | 79 |
| Gambar 5.5 Rerata Kadar MDA Larva <i>Zebrafish</i> pada Usia 6 dpf..... | 80 |
| Gambar 5.6 Rerata Kadar IL-6 Larva <i>Zebrafish</i> pada Usia 6 dpf | 82 |

xix

DAFTAR SINGKATAN

| | |
|---------|---|
| ATP | : <i>adenosin triphosphate</i> |
| BDNF | : <i>brain derived neurotrophic factor</i> |
| BMI | : <i>body mass index</i> |
| C | : <i>kontrol</i> |
| CAT | : <i>katalase</i> |
| CRP | : <i>C-reactive protein</i> |
| DAMPs | : <i>Damage-associated molecular patterns</i> |
| DNA | : <i>asam deoksiribonukleat</i> |
| Dpf | : <i>day post fertilization</i> |
| EDCs | : <i>endocrine disrupting chemical</i> |
| ERK 1/2 | : <i>extracellular signal-regulated kinase ½</i> |
| GH | : <i>growth hormone</i> |
| GLUT-1 | : <i>glucose transporter-1</i> |
| GLUT-4 | : <i>glucose transporter-4</i> |
| GNRH | : <i>gonadotropin releasing hormone</i> |
| GSIS | : <i>glucose-stimulated insulin secretion</i> |
| HMGB1 | : <i>high mobility group box 1</i> |
| HNE | : <i>4-hydroxy-trans-2-nonenal</i> |
| Hpf | : <i>hour post fertilization</i> |
| HPK | : Hari pertama kehidupan |
| IGF-1 | : <i>insulin-like growth factor-1</i> |
| IGFBP-3 | : <i>insulin-like growth factor binding protein-3</i> |
| IL-6 | : <i>Interleukin-6</i> |
| IUGR | : <i>intrauterine growth restriction</i> |
| JAK | : <i>Janus kinase</i> |
| LDA | : <i>lipid-derived aldehyde</i> |
| MAPK | : <i>mitogen-activated protein kinase</i> |
| M-CSF | : <i>macrophage colony-stimulating factor</i> |
| MDA | : <i>malondialdehid</i> |
| MO1 | : ekstrak daun kelor 0,56 µg/mL |
| MO2 | : ekstrak daun kelor 1,12 µg/mL |
| MO3 | : ekstrak daun kelor 2,24 µg/mL |
| MPASI | : makanan pendamping ASI |
| NF-κB | : <i>nuclear factor- κB</i> |
| OPG | : <i>osteoprotegrin</i> |
| PAMP | : <i>pathogen associated molecular pattern</i> |
| PB/U | : Panjang badan dibanding usia |
| PRR | : <i>pathogen-recognition receptors</i> |
| PUFA | : <i>polyunsaturated fatty acid</i> |
| R | : rotenon 12,5 ppb |
| RAGE | : <i>receptor of advanced glycation end products</i> |
| RANKL | : <i>receptor activator nuclear kappa-B ligand</i> |
| RMO1 | : Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 0,56 µg/mL |
| RMO2 | : Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 1,12 µg/mL |
| RMO3 | : Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 2,24 µg/mL |
| RNA | : <i>asam ribonukleat</i> |
| ROS | : <i>reactive oxygen species</i> |
| SD | : Standar deviasi |
| SOD | : <i>superoksid dismutase</i> |
| Sp1 | : <i>specificity protein-1</i> |
| Sp3 | : <i>specificity protein-3</i> |

| | |
|---------------|---|
| STAT3 | : <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> |
| T3 | : triyodotironin |
| T4 | : tiroksin |
| TB/U | : Tinggi badan dibanding usia |
| TBA | : asam tio barbiturat |
| TCA | : <i>trichloroacetic acid</i> |
| TNF- α | : <i>tumor necrosis factor-α</i> |
| VEGF | : <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| VEGFR-2 | : <i>vascular endothelial growth factor receptor-2</i> |
| WHO | : <i>World Health Organization</i> |

*er and activator of transcription 3
banding usia
irat
acid
factor- α
helial growth factor
helial growth factor receptor-2
organization*

Albert Christianto, NIM. 156070122011001. Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Desember 2018. Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Panjang Badan, Kadar Malondialdehid dan Interleukin-6 pada Larva Zebrafish (*Danio rerio*) model Stunting yang Diinduksi dengan Rotenon. Komisi Pembimbing, Ketua: Husnul Khotimah, Anggota: Umi Kalsum

Stunting merupakan gangguan pertumbuhan dan perkembangan yang disebabkan oleh berbagai faktor yang terjadi pada 1000 hari pertama kehidupan. Selain asupan gizi yang buruk, inflamasi kronis dan stres oksidatif juga dapat menyebabkan *stunting*. Daun kelor (*Moringa oleifera*) memiliki banyak nutrisi, mineral, vitamin, dan senyawa aktif seperti kaempferol, querctein, dan *isothiocyanate*, yang dapat memenuhi kebutuhan nutrisi, menekan proses inflamasi, dan mencegah stres oksidatif. Oleh karena itu, ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menjadi kandidat untuk mencegah *stunting*. Embrio zebrafish (*Danio rerio*) pada usia 2-72 hours post fertilization (hpf) dipapar dengan rotenon konsentrasi 12,5 ppb untuk menginduksi *stunting*, serta dipapar dengan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) berbagai konsentrasi (0.56, 1.12, 2.24 µg/mL). Pada 6 day post fertilization (dpf), larva zebrafish dikorbankan dan dilakukan pengukuran dengan metode ELISA untuk menentukan kadar MDA dan IL-6. Pengukuran panjang badan dilakukan pada 3, 6, dan 9 dpf. Pemberian rotenon secara signifikan menyebabkan gangguan pertumbuhan pada larva zebrafish. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat mengoreksi panjang badan larva zebrafish model *stunting* melalui penurunan kadar IL-6, sitokin proinflamasi yang dapat mengganggu hormon pertumbuhan dan perkembangan ($p < 0,05$). MDA, merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid, didapatkan meningkat pada kelompok yang diberikan rotenon maupun ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$). Namun, kadar MDA tidak memiliki hubungan yang bermakna dengan panjang badan larva zebrafish ($p > 0,05$). *Moringa oleifera* memiliki potensi untuk mencegah *stunting* pada larva zebrafish karena memiliki kemampuan untuk mengurangi proses inflamasi.

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

RINGKASAN

Repository Universitas Brawijaya

Albert Christianto, NIM. 156070122011001. *Master Program in Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya, Malang, December 2018. The Effect of Moringa oleifera Extract on Body Length, Malondialdehyde and Interleukine-6 Levels in Zebrafish (Danio rerio), Stunting's Model Induced by Rotenone. Supervisor Chairman: Husnul Khotimah, Member: Umi Kalsum.*

Stunting is growth and development disorder caused by various factors occurred in the first 1000 days of life which can disturb growth and development of children. Beside poor nutritional intake, chronic inflammation and high oxidative stress can also cause stunting. Moringa oleifera leaf contains many nutrients, minerals, trace elements, vitamins, and active compounds such as kaempferol, quercetin, and isothiocyanate, providing nutritional needs, suppress inflammatory processes, and prevent oxidative stress. Hence, Moringa oleifera leaf extract can be a strong candidate to prevent stunting. Zebrafish (Danio rerio) embryos ranging from 2-72 hours post fertilization (hpf) were exposed to rotenone at 12.5 ppb to induce stunting. It was incubated with 0.56, 1.12, and 2.24 µg/mL of Moringa oleifera leaf extract. After 6 days post fertilization (dpf), zebrafish larvae were sacrificed and ELISA measurement was done to determine the level of MDA and IL-6. Body length measurement was performed on 3, 6, and 9 dpf. Administration of rotenone significantly caused impaired of zebrafish larvae growth. Moringa oleifera leaf extract corrects the body length of zebrafish larvae which was exposed with rotenone through reduction of IL-6, proinflammatory cytokine that primarily impairs growth and development ($p<0.05$). The level of MDA as a final product of lipid peroxidation was increased in group that given rotenone or Moringa oleifera ethanolic extract compared with the controls ($p<0.05$), but MDA levels did not have significant correlation with the body length of zebrafish larvae ($p>0.05$). Moringa oleifera has the potential to be developed as a lead compound to prevent stunting on zebrafish larvae because it has the capability to minimize the inflammatory process.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

1.1 Latar Belakang Masalah

Stunting merupakan gangguan pertumbuhan yang disebabkan asupan gizi yang kurang dalam waktu yang lama dengan pemberian makanan yang tidak sesuai dengan kebutuhan gizi (Kemenkes RI, 2016). Menurut *WHO Child Growth Standard*, seseorang dikatakan *stunting* bila panjang badan dibanding usia (PB/U) atau tinggi badan dibanding usia (TB/U) menunjukkan batas (*z-score*) kurang dari -2 standar deviasi (SD) pada kurva WHO (WHO, 2014). Menurut WHO, 215 juta balita di dunia mengalami *stunting* (Aly et al., 2014). Indonesia menduduki peringkat kelima dunia dalam menghadapi masalah *stunting*. Prevalensi *stunting* nasional mengalami peningkatan dari tahun 2010 (35,6%) menjadi 37,2% pada tahun 2013. Angka ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan negara berkembang lainnya di Asia seperti Myanmar (35%), Vietnam (23%), dan Thailand (16%) (MCA Indonesia, 2013; Kemenkes RI, 2016). *World Health Organization* (WHO) merekomendasikan berbagai upaya untuk menurunkan angka kejadian *stunting* yang diharapkan pada tahun 2025 akan menurun sebesar 40% (WHO, 2014).

Upaya intervensi yang dilakukan oleh pemerintah berupa intervensi gizi spesifik yang difokuskan pada 1.000 hari pertama kehidupan (HPK), yaitu ibu hamil, ibu menyusui, dan anak usia 0-23 bulan. Periode 1.000 HPK, berupa 270 hari selama kehamilan dan 730 hari pertama setelah bayi dilahirkan, secara ilmiah telah dibuktikan sebagai periode yang menentukan kualitas kehidupan. Periode ini disebut sebagai "periode emas", dan Bank Dunia (2006) menyebutnya sebagai "*window of opportunity*" (Kemenkes RI, 2016).

Faktor-faktor yang mempengaruhi tumbuh kembang anak terdiri dari faktor genetik dan lingkungan. Faktor lingkungan terdiri dari lingkungan prenatal

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

BAB 1

PENDAHULUAN

Mekanisme patofisiologi terjadinya *stunting* masih belum sepenuhnya dipahami, namun ada beberapa hipotesis yang diyakini sebagai penyebab utama terjadinya *stunting*, yakni hipotesis tentang stres oksidatif (Khotimah *et al.*, 2018) dan hipotesa tentang inflamasi kronis (Prendergast *et al.*, 2014). Inflamasi kronis dapat menurunkan produksi *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) yang dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan (Prendergast *et al.*, 2014). Interleukin-6 (IL-6) memegang peran utama dari pengurangan produksi IGF-1, karena produksi IL-6 yang berlebihan pada inflamasi kronis dapat menyebabkan penurunan ekspresi IGF-1 dan peningkatan degradasi proteolitik dari *insulin-like growth factor binding protein-3* (IGFBP-3) (AbdEl-Maksoud *et al.*, 2017). Selain itu, dengan penurunan IGFBP-3, IGF-1 memiliki waktu paruh yang lebih pendek karena tidak berikatan dengan IGFBP-3. IL-6 juga mampu menghambat aktivitas osteoblas, dan meningkatkan osteoklastogenesis (Szaleckia *et al.*, 2018), sehingga IL-6 adalah sitokin proinflamasi yang memiliki potensi untuk menyebabkan *stunting*.

jumlah elektron ini akan semakin menumpuk pada kompleks-1 mitokondria sampai terjadi kebocoran pada kompleks-1 mitokondria sehingga elektron ini akan melepaskan satu elektron terhadap O_2 menjadi O_2^- / superoksida (Lenaz et al., 2006). Dengan terhambatnya transfer elektron, maka tidak didapatkan elektron di kompleks-3 mitokondria sehingga hukum "all or none" pelepasan sitokrom-C akan berjalan (Clayton et al., 2005). Pelepasan sitokrom-C ini ke sitosol akan mengaktifkan caspase-3 pada saat yang bersamaan dan menjadi poin penting untuk terjadinya apoptosis (Li et al., 2002). Selain itu, rotenon juga dapat meningkatkan aktivitas dari *nuclear factor- kB* (NF- κ B), dan ekspresi IL-6, sehingga mengakibatkan terjadinya inflamasi (Khotimah et al., 2015; Ye et al., 2016).

Pembentukan radikal bebas dimulai dengan pengambilan oksigen (O_2) dilanjutkan aktivasi NADPH oksidase dan produksi dari radikal anion superoksida (O_2^-). O_2^- ini kemudian dikonversi secara cepat menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) oleh enzim superoksida dismutase (SOD) (Nimse & Pal, 2015). Selanjutnya, hydrogen peroksida ini akan dikatalisir oleh enzim katalase (CAT) menjadi H_2O dan O_2 (Glorieux et al., 2015). Khotimah et al (2018) menunjukkan bahwa pemberian rotenon dapat meningkatkan pembentukan radikal bebas (ROS), menyebabkan kerusakan oksidatif, peningkatan kadar malondialdehida (MDA), penurunan kadar superoksida dismutase (SOD) dan katalase (CAT). MDA dijadikan sebagai petunjuk terjadinya stres oksidatif karena pengaruh radikal bebas (Zhao et al., 2013).

Zebrafish banyak dipakai sebagai model penelitian belakangan ini dikarenakan memiliki gen yang 70% homolog dengan gen manusia (Scholz et al., 2008; Santoriello & Zon, 2012; Chitramuthu, 2013). Ikan ini juga memiliki beberapa keunggulan yaitu tingkat reproduksinya yang tinggi, tahap larva yang transparan sehingga mudah diamati, memiliki tingkat sensitifitas yang tinggi

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 sehingga digunakan untuk model penelitian terhadap toksisitas bahan kimia atau obat, memiliki karakteristik pertumbuhan tulang yang cepat sehingga memudahkan untuk mengobservasi morfologi tulang pada embrio hidup, tidak memakan banyak tempat sebagai subjek penelitian, perawatan yang mudah, sampel embrio yang dihasilkan dalam jumlah banyak, *zebrafish* usia 6-10 hari/day post fertilization (dpf) analog dengan anak manusia usia 2-8 tahun (Eisen, 1996; Hill et al., 2005; Witten & Huysseune, 2009; Andreeva et al., 2011; Reed & Jennings, 2011; Sorribes, 2013). Disebutkan bahwa paparan rotenon dosis 10 ppb pada *zebrafish* usia 2-72 hour post fertilization (hpf) dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan linier pada usia 6 dpf melalui penurunan ekspresi BDNF dan tidak ditemukan kecacatan dengan survival rate sebesar 70% (Wijayanti, 2016; Ridlayanti, 2016). Selain itu, pemberian rotenon dosis 12,5 ppb pada *zebrafish* (2-72 hpf) dapat menyebabkan stunting melalui penurunan ekspresi *insulin like growth factor-1* (IGF-1), *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK 1/2), protein Ki-67, *glucose transporter-1* (GLUT-1), *glucose transporter-4* (GLUT-4), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *vascular endothelial growth factor receptor-2* (VEGFR-2), penurunan osifikasi tulang, penurunan osteoblastogenesis melalui penurunan ekspresi *osteoprotegerin* (*OPG*), penurunan ekspresi *osteocalcin*, peningkatan osteoklastogenesis melalui peningkatan ekspresi *receptor activator nuclear kappa-B ligan* (RANKL) (Ariati, 2017; Cory'ah, 2017; Primaditya, 2017; Primihastuti, 2017; Wardani, 2017; Yuningsih, 2017; Zakiah, 2017).

Kelor (*Moringa oleifera*) merupakan tanaman asli dari India Utara, Pakistan, dan Nepal, tumbuh di negara tropis maupun subtropis, mengandung vitamin (A, B6, B12, C, D, E), mineral (Ca, K, Zn, Mg, Fe, Cu), dan berbagai phytochemicals (Cheenpracha et al., 2010; Jaiswal et al., 2013; Gopalakrishnan et al., 2016). Isothiocyanate, β -carotene, quercetin, dan kaempferol yang

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
terkandung dalam *Moringa oleifera* bertindak sebagai antioksidan yang mampu menghambat stres oksidatif (Nijveldt *et al.*, 2001; Coppin *et al.*, 2013), dan sebagai anti-inflamasi (Kopeć *et al.*, 2014; Waterman *et al.*, 2014; Catarino *et al.*, 2016; Gupta *et al.*, 2017).

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap panjang badan, kadar MDA dan IL-6 pada larva zebrafish (*Danio rerio*) model *stunting* yang diinduksi dengan rotenon.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Umum

Apakah pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat mempengaruhi panjang badan, kadar MDA dan IL-6 pada larva zebrafish (*Danio rerio*) model *stunting* yang diinduksi dengan rotenon?

1.2.2 Khusus

1. Apakah ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat mengoreksi panjang badan pada larva zebrafish model *stunting*?

2. Apakah ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan kadar MDA pada larva zebrafish model *stunting*?

3. Apakah ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan kadar IL-6 pada larva zebrafish model *stunting*?

4. Apakah ada korelasi antara panjang badan larva zebrafish model *stunting* dengan kadar MDA?

5. Apakah ada korelasi antara panjang badan larva zebrafish model *stunting* dengan kadar IL-6?

6. Apakah ada korelasi antara MDA dengan kadar IL-6 pada larva zebrafish model *stunting*?

- Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
1.3 Tujuan Penelitian
1.3.1 Tujuan Umum
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Membuktikan bahwa pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat mempengaruhi panjang badan, kadar MDA dan IL-6 pada larva *zebrafish* (*Danio rerio*) model *stunting* yang diinduksi dengan rotenon.
- Repository Universitas Brawijaya
1.3.2 Tujuan Khusus
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 1. Membuktikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat mengoreksi panjang badan pada larva *zebrafish* model *stunting*.
 2. Membuktikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan kadar MDA pada larva *zebrafish* model *stunting*.
 3. Membuktikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan kadar IL-6 pada larva *zebrafish* model *stunting*.
 4. Menganalisa korelasi antara panjang badan larva *zebrafish* model *stunting* dengan kadar MDA.
 5. Menganalisa korelasi antara panjang badan larva *zebrafish* model *stunting* dengan kadar IL-6.
 6. Menganalisa korelasi antara MDA dengan IL-6 pada larva *zebrafish* model *stunting*.
- 1.4 Manfaat Penelitian**
1.4.1 Manfaat Teoritis
 1. Dapat menambah ilmu pengetahuan mengenai pengaruh pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap model *stunting* *zebrafish* yang diinduksi dengan rotenon.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Dapat dijadikan sebagai dasar teori sehingga potensi kelor (*Moringa oleifera*) sebagai alternatif pengobatan dapat dikembangkan.
2. Budidaya kelor (*Moringa oleifera*) di masa mendatang dapat menjadi salah satu upaya guna mengatasi kejadian *stunting*.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

2.1 ***Stunting***

2.1.1 ***Definisi Stunting***

Stunting merupakan gangguan pertumbuhan linear yang menjadi salah satu indikator status gizi, dimana panjang badan atau tinggi badan berdasarkan umur kurang dari -2 SD , sedangkan anak-anak dikatakan sangat terhambat pertumbuhannya/*severely stunted* jika PB/U atau TB/U dibawah -3 SD dari standar median pertumbuhan anak WHO (Sudirman, 2008; De Onis & Branca, 2016) yang akan tampak pada saat anak berusia 2 tahun (MCA Indonesia, 2013).

Periode emas pertumbuhan anak merupakan periode pertumbuhan yang terjadi mulai dalam kandungan hingga dua tahun pertama kehidupan termasuk pertumbuhan otak, namun pada masa ini juga sangat rentan terjadi berbagai gangguan pertumbuhan dan perkembangan. Dengan pemberian asupan gizi yang cukup dan adekuat dapat membantu menanggulangi masalah tumbuh kembang pada anak (Badham & Sweet, 2010). Anak-anak dengan *stunting* diidentifikasi dengan tubuh pendek, namun bertubuh pendek bukan masalah yang berdiri sendiri. Kondisi ini merupakan *stunting syndrome*, yang ditandai dengan retardasi pertumbuhan linear (Prendergest & Humphrey, 2014).

Kekurangan gizi pada usia dini dapat menyebabkan penderitanya mudah sakit, berkurangnya kemampuan kognitif, memiliki postur tubuh yang pendek saat dewasa, dan dapat meningkatkan angka kematian bayi dan anak, sehingga 50% kematian terjadi pada anak-anak dibawah usia 5 tahun, serta secara jangka panjang berpengaruh terhadap produktivitas dan kondisi perekonomian suatu negara (MCA Indonesia, 2013; Aly *et al*, 2014). Dengan demikian, *stunting* tidak

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
BAB 2
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

TINJAUAN PUSTAKA

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

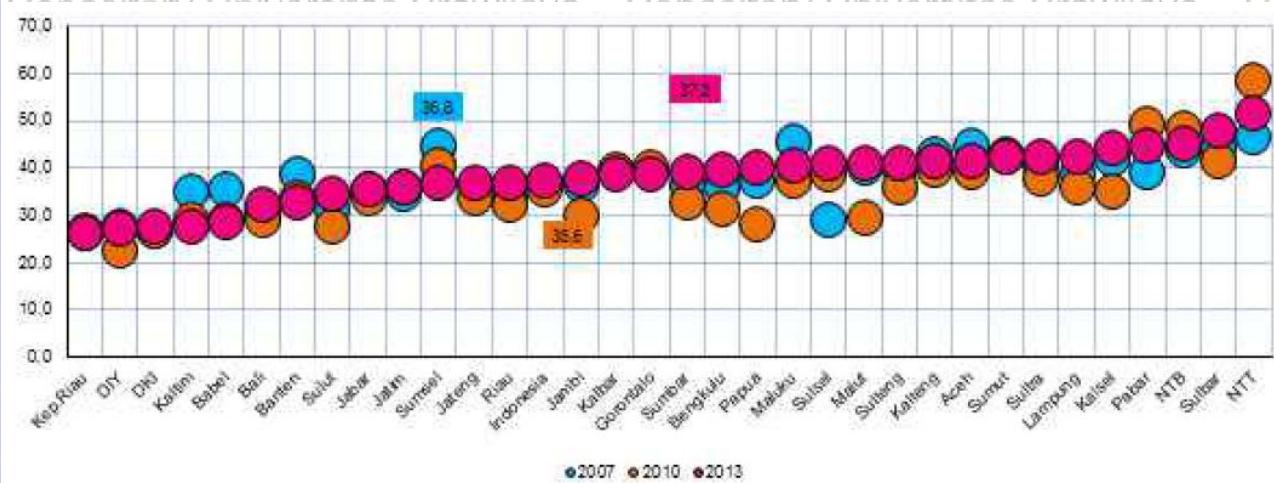
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

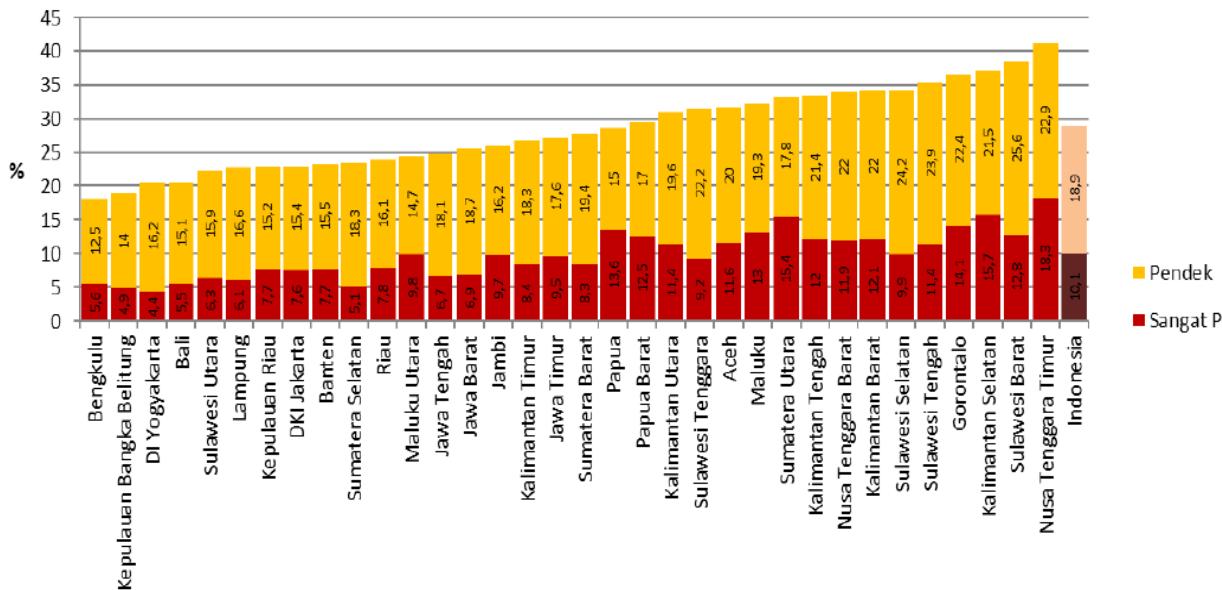
2.1.2 Epidemiologi Stunting

Menurut Riskesdas (2013) persentase status gizi balita pendek di Indonesia pada tahun 2013 adalah 37,2%, tahun 2010 (35,6%) dan tahun 2007 (36,8%) (Gambar 2.1). Hal ini tidak menunjukkan penurunan ataupun perbaikan yang signifikan. Pada tahun 2013, persentase tertinggi adalah provinsi Nusa Tenggara Timur (51,7%), Sulawesi Barat (48,0%) dan Nusa Tenggara Barat (45,3%), sedangkan persentase terendah adalah provinsi Kepulauan Riau (26,3%), DI Yogyakarta (27,2%) dan DKI Jakarta (27,5%) (Kemenkes RI, 2016).



Gambar 2.1 Persentase *Stunting* di Indonesia Tahun 2007, 2010 dan 2013.

Warna biru menunjukkan persentase *stunting* pada tahun 2007 (36,8%), warna jingga menunjukkan persentase *stunting* pada tahun 2010 (35,6%), warna merah muda menunjukkan persentase *stunting* pada tahun 2013 (37,2%) (Kemenkes RI, 2016).



Gambar 2.2 Persentase Stunting di Indonesia Tahun 2015. Sebesar 29% balita Indonesia termasuk kategori pendek, dengan persentase tertinggi adalah provinsi Nusa Tenggara Timur dan Sulawesi Barat (Kemenkes RI, 2016)

Menurut WHO, prevalensi balita pendek menjadi masalah kesehatan masyarakat jika prevalensinya 20% atau lebih. Prevalensi balita pendek di Indonesia juga tertinggi dibandingkan Myanmar (35%), Vietnam (23%), Malaysia (17%), Thailand (16%) dan Singapura (4%) (MCA Indonesia, 2013). *Global Nutrition Report* tahun 2014 menunjukkan bahwa Indonesia termasuk dalam 17 negara, di antara 117 negara, yang mempunyai tiga masalah gizi yaitu *stunting*, *wasting* dan *overweight* pada balita (Kemenkes RI, 2016).

2.1.3 Etiologi Stunting

Stunting disebut juga sebagai retardasi pertumbuhan linear yang merupakan bentuk mekanisme fisiologis tubuh untuk mencegah dari kondisi malnutrisi. Namun proses adaptasi ini memiliki batas – batas tertentu, jika terlewati dapat menyebabkan sakit bahkan kematian (Sudirman, 2008). Pada masa prenatal, diperkirakan 20% retardasi pertumbuhan linear dimulai sejak bayi belum lahir dan akan meningkat 58% pada saat usia anak 18-23 bulan.

Stunting disebabkan oleh multifaktorial, diantaranya nutrisi (energi, makronutrien, mikronutrien), toksin, infeksi (luka pada mukosa gastrointestinal), sistem imun, dan interaksi antara ibu dan janin (nutrisi ibu saat hamil dan setelah melahirkan, interaksi perilaku ibu dan anak) (Frongillo, 1999). Menurut Badhan dan Sweet (2010) faktor-faktor penyebab *stunting* adalah faktor genetik dan lingkungan. Faktor lingkungan terdiri dari periode prenatal dan postnatal (Soetjiningsih, 1995).

Periode prenatal, pertumbuhan janin merupakan hasil interaksi kompleks antara status nutrisi ibu, endokrin, sinyal metabolisme dan perkembangan plasenta. Ukuran bayi merupakan refleksi dari lingkungan di intrauterin. Bayi dengan berat lahir rendah (<2,5 kg), 6 kali lebih tinggi terjadi di negara berkembang (Kolsteren, 1996; Prendergast & Humphrey, 2014). Bayi lahir dengan berat lahir rendah meliputi *preterm*, kecil masa kehamilan atau gabungan keduanya. Tahun 2010, sebanyak 27% bayi lahir dengan *preterm* dan hampir 3 juta bayi lahir dengan *preterm* dan kecil masa kehamilan, sehingga masa prenatal menjadi sangat penting untuk diperhatikan. Status gizi ibu juga berpengaruh terhadap *stunting*, terutama ibu dengan nutrisi kurang/malnutrisi berkontribusi besar terhadap kematian ibu, meningkatkan risiko merugikan pada janin, kematian bayi dan balita serta *stunting*. Selain itu, perawakan ibu yang pendek, *body mass index* (BMI) rendah (< 18,5 kg/cm²) selama hamil, ibu hamil dengan anemia (Hb <11 g/dl), dan ibu dengan malaria saat hamil juga turut serta berisiko melahirkan anak dengan retardasi pertumbuhan linear (Danaei *et al.*, 2016).

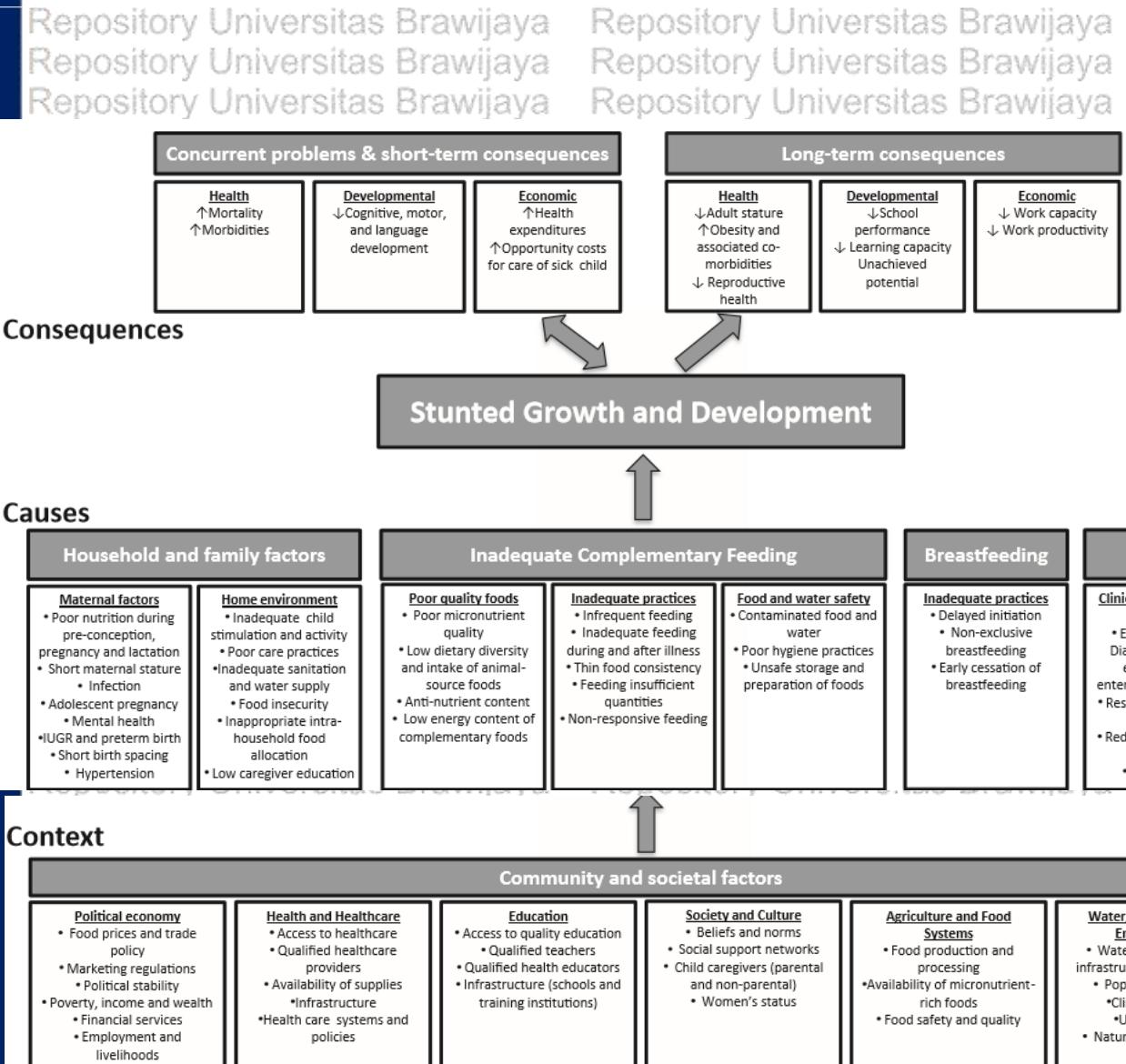
Otak berkembang sangat pesat pada periode postnatal. Asupan nutrisi yang tidak adekuat, pemberian ASI tidak eksklusif (0-6 bulan), inflamasi, faktor psikologis, hormon, dan kurangnya akses terhadap pelayanan kesehatan serta faktor lingkungan (rendahnya sanitasi, kebersihan lingkungan, air minum yang

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
tercemar) dapat berisiko menjadi penyebab gangguan pertumbuhan linear pada anak. Akses terhadap air bersih dan fasilitas sanitasi yang buruk dapat meningkatkan kejadian penyakit infeksi yang dapat membuat energi untuk pertumbuhan teralihkan kepada perlawanannya tubuh terhadap infeksi, selain itu pertumbuhan sel otak yang seharusnya berkembang pesat pada 2 tahun pertama menjadi terhambat (Prendergast *et al.*, 2014; Danaei *et al.*, 2016; Torlesse *et al.*, 2016; Kemenkes RI, 2016).

2.1.4 Patofisiologi *Stunting*

World Health Organization Conceptual Framework menjelaskan bahwa *stunting* disebabkan oleh multifaktorial yang sangat kompleks dan saling mempengaruhi satu dengan yang lain, meliputi faktor komunitas dan sosial seperti asuhan kesehatan, pendidikan, stabilitas politik, urbanisasi, kepadatan populasi, dukungan sosial (Stewart *et al.*, 2013).

Pertumbuhan merupakan proses fisiologis yang terjadi sejak kehidupan janin dalam kandungan, bayi, balita, dan pubertas. Status nutrisi yang adekuat merupakan faktor kunci dalam proses pertumbuhan. *Stunting* merupakan salah satu gangguan pertumbuhan yang disebabkan karena malnutrisi. Pemberian nutrisi yang adekuat pada awal kehidupan dapat berdampak pada ekspresi genetik pertumbuhan yang berpengaruh terhadap proses pertumbuhan, metabolisme, dan risiko penyakit. Kekurangan dan kelebihan nutrisi akan sangat berpengaruh terhadap replikasi, migrasi, maturasi, apoptosis, dan meningkatkan risiko abnormal pada pertumbuhan dan perkembangan embrio (Black *et al.*, 2013).



Gambar 2.3 WHO Conceptual Framework pada Stunting. Stunting disebabkan oleh multifaktorial yang sangat kompleks dan saling mempengaruhi satu dengan yang lain (Stewart *et al.*, 2013).

Proses pertumbuhan terbagi menjadi 2 jalur yang berbeda, yaitu hiperplasia (otak, tulang), atau hipertrofi (jaringan lemak). Hiperplasia tergantung pada hormon, seperti insulin, *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), *insulin-like growth factor binding protein-3* (IGFBP-3), leptin, kortisol, hormon pertumbuhan, triyodotironin (T3)/tiroksin (T4), dan membutuhkan nutrisi esensial seperti asam amino, iodine, besi, tembaga, zink, sodium, potassium, fosfor, energi yang adekuat, dan asam lemak esensial (Black *et al.*, 2013). Kondisi malnutrisi, infeksi dapat mengganggu mekanisme molekuler pada proses pertumbuhan linear.

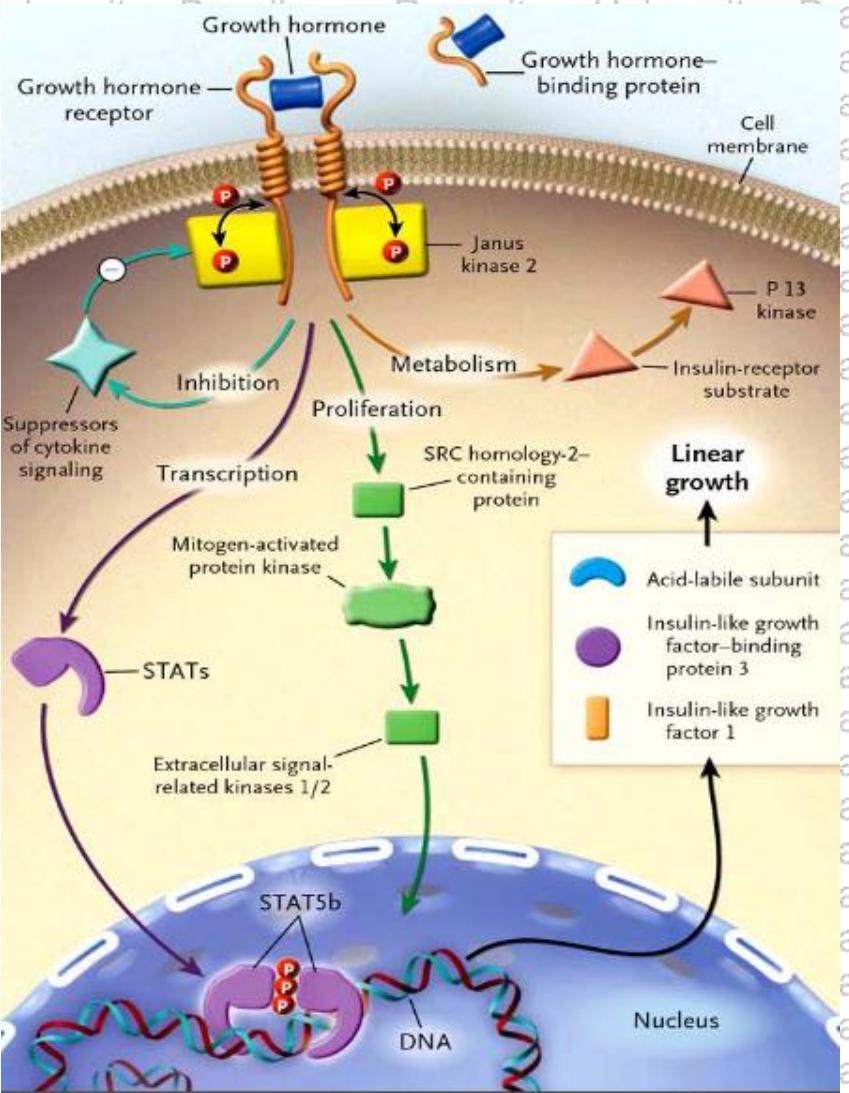
(Black *et al.*, 2013). Kondisi malnutrisi, infeksi dapat mengganggu mekanisme molekuler pada proses pertumbuhan linear.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Pada kondisi malnutrisi akut *growth hormone* (GH) akan meningkat, namun akan
menurun jika terjadi malnutrisi yang berkepanjangan, demikian juga IGF-1 akan
menurun (Thissen et al., 1994; Scacchi et al., 2003; Bartz et al., 2014).

Gangguan pada hormon tiroid akibat penurunan sintesis *growth hormone*
dan penurunan reseptor *gonadotropin releasing hormone* (GNRH) pada
somatotropes juga dapat berdampak pada pertumbuhan. Hormon tiroid terdiri
dari tiroksin (T4) dan triyodotironin (T3) yang berfungsi mempertahankan
keoptimalan metabolisme di berbagai jaringan tubuh, sangat dibutuhkan untuk
proses pertumbuhan badan perkembangan otak, perkembangan sistem saraf,
dan perkembangan sistem jaringan gigi serta tulang (Institute of Medicine, 2003).

Hipotiroidisme yang terjadi pada anak, dapat mengakibatkan gangguan tumbuh
kembang yang ditandai dengan panjang/tinggi badan sangat pendek, dan
penurunan kecerdasan (Desai, 2011). Hormon tiroid memiliki efek “*promoting*”
jika tidak ada *growth hormone*. IGF-1 merupakan *growth promoting hormone*.

Dalam pertumbuhan normal, insulin diperlukan untuk mempertahankan
pertumbuhan secara optimal, namun insulin tidak dapat berfungsi dengan baik
jika tidak terdapat *growth hormone* (Lupu et al., 2001).



Growth Hormone-Activated Intracellular Signaling.

Gambar 2.4 Growth Hormone Mengaktifasi Sinyal Intraseluler (Eugster & Pescovitz, 2003). Proses fosforilasi dari reseptor GH mengakibatkan aktivasi proses metabolisme, proliferasi dan jalur transkripsi. Gen STAT5b memodulasi proses transkripsi dari IGF-1, IGFBP-3 dan acid labile subunit yang berperan pada pertumbuhan. Mutasi pada gen STAT5b berpengaruh pada proses transkripsi yang mengakibat gangguan pada *linear growth* (Eugster & Pescovitz, 2003).

Penelitian lain menyebutkan bahwa anak-anak dengan gangguan pertumbuhan linear memiliki serum spngomielin yang rendah. Spngomielin berperan penting dalam mielinisasi sistem saraf pusat selama perkembangan anak (Lebrun-Julien et al., 2014).

2.1.5 Dampak Stunting

Kegagalan pertumbuhan linear akibat *stunting* digunakan sebagai penanda beberapa kelainan patologis terkait dengan peningkatan morbiditas dan mortalitas, kehilangan kemampuan pertumbuhan fisik, penurunan fungsi perkembangan kognitif dan saraf, serta peningkatan risiko penyakit kronis (De Onis & Branca, 2016). *World Health Organization* (WHO) menjelaskan bahwa konsekuensi jangka panjang dari *stunting* berupa perawakan tubuh pendek pada saat dewasa, peningkatan risiko obesitas, dan penurunan kesehatan reproduksi (bidang kesehatan), penurunan prestasi dan kapasitas belajar (perkembangan mental), dan penurunan kemampuan serta kapasitas kerja (bidang ekonomi) (Prendergast & Humphrey, 2014).

2.1.6 Pencegahan *Stunting*

Dampak yang ditimbulkan oleh kondisi *stunting* dapat dicegah dengan berbagai upaya perbaikan, yaitu melalui upaya perbaikan langsung (intervensi gizi spesifik) yang umumnya dilakukan oleh sektor kesehatan dengan kontribusi sebesar 30% dan melalui upaya tidak langsung (intervensi gizi sensitif) dengan kontribusi sebesar 70% yang melibatkan berbagai sektor seperti ketahanan pangan, ketersediaan air bersih, dan sanitasi, penanggulangan kemiskinan, pendidikan, sosial, dan sebagainya (Kemenkes RI, 2016). Berbagai upaya pencegahan *stunting* dapat dimulai pada 1000 hari pertama kehidupan, karena pada masa ini menjadi penentu kualitas hidup anak. *World Health Organization* (WHO) merekomendasikan berbagai upaya untuk menurunkan angka kejadian *stunting* yang diharapkan pada tahun 2025 akan menurun sebesar 40% (WHO).

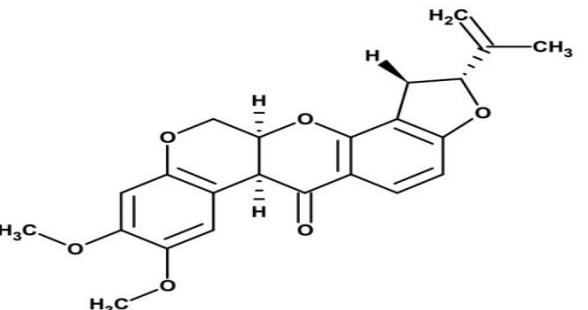
2014). Adapun upaya – upaya penurunan angka kejadian *stunting* adalah sebagai berikut :

- 1) Pemenuhan kebutuhan zat gizi bagi ibu hamil. Ibu hamil harus mendapatkan asupan nutrisi yang adekuat, mendapatkan suplementasi zat gizi (tablet zat besi atau Fe), dan kesehatan ibu hamil harus terjaga agar tidak mudah sakit.
- 2) Pemberian ASI eksklusif sampai umur 6 bulan dan setelah 6 bulan memberikan makanan pendamping ASI (MPASI) yang adekuat baik kuantitas maupun kualitasnya, serta melanjutkan pemberian ASI sampai 2 tahun.
- 3) Memantau pertumbuhan bayi dan balita di posyandu sebagai upaya strategis untuk deteksi dini gangguan pertumbuhan linear.
- 4) Meningkatkan akses terhadap air bersih dan fasilitas sanitasi, serta menjaga kebersihan lingkungan.
- 5) Persalinan ditolong oleh tenaga kesehatan dan dilanjutkan dengan inisiasi menyusu dini untuk menciptakan bounding attachment antara ibu dan bayi (MCA Indonesia, 2013; Kemenkes RI, 2016)

2.2 Rotenon

Rotenon merupakan produk pestisida alami yang diisolasi dari akar tanaman *Pea* (kacang-kacangan) subtropis dan tropis, ditemukan di Amerika Selatan dan Asia Tenggara (Ott, 2006). Di Indonesia, rotenon dapat ditemukan pada daun kacang babi (*Tefrosia*) (5% rotenon), akar tanaman tuba (*Derris elliptica*) (0,3-1,2% rotenon). Rotenon digunakan sebagai racun kuat untuk ikan (piscicide), serangga (insektisida), dan jamur (fungisida) (Turner et al., 2007).

2.2.1 Struktur Fisik dan Kimia Rotenon



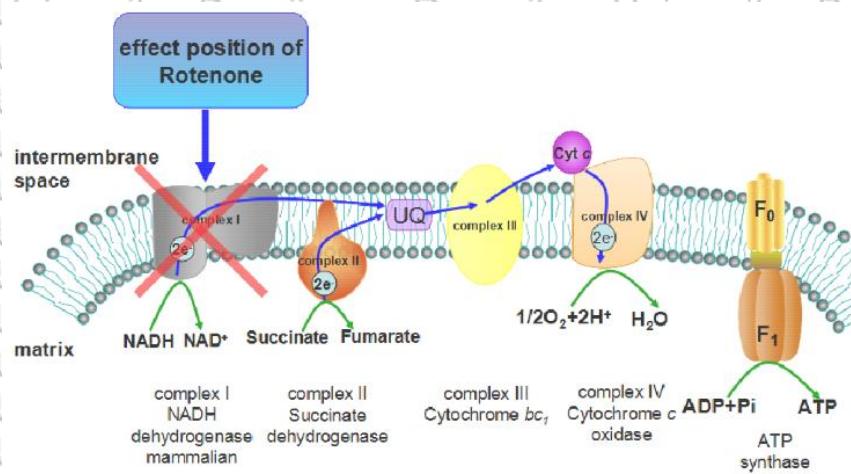
Gambar 2.5 Struktur Kimia Rotenon (Ling, 2003). Perrone (2011) mengemukakan bahwa degradasi rotenon di lingkungan dipengaruhi oleh pH (5-9), temperatur air (25°C). Waktu paruh rotenon sekitar 12 jam pada suhu 24°C dan 3,5 hari pada suhu 0°C (Ott, 2006).

Tabel 2.1 Karakteristik Rotenon (Gupta & Milatovic, 2014)

| Klasifikasi | Nama |
|--------------------------|--|
| Nama umum | Rotenon |
| Nama kimia | [2R-(2a,6ac,12ac)]1,2,12,12a-tetrahydri-8,9-dimethoxy-2-(1-ethylethenyl)[1]benzopyranol[3,4-b]furo[2,3h][1]benzopyran-6(6ah)-one |
| Rumus empiris | C ₂₃ H ₂₂ O ₆ |
| Berat molekul | 394,43 |
| Titik lebur | 163°C |
| Titik didih | 220°C |
| Tekanan penguapan | <mpa-20°C |
| Kelarutan | 15 mg/L pada 100°C, larut dalam pelarut organik (etanol, karbon tetraklorid, amil asetat, xylem, aseton, benzene, klorobenzen, dan ethylene dichloride chloroform) |
| Ciri | berbentuk kristal, warna putih trasparan sampai kecoklatan |

2.2.2 Mekanisme Aksi Rotenon

Rotenon merupakan pestisida yang tergolong *endocrine disrupting chemical* (EDCs) yang bertindak sebagai antagonis atau meniru hormon, melalui efek toksisitasnya menyebabkan adanya kompetisi ikatan ligan dan reseptornya seperti estrogen, sehingga mengganggu mekanisme jalur pengiriman sinyal ke berbagai jaringan (Kortenkamp, 2007; Mnif *et al.*, 2011).



Gambar 2.6 Mekanisme Aksi Rotenon. Rotenon bertindak pada tempat kopling dari NADH-coenzyme Q oxidoreductase, menghambat proses fosforilasi oksidatif dan menghambat transport elektron dari kompleks I mitokondria (Xu et al., 2016).

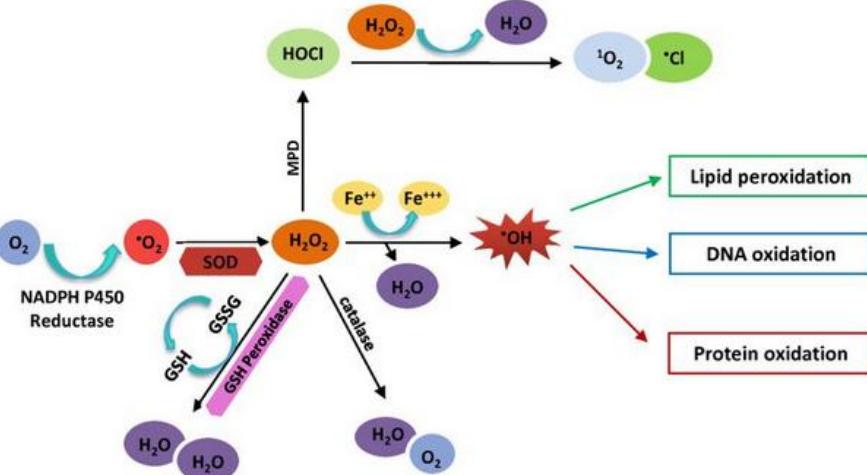
Rotenon bekerja menghambat NADH dehidrogenase yang dikenal dengan komplek I, sehingga menyebabkan penurunan kemampuan oksidasi fosforilasi, menyebabkan hambatan pada produksi ATP di mitokondria, dan mendorong terbentuknya radikal bebas (ROS), serta mengaktifkan mekanisme stres oksidatif (Xu et al., 2016). Hasil penelitian Khotimah et al (2018) menunjukkan bahwa pemberian rotenon dapat meningkatkan ROS, menyebabkan kerusakan oksidatif, peningkatan kadar malondialdehide (MDA), penurunan kadar superoksida dismutase (SOD) dan katalase (CAT).

Sel-sel dalam tubuh akan merespon terhadap sinyal yang dikirim dari lingkungan seperti toksikan, stressor melalui mekanisme yang terlibat dalam pengiriman sinyal transduksi. Sejumlah reseptor akan merespon benda asing yang masuk dengan mengaktifkan suatu kaskade sinyal untuk mengekspresi benda asing tersebut. Adanya benda asing tersebut dapat memicu metabolisme bahan toksik atau *reactive oxygen species* (ROS) dari hasil stres oksidatif (Tebourbi et al., 2011). ROS diproduksi secara fisiologis selama pembentukan energi seluler di mitokondria. Mitokondria terdiri dari kompleks enzim (I, II, III, dan IV), coenzyme Q (pembawa elektron), dan cytochrome C yang berperan penting

Repository Universitas Brawijaya
dalam produksi *adenosin triphosphate* (ATP). Komplek I, II, III merupakan sumber O_2^- dan ROS lainnya, yaitu OH^- , NO^- , H_2O_2 , dan $ONOO^-$ (Adam-Vizi & Chinopoulos, 2006). Mitokondria berfungsi tidak hanya memproduksi ATP dan mengontrol konsentrasi ROS dalam kadar normal, namun juga berpartisipasi dalam proses intraseluler, seperti generasi, modulasi, dan propagasi sinyal Ca^{2+} sitosol selama mengontrol hidup dan mati sel melalui apoptosis (Brookes, 2005).

Mekanisme antioksidatif seluler membutuhkan kontrol ketat dari O_2^- dan H_2O_2 sebelum bertransformasi menjadi ROS yang reaktif, terutama $ONOO^-$ dan OH^- .

Secara fisiologis O_2^- dan H_2O_2 berperan penting dalam regulasi jalur sinyal transduksi dan ekspresi gen dalam metabolisme sel, pertumbuhan, perkembangan, dan diferensiasi (Dennery, 2007; Valko *et al.*, 2007), sebaliknya, jika produksi ROS berlebih akan menginduksi stres oksidatif, menyebabkan proteksi antioksidan dalam tubuh lemah, dan mengakibatkan kerusakan oksidatif makromolekuler sel, termasuk protein, lemak, dan asam nukleat (Ježek & Hlavatá, 2005), kurangnya aktivitas enzim, kerusakan peroksidatif membran sel, kerusakan DNA, dan mutagenesis (Buonocore *et al.*, 2010).



Gambar 2.7 Reactive Oxygen Species (ROS). Sel menghasilkan energi (aerob) dengan mengurangi molekul oksigen (O_2) menjadi air. Selama metabolisme oksigen, anion superoksida (O_2^-) terbentuk dengan bantuan NADPH P450 reduktase. Adanya

superoksid dismutase (SOD) menyebabkan anion superoksid mengalami dismutasi menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2), yang diubah oleh glutathione peroxidase atau katalase menjadi air. Myeloperoxidase (MPD) mengubah H_2O_2 dalam neutrofil menjadi asam hipoklorit ($HOCl$) (oksidan kuat yang bertindak sebagai agen bakterisida dalam sel fagosit). Reaksi Fenton, Fe^{2+} dioksidasi menjadi Fe^{3+} dan H_2O_2 diubah menjadi radikal hidroksil yang sangat reaktif (OH^-). Radikal ini terlibat dalam peroksidasi lipid, DNA dan oksidasi protein (Castello *et al.*, 2010).

Produksi ROS pada konsentrasi fisiologis berperan penting dalam proses pertumbuhan normal pada pertumbuhan bayi, perkembangan dan kesehatan melalui regulasi gen, proliferasi, diferensiasi, dan perkembangan jaringan. Sebaliknya ketidakseimbangan produksi ROS dan antioksidan dapat menyebabkan gangguan pada kehamilan dan janin, yaitu kematian embrionik, keguguran, *intrauterine growth restriction* (IUGR), kecacatan dan kematian janin, lahir prematur dan berat lahir rendah (Al-Gubory *et al.*, 2010; Agarwal *et al.*, 2012).

Penelitian Li *et al* (2002) menunjukkan bahwa pemberian rotenon pada sel HL-60 dengan dosis rendah (<100 nM) hanya dapat meningkatkan ROS, namun pada dosis besar (>500nM) secara signifikan meningkatkan ROS dalam sel, dan menginduksi kematian sel. Hasil penelitian Wijayanti (2016) menunjukkan paparan rotenon dengan konsentrasi 10 ppb pada larva zebrafish selama 3 hari dapat menginduksi apoptosis melalui peningkatan ekspresi Bax dan Hsp 60, dan menyebabkan kondisi *stunting*.

2.2.3 Toksisitas Rotenon

Penggunaan pestisida dapat menyebabkan masalah serius pada lingkungan dan masalah kesehatan manusia dan hewan. Semua produk pestisida, toksitasnya tergantung pada konsentrasi yang terpapar pada manusia. Rotenon memiliki toksitas tinggi pada paparan oral dan inhalasi.

Tabel 2.2 : Toksisitas Akut Rotenon (EPA, 2007)

| Rute paparan | Kategori toksisitas | Peringatan |
|---------------|---------------------|----------------|
| Oral | I | Danger, poison |
| Dermal | IV | Caution |
| Inhalasi | I | Danger, poison |
| Iritasi kulit | IV | Caution |
| Iritasi mata | IV | Caution |

Penelitian terkait toksisitas akut dilakukan pada rat untuk mengukur tingkat letal rotenon yang diberikan secara oral. Ditemukan bahwa rotenon sangat toksik pada rat betina pada dosis $LD_{50} = 39,5$ mg/kg, sedangkan pada rat jantan $LD_{50} = 102$ mg/kg. Efek yang ditimbulkan adalah terjadinya abnormalitas berat, termasuk abnormalitas pada tingkah laku dan tanda klinis seperti perubahan berat badan, adanya lesi yang berat dan lain sebagainya berdasarkan efek pemberian variasi dosis rotenon (Turner et al., 2007).

Toksisitas akut pada penggunaan pestisida akan menunjukkan gejala sakit kepala, pusing, mual, muntah, iritasi kulit, kebutaan, bahkan bisa sampai tak sadarkan diri, kejang-kejang, dan meninggal. Pada toksisitas kronis dapat menimbulkan kanker, gangguan saraf, fungsi hati, ginjal, gangguan pernafasan, keguguran, dan kecacatan pada bayi (Djojosumarto, 2008).

Efek rotenon pada gangguan pertumbuhan dilaporkan oleh Wijayanti (2016) dan Ridlayanti (2016) bahwa pemberian rotenon pada zebrafish dosis 10 ppb pada hari ke-6 dapat menyebabkan stunting, tidak ditemukan kecacatan dengan survival rate sebesar 70%. Lain halnya dalam penelitian Khotimah

(2015), paparan rotenon selama 28 hari pada zebrafish dosis 5 μ g/L menunjukkan adanya signal parkinson disease yang ditandai dengan peningkatan ekspresi *a synuclein*, aktivasi caspase 9, caspase 3, dan apoptosis pada otak tengah, serta penurunan ekspresi faktor BDNF. Selain itu, pemberian

rotenon dosis 12,5 ppb pada zebrafish (2-72 hpf) dapat menyebabkan stunting melalui penurunan ekspresi *insulin like growth factor-1* (IGF-1) (Cory'ah, 2017),

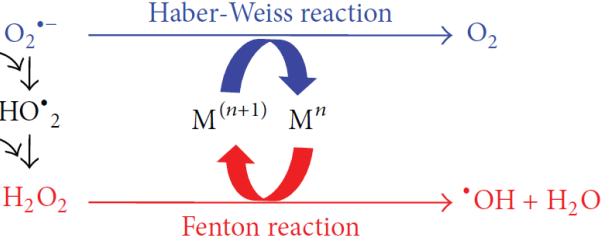
2.3 Peroksidasi Lipid

Salah satu konsekuensi dari stres oksidatif yang tidak terkendali (ketidakseimbangan antara tingkat prooksidan dan antioksidan) adalah kerusakan sel, jaringan, dan organ yang disebabkan oleh kerusakan oksidatif.

Telah lama diketahui bahwa tingkat radikal bebas atau *reactive oxygen species* (ROS) yang tinggi dapat menyebabkan kerusakan langsung pada lipid. ROS dapat dihasilkan secara endogen maupun eksogen. Sumber utama pembentukan ROS secara endogen adalah mitokondria, membran plasma, retikulum endoplasma, dan peroksisom (Moldovan & Moldovan, 2004) melalui berbagai mekanisme termasuk reaksi enzimatik dan/atau autooksidasi beberapa senyawa, seperti katekolamin dan hidrokuinon. Sumber produksi ROS secara eksogen (*in vivo*) melalui radiasi pengion, sinar ultraviolet, asap tembakau, infeksi patogen, racun lingkungan (toxin), dan paparan pestisida/insektisida (Ayala *et al.*, 2014).

Reactive oxygen species (ROS) yang dapat mempengaruhi lipid adalah radikal hidroksil (OH^{\cdot}) dan hydroperoxyl (HO_2^{\cdot}). Radikal hidroksil (OH^{\cdot}) adalah spesies oksigen aktif yang kecil, sangat *mobile*, larut dalam air, dan paling reaktif

Repository Universitas Brawijaya secara kimia. Molekul yang berumur pendek ini dapat diproduksi dari O_2 dalam metabolisme sel dan dalam berbagai kondisi stres. Sekitar 50 radikal hidroksil dihasilkan setiap detiknya oleh sel. Dalam sehari penuh, setiap sel akan menghasilkan 4 juta radikal hidroksil, yang dapat dinetralisir atau menyerang biomolekul (Lane, 2002). Radikal hidroksil menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel karena secara tidak spesifik menyerang biomolekul (Halliwell & Gutteridge, 1984) yang terletak kurang dari beberapa nanometer dari lokasi pembentukannya dan hal ini terlibat dalam beberapa gangguan seluler seperti gangguan neurodegenerasi (Venero *et al.*, 2003; Castellani *et al.*, 2004), termasuk penyakit Alzheimer (Montine *et al.*, 2005), Parkinson (Porter *et al.*, 2010), penyakit kardiovaskular (Lipinski & Pretorius, 2012), diabetes (Silverstein & Febrario, 2009), paparan alkohol kronis (Yang *et al.*, 2010), cedera paru akut (Nonas *et al.*, 2006; Imai *et al.*, 2008), dan kanker (Hammad *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010; Dizdaroglu & Jaruga, 2012; Kanno *et al.*, 2012).



Gambar 2.8 Reaksi Fenton dan Haber-Weiss. Dalam sistem biologis, diasumsikan bahwa OH^\cdot dibentuk melalui siklus redoks oleh reaksi Fenton melalui besi bebas (Fe^{2+}) yang bereaksi dengan hidrogen peroksidia (H_2O_2), dan reaksi Haber-Weiss yang akan menghasilkan Fe^{2+} , dan radikal superoksidbereaksi dengan besi (Fe^{3+}). Selain siklus redoks besi yang dijelaskan di atas, sejumlah logam transisi lainnya termasuk Cu, Ni, Co, dan V dapat bertanggung jawab untuk pembentukan radikal hidroksil (OH^\cdot) pada sel hidup (Ayala *et al.*, 2014).

Radikal hydroperoxyd (HO_2^\cdot) memainkan peran penting dalam proses peroksidasi lipid. Bentuk superoksid yang terprotonasi menghasilkan H_2O_2 dapat bereaksi dengan logam aktif redoks seperti besi (Fe) atau tembaga (Cu) untuk menghasilkan OH^\cdot melalui reaksi Fenton atau Haber-Weiss. HO_2^\cdot

merupakan oksidan yang jauh lebih kuat daripada radikal anion superoksid dan HO₂ dapat memulai proses oksidasi rantai fosfolipid *polyunsaturated*, sehingga menyebabkan kerusakan fungsi membran (Schneider *et al.*, 2008; Ayala *et al.*, 2014).

Peroksidasi lipid merupakan proses terjadinya degradasi lipid secara oksidatif. Peroksidasi lipid merupakan proses dimana radikal bebas mengikat elektron-elektron lipid pada membrane sel yang berakibat langsung pada kerusakan sel. Ada pun zat yang terlibat dalam proses peroksidasi lipid antara lain *polyunsaturated fatty acid* (PUFA), fosfolipid, glikolipid, kolesterol ester dan kolesterol. Asam lemak tak jenuh (PUFA) merupakan bahan yang paling sering terlibat dalam mekanisme oksidasi karena mengandung banyak ikatan ganda diantara molekulnya (Ayala *et al.*, 2014).

Peroksidasi lipid dapat terjadi secara enzimatis dan non-enzimatis.

Peroksidasi enzimatis dilakukan oleh 2 macam enzim yaitu lipoxygenase dan cyclooxygenase. Peroksidasi non enzimatis dapat dibagi menjadi 2 proses yaitu autooksidasi dan foto-oksidasi. Proses autooksidasi terdiri dari 3 tahap adalah inisiasi, propagasi, terminasi (Yin *et al.*, 2011; Ayala *et al.*, 2014).

1. Tahap inisiasi.

Pada tahap ini dimulainya produksi asam lemak radikal. Dimana terjadi serangan radikal bebas umumnya spesies oksigen reaktif (OH⁻) terhadap partikel lipid dan menghasilkan air (H₂O) dan asam lemak radikal (Yin *et al.*, 2011; Ayala *et al.*, 2014).

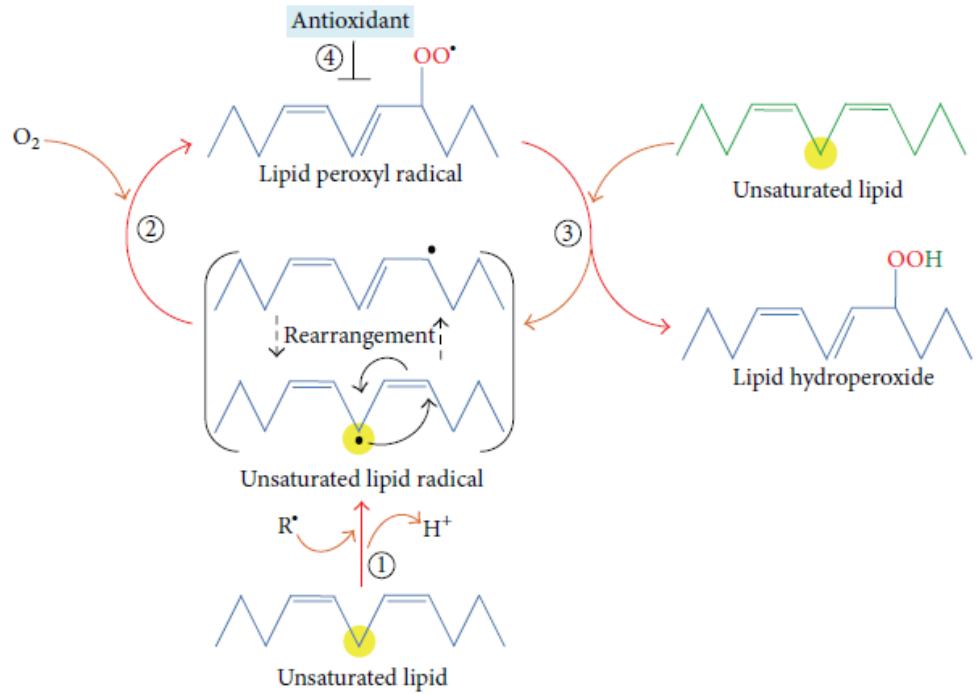
2. Tahap propagasi.

Asam lemak radikal yang dihasilkan dari proses inisiasi bersifat sangat tidak stabil dan mudah bereaksi dengan molekul oksigen dan akan menghasilkan suatu peroksi radikal asam lemak. Bahan ini juga ternyata bersifat tidak stabil

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 dan kemudian bereaksi dengan asam lemak bebas lainnya untuk menghasilkan asam lemak radikal yang baru dan dapat menghasilkan peroksidasi lipid atau peroksidasi siklik bila bereaksi dengan dirinya sendiri. Siklus ini berlanjut sedemikian rupa hingga memasuki tahap terminasi (Yin et al., 2011; Ayala et al., 2014).

3. Tahap terminasi

Ketika suatu radikal bereaksi dengan non radikal maka akan menghasilkan suatu radikal baru. Proses ini dinamakan dengan mekanisme reaksi berantai. Reaksi radikal akan berhenti bila terdapat dua radikal yang saling bereaksi dan menghasilkan suatu spesies non radikal. Hal ini hanya dapat terjadi ketika konsentrasi spesies radikal sudah sedemikian tingginya sehingga memungkinkan dua spesies radikal untuk saling bereaksi (Yin et al., 2011; Ayala et al., 2014).



Gambar 2.9 Proses Peroksidasi Lipid. Keseluruhan proses peroksidasi lipid terdiri dari tiga tahap: inisiasi, propagasi, dan terminasi. Pada fase inisiasi, prooxidan seperti radikal hidroksil memisahkan *allylic* hydrogen membentuk *carbon-centered lipid radical* (L^\cdot) (tahap 1). Pada fase propagasi, radikal lipid (L^\cdot) dengan cepat bereaksi dengan oksigen membentuk radikal lipid peroksidasi (LOO^\cdot) (tahap 2) yang memisahkan hidrogen dari molekul lipid lain yang menghasilkan radikal lipid baru (L'^\cdot) (dimana akan terjadi reaksi berantai yang berkelanjutan) dan lipid hidroperoksid

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya (LOOH) (tahap 3). Pada fase terminasi, antioksidan akan menyumbangkan atom hidrogen ke radikal lipid peroksida (LOO) membentuk produk yang non-radikal (tahap 4). Setelah peroksidasi lipid memasuki fase inisiasi, reaksi berantai dari fase propagasi akan terjadi sampai produk fase terminasi terbentuk (Yin *et al.*, 2011; Ayala *et al.*, 2014).

Membran sel kaya akan sumber *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) mudah dirusak oleh bahan-bahan pengoksidasi, proses tersebut dinamakan peroksidasi lipid. Hal ini sangat merusak karena merupakan suatu proses berkelanjutan. Komponen terpenting membran sel adalah fosfolipid, glikolipid, dan kolesterol (Ayala *et al.*, 2014).

Dua komponen pertama mengandung asam lemak tak jenuh seperti asam linoleat, linolenat dan arakidonat sangat rawan terhadap serangan-serangan radikal terutama radikal hidroksil. Akibat dari serangan radikal tersebut dapat mengakibatkan kerusakan parah membran sel sehingga membahayakan kehidupan sel (Ayala *et al.*, 2014).

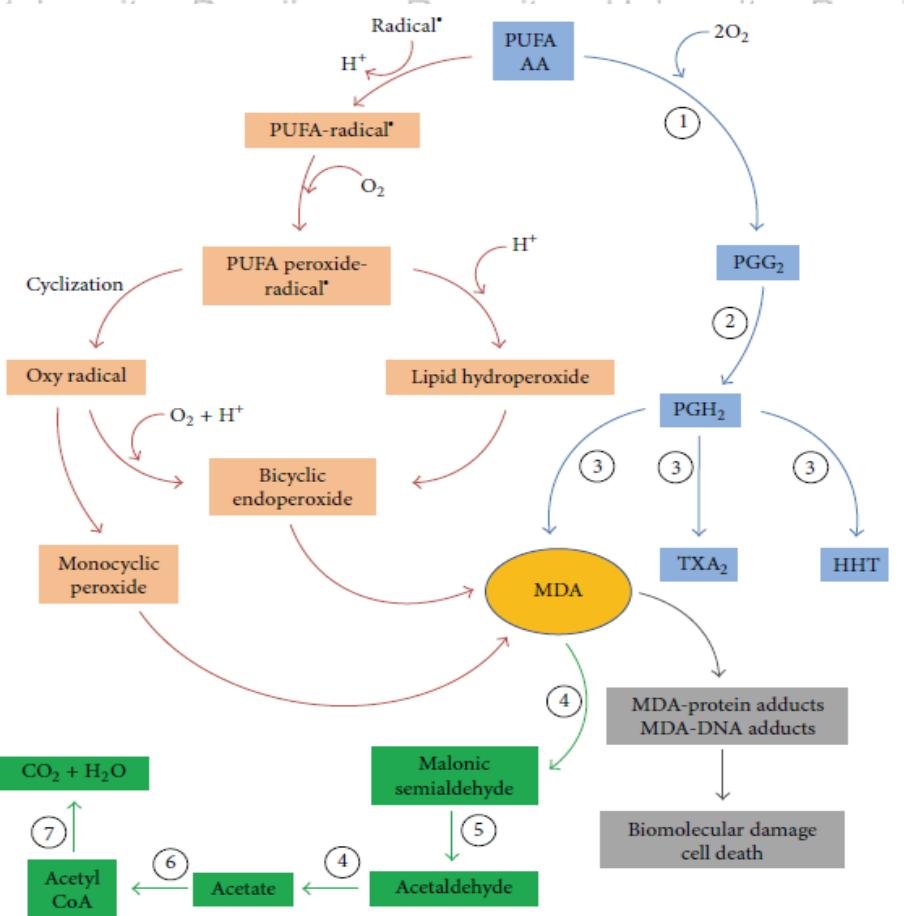
2.3.1 Malondialdehide

Malondialdehide (MDA) merupakan produk akhir yang dihasilkan dari dekomposisi asam arakidonat dan PUFA (Ayala *et al.*, 2014), melalui proses enzimatik atau nonenzimatik (Gambar 2.10). Produksi MDA oleh proses enzimatik telah diketahui tetapi fungsi biologisnya dan kemungkinan peran ganda bergantung dosisnya belum diteliti meskipun MDA secara kimia lebih stabil dan lebih permeabel daripada ROS dan kurang toksik dibandingkan 4-HNE dan methylglyoxal (MG) (Ayala *et al.*, 2014).

Malondialdehide (MDA) dapat bertindak sebagai *signaling messenger* dan pengatur ekspresi gen *islet glucose-stimulated insulin secretion* (GSIS) melalui jalur Wnt (Garcia-Ruiz *et al.*, 2002). Tingkat MDA yang cukup tinggi (5 dan 10 μM) dapat menaikkan GSIS islet, peningkatan rasio ATP/ADP dan kadar Ca^{2+} sitosol, dan mempengaruhi ekspresi gen dan produksi/aktivitas protein dari

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
regulator utama GSIS (Wang *et al.*, 2014). Dalam sel stellata hati, MDA menginduksi ekspresi gen kolagen dengan meningkatkan ekspresi gen *specificity protein-1* (Sp1) dan kadar protein Sp1 dan Sp3 (Garcia-Ruiz *et al.*, 2002). Baik Sp1 dan Sp3 dapat berinteraksi dan merekrut sejumlah besar protein termasuk kompleks inisiasi transkripsi, *histone modifying enzymes*, dan kompleks *remodeling kromatin* yang dijelaskan bahwa Sp1 dan Sp3 adalah faktor transkripsi penting dalam *remodeling kromatin* dan regulasi ekspresi gen (Li & Davie, 2010).

Malondialdehyde (MDA) diyakini berasal dari kondisi stres dan memiliki kemampuan untuk bereaksi dengan beberapa biomolekul seperti protein atau DNA, dan produksi MDA yang berlebihan telah dikaitkan dengan berbagai kondisi patologis (Baskol *et al.*, 2006; Shammugam *et al.*, 2008; Sanyal *et al.*, 2009; Paggiaro *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Garcia *et al.*, 2013), seperti penyakit kardiovaskuler, diabetes, penyakit hati, kanker, penyakit Alzheimer dan Parkinson (Ayala *et al.*, 2014).



Gambar 2.10 Pembentukan dan Metabolisme Malondialdehida (MDA).

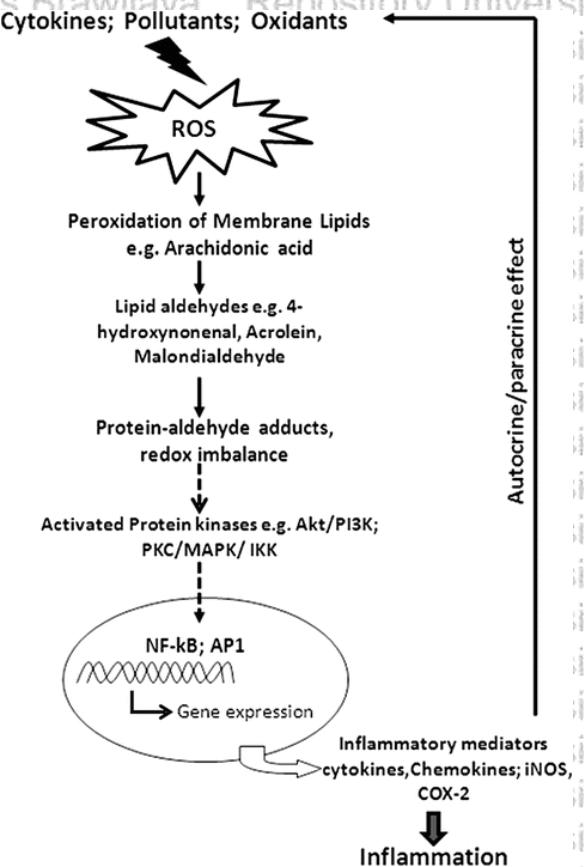
MDA dapat dihasilkan secara *in vivo* melalui dekomposisi dari asam arakidonat (AA) dan PUFA oleh proses enzimatik selama proses biosintesis dari *thromboxane A2* (TXA₂) dan *12-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid* (HHT) (jalur biru), atau melalui proses nonenzimatik oleh *bicyclic endoperoxides* yang dihasilkan selama peroksidasi lipid (jalur merah). MDA yang terbentuk dapat dimetabolisme secara enzimatik (jalur hijau). Enzim kunci yang terlibat dalam pembentukan dan metabolisme MDA: *cyclooxygenases* (1), *prostacyclin hydroperoxidase* (2), *thromboxane synthase* (3), *aldehyde dehydrogenase* (4), *decarboxylase* (5), *acetyl CoA synthase* (6), dan siklus asam trikarboksilat (7) (Ayala *et al.*, 2014).

Malondialdehida (MDA) terbentuk akibat degradasi radikal bebas hidroksil (OH⁻) terhadap PUFA yang nantinya ditransformasi menjadi radikal yang sangat reaktif. Proses terbentuknya MDA dapat dijelaskan sebagai berikut, radikal bebas oksigen (O₂) diproduksi melalui proses enzimatik dan non enzimatik. Sel-sel tubuh yang dapat membentuk radikal bebas oksigen dan H₂O₂ adalah sel polimorfonuklir, monosit dan makrofag (Yin *et al.*, 2011).

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Radikal bebas yang terbentuk akan bereaksi dengan SOD dan ion Cu²⁺ menjadi H₂O₂. Hidrogen peroksida (H₂O₂) ini banyak diproduksi di mitokondria dan mikrosom dan yang penting H₂O₂ ini dapat menembus membran sel. Sebagai sistem pertahanan tubuh, H₂O₂ oleh katalase dapat diubah menjadi H₂O dan O₂. Hidrogen peroksida ini merupakan oksidan yang kuat oleh karena dapat bereaksi dengan berbagai senyawa. Selain itu H₂O₂ oleh enzim glutation peroksidase diubah menjadi H₂O. Pada stres oksidatif terbentuk radikal bebas oksigen dan H₂O₂ yang berlebih, sehingga sistem proteksi tubuh seperti enzim katalase dan glutation peroksidase tidak dapat lagi menetralkan semua radikal bebas oksigen yang terbentuk (Yin *et al.*, 2011).

Selanjutnya jika H₂O₂ bereaksi dengan Fe²⁺ dan Cu²⁺ maka terbentuklah radikal bebas hidroksil melalui reaksi Fenton dan Haber-Weiss. Radikal hidroksil adalah spesies yang sangat reaktif. Membran sel terdiri dari banyak komponen penting yaitu fosfolipid, glikolipid, (keduanya mengandung asam lemak tak jenuh) dan kolesterol. Asam lemak tak jenuh ini sangat peka terhadap radikal hidroksil (Yin *et al.*, 2011). Kemampuan radikal hidroksil ini akan membentuk reaksi rantai dengan satu atom hidrogen dari membran sel dan terbentuk peroksidasi lipid. Kelanjutan dari reaksi ini adalah terputusnya rantai asam lemah menjadi senyawa aldehid yang memiliki daya perusak yang tinggi terhadap sel-sel tubuh antara lain malondialdehid, 4-hidroksinenal, etana dan pentana. Demikian pula dengan DNA dan protein juga mengalami kerusakan yang seringkali cukup hebat (Yin *et al.*, 2011).

Malondialdehide merupakan senyawa yang dapat menggambarkan aktivitas radikal bebas di dalam sel sehingga dijadikan sebagai salah satu petunjuk terjadinya stres oksidatif akibat radikal bebas (Asni *et al.*, 2009). Rahardjani (2010) memperkuat pernyataan tersebut dengan menyatakan bahwa



Gambar 2.11 Regulasi Persinyalan Inflamasi yang Diinduksi oleh Lipid Aldehid. Lipid aldehid yang terbentuk akibat proses peroksidasi lipid dapat mengaktifkan sinyal-sinyal kinase dan mengubah jalur pensinyalan redoks menghasilkan sitotoksitas seperti proliferasi sel yang berlebihan atau kematian sel (Yadav, 2015).

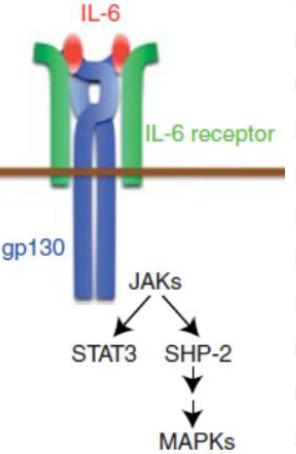
2.3.3 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) merupakan sebuah mediator pleiotropik dan berperan pada beberapa fungsi yang dilakukan oleh tubuh, seperti inflamasi, respon imun, dan hematopoiesis. IL-6 diproduksi oleh berbagai macam jenis sel, seperti makrofag, sel endotel, sel glia, keratinoosit, fibroblas, dan berperan dalam hematopoiesis, respon fase akut, proses metabolismik, dan neurogenesis (Spooren et al., 2011). IL-6 merupakan sitokin proinflamasi, dan miokin antiinflamasi. Pada tahap awal inflamasi, IL-6 diproduksi pada lesi lokal, masuk dalam aliran darah, dan menyebabkan peningkatan protein-protein fase akut, seperti *C-reactive protein* (CRP), serum amyloid (SAA), fibrinogen, haptoglobin dan $\alpha 1$ -antichymotrypsin. Tetapi fibronectin, albumin, dan transferrin mengalami penurunan akibat peningkatan IL-6 ini. Fe serum juga mengalami penurunan akibat peningkatan IL-6, karena IL-6 menyebabkan pembentukan hepcidin, yang akan menghambat ferroportin 1 yang berperan sebagai transporter Fe (Tanaka et al., 2014).

Interleukin-6 akan diproduksi pada beberapa keadaan, seperti saat adanya lesi infeksius. Saat terjadi infeksi, IL-6 akan diproduksi dan memberi sinyal pada seluruh tubuh. Saat *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) dikenali pada lesi infeksi oleh *pathogen-recognition receptors* (PRR) yang dimiliki oleh sel imun seperti monosit dan makrofag, akan terjadi aktivasi *signalling pathway*, termasuk NF- κ B, dan akan meningkatkan transkripsi mRNA sitokin inflamasi, seperti IL-6, *tumor necrosis factor* (TNF)- α , dan IL-1 β . TNF- α , dan IL-1 β sendiri dapat pula mengaktifkan faktor transkripsi untuk memproduksi IL-6. IL-6 juga diproduksi saat terjadi kerusakan jaringan. *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) yang dilepaskan oleh sel yang mengalami kerusakan/kematian akan mendukung inflamasi. DAMPs dari sel yang mengalami kerusakan tersusun atas beberapa molekul, seperti *mitochondrial* (mt) DNA, *high mobility group box* 1

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya (HMGB1), dan S100 proteins (Bianchi, 2006). mtDNA sendiri merangsang aktivasi TLR9 dan NF-K β , sedangkan ikatan antara HMGB1 pada TLR2, TLR4, dan *receptor of advanced glycation end products* (RAGE) dapat merangsang proses inflamasi (Tanaka *et al.*, 2014).

Reseptor IL-6 tersusun atas IL-6 *binding chain* yang tersusun atas 2 komponen, yaitu komponen transmembran yang berukuran 80 kDa, dan komponen solabel yang berukuran 50-55 kDa (SIL-6r), sedangkan gp130 merupakan *signal-transducing chain*. Protein-protein ini tergolong dalam famili reseptor dengan motif Trp-Ser-X-Trp-Ser. SIL-6 ada pada serum manusia, dan setelah IL-6 berikatan dengan SIL-6, akan terjadi induksi sinyal IL-6 pada sel yang mengekspresikan gp130. Setelah terjadi ikatan antara IL-6 dengan IL-6R, kompleks IL-6/IL-6R menginduksi homodimerisasi gp130 dan memicu kaskade sinyal. Teraktivasinya gp130 akan mengaktifasi molekul *signaling* lainnya, yaitu *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3 (JAK-STAT3)* dan *JAK-SHP2-mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway* (Tanaka *et al.*, 2014).



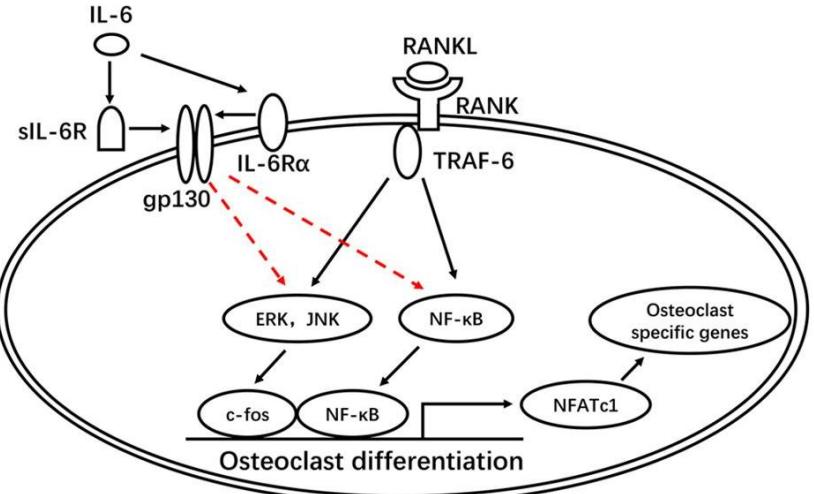
Gambar 2.12 Sistem reseptor IL-6. IL-6 berikatan dengan IL-6R solabel dan transmembran, kemudian menginduksi homodimerisasi gp130, yang akan mengaktifasi sistem persinyalan JAK-STAT3 dan JAK-SHP2-MAPK (Tanaka *et al.*, 2014)

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Interleukin-6 dan reseptornya memiliki peran penting dalam hematopoiesis, pertumbuhan, perkembangan, dan aktivasi beberapa jenis sel. Termasuk *zebrafish* juga memiliki IL-6 yang berfungsi sama seperti dengan yang dimiliki oleh manusia. Ekspresi IL-6, IL-6R, dan gp130 pada larva *zebrafish* yang berusia 2-3 day post fertilisation (dpf) menunjukkan bahwa IL-6 diperlukan oleh *zebrafish* untuk melakukan aktivitas biologis. Varela *et al.* (2012) menyatakan bahwa *zebrafish* memiliki IL-6, dan karakteristiknya memiliki kesamaan dengan IL-6 pada vertebrata lainnya. Ekspresi IL-6 pada tahap awal kehidupan larya *zebrafish*, dan pola ekspresinya setelah terdapat rangsang imun menunjukkan adanya kemiripan dengan sitokin proinflamasi lainnya, sehingga *zebrafish* dapat digunakan untuk model studi yang melibatkan IL-6 dan reseptornya.

2.3.3.1 Peran IL-6 pada Pertumbuhan Tulang

Pertumbuhan tulang diatur oleh osteoklas, osteoblas, dan osteosit, dan osteosit terdiri dari sekitar 90–95% sel dalam jaringan tulang (Bonewald, 2011).

Osteoblas mengatur pembentukan tulang dan dapat berdiferensiasi menjadi osteosit, yang dapat mensekresi *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), RANKL, dan osteoprotegerin (OPG) dalam matriks tulang, mengatur pembentukan osteoklas dan mempengaruhi resorpsi tulang (Nakashima *et al.*, 2011). RANKL memainkan peran kunci dalam pertumbuhan dan pemeliharaan tulang, dan diekspresikan dalam berbagai jenis sel, termasuk fibroblas, limfosit dan osteosit (Hanada *et al.*, 2011). Osteosit mengatur aktivitas osteoblas dan osteoklas, serta bertindak sebagai faktor kunci dari remodeling tulang (Bonewald, 2011; Xiong *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2015).



Gambar 2.13 Diagram Skematis Regulasi IL-6/SIL-6R dan Aktivitas Osteoklas yang Diinduksi RANKL.

Interaksi RANKL-RANK mengaktifkan jalur pensinyalan downstream seperti NF-κB, MAPK (p38, ERK dan JNK) dan Akt, yang akan menginisiasi ekspresi faktor transkripsi osteoklas seperti NFATc1, c-fos dan *osteoclast specific genes*, sehingga terbentuk osteoklas matur dengan aktivitas resorpsi tulang yang poten. IL-6/SIL-6R secara berbeda mengatur pembentukan osteoklas yang diinduksi RANKL melalui modulasi fosforilasi NF-κB, ERK dan JNK. Proses ini bergantung dengan konsentrasi RANKL, seperti efek stimulasi ketika RANKL dalam kadar rendah, dan efek penghambatan ketika kadar RANKL tinggi (Maggio *et al.*, 2013).

Interleukin-6 dapat menginduksi resorpsi tulang dan secara langsung meningkatkan pembentukan osteoklas (Kishimoto, 1989; Romas *et al.*, 1996). IL-

6 merangsang produksi RANKL dalam sel osteoblastik dengan aktivasi *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) untuk meningkatkan

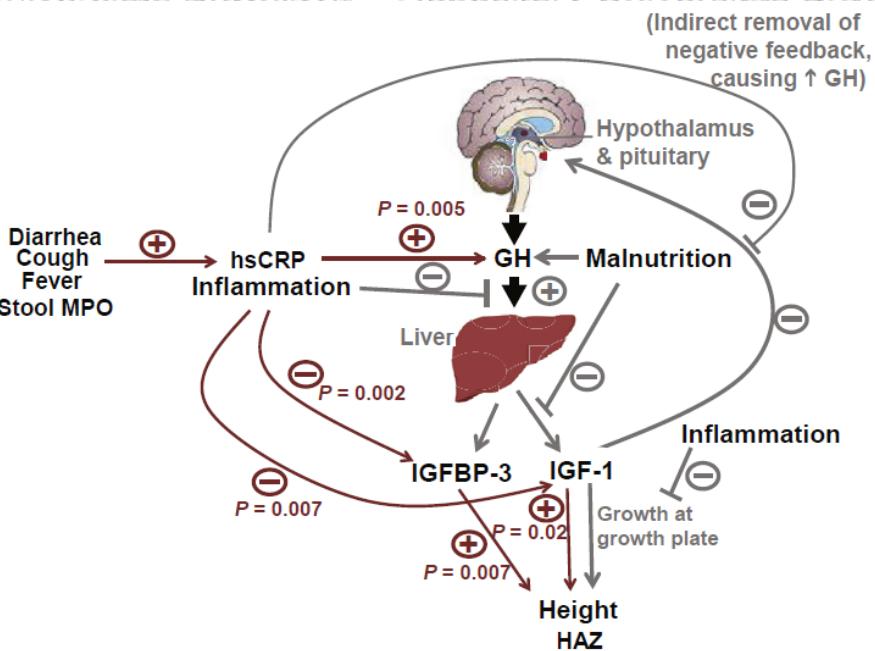
osteoklastogenesis (Tamura *et al.*, 1993; O'Brien *et al.*, 1999). Ikatan IL-6/IL-6R dan gp130 dapat mengaktifkan *Janus activated kinase* (JAK). JAK menginduksi

proses fosforilasi dari STAT3 (Mori *et al.*, 2011). Penelitian oleh Choe *et al* (2013) menunjukkan bahwa ekspresi RANKL meningkat pada aktivasi JAK dan

STAT3. IL-6 dan IL-6R meningkatkan ekspresi mRNA RANKL dan rasio ekspresi RANKL/OPG (Wu *et al.*, 2017)

2.3.3.2 Peran IL-6 pada Hormon Pertumbuhan

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) merupakan hormon yang diproduksi terutama oleh hati dan merupakan *growth factor* yang memiliki efek untuk merangsang pertumbuhan (De-Benedetti *et al.*, 1997). Penurunan kadar IGF-1 telah dilaporkan baik dalam kondisi malnutrisi (Thissen *et al.*, 1994; Scacchi *et al.*, 2003; Bartz *et al.*, 2014) maupun inflamasi sistemik (Fan *et al.*, 1995; De-Benedetti *et al.*, 1997; DiFedele *et al.*, 2005). Paparan inflamasi kronis selama kehidupan janin dan pasca-kelahiran menjadi salah satu penyebab *stunting* pada anak di samping nutrisi yang tidak adekuat. Inflamasi kronis dapat menekan produksi *growth factor* seperti IGF-1 dan mengganggu axis dari hormon pertumbuhan (GH) di awal kehidupan (Prendergast *et al.*, 2014).



Gambar 2.14 Model Konseptual Pengaruh Inflamasi terhadap Regulasi Axis GH-IGF-1.

Garis berwarna abu-abu menggambarkan asosiasi dari studi preklinik dan garis berwarna merah menggambarkan temuan dari penelitian yang dilakukan oleh DeBoer *et al* (2017). Efek stimulasi atau asosiasi positif ditunjukkan tanda (+); penghambatan atau asosiasi negatif ditunjukkan dengan (-). Studi preklinik (garis abu-abu) menunjukkan pengaruh inflamasi menginduksi resistensi GH, menghasilkan penurunan ekspresi IGF-1 dan IGFBP-3; menyebabkan peningkatan sirkulasi GH melalui hilangnya umpan balik negatif IGF-1 pada axis GH. IGF-1 adalah mediator kunci dari kerja axis GH pada pertumbuhan linier. Analisis dari kelompok penelitian DeBoer *et al*

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 (2017) menemukan beberapa korelasi (panah merah, dengan *p-values*) yang konsisten dengan konsep ini. Kadar hsCRP lebih tinggi pada anak dengan gejala/sakit dan berhubungan positif dengan MPO tinja. Seperti yang diharapkan dari model, hsCRP secara positif terkait dengan GH, dan berhubungan negatif dengan IGF-1 dan IGFBP-3. IGF-1 dan IGFBP-3 berhubungan positif dengan HAZ dan tidak bergantung pada kadar hsCRP. GH, hormon pertumbuhan; HAZ, *height-for-age*; hsCRP, *high-sensitivity C-reactive protein*; IGF, *insulin-like growth factor*; IGFBP, *IGF binding protein*; MPO, *myeloperoxidase* (DeBoer *et al.*, 2017).

Model preklinik dari penyakit inflamasi telah menunjukkan hubungan langsung antara inflamasi sistemik, sinyal GH, dan pertumbuhan linear (Wong *et al.*, 2016). Inflamasi sistemik berhubungan dengan resistansi GH yang dibuktikan dengan kadar GH sistemik yang tinggi (Ballinger *et al.*, 2001), kadar sistemik IGF-1 dan *insulin-like growth factor binding protein-3* (IGFBP-3) yang rendah, serta pertumbuhan linear yang terhambat (DiFedele *et al.*, 2005).

Pada studi anak-anak dengan inflamasi kronis, kadar IL-6 dan TNF- α telah dikaitkan dengan berkurangnya kadar IGF-1 dan pertumbuhan linear yang buruk (Ballinger, 2002). Didapatkan peningkatan kadar IL-6, TNF- α dan CRP pada anak *stunting* dibandingkan dengan kelompok sehat (AbdEl-Maksoud *et al.*, 2017).

Interleukin-6 dianggap sebagai induser penting dalam sintesis protein fase akut oleh sel hepatosit (Gauldie *et al.*, 1992). Pada masa kanak-kanak, inflamasi kronis dan kadar IL-6 yang berlebihan menyebabkan gangguan pertumbuhan yang menyebabkan *stunting*. IL-6 juga menurunkan ekspresi gen IGF-1 di hati dan meningkatkan degradasi proteolitik dari IGFBP-3 (De-Benedetti *et al.*, 1997; AbdEl-Maksoud *et al.*, 2017). Produksi IL-6 yang berkepanjangan dan berlebihan pada anak yang malnutrisi dapat mengganggu pertumbuhan linear dengan menurunkan sirkulasi IGF-1 (De-Benedetti *et al.*, 1997). Sederquist *et al* (2014) menemukan bahwa beberapa sitokin inflamasi termasuk TNF- α dan IL-6 dapat bertindak secara individu ataupun kombinasi dalam mempengaruhi pertumbuhan linear anak.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

2.4. Zebrafish (*Danio rerio*)

2.4.1 Morfologi dan Taksonomi Zebrafish



Gambar 2.15 Zebrafish (*Danio rerio*) (unpublish). Zebrafish memiliki garis-garis hitam pada kulit bagian tubuh luarnya yang tampak dari sirip (anal fin) hingga ekor (caudal fin) seperti zebra (Schilling, 2002).

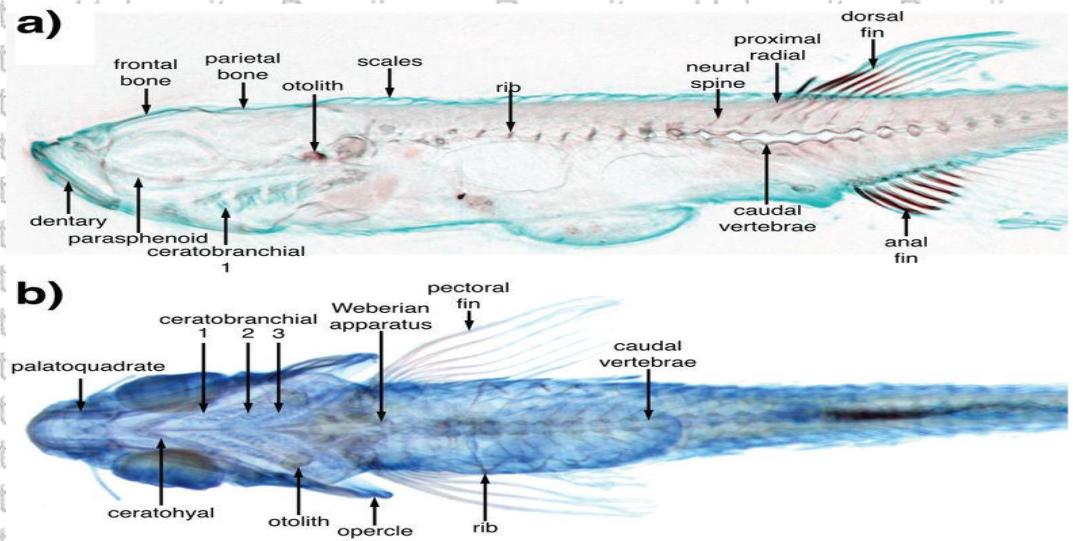
Zebrafish atau *Danio rerio* merupakan spesies ikan air tawar yang banyak ditemukan di wilayah tropis seperti Asia Selatan, dan Pasifik, berasal dari perairan di sungai gangga bagian timur India, Burma, dan Bangladesh. Habitat alaminya di air yang tenang, seperti di sungai, kolam, dan sawah dengan temperatur air sekitar 26-32°C (Engeszer *et al.*, 2007; Spence *et al.*, 2008).

Taksonomi zebrafish diuraikan pada tabel dibawah ini.

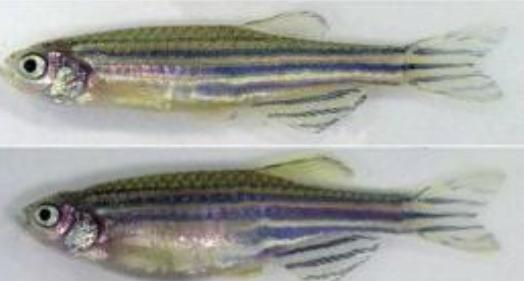
Tabel 2.3 Taksonomi Zebrafish (Spence *et al.*, 2008)

| Klasifikasi | Nama |
|-------------|--------------------|
| Kingdom | Animalia |
| Phylum | Chordata |
| Class | Actinopterygii |
| Order | Cyprinoformes |
| Family | Cyprinidae |
| Subfamily | Rasborinae |
| Genus | Danio |
| Spesies | <i>Danio rerio</i> |

Ciri zebrafish dewasa yaitu tubuh bagian luar, pada kulitnya terdapat garis-garis hitam putih yang tampak dari sirip hingga ekor (seperti zebra). Pada jenis *wildtype*, warna kulit yang terlihat biru kehitaman yang berisi sel pigmen melanophores dan iridophores, memiliki panjang maksimal kurang dari 5 cm atau 40 mm (DeTolla *et al.*, 1995; Schilling, 2002).



Gambar 2.16 Anatomi zebrafish (Bryson-Richardson et al., 2007). Pengukuran panjang badan (*standard length*) dimulai dari ujung hidung (*tip of the snout*) sampai dengan ujung ekor (*caudal fin*) (Spence et al., 2008).



Gambar 2.17 Zebrafish jantan (atas) dan zebrafish betina (bawah) (Avdesh et al., 2012). Zebrafish jantan memiliki karakteristik lebih kecil dan tampak kurus di daerah abdomen dan cenderung memancarkan warna merah muda-kekuningan di sirip samping dan ekor, warna strip biru lebih gelap, lebih aktif, sedangkan betina lebih besar dan memiliki perut dengan bentuk yang lebih bulat, berwarna putih, memancarkan warna putih kebiruan dan terdapat strip berwarna silver diantara strip biru (Schilling, 2002; Reed & Jennings, 2011).

Survival rate zebrafish di habitat asli berkisar antara 1-2 tahun karena adanya predator atau parasit, namun zebrafish yang dipelihara di laboratorium

dapat bertahan hingga berusia maksimal 5 tahun. Kematangan reproduksi zebrafish sekitar usia 3-4 bulan dengan produksi telur 200-300 telur teratur setiap

minggu (Liew & Orban, 2013). Pada usia lebih dari 2 tahun kemampuan reproduksinya telah menurun (Gerhard et al., 2002; Spence et al., 2008).

2.4.2 Perkembangan Zebrafish

Perkembangan zebrafish dapat dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan. Tahap awal perkembangan dimulai sejak 24 jam post fertilisasi. Larva akan *hatching* (lepas dari korion) pada hari ketiga, dimana pergerakan masih belum aktif, immobilitas didasar, tidak terapung dan sudah ada gerakan ekor. Pada hari kelima post fertilisasi, larva akan mengambang, dapat berenang dan mengambil udara di permukaan. Setelah itu, larva akan terus berkembang hingga mencapai dewasa dengan penampilan karakteristik seksualitas sekunder yang siap untuk fertilisasi (Parichy *et al.*, 2009).

Pertumbuhan mulai berkurang setelah 3 bulan *post-hatching* dan berhenti saat usia zebrafish 18 bulan *post-hatching* (Spence *et al.*, 2008).

Tabel 2.4 Tahap perkembangan embrio *Danio rerio* hingga 72 hpf (Kimmel *et al.*, 1995)

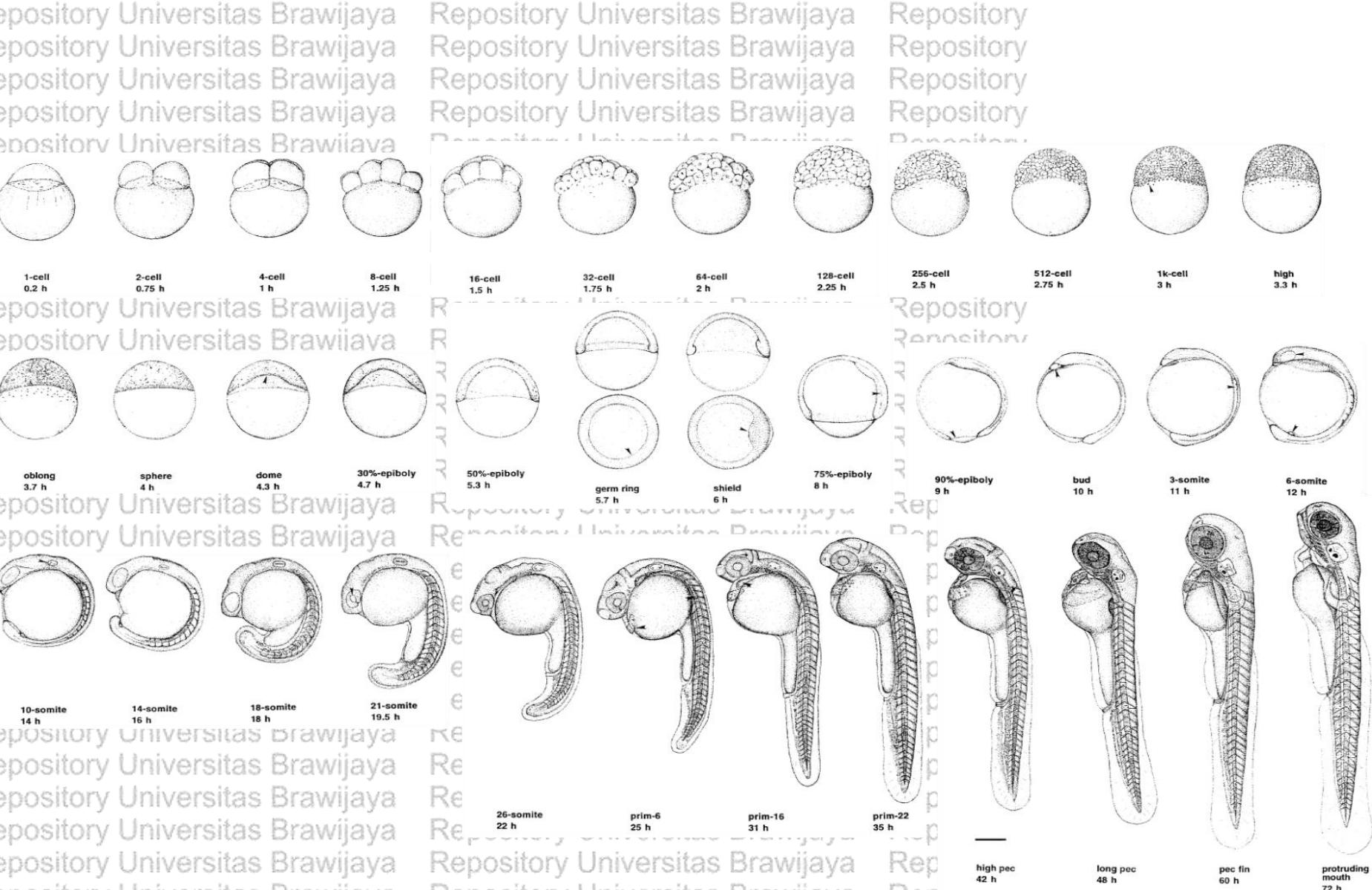
| Periode Perkembangan | hpf | Deskripsi |
|----------------------|---|--|
| Zigot | - 1 sel | 0 Terdapat aliran sitoplasma yang menuju ke animal pole untuk membentuk blastodisk |
| Pembelahan | - 2 sel - 4 sel - 8 sel - 16 sel - 32 sel | $\frac{3}{4}$ Pembelahan sebagian Blastomer dengan susunan 2×2 $1 \frac{1}{4}$ Blastomer dengan susunan 2×4 $1 \frac{1}{2}$ Blastomer dengan susunan 4×4 Dua tingkat blastomer, kadang — kadang dengan susunan 4×8 |
| | - 64 sel | 2 Tiga tingkat blastomer |
| Blastula | - 128 sel - 256 sel - 512 sel - 1K sel - High | $2 \frac{1}{4}$ Lima tingkat blastomer, dengan bidang pembelahan mulai irreguler $2 \frac{1}{2}$ Tujuh tingkat blastomer $2 \frac{3}{4}$ Sembilan tingkat blastomer; terbentuk YSL 3 Sebelas tingkat blastomer; perkembangan sel pada blastodisk bersifat asinkron $3 \frac{1}{3}$ >11 tingkat blastomer; blastomer mulai mendatar Pendataran blastomer menjadikan bentuk embrio menjadi elips |
| | - Oblong - Sferis - Kubah | $3 \frac{2}{3}$ Bentuk embrio bulat sempurna 4 Terjadi pembesaran yolk menuju ke animal pole ketika epiboli dimulai $4 \frac{1}{3}$ Blastoderm berbentuk seperti mangkok yang terbalik, dengan jarak mencapai 30% antara animal dan vegetal pole |
| | - Epiboli 30% | $4 \frac{2}{3}$ |

| | | | |
|------------|---|--|---|
| Gastrula | - Epiboli 50% - Germ ring - Shield - Epiboli 75% - Epiboli 90% - Bud | 5 1/4 5 2/3 6 8 9 10 | Ketebalan blastoderm sama rata Germ ring mulai terlihat pada animal pole Pelindung embrio terlihat pada animal pole Sisi dorsal menebal; zona epiblas, hipoblas, dan zona evakuasi terlihat Rudimen otak mulai terbentuk dan menebal; rudimen notochord terpisah dari segmental plate Tunas ekor terlihat menonjol; epiboli 100% |
| Segmentasi | - 1 somit - 5 somit - 14 somit - 20 somit - 26 somit - Prim 5 | 10 1/3 11 2/3 16 19 22 24 | Parit somit yang pertama terbentuk Tonjolan – tonjolan otot polos mulai terbentuk; terbentuk vesikel optik dan kupffer yang diperkirakan merupakan rudimen alantois mulai terbentuk PE = 0,9 mm; cikal bakal telinga terbentuk; neuromer otak terbentuk; somit berbentuk V; YE terbentuk PE = 1,4 mm; YE/YB > 0,5 dan < 1; otot mulai berkedut; kelokan rhombus mulai terbentuk; terbentuk lensa dan vesikel telinga; neuromer otak belakang menonjol; ekor lurus PE = 1,6 mm; HTA = 125°; terbentuk ototil PE = 1,9 mm; HTA = 120°; YE/YB = 1; pigmentasi pada retina dan kulit dimulai; terdapat sel darah merah pada yolk sac; jantung mulai terlihat berdenyut; jantung berbentuk seperti kerucut dibawah otak |
| | - Prim 15 | 30 | PE = 2,5 mm; HTA = 95°; YE/YB > 1; YB/HD = 2; mulai muncul refleks terhadap sentuhan; retina berpigmen; strip dorsal hingga ke somit 12; sirkulasi masih lemah; jantung masih berupa saluran yang lurus; vena kaudal teranyam; ekor lurus |
| | - Prim 25 | 36 | PE = 2,7 mm; HTA = 75°; PF(H/W) = ¾ ; embrio mulai motil; pigmentasi ekor dan strip ventral; arkus aorta 1 pasang; jantung menjadi sedikit tertekuk; arteri kaudal mencapai ¾ panjang ekor |
| | - High pec | 42 | PE = 2,9 mm; HTA = 55°; YE/YB = 1,5; YB/HD < 1,3; PF(H/W) = 1; terdapat xanthophore pada kepala, iridophore di retina; perikardium menonjol; lekukan jantung menonjol; mulai terlihat atrium dan ventrikel; denyut jantung sekitar 180 x / menit, dengan denyut atrium mendahului denyut ventrikel |
| Penetasan | - Long pec - Pec fin - Protruding mouth | 48 60 72 | PE = 3,1 mm; HTA = 45°; PF(H/W) = 2; strip dorsal dan ventral bertemu di ekor; melanophore pada strip lateral; iridophore banyak di retina PE = 3,3 mm; HTA = 35°; gerakan sangat cepat; melanophore pada strip lateral mencapai 10; iridophore pada strip dorsal; denyut jantung kuat, dan terisi oleh darah yang bersirkulasi PE = 3,5 mm; HTA = 25°; mulut terbuka lebar menonjol ke anterior ke arah mata; iridophore pada strip yolk; mata tertutup sebagian dengan iridophore; tubuh bagian dorsal berwarna kuning sama seperti kepala |

Tabel 2.5 Tahap perkembangan *Danio rerio* mulai larva hingga dewasa (Kimmel et al, 1995; Parichy et al., 2009; Reed & Jennings, 2011)

| Periode | Waktu | Deskripsi |
|----------------------|----------------|--|
| <i>Early larvae</i> | | |
| | 72 hpf / 3 dpf | Mulut membuka mulai dari anterior ke mata; <i>iridophores</i> pada <i>yolk stripe</i> dan setengah dari mata; adanya tunas filamen insang; tulang rawan di lengkungan dan <i>pectoral girdle</i> ; <i>operculum rudiment</i> ; <i>cleithrum</i> ; intestinal yang motil. Kandung kemih mengembang; mulai mencari makanan, dan aktif bergerak menjauh jika disentuh; badan tegak lurus; ada respon optokinetic. |
| | 5 dpf | <i>Swim bladder inflates</i> ; aktif makan; <i>pronephric tubules</i> |
| | 7 dpf | Strip ekor dekat; tulang rawan di tulang belakang anterior; 3 garis batang <i>neuromast</i> . |
| <i>Mid larvae</i> | | |
| | 14 dpf | Pertama <i>hypural cartilage</i> pada strip ekor; saraf (neuron) <i>Rohon-Bread</i> sempurna ditempatkan oleh <i>dorsal root ganglia</i> . Kandung kemih mulai berenang; mulai mencari makanan; nampak pertumbuhan. |
| | 21 dpf | Osisifikasi skeleton faringeal; radial pada sirip pectoral; dorsal dan tunas strip anal |
| <i>Juvenile</i> | | |
| | 30 dpf | Sirip dewasa dan muncul pola pigmentasi pada kulit. |
| | 45 dpf | 7 <i>hypural cartilage</i> pada sirip ekor; terbentuknya <i>old mid body lateral line shifts ventrally</i> dan <i>new mid-body line</i> ; <i>kidney haematopoietic</i> ; <i>mesonephros replaces pronephros</i> |
| <i>Adults</i> | | |
| - <i>Early adult</i> | 90 dpf | Maturasi sexual dan siap kawin |
| | 1000 dpf | Mati |

Keterangan : hpf, hour post fertilization; dpf, day post fertilization.



Gambar 2.18 Tahap perkembangan embrio *Danio rerio* hingga 72 hpf (Kimmel et al, 1995)

2.4.3 Zebrafish sebagai Model Penelitian

Zebrafish merupakan salah satu model penelitian yang dianggap sangat cocok untuk perkembangan biologi karena tingkat reproduksinya yang tinggi, tahap larva yang transparan sehingga mudah diamati, waktu *hatching* pendek, dan mudah penanganannya (Eisen, 1996). *Zebrafish* memiliki 70% kesamaan gen secara ortolog dengan manusia, dan 80% gen yang dianalisa dengan expressed sequence tags (ESTs) menunjukkan 2 atau lebih gen saling berhubungan (Barbazuk et al., 2000; Scholz et al., 2008; Santoriello & Zon, 2012; Chitramuthu, 2013). Oleh karena itu, *zebrafish* banyak digunakan untuk penelitian neurobiologi, genetik (Westerfield, 1995), perkembangan seluler dan penyakit pada manusia (Vacaru et al., 2014) seperti kanker, kardiovaskuler, hemofilia, osteoporosis, ginjal, hati, central nervous system (CNS) (Kabashi et al., 2011), penyakit yang terkait dengan gen, stres oksidatif, penyakit imunitas, *stem cell*, alzheimer, bakteri, virus, dan pengembangan vaksin (Hsu et al., 2002). *Zebrafish* memiliki tingkat sensitifitas yang tinggi, sehingga digunakan untuk model penelitian terhadap toksitas bahan kimia atau obat (Hill et al, 2005). Dalam penelitian Khotimah et al (2015), paparan pestisida rotenon 10 µg/L dapat menyebabkan kematian pada *zebrafish* setelah 48 jam pemberian, sedangkan menurut Padilla et al (2012), efek toksik rotenon pada perkembangan embrio *zebrafish* pada medium aktivitas konsentrasi (AC_{50}) sebesar $<0,0014 \mu M$.

Sorribes (2013) melakukan penelitian untuk membandingkan analogi usia *zebrafish* dibandingkan dengan manusia berdasarkan ontogeni siklus bangun-tidur. Hasil penelitian menunjukkan usia 6-10 hari pada ikan zebra analog dengan usia anak-anak 2-8 tahun. Usia 4-6 minggu pada ikan zebra analog dengan usia 11-16 tahun pada manusia pra-remaja dan remaja. Usia dewasa awal 4-6 bulan pada ikan zebra analog dengan usia manusia 23-43 tahun.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Sedangkan dewasa lanjut berusia 50 tahun keatas (49-74 tahun) analog dengan usia 12 bulan pada ikan zebra (Sorribes, 2013).
Zebrafish juga dapat digunakan sebagai model penelitian perkembangan sistem skeletal karena memiliki karakteristik pertumbuhan tulang yang cepat, struktur tulang sederhana, perkembangan embrionik secara eksternal dan tubuh transparan sehingga memudahkan untuk mengobservasi morfologi tulang pada embrio hidup (Witten & Huysseune, 2009; Andreeva *et al.*, 2011). Disebutkan bahwa paparan rotenon dengan dosis 10 ppb pada zebrafish usia 2-72 hpf dapat menyebabkan larva zebrafish menjadi *stunting* yaitu panjang badan dibawah -2 SD melalui ekspresi BDNF yang menurun dibanding dengan larva zebrafish kontrol, dan tidak ditemukan kecacatan dengan *survival rate* sebesar 70% (Wijayanti, 2016; Ridlayanti, 2016). Zebrafish yang mengalami toksisitas memiliki ciri – ciri *yolk sac* lebih gelap, *yolk* membesar dari ukuran biasanya, tidak ada pigmentasi, bentuk secara keseluruhan mengalami retardasi, mata dan otak tidak berkembang, dan tingkat toksik menyebabkan permukaan *yolk sac* kuning, kasar, dan melebar (Macdonald *et al.*, 2016).

2.5 Kelor (*Moringa oleifera*)

Kelor (*Moringa oleifera*) merupakan salah satu spesies dari 13 spesies lain genus Moringa. Spesies *Moringa oleifera* ini merupakan spesies asli dari India Utara, Pakistan, dan Nepal dengan tinggi dapat mencapai 12 meter dan berbatang lunak (Leone *et al.*, 2015). Tanaman ini dapat tumbuh di negara tropis dan subtropis (Kholfi *et al.*, 2015), salah satunya di Indonesia. Walaupun berasal asli dari India Utara, tanaman ini banyak ditemukan di Timur Tengah, Afrika, dan Asia karena memiliki kandungan nutrisi yang cukup tinggi dan manfaat yang cukup banyak seperti sayur atau obat (Leone *et al.*, 2015). Daun dan bunga dari kelor (*Moringa oleifera*) dapat dijadikan sebagai makanan/suplemen dan memiliki

| Klasifikasi | Nama |
|-------------|------------------------------|
| Kingdom | Plantae |
| Division | Magnoliophyta |
| Class | Magnoliopsida |
| Subclass | Dilleniidae |
| Order | Capparales |
| Family | Moringaceae |
| Genus | Moringa |
| Species | <i>Moringa oleifera</i> Lam. |



Gambar 2.19 (a) Pohon Kelor; (b) Bunga dan Daun Kelor. Pohon kelor dapat mencapai 12 meter dan berbatang lunak; bunganya berwarna putih kekuningan memiliki ukuran sekitar 10-25 cm dan memiliki aroma semerbak yang keluar sepanjang tahun; daunnya hijau berbentuk *bipinnate* atau *tripinnate* dan tersusun secara spiral (Parrotta, 2009; Leone et al., 2015).

2.5.1 Kandungan dan Manfaat Kelor (*Moringa oleifera*)

Kelor (*Moringa oleifera*) kaya akan senyawa yang mengandung gula sederhana, rhamnose yang disebut glucosinolates dan isothiocyanates (Fahey et al., 2001; Bennet et al., 2003). Daun kelor (*Moringa oleifera*) mengandung protein, mineral, antioksidan dan beta-karoten yang dapat dikonsumsi sebagai makanan oleh manusia (Fahey, 2005). Selain makanan, daun kelor (*Moringa oleifera*) juga dapat digunakan sebagai obat untuk beberapa penyakit seperti malaria, demam tipoid, arthritis, luka, Bengkak dan masih banyak lagi.

Kandungan mineral dan vitamin dalam kelor (*Moringa oleifera*) seperti vitamin A,

vitamin C, kalsium, potassium, besi, dan protein di ketahui memiliki jumlah lebih banyak dibandingkan buah ataupun sayuran lain, sehingga mampu memenuhi kebutuhan mineral dan vitamin tubuh (Fahey, 2005). Kelor (*Moringa oleifera*) kaya akan mineral, vitamin dan protein, sehingga tumbuhan ini dapat dimanfaatkan sebagai suplementasi nutrisi untuk populasi yang kekurangan gizi (malnutrisi) (Sarwatt *et al.*, 2002; McBurney *et al.*, 2004; Fahey, 2005; Fuglie *et al.*, 2006; Sa'ncnez *et al.*, 2006; Arabshahi *et al.*, 2007; Shinano & Kasase, 2009; Coppin *et al.*, 2013).

Tabel 2.7 Kandungan mineral daun Kelor (*Moringa oleifera*) beberapa negara (Mulyaningsih & Yusuf, 2018)

| Elements (mg/100g) | Indonesia | Namibia | Pakistan | Agra-India | Thailand | India | Nigeria | Ghana | Egypt |
|--------------------|-----------|---------|----------|------------|----------|-------|---------|-------|-------|
| Calcium | 3039 | 242 | 2098 | 229 | 1904 | 2078 | 2600 | 3539 | 486 |
| Magnesium | 658 | 397 | 406 | 9.57 | - | 403 | 64.3 | 6099 | 25.64 |
| Potassium | 3345 | 639 | 1922 | 196 | 1795 | 1498 | 821 | 2522 | 33.63 |
| Sodium | 16.55 | 19.05 | ND | - | - | 72.50 | 298 | 3342 | 289 |
| Iron | 14.72 | 8.47 | 28.3 | 20.48 | 25.97 | 27.76 | 16.9 | 7.38 | 9.45 |
| zinc | 3.57 | 5.91 | 5.4 | 0.99 | - | 5.43 | 1.53 | 0.39 | 1.63 |
| Cobalt | 0.017 | 0.34 | - | 0.016 | - | - | - | - | - |
| Mangan | 10.21 | 1.77 | - | 7.48 | - | 32.45 | 6.99 | 0.012 | 5.21 |
| Chromium | 0.48 | - | - | 0.019 | - | - | - | - | - |
| Arsenic | - | - | - | 0.23 | - | - | - | - | - |
| Aluminium | 15.04 | 2.84 | - | - | - | - | - | - | - |
| Barium | 6.51 | 0.21 | - | - | - | - | - | - | - |

Beberapa komponen bioaktif dari daun kelor (*Moringa oleifera*) sudah

diidentifikasi, yakni vitamin, karotenoid, polifenol, asam fenolik, flavonoid, alkaloid, glukosinolat, isothiocyanate, tannin, saponin, oxalat dan phytate (tabel 2.8).

Beberapa glikosida flavonoid telah terdeteksi pada daun kelor (*Moringa oleifera*), seperti myricetin, quaracetin, beta-sitosterol, kaempferol, luteolin dan apigenin (Miean & Mohamed, 2001; Bennett *et al.*, 2003; Bose *et al.*, 2007).

Flavonoid yang ada dalam kelor juga mampu memberikan efek lain selain antioksidan, yakni antikanker, antiinflamasi, dan juga anti hipertensi (Formika, 1995).

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Coppin *et al.* (2013) menganalisa daun kelor (*Moringa oleifera*) menggunakan *high performance liquid chromatography* (HPLC) yang dikombinasikan dengan *ultraviolet* (UV) dan *mass spectrometric* (MS), didapatkan dua belas flavonoid teridentifikasi, dimana konstituen utama adalah quercetin, kaempferol glukosida dan malonat glukosida. Flavonoid seperti quercetin dan kaempferol telah terbukti sebagai antioksidan yang lebih kuat dibandingkan vitamin tradisional (Coppin *et al.*, 2013).

Tabel 2.8 Kandungan Daun Kelor (*Moringa oleifera*) (Leone *et al.*, 2015)

| Komponen Bioaktif | Jumlah | Komponen Bioaktif | Jumlah |
|-------------------------|------------------|---|--------------|
| Vitamin A | 45.200 IU | Ferulic acid | 0,078 mg/g |
| Vitamin B1 | 0,24 mg/100 g | Gallic acid | 1,034 mg/g |
| Vitamin B2 | 0,2 mg/100 g | Flavonoid | 5,059 mg/g |
| Vitamin B3 | 3,2 mg/100 g | 4-hydroxybenzyl (sinalbin) | 2,36 mg/g |
| Vitamin C | 880 mg/100 g | 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)-benzyl | 22,56 mg/g |
| Vitamin E | 16,21 mg/100 g | 4-O- (α -L-acetyl rhamnopyranosyloxy)-benzyl isomer 1 | 2,76 mg/g |
| β -carotene | 33,48 mg/100 g | 4-O- (α -L-acetyl rhamnopyranosyloxy)-benzyl isomer 2 | 1,80 mg/g |
| Lutein | 6,94 mg/100 g | 4-O- (α -L-acetyl rhamnopyranosyloxy)-benzyl isomer 3 | 20,16 mg/g |
| Phenol | 4581 mgGAE/100 g | Tannin | 13,2 gTAE/kg |
| Caffeic acid | 0,409 mg/g | Condensed tannin | 1,05 gLE/kg |
| Chlorogenic acid | 0,018 mg/g | Saponin | 2,0 gDE/kg |
| α -Coumaric acid | 6,457 mg/g | Oxalates | 430 mg/100 g |
| Ellagic acid | 0,018 mg/g | Phytates | 25,0 g/kg |
| Rutin | 0,390 mg/g | Isorhamnetin | 0,118 mg/g |
| Quercetin | 12,84 mg/g | Epicatechin | 5,68 mg/g |
| Myricetin | 5,804 mg/g | Kaempferol | 3,92 mg/g |

Banyak penelitian *in vitro* dan *in vivo* pada model shewan coba telah menunjukkan efek anti-inflamasi (Gupta *et al.*, 2010; Waterman *et al.*, 2014) dan imunodulator dari daun kelor (*Moringa oleifera*) (Sudha *et al.*, 2010). Banyak senyawa bioaktif yang terlibat dalam proses anti-inflamasi (Rajanandh *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2013). Salah satunya, quercetin dapat menghambat aktivasi

Tabel 2.9 Konstituen Fitokimia dalam Ekstrak Metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) (Idoga et al., 2018)

| Constituents | Bioassay |
|--------------|----------|
| Alkaloid | + |
| Flavonoid | ++++ |
| Glycoside | + |
| Phenol | +++ |
| Saponin | + |
| Tannin | + |
| Terpenoids | + |

Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) telah dilaporkan menunjukkan aktivitas antioksidan baik secara *in vitro* dan *in vivo* karena asam fenolik dan flavonoid yang melimpah (Chumark et al., 2008; Verma et al., 2009).

Penggunaan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) mampu mencegah kerusakan oksidatif yang disebabkan makanan berlemak, dan mampu menghambat produksi *nitric oxide* oleh sel makrofag yang dipapar oleh bakteri lipopolisakarida (LPS) (Coppin et al., 2013). Sreelatha & Padma (2009) menyatakan bahwa ekstrak aqueous *Moringa oleifera* memiliki efek *scavenging* yang kuat terhadap radikal bebas 2,2-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), superoksida, radikal nitrit oxida dan penghambatan peroksidasi lipid. Sifat antioksidan dari ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) telah dibuktikan, dan dapat digunakan untuk meredakan kondisi stres oksidatif (Oparinde & Atiba, 2014; Velaga et al., 2014), termasuk paparan pestisida organofosfat jangka panjang (Idoga et al., 2018).

Tabel 2.10 Kandungan Antioksidan dalam Ekstrak Metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) (Idoga et al., 2018)

| Antioxidant component | Concentration |
|-----------------------|---------------|
| Flavonoid | 22.6% w/w |
| Vitamin A | 0.3 mg/g |
| Vitamin C | 6.7 mg/g |
| Vitamin E | 0.22 IU/g |

Siddhuraju & Becker (2003) menguji kapasitas *scavenging* radikal dan aktivitas antioksidan dari ekstrak aqueous, ekstrak metanol, dan ekstrak etanol dari daun kelor (*Moringa oleifera*) dari agro-iklim yang berbeda-beda. Hasil yang didapatkan adalah semua pelarut ekstrak dari sampel daun kelor (*Moringa oleifera*) memiliki aktivitas *scavenging* radikal yang sangat tinggi, namun hasil yang lebih baik diperoleh pada ekstrak metanol dan etanol. Aktivitas antioksidan tertinggi didapatkan pada ekstrak metanol (65,1%) dan ekstrak etanol (66,8%) (Siddhuraju & Becker, 2003). Moyo et al. (2012) mempelajari sifat antioksidan dari diet suplementasi daun kelor pada model kambing. Ditemukan peningkatan yang signifikan dari aktivitas GSH pada kambing yang diberi suplementasi daun kelor (*Moringa oleifera*) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sebagai perbandingan, aktivitas katalase (CAT) dan superoxide dismutase (SOD) dari kelompok yang diberi suplementasi kelor (*Moringa oleifera*) meningkat dibanding kelompok kambing yang diberi pakan biasa. Selain itu, suplementasi daun kelor (*Moringa oleifera*) menghambat jumlah MDA yang dihasilkan dalam homogenat hati. Oleh karena itu, konsumsi daun kelor dapat melindungi hewan dari penyakit yang disebabkan oleh stres oksidatif (Moyo et al., 2012).

2.5.2 Toksisitas Kelor (*Moringa oleifera*)

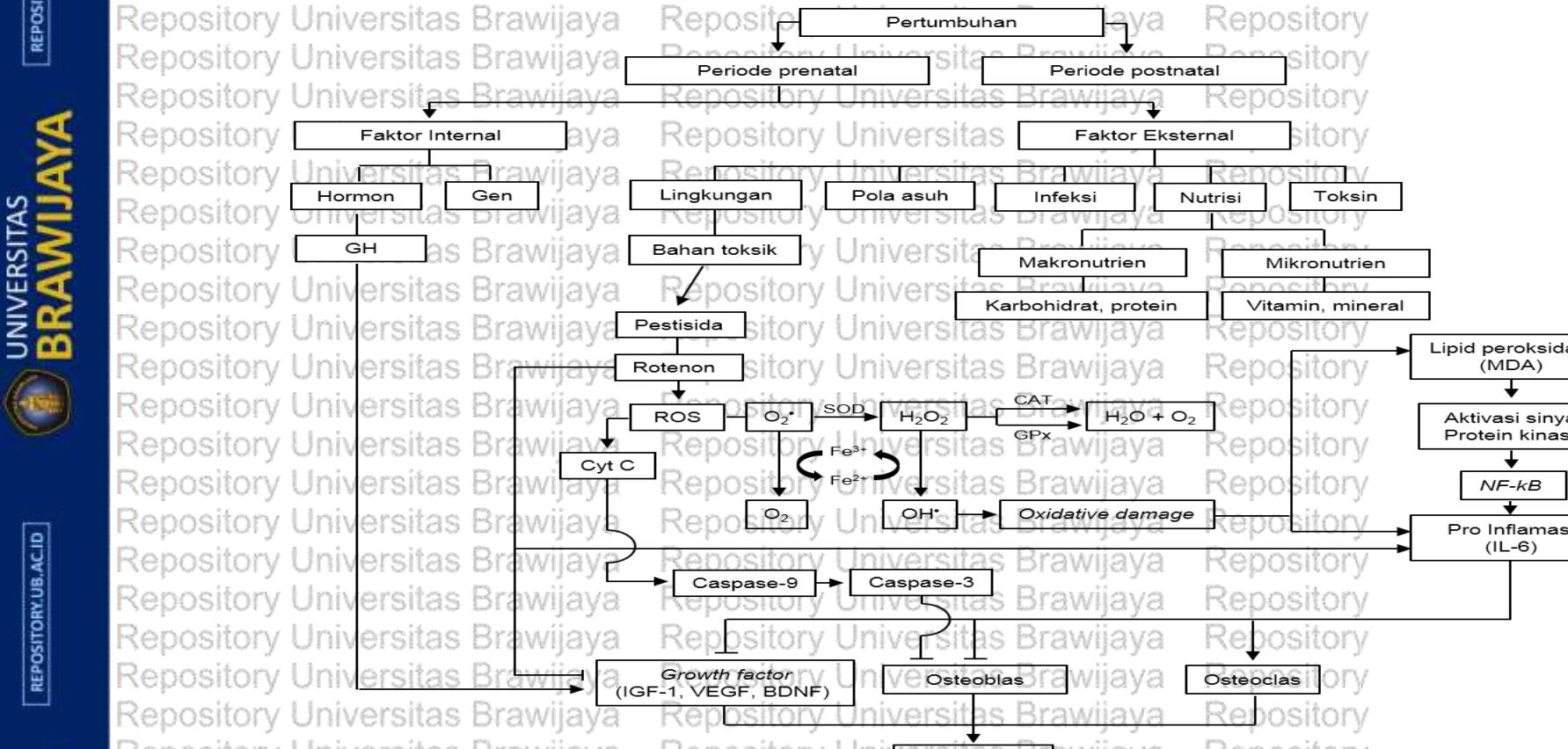
Penelitian oleh David *et al.* (2016) melihat pengaruh pemberian ekstrak aqueous daun kelor (*Moringa oleifera*) pada embrio zebrafish. Didapatkan konsentrasi 3000 dan 6000 ppm (µg/mL) menunjukkan toksisitas bagi embrio zebrafish setelah dipapar selama 12 dan 24 jam, sedangkan konsentrasi 300 dan 1500 ppm (µg/mL) baru menunjukkan efek toksisitas setelah dipapar selama 48 jam, yang ditunjukkan dengan persentase *hatchability* yang rendah atau tidak ada, detak jantung yang rendah atau tidak ada, serta gangguan pertumbuhan linear dan kelainan morfologi (David *et al.*, 2016).

Studi toksisitas akut oleh Adedapo *et al.* (2009), menyatakan bahwa dosis pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) mencapai 2000 mg/kgBB dikategorikan aman (tidak mematikan) bagi hewan coba, namun pada dosis yang lebih tinggi dari dosis ini, didapatkan beberapa perubahan toksik pada hewan coba (Adedapo *et al.*, 2009). Diallo *et al.* (2009) mengungkapkan bahwa ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) aman pada dosis setinggi 5000 mg/kgBB. Awodele *et al.* (2012) melakukan studi toksisitas dari ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) pada hewan coba, dan didapatkan tidak ada mortalitas pada dosis maksimum 6400 mg/kgBB. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) aman secara oral (tidak mematikan) selama pemberian akut pada dosis 2 g/kgBB (Stohs & Hartman, 2015).

Berbagai penelitian pada hewan telah menilai keamanan ekstrak secara umum, dan telah menunjukkan tingkat keamanan yang sangat tinggi (Stohs & Hartman, 2015). Tidak ada efek samping yang dilaporkan dalam penelitian manusia yang dilakukan dengan bubuk daun kelor (*Moringa oleifera*) hingga dosis tunggal (50 g) atau dalam penelitian menggunakan 8 gram per hari selama 40 hari (Kumari, 2010; Kushwaha *et al.*, 2012; Stohs & Hartman, 2015).

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
BAB 3
KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori Penelitian



Keterangan :

→ : Menyebabkan/Mengaktifasi/Meningkatkan/Mempengaruhi

→ : Menghambat/Menginhibisi

Keterangan gambar:

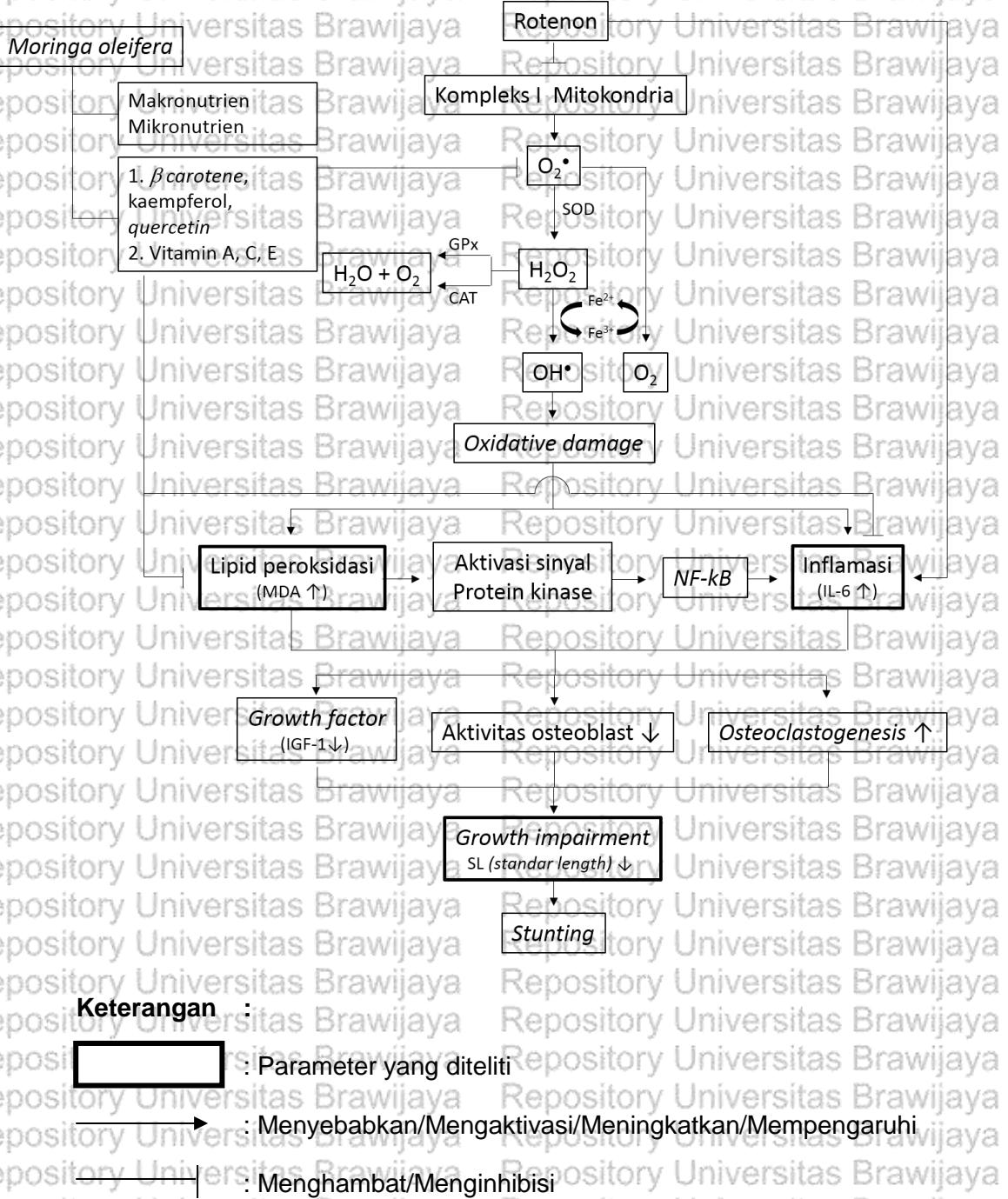
Periode emas pertumbuhan anak terjadi mulai periode prenatal hingga postnatal (1000 hari pertama kehidupan). Periode prenatal dipengaruhi oleh faktor internal dan eksternal. Faktor internal yang mempengaruhi berupa genetik dan hormon. Hormon yang mengatur pertumbuhan adalah *growth hormone* (GH). GH memiliki beberapa faktor pertumbuhan, seperti VEGF, BDNF dan *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) yang diperlukan tubuh untuk proliferasi dan diferensiasi sel. Faktor eksternal berupa pola asuh, infeksi, pemenuhan kebutuhan nutrisi (baik makronutrien maupun mikronutrien), toksin dan lingkungan. Salah satu faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan adalah adanya paparan bahan toksik. Dalam kehidupan sehari-hari zat kimia atau toksin banyak ditemukan dalam pestisida. Rotenon merupakan salah satu pestisida yang menghambat kompleks I mitokondria, menyebabkan hambatan pembentukan ATP dan mendorong terbentuknya radikal bebas (ROS) seperti radikal superoksida (O_2^-). Dengan terhambatnya transfer elektron, maka tidak didapatkan elektron di kompleks-3 mitokondria sehingga hukum "all or none" pelepasan sitokrom-C akan berjalan. Pelepasan sitokrom-C ini ke sitosol akan mengaktifasi caspase-3 pada saat yang bersamaan dan menjadi poin penting untuk terjadinya apoptosis.

Adanya superoksida dismutase (SOD) menyebabkan radikal superoksida (O_2^-) mengalami dismutasi menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Oleh enzim katalase (CAT) dan glutation peroksidase (GPx), H_2O_2 diubah menjadi H_2O dan O_2 . Radikal hidroksil (OH^-) dibentuk melalui siklus redoks oleh reaksi Fenton, dimana besi bebas (Fe^{2+}) bereaksi dengan H_2O_2 , dan reaksi Haber-Weiss yang akan menghasilkan Fe^{2+} dan O_2^- , dimana O_2^- bereaksi dengan besi (Fe^{3+}).

Radikal hidroksil (OH^-) menyebabkan kerusakan oksidatif melalui proses peroksidasi lipid, DNA dan oksidasi protein.

Proses peroksidasi lipid menghasilkan sejumlah lipid aldehid yang dapat mengaktifkan sinyal-sinyal kinase, yang menyebabkan aktivasi faktor transkripsi, seperti *nuclear factor- kB* (NF- κ B) yang akan mentranskripsikan gen penanda inflamasi termasuk mediator inflamasi, salah satunya interleukin-6 (IL-6). Rotenon juga dapat meningkatkan aktivitas dari NF- κ B dan ekspresi IL-6. Produksi IL-6 yang berlebihan dapat menyebabkan penurunan ekspresi IGF-1, dan peningkatan degradasi proteolitik dari *insulin-like growth factor binding protein-3* (IGFBP-3). Selain itu, IL-6 juga mampu menghambat aktivitas osteoblas, dan meningkatkan osteoklastogenesis. Adanya stres oksidatif, penurunan aktivasi *growth factor* akan berujung pada gangguan pertumbuhan, sehingga pada akhirnya dapat menyebabkan *stunting*.

3.2 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Penjelasan kerangka konsep

Rotenon merupakan salah satu pestisida yang digunakan sebagai bahan toksik untuk menginduksi embrio zebrafish. Rotenon bekerja dengan cara menghambat NADH dehidrogenase dan menghambat transpor elektron pada kompleks I mitokondria, sehingga menyebabkan penurunan kemampuan oksidasi fosforilasi, menyebabkan hambatan pada produksi ATP di mitokondria, dan mendorong terbentuknya radikal bebas (ROS) seperti radikal superoksida (O_2^-). Adanya superoksida dismutase (SOD) menyebabkan O_2^- mengalami dismutasi menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Oleh enzim katalase (CAT) dan glutation peroksidase (GPx), H_2O_2 diubah menjadi H_2O dan O_2 . Melalui reaksi Fenton, Fe^{2+} dioksidasi menjadi Fe^{3+} dan H_2O_2 diubah menjadi radikal hidroksil yang sangat reaktif (OH^-), sedangkan melalui reaksi Haber-Weiss, O_2^- bereaksi dengan besi (Fe^{3+}) yang akan menghasilkan Fe^{2+} dan O_2 . Radikal hidroksil (OH^-) menyebabkan kerusakan oksidatif melalui proses peroksidasi lipid, DNA dan oksidasi protein. Proses peroksidasi lipid menghasilkan sejumlah lipid aldehid yang berpotensi merusak, seperti 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE), acrolein, dan malondialdehid (MDA). Lipid aldehid yang dihasilkan dapat mengaktifkan sinyal-sinyal kinase, seperti aktivasi kaskade protein kinase yang mengarah pada aktivasi faktor transkripsi, salah satunya nuclear factor- κB (NF- κB) yang akan mentranskripsikan beberapa gen penanda inflamasi termasuk mediator inflamasi, sitokin, dan kemokin, salah satunya interleukin-6 (IL-6). Rotenon juga dapat meningkatkan aktivitas dari NF- κB dan ekspresi IL-6. Produksi IL-6 yang berlebihan dapat berpengaruh pada growth hormone dan growth factor seperti insulin-like growth factor-1 (IGF-1). IL-6 dapat menyebabkan penurunan ekspresi IGF-1, dan peningkatan degradasi proteolitik dari insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3). Faktor pertumbuhan seperti IGF-1 diperlukan tubuh

aktivitas osteoblas, dan meningkatkan osteoklastogenesis. Adanya stres oksidatif, penurunan aktivasi *growth factor* akan berujung pada gangguan pertumbuhan, sehingga pada akhirnya dapat menyebabkan *stunting*. Pemberian kelor (*Moringa oleifera*) yang mengandung senyawa aktif anti-inflamasi dan antioksidan (β -carotene, quercetin, kaempferol) dapat mencegah terjadinya *stunting* dengan dua cara, yaitu mencegah terjadinya stres oksidatif, dan mencegah terjadinya inflamasi yang berlebihan, sehingga tidak akan terjadi gangguan aktivasi *growth hormone* dan *growth factor*, sehingga tidak terjadi *stunting*. Selain itu kandungan nutrisinya, makronutrien dan mikronutrien dapat memenuhi kebutuhan nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan aktivasi antioksidan enzimatis.

3.3 Hipotesis Penelitian

3.3.1 Hipotesis Umum

1. Pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) berpengaruh terhadap panjang badan, kadar MDA dan IL-6 pada larva zebrafish (*Danio rerio*) model *stunting* yang diinduksi dengan rotenon.

3.3.2 Hipotesis Khusus

1. Pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat mengoreksi panjang badan pada larva zebrafish model *stunting*.
2. Pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan kadar MDA pada larva zebrafish model *stunting*.
3. Pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan kadar IL-6 pada larva zebrafish model *stunting*.
4. Panjang badan larva zebrafish model *stunting* memiliki korelasi negatif dengan kadar MDA.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
5. Panjang badang larva *zebrafish* model *stunting* memiliki korelasi negatif dengan kadar IL-6.

6. MDA memiliki korelasi positif dengan IL-6 pada larva *zebrafish* model *stunting*.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

4.2.2 Sampel Penelitian

Penelitian yang dilakukan oleh Luccit *et al.* (2008) dan Hallare *et al* (2016) menggunakan embrio zebrafish sebanyak 20-30 embrio. Sehingga berdasarkan rujukan jumlah sampel tersebut, sampel yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 30 embrio perkelompok kemudian dilakukan pengulangan dengan total 480 embrio dan terbagi dalam 8 kelompok, dimana masing-masing kelompok dibagi dalam 2 *well plate* yang berisi 30 embrio tiap *well*.

4.2.3 Kriteria Sampel

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah embrio zebrafish yang berusia 0-2 *hour post fertilisation*, *yolk sac* berwarna putih bening, tidak berjamur (tidak ada serabut putih).

4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi yaitu telur yang tidak dibuahi, berjamur/berserabut putih.

4.2.3.3 Kriteria Dropout

Kriteria *dropout* yaitu embrio yang *hatching* kurang dari 72 hpf dan mati sebelum penelitian berakhir pada 9 dpf (*day post fertilisation*).

4.3 Lokasi dan Waktu penelitian

4.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian berlangsung mulai bulan Oktober sampai Desember 2018.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*).

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah panjang badan, kadar

4.5 Definisi Operasional

1. Embrio zebrafish yang digunakan dalam penelitian ini adalah embrio sehat usia 0-2 hpf yang diperoleh dari hasil fertilisasi induk jantan dan betina *wildtype* yang telah diidentifikasi di Laboratorium Kelautan FPIK-UB dan tersertifikasi Laboratorium Farmakologi FKUB.
 2. Rotenon yang digunakan diperoleh dari *Sigma* (R8875) dengan kemurnian $\geq 95\%$ dalam bentuk serbuk yang dilarutkan dengan *Dimethyl sulfoxide* 10% (DMSO) untuk membuat larutan stok awal dengan konsentrasi $2 \times 10^7 \mu\text{g/L}$ (ppb). Konsentrasi rotenon yang digunakan berdasarkan studi eksplorasi adalah 12,5 ppb (Zakiah, 2017).
 - 3.. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) yang digunakan diperoleh dengan menggunakan teknik maserasi (ethanol) 98% yang dibagi dalam 3 dosis yakni dosis 0,56; 1,12; dan 2,24 $\mu\text{g/mL}$. Dasar penentuan konsentrasi ini adalah hasil konversi dari penelitian Bais et al. (2014) dan Siswanto (2017). Kelor diperoleh dari Materia Medika Batu yang telah tersertifikasi.
 4. Panjang badan larva zebrafish diukur berdasarkan *standar length* (SL), pengukuran dimulai dari moncong mulut (*snout*) sampai ujung

sirip ekor (*caudal fin*) (*Spence et al.*, 2008) menggunakan *software image raster* 3.0 yang terkalibrasi dalam satuan panjang badan milimeter (mm) yang diukur pada 3, 6 dan 9 dpf. Sebelum pengukuran, larva zebrafish difoto dalam kondisi lurus, tidak bergerak pada medium air minimal menggunakan mikroskop stereo (Olympus SZ61) yang dihubungkan dengan *software optilab*.

5. Kriteria *stunting* sesuai standar WHO dengan PB/U kurang dari -2 SD, *confidence coefficient* 95% dan menetap hingga usia 9 dpf (WHO, 2014).

6. Pengukuran kadar MDA dan IL-6

Larva zebrafish yang berusia 6 dpf dieuthanasia dengan direndam dalam *chamber* berisi air:es (5:1) selama 10 menit (Strykowski & Schech, 2015), kemudian dilisiskan menggunakan RIPA buffer, dihomogenkan menggunakan *plunger* dalam cawan petri. Hasil suspensinya dipersiapkan kedalam 2 mL *microtube*, dan disentrifugasi dingin 4°C dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Hasil supernatan yang diperoleh dianalisa menggunakan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (*ELISA*) untuk menentukan kadar MDA (*Bioassay Technology Laboratory*; E0017F1) dan IL-6 (*Bioassay Technology Laboratory*; E0026F1).

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Pemeliharaan Indukan Zebrafish, Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio Zebrafish

Alat dan bahan yang digunakan untuk pemeliharaan indukan zebrafish, persiapan fertilisasi dan perawatan embrio zebrafish, yaitu aquarium yang dapat menampung ±60 liter, terdapat alat pengukur konduktivitas, PH meter, penyaring air saringan ikon tipe 2 buah yang dibuat dari wadah plastik ukuran 25x10x5 cm

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 dan penutup diganti dengan saringan kawat kecil agar telur dapat masuk ke
 dalam wadah *trap*, lampu, cawan petri, pakan ikan (tetramin), anti-chlorin, air
 filtrasi, gelas ukur, pipet plastik, sputit 5 cc dan 10 cc, plate isi 6 sumuran, objek
 glass, inkubator suhu $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, alat gerus, sentrifugasi dingin 4°C , mikroskop
Stereo, software *Optilab* dan *image raster*.

4.6.2 Pembuatan Larutan Rotenon (Sigma R8875)

Alat dan bahan yang digunakan untuk pembuatan larutan rotenon, yaitu
 gelas ukur, timbangan analitik, mikropipet, ependorf, tip (biru, kuning, putih),
 serbuk rotenon, pelarut DMSO 10% (*Dimethyl sulfoxida*).

4.6.3 Pembuatan Medium Embrio

Alat dan bahan yang digunakan untuk pembuatan medium embrionik,
 yaitu timbangan digital (Mettler Toledo), kertas saring, sendok pengaduk, botol
 kaca 500 mL, CaCl 0,08 gr, KCl 0,06 gr, NaCl 2 gr, MgSO₄ 3,2 gr dilarutkan
 dalam 200 ml air filtrasi (CSH Protocols, 2011).

4.6.4 Pembuatan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

Alat dan bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun kelor,
 yaitu *rotary evaporator*, gelas ukur, pipet, erlenmeyer, corong *buncher*, kertas
 saring, tabung plastik, aluminium foil, *waterbath*, *water pump*, selang *water
 pump*, *vacuum pump*, timbangan analitik, simplisia daun kelor, pelarut etanol
 98%, air steril.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pemeliharaan indukan zebrafish, Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio Zebrafish

Indukan zebrafish berusia 4 bulan terdiri dari indukan betina dan jantan
 dengan rasio 2:1. Aquarium dibersihkan minimal setiap minggu sekali, penyaring

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 air diganti 3 hari sekali, air diberi anti chlorin ditunggu 30 menit sebelum ikan dimasukkan. Pemberian makanan dengan tetramin 3 kali sehari (Khotimah *et al.*, 2015).

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Sebelum proses fertilisasi dimulai, *trap* dipasang di dasar aquarium untuk perangkap embrio kemudian aquarium ditutup (menggunakan kardus dan kain), lampu dimatikan untuk menciptakan siklus gelap (10 jam) selama waktu yang telah diatur oleh peneliti (20.30-06.30 WIB). Perbandingan siklus gelap terang yaitu 10:14 jam (Avdesh *et al.*, 2012). Pada keesokan harinya pukul 06.30 lampu dinyalakan 30 menit sebelum penutup diangkat untuk memberi kesempatan pembuahan. *Trap* diangkat, telur dibersihkan dengan air filtrasi sampai bersih dan tidak lebih dari 2 hpf.

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Embrio diletakkan dalam *plate* 6 sumuran, masing-masing sumuran berisi 30 embrio (Luccit *et al.*, 2008; Hallare *et al.*, 2016). Medium embrionik diberikan sesuai kelompok perlakuan dan diganti setiap hari sampai 72 hpf sesuai sebagai berikut:

1. Kelompok 1: Medium embrionik
2. Kelompok 2: Rotenon 12,5 ppb + medium embrionik
3. Kelompok 3: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 0,56 µg/mL + medium embrionik
4. Kelompok 4: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 1,12 µg/mL + medium embrionik
5. Kelompok 5: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 2,24 µg/mL + medium embrionik
6. Kelompok 6: Ekstrak daun kelor 0,56 µg/mL + medium embrionik
7. Kelompok 7: Ekstrak daun kelor 1,12 µg/mL + medium embrionik
8. Kelompok 8: Ekstrak daun kelor 2,24 µg/mL + medium embrionik

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Setelah itu, 3 dpf sampai 9 dpf, semua kelompok menggunakan medium embrionik saja. Simpan dalam inkubator suhu $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Avdesh *et al.*, 2012).
 Pemberian makan pada larva *zebrafish* usia 6 dpf dengan tetramin diambil secukupnya, digerus sampai halus, tambahkan air dan diberikan pada larva *zebrafish*.

4.7.2 Pembuatan Larutan Rotenon (Sigma R8875)

Membuat larutan rotenon yaitu serbuk rotenon dilarutkan dengan pelarut DMSO 10% hingga mencapai konsentrasi $2 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan:

V1: volume pengencer/air filtrasi

V2: volume yang akan diberikan sesuai dosis yang diminta

M1: konsentrasi stok rotenon

M2: dosis yang diminta

Stok rotenon yang telah dibuat dimasukkan dalam eppendorf, diberi label tanggal pembuatan dan disimpan dalam freezer. Sebelum digunakan rotenon dicairkan dan diambil sesuai kebutuhan kemudian diencerkan dengan medium embrionik.

Dosis rotenon yang digunakan:

Diketahui:

M1: $2 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$

M2: $12,5 \mu\text{g/mL}$

V1: 15 mL (medium embrionik)

$$15 \times 2 \cdot 10^3 = V_2 \times 12,5$$

$$V_2 = 93,75 \cdot 10^{-3} \text{ mL} = 93,75 \mu\text{L}$$

4.7.3 Pembuatan Medium Embrionik

Langkah-langkah pembuatan medium embrionik sebagai berikut:

a. Semua bahan (CaCl_2 0,08 gr, KCl 0,06 gr, NaCl 2 gr, MgSO_4 3,2 gr) ditimbang menggunakan timbangan digital dan dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi air filtrasi 200 mL (CSH Protocols, 2011).

b. Diaduk sampai bahan tercampur rata, masukkan dalam botol, diberi label (tanggal pembuatan), dan disimpan di lemari es sebagai stok.

c. Pada saat akan digunakan, stok diambil dan ditambahkan air filtrasi sesuai kebutuhan dengan perbandingan stok medium embrionik : air filtrasi (1:9) (Avdesh et al., 2012).

4.7.4 Pembuatan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

- a. Simplisia kelor yang diperoleh dari Materia Medika Batu ditimbang sebanyak 100 gram dan dimasukkan dalam gelas erlenmeyer.
 - b. Simplisia dimaserasi dengan pelarut ethanol 98% sebanyak 900 ml sambil dikocok sampai tercampur dan didiamkan selama 24 jam sampai terdapat endapan.
 - c. Diambil lapisan atas. Proses perendaman dilakukan sebanyak 3 kali.
 - d. Simplisia yang telah terendam, disaring dengan kertas saring menggunakan corong *buchner*.
 - e. Filtrat dimasukkan ke dalam labu evaporasi 1 L, labu evaporasi disambungkan ke evaporator, *waterbath* diisi dengan air sampai penuh, semua alat evaporasi dirangkai dan disambungkan dengan aliran listrik. *Waterbath* dipanaskan sampai suhu 90°C dibiarkan selama ±1,5 s/d 2 jam agar larutan etanol terpisah dengan zat aktif yang terdapat dalam labu penampungan. Hasil ekstraksi

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
dimasukkan dalam botol plastik, ditimbang dan disimpan dalam
Repository Universitas Brawijaya
freezer.

f. Tabung diberi label tanggal pembuatan, dan dimasukkan ke dalam
Repository Universitas Brawijaya
freezer.

Untuk membuat stok larutan ekstrak daun kelor 1 mg/mL (1000 µg/mL)
Repository Universitas Brawijaya
dengan cara: ekstrak daun kelor ditimbang sebanyak 10 mg, dilarutkan dengan
Repository Universitas Brawijaya
air steril 10 mL hingga tercampur rata. Masukkan dalam valcon/ependorf dan
Repository Universitas Brawijaya
diberi label pembuatan kemudian disimpan dalam freezer.

Dosis ekstrak daun kelor didapatkan dari penelitian oleh Bais et al. (2014)
Repository Universitas Brawijaya
mengenai ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) pada tikus. Pada penelitian ini,
Repository Universitas Brawijaya
dilakukan konversi dosis dengan menggunakan perbandingan berat badan tikus
Repository Universitas Brawijaya
dan zebrafish (Siswanto, 2017).

Berat rerata tikus (gram)

Berat rerata zebrafish (gram)

$$\frac{\text{Dosis ekstrak daun kelor pada tikus (mg/kgBB)}}{200 \text{ (mg/kgBB)}} = \frac{\text{Dosis ekstrak daun kelor pada zebrafish (mg/kgBB)}}{150 \text{ (gram)}}$$

$$x = 0,42 \text{ (gram)}$$

$$x = 0,56 \text{ mg/kgBB zebrafish}$$

sehingga didapatkan:

$$\text{dosis 1} = 0,56 \text{ mg/kgBB} = 0,56 \text{ ppm} = 0,56 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{dosis 2} = 1,12 \text{ mg/kgBB} = 1,12 \text{ ppm} = 1,12 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{dosis 3} = 2,24 \text{ mg/kgBB} = 2,24 \text{ ppm} = 2,24 \mu\text{g/mL}$$

Sebelum digunakan stok larutan ekstrak daun kelor dicairkan dan diambil
Repository Universitas Brawijaya
sesuai kebutuhan kemudian diencerkan dengan medium embrionik.

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

Keterangan:

V1: volume pengencer/air filtrasi

V2: volume yang akan diberikan sesuai dosis yang diminta

M1: konsentrasi stok ekstrak daun kelor

M2: dosis yang diminta

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Dosis ekstrak daun kelor yang digunakan:
 Diketahui:
 M1: 1000 µg/mL
 M2: 0,56 µg/mL
 V1: 15 mL (medium embrionik)

$$15 \times 1000 = V2 \times 0,56$$

$$V2 = 8,4 \cdot 10^{-3} \text{ mL} = 8,4 \mu\text{L}$$

sehingga didapatkan:

$$V2 \text{ untuk dosis ekstrak daun kelor } 0,56 \mu\text{g/mL} = 8,4 \mu\text{L}$$

$$V2 \text{ untuk dosis ekstrak daun kelor } 1,12 \mu\text{g/mL} = 16,8 \mu\text{L}$$

$$V2 \text{ untuk dosis ekstrak daun kelor } 2,24 \mu\text{g/mL} = 33,6 \mu\text{L}$$

4.7.5 Pemberian Paparan Rotenon dan Ekstrak Daun Kelor, Penggantian Medium dan Pemberian Pakan Larva

Pemberian rotenone maupun ekstrak daun kelor diberikan pada 2 hpf sampai 72 hpf. Embrio *zebrafish* dikelompokkan menjadi 8 kelompok diberikan paparan rotenon konsentrasi 12,5 ppb; rotenon dan kelor dalam berbagai dosis 0,56; 1,12; dan 2,24 µg/mL; dan diberikan dalam jarak waktu yang sama yaitu 2 hpf, 24 hpf, dan 48 hpf. Pada usia 72 hpf (3 dpf), larva yang telah *hatching* (keluar dari korion), dibilas dengan larutan medium embrionik sebanyak 3 kali untuk memastikan larva bersih dari medium paparan. Semua kelompok diganti mediumnya dengan medium embrionik setiap hari sampai 9 dpf untuk menjaga dari kontaminasi yang dapat mengganggu larva.

Pemberian makan pada larva *zebrafish* dilakukan pada usia 6 dpf, hal ini dikarenakan larva *zebrafish* masih mendapatkan nutrisi dari *yolksac* sampai usia 5 dpf. Larva *zebrafish* diberi pakan dengan tetramin pada usia 6 dpf untuk memenuhi kebutuhan nutrisi dan mencegah dari kematian (Wilson, 2012). Tetramin diberikan dengan cara dihaluskan terlebih dahulu dan ditambahkan dengan air filtrasi kemudian diteteskan ke dalam masing-masing well sebanyak 5

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 tetes. Pergantian medium dan pemberian makan dilakukan setiap hari hingga hari ke-9 agar nutrisi terpenuhi.

4.7.6 Pengukuran Panjang Badan

Pengukuran panjang badan pada larva zebrafish dilakukan sebanyak 3 kali yaitu usia 72 hpf, 6 dpf, dan 9 dpf. Larva zebrafish diletakkan dalam objek glass diamati dibawah mikroskop stereo (Olympus SZ61), difoto menggunakan software *optilab* versi 2,0 dalam posisi lurus dan tidak bergerak kemudian diukur dengan menggunakan software *image raster* yang terkalibrasi. Larva zebrafish yang telah difoto dan diukur dimasukkan dalam plate yang berbeda bersi medium embrionik. Berdasarkan *standrad length* (SL), panjang badan diukur dari ujung hidung (*tip of the snout*) sampai dengan pangkal strik ekor (*caudal fin*).

4.7.7 Pengukuran Kadar MDA dan IL-6

Larva zebrafish yang berusia 6 dpf dieuthanasia dengan direndam dalam *chamber* berisi air:es (5:1) selama 10 menit (Strykowski & Schech, 2015), kemudian dipindahkan dalam cawan petri, dilisiskan menggunakan 500 µL RIPA buffer, dan dihomogenkan menggunakan *plunger* dan ditambahkan 250 µL RIPA buffer. Hasil suspensinya dimasukkan kedalam 2 mL *microtube*, dan disentrifugasi dingin pada suhu 4°C dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Hasil supernatan yang diperoleh dianalisa menggunakan metode ELISA untuk menentukan kadar MDA (*Bioassay Technology Laboratory*; E0017FI) dan IL-6 (*Bioassay Technology Laboratory*; E0026FI). Prosedur assay ELISA: (1) masukkan 50 µL standar kedalam sumur standar; (2) masukkan 40 µL sampel kedalam sumur sampel, kemudian tambahkan 10 µL antibodi anti-MDA zebrafish/antibodi anti-IL-6 zebrafish kedalam sumur sampel; (3) masukkan 50 µL streptavidin-HRP kedalam sumur standar dan sumur sampel (jangan dimasukkan kedalam sumur kontrol), dicampur selama 1 menit, ditutup dengan

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
perekat, dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C; (4) buka perekat,
Repository Universitas Brawijaya
kemudian tiap sumur diaspirasi dan dicuci 5 kali dengan *wash Buffer*. Pada akhir
Repository Universitas Brawijaya
pencucian, sisa dari *wash buffer* dibuang dan dikeringkan dengan kertas
Repository Universitas Brawijaya
pengeering; (5) tambahkan 50 µL *substrate solution A* dan 50 µL *substrate*
Repository Universitas Brawijaya
solution B pada masing-masing sumur, diinkubasi selama 10 menit pada suhu
Repository Universitas Brawijaya
37°C, ditutup dengan perekat agar terlindungi dari sinar; (6) tambahkan 50 µL
Repository Universitas Brawijaya
stop solution ke dalam masing-masing sumur; (7) dalam 30 menit dilakukan
Repository Universitas Brawijaya
pembacaan pada panjang gelombang 450nm dengan *ELISA reader* untuk
Repository Universitas Brawijaya
menentukan *optical density (OD value)*.

4.7.8 Bagan Alur Penelitian

0 hpf

Fertilisasi indukan zebrafish jantan dan betina dalam siklus gelap terang (10:14)

↓
Emбриo dibersihkan dengan air filtrasi dan diseleksi sebanyak 480 embrio

↓
Emбриo dibagi secara random alokasi menjadi 8 kelompok perlakuan, tiap kelompok dibagi dalam 2 well plate,
@well= 30 embrio

2 hpf

↓
Memberikan paparan sebanyak 3 kali yaitu pada 2 hpf, 24 hpf dan 48 hpf sesuai kelompok

C
(medium
embryonik)

R
(rotenon
12,5 ppb)

RMO1
(rotenon
12,5 ppb +
ekstrak
etanol daun
kelor 0,56
μg/mL)

RMO2
(rotenon
12,5 ppb +
ekstrak
etanol daun
kelor 1,12
μg/mL)

RMO3
(rotenon
12,5 ppb +
ekstrak
etanol daun
kelor 2,24
μg/mL)

MO1
Re(ekstrak
etanol daun
kelor 0,56
μg/mL)

MO2
(ekstrak
etanol daun
kelor 1,12
μg/mL)

MO3
(ekstrak
etanol daun
kelor 2,24
μg/mL)

3 dpf

↓
72 hpf embrio hatching (lepas dari chorion)

Gambar 4.1 Alur Penelitian (0 hpf hingga 3 dpf)

3 dpf

72 hpf embrio hatching (lepas dari chorion)

Medium larva diganti dengan medium embrionik untuk semua kelompok

Panjang badan larva zebrafish difoto dengan
software optilab dan diukur dengan image
raster pada 3 dpf dan 6 dpf

6 dpf

Terminasi

Mengukur kadar MDA, dan IL-6

9 dpf

Panjang badan larva zebrafish difoto dengan
software optilab dan diukur dengan image
raster pada 9 dpf

Panjang badan larva zebrafish difoto dengan
software optilab dan diukur dengan image
raster pada 3 dpf, 6 dpf dan 9 dpf

Analisis data

Gambar 4.2 Alur Penelitian (3 dpf hingga 9 dpf)

4.8 Analisis Data

Data hasil penelitian disajikan dalam $mean \pm SD$. Kemudian semua data dianalisis menggunakan software SPSS versi 21 dengan metode statistik parametrik One-way ANOVA setelah memenuhi uji normalitas data dan uji homogenitas varian. Apabila syarat dari uji one-way ANOVA tidak terpenuhi, maka dipilih uji *non-parametric Kruskal-Wallis*. Analisa data dengan derajat kepercayaan 95% dan $\alpha=0,05$.

HASIL PENELITI

5.1 Ekstrak Daun Kelor (*Morinda citrifolia*) Larva Zebrafish Model Stunting

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Panjang Badan pada Larva Zebrafish Model Stunting

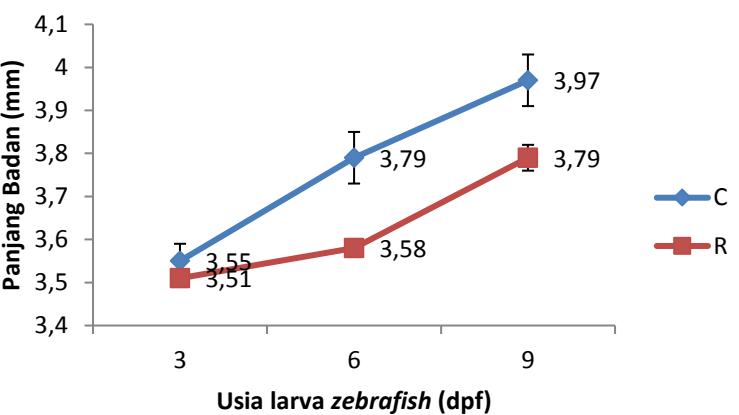
5.1.1 Pengaruh Induksi Rotenon Terhadap Larva Zebrafish

Hasil pengukuran rerata panjang badan larva zebrafish kelompok kontrol (C) dan rotenon (R) menggunakan *software image raster* pada usia 3, 6, dan 9 day post fertilization (dpf) ditunjukkan pada tabel 5.1 dan gambar 5.1.

Tabel 5.1 Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish Kelompok Kontrol dan Kelompok Rotenon (mm)

| Hari | Rerata Panjang Badan (mm) | | Uji beda <i>p-value</i> |
|------|---------------------------|-----------------|----------------------------|
| | C | R | |
| Ke-3 | $3,55 \pm 0,04$ | $3,51 \pm 0,02$ | 0,214 |
| Ke-6 | $3,79 \pm 0,06$ | $3,58 \pm 0,02$ | 0,004* |
| Ke-9 | $3,97 \pm 0,06$ | $3,79 \pm 0,03$ | 0,04* |

Keterangan : C: kontrol; R: rotenon 12,5 ppb; *: signifikan



Gambar 5.1 Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish antara Kelompok Kontrol dan Kelompok Rotenon. Kelompok rotenon (R) menunjukkan panjang badan yang lebih pendek dibandingkan kelompok kontrol (C) di usia 6 dan 9 dpf ($p<0,05$). Keterangan : C: kontrol; R: rotenon 12,5 ppb.

Tabel 5.1 dan gambar 5.1 menunjukkan tidak ada perbedaan panjang badan yang bermakna antara kelompok C dan R pada usia 3 dpf ($p=0,214$).

Sedangkan, terdapat perbedaan panjang badan antara kelompok C dengan kelompok R pada usia 6 dan 9 dpf ($p=0,004$ dan $p=0,04$; secara berurutan).

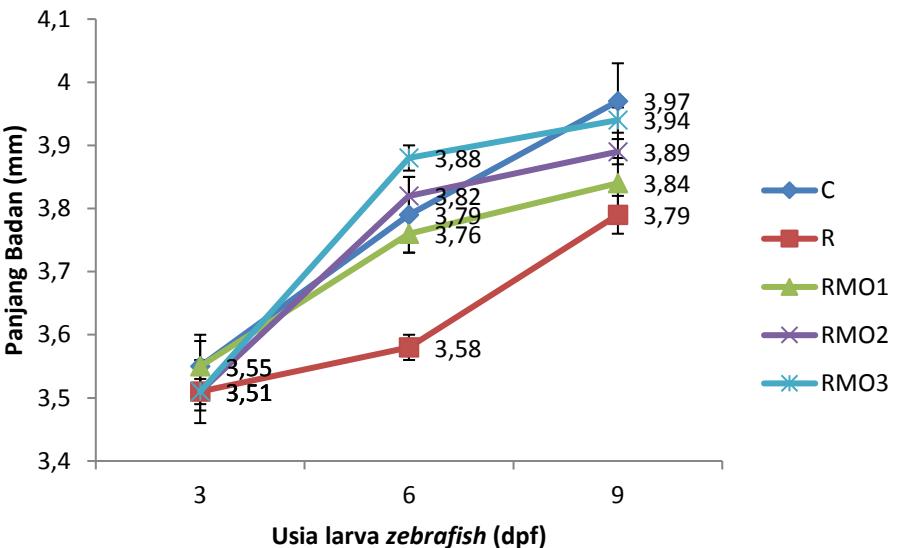
5.1.2 Pengaruh Paparan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish Model Stunting

Hasil pengukuran rerata panjang badan larva zebrafish model stunting yang diinduksi dengan rotenon dan pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam berbagai konsentrasi dengan menggunakan software *image raster* pada usia 3, 6 dan 9 dpf ditunjukkan pada tabel 5.2 dan gambar 5.2.

Tabel 5.2 Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish Model Stunting antara Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan

| Kelompok | Hari ke- | | |
|----------|----------------|----------------|----------------|
| | 3 | 6 | 9 |
| | Mean ± SD (mm) | Mean ± SD (mm) | Mean ± SD (mm) |
| C | 3,55 ± 0,04 | 3,79 ± 0,06 | 3,97 ± 0,06 |
| R | 3,51 ± 0,02 | 3,58 ± 0,02 | 3,79 ± 0,03 |
| RMO1 | 3,55 ± 0,05 | 3,76 ± 0,03 | 3,84 ± 0,04 |
| RMO2 | 3,51 ± 0,03 | 3,82 ± 0,03 | 3,89 ± 0,02 |
| RMO3 | 3,51 ± 0,05 | 3,88 ± 0,02 | 3,94 ± 0,02 |
| p- value | 0,90 | < 0,001* | 0,021* |

Keterangan : C: kontrol; R: rotenon 12,5 ppb; RMO1: Rote non 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 0,56 µg/mL ; RMO2: Rote non 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 1,12 µg/mL; RMO3: Rote non 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 2,24 µg/mL; * : signifikan



Gambar 5.2 Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish model Stunting antara Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan.

Kelompok rotenon (R) menunjukkan rerata panjang badan yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol (C) di usia 6 ($p=0,022$) dan 9 dpf ($p=0,033$). Koreksi panjang badan terjadi pada kelompok RMO1, RMO2, RMO3 di usia 6 dpf ($p<0,001$) dan RMO2, RMO3 di usia 9 dpf jika dibandingkan kelompok R ($p<0,05$). Keterangan : C: kontrol; R: rotenon 12,5 ppb; RMO1: Rote non 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 0,56 µg/mL ; RMO2: Rote non 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 1,12 µg/mL; RMO3: Rote non 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 2,24 µg/mL



Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui seberapa besar hubungan antara pemberian konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap panjang badan pada larva zebrafish model *stunting*. Hasil uji korelasi Pearson didapatkan nilai koefisien korelasi 0,683 ($p=0,001$); artinya ada hubungan positif kuat antara konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan panjang badan pada larva zebrafish model *stunting*. Adanya peningkatan konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) diikuti dengan peningkatan panjang badan pada larva zebrafish model *stunting*.

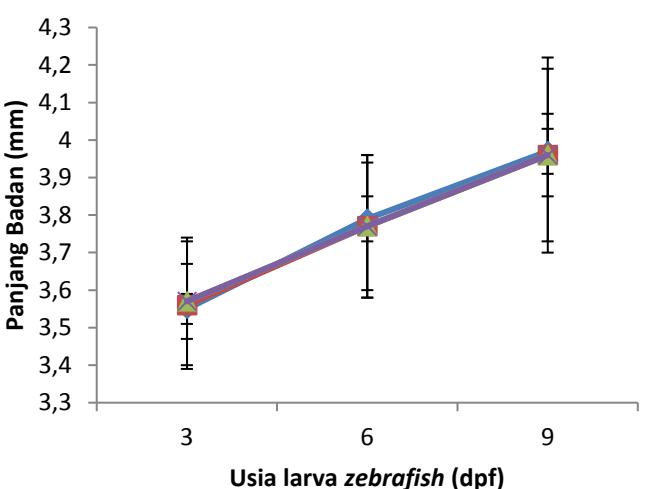
5.1.3 Pengaruh Paparan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish Tanpa Induksi Rotenon

Pengukuran panjang badan dengan pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) saja pada larva zebrafish tanpa induksi rotenon ditunjukkan pada tabel 5.3.

Tabel 5.3 Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish

| Kelompok | Hari ke- | | |
|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 3 | 6 | 9 |
| | Mean ± SD (mm) | Mean ± SD (mm) | Mean ± SD (mm) |
| C | 3,55 ± 0,04 | 3,79 ± 0,06 | 3,97 ± 0,06 |
| MO1 | 3,56 ± 0,17 | 3,77 ± 0,17 | 3,96 ± 0,11 |
| MO2 | 3,57 ± 0,17 | 3,77 ± 0,19 | 3,96 ± 0,23 |
| MO3 | 3,57 ± 0,10 | 3,77 ± 0,19 | 3,96 ± 0,26 |
| p - value | 0,968 | 0,999 | 0,941 |

Keterangan : C: kontrol; MO1: ekstrak daun kelor 0,56 µg/mL ; MO2: ekstrak daun kelor 1,12 µg/mL; MO3: ekstrak daun kelor 2,24 µg/mL



Gambar 5.4 Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish antara Kelompok Kontrol dan Kelompok Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Tanpa Induksi Rotenon.

Tidak didapatkan perbedaan panjang badan antara kelompok C, MO1, MO2, MO3 di usia 3, 6 dan 9 dpf ($p>0,05$). Keterangan : C: kontrol; MO1: ekstrak daun kelor 0,56 μ g/mL; MO2: ekstrak daun kelor 1,12 μ g/mL; MO3: ekstrak daun kelor 2,24 μ g/mL

Tabel 5.3 dan gambar 5.4 menunjukkan tidak ada perbedaan panjang badan yang bermakna antara kelompok C dengan kelompok yang diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam berbagai konsentrasi (0,56 μ g/mL; 1,12 μ g/mL; dan 2,24 μ g/mL) pada usia 3, 6 dan 9 dpf ($p=0,968$; $p=0,999$; $p=0,941$; secara berurutan). Hal ini menunjukkan pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) saja tidak mempengaruhi panjang badan larva zebrafish.

5.2 Pengaruh Paparan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Kadar MDA pada Larva Zebrafish Model Stunting

Hasil pengukuran kadar malondialdehid (MDA) pada larva zebrafish model stunting usia 6 dpf menggunakan metode enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ditunjukkan pada tabel 5.4 dan gambar 5.5.

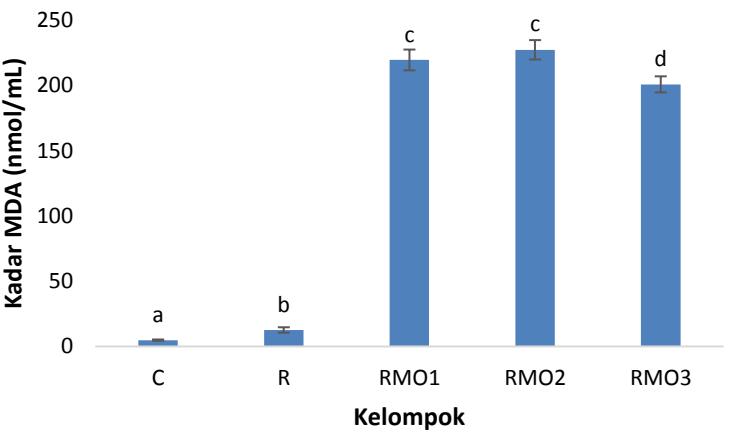
Tabel 5.4 Rerata Kadar MDA Larva Zebrafish Model Stunting pada Usia 6 dpf

| Kelompok | Kadar | |
|-----------|---------------|-----------|
| | MDA (nmol/ml) | Mean ± SD |
| C | 4,84 ± 0,51 | |
| R | 12,63 ± 2,08 | |
| RMO1 | 219,45 ± 7,97 | |
| RMO2 | 227,23 ± 7,43 | |
| RMO3 | 200,75 ± 6,16 | |
| p - value | 0,000* | |

Keterangan : C: kontrol; R: rotenon 12,5 ppb; RMO1: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 0,56 µg/mL ; RMO2: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 1,12 µg/mL; RMO3: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 2,24 µg/mL; *: signifikan

Tabel 5.4 menunjukkan perbedaan kadar MDA yang bermakna antar kelompok ($p=0,000$). Uji Post Hoc dilakukan untuk melihat adanya perbedaan

kadar MDA yang lebih spesifik antar masing-masing kelompok (gambar 5.5).



Gambar 5.5 Rerata Kadar MDA Larva Zebrafish pada Usia 6 dpf. Kelompok R, RMO1, RMO2, RMO3 menunjukkan peningkatan kadar MDA dibandingkan kelompok C ($p<0,05$). Keterangan : C: kontrol; R: rotenon 12,5 ppb; RMO1: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 0,56 µg/mL ; RMO2: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 1,12 µg/mL; RMO3: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 2,24 µg/mL; a-d: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna

Gambar 5.5 menunjukkan peningkatan kadar MDA yang bermakna antara kelompok R, RMO1, RMO2, RMO3 dengan C ($p<0,05$).

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui seberapa besar hubungan antara pemberian konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap kadar

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 MDA. Hasil uji korelasi *Spearman* didapatkan nilai koefisien korelasi sebesar 0,415 ($p=0,069$); artinya tidak ada hubungan yang bermakna antara konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan kadar MDA pada larva *zebrafish* model *stunting*.

5.3 Pengaruh Paparan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Kadar IL-6 pada Larva Zebrafish Model Stunting

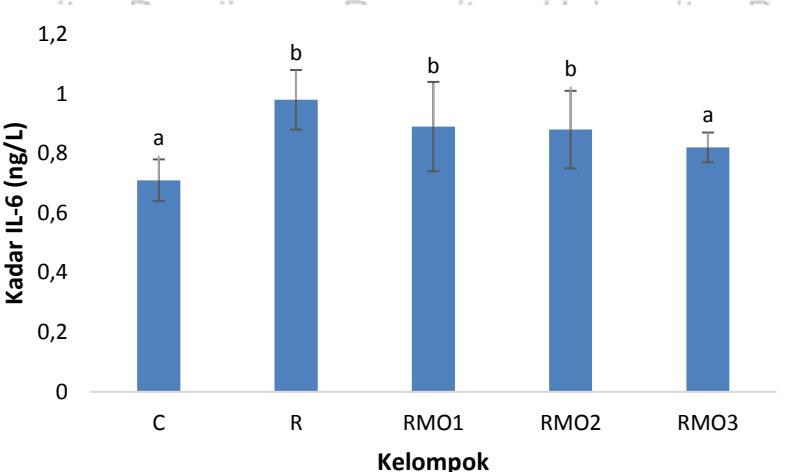
Hasil pengukuran kadar interleukin-6 (IL-6) pada larva *zebrafish* model *stunting* usia 6 dpf menggunakan metode ELISA ditunjukkan pada tabel 5.5 dan gambar 5.6.

Tabel 5.5 Rerata Kadar IL-6 Larva Zebrafish Model Stunting pada Usia 6 dpf

| Kelompok | Kadar |
|-----------------|---------------------------------|
| | IL-6 (ng/L) |
| C | Mean \pm SD |
| R | $0,71 \pm 0,07$ |
| RMO1 | $0,98 \pm 0,10$ |
| RMO2 | $0,89 \pm 0,15$ |
| RMO3 | $0,88 \pm 0,13$ |
| | $0,82 \pm 0,05$ |
| | p-value |
| | 0,011* |

Keterangan : C: kontrol; R: rotenon 12,5 ppb; RMO1: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 0,56 μ g/mL ; RMO2: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 1,12 μ g/mL; RMO3: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 2,24 μ g/mL; *: signifikan

Tabel 5.5 menunjukkan didapatkan perbedaan kadar IL-6 yang bermakna antar kelompok ($p=0,011$). Untuk melihat adanya perbedaan kadar IL-6 yang lebih spesifik antar masing-masing kelompok maka dilakukan uji *Post Hoc* (gambar 5.6).



Gambar 5.6 Rerata Kadar IL-6 Larva Zebrafish pada Usia 6 dpf. Kelompok R menunjukkan peningkatan kadar IL-6 dibandingkan kelompok C ($p=0,001$). Penurunan kadar IL-6 pada kelompok RMO3 dibandingkan kelompok R ($p=0,027$). Keterangan : C: kontrol; R: rotenon 12,5 ppb; RMO1: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 0,56 μ g/mL ; RMO2: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 1,12 μ g/mL; RMO3: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 2,24 μ g/mL; a-b: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna

Gambar 5.6 menunjukkan peningkatan kadar IL-6 yang bermakna pada kelompok R dibandingkan dengan kelompok C ($p=0,001$). Sedangkan, didapatkan penurunan kadar IL-6 yang tidak bermakna pada kelompok RMO1 dan RMO2 ($p=0,221$ dan $p=0,160$; secara berurutan). Sementara itu, penurunan kadar IL-6 yang bermakna ditunjukkan pada kelompok RMO3 dibandingkan dengan kelompok R ($p=0,027$).

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui seberapa besar hubungan antara pemberian konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap kadar IL-6.

Hasil uji korelasi Pearson didapatkan nilai koefisien korelasi $-0,465$ ($p=0,039$); artinya ada hubungan negatif sedang antara konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan kadar IL-6 pada larva zebrafish model *stunting*.

Adanya peningkatan konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) diikuti dengan penurunan kadar IL-6 pada larva zebrafish model *stunting*.

5.4 Hubungan antara Panjang Badan dengan Kadar MDA pada Larva Zebrafish Model Stunting

Hasil uji korelasi antara panjang badan dengan kadar MDA pada larva zebrafish model stunting terlihat pada tabel 5.6.

Tabel 5.6 Hasil Uji Korelasi Panjang Badan dengan Kadar MDA pada Larva Zebrafish Model Stunting

| Variabel | Uji Korelasi | Kesimpulan | |
|-----------------------|--------------|------------|-------------------------------|
| | p-value | r-value | |
| Panjang badan dan MDA | 0,148 | 0,298 | Tidak ada hubungan signifikan |

Keterangan : MDA, malondialdehid

Hasil uji korelasi Spearman antara panjang badan dengan kadar MDA diperoleh nilai p-value 0,148; artinya tidak ada hubungan yang bermakna antara panjang badan dengan kadar MDA pada larva zebrafish model stunting.

5.5 Hubungan antara Panjang Badan dengan Kadar IL-6 pada Larva Zebrafish Model Stunting

Hasil uji korelasi antara panjang badan dengan kadar IL-6 pada larva zebrafish model stunting terlihat pada tabel 5.7.

Tabel 5.7 Hasil Uji Korelasi Panjang Badan dengan Kadar IL-6 pada Larva Zebrafish Model Stunting

| Variabel | Uji Korelasi | Kesimpulan | |
|------------------------|--------------|------------|-------------------------|
| | p-value | r-value | |
| Panjang badan dan IL-6 | 0,024* | -0,449 | Ada hubungan signifikan |

Keterangan : IL-6, interleukin-6; *: signifikan

Hasil uji korelasi Pearson antara panjang badan dengan kadar IL-6 menunjukkan adanya hubungan negatif dengan nilai koefisien korelasi -0,449 ($p=0,024$); artinya ada hubungan negatif sedang antara kadar IL-6 dengan

($p=0,024$); artinya ada hubungan negatif sedang antara kadar IL-6 dengan

panjang badan pada larva *zebrafish* model *stunting*. Adanya penurunan kadar IL-6 diikuti dengan peningkatan panjang badan pada larva *zebrafish* model *stunting*.

5.6 Hubungan antara Kadar MDA dengan Kadar IL-6 pada Larva Zebrafish Model Stunting

Uji korelasi antara kadar MDA dan kadar IL-6 dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat hubungan antara kedua parameter yang diuji menggunakan korelasi spearman ditunjukkan pada tabel 5.8.

Tabel 5.8 Hasil Uji Korelasi Kadar MDA dengan Kadar IL-6 pada Larva Zebrafish model Stunting

| Variabel | Uji Korelasi | Kesimpulan |
|------------|--------------|------------|
| | p-value | r-value |
| Kadar MDA | | |
| Kadar IL-6 | 0,409 | 0,173 |

Keterangan : MDA, malondialdehid; IL-6, interleukin-6

Hasil uji korelasi antara kadar MDA dan kadar IL-6 diperoleh nilai p-value 0,409; artinya tidak ada hubungan yang bermakna antara kadar MDA dengan kadar IL-6 pada larva *zebrafish* model *stunting*.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

6.1 Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Panjang Badan pada Larva Zebrafish Model Stunting

6.1.1 Pengaruh Induksi Rotenon Terhadap Larva Zebrafish

Stunting merupakan suatu retardasi pertumbuhan linear. *Stunting* telah digunakan secara luas untuk mengukur status gizi individu maupun kelompok masyarakat (Brâncă *et al.*, 2015). Penggunaan *stunting* atau *linear growth* sebagai indikator malnutrisi memiliki banyak pertimbangan, salah satunya adalah pengukuran tinggi badan (TB) atau panjang badan (PB) menurut umur (Waterlow, 1994; WHO, 2010). Atas dasar tersebut, panjang badan dijadikan parameter pada penelitian ini.

Pengukuran panjang badan dilakukan pada 3, 6 dan 9 *day post fertilization* (dpf) sesuai dengan analogi usia anak-anak 0, 2 dan 8 tahun pada manusia (Sorribes, 2013). Hasil pengukuran panjang badan larva zebrafish menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok rotenon (R) dan kontrol (C) pada 6 dan 9 dpf. Sedangkan, tidak ada perbedaan panjang badan yang bermakna antara kelompok rotenon (R) dan kontrol (C) pada 3 dpf (gambar 5.1).

Tidak adanya perbedaan panjang badan yang bermakna antara kelompok rotenon (R) dan kontrol (C) ditunjukkan pada 3 dpf. Hal ini sesuai dengan Syed (2015) dan Picasso (2016) yang menyebutkan bahwa panjang badan saat lahir pada *stunting* adalah normal.

Didapatkan perbedaan panjang badan yang bermakna antara kelompok kontrol (C) dan rotenon (R) pada 6 dan 9 dpf. Hal ini sejalan dengan definisi bahwa *stunting* mulai terlihat pada saat anak berusia 2 tahun dan memiliki

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

BAB 6

PEMBAHASAN

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

manifestasi jangka panjang hingga anak menginjak usia reproduksi (Prendergast & Humphrey, 2014).

Menurut Kolsteren (1996) salah satu faktor penyebab gangguan pertumbuhan linear pada tahun pertama kehidupan adalah toksin. Rotenon merupakan pestisida yang tergolong *endocrine disrupting chemical* (EDCs) (Kortenkamp, 2007; Mnif et al., 2011). Rotenon bekerja menghambat NADH dehydrogenase yang dikenal dengan komplek I, sehingga menyebabkan penurunan kemampuan oksidasi fosforilasi, menyebabkan hambatan pada produksi ATP di mitokondria, dan mendorong terbentuknya radikal bebas (ROS), serta mengaktifkan mekanisme stres oksidatif (Xu et al., 2016).

Penelitian sebelumnya pada model *stunting zebrafish* yang dibuktikan oleh Wijayanti (2016) dan Ridlayanti (2016) menunjukkan paparan rotenon konsentrasi 10 ppb pada zebrafish usia 2-72 hour post fertilization (hpf) dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan linier pada usia 6 dpf. Selain itu, pemberian rotenon dosis 12,5 ppb pada zebrafish (2-72 hpf) dapat menyebabkan *stunting* melalui penurunan ekspresi *insulin like growth factor-1* (IGF-1) (Cory'ah, 2017), *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK 1/2), protein Ki-67 (Zakiah, 2017), *glucose transporter-1* (GLUT-1) (Yuningsih, 2017), *glucose transporter-4* (GLUT-4) (Primaditya, 2017), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *vascular endothelial growth factor receptor-2* (VEGFR-2) (Wardani, 2017), penurunan osifikasi tulang (Primihastuti, 2017), penurunan osteoblastogenesis melalui penurunan ekspresi *osteoprotegrin* (OPG) (Ariati, 2017), penurunan ekspresi *osteocalcin* (Primaditya, 2017; Yuningsih, 2017), peningkatan osteoklastogenesis (Primihastuti, 2017), peningkatan ekspresi *receptor activator nuclear kappa-B ligand* (RANKL) (Ariati, 2017). Panjang badan merupakan indikator utama untuk menentukan suatu kondisi *stunting* (Bash, 2015).

6.1.2 Pengaruh Paparan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish Model Stunting

Patofisiologi terjadinya *stunting* berhubungan dengan kondisi malnutrisi kronis, stres oksidatif dan inflamasi kronis (Frongillo, 1999; MCA Indonesia, 2013; Aly et al, 2014; Prendergast et al., 2014; Khotimah et al., 2018). Kelor (*Moringa oleifera*) mengandung banyak komponen bioaktif, seperti vitamin, karotenoid, polifenol, asam fenolik, flavonoid, alkaloid, glukosinolat, isothiocyanate, tannin, saponin, oxalat dan phytate (Leone et al., 2015). Golongan flavonoid, seperti quercetin (0,07%-1,26%) dan kaempferol (0,05-0,67%) yang terkandung dalam Kelor (*Moringa oleifera*) merupakan antioksidan kuat yang mampu menghambat stress oksidatif (Coppin et al., 2013). Selain itu, *isothiocyanate*, β -carotene, quercetin, dan kaempferol yang terkandung dalam kelor (*Moringa oleifera*) juga memiliki efek antiinflamasi (Kopec et al., 2014; Waterman et al., 2014; Catarino et al., 2016; Gupta et al., 2017), antikanker (Tiloke et al., 2013; Jung, 2014), dan anti-hipertensi (Formika, 1995).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi peningkatan panjang badan larva zebrafish pada kelompok yang diberikan rotenon dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam berbagai konsentrasi (RMO1, RMO2, RMO3) dibandingkan dengan kelompok rotenon (R). Nilai rerata panjang badan larva zebrafish pada kelompok RMO1, RMO2 dan RMO3 tampak mendekati kelompok kontrol (C) pada usia 6 dan 9 dpf (tabel 5.2). Dari hasil uji korelasi Pearson, ditunjukkan teradapat hubungan positif kuat antara konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan panjang badan pada larva zebrafish model stunting. Adanya peningkatan konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) diikuti dengan peningkatan panjang badan pada larva zebrafish model *stunting*. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) mampu mengoreksi panjang badan larva zebrafish model *stunting*.

6.1.3 Pengaruh Paparan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish Tanpa Induksi Rotenon

Hasil penelitian menunjukkan tidak ada perbedaan panjang badan larva zebrafish pada kelompok yang diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) saja (MO1, MO2, MO3) dengan kelompok kontrol (C) pada usia 3, 6 dan 9 dpf (gambar 5.4). Hal ini menggambarkan bahwa pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) konsentrasi 0,56 µg/mL; 1,12 µg/mL; dan 2,24 µg/mL tidak memberikan efek *stunting* terhadap pertumbuhan panjang badan larva zebrafish. Berbagai penelitian pada hewan coba telah menilai keamanan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) secara umum, dan telah menunjukkan tingkat keamanan yang sangat tinggi (Adedapo *et al.*, 2009; Diallo *et al.*, 2009; Stohs & Hartman, 2015). Tidak ada efek samping yang dilaporkan dalam penelitian hewan coba maupun manusia (Kumari, 2010; Awodele *et al.*, 2012; Kushwaha *et al.*, 2012; Stohs & Hartman, 2015).

6.2 Pengaruh Paparan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Kadar MDA pada Larva Zebrafish Model Stunting

Malondialdehyde (MDA) merupakan produk akhir dari peroksidase lipid didalam sel. Peningkatan radikal bebas menyebabkan produksi MDA secara berlebihan. Kadar MDA yang tinggi merupakan tanda dari peroksidase lipid dan stres oksidatif (Rahmath *et al.*, 2015). Hasil penelitian ini menunjukkan peningkatan kadar MDA yang signifikan pada kelompok rotenon (R) dibandingkan dengan kelompok kontrol (C) (gambar 5.5). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian rotenon menyebabkan kerusakan mitokondria yang dapat menyebabkan peningkatan ROS (Douarre, 2012; Zafiroopoulos *et al.*, 2014). Hasil ini sesuai dengan studi oleh Khotimah *et al* (2018), pemberian rotenon dapat meningkatkan pembentukan radikal bebas (ROS), penurunan kadar superoksid dismutase (SOD) dan katalase (CAT), serta peningkatan kadar MDA.

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Rotenon menghambat kompleks I mitokondria yang menyebabkan penurunan jumlah *adenosine triphosphate* (ATP) sehingga nukleus gagal membelah dan proses apoptosis terjadi. Kebocoran kompleks I menghasilkan peningkatan elektron bebas yang bereaksi terhadap molekul oksigen yang menghasilkan radikal superoksida (O_2^-) (Lenaz *et al.*, 2006). Radikal superoksida akan diubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) oleh enzim superoksida dismutase (SOD). Oleh enzim katalase (CAT), hidrogen peroksida akan dikatalisis menjadi H_2O dan O_2 . Pada kondisi stres oksidatif terbentuk radikal bebas oksigen dan H_2O_2 yang berlebih, sehingga sistem proteksi tubuh seperti enzim katalase dan glutation peroksidase tidak dapat lagi menetralkan semua radikal bebas oksigen yang terbentuk (Yin *et al.*, 2011).

Pengamatan pada kelompok yang diberikan rotenon dan ekstrak kelor (*Moringa oleifera*) berbagai konsentrasi (RMO1, RMO2, RMO3) didapatkan peningkatan kadar MDA (gambar 5.5). Hal ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Rahmath (2015), kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan stres oksidatif melalui penghambatan pembentukan radikal bebas. *Isothiocyanate*, β -*carotene*, querctin, dan kaempferol yang terkandung dalam kelor (*Moringa oleifera*) bertindak sebagai antioksidan yang mampu menghambat stres oksidatif (Nijveldt *et al.*, 2001; Coppin *et al.*, 2013). Hasil penelitian Wangta (2018) dan Chandra (2018) juga menyatakan bahwa pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) mampu meningkatkan aktivitas enzim SOD dan CAT sehingga radikal superoksida yang terbentuk dapat diubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2), dan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang terbentuk dapat dikatalisis menjadi H_2O dan O_2 . Peningkatan kadar MDA pada kelompok RMO1, RMO2 dan RMO3 kemungkinan akibat pemberian kombinasi antara rotenon dan *Moringa oleifera*.

Penelitian oleh Gouda *et al.* (2018) menyatakan bahwa pemberian *Moringa oleifera* dapat meningkatkan metabolisme mitokondria sehingga meningkatkan

uptake O₂. Namun, pemberian rotenon dapat menghambat kompleks I mitokondria yang mengakibatkan penurunan kemampuan oksidasi fosforilasi dan menghambat transport elektron dari kompleks I mitokondria (Xu *et al.*, 2016). Sehingga pemberian kombinasi antara rotenon dan *Moringa oleifera* dapat meningkatkan metabolisme mitokondria yang sudah mengalami gangguan fungsi sehingga dapat meningkatkan pembentukan radikal bebas (ROS) yang berujung pada stres oksidatif. Selain itu, peningkatan kadar MDA pada kelompok RMO1, RMO2 dan RMO3 juga diakibatkan karena komponen mineral berupa metal yang terkandung dalam kelor (*Moringa oleifera*), seperti besi (Fe), magnesium (Mg), cobalt (Co) (Mulyaningsih & Yusuf, 2018). Komponen mineral ini dapat bereaksi dengan hidrogen peroksida (H₂O₂) membentuk radikal hidroksil yang sangat reaktif melalui reaksi Fenton (Schoonen *et al.*, 2005). Radikal hidroksil dapat merusak *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) melalui proses peroksidasi lipid dan salah satu aldehida sekunder yang terbentuk adalah MDA (Yin *et al.*, 2011). Namun, peningkatan kadar MDA ini tidak berhubungan dengan panjang badan pada larva zebrafish model stunting (tabel 5.6).

6.3 Pengaruh Paparan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Kadar IL-6 pada Larva Zebrafish Model Stunting

Interleukin-6 (IL-6) merupakan sitokin pro-inflamasi yang akan diproduksi pada beberapa keadaan, seperti infeksi, paparan toksin atau saat terjadi kerusakan jaringan. *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) yang dilepaskan oleh sel yang mengalami kerusakan akan menyebabkan proses inflamasi (Tanaka *et al.*, 2014). IL-6 diketahui dapat mempengaruhi hormon pertumbuhan dan pertumbuhan tulang, sehingga akan berpengaruh terhadap pertumbuhan linear (Kishimoto, 1989; Fan *et al.*, 1995; Romas *et al.*, 1996; De Benedetti *et al.*, 1997; DiFede *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2017). IL-6 dapat menginduksi resorpsi tulang dan secara langsung meningkatkan pembentukan

osteoklas (Kishimoto, 1989; Romas *et al.*, 1996). IL-6 merangsang produksi RANKL dalam sel osteoblastik dengan aktivasi *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) untuk meningkatkan osteoklastogenesis (Tamura *et al.*, 1993; O'Brien *et al.*, 1999). Selain itu, IL-6 juga dapat menurunkan kadar *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) yang berperan dalam pertumbuhan (De-Benedetti *et al.*, 1997; Prendergast *et al.*, 2014).

Hasil penelitian menunjukkan peningkatan kadar IL-6 pada kelompok rotenon (R) dibandingkan dengan kelompok kontrol (C) (gambar 5.6). Hasil ini sesuai dengan penelitian oleh Khotimah *et al.* (2015) dan Ye *et al.* (2016), rotenon dapat meningkatkan aktivitas dari *nuclear factor- κ B* (NF- κ B), dan ekspresi IL-6, sehingga mengakibatkan terjadinya inflamasi. Pada kelompok yang diberikan rotenon dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) berbagai konsentrasi (RMO1, RMO2 dan RMO3) menunjukkan penurunan kadar IL-6 dibandingkan dengan kelompok R (gambar 5.6). Namun berdasarkan uji statistik One Way ANOVA, efek signifikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) ditunjukkan oleh kelompok RMO3 (konsentrasi 2,24 μ g/mL). Hasil ini sesuai dengan penelitian oleh Koolheat *et al.* (2014), ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) mampu menghambat produksi sitokin makrofag manusia (TNF- α , IL-6 dan IL-8) yang diinduksi oleh asap rokok dan *lipopolysaccharide* (LPS). Esktrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan kadar IL-6, karena *isothiocyanate*, β -carotene, quercetin, dan kaempferol yang terkandung dalam kelor (*Moringa oleifera*) bertindak sebagai anti-inflamasi (Kopec *et al.*, 2014; Waterman *et al.*, 2014; Catarino *et al.*, 2016; Gupta *et al.*, 2017). Penurunan kadar IL-6 berhubungan dengan panjang badan pada larva *zebrafish* model *stunting* (tabel 5.7).

6.4 Hubungan antara Panjang Badan dengan Kadar MDA pada Larva Zebrafish Model Stunting

Hasil penelitian menunjukkan tidak ada hubungan yang bermakna antara panjang badan dengan kadar MDA pada larva zebrafish model *stunting* (tabel 5.6).

Hasil ini berbeda dengan penelitian oleh Aly *et al.* (2014), kondisi stres oksidatif pada anak malnutrisi berhubungan dengan terjadinya *stunting*. Aly *et al.*

(2014) melaporkan didapatkan peningkatan kadar MDA pada anak *stunting* yang mengalami malnutrisi. Selain itu, penelitian oleh Khotimah *et al.* (2018)

melaporkan penurunan kadar MDA pada kelompok yang diberi rotenon dan ekstrak *Centella asiatica* pada 4, 5 dan 6 dpf diikuti dengan perbaikan panjang

badan larva zebrafish. Tidak adanya hubungan yang bermakna antara panjang

badan dengan kadar MDA pada larva zebrafish model *stunting* kemungkinan

disebabkan karena pada penelitian ini hanya dilakukan pengukuran kadar MDA pada 6 dpf sehingga tidak dapat mengetahui bagaimana grafik perubahan kadar

MDA terhadap panjang badan larva zebrafish model *stunting* pada 3, 6 dan 9 dpf.

6.5 Hubungan antara Panjang Badan dengan Kadar IL-6 pada Larva Zebrafish Model Stunting

Hasil penelitian menunjukkan terdapat korelasi negatif dengan kekuatan sedang antara panjang badan dengan kadar IL-6 pada larva zebrafish model

stunting (tabel 5.7), artinya adanya penurunan kadar IL-6 diikuti dengan

peningkatan panjang badan pada larva zebrafish model *stunting*. Hasil ini sesuai

dengan teori bahwa IL-6 dapat mempengaruhi hormon pertumbuhan (Fan *et al.*, 1995; De-Benedetti *et al.*, 1997; DiFedele *et al.*, 2005; Prendergast *et al.*, 2014)

dan pertumbuhan tulang (Kishimoto, 1989; Romas *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2017), sehingga akan berpengaruh terhadap pertumbuhan linear.

Salah satu teori terjadinya *stunting* yaitu kondisi inflamasi kronis

(Prendergast *et al.*, 2014). Penelitian oleh AbdEl-Maksoud *et al.* (2017)

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
melaporkan didapatkan peningkatan kadar IL-6 pada anak *stunting* dibandingkan dengan kelompok sehat. Pada studi anak-anak dengan inflamasi kronis, kadar IL-6 telah dikaitkan dengan berkurangnya kadar IGF-1 dan pertumbuhan linear yang buruk (De-Benedetti *et al.*, 1997; Ballinger, 2002). Selain dapat menurunkan ekspresi gen IGF-1 di hati, IL-6 juga dapat meningkatkan degradasi proteolitik dari IGFBP-3 (De-Benedetti *et al.*, 1997; AbdEl-Maksoud *et al.*, 2017). Sederquist *et al* (2014) menemukan bahwa beberapa sitokin inflamasi termasuk TNF- α dan IL-6 dapat bertindak secara individu ataupun kombinasi dalam mempengaruhi pertumbuhan linear anak. IL-6 juga mampu menghambat aktivitas osteoblas, dan meningkatkan osteoklastogenesis (Kishimoto, 1989; Romas *et al.*, 1996; Szaleckia *et al.*, 2018). Dengan penurunan kadar IL-6, fungsi dari IGF-1 tidak terganggu, terjadi keseimbangan antara osteoblas dan osteoklas, sehingga pertumbuhan normal dipertahankan.

6.6 Hubungan antara Kadar MDA dengan Kadar IL-6 pada Larva Zebrafish Model Stunting

Hasil penelitian menunjukkan tidak ada hubungan yang bermakna antara kadar MDA dengan kadar IL-6 pada larva zebrafish model *stunting* (tabel 5.8). Hasil ini berbeda dengan teori yang menyatakan bahwa kerusakan oksidatif akibat peroksidasi lipid akan menghasilkan lipid aldehid, seperti *4-hydroxy-trans-2-nonenal* (HNE), *acrolein*, dan *malondialdehid* (MDA), yang dapat mempengaruhi aktivasi faktor transkripsi *nuclear factor- kB* (NF- κ B) sehingga akan terjadi peningkatan produksi sitokin pro-inflamasi, salah satunya IL-6 (Yadav, 2015). Selain itu, penelitian oleh Khotimah *et al.* (2018) melaporkan penurunan kadar MDA pada kelompok yang diberi rotenon dan ekstrak *Centella asiatica* pada 4, 5 dan 6 dpf diikuti dengan penurunan kadar IL-6 larva zebrafish.

Tidak adanya hubungan yang bermakna antara kadar MDA dan IL-6 pada larva zebrafish model *stunting* kemungkinan disebabkan karena pengukuran hanya

dilakukan pada satu waktu, yaitu bagaimana grafik perubahan kadar model *stunting* pada 3, 6 dan 9 dpf.

6 dpf, sehingga tidak dapat mengetahui

DAFTAR PUSTAKA

- ## DAFTAR PUSTAKA
- Abd El-Maksoud, A. M., Khairy, S. A., Sharada, H. M., Abdalla, M. S., Ahmed, N. F. (2017). Evaluation of pro-inflammatory cytokines in nutritionally stunted Egyptian children. *Egyptian Pediatric Association Gazette*, 65(3), 80–84.

Adam-Vizi, V., & Chinopoulos, C. (2006). Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(12), 639–645.

Adedapo, A.A., Mogbojuri, O.M., Emikpe, B.O. (2009). Safety evaluations of the aqueous extract of the leaves of *Moringa oleifera* in rats. *J Med Plant*, 3, 586–591.

Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A., Gupta, S. (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 49.

Al-Gubory, K. H., Fowler, P. A., Garrel, C. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(10), 1634–1650.

Aly, G. S., Shaalan, A. H., Mattar, M. K., Ahmed, H. H., Zaki, M. E., Abdallah, H. R. (2014). Oxidative stress status in nutritionally stunted children. *Egyptian Pediatric Association Gazette*, 62(1), 28–33.

Andreeva, V., Connolly, M. H., Stewart-Swift, C., Fraher, D., Burt, J., Cardarelli, J., Yelick, P. C. (2011). Identification of adult mineralized tissue zebrafish mutants. *Genesis*, 49(4), 360–366.

Arabshahi, D. S., Devi, D. V., Urooj, A. (2007). Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. *Food Chemistry*, 100, 1100–1105.

Ariati, L.I.P. (2017). Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella Asiatica*) Terhadap Ekspresi Osteoprotegrin (Opg) Dan Receptor Activator Nuclear Kappa-B Ligan (Rankl) Pada Stunting Larva Zebrafish (*Danio Rerio*) Yang Diinduksi Rotenon. Magister thesis, Universitas Brawijaya.

Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., Groth, D. M., Verdile, G., Martins, R. N. (2012). Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction. *Journal of Visualized Experiments*, (69).

Awodele, O., Oreagba, I. A., Odoma, S., Teixeira da Silva, J. A., Osunkalu, V. O. (2012). Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 330–336.

- Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–31.
- Badham, J., Sweet, L. (2010). Stunting: an overview. *Sight and Life Magazine*, 3, 40-47.
- Bais, S., Singh, G. S., Sharma, R. (2014). Antiobesity and Hypolipidemic Activity of *Moringa oleifera* Leaves against High Fat Diet-Induced Obesity in Rats. *Advances in Biology*, 1–9.
- Ballinger, A. (2002). Fundamental mechanisms of growth failure in inflammatory bowel disease. *Horm Res*, 58(1), 7–10.
- Ballinger, A.B., Camacho-Hubner, C., Croft, N.M. (2001). Growth failure and intestinal inflammation. *QJM*, 94, 121–5.
- Barbazuk, W. B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., Bedell, J. A., McPherson, J. D., Johnson, S. L. (2000). The Syntenic Relationship of the Zebrafish and Human Genomes. *Genome Research*, 10(9), 1351–1358.
- Bartz, S., Mody, A., Hornik, C., Bain, J., Muehlbauer, M., Kiyimba, T. (2014). Severe acute malnutrition in childhood: hormonal and metabolic status at presentation, response to treatment, and predictors of mortality. *J Clin Endocrinol Metab*, 99, 2128–37.
- Baskol, G., Demir, H., Baskol, M., Kilic, E., Ates, F., Karakukcu, C., Ustdal, M. (2006). Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochemistry and Function*, 24(4), 307–311.
- Bennett, R. N., Mellon, F. A., Foidl, N., Pratt, J. H., Dupont, S. M., Perkins, L., Kroon, P. A. (2003). Profiling Glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *M. oleifera* L. (Horseradish Tree) and *Moringa stenopetala* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 3546–3553.
- Bianchi, M. E. (2006). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(1), 1–5.
- Black, R. E., Victora, C. G., Walker, S. P., Bhutta, Z. A., Christian, P., de Onis, M., Ezzati, M., Grantham-McGregor, S., Katz, J., Martorell, R., Uauy, R. (2013). Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *The Lancet*, 382(9890), 427–451.
- Bonewald, L.F. (2011). The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*, 26, 229-238.
- Brookes, P. S. (2005). Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(1), 12–23.

- Repository Universitas Brawijaya
- Repository Universitas Brawijaya
- Bryson-Richardson, R. J., Berger, S., Schilling, T. F., Hall, T. E., Cole, N. J., Gibson, A. J., Sharpe, J., Currie, P. D. (2007). FishNet: an online database of zebrafish anatomy. *BMC Biology*, 5(1), 34.
- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M. L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 15(4), 186–190.
- Castellani, R.J., Honda, K., Zhu, X., Cash, A.D., Nunomura, A., Perry, G., Smith, M.A. (2004). Contribution of redox-active iron and copper to oxidative damage in Alzheimer disease. *Ageing Research Reviews*, 3(3), 319–326
- Castello, G., Costantini, S., Scala, S. (2010). Targeting the inflammation in HCV-associated hepatocellular carcinoma: a role in the prevention and treatment. *Journal of Translational Medicine*, 8(1), 109.
- Catarino, M.D., Talhi, O., Rabahi, A., Silva, A.M.S., Cardoso, S.M. (2016). The Antiinflammatory Potential of Flavonoids: Mechanistic Aspects. *Studies in Natural Products Chemistry*, 48, 65–99.
- Chandra, K. (2018). Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Kadar Interleukin-6 dan Aktivitas Katalase pada Larva Zebrafish (*Danio rerio*) Stunting yang Diinduksi dengan Rotenon. Magister thesis, Universitas Brawijaya.
- Cheenpracha, S., Park, E.J., Yoshida, W.Y., Barit, C., Wall, M., Pezzuto, J.M., Chang, L.C. (2010). Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits. *Bioorganic Med Chem*, 18(17), 6598–6602.
- Chitramuthu, B.P. (2013). Modeling Human Disease and Development in Zebrafish. *Human Genet Embryol*, 3(1), 1-3.
- Choe, J.Y., Park, K.Y., Park, S.H., Lee, S.I., Kim, S.K. (2013). Regulatory effect of calcineurin inhibitor, tacrolimus, on IL-6/sIL-6R-mediated RANKL expression through JAK2-STAT3-SOCS3 signaling pathway in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther*, 15, R26
- Chumark, P., Khunawat, P., Sanvarinda, Y., Phornchirasilp, S., Morales, N.P., Phivthong-ngam, L., Ratanachamnong, P., Srisawat, S., Pongrapeeporn, K. (2008). The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *J. Ethnopharmacol*, 116, 439–446.
- Clayton, R., Clark, J. B., Sharpe, M. (2005). Cytochrome c release from rat brain mitochondria is proportional to the mitochondrial functional deficit: implications for apoptosis and neurodegenerative disease. *Journal of Neurochemistry*, 92(4), 840–849.

- Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Coppin, J. P., Xu, Y., Chen, H., Pan, M. H., Ho, C. T., Juliani, R., Simon, J. E., Wu, Q. (2013). Determination of flavonoids by LC/MS and anti-inflammatory activity in *Moringa oleifera*. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1892–1899.
- Cory'ah, F. A. N. (2017). *Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (Centella Asiatica) Terhadap Panjang Badan, Ekspresi Insulin Like Growth Factor-1 (Igf-1) Dan Insulin Reseptor Substrat (Irs) Pada Larva Zebrafish (Danio Rerio) Model Stunting Dengan Induksi Rotehon*. Magister thesis, Universitas Brawijaya.
- CSH Protocols. (2011). *Protocol Zebrafish embryo medium*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Danaei, G., Andrews, K. G., Sudfeld, C. R., Fink, G., McCoy, D. C., Peet, E., Sania, A., Smith Fawzi, M. C., Ezzati, M., Fawzi, W. W. (2016). Risk Factors for Childhood Stunting in 137 Developing Countries: A Comparative Risk Assessment Analysis at Global, Regional, and Country Levels. *PLoS Med*, 13(11), 1-18.
- Das, N., Sikder, K., Bhattacharjee, S., Majumdar, S.B., Ghosh, S., Majumdar, S., Dey, S. (2013). Quercetin alleviates inflammation after short-term treatment in high-fat-fed mice. *Food Funct.*, 4, 889–898
- David, C.R.S., Angeles, A., Angoluan, R.C., Santos, J.P.E., David, E.S., Dulay, R.M.R. (2016). *Moringa oleifera* (Malunggay) Water Extracts Exhibit Embryo-toxic and Teratogenic Activity in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Model. *Der Pharmacia Lettre*, 8 (7), 163-168
- De Onis, M., & Branca, F. (2016). Childhood stunting: a global perspective. *Maternal & Child Nutrition*, 12, 12–26
- De-Benedetti, F., Alonzi, T., Moretta, A., Lazzaro, D., Costa, P., Poli, V. (1997). Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through decreases in insulin-like growth factor-I. A model for stunted growth in children with chronic inflammation. *J Clin Invest*, 99, 643–650.
- DeBoer, M. D., Scharf, R. J., Leite, A. M., Ferrer, A., Hvat, A., Pinkerton, R., Guerrant, R. L. (2017). Systemic inflammation, growth factors, and linear growth in the setting of infection and malnutrition. *Nutrition*, 33, 248–253.
- Denner, P. A. (2007). Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 81(3), 155–162.
- Desai, M.P. (2011). Thyroid Function in Children. *Supplement to JAPI*, 59, 35-42
- DeTolla, L.J., Srinivas, S., Whitaker, B.R., Andrews, C., Hecker, B., Kane, A.S., Reimschuessel, R. (1995). Guidelines for the care and use of fish in research. *ILAR Journal*, 37, 159-173
- Diallo, A., Eklu-Gadegbeku, K., Mobio, T., Moukha, S., Agbonon, A. (2009). Protective effect of *Moringa oleifera* Lam. and *Lannea kerstingii* extracts

- Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
against cadmium and ethanol induced lipid peroxidation. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4, 160–166.
- DiFedele, L.M., He, J., Bonkowski, E.L., Han, X., Held, M.A., Bohan, A. (2005). Tumor necrosis factor alpha blockade restores growth hormone signaling in murine colitis. *Gastroenterology*, 128, 1278–91.
- Dizdaroglu, M., & Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radicalinduced damage to DNA. *Free Radical Research*, 46(4), 382–419.
- Djojosumarto, P. (2008). *Teknik Aplikasi Pestisida Pertanian Edisi Revisi*. Yogyakarta: Kanisius
- Eisen, J.S. (1996) Zebrafish make a big splash! *Cell*, 87(6), 969-977.
- Engeszer, R. E., Patterson, L. B., Rao, A. A., Parichy, D. M. (2007). Zebrafish in The Wild: A Review of Natural History And New Notes from The Field. *Zebrafish*, 4(1), 21–40.
- EPA. (2007). *Reregistration Eligibility Decision for Rotenone*. Prevention, Pesticides and Toxic Substances. United States: Environmental Protection Agency.
- Eugster, E. A., & Pescovitz, O. H. (2003). New Revelations about the Role of STATs in Stature. *New England Journal of Medicine*, 349(12), 1110–1112.
- Fahey, J.W. (2005). Moringa oleifera: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Phytochemistry*, 47, 123–157
- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56, 5-51
- Faizi, S., Siddiqui, B.S., Saleem, R., Aftab, K., Shaheen, F., Gilani, A. (1998). Hypotensive Constituents from the pods of Moringa oleifera. *Planta Med*, 64, 225-228.
- Fan, J., Li, Y.H., Bagby, G.J., Lang, C.H. (1995). Modulation of inflammationinduced changes in insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-1 by anti-TNF antibody. *Shock*, 4, 21–6.
- Farooq, F., Rai, M., Tiwari, A., Khan, A.A., Farooq, S. (2012). Medicinal properties of Moringa oleifera: an overview of promising healer. *J Med Plant Res*, 6, 4368–4374
- Frongillo, E. A. (1999). Introduction. *The Journal of Nutrition*, 129(2), 529S–530S.
- Fuglie, L. J., Mane, M., de la Vie, L' Arbre (2006). *Moringa oleifera: Traitement et prevention de la malnutrition*. New York: Church World Service.
- García-Ruiz, I., de la Torre, P., Díaz, T., Esteban, E., Fernández, I., Muñoz-Yagüe, T., Solís-Herruzo, J.A. (2002). Sp1 and Sp3 transcription factors

- Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
mediate malondialdehyde-induced collagen alpha 1(I) gene expression in
cultured hepatic stellate cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(34),
30551–30558.
- Garcia, S. C., Grotto, D., Bulc~ao, R. P., Moro, A.M., Roehrs, M., Valentini, J., de
Freitas, F.A., Paniz, C., Bubols, G.B., Charão, M.F. (2013). Evaluation of
lipid damage related to pathological and physiological conditions. *Drug and
Chemical Toxicology*, 36(3), 306–312.
- Gauldie, J., Richards, C., Baumann, H. (1992). IL6 and the acute phase reaction.
Res Immunol, 143, 755–759.
- Gerhard, G. S., Kauffman, E. J., Wang, X., Stewart, R., Moore, J. L., Kasales, C.
J., Demidenko, E., Cheng, K. C. (2002). Life spans and senescent
phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Experimental
Gerontology*, 37(8-9), 1055–1068.
- Glorieux, C., Zamocky, M., Sandoval, J.M., Verrax, J., Calderon, P.B. (2015).
Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free
Radic Biol Med*, 87, 84–97.
- Gopalakrishnan, L., Doriya, K., Kumar, D.S. (2016). Moringa oleifera: A review on
nutritive importance and its medicinal application. *Food Sci Hum Wellness*,
5(2), 49–56.
- Gouda, A. S., El-Nabarawy, N. A., Ibrahim, S. F. (2018). Moringa oleifera extract
(Lam) attenuates Aluminium phosphide-induced acute cardiac toxicity in
rats. *Toxicol Rep*, 5, 209–212.
- Gupta, A., Gautam, M.K., Singh, R.K., Kumar, M.V., Rao, C.H.V., Goel, R.K.,
Anupurba, S. (2010). Immunomodulatory effect of *Moringa oleifera* Lam.
extract on cyclophosphamide induced toxicity in mice. *Indian J. Exp. Biol.*,
48, 1157–1160.
- Gupta, R. C., & Milatovic, D. (2014). Insecticides. *Biomarkers in Toxicology*, 389–
407.
- Gupta, S., Jain, R., Kachhwaha, S., Kothari, S.L. (2017). Nutritional and medicinal
applications of *Moringa oleifera* Lam. Review of current status and future
possibilities. *Journal of Herbal Medicine*, 11, 1–11.
- Hallare, A. V., Castillo, R. L., De Guzman, A. L. B., Balolong, M. P. B., Lazaro, J.
E. H. (2016). Downregulation of liver HSP70 in zebrafish exposed to
Jatropha curcas seed cake extract. *Cogent Environmental Science*, 2(1).
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals,
transition metals and disease, *Biochemical Journal*, 219(1), 1–14.
- Hammad, L. A., Wu, G., Saleh, M. M., Klouckova, I., Dobrolecki, L. E., Hickey, R.
J., Hickey, R. J., Schnaper, L., Novotny, M. V., Mechref, Y. (2009). Elevated
levels of hydroxylated phosphocholine lipids in the blood serum of breast

- Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya Ježek, P., & Hlavatá, L. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(12), 2478–2503.
- Repository Universitas Brawijaya Jones, S.A., & Rose-John, S. (2002). The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. *Biochim Biophys Acta*, 1592, 251-263.
- Repository Universitas Brawijaya Jung, I.L. (2014). Soluble extract of *Moringa oleifera* leaves with a new anticancer activity. *PLOSOne*, 9.
- Repository Universitas Brawijaya Kabashi, E., Brustein, E., Champagne, N., Drapeau, P. (2011). Zebrafish models for the functional genomics of neurogenetic disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Basis of Disease*, 1812(3), 335–345.
- Repository Universitas Brawijaya Kanno, T., Nakamura, K., Ikai, H., Kikuchi, K., Sasaki, K., Niwano, Y. (2012). Literature review of the role of hydroxyl radicals in chemically-induced mutagenicity and carcinogenicity for the risk assessment of a disinfection system utilizing photolysis of hydrogen peroxide. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 51(1), 9–14.
- Repository Universitas Brawijaya Kemenkes RI. 2016. *Infodatin: Situasi Balita Pendek*. Jakarta: Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI.
- Repository Universitas Brawijaya Kholif, A.E., Gouda, G.A., Morsy, T.A., Salem, A.Z.M., Lopez, S., Kholif, A.M. (2015). *Moringa oleifera* leaf meal as a protein source in lactating goat's diets: feed intake, digestibility, ruminal fermentation, milk yield and composition, and its fatty acids profile. *Small Rumin Res*, 129, 129–131.
- Repository Universitas Brawijaya Khotimah, H., Ali, M., Sumitro, S. B., Widodo, M. A. (2015). Decreasing α -synuclein aggregation by methanolic extract of *Centella asiatica* in zebrafish Parkinson's model. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(11), 948–954.
- Repository Universitas Brawijaya Khotimah, H., Darwiti, D., Yuliyani, T., Nuraenah, E., Zahara, E., Kalsum, U., Nurdiana, N., Ali, M.M. (2018). *Centella Asiatica* Increased the Body Length Through the Modulation of Antioxidant in Rotenone-Induced Zebrafish Larvae. *Biomed Pharmacol J*, 11(2), 827-833.
- Repository Universitas Brawijaya Khotimah, H., Sumitro, S. B., Widodo, M. A. (2015). Zebrafish Parkinson's model: Rotenone decrease motility, Dopamine, and increase α -synuclein Aggregation and Apoptosis of Zebrafish Brain. *International Journal of PharmTech Research*, 8(4), 614–621.
- Repository Universitas Brawijaya Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310.
- Repository Universitas Brawijaya Kishimoto, T. (1989). The biology of interleukin-6. *Blood*, 74, 1-10.

- Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Kolsteren, P. (1996). The determinants of stunting: Can we regard the linear growth performance as a continuum of fetal development? *Asia Pacific J Clin Nutr*, 5, 59-69.
- Koolheat, N., Sranujit, R.P., Chumark, P., Potup, P., Laytragoon-Lewin, N., Usuwanthim, K. (2014). An ethyl acetate fraction of *Moringa oleifera* Lam. Inhibits human macrophage cytokine production induced by cigarette smoke. *Nutrients*, 6, 697–710.
- Kopec, R.E., Cooperstone, J.L., Schweiggert, R.M., Young, G.S., Harrison, E.H., Francis, D.M. (2014). Avocado Consumption Enhances Human Postprandial Provitamin A Absorption and Conversion from a Novel High- α -Carotene Tomato Sauce and from Carrots. *J Nutr*, 144(8), 1158–1166.
- Kortenkamp, A. (2007). Ten Years of Mixing Cocktails: A Review of Combination Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 115(S-1), 98–105.
- Kumari, D.J. (2010). Hypoglycemic effect of *Moringa oleifera* and *Azadirachta indica* in type-2 diabetes. *Bioscan*, 5, 211–214.
- Kushwaha, S., Chawla, P., Kochhar, A. (2012). Effect of supplementation of drumstick (*Moringa oleifera*) and amaranth (*Amaranthus tricolor*) leaves powder on antioxidant profile and oxidative status among postmenopausal women. *J Food Sci Technol*, 51(11), 3464–3469.
- Lane, N. (2002). *Oxygen: The Molecule that Made the World*, Oxford University Press.
- Lebrun-Julien, F., Bachmann, L., Norrmen, C., Trotzmuller, M., Kofeler, H., Ruegg, M. A., Hall, M. N., Suter, U. (2014). Balanced mTORC1 Activity in Oligodendrocytes Is Required for Accurate CNS Myelination. *Journal of Neuroscience*, 34(25), 8432–8448.
- Lenaz, G., Fato, R., Genova, M. L., Bergamini, C., Bianchi, C., Biondi, A. (2006). Mitochondrial Complex I: Structural and functional aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Bioenergetics*, 1757(9-10), 1406–1420.
- Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., Bertoli, S. (2015). Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of *Moringa oleifera* Leaves: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 12791–12835.
- Li, G., Chen, Y., Hu, H., Liu, L., Hu, X., Wang, J., Shi, W., Yin, D. (2012). Association between age-related decline of kidney function and plasma malondialdehyde. *Rejuvenation Research*, 15(3), 257–264.
- Li, L., & Davie, J. R. (2010). The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Annals of Anatomy: Anatomischer Anzeiger*, 192(5), 275–283.

- Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Meléndez, J. A., Robinson, J. P. (2002). Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8516–8525.
- Liew, W. C., & Orban, L. (2013). Zebrafish sex: a complicated affair. *Briefings in Functional Genomics*, 13(2), 172–187.
- Lipinski, B., & Pretorius, E. (2012). Hydroxyl radical-modified fibrinogen as a marker of thrombosis: the role of iron. *Hematology*, 17(4), 241–247.
- Lucitt, M. B., Price, T. S., Pizarro, A., Wu, W., Yocom, A. K., Seiler, C., Pack, M. A., Blair, I. A., Fitzgerald, G. A., Grosser, T. (2008). Analysis of the Zebrafish Proteome during Embryonic Development. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(5), 981–994.
- Lupu, F., Terwilliger, J. D., Lee, K., Segre, G. V., Efstratiadis, A. (2001). Roles of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor 1 in Mouse Postnatal Growth. *Developmental Biology*, 229(1), 141–162.
- Macdonald, N. P., Zhu, F., Hall, C. J., Reboud, J., Crosier, P. S., Patton, E. E., Włodkowic, D., Cooper, J. M. (2016). Assessment of biocompatibility of 3D printed photopolymers using zebrafish embryo toxicity assays. *Lab Chip*, 16(2), 291–297.
- Maggio, M., De Vita, F., Lauretani, F., Buttò, V., Bondi, G., Cattabiani, C., Ceda, G. (2013). IGF-1, the Cross Road of the Nutritional, Inflammatory and Hormonal Pathways to Frailty. *Nutrients*, 5(10), 4184–4205.
- MCA Indonesia. (2013). Stunting dan Masa Depan Indonesia. *Millenn. Chall. Acc. Indones.* 2010, 2–5.
- McBurney, R. P. H., Griffin, C., Paul, A. A., Greenberg, D. C. (2004). The nutritional composition of African wild food plants: From compilation to utilization. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 277–289.
- Melo, K. M., Oliveira, R., Grisolia, C. K., Domingues, I., Pieczarka, J. C., de Souza Filho, J., Nagamachi, C. Y. (2015). Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18), 13926–13938.
- Miean, H. K., & Mohamed, S. (2001). Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible topical plants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 3106–3112.
- Mnif, W., Hassine, A. I. H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., Roig, B. (2011). Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(6), 2265–2303.

- Moldovan, L., & Moldovan, N. I. (2004). Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(4), 395–412.
- Montine, T. J., Montine, K. S., McMahan, W., Markesberry, W. R., Quinn, J. F., Morrow, J. D. (2005). F2-Isoprostanes in Alzheimer and Other Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(1-2), 269–275.
- Mori, T., Miyamoto, T., Yoshida, H., Asakawa, M., Kawasumi, M., Kobayashi, T., Morioka, H., Chiba, K., Toyama, Y., Yoshimura, A. (2011). IL-1beta and TNFalpha-initiated IL-6-STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis. *Int Immunol*, 23, 701-712.
- Moyo, B., Oyedemi, S., Masika, P.J., Muchenje, V. (2012). Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* Leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* Leaves/sunflower seed cake. *Meat Sci*, 91, 441–447.
- Mulyaningsih, T.R., & Yusuf, S. (2018). Determination of Minerals Content in Leaves of *Moringa oleifera* by Neutron Activation Analysis. *Ganendra Journal of Nuclear Science and Technology*, 21 (1), 11—16.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13.
- Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-Hora, M., Feng, J.Q., Bonewald, L.F., Kodama, T., Wutz, A., Wagner, E.F., Penninger, J.M., Takayanagi, H. (2011). Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*, 17, 1231-1234.
- Nijveldt, R.J., Van Nood, E., Van Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., Van Norren, K., Van Leeuwen, P.A.M. (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), 418–425.
- Nimse, S.B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *R Soc Chem*, 5, 27986–28006.
- Nonas, S., Miller, I., Kawkitinarong, K., Chatchavalvanich, S., Gorshkova, I., Bochkov, V. N., Leitinger, N., Natarajan, V., Garcia, J. G. N., Birukov, K. G. (2006). Oxidized Phospholipids Reduce Vascular Leak and Inflammation in Rat Model of Acute Lung Injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(10), 1130–1138.
- O'Brien, C.A., Gubrij, I., Lin, S.C., Sailors, R.L., Manolagas, S.C. (1999). STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF- κ B ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1, 25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. *J Biol Chem*, 274, 19301-19308.

- Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Oparinde, D.P., & Atiba, A.S. (2014). Moringa oleifera leaf prevents oxidative stress in Wistar rats. *Eur J Med Plant*, 4(9), 1150–1157.
- Ott, K.C. (2006). *Rotenone. A Brief Review of its Chemistry, Environmental Fate, and the Toxicity of Rotenone Formulations*. Kevin C. Ott, Ph.D. Fisheries (Bethesda). Retrieved from <http://newmexicotu.org/Rotenone summary.pdf>
- Padilla, S., Corum, D., Padnos, B., Hunter, D. L., Beam, A., Houck, K. A., Sipes, N., Kleinstreuer, N., Knudsen, T., Dix, D. J., Reif, D. M. (2012). Zebrafish developmental screening of the ToxCast™ Phase I chemical library. *Reproductive Toxicology*, 33(2), 174–187.
- Paggiaro, P. L., Bartoli, M. L., Novelli, F., Costa, F., Malagrino, L., Melosini, L., Bacci, E., Cianchetti, S., Dente, F. L., Di Franco, A., Vagaggini, B. (2011). Malondialdehyde in exhaled breath condensate as a marker of oxidative stress in different pulmonary diseases. *Mediators of Inflammation*, 2011, 1–7.
- Parichy, D. M., Elizondo, M. R., Mills, M. G., Gordon, T. N., Engeszer, R. E. (2009). Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental Dynamics*, 238(12), 2975–3015.
- Parrotta, J. A. 2009. *Moringa oleifera Lam.*, 1785, pp. 1-8. In B. Stimm (ed.), Enzyklopädie der Holzgewächse, Handbuch und Atlas der Dendrologie, Vol. 40. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Perrone, P. (2011). *Rotenone Detection in Surface and Ground Waters*. Microbac Laboratories, Inc.
- Porter, F. D., Scherrer, D. E., Lanier, M. H., Langmade, S. J., Molugu, V., Gale, S. E., Olzeki, D., Sidhu, R., Dietzen, D. J., Fu, R., Wassif, C. A., Yanjanin, N. M., Marso, S. P., House, J., Vite, C., Schaffer, J. E., Ory, D. S. (2010). Cholesterol Oxidation Products Are Sensitive and Specific Blood-Based Biomarkers for Niemann-Pick C1 Disease. *Science Translational Medicine*, 2(56), 1-13.
- Prendergast, A. J., & Humphrey, J. H. (2014). The stunting syndrome in developing countries. *Paediatrics and International Child Health*, 34(4), 250–265.
- Prendergast, A. J., Rukobo, S., Chasekwa, B., Mutasa, K., Ntozini, R., Mbuya, M. N. N., Jones, A., Moulton, L. H., Stoltzfus, R. J., Humphrey, J. H. (2014). Stunting Is Characterized by Chronic Inflammation in Zimbabwean Infants. *PLoS ONE*, 9(2), 1-11.
- Primaditya, V. (2017). *Efek Ekstrak Etanol Pegagan (Centella Asiatica) Pada Stunting Larva Zebrafish (Danio Rerio) Akibat Induksi Rotenon Melalui Peningkatan Ekspresi Glucose Transporter 4 (Glut 4) Dan Osteocalcin*. Magister thesis, Universitas Brawijaya.

- Repository Universitas Brawijaya
Primihastuti, D. (2017). *Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (Centella Asiatica) Pada Osifikasi Tulang Dan Osteoklastogenesis Pada Model Stunting Larya Zebrafish (Danio Rerio) Yang Diinduksi Rotenon.* Magister thesis, Universitas Brawijaya.
- Purohit, S., Upadhyay, P., Yadav, M.K., Mishra, S., Sharma, P. (2015). Moringa oleifera: A review of the medical evidence for its nutritional and pharmacological properties. *Int J Res Pharm Sci*, 5(2), 12-16
- Rajanandh, M.G., Satishkumar, M.N., Elango, K., Suresh, B. (2012). *Moringa oleifera Lam.* A herbal medicine for hyperlipidemia: A pre-clinical report. *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, 2, S790-S795.
- Reed, B., & Jennings, M. (2011). *Guidance on the housing and care of Zebrafish (Danio rerio).* Research Animal Department, Science Group, RSPCA, 1-65
- Romas, E., Udagawa, N., Zhou, H., Tamura, T., Saito, M., Taga, T., Hilton, D.J., Suda, T., Ng, K.W., Martin, T.J. (1996). The role of gp130-mediated signals in osteoclast development: regulation of interleukin 11 production by osteoblasts and distribution of its receptor in bone marrow cultures. *J Exp Med*, 183, 2581-2591.
- Sánchez, N. R., Sporndly, E., Ledin, I. (2006). Effect of feeding different levels of foliage of *Moringa oleifera* to creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. *Livestock Science*, 101(1-3), 24-31.
- Santoriello, C., & Zon, L.I. (2012). Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest*, 122, 2337-2343.
- Sanyal, J., Bandyopadhyay, S. K., Banerjee, T. K., Mukherjee, S. C., Chakraborty, D. P., Ray, B. C., Rao, V. R. (2009). Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 13(2), 129-132.
- Sarwatt, S. V., Kapange, S. S., Kakengi, A. M. V. (2002). Substituting sunflower seed-cake with *Moringa oleifera* leaves as a supplemental goat feed in Tanzania. *Agroforestry Systems*, 56(3), 241-247.
- Scacchi, M., Pincelli, A.I., Cavagnini, F. (2003). Nutritional status in the neuroendocrine control of growth hormone secretion: the model of anorexia nervosa. *Front Neuroendocrinol*, 24, 200-24.
- Schilling, T.F. (2002) 'The morphology of larval and adult zebrafish' in Nüsslein-Volhard & Dahm (2002) *Zebrafish - A Practical Approach*; Oxford University Press, Oxford, UK
- Schneider, C., Boeglin, W. E., Yin, H., Porter, N. A., Brash, A. R. (2008). Intermolecular peroxy radical reactions during autoxidation of hydroxy and hydroperoxy arachidonic acids generate a novel series of epoxidized products. *Chemical Research in Toxicology*, 21(4), 895-903.

- Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D. (2008). The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research*, 15(5), 394–404.
- Repository Universitas Brawijaya Schoonen, M. A. A., Cohn, C. A., Roemer, E., Laffers, R., Simon, S. R., & O'Riordan, T. (2006). Mineral-Induced Formation of Reactive Oxygen Species. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 64(1), 179–221.
- Repository Universitas Brawijaya Sederquist, B., Fernandez-Vojvodich, P., Zaman, F., Sävendahl, L. (2014). Impact of inflammatory cytokines on longitudinal bone growth Bettina. *J Mol Endocrinol*, 53, T35–T44.
- Repository Universitas Brawijaya Shanmugam, N., Figarola, J.L., Li, Y., Swiderski, P.M., Rahbar, S., Natarajan, R. (2008). Proinflammatory effects of advanced lipoxidation end products in monocytes. *Diabetes*, 57(4), 879–888.
- Repository Universitas Brawijaya Shinano, J., & Kasase, C. (2009). *Moringa (Moringa oleifera): A source of food and nutrition, medicine and industrial products*. In H. R. Juliani, J. E. Simon, & C. T. Ho (Eds.), African natural plant products: New discoveries and challenges in chemistry and quality. ACS symposium series (pp. 421–467). Washington, D.C.: American Chemical Society.
- Repository Universitas Brawijaya Siddhuraju, P., & Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2144–2155.
- Repository Universitas Brawijaya Silverstein, R. L., & Febbraio, M. (2009). CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. *Science Signaling*, 2(72), re3–re3.
- Repository Universitas Brawijaya Siswanto, A. (2017) Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) Terhadap Survival Rate, Morfologi Jantung, Edema Perikardium, Dan Yolk Sac Pada Zebrafish (*Danio Rerio*). Sarjana thesis, Universitas Brawijaya.
- Repository Universitas Brawijaya Soetjiningsih. (1995). *Tumbuh Kembang Anak*. Jakarta: EGC.
- Repository Universitas Brawijaya Sorribes, A. (2013). The ontogeny of sleep–wake cycles in zebrafish: a comparison to humans. *Frontiers in Neural Circuits*, 7, 178.
- Repository Universitas Brawijaya Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13–34.
- Repository Universitas Brawijaya Spooren, A., Kolmus, K., Laureys, G., Clinckers, R., De Keyser, J., Haegeman, G., Gerlo, S. (2011). Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Research Reviews*, 67(1-2), 157–183.
- Repository Universitas Brawijaya Sreelatha, S., & Padma, P.R. (2009). Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Moringa oleifera* Leaves in Two Stages of Maturity. *Plant Foods Hum Nutr*, 64, 303–311.

- Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Stewart, C. P., Iannotti, L., Dewey, K. G., Michaelsen, K. F., Onyango, A. W. (2013). Contextualising complementary feeding in a broader framework for stunting prevention. *Maternal & Child Nutrition*, 9, 27–45.
- Stohs, S. J., & Hartman, M. J. (2015). Review of the Safety and Efficacy of *Moringa oleifera*. *Phytotherapy Research*, 29(6), 796–804
- Strykowski, J.L., & Schech, J.M. (2015) Effectiveness of recommended euthanasia methods in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(1), 81-84.
- Sudha, P., Asdaq, S.M., Dhamingi, S.S., Chandrakala, G.K. (2010). Immunomodulatory activity of methanolic leaf extract of *Moringa oleifera* in animals. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 54, 133–140.
- Sudirman. (2008). *Stunting atau Pendek: Awal Perubahan Patologis atau Adaptasi karena Perubahan Sosial Ekonomi Yang Berkepanjangan?* Media Litbang Kesehatan Volume XVIII Nomor 1. Departemen Kesehatan 2008.
- Svefors, P., Rahman, A., Ekström, E.-C., Khan, A. I., Lindström, E., Persson, L. Å., & Ekholm Selling, K. (2016). Stunted at 10 Years. Linear Growth Trajectories and Stunting from Birth to Pre-Adolescence in a Rural Bangladeshi Cohort. *PLOS ONE*, 11(3), e0149700
- Szalecki, M., Malinowska, A., Prokop-Piotrkowska, M., Janas, R. (2018). Interactions between the growth hormone and cytokines – A review. *Advances in Medical Sciences*, 63(2), 285–289.
- Tamura, T., Udagawa, N., Takahashi, N., Miyaura, C., Tanaka, S., Yamada, Y., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Kumaki, K., Taga, T. (1993). Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 11924–11928.
- Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), a016295–a016295.
- Tebourbi, O., Sakly, M., Rhouma, K.B. (2011). *Molecular Mechanisms of Pesticide Toxicity*. Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment, Dr. Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-457-3
- The World Bank. (2006). *Repositioning Nutrition as Central to Development: a strategy for large-scale action*. 1st ed. 2006. Washington DC. The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank <https://siteresources.worldbank.org/NUTRITION/Resources/281846-1131636806329/NutritionStrategyOverview.pdf>.
- Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., Underwood, L.E. (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev*, 15, 80–101.



- Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Tiloke, C., Phulukdaree, A., Chuturgoon, A.A. (2013). The antiproliferative effect of *Moringa oleifera* crude aqueous extract on cancerous human alveolar epithelial cells. *BMC Complement Altern Med*, 13, 226–233.
- Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Torlesse, H., Cronin, A. A., Sebayang, S. K., Nandy, R. (2016). Determinants of stunting in Indonesian children: evidence from a cross-sectional survey indicate a prominent role for the water, sanitation and hygiene sector in stunting reduction. *BMC Public Health*, 16(1).
- Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Turner, L., Jacobson, S., Shoemaker, L. 2007. *Risk assessment for piscicidal formulations of rotenone*. Compliance Services International, Lakewood.
- Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Vacaru, A. M., Di Narzo, A. F., Howarth, D. L., Tsedensodnom, O., Imrie, D., Cinaroglu, A., Amin, S., Hao, K., Sadler, K. C. (2014). Molecularly defined unfolded protein response subclasses have distinct correlations with fatty liver disease in zebrafish. *Disease Models & Mechanisms*, 7(7), 823–835.
- Repository Universitas Brawijaya
 Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- Repository Universitas Brawijaya
 Varela, M., Dios, S., Novoa, B., Figueras, A. (2012). Characterisation, expression and ontogeny of interleukin-6 and its receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental & Comparative Immunology*, 37(1), 97–106.
- Repository Universitas Brawijaya
 Velaga, M.K., Daughtry, L.K., Jones, A.C., Yallapragada, P.R., Rajanna, S., Rajanna, B. (2014). Attenuation of lead-induced oxidative stress in rat brain, liver, kidney and blood of male Wistar rats by *Moringa oleifera* seed powder. *J Environ Pathol Toxicol*, 33(4), 323–337.
- Repository Universitas Brawijaya
 Venero, J.L., Revuelta, M., Atiki, L., Santiago, M., Toms-Camerdiel, M. C., Cano, J., Machado, A. (2003). Evidence for dopaminergic hydroxyl radical formation in the nigrostriatal system in response to axotomy. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(1), 111–123.
- Repository Universitas Brawijaya
 Verma, A.R., Vijayakumar, M., Mathela, C.S., Rao, C.V. (2009). In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chem. Toxicol.*, 47, 2196–2201.
- Repository Universitas Brawijaya
 Wang, X., Lei, X. G., Wang, J. (2014). Malondialdehyde regulates glucose-stimulated insulin secretion in murine islets via TCF7L2-dependent Wnt signaling pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 8–16.
- Repository Universitas Brawijaya
 Wangta, C. (2018). Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Kadar Superoksid Dismutase dan Kaspase-3 pada Zebrafish (*Danio rerio*) Model Linear Growth Retardation yang Diinduksi Rotenon. Magister thesis, Universitas Brawijaya.
- Repository Universitas Brawijaya
 Wardani, D.W.K.K. (2017). Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella Asiatica*) Terhadap Ekspresi Vascular Endotelial Growth Factor Dan

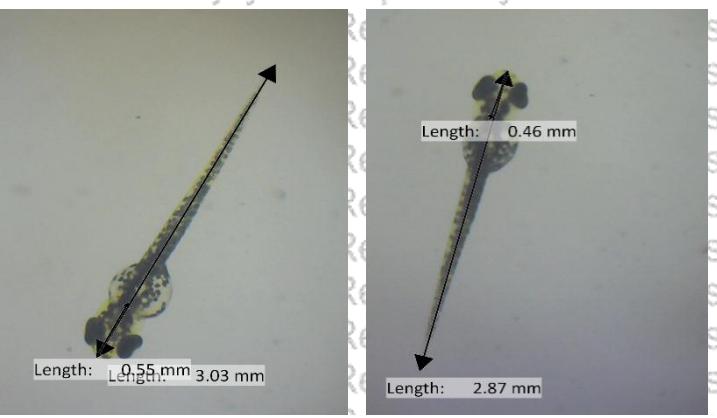
- Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Vascular Endothelial Growth Factor Receptor – 2 Pada Larva Zebrafish (*Danio Rerio*) Model Stunting Akibat Induksi Rotenon. Magister thesis, Universitas Brawijaya.
- Waterman, C., Cheng, D.M., Rojas-Silva, P., Poulev, A., Dreifus, J., Lila, M.A., Raskin, I. (2014). Stable, water extractable isothiocyanates from *Moringa oleifera* leaves attenuate inflammation *in vitro*. *Phytochemistry*, 103, 114–122.
- Westerfield, M. (1995) *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 3rd Edition. Eugene, OR, University of Oregon Press:385.
- WHO. (2014). *Global Nutrition Targets 2025: Stunting policy brief*. Geneva: World Health Organization
- Wilson, C. (2012). Aspects of Larval Rearing. *ILAR Journal*, 53(2), 169–178.
- Witten, P.E., & Huysseune, A. (2009). A comparative view on mechanisms and functions of skeletal remodelling in teleost fish, with special emphasis on osteoclasts and their function. *Biological Reviews*, 84(2), 315–346.
- Wong, S.C., Dobie, R., Altowati, M.A., Werther, G.A., Farquharson, C., Ahmed, S.F. (2016). Growth and the growth hormone-insulin like growth factor 1 axis in children with chronic inflammation: current evidence, gaps in knowledge, and future directions. *Endocr Rev*, 37, 62–110.
- Wu, R.P., Hayashi, T., Cottam, H.B., Jin, G., Yao, S., Wu, C.C., Rosenbach, M.D., Corr, M., Schwab, R.B., Carson, D.A. (2010). Nrf2 responses and the therapeutic selectivity of electrophilic compounds in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 107(16), 7479–7484.
- Xiong, J., Onal, M., Jilka, R.L., Weinstein, R.S., Manolagas, S.C., O'Brien, C.A. (2011). Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med*, 17, 1235–1241.
- Xiong, J., Piemontese, M., Onal, M., Campbell, J., Goellner, J.J., Dusevich, V., Bonewald, L., Manolagas, S.C., O'Brien, C.A. (2015). Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *Plos One*, 10, e0138189.
- Xu, X.L., Shang, Y., Jiang, J.G. (2016). Plant species forbidden in health food and their toxic constituents, toxicology and detoxification. *Food & Function*, 7(2), 643–664.
- Yadav, U.C.S. (2015). *Oxidative Stress-Induced Lipid Peroxidation: Role in Inflammation*. In: Rani V., Yadav U. (eds) *Free Radicals in Human Health and Disease*. Springer, New Delhi
- Yang, L., Latchoumycandane, C., McMullen, M. R., Pratt, B. T., Zhang, R., Papouchado, B. G., Nagy, L. E., Feldstein, A. E., McIntyre, T. M. (2010).

- Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Chronic Alcohol Exposure Increases Circulating Bioactive Oxidized Phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22211–22220.
- Repository Universitas Brawijaya
 Ye, J., Jiang, Z., Chen, X., Liu, M., Li, J., Liu, N. (2016). Electron transport chain inhibitors induce microglia activation through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *Exp Cell Res*, 340(2), 315–326.
- Repository Universitas Brawijaya
 Yin, H., Xu, L., Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis, *Chemical Reviews*, 111(10), 5944–5972.
- Repository Universitas Brawijaya
 Yuningsih. (2017). Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella Asiatica*) Terhadap Ekspresi Glucose Transporter 1 (Glut 1) Dan Osteocalcins Pada Stunting Larva Ikan Zebra (*Danio Rerio*) Akibat Induksi Rotenon. Magister thesis, Universitas Brawijaya.
- Repository Universitas Brawijaya
 Zakiah. (2017). Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella Asiatica*) Terhadap Ekspresi Extracellular Signal-Regulated Kinase1/2 Dan Protein Ki-67 Pada Larva Zebrafish (*Danio Rerio*) Model Stunting Dengan Induksi Rotenon. Magister thesis, Universitas Brawijaya.
- Repository Universitas Brawijaya
 Zhao, H., Liu, J., Pan, S., Sun, Y., Li, Q., Li, F., Ma, L., Guo, Q. (2013). SOD mRNA and MDA Expression in Rectus Femoris Muscle of Rats with Different Eccentric Exercise Programs and Time Points. *PLoS One*, 8(9).

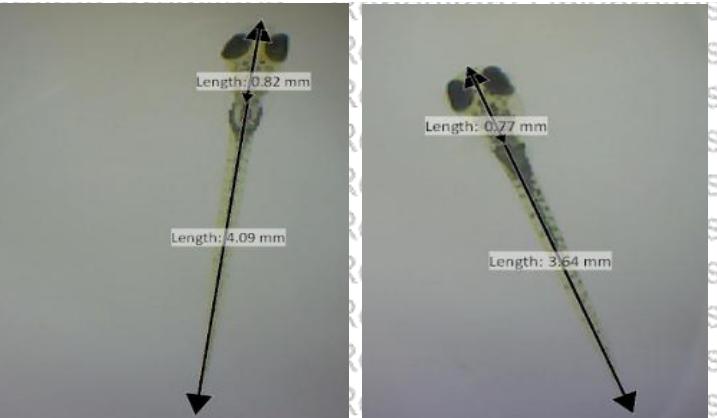
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Lampiran 1: Repository Universitas Brawijaya

Lampiran 1:

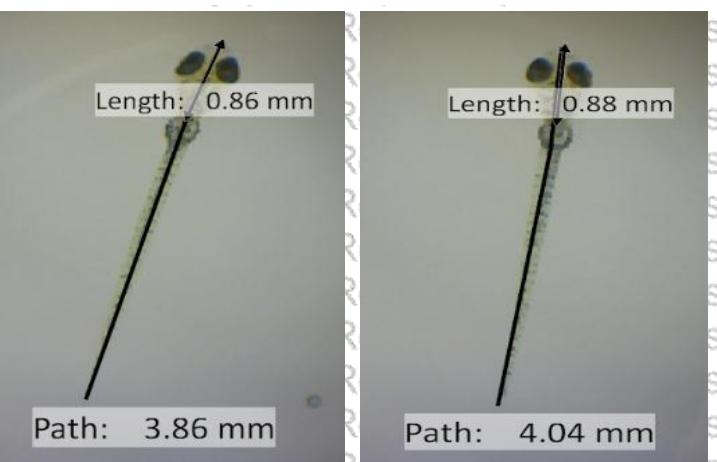
Foto Panjang Badan Larva Zebrafish menggunakan Mikroskop Stereo (Olympus SZ61) yang dihubungkan dengan Software Optilab



Larva zebrafish usia 3 dpf disertai keterangan panjang badan (mm) dan panjang kepala (mm) hasil pengukuran dengan software *image raster*.



Larva zebrafish usia 6 dpf disertai keterangan panjang badan (mm) dan panjang kepala (mm) hasil pengukuran dengan software *image raster*.



Repositori Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya
Reposit Larva zebrafish usia 9 dpf disertai keterangan panjang badan (mm) dan panjang kepala (mm) hasil pengukuran dengan software imageJ raster.

Tabel Uji Post Hoc Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish Usia 6, 9 dpf

| 6 dpf | | <i>p-value</i> | 9 dpf | | <i>p-value</i> |
|----------|------------|----------------------|----------|------------|--------------------|
| Kelompok | Pembanding | | Kelompok | Pembanding | |
| 1 | R | 0,022 ^a | 1 | R | 0,033 ^a |
| C | RM01 | 1,000 ^b | C | RM01 | 0,069 ^b |
| C | RM02 | 1,000 ^b | C | RM02 | 0,733 ^b |
| C | RM03 | 0,878 ^b | C | RM03 | 1,000 ^b |
| R | RM01 | < 0,001 ^a | R | RM01 | 0,596 ^b |
| R | RM02 | < 0,001 ^a | R | RM02 | 0,031 ^a |
| R | RM03 | < 0,001 ^a | R | RM03 | 0,003 ^a |
| RM01 | RM02 | 0,058 ^b | RM01 | RM02 | 0,240 ^b |
| RM01 | RM03 | 0,002 ^a | RM01 | RM03 | 0,054 ^b |
| RM02 | RM03 | 0,075 ^b | RM02 | RM03 | 0,150 ^b |

Keterangan : C: kontrol; R: rotenon 12,5 ppb; RM01: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 0,56 µg/mL ; RM02: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 1,12 µg/mL; RM03: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 2,24 µg/mL; ^a: signifikan; ^b: tidak signifikan

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Lampiran 2:
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Analisis Data Kadar MDA Larva Zebrafish Model Stunting pada 6 dpf

Descriptives

| | | Kelompok | | Statistic | Std. Error |
|--|------|----------------------------------|-------------|------------------|-------------------|
| | C | Mean | | 4.84619 | .518582 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 3.40637 | |
| | | | Upper Bound | 6.28600 | |
| | | 5% Trimmed Mean | | 4.84512 | |
| | | Median | | 4.68468 | |
| | | Variance | | 1.345 | |
| | | Std. Deviation | | 1.159585 | |
| | | Minimum | | 3.670 | |
| | | Maximum | | 6.042 | |
| | | Range | | 2.372 | |
| | | Interquartile Range | | 2.310 | |
| | | Skewness | | .165 | .913 |
| | | Kurtosis | | -2.999 | 2.000 |
| | R | Mean | | 12.63951 | 2.086014 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 6.84781 | |
| | | | Upper Bound | 18.43122 | |
| | | 5% Trimmed Mean | | 12.62469 | |
| | | Median | | 12.78938 | |
| | | Variance | | 21.757 | |
| | | Std. Deviation | | 4.664470 | |
| | | Minimum | | 7.339 | |
| | | Maximum | | 18.207 | |
| | | Range | | 10.868 | |
| | | Interquartile Range | | 9.164 | |
| | | Skewness | | .026 | .913 |
| | | Kurtosis | | -2.337 | 2.000 |
| | RMO1 | Mean | | 219.45725 | 7.975882 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 197.31265 | |
| | | | Upper Bound | 241.60184 | |
| | | 5% Trimmed Mean | | 219.87945 | |
| | | Median | | 227.10465 | |
| | | Variance | | 318.073 | |
| | | Std. Deviation | | 17.834615 | |
| | | Minimum | | 196.331 | |
| | | Maximum | | 234.984 | |
| | | Range | | 38.653 | |
| | | Interquartile Range | | 34.124 | |
| | | Skewness | | -.603 | .913 |
| | | Kurtosis | | -2.521 | 2.000 |
| | RMO2 | Mean | | 231.77258 | 6.481384 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 213.77737 | |
| | | | Upper Bound | 249.76779 | |
| | | 5% Trimmed Mean | | 232.20907 | |
| | | Median | | 234.98394 | |
| | | Variance | | 210.042 | |
| | | Std. Deviation | | 14.492816 | |
| | | Minimum | | 210.468 | |
| | | Maximum | | 245.220 | |
| | | Range | | 34.752 | |
| | | Interquartile Range | | 26.977 | |
| | | Skewness | | -.807 | .913 |
| | | Kurtosis | | -.581 | 2.000 |
| | RMO3 | Mean | | 200.75372 | 6.166812 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 183.63190 | |
| | | | Upper Bound | 217.87553 | |
| | | 5% Trimmed Mean | | 200.36615 | |
| | | Median | | 193.82179 | |
| | | Variance | | 190.148 | |
| | | Std. Deviation | | 13.789411 | |
| | | Minimum | | 189.185 | |
| | | Maximum | | 219.298 | |
| | | Range | | 30.113 | |
| | | Interquartile Range | | 25.892 | |
| | | Skewness | | .712 | .913 |
| | | Kurtosis | | -2.259 | 2.000 |

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Reposit

Tests of Normality

| | Kelompok | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|---------------|----------|---------------------------------|----|-------------------|--------------|----|------|
| | | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| MDA (nmol/mL) | C | .249 | 5 | .200 [*] | .835 | 5 | .152 |
| | R | .201 | 5 | .200 [*] | .936 | 5 | .636 |
| | RM01 | .266 | 5 | .200 [*] | .847 | 5 | .186 |
| | RM02 | .195 | 5 | .200 [*] | .915 | 5 | .501 |
| | RM03 | .292 | 5 | .188 | .838 | 5 | .159 |

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

a. Lilliefors Significance Correction

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Test of Homogeneity of Variances

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

MDA (nmol/mL)

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 9.035 | 4 | 20 | .000 |

Tabel Uji Beda Kruskal Wallis Kadar MDA Larva Zebrafish Model Stunting pada 6 dpf

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Ranks

| | Kelompok | N | Mean Rank |
|---------------|----------|----|-----------|
| MDA (nmol/mL) | C | 5 | 3.00 |
| | R | 5 | 8.00 |
| | RM01 | 5 | 18.50 |
| | RM02 | 5 | 21.30 |
| | RM03 | 5 | 14.20 |
| | Total | 25 | |

Test Statistics^{a,b}

| | MDA (nmol/mL) |
|-------------|---------------|
| Chi-Square | 20.839 |
| df | 4 |
| Asymp. Sig. | .000 |

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
Kelompok

Tabel Uji post-hoc Mann Whitney Kadar MDA Larva Zebrafish Model Stunting pada 6 dpf

Ranks

| Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---------------|----|-----------|--------------|
| MDA (nmol/mL) | | | |
| C | 5 | 3.00 | 15.00 |
| R | 5 | 8.00 | 40.00 |
| Total | 10 | | |

Test Statistics^a

| | MDA (nmol/mL) |
|-----------------------------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.619 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .009 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^b |

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks

| Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---------------|----|-----------|--------------|
| MDA (nmol/mL) | | | |
| C | 5 | 3.00 | 15.00 |
| RMO1 | 5 | 8.00 | 40.00 |
| Total | 10 | | |

Test Statistics^a

| | MDA (nmol/mL) |
|-----------------------------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.619 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .009 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^b |

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---------------|----------|----|-----------|--------------|
| MDA (nmol/mL) | R | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | RMO2 | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^a

| | MDA (nmol/mL) |
|-----------------------------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.611 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .009 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^b |

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

| Ranks | | | | |
|---------------|-------|-----------|--------------|-------|
| Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks | |
| MDA (nmol/mL) | R | 5 | 3.00 | 15.00 |
| | RMO3 | 5 | 8.00 | 40.00 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^a

| | MDA (nmol/mL) |
|-----------------------------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | .000 |
| Wilcoxon W | 15.000 |
| Z | -2.611 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .009 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .008 ^b |

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties

| Ranks | | | | |
|---------------|----------|----|-----------|--------------|
| | Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| MDA (nmol/mL) | RMO1 | 5 | 4.30 | 21.50 |
| | RMO2 | 5 | 6.70 | 33.50 |
| | Total | 10 | | |

Test Statistics^a

| | MDA (nmol/mL) |
|-----------------------------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | 6.500 |
| Wilcoxon W | 21.500 |
| Z | -1.257 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .209 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .222 ^b |

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Reposit

Ranks

| Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---------------|-------|-----------|--------------|
| MDA (nmol/mL) | RMO1 | 5 | 7.20 |
| | RMO3 | 5 | 3.80 |
| | Total | 10 | 19.00 |

Test Statistics^a

| | MDA (nmol/mL) |
|--------------------------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | 4.000 |
| Wilcoxon W | 19.000 |
| Z | -1.776 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .076 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .095 ^b |

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks

| Kelompok | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---------------|-------|-----------|--------------|
| MDA (nmol/mL) | RMO2 | 5 | 7.60 |
| | RMO3 | 5 | 3.40 |
| | Total | 10 | 17.00 |

Test Statistics^a

| | MDA (nmol/mL) |
|--------------------------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | 2.000 |
| Wilcoxon W | 17.000 |
| Z | -2.193 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | .028 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | .032 ^b |

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Tabel Uji Post Hoc Rerata Kadar MDA Larva Zebrafish Model Stunting

| Pembanding 1 | Pembanding 2 | MDA | |
|--------------|--------------|--------------------|---------|
| | | Kelompok | p-value |
| C | R | 0,009 ^a | |
| C | RMO1 | 0,009 ^a | |
| C | RMO2 | 0,009 ^a | |
| C | RMO3 | 0,009 ^a | |
| R | RMO1 | 0,009 ^a | |
| R | RMO2 | 0,009 ^a | |
| R | RMO3 | 0,009 ^a | |
| RMO1 | RMO2 | 0,209 ^b | |
| RMO1 | RMO3 | 0,076 ^b | |
| RMO2 | RMO3 | 0,028 ^a | |

Keterangan : C: kontrol; R: rotenon 12,5 ppb; RMO1: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 0,56 µg/mL ; RMO2: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 1,12 µg/mL; RMO3: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak daun kelor 2,24 µg/mL; ^a: signifikan; ^b: tidak signifikan

| Descriptives | | | |
|--------------|------|----------------------------------|------------|
| Kelompok | | | Statistic |
| | | | Std. Error |
| IL-6 (ng/L) | C | Mean | .7087 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | .6234 |
| | | Lower Bound | .7939 |
| | | Upper Bound | |
| | | 5% Trimmed Mean | .7070 |
| | | Median | .6798 |
| | | Variance | .005 |
| | | Std. Deviation | .06865 |
| | | Minimum | .65 |
| | | Maximum | .80 |
| | R | Range | .15 |
| | | Interquartile Range | .13 |
| | | Skewness | .581 |
| | | Kurtosis | -2.608 |
| | RMO1 | Mean | .9769 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | .8480 |
| | | Lower Bound | |
| | | Upper Bound | 1.1058 |
| | | 5% Trimmed Mean | .9779 |
| | | Median | .9819 |
| | | Variance | .011 |
| | | Std. Deviation | .10378 |
| | | Minimum | .86 |
| | | Maximum | 1.08 |
| | | Range | .22 |
| | | Interquartile Range | .21 |
| | | Skewness | -.115 |
| | | Kurtosis | -2.778 |
| | RMO2 | Mean | .8913 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | .7017 |
| | | Lower Bound | |
| | | Upper Bound | 1.0808 |
| | | 5% Trimmed Mean | .8909 |
| | | Median | .8570 |
| | | Variance | .023 |
| | | Std. Deviation | .15266 |
| | | Minimum | .71 |
| | | Maximum | 1.08 |
| | | Range | .37 |
| | | Interquartile Range | .29 |
| | | Skewness | .187 |
| | | Kurtosis | -1.959 |
| | RMO3 | Mean | .8777 |
| | | 95% Confidence Interval for Mean | .7210 |
| | | Lower Bound | |
| | | Upper Bound | 1.0344 |
| | | 5% Trimmed Mean | .8761 |
| | | Median | .9189 |
| | | Variance | .016 |
| | | Std. Deviation | .12622 |
| | | Minimum | .74 |
| | | Maximum | 1.05 |
| | | Range | .31 |
| | | Interquartile Range | .23 |
| | | Skewness | .168 |
| | | Kurtosis | -1.354 |

Tests of Normality

| Kelompok | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
| | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| C | .263 | 5 | .200* | .838 | 5 | .159 |
| R | .237 | 5 | .200* | .869 | 5 | .261 |
| RMO1 | .189 | 5 | .200* | .950 | 5 | .737 |
| RMO2 | .228 | 5 | .200* | .918 | 5 | .517 |
| RMO3 | .216 | 5 | .200* | .963 | 5 | .832 |

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

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

| IL-6 (ng/L) | Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|-------------|------------------|-----|------|------|
| 2.588 | 4 | 20 | .068 | |

Tabel Uji Beda One-Way Anova Kadar IL-6 Larva Zebrafish Model Stunting pada 6 dpf.

ANOVA

| IL-6 (ng/L) | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | .198 | 4 | .050 | 4.300 | .011 |
| Within Groups | .231 | 20 | .012 | | |
| Total | .429 | 24 | | | |

Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
 Repository Universitas Brawijaya
Tabel Uji post-hoc Tukey Kadar IL-6 Larva Zebrafish Model Stunting pada 6 dpf

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IL-6 (ng/L)
 LSD

| (I) Kelompok | (J) Kelompok | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------|--------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| C | R | -.26824* | .06794 | .001 | -.4100 | -.1265 |
| | RMO1 | -.18262* | .06794 | .014 | -.3243 | -.0409 |
| | RMO2 | -.16902* | .06794 | .022 | -.3107 | -.0273 |
| | RMO3 | -.10642 | .06794 | .133 | -.2481 | .0353 |
| R | C | .26824* | .06794 | .001 | .1265 | .4100 |
| | RMO1 | .08562 | .06794 | .222 | -.0561 | .2273 |
| | RMO2 | .09922 | .06794 | .160 | -.0425 | .2409 |
| | RMO3 | .16182* | .06794 | .027 | .0201 | .3035 |
| RMO1 | C | .18262* | .06794 | .014 | .0409 | .3243 |
| | R | -.08562 | .06794 | .222 | -.2273 | .0561 |
| | RMO2 | .01360 | .06794 | .843 | -.1281 | .1553 |
| | RMO3 | .07620 | .06794 | .275 | -.0655 | .2179 |
| RMO2 | C | .16902* | .06794 | .022 | .0273 | .3107 |
| | R | -.09922 | .06794 | .160 | -.2409 | .0425 |
| | RMO1 | -.01360 | .06794 | .843 | -.1553 | .1281 |
| | RMO3 | .06260 | .06794 | .368 | -.0791 | .2043 |
| RMO3 | C | .10642 | .06794 | .133 | -.0353 | .2481 |
| | R | -.16182* | .06794 | .027 | -.3035 | -.0201 |
| | RMO1 | -.07620 | .06794 | .275 | -.2179 | .0655 |
| | RMO2 | -.06260 | .06794 | .368 | -.2043 | .0791 |

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

Tabel Uji Post Hoc Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish Usia 6 dpf dan 9 dpf

| 6 dpf | | 9 dpf | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Kelompok | p-value | Kelompok | p-value |
| Pembanding1 | Pembanding2 | Pembanding1 | Pembanding2 |
| C | R | 0,022* | C |
| R | C | 0,033* | R |
| RMO1 | 1,000 | C | RMO1 |
| RMO2 | 1,000 | C | RMO2 |
| RMO3 | 0,878 | C | RMO3 |
| RMO1 | <0,001* | R | RMO1 |
| RMO2 | <0,001* | R | RMO2 |
| RMO3 | <0,001* | R | RMO3 |
| RMO1 | 0,058 | RMO1 | RMO2 |
| RMO1 | RMO3 | 0,002* | RMO2 |
| RMO2 | RMO3 | 0,075 | RMO3 |

Keterangan: C: kontrol, R: rotenon, RMO1: Rotenon dan ekstrak etanol daun *M. oleifera* 0,56 µg/mL, RMO2: Rotenon dan ekstrak etanol daun *M. oleifera* 1,12 µg/mL, RMO3: Rotenon dan ekstrak etanol daun *M. oleifera* 2,24 µg/mL; *: p<0,05

Lampiran 4:**Tabel Uji Korelasi Pearson Konsentrasi Ekstrak Daun Kelor dengan Panjang Badan Larva Zebrafish Model Stunting****Correlations**

| | | Dosis Daun Kelor (ppm) | Panjang_Badan |
|------------------------|---------------------|------------------------|---------------|
| Dosis Daun Kelor (ppm) | Pearson Correlation | 1 | .683** |
| | Sig. (2-tailed) | | .001 |
| | N | 20 | 20 |
| Panjang_Badan | Pearson Correlation | .683** | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | .001 | |
| | N | 20 | 20 |

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

Tabel Uji Korelasi Spearman Konsentrasi Ekstrak Daun Kelor dengan Kadar MDA Larva Zebrafish Model Stunting**Correlations**

| | | Dosis Daun Kelor (ppm) | MDA (nmol/mL) |
|----------------|------------------------|-------------------------|---------------|
| Spearman's rho | Dosis Daun Kelor (ppm) | Correlation Coefficient | 1.000 |
| | | Sig. (2-tailed) | .415 |
| | | N | .069 |
| | MDA (nmol/mL) | Correlation Coefficient | .415 |
| | | Sig. (2-tailed) | .069 |
| | | N | .20 |

Tabel Uji Korelasi Pearson Konsentrasi Ekstrak Daun Kelor dengan Kadar IL-6 Larva Zebrafish Model Stunting**Correlations**

| | | Dosis Daun Kelor (ppm) | IL-6 (ng/L) |
|------------------------|---------------------|------------------------|-------------|
| Dosis Daun Kelor (ppm) | Pearson Correlation | 1 | -.465* |
| | Sig. (2-tailed) | | .039 |
| | N | 20 | 20 |
| IL-6 (ng/L) | Pearson Correlation | -.465* | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | .039 | |
| | N | 20 | 20 |

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

Tabel Uji Korelasi Spearman Panjang Badan dengan Kadar MDA Larva Zebrafish Model Stunting

Correlations

| | | Panjang_Badan | MDA (nmol/mL) |
|----------------|---------------|-------------------------|---------------|
| Spearman's rho | Panjang_Badan | Correlation Coefficient | 1.000 |
| | | Sig. (2-tailed) | .298 |
| | | N | 25 |
| MDA (nmol/mL) | | Correlation Coefficient | .298 |
| | | Sig. (2-tailed) | .148 |
| | | N | 25 |

Tabel Uji Korelasi Pearson Panjang Badan dengan Kadar IL-6 Larva Zebrafish Model Stunting

Correlations

| | | Panjang_Badan | IL-6 (ng/L) |
|---------------|---------------------|---------------|-------------|
| Panjang_Badan | Pearson Correlation | 1 | -.449* |
| | Sig. (2-tailed) | | .024 |
| | N | 25 | 25 |
| IL-6 (ng/L) | Pearson Correlation | -.449* | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | .024 | |
| | N | 25 | 25 |

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

Tabel Uji Korelasi Spearman Kadar MDA dengan Kadar IL-6 Larva Zebrafish Model Stunting

Correlations

| | | MDA (nmol/mL) | IL-6 (ng/L) |
|----------------|---------------|-------------------------|-------------|
| Spearman's rho | MDA (nmol/mL) | Correlation Coefficient | 1.000 |
| | | Sig. (2-tailed) | .173 |
| | | N | 25 |
| IL-6 (ng/L) | | Correlation Coefficient | .409 |
| | | Sig. (2-tailed) | .173 |
| | | N | 25 |



Proses penimbangan dan pengeringan simplisia daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam oven 40°C



Simplisia daun kelor (*Moringa oleifera*) dimaserasi dengan pelarut ethanol 98%, dihomogenkan dan didiamkan selama 3x24 jam sampai terdapat endapan



Simplisia daun kelor (*Moringa oleifera*) yang telah terendam, disaring dengan kertas saring menggunakan corong buchner.



Filtrat dimasukkan ke dalam labu evaporasi 1 L, labu evaporasi disambungkan ke evaporator, *waterbath* diisi dengan air sampai penuh, semua alat evaporasi dirangkai dan disambungkan dengan aliran listrik. *Waterbath* dipanaskan sampai suhu 90°C dibiarkan selama ±1,5 s/d 2 jam agar larutan etanol terpisah dengan zat aktif yang terdapat dalam labu penampungan.



Hasil ekstraksi ditimbang dan disimpan dalam freezer.



Proses pembuatan medium embrionik: semua bahan (CaCl₂ 0,08 gr, KCl 0,06 gr, NaCl 2 gr, MgSO₄ 3,2 gr) ditimbang menggunakan timbangan digital dan dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi air filtrasi 200 mL, kemudian diaduk sampai bahan tercampur rata, masukkan dalam botol, diberi label (tanggal pembuatan), dan disimpan di lemari es sebagai stok.



Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya



Plate berisi larva zebrafish dalam incubator $37 \pm 1^\circ\text{C}$

A photograph showing a person's hands holding a petri dish over a piece of paper with handwritten text. The hands are using a black marker to write on the paper. The paper has the text "24/07/2014" and "P/55" written on it.

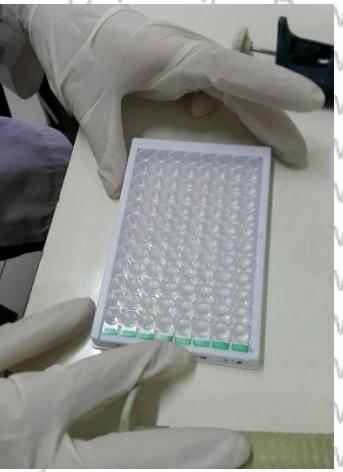


Proses persiapan sampel: larva zebrafish yang berusia 6 dpf dieuthanasi dengan direndam dalam *chamber* berisi air:es (5:1) selama 10 menit, kemudian dipindahkan dalam cawan petri, dilisiskan menggunakan 500 µL RIPA buffer, dan dihomogenkan menggunakan *plunger* dan ditambahkan 250 µL RIPA buffer. Hasil suspensinya dimasukkan kedalam 2 mL *microtube*, dan disentrifugasi dingin pada suhu 4°C dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Hasil supernatan yang diperoleh dianalisa menggunakan metode ELISA untuk menentukan kadar MDA (*Bioassay Technology Laboratory*; E0017FI) dan IL-6 (*Bioassay Technology Laboratory*; E0026FI).



Pengamatan panjang badan larva zebrafish dengan mikroskop stereo (Olympus SZ61) yang dihubungkan dengan software *optilab*, kemudian diukur dengan menggunakan software *image raster* yang terkalibrasi.





Prosedur assay ELISA: (1) masukkan 50 μL standar kedalam sumur standar; (2) masukkan 40 μL sampel kedalam sumur sampel, kemudian tambahkan 10 μL antibodi anti-MDA zebrafish/antibodi anti-IL-6 zebrafish kedalam sumur sampel; (3) masukkan 50 μL streptavidin-HRP kedalam sumur standar dan sumur sampel (jangan dimasukkan kedalam sumur kontrol), dicampur selama 1 menit, ditutup dengan perekat, dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C; (4) buka perekat, kemudian tiap sumur diaspirasi dan dicuci 5 kali dengan *wash Buffer*. Pada akhir pencucian, sisa dari *wash buffer* dibuang dan dikeringkan dengan kertas pengering; (5) tambahkan 50 μL *substrate solution A* dan 50 μL *substrate solution B* pada masing-masing sumur, diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C, ditutup dengan perekat agar terlindungi dari sinar; (6) tambahkan 50 μL *stop solution* ke dalam masing-masing sumur; (7) dalam 30 menit dilakukan pembacaan pada panjang gelombang 450nm dengan ELISA reader untuk menentukan *optical density (OD value)*.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Lampiran 6:
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No.87 Telpon/Fax (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 074 / 19A / 102.7 / 2018
 Sifat : Biasa
 Perihal : **Determinasi Tanaman Kelor**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : Dr. HUSNUL KHOTIMAH, S.Si.,M.Kes
 NIP : 19751125 200501 2 001
 Instansi : UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanaman kelor

| | |
|--------------|--|
| Kingdom | : Plantae (Tumbuhan) |
| Subkingdom | : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh) |
| Super Divisi | : Spermatophyta (Menghasilkan biji) |
| Divisi | : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga) |
| Kelas | : Dicotyledonae |
| Sub kelas | : Dilleniidae |
| Bangsa | : Capparales |
| Suku | : Moringaceae |
| Marga | : Moringa |
| Jenis | : <i>Moringa oleifera</i> Lamk. |
| Sinonim | : <i>Moringa pterygosperma</i> Gaertn. N. W. |
| Nama Daerah | : Kelor (Indonesia, Jawa, Sunda, Bali, Lampung), Kerol (Buru), Marangghi (Madura), Moltong (Flores), Kelo (Gorontalo), Keloro (Bugis), Kawano (Sumba), Ongge (Bima), Hau fo (Timor). |

Kunci determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15b-197b-208b-209b-210b-211b-214a-1

2. Morfologi : Habitat: Pohon, tinggi ±8 m. Batang: Berkayu, bulat, bercabang, berbintik hitam, putih kotor. Daun: Majemuk, panjang 20-60 cm, anak daun bulat telur, tepi rata, ujung berlekuk, menyirip ganjil, hijau. Bunga: Majemuk, bentuk malai, letak di ketiak daun, panjang 10-30 cm, daun kelopak hijau, benang sari dan putik kecil, mahkota putih, putih. Buah: Polong, panjang 20-45 cm, berisi 15-25 biji, coklat kehitaman. Biji: Bulat, bersayap tiga, hitam. Akar: Tunggang, putih kotor.

3. Nama Simplisia : *Moringae Folium* / Daun kelor.

4. Kandungan kimia : Akar mengandung saponin, polifenol, zat pahit, getir dan pedas. Daun mengandung saponin, polifenol dan minyak atsiri. Kulit batang mengandung saponin polifenol dan alkaloid. Biji mengandung minyak dan lemak.

5. Penggunaan : Penelitian.

6. Daftar Pustaka

- Anonim. <http://www.iptek.net.id/kelor>, diakses tanggal 22 Oktober 2010.
- Anonim. <http://www.plantamor.com/kelor>, diakses tanggal 11 Desember 2010.
- Anonim. <http://www.warintek.ristek.go.id/kelor>, diakses tanggal 4 Oktober 2006.
- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Hutapea, Johnny Ria. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.



DR. R.M. SYAFRUDIN, Apt., M.Kes.
199103 1 003

Lampiran 7: Bukt

Lampiran 7:

Bukti Submit Jurnal



The Pan African Medical Journal

ISSN: 1937 – 8688

www.panafrican-med-journal.com

Nairobi- Kampala. Editor@panafrican-med-journal.com

Manuscript ID : 17837 - Submission Confirmation

Dear Kosasih, T.

Your submission was received by the editorial office of the Pamj and will soon be processed

Summary of submission

Moringa oleifera Extract Modulates Body Length, IL-6, IL-10, BDNF, Aromatase Level on Rotenone-Induced Zebrafish Larvae

Manuscript ID : 17837

Authors : Husnul Khotimah, Claudio Wangta, Tomson Kosasih, Krisna Chandra, Albert Christianto, Benny Tjan, Travis Alfred, M. Mulyohadi Ali, Umi Kalsum, Nurdiana, M. Aris Widodo.

Submitted as : Research Article

Keywords : BDNF; IL-6; IL-10; inflammation; *Moringa oleifera*; rotenone; (Biology, Pharmacology)

Lampiran 8:

Bukti Letter

**SURAMADE
MALANG**

**THE
SYMPOSIUM**

"Update On Clinical Pathology and

Academic

To: Tomson Kosasih

Dear author,

It's my pleasure to inform you that, after the review process, your manuscript titled "Moringa oleifera Extract Modulate Beta Amyloid Protein Aggregation in Rotenone-Induced Zebrafish Larvae" will be ACCEPTED in Pan African Medical Journal. The manuscript has been submitted between SURAMADE committee and Pan African Medical Journal, and it is still under-review.

Though the reviewers of the journal already gave their positive feedback, you can still add content to it, such as solid conclusion, giving more information on your results.

Again, thank you for working with us. I believe that knowledge creation and sharing one step at a time.

Sincerely,

Friday November 30th, 2018
Vice Chairman of 8th SURAMADE Committee
dr. AGUSTIN ISKANDAR, M.Kes., Sp.PK

Lampiran 8:

Bukti Letter of Acceptance Jurnal



Academic Paper Acceptance Letter

To: Tomson Kosasih

Dear author,

It's my pleasure to inform you that, after the peer review, your paper,

Moringa oleifera Extract Modulate Body Length, IL-6, IL-10, BDNF, Aromatase Level on Rotenone-Induced Zebrafish Larvae

will be ACCEPTED in Pan African Medical Journal – ISSN 1947- 8688 according MoU agreement between SURAMADE committee and Pan African Medical Journal (PAMJ) publisher with content is still under-review.

Though the reviewers of the journal already confirmed the quality of your paper's current version, you can still add content to it, such as solidifying the literature review, adding more content in the conclusion, giving more information on your analytical process and giving acknowledgement.

Again, thank you for working with us. I believe that our collaboration will help to accelerate the global knowledge creation and sharing one step further. Please do not hesitate to contact me if you have any further questions.

Sincerely,

Friday November 30th, 2018
Vice Chairman of 8th SURAMADE Committee

dr. AGUSTIN ISKANDAR, M.Kes., Sp.PK

PanAfrican
Medical
Journal



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS KEDOKTERAN

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia

Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755

<http://www.fk.ub.ac.id>

e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK ("ETHICAL CLEARANCE")

No. 274 / EC / KEPK / 11 / 2018

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

JUDUL : Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Panjang Badan, Kadar Superoksid Dismutase, Catalase, Malondialdehide, Caspase-3, Interleukin-6, Interleukin-10, Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), dan Aromatase pada Larva Zebrafish (*Danio rerio*) Model Stunting yang Diinduksi Rotenon.

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

ANGGOTA : Albert Christiano
Benny Tjan
Claudio Wangta
Krisna Chandra
Tomson Kosasih
Travis Alfred

UNIT / LEMBAGA : Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya Malang.

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

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang,
Ketua
08 NOV 2018
Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES,
NIK. 160746683

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

Catatan :

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

Repository Universitas Brawijaya
Lampiran 10: **Lampiran 10:**
Repository Universitas Brawijaya

Lampiran 10:



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia

Telp. (0341) 5516111 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755
<http://www.flasko.id> e-mail: sknf@hsc.id

<http://www.fk.ub.ac.id>

e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

SURAT KETERANGAN

Nomor : 2 /UN10.F08.08/PN/2019

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

Judul : Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oliefera*) Terhadap Kadar Malondialdehid Dan Interleukin-6 Pada Larva Zebrafish (*Danio rerio*) Model Stunting Yang Diinduksi Dengan Rotenon

Penulis : dr. Albert Christianto

NIM : 156070122011001

Jumlah Halaman : 96

Jenis Artikel : Tesis (Program Studi Magister Ilmu Biomedik)

Kemiripan : 5 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

03 JAN 2019



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