



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR (*Moringa oleifera*)**

**TERHADAP KADAR MALONDIALDEHYDE DAN BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC**

**FACTOR PADA LARVA ZEBRAFISH (*Danio rerio*) STUNTING**

**TESIS**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Magister**

Oleh:

**Benny Tjan**  
**156070122011012**

**PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Stunting* merupakan gangguan pertumbuhan linear pada anak yang ditandai dengan tinggi badan yang rendah dibandingkan dengan anak seusianya. Pengukuran *stunting* dapat dilakukan melalui panjang atau tinggi badan, lalu dibandingkan dengan standar usia (PB/U) dan hasilnya berada di bawah normal. Pada penderita *stunting*, status gizi berdasarkan panjang atau tinggi badan menurut umurnya dibandingkan dengan standar baku WHO-MGRS (Multicentre Growth Reference Study) tahun 2005 dan didapatkan hasil definitive *stunting* bila nilai z-score kurang dari -2SD dan dikategorikan sangat pendek jika nilai z-scorenya kurang dari -3SD (Kemenkes, 2016).

Di Indonesia pada tahun 2013 jumlah balita yang masuk dalam kategori *stunting* adalah 9,2 juta jiwa dari jumlah total balita 24,5 juta. Angka ini menurut Riskesdas terus meningkat sejak tahun 2007. Pada tahun 2007 balita yang mengalami *stunting* mencapai 36,8%, lalu pada tahun 2010 sempat mengalami penurunan menjadi 35,6%. Namun pada tahun 2013 jumlah balita yang masuk dalam kategori *stunting* kembali meningkat di persentase 37,2%. Pemerintah Indonesia menargetkan penurunan angka *stunting* untuk bayi di bawah 2 tahun sebesar 28% pada tahun 2015-2019. Pemerintah akan melakukan intervensi gizi yang melibatkan sektor seperti ketahanan pangan, ketersediaan air bersih dan sanitasi, penanggulangan kemiskinan, pendidikan sosial, dan sebagainya (Infodatin, 2016).



Akibat dari *stunting* adalah peningkatan angka kematian bayi dan anak, anak sakit-sakitan, ukuran tubuh yang tidak sesuai dengan usia, serta penurunan kognitif.

Akibat-akibat yang ditimbulkan ini apabila dibiarkan dalam jangka waktu panjang akan merugikan perekonomian suatu negara, khususnya di Indonesia. *Stunting* masih menjadi masalah serius yang terjadi pada hampir sepertiga penduduk dunia (Prendergast, 2014).

*Stunting* disebabkan oleh faktor intrauterine dan ekstrauterin. Faktor intrauterine meliputi nutrisi ibu saat hamil, kesehatan ibu saat hamil, dan perkembangan plasenta. Sedangkan faktor ekstrauterin antara lain asupan nutrisi, inflamasi, faktor psikologis, dan faktor lingkungan. Kedua faktor ini saling berkaitan untuk mengakibatkan terjadinya *stunting* melalui mekanisme inflamasi dan terbentuknya radikal bebas. Diketahui bahwa *stunting* terjadi karena adanya radikal bebas yang berlebih (Murphy *et al.*, 2009). Radikal bebas yang paling berbahaya untuk sel adalah radikal hidroksil (OH<sup>•</sup>). Hidroksil dapat merusak membran sel dan akan terjadi peroksidasi lipid. Salah satu produk akhir peroksidasi lipid adalah *malondialdehyde* (MDA) (Asni *et al.*, 2009). Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa pemberian ekstrak pegagan dapat menurunkan kadar MDA pada *zebrafish* yang diinduksi rotenone (Ridlayanti, 2016). Karena mekanisme tersebut, maka penelitian ini menggunakan MDA sebagai parameter.

Ketika peroksidasi lipid terjadi, sel juga mengalami inflamasi. Inflamasi yang terjadi secara terus-menerus akan menyebabkan sel apoptosis. Selain apoptosis, kondisi inflamasi dapat mengganggu faktor-faktor pertumbuhan seperti BDNF. Apoptosis dan terganggunya BDNF akan menyebabkan terjadinya *stunting* (Savage, 2013; Black *et al.*, 2013). Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa pemberian



daun pegagan dapat meningkatkan kadar BDNF pada *zebrafish* yang diinduksi dengan rotenone (Khotimah, 2018). Berdasarkan mekanisme tersebut, maka BDNF perlu diperiksa kadarnya dalam penelitian ini.

Rotenon merupakan pestisida alami yang didapatkan dari akar tanaman keluarga Leguminosae, genus *Lonchocarpus* (Khotimah, 2018). Rotenone diketahui dapat menghambat kompleks 1 mitokondria. Aktivitas rotenone ini akan meningkatkan jumlah radikal bebas. Kondisi banyaknya radikal bebas akan menyebabkan apoptosis yang meningkat dan inflamasi. Kondisi ini akan menyebabkan terjadinya *stunting* (Darwitri *et al.*, 2018). Pada penelitian ini rotenone digunakan untuk memicu terjadinya *stunting* pada larva *zebrafish*.

Daun kelor (*Moringa oleifera*) merupakan tanaman yang dapat tumbuh di negara tropis dan subtropis, salah satunya di Indonesia. Sering sekali kita jumpai keberadaan daun kelor ini di Indonesia karena ketersediaannya yang berlimpah. Daun kelor ini diketahui memiliki banyak manfaat sehingga disebut juga dengan tanaman "dewa". Manfaat berlimpah yang dimiliki daun kelor dimanfaatkan masyarakat untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit seperti malaria, demam tipoid, arthritis, luka, bengkak, nyeri kepala, sakit tenggorokan, bronchitis, infeksi mata, dan infeksi telinga. Manfaat daun kelor didapatkan dari kandungan antioksidan, mineral, dan vitamin yang terkandung di dalamnya. (Leone *et al.*, 2015). Jika dilihat dari kandungannya, senyawa daun kelor dapat menghambat peningkatan radikal bebas yang merupakan patomekanisme *stunting*. Maka penelitian ini menggunakan daun kelor sebagai penghambat *stunting*.



Pada penelitian ini menggunakan hewan coba *zebrafish* karena memiliki gen yang tingkat kesamaannya 70% secara ortolog dengan manusia (Barbazuk, 2000).

Selain itu *zebrafish* memiliki fekunditas yang tinggi, embryogenesis yang cepat, larva transparan, dan cukup mudah dipelihara. Dengan karakteristik tersebut, *zebrafish* merupakan hewan coba yang sesuai dan memudahkan dalam penelitian ini.

Masalah *stunting* masih menjadi tantangan berat dunia, khususnya Indonesia.

Dengan pengetahuan yang sudah ada tentang patomekanisme *stunting*, penulis ingin mengetahui apakah daun kelor dapat menghambat *stunting* dengan melihat kadar MDA dan BDNF pada hewan coba *zebrafish stunting*. Diharapkan dengan mengetahui pengaruh daun kelor terhadap *stunting*, daun kelor dapat dijadikan cara pencegahan *stunting*.

## 1.2 Rumusan Masalah

### 1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Apakah pemberian ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) berpengaruh terhadap kadar *malondialdehyde* dan *Brain Derived Neurotrophic Factor* pada larva *zebrafish (Danio rerio) stunting*?

### 1.2.2 Rumusan Masalah Khusus

1. Apakah ekstrak etanol daun kelor dapat mencegah *stunting* pada larva *zebrafish*?
2. Apakah ekstrak etanol daun kelor dapat meningkatkan kadar MDA pada larva *zebrafish stunting*?



3. Apakah ekstrak etanol daun kelor dapat menurunkan kadar BDNF pada larva *zebrafish stunting*?
4. Bagaimana korelasi antara panjang badan larva *zebrafish stunting* dengan kadar MDA?
5. Bagaimana korelasi antara panjang badan larva *zebrafish stunting* dengan kadar BDNF?
6. Bagaimana kekuatan korelasi antara panjang badan larva *zebrafish stunting* dengan kadar MDA dan BDNF?

### 1.3 Tujuan

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan pemberian ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) berpengaruh terhadap kadar *malondialdehyde* dan *Brain Derived Neurotrophic Factor* pada larva *zebrafish (Danio rerio) stunting*.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan ekstrak etanol daun kelor dapat mencegah *stunting* pada larva *zebrafish*.
2. Membuktikan ekstrak etanol daun kelor dapat menurunkan kadar MDA pada larva *zebrafish stunting*.
3. Membuktikan ekstrak etanol daun kelor dapat meningkatkan kadar BDNF pada larva *zebrafish stunting*.
4. Menganalisa korelasi antara panjang badan larva *zebrafish stunting* dengan kadar MDA.
5. Menganalisa korelasi antara panjang badan larva *zebrafish stunting* dengan kadar BDNF.



6. Mengetahui kekuatan korelasi antara panjang badan larva *zebrafish stunting* dengan kadar MDA dan BDNF.

#### 1.4 Manfaat Penelitian

##### 1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Memberi pengetahuan tentang daun kelor (*Moringa oleifera*) memiliki kandungan yang dapat mencegah *stunting*.

##### 1.4.2 Manfaat Praktis

1. Dapat mengembangkan budidaya daun kelor secara meluas di masyarakat sebagai salah satu tanaman herbal yang memiliki manfaat bagi kesehatan dengan kandungan antioksidan yang tinggi guna mengatasi kejadian *stunting*
2. Memberikan gambaran pentingnya deteksi dini pemenuhan kebutuhan nutrisi yang adekuat yang dimulai sejak masa prenatal, postnatal, dan tumbuh kembang bayi dan balita dalam praktek klinis kedokteran yang dilaksanakan secara komprehensif dan kontinu guna menurunkan angka kejadian *stunting*.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Stunting*

##### 2.1.1 Definisi *Stunting*

*Stunting* adalah kondisi dimana suatu individu mengalami gangguan pertumbuhan sehingga individu tersebut lebih pendek daripada individu lain yang seumuran. Berdasarkan standar pertumbuhan anak WHO, seorang anak dikatakan mengalami *stunting* apabila panjang atau tinggi badan sesuai umur kurang dari -2 SD. Sedangkan anak-anak dengan tinggi badan <-3 SD dikategorikan sebagai *sever* (de Onis & Branca, 2016).

Salah satu penyebab *stunting* adalah kurangnya asupan gizi pada usia dini. Kekurangan gizi dapat menyebabkan berkurangnya kemampuan kognitif, mudah sakit, postur tubuh pendek, meningkatkan angka kematian pada bayi dan anak, dimana 50% kematian terjadi pada anak usia di bawah 5 tahun (Aly *et al.*, 2014). Selain itu, bila dilihat dari efek jangka panjangnya, kekurangan gizi dapat membebani produktivitas dan perekonomian suatu negara (MAC Indonesia, 2015). Maka pada kondisi dimana terjadi *stunting*, sebenarnya banyak sekali hal yang berkaitan dan menyebabkan dampak buruk dari banyak aspek (Svefors *et al.*, 2016).

Pertumbuhan anak paling pesat terjadi saat bayi dalam kandungan sampai 2 tahun kehidupan pertama, terutama pertumbuhan otak. Karena pada masa tersebut merupakan masa yang paling cepat terjadi pertumbuhan, maka terjadinya gangguan pertumbuhan dan perkembangan juga akan semakin rentan. Suatu individu yang mengalami *stunting* dapat terlihat dari penampakan fisiknya, yaitu



memiliki tubuh yang pendek. Masalah ini tentunya dapat ditanggulangi dengan pemberian asupan gizi yang cukup dan adekuat selama masa pertumbuhan pada anak (Badham & Sweet, 2010).

### 2.1.2 Etiologi *Stunting*

*Stunting* disebabkan oleh dua hal utama, yaitu faktor intrauterin dan faktor ekstrauterin. Faktor intrauterin mempengaruhi pertumbuhan janin saat periode prenatal, antara lain interaksi kompleks antara status nutrisi ibu, sinyal metabolisme, endokrin, serta perkembangan plasenta, sehingga ukuran bayi secara keseluruhan dapat dijadikan cerminan lingkungan di intrauterin. Bayi yang mengalami berat lahir rendah (<2,5 kg), terjadi 6 kali lebih tinggi di negara berkembang (Prendergest *et al.*, 2014). Bayi dengan berat badan rendah sering terjadi pada kasus preterm, kecil masa kehamilan, maupun karena kedua hal ini terjadi bersamaan. Pada tahun 2010, kasus preterm terjadi sebanyak 27% dan hampir 3 juta bayi lahir dengan preterm dan kecil masa kehamilan. Dari kondisi tersebut, maka pada masa prenatal sangat penting untuk diperhatikan. Status gizi ibu juga sangat berpengaruh terhadap terjadinya *stunting*. Selain itu perawakan ibu yang pendek (BMI < 18,5 kg/cm<sup>2</sup>) selama kehamilan, ibu hamil dengan anemia (Hb <11 g/dl), dan ibu dengan malaria saat hamil juga sangat berpengaruh terhadap terjadinya *stunting* (Danaei *et al.*, 2016).

Faktor ekstrauterin mempengaruhi pertumbuhan pada periode postnatal, antara lain asupan nutrisi, pemberian ASI eksklusif, inflamasi, faktor psikologi, hormon, sulitnya akses terhadap pelayanan kesehatan, dan faktor lingkungan. Faktor lingkungan yang dimaksud antara lain rendahnya sanitasi, kebersihan lingkungan, dan pencemaran air. Apabila faktor-faktor tersebut terganggu, suatu individu berisiko mengalami gangguan pertumbuhan linear atau *stunting*



(Prendergest *et al.*, 2014; Danaei *et al.*, 2016; Torlesse, Cronin, Sebayang, & Nandy, 2016; Kemenkes RI, 2016).

### 2.1.3 Patofisiologi *Stunting*

Pertumbuhan adalah proses fisiologis yang terjadi pada setiap individu, baik sejak kehidupan janin, bayi, balita, pubertas, maupun dewasa. Banyak faktor yang mempengaruhi pertumbuhan ini, salah satu faktor penting yang berperan adalah status nutrisi. Apabila status nutrisi terganggu, maka pertumbuhan juga akan terhambat dan dapat menyebabkan *stunting*. Kecukupan nutrisi pada awal kehidupan mempengaruhi ekspresi genetik pertumbuhan, metabolisme, dan risiko terjadinya penyakit. Kekurangan maupun kelebihan nutrisi dapat mengganggu replikasi, migrasi, maturasi, apoptosis, pertumbuhan serta perkembangan embrio (Savage, 2013; Black *et al.*, 2013).

Pertumbuhan terbagi menjadi 2 proses yang berbeda. Proses tersebut adalah hiperplasia (terjadi di otak dan tulang) dan hipertrofi (terjadi pada jaringan lemak). Proses pertumbuhan hiperplasia dipengaruhi oleh hormon, seperti insulin, IGF-1, leptin, kortisol, BP3, *growth hormone*, T3/T4. Hiperplasia juga membutuhkan nutrisi esensial seperti asam amino, besi, zinc, iodine, tembaga, sodium, potasium, fosfor, energi yang adekuat, serta asam lemak esensial. Kurangnya nutrisi dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan linear melalui beberapa mekanisme, yaitu ekspresi gen, reseptor hormon, sinyal transduksi, dan pertumbuhan sel dalam periode kritis (Black *et al.*, 2013). Pada kondisi malnutrisi akut, tubuh akan merespon dengan meningkatkan GH. Namun seiring dengan malnutrisi yang berkepanjangan GH akan semakin menurun, demikian juga yang terjadi dengan IGF-1.

Infeksi kronis juga dapat memicu terjadinya *stunting*. Ketika infeksi akan



terjadi kurangnya asupan makanan akibat anoreksia, peningkatan kebutuhan asam amino untuk mempercepat sintesis protein pada fase akut, produksi glutation, dan membangun respon kekebalan adaptif (Briend *et al.*, 2015). Anak yang sering terpapar oleh patogen enteric akan mengalami perubahan fungsi dan struktur usus yang ditandai dengan atrofi vili usus. Apabila kondisi ini terjadi terus menerus, kemampuan usus untuk menyerap nutrisi akan berkurang dan permeabilitas usus akan meningkat. Peningkatan permeabilitas usus menyebabkan translokasi produk mikroba dari lumen usus ke sirkulasi sistemik.

Kondisi ini akan menyebabkan peradangan kronik dan menekan IGF-1 (Prendergast & Humphrey, 2014). Peningkatan ekspresi IL-6 adalah tanda bahwa terjadi infeksi kronis. Meningkatnya ekspresi IL-6 akan menghambat ekspresi BDNF (Mondelli *et al.*, 2011).

Radikal bebas memiliki peranan penting terhadap *stunting*. Radikal bebas yang terlalu banyak akan menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif akan memicu terbentuknya radikal bebas hidroksil ( $\text{OH}^\cdot$ ) yang merupakan ROS yang paling berbahaya (Esra *et al.*, 2012). Hidroksil akan merusak membran sel sehingga terjadi peroksidasi lipid dengan hasil akhir *malondialdehyde* (MDA). Kondisi ini akan merusak sel dan mengganggu pertumbuhan individu sehingga mengalami *stunting* (Savage, 2013).

Kelainan pada tiroid yang mengakibatkan turunnya sintesis GH dan reseptor GNRH pada somatotrop dapat mengakibatkan gangguan pertumbuhan. Hormon tiroid ( $\text{T}_3$  dan  $\text{T}_4$ ) berfungsi mempertahankan kestabilan metabolisme tubuh, pertumbuhan dan perkembangan otak, perkembangan sistem saraf, dan perkembangan tulang dan gigi (Wallace & Stone, 2003). Kondisi hipotiroid (kekurangan hormon tiroid) pada ibu hamil dapat menyebabkan infertilitas, gangguan tumbuh kembang janin, abortus spontan, dan bayi lahir prematur.

Hipotiroid pada anak dapat mengakibatkan gangguan tumbuh kembang yang secara klinis dapat terlihat dari panjang atau tinggi badan yang lebih pendek daripada anak seusianya dan penurunan kecerdasan (Hetzel, 2000; Dunn, 2003; Akhter & Hasan 2009).

#### 2.1.4 Dampak *Stunting*

*Stunting* tidak hanya berdampak pada ukuran tubuh suatu individu, namun juga berdampak pada kelangsungan hidupnya, baik dampak jangka maupun jangka pendek. Beberapa dampak buruk sebagai akibat dari *stunting* adalah meningkatnya angka kesakitan dan kematian, perkembangan bahasa dan motorik, penurunan kognitif, dan masalah ekonomi berupa meningkatnya biaya kesehatan. Dampak jangka panjang dari *stunting* antara lain perawakan tubuh pendek saat dewasa, gangguan sistem reproduksi, meningkatnya risiko obesitas, menurunnya kemampuan belajar, serta kurangnya kemampuan di bidang pekerjaan (WHO, 2013; WHO, 2014; Prendergest *et al.*, 2014).

#### 2.1.5 Terapi dan Pencegahan *Stunting*

*Stunting* adalah keadaan kekurangan gizi kronis yang disebabkan berbagai macam hal, salah satu yang paling sering adalah asupan gizi yang kurang yang kronis. Terapi untuk *stunting* pada anak di bawah tiga tahun merupakan hal yang sulit. Namun dengan intervensi gizi yang sesuai dengan umur anak dapat memperbaiki *stunting* pada anak walaupun sulit. Selain pemenuhan nutrisi, pengaturan waktu tidur anak sehingga hormone pertumbuhan anak dapat bekerja dengan efektif (Kemenkes RI, 2016).

Banyak sekali dampak negatif yang disebabkan oleh *stunting*. Maka dari itu sudah seharusnya *stunting* dicegah sejak dini. Upaya pencegahan *stunting* dapat melalui upaya perbaikan atau intervensi gizi spesifik secara langsung dan



melalui upaya intervensi gizi sensitif secara tidak langsung. Intervensi secara tidak langsung ini meliputi ketersediaan air bersih dan sanitasi, penanggulangan kemiskinan, pendidikan, sosial, dan sebagainya (Kemenkes RI, 2016).

Upaya pencegahan *stunting* dapat dimulai sejak 1000 hari pertama kehidupan karena pada waktu tersebut merupakan masa pertumbuhan yang paling rentan mengalami kelainan. Adapun upaya yang dilakukan untuk mencegah *stunting* antara lain pemenuhan nutrisi ibu saat hamil yang meliputi asupan gizi adekuat dan suplementasi (Fe). Saat melahirkan sebaiknya persalinan ditangani oleh tenaga kesehatan dan dilanjutkan dengan inisiasi menyusui dini untuk menciptakan bonding attachment antara ibu. Setelah melahirkan, upaya yang bisa diberikan adalah memberikan ASI eksklusif selama 6 bulan, setelah lebih dari 6 bulan ditambahkan makanan pendamping ASI (MPASI), dan meneruskan ASI sampai usia 2 tahun. Setelah itu penting bagi ibu untuk memeriksakan anaknya ke posyandu untuk memantau tumbuh kembang anak. Lingkungan juga memiliki peran penting terhadap tumbuh kembang anak, maka penting adanya akses terhadap air bersih dan fasilitas sanitasi, serta menjaga kebersihan lingkungan (MCA Indonesia, 2105; Kemenkes RI, 2016).

## 2.2 Rotenon

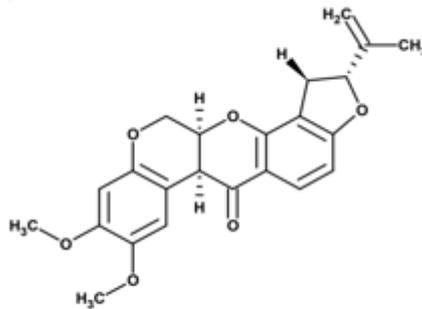
Rotenon merupakan salah satu jenis pestisida alami yang berasal dari akar tanaman keluarga Pea (kacang-kacangan) subtropis dan tropis, ditemukan di Amerika Selatan, dan Asia Tenggara (Hien *et al.*, 2003). Di Indonesia, rotenon dapat ditemukan pada daun kacang babi (*Tefrosia*) yang mengandung 5% rotenon, akar tanaman tuba (*Derris elliptica*) dengan kadar rotenon 0,3-1,2% (Kementerian Pertanian, 2012). Rotenon digunakan sebagai racun kuat untuk ikan (Piscicide) serangga (Insektisida), dan jamur (Fungisida) (Dhaouadi, Monser, &



Adhoum, 2010).

### 2.2.1 Struktur Fisik dan Kimia Rotenon

Figure 1. Structure of rotenone.



Gambar 2.1 Struktur kimia rotenone (Ling, 2004)

Rotenon memiliki struktur sebagai berikut (Tanner *et al.*, 2011) :

Nama umum : Rotenon

Nama kimia : [2R-(2 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )]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<sub>23</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>

Berat molekul : 394,43

Titik lebur : 163°C

Titik didih : 220°C

Tekanan penguapan : <math>\leq</math>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 transparan 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 (Tanner *et al.*, 2011). 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 mengekskresi benda asing tersebut. Adanya benda asing tersebut dapat memicu metabolisme bahan toksik atau ROS dari hasil stress oksidatif (Tebourbi *et al.*, 2006).

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 dalam produksi

Adenosin Triphosphate (ATP). Komplek I, II, III merupakan sumber  $O_2^-$  dan ROS lainnya, yaitu OH, NO,  $H_2O_2$ , dan ONOO<sup>-</sup> (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  $\text{Ca}^{2+}$  sitosol selama mengontrol hidup dan mati sel melalui apoptosis (Brookes *et al.*, 2005).

Dalam sel mamalia terdapat antioksidan alami hasil penguraian inter independen antara enzim dan nonenzim, sistem antioksidan yang melindungi struktur sel dan berfungsi melawan kerusakan sel akibat ROS (Jezek & Hlavata, 2005). Mekanisme antioksidatif seluler membutuhkan kontrol ketat dari  $\text{O}_2^-$  dan  $\text{H}_2\text{O}_2$  sebelum bertransformasi menjadi ROS yang reaktif, terutama ONOO<sup>-</sup> dan OH. Secara fisiologis  $\text{O}_2^-$  dan  $\text{H}_2\text{O}_2$  berperan penting dalam regulasi jalur sinyal transduksi dan ekspresi gen dalam metabolisme sel, pertumbuhan, perkembangan, dan diferensiasi (Dennery, 2007; Marian *et al.*, 2007), sebaliknya, jika produksi ROS berlebih akan menginduksi stress oksidatif, menyebabkan proteksi antioksidan dalam tubuh lemah, dan mengakibatkan kerusakan oksidatif makromolekuler sel, termasuk protein, lemak, dan asam nukleat (Jezek & Hlavata, 2005), berkurangnya aktivitas enzim, ekursakan peroksidatif membran sel, kerusakan DNA, dan mutagenesis (Buonocore *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).

Rotenon bekerja menghambat NADH dehidrogenase yang dikenal dengan kompleks I, sehingga menyebabkan penurunan kemampuan oksidasi fosforilasi, menyebabkan hambatan pada produksi ATP di mitokondria, dan mendorong



terbentuknya radikal bebas/ROS, serta menaktifkan mekanisme stres oksidatif.

Hasil penelitian Li et al (2003) menunjukkan bahwa pemberian rotenon pada sel HI-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. Pemberian rotenon konsentrasi 1  $\mu$ M selama 36 jam menunjukkan bahwa 50% kromatin kondensasi dan fragmentasi inti sel yang menyebabkan kerusakan DNA, pengeluaran sitokrom C, dan aktivasi caspase 3. 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 Dosis dan Toksisitas Rotenon

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

Tabel 2.1 : 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<sub>50</sub> = 39,5 mg/kg, sedangkan pada rat jantan LD<sub>50</sub> = 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 (Tanner, 2011).

Toksikitas 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, 2014).

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 µg/L menunjukkan adanya signal parkinson disease yang ditandai dengan peningkatan ekspresi α synuclein, aktivasi caspase 9, caspase 3, dan apoptosis pada otak tengah, serta penurunan ekspresi faktori BDNF.

**2.3. Zebrafish (Danio rerio)**

*Zebrafish (Danio rerio)* merupakan salah satu model yang populer saat ini dalam studi perkembangan embrio. *Zebrafish* ini memiliki beberapa karakteristik, antara lain (Fleming dan Alderton, 2013) :

- 1. Fekunditas yang tinggi (200 telur / minggu)





2 Embryogenesis yang cepat. Rangka secara utuh terbentuk pada 24 jam setelah fertilisasi. Organ dalam (jantung, ginjal, hepar, dan usus) berkembang sempurna pada 96 jam setelah fertilisasi.

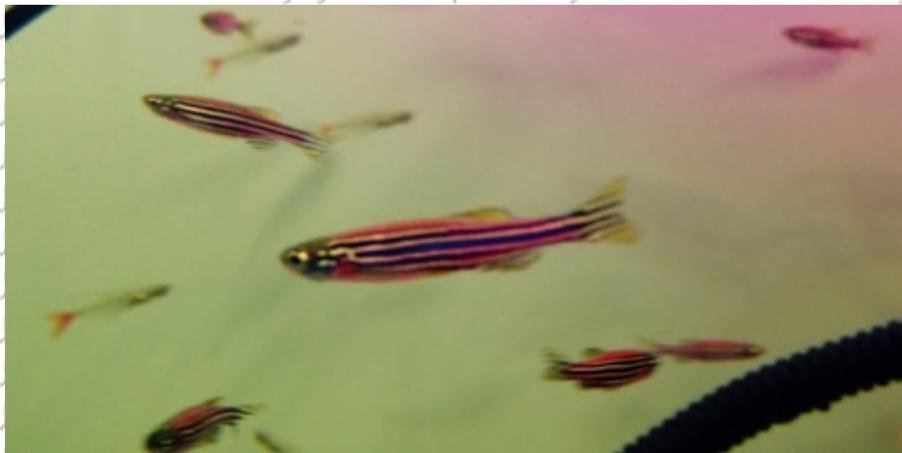
3 Mudah untuk *maintain*

4 Larva yang transparan

5 Mudah dilakukan manipulasi genetik

Tentu ada beberapa keuntungan yang dipertimbangkan sehingga *zebrafish* kini populer sebagai model penelitian. Keuntungan pertama adalah dari sisi harga. Harga *zebrafish* ini terbilang murah. Maka dalam penelitian hal ini sangat dipertimbangkan. Kemudian juga dari hal *timeline*. *Zebrafish* memiliki waktu embryogenesis yang relatif cepat. Tentu waktu juga sangat penting untuk kelancaran suatu penelitian, baik penelitian itu sendiri, maupun penelitian lanjutan berikutnya. Embriogenesis *zebrafish* yang menyerupai proses pembelahan, gastrulasi, somitogenesis, dan organogenesis pada sel manusia mendukung *zebrafish* untuk digunakan sebagai model dalam penelitian (Lieschke & Currie, 2007).

### 2.3.1 Morfologi dan Taksonomi *Zebrafish*



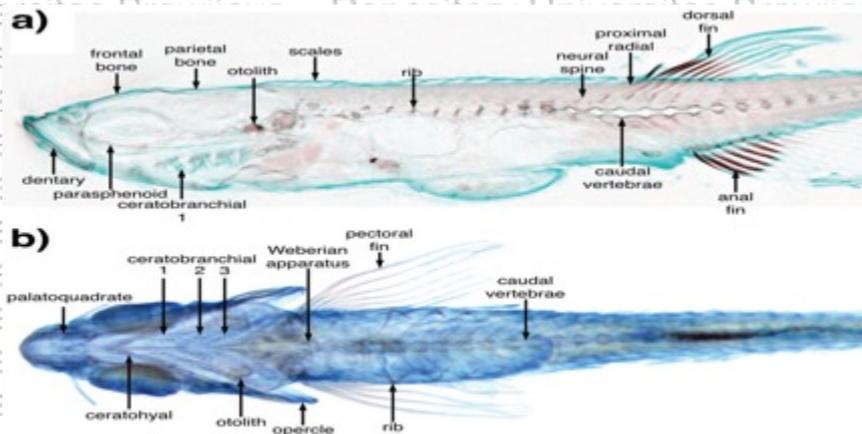
Gambar 2.2 *Zebrafish (Danio rerio)* (Spence, Gerlach, Lawrence, & Smith, 2008)



Adapun taksonomi zebrafish sebagai berikut :

**Tabel 2.2 Taksonomi Zebrafish**

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



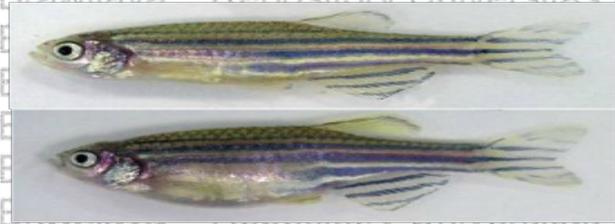
**Gambar 2.3 Anatomi zebrafish (Bryson-Richardson et al., 2007)**

**Keterangan : a. Anatomi zebrafish dari sisi samping, b. Anatomi zebrafish dari sisi atas**

Morfologi zebrafish jantan dan betina memiliki beberapa perbedaan.

*Zebrafish* jantan cenderung memiliki ukuran lebih kecil, tampak lebih ramping di

bagian abdomen, cenderung berwarna merah muda kekuningan di bagian sirip samping dan ekor, warna garis biru lebih gelap, dan lebih aktif. Sedangkan *zebrafish* betina dewasa lebih besar dan memiliki perut dengan bentuk yang lebih bulat, berwarna putih, memancarkan warna putih kebiruan dan terdapat strip berwarna silver diantara strip biru (Reed & Jennings, 2011). Kematangan reproduksi *zebrafish* berlangsung sekitar usia 3-4 bulan. Sekali bertelur, *zebrafish* memproduksi telur 200-300 telur teratur setiap minggu (Liew & Orban, 2013). Pengukuran panjang badan *zebrafish* (*Standart length*) dimulai dari ujung hidung (*tip of the snout*) sampai dengan ujung ekor (*caudal fin*). Dengan cara pengukuran tersebut, *Zebrafish* memiliki rata-rata panjang badan 40 mm (Spence, Gerlach, Lawrence, & Smith, 2008).



**Gambar 2.4** *Zebrafish* jantan (atas) dan *zebrafish* betina (bawah) (Spence et al., 2008)

*Survival rate zebrafish* di habitat asli berkisar antara 1-2 tahun karena adanya predator atau parasit, namun apabila *zebrafish* yang dipelihara di laboratorium dengan baik dapat bertahan hingga berusia maksimal 5 tahun. Pada usia lebih dari 2 tahun, kemampuan reproduksi *zebrafish* menurun (Spence, Gerlach, Lawrence, & Smith, 2008).

**2.3.2 Perkembangan Zebrafish**

*Zebrafish* memiliki beberapa tahap perkembangan. Berikut tabel tentang perkembangan *zebrafish* (Woo, Shih, & Fraser, 1995).

Tabel 2.3 Stadium Perkembangan Zebrafish

Stadium	Waktu (jam)	Perkembangan
Periode zygote	0 - $\frac{3}{4}$	Telur yang baru terfertilisasi
Periode Cleavage	$\frac{3}{4}$ - $2\frac{1}{4}$	Sel membelah menjadi 2, 4, 8, 16, 32, sampai 64 sel.
Periode Blastula	$2\frac{1}{4}$ - $3\frac{1}{4}$	Pembentukan epiboly, yaitu penipisan dari kedua yolk syncitial layer dan blastoderm melewati yolk cell, yang pada akhirnya yolk cell akan terliputi, tahap ini diawali dengan : -terbentuknya kubah -perubahan blastodisk menjadi blastoderm
Periode Grastula	$5\frac{1}{4}$ - 10	-epiboly terbentuk sempurna -terbentuk tail bud -terbentuk primary germ layer dan embryonic axis
Periode Segmentasi	10 - 24	-awal pembentukan neuron -optic primordium dapat diidentifikasi -awal pembentukan ginjal -otic placode, yang merupakan awal pembentukan telinga tampak -olfactory primordium dapat diidentifikasi -awal terjadinya pembagian dan diferensiasi sel darah -pelurusan pada trunkus posterior hampir sempurna, pemanjangan ekor di anterior masih membentuk kurva di bagian ventral -kontraksi myotom secara spontan

### 2.3.3 Zebrafish sebagai Model Penelitian

*Zebrafish* merupakan salah satu model yang populer dalam dunia penelitian karena 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). Selain itu, alasan utama *zebrafish* digunakan sebagai model penelitian adalah gen *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, 2000). Oleh karena itu, *zebrafish* banyak digunakan dalam penelitian neurobiologi, genetika, 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, stress oksidatif, penyakit imunitas, stem cell, alzheimer, bakteri, virus, dan pengembangan vaksin (Hsu, Hsiao, Kuo, & Chung, 2002).

*Zebrafish* memiliki tingkat sensitifitas yang tinggi, sehingga digunakan untuk model penelitian terhadap toksisitas bahan kimia atau obat (Hill, Teraoka, Heideman, & Peterson, 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<sub>50</sub>) sebesar < 0,0014 µM.

*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). Embrio *zebrafish* dapat pula digunakan sebagai model penelitian *stunting*. Ridlayanti (2016) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa paparan rotenon dengan dosis 10 ppb dapat menyebabkan larva *zebrafish* menjadi *stunting* yaitu panjang badan dibawah -2 SD melalui ekspresi BDNF yang menurun dibanding dengan larva *zebrafish* kontrol. *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).

### 2.3.4 Perawatan *Zebrafish*

#### 1. Karakteristik Air

Ikan zebra dipelihara pada sistem sirkulasi, aerasi, dan penyaringan yang baik agar air tetap sehat. Berikut karakteristik air yang sehat :

**Tabel 2.4 Karakteristik Air Pada Pemeliharaan *Zebrafish***

Parameter	Rentang Optimum
Alkalinitas	50-150 mg/L CaCO <sub>3</sub>
pH	6,8-7,5
Suhu	26-28,5°C
Hardness	50-100 mg/L CaCO <sub>3</sub>
Amonia tidak terionisasi	<0,02 mg/L
Nitrat (NO <sup>3-</sup> )	<50 mg/L
Nitrit (NO <sup>2-</sup> )	<0,1 mg/L
Oksigen terlarut	>6 mg/L
Salinitas	0,5-1 g/L
Konduktivitas	300-1500 µS

(Advsh *et al.*, 2012)

#### 2. Kebersihan

Aquarium perlu dibersihkan secara teratur seminggu sekali. Membersihkan menggunakan spon penyaring dilakukan setiap 3 hari (Advsh, *et al.*, 2012).

#### 3. Pencahayaan

*Zebrafish* memerlukan pencahayaan sesuai dengan siklus gelap terangnya. Siklus terang berlangsung selama 14 jam, sedangkan siklus gelap

berlangsung selama 10 jam. Ikan dewasa betina akan mempersiapkan telur dan ikan jantan akan membuahi telur tersebut setelah terpapar cahaya (Nusslein & Dahm, 2002).

#### 4. Makanan

*Zebrafish* dapat diberikan makanan kering berukuran 100 mikron untuk larva dan 300-400 mikron untuk ikan dewasa. Selain itu artemia juga dapat diberikan (Advesh *et al.*, 2012).

#### 2.4 Kelor (*Moringa oleifera*)

Kelor 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 mencapai 12 meter dan memiliki kayu yang berbatang lunak (Leone *et al.*, 2015). Daunnya hijau berbentuk *bipinnate* atau *tripinnate* dan tersusun secara spiral. Bunganya berwarna putih kekuningan memiliki ukuran sekitar 10- 25 cm (Parrota, 2009) dan memiliki aroma semerbak yang keluar sepanjang tahun. Tanaman ini dapat tumbuh di negara tropis dan subtropis, 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).

Taksonomi kelor (*Moringa oleifera*) menurut USDA (Diakses November 2016):

Kingdom : Plantae

Division : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Order : Capparales





Family : Moringaceae  
Genus : Moringa  
Species : *Moringa oleifera* Lam.



Gambar 2.5 Daun Kelor (Krisnadi, 2015)

Daun kelor mengandung protein, mineral, antioksidan dan beta-karoten yang dapat dikonsumsi sebagai makanan oleh manusia (Fahey,2005). Selain makanan, daun kelor juga dapat digunakan sebagai obat untuk beberapa penyakit seperti malaria, demam tipoid, arthritis, luka, bengkak, nyeri kepala, sakit tenggorokan, bronchitis, infeksi mata, dan infeksi telinga. Kandungan mineral dan vitamin dalam kelor seperti vitamin A, vitamin C, kalsium, potassium, besi,protein,dan lain-lain yang di ketahui memiliki jumlah lebih dibandingkan buah-buahan dan sayuran lain mampu memenuhi kebutuhan mineral dan vitamin tubuh (Fahey,2005).

#### 2.4.1 Kandungan Kelor

Kandungan pada daun kelor diuraikan sebagai berikut.

Tabel 2.5 Kandungan Daun Kelor (Leone *et al.*, 2015)

Komponen Bioaktif	Jumlah	Komponen Bioaktif	Jumlah
Vitamin A	45.200 IU	Ferulic acid	0,078 mg/g
Vitamin B1-thiamine	0,24 mg/100 g	Gallic acid	1,034 mg/g
Vitamin B2-riboflavin	0,2 mg/100 g	Flavonoid	5,059 mg/g
Vitamin B3-niacin	3,2 mg/100 g	4-hydroxybenzyl (sinalbin)	2,36 mg/g
Vitamin C-asam askorbat	880 mg/100 g	4-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyloxy)- benzyl	22,56 mg/g
Vitamin E-tocopherol	16,21 mg/100 g	4-O- ( $\alpha$ -L-acetylramnopyranosyloxy)-benzyl isomer 1	2,76 mg/g
$\beta$ -carotene	33,48 mg/100 g	4-O- ( $\alpha$ -L-acetylramnopyranosyloxy)-benzyl isomer 2	1,80 mg/g
Lutein	6,94 mg/100 g	4-O- ( $\alpha$ -L-acetylramnopyranosyloxy)-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
o-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

Tumbuhan kelor mengandung antioksidan golongan flavonoid seperti quercetin, beta-sitosterol dan kaempferol. Penggunaan ekstrak daun kelor mampu mencegah dari kerusakan oksidatif yang disebabkan makanan berlemak, selain itu kelor juga mampu menghambat produksi *nitric oxide* oleh sel makrofag yang



dipapar oleh bakteri lipopolisakarida (LPS) (Coppin *et al.*, 2013). Flavonoid yang ada dalam kelor juga mampu memberikan efek lain selain antioksidan, yakni antikanker, antiinflamasi, dan juga anti hipertensi (Formika, 1995).

Tumbuhan kelor memiliki kandungan mineral seperti kalsium yang berperan penting terhadap pertumbuhan manusia. Kandungan kalsium dalam 1000 mg kelor adalah 4000 mg. Kalsium dalam 1000 mg kelor ini mengandung 10x lipat lebih banyak dibanding dengan 8 ons susu yang mengandung 300-400 mg kalsium. Kelor juga memiliki kandungan besi sebanyak 28 mg yang lebih banyak daripada kandungan besi dalam bayam maupun daging sapi. Selain itu kelor juga mengandung zinc yang berperan penting untuk sintesis DNA dan RNA. Kandungan zinc dalam kelor adalah 25,5-31,03 mg/kg. Kelor juga mengandung PUFA (*Poly Unsaturated Fatty Acid*) seperti *linoleic acid*, *linolenic acid*, dan *oleic acid*. PUFA ini berperan sebagai pengatur kadar kolesterol (Lakshmipriya, 2016).

#### 2.4.2 Kelor sebagai Antioksidan

Banyak kandungan kelor yang berperan sebagai antioksidan, seperti vitamin C,  $\beta$ -carotene, vitamin E (Kumar *et al.*, 2012), *kaempferol*, *quercetin* (Gupta *et al.*, 2012), dan asam fenolat (Sreelatha *et al.*, 2011). Kandungan pada daun kelor seperti *isothiocyanates*, *polyphenol* juga berfungsi sebagai antioksidan (Tumer *et al.*, 2015). Dari biji kelor juga didapatkan senyawa antioksidan seperti *tocopherols*, *myricetin*, dan *lectin* (Singh *et al.*, 2013). Minyak biji kelor mengandung *monopalmitic acid*, *oleic acid*, *trioleic triglycerides* sebagai antioksidan. Kulit kelor mengandung *procyanidins* dan bunga kelor mengandung *palmitic acid*, *phytosterols 9-octadecenamide* yang berperan sebagai antioksidan (Inbathamizh, 2012).



### 2.4.3 Kelor sebagai Antiinflamasi

Kandungan kelor yang berfungsi sebagai antiinflamasi antara lain *isothiocyanate*, *quercetin*, *kaempferol glucosides*, *aurantiamide acetate*, dan *1,3-dybenzyl urea* (Maheshwari *et al.*, 2014). Kelor juga berpotensi menghambat proses inflamasi terkait penyakit lain, seperti kanker, asma, rinitis alergika, dermatitis atopi, dan rheumatoid arthritis (Lee *et al.*, 2013).

### 2.4.4 Kelor sebagai Neuroprotector

Daun kelor diketahui memiliki kandungan yang memiliki efek *neuroprotective* dengan mempertahankan kelangsungan hidup neuron dan merangsang pertumbuhan neuron (Hannan *et al.*, 2014). Ekstrak daun kelor juga diketahui memiliki efek protektif terhadap penyakit Alzheimer dengan mengubah kadar monoamine di otak dan aktivitas listrik (Ganguly, 2008).

### 2.4.5 Kelor sebagai Antitumor

Kelor mengandung fitokimia seperti *thannin*, *sterol*, *terpenoid*, *flavonoid*, *saponin*, *anthraquinone*, dan *alkaloid* yang berfungsi sebagai antitumor (Onsare & Arora, 2015).

## 2.5 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan suatu molekul yang memiliki atom berlebih (satu atau lebih) yang bebas tidak berpasangan. Radikal bebas dibagi menjadi derivat radikal oksigen dan non radikal oksigen. Contoh yang termasuk derivat oksigen adalah hidrosil, peroksil ion, dan superoxid. Sedangkan contoh daro non radikal oksigen adalah ozon, singlet oksigen, peroksida lemak, dan hidrogen peroksida. Molekul bebas ini memiliki masa hidup yang singkat dan tidak stabil. Radikal bebas dapat merupakan reaksi berantai menjadi radikal bebas baru dan

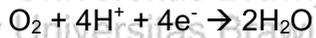
reaksi inilah yang dapat dihambat dengan antioksidan. Proses terbentuknya radikal bebas dibagi menjadi radikal bebas endogen yang terbentuk karena proses respirasi seluler dan radikal bebas eksogen yang terbentuk akibat detoksikasi, seperti detoksikasi obat-obatan, bahan kimia, dan lain-lain (Jaime Gosalvez, 2017).

Berikut pengelompokan radikal bebas

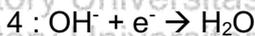
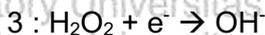
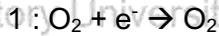
#### Gambar 2.6 Pengelompokan radikal bebas

Keterangan : Radikal bebas dibagi menjadi dua kelompok besar, yaitu 1. *Reactive Oxygen Species* (ROS) terdiri dari *O<sub>2</sub> centered radical* (anion superoksida ( $O_2^-$ ), radikal hidroksil (OH $\cdot$ ), radikal peroksil ( $ROO\cdot$ )) dan *O<sub>2</sub> centered non radical* (hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), oksigen tunggal ( $^1O_2$ )). 2. *Reactive Nitrit Species* terdiri dari nitrit oksida ( $NO\cdot$ ), nitrit dioksida ( $NO_2\cdot$ ), dan nitrit peroksida ( $ONOO\cdot$ ) (El-Bahr, 2013).

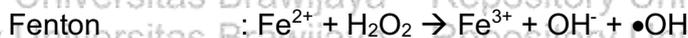
ROS merupakan molekul radikal yang dibentuk lewat reduksi oksigen yang tidak sempurna. ROS diproduksi oleh organisme sebagai produk metabolisme sel normal dan juga berasal dari lingkungan (polutan udara) (Esra *et al.*, 2012). Pada proses respirasi di mitokondria terjadi proses reduksi oksigen menjadi ROS sebesar 1-5% dari oksigen yang digunakan. 95% sisanya diubah menjadi  $H_2O$  melalui reaksi berikut:



Sedangkan 5%  $\text{O}_2$  diubah menjadi radikal bebas melalui empat reaksi berikut:



Hydrogen peroksida merupakan senyawa reaktif, tapi bukan termasuk oksidan kuat.  $\text{H}_2\text{O}_2$  dapat berubah menjadi radikal hidroksil melalui dua reaksi, yaitu :



$\text{O}_2^-$  juga dapat bereaksi dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$  dengan produk  $\text{OH}^-$ . Radikal hidroksil merupakan ROS yang paling berbahaya dan dapat merusak protein, lipid, karbohidrat, maupun DNA (Esra *et al.*, 2012).

## 2.6 Peroksidasi Lipid

Peroksidasi merupakan proses radikal autokatalisis yang terdiri dari tiga tahap, yaitu *initiation*, *propagation*, dan *termination*. Peroksidasi lipid disebabkan karena radikal bebas, terutama radikal hidroksil yang terbentuk dari reaksi fenton.

Pada tahap inisiasi, radikal bebas ditangkap oleh atom hidrogen dari *methylene carbon* dari asam lemak dan akan berubah menjadi lemak radikal. Lemak radikal ini akan mampu bereaksi dengan oksigen dan menjadi radikal peroksil yang mampu menghilangkan atom hidrogen. Radikal peroksil yang tidak stabil akan



mengakibatkan peroksidasi lipid dengan produksi akhir *malondialdehyde* (MDA), *hydroxynonenal*, dan *hexanal* (Niki, 2014).

## 2.7 MDA (*Malondialdehyde*)

### 2.7.1 Struktur MDA

*Malondialdehyde* (MDA) merupakan senyawa organik yang memiliki rumus kimia  $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ . MDA memiliki penamaan IUPA propanedial. Senyawa ini dikenal sebagai tanda untuk stress oksidatif (Nair, 2008).

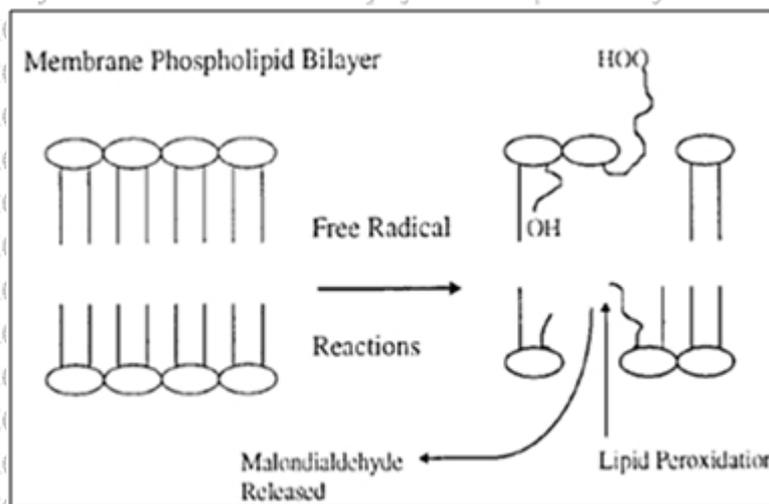
Gambar 2.7 Struktur kimia *Malondialdehyde* (MDA) (Nair, 2008)

### 2.7.2 Sintesis *Malondialdehyde* (MDA)

*Malondialdehyde* (MDA) merupakan metabolit hasil peroksidasi lipid oleh radikal bebas (Asni dkk, 2009: 596). MDA merupakan produk utama dari sintesis tromboksan A<sub>2</sub>, dimana COX-1 ataupun COX-2 memetabolisme asam arakidonat menjadi prostaglandin H<sub>2</sub> oleh platelet. Produk ini kemudian akan dimetabolisme oleh tromboksan sintase menjadi tromboksan A<sub>2</sub>, *12-hydroxyheptadecatrienoic acid*, dan *malondialdehyde* (MDA).

*Malondialdehyde* (MDA) dapat terbentuk apabila radikal bebas hidroksil seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) bereaksi dengan komponen asam lemak

dari membran sel sehingga terjadi reaksi berantai yang dikenal dengan peroksidasi lemak. Peroksidasi lemak tersebut akan menyebabkan terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa toksik dan menyebabkan kerusakan pada membran sel yang memproduksi MDA (Yunus, 2001: 11). MDA ini merupakan aldehida yang reaktif dan merupakan salah satu elektrofil reaktif yang menyebabkan stress toksik di dalam sel. Produksi dari aldehida ini dapat digunakan sebagai biomarker untuk mengukur tingkatan stress oksidatif suatu organisme (Del Rio, 2005). Lebih lanjut, McBride dan Kraemer (1999: 177) menggambarkan mekanisme pembentukan *Malondialdehyde* (MDA) secara sederhana sebagai berikut:



herikrisnawan.wordpress.com

Gambar 2.8 Proses Peroksidase Membran Lipid (Rahardjani, 2010)

*Malondialdehyde* (MDA) merupakan salah satu indikator yang paling sering digunakan sebagai indikasi peroksidasi lemak (Nielsen dkk, 1997: 1209).

*Malondialdehyde* (MDA) merupakan senyawa yang dapat menggambarkan aktivitas radikal bebas di dalam sel sehingga dijadikan sebagai salah satu petunjuk terjadinya stres oksidatif akibat radikal bebas (Asni dkk, 2009: 596). Rahardjani (2010: 83) memperkuat pernyataan tersebut dengan menyatakan bahwa mediator

*Malondialdehyde* (MDA) merupakan suatu produk akhir peroksidasi lemak yang digunakan sebagai biomarker biologis peroksidasi lemak serta dapat menggambarkan derajat stres oksidatif.

### 2.7.3 Pengukuran *Malondialdehyde* (MDA)

Pengukuran kadar *Malondialdehyde* (MDA) dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang eksitasi 515 nm dan emisi 553 nm (Wresdiyati dkk, 2004: 204). Lebih lanjut, Zainuri dan Wanandi (2012: 90) menyebutkan salah satu metode pengukuran kadar *Malondialdehyde* (MDA) sebagai berikut. Pengukuran MDA dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode uji asam tiobarbiturat (TBA) secara spektrofotometri. Sebanyak 400  $\mu$ l sampel direaksikan dengan 200  $\mu$ l *trichloroacetic acid* (TCA) 20% untuk deproteinasi. Kemudian divorteks dan sentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil dan ditambahkan 400  $\mu$ l TBA 0,67%. Selanjutnya sampel divorteks dan diinkubasi dalam pemanas air pada suhu 96°C, 10 menit kemudian angkat dan dinginkan pada suhu ruang. Kemudian baca serapan pada panjang gelombang 530 nm.

### 2.8 BDNF (*Brain Derived Neurotropic Factor*)

BDNF merupakan salah satu protein dalam tubuh manusia yang merupakan family dari faktor pertumbuhan yang berkaitan dengan faktor pertumbuhan saraf. BDNF berperan di beberapa neuron sistem saraf sentral dan sistem saraf perifer untuk mempertahankan sel neuron yang ada dan memicu pertumbuhan dan diferensiasi neuron baru dan sinap. BDNF banyak diekspresikan di retina, motor neuron, ginjal, saliva, dan prostat.

BDNF bekerja pada neuron sistem saraf pusat tertentu dan sistem saraf perifer dengan mendukung kelangsungan hidup dan memicu pertumbuhan serta



diferensiasi neuron dan sinaps. BDNF juga memiliki fungsi khusus di otak (hipokampus, korteks, basal otak depan), yaitu fungsi belajar, fungsi memori, dan fungsi luhur. BDNF juga memiliki peran dalam perkembangan otak melalui proses neurogenesis. Neurotropin merupakan protein yang membantu proses neurogenesis. BDNF adalah salah satu neurotropin yang paling aktif dan memiliki peran penting dalam perkembangan saraf normal (Mandel, 2009).

BDNF dibentuk di dalam retikulum endoplasma dan disekresikan melalui vesikel berinti padat. Setelah dibentuk, BDNF akan berikatan dengan *carboxypeptidase E* (CPE). Apabila ikatan ini gagal, pengemasan BDNF ke dalam vesikel berinti padat ini akan gagal (Fu, 2014).

### 2.8.1 Mekanisme Kerja BDNF

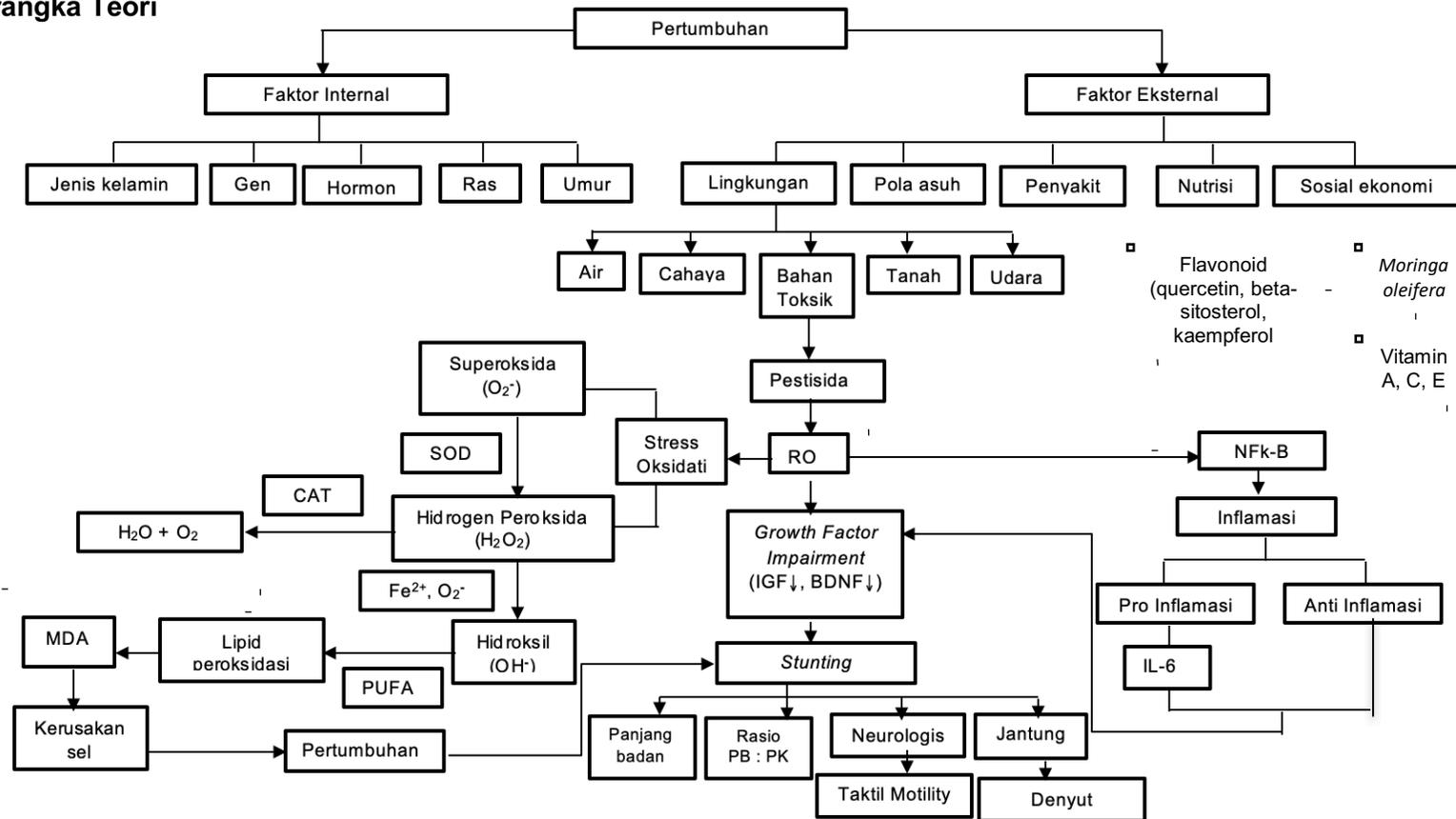
BDNF berikatan dengan setidaknya dua reseptor di permukaan sel. Kedua reseptor ini adalah TrkB (*Track B*) dan LNGFR (*low-affinity nerve growth factor receptor*, atau disebut juga p75). BDNF juga memodulasi aktivitas beberapa reseptor neurotransmitter, seperti *Alpha-7 nicotinic receptor* (Fernandes, 2008).

Gen yang mengkode BDNF terdapat pada kromosom 11. Secara structural, transkripsi BDNF dikendalikan oleh 8 promotr yang berbeda. Salah satunya adalah promotor IV yang aktivitasnya mengarah ke terjemahan mRNA yang mengandung ekson IV. Promotor IV ini membutuhkan kalsium dimana kalsium akan masuk ke dalam sel dan menghasilkan CREB. Terdapat beberapa mekanisme aktivitas neuronal yang dapat meningkatkan ekspresi spesifik BDNF ekson IV. Stimulus ini akan mengaktifasi reseptor NMDA yang akan memicu masuknya kalsium. Pada kaskade ini sinyal protein membutuhkan Erk, CaM KII / IV, PI3K, dan PLC. BDNF dapat berikatan dengan reseptor TrkB yang terdapat pada permukaan sel yang menyebabkan sinyal kaskade yang juga melibatkan Erk



**BAB 3**  
**KERANGKA TEORI, KONSEP, DAN HIPOTESIS**

**3.1 Kerangka Teori**



**Gambar 3.1 Kerangka Teori**



### 3.2 Penjelasan Kerangka Teori

Pertumbuhan dipengaruhi oleh dua faktor, yaitu faktor internal dan faktor eksternal. Faktor eksternal terdiri dari jenis kelamin, gen, hormone, ras, dan umur.

Sedangkan faktor internal terdiri dari lingkungan, pola asuh, penyakit, nutrisi, dan social ekonomi. Faktor lingkungan dalam kehidupan sehari-hari yang berpengaruh dalam kehidupan sehari-hari antara lain adalah zat kimia yang bersifat toksik. Zat kimia toksik yang banyak ditemukan salah satunya adalah pestisida. Rotenon merupakan salah satu bentuk pestisida yang mampu meningkatkan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Peningkatan ROS akan menyebabkan stres oksidatif yang memicu terbentuknya hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan superoksida ( $O_2^-$ ).

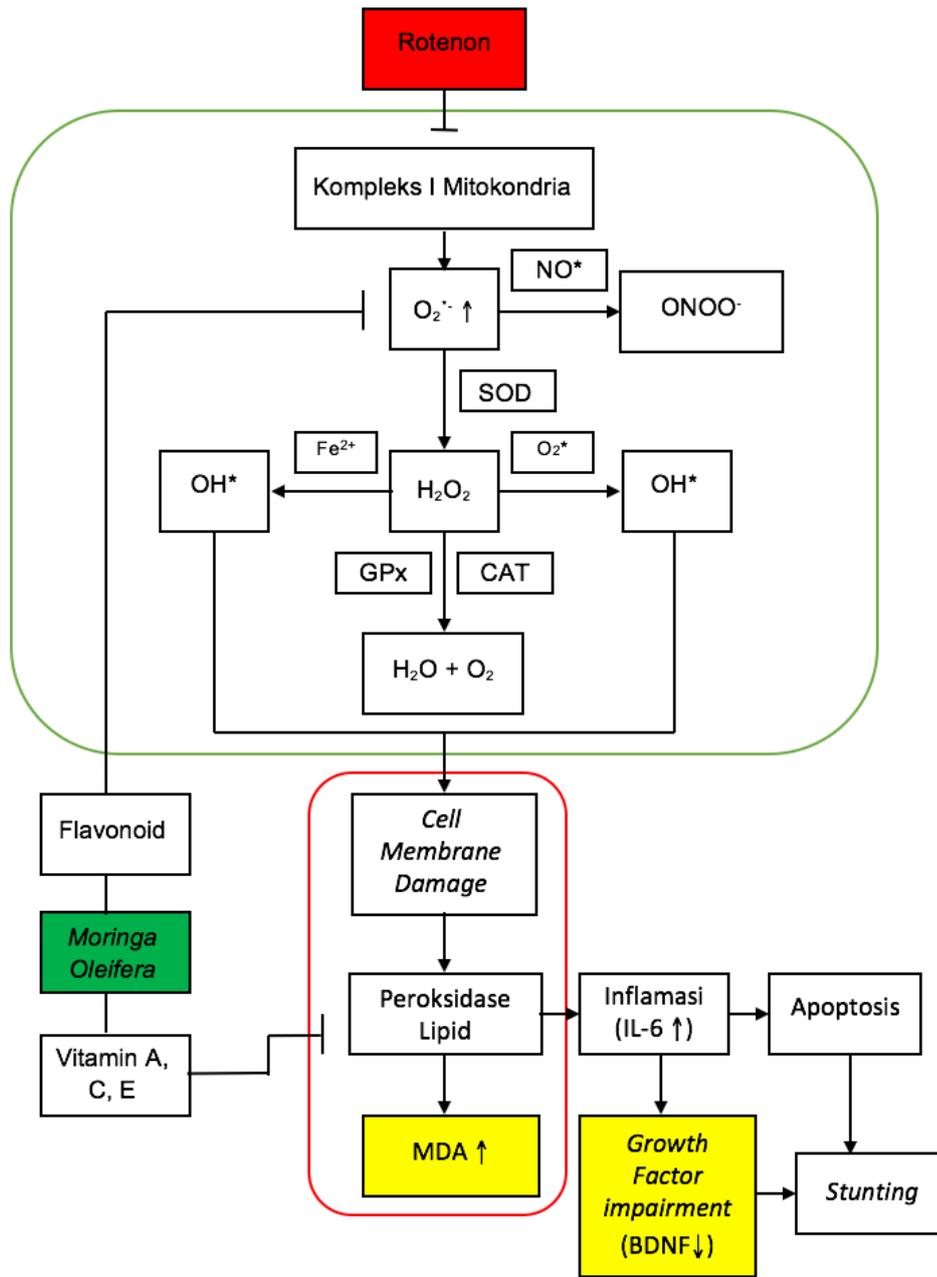
Superoksida oleh SOD akan diubah menjadi hidrogen peroksida. Melalui reaksi fenton dan reaksi dengan superoksida, hidrogen peroksida diubah menjadi senyawa hidroksil ( $OH^\cdot$ ). Terbentuknya senyawa hidroksil akan memicu terjadinya peroksidasi lipid dengan hasil akhir MDA. Meningkatnya kadar MDA akan mengakibatkan kerusakan sel dan mengganggu pertumbuhan suatu individu. Keadaan ini berujung pada terjadinya *stunting*.

Kondisi ROS yang meningkat juga dapat secara langsung menghambat faktor pertumbuhan seperti IGF dan BDNF. Turunnya faktor pertumbuhan akan mengakibatkan *stunting*. ROS juga dapat memicu terjadinya inflamasi. Inflamasi yang terjadi secara terus menerus akan meningkatkan kadar IL-6. Kadar IL-6 yang meningkat akan menghambat faktor pertumbuhan sehingga terjadi *stunting*.

*Moringa oleifera* mengandung antioksidan golongan flavonoid seperti quercetin, beta-sitosterol, dan kaempferol yang mampu menghambat pembentukan ROS. Vitamin A, C, dan E juga terkandung dalam *Moringa oleifera* yang mampu menghambat proses terjadinya lipid peroksidasi.



### 3.3 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep



### 3.4 Penjelasan Kerangka Konsep

Dalam penelitian ini rotenon digunakan sebagai paparan untuk membuat model *stunting*. Dimana rotenon akan menghambat kompleks 1 mitokondria yang akan menghambat pembentukan ATP sehingga  $O_2^-$  akan terbentuk (Adam-Vizi &

Chinopoulos, 2006). Selanjutnya  $O_2^-$  sebagian akan diubah menjadi  $H_2O_2$  oleh SOD. Namun apabila  $O_2^-$  bereaksi dengan  $NO^*$  akan berubah menjadi  $ONOO^-$ . Dalam kondisi sel yang optimal  $H_2O_2$  akan diubah oleh CAT dan GPx menjadi air dan oksigen. Namun apabila  $H_2O_2$  bereaksi dengan  $O_2^-$  akan membentuk radikal hidroksil yang merupakan radikal bebas paling berpotensi menyerang membran sel. Selain itu, radikal hidroksil juga dapat terbentuk dari reaksi fenton, dimana  $H_2O_2$  bereaksi dengan  $Fe^{2+}$  dan membentuk  $OH^*$  (Jaime Gosalvez, 2017).

Kondisi terlalu banyaknya  $O_2^-$  akan cenderung membentuk banyak radikal hidroksil. Senyawa hidroksil yang berlebihan sangat berpotensi untuk terjadi *cell membrane damage*. Kerusakan membran akan diteruskan dengan reaksi peroksidasi lemak dengan produksi akhir MDA (Niki, 2014). Reaksi peroksidasi lemak yang terus terjadi akan menyebabkan terjadinya inflamasi kronis dan berujung pada apoptosis sel. Salah satu tanda inflamasi adalah peningkatan kadar IL-6. Dari penelitian sebelumnya diketahui bahwa peningkatan IL-6 dapat



menurunkan kadar dari BDNF. Apoptosis sel ditambah dengan BDNF yang menurun akan memicu terjadinya *stunting* (Savage, 2013; Black et al., 2013).

Daun kelor (*Moringa Oleifera*) mengandung bahan-bahan antioksidan yang berperan menghambat kerja ROS (Bose et al., 2007). Bahan yang paling berperan dalam menghambat ROS adalah flavonoid, vitamin A, vitamin C, dan vitamin E. Kandungan flavonoid daun kelor ini menghambat ROS yang telah diproduksi oleh mitokondria (Coppin et al., 2013). Sedangkan vitamin A, C, dan E diketahui berfungsi untuk menstabilkan senyawa radikal lemak peroksil (Niki, 2014).

Pemberian daun kelor akan menghambat pembentukan  $O_2^+$  sehingga radikal hidroksil juga akan menurun. Selain itu, vitamin A, C, dan E yang terkandung dalam daun kelor juga akan menghambat terjadinya peroksidasi lipid dengan membuat senyawa radikal lemak peroksil menjadi stabil. Sehingga pemberian daun kelor pada larva *zebrafish* model *stunting* akan menurunkan ekspresi MDA dan meningkatkan ekspresi BDNF.

### 3.5 Hipotesis

1. Pemberian ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) berpengaruh terhadap kadar *malondialdehyde* dan *Brain Derived Neurotrophic Factor* pada larva *zebrafish* (*Danio rerio*) *stunting*.
2. Pemberian ekstrak etanol daun kelor dapat mencegah *stunting* pada larva *zebrafish*.
3. Pemberian daun kelor dapat menurunkan kadar MDA pada larva *zebrafish* *stunting*.
4. Pemberian daun kelor dapat meningkatkan kadar BDNF pada larva *zebrafish* *stunting*.



5. Semakin besar kadar MDA, maka panjang badan larva *zebrafish* semakin kecil.
6. Semakin besar kadar BDNF, maka panjang badan larva *zebrafish* semakin besar.
7. Kadar MDA memiliki korelasi yang lebih kuat terhadap panjang badan larva *zebrafish* dibandingkan kadar BDNF.



## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *true experimental, Post Test Only, Control Group Design*. Pada penelitian ini model hewan coba yang digunakan adalah embrio ikan zebra yang dikelompokkan secara acak.

Tabel 4.1 Kelompok perlakuan

Kelompok	Macam Perlakuan
Kontrol negatif (C)	Normal
Kontrol positif (R)	Dipapar rotenon 12,5 ppb
Perlakuan 1 (RMO 1)	Dipapar rotenon 12,5 ppb + ekstrak etanol daun kelor 0,56 ug/ml
Perlakuan 2 (RMO 2)	Dipapar rotenon 12,5 ppb + ekstrak etanol daun kelor 1,12 ug/ml
Perlakuan 3 (RMO 3)	Dipapar rotenon 12,5 ppb + ekstrak etanol daun kelor 2,24 ug/ml
Perlakuan 4 (MO 1)	Dipapar ekstrak etanol daun kelor 0,56 ug/ml
Perlakuan 5 (MO 2)	Dipapar ekstrak etanol daun kelor 1,12 ug/ml
Perlakuan 6 (MO 3)	Dipapar ekstrak etanol daun kelor 2,24 ug/ml

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah embrio *zebrafish* berusia 0-2 hpf (*hour post fertilization*) yang didapat dari hasil perkawinan indukan *zebrafish* jenis *wildtype*, di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah teruji dan tersertifikasi di Laboratorium Hidrologi Fakultas Ilmu Perikanan (Khotimah *et al.*, 2015). *Zebrafish* yang digunakan memiliki ciri tubuhnya terdapat strip



horizontal berwarna biru kehitaman dengan dasar berwarna perak. Zebrafish yang dipelihara untuk dibiakkan berusia 4 bulan.

#### 4.2.2 Sampel Penelitian

Pada penelitian ini peneliti menggunakan embrio *zebrafish* sebanyak 20-30 embrio. Jumlah ini berdasarkan penelitian sebelumnya yang sudah dilakukan (Hallare *et al.*, 2016). Terdapat 8 kelompok perlakuan dalam penelitian ini, dengan masing-masing kelompok berisi 30 embrio *zebrafish*. Penelitian ini dilakukan 2 kali pengulangan, maka total embrio ikan zebra yang diperlukan berjumlah 480 embrio.

#### 4.2.3 Kriteria Sampel

##### 4.2.3.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah embrio *zebrafish* yang berusia 0-2 hpf (*hour post fertilization*), *yolk sac* berwarna putih bening, dan tidak berjamur. Tanda embrio yang berjamur adalah Nampak garis putih keruh pada *yolk sac*.

##### 4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi yaitu embrio mati (berwarna putih), tidak terbuahi, 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 Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

##### 4.3.2 Waktu Penelitian



Penelitian berlangsung mulai bulan Oktober 2018 sampai Desember 2018.

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel Bebas

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

##### 4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah panjang badan larva *zebrafish*.

##### 4.4.3 Variabel Antara

Variabel antara pada penelitian ini adalah kadar MDA dan kadar BDFN.

#### 4.5 Definisi Operasional

1. *Zebrafish* yang digunakan dalam penelitian ini adalah embrio *zebrafish* dan larva *zebrafish* sehat yang diperoleh dari hasil fertilisasi induk jantan dan betina *wildtype* yang telah diidentifikasi di Laboratorium Kelautan FPIK-UB. Embrio *zebrafish* adalah hasil fertilisasi berumur 0 – 3 dpf (*day post fertilization*) dengan kriteria berbentuk bulat, transparan, bening, tidak berjamur (berserabut putih), dan tidak berwarna putih (embrio mati). Larva *zebrafish* adalah hasil fertilisasi mulai umur 3 dpf (waktu *hatching*). Larva *zebrafish* akan diamati bentuk tubuh, panjang tubuh, pergerakan, dan pembesaran jantung. Larva *zebrafish* diamati sampai 9 dpf.

2. Rotenon yang digunakan diperoleh dari *Sigma* (R8875) dengan kemurnian  $\geq 95\%$  dalam bentuk serbuk yang dilarutkan dengan *Dimethyl sulfoxide* (DMSO).

Konsentrasi rotenon yang digunakan berdasarkan studi eksplorasi adalah 12,5 ppb (Zakiah, 2017).

3. Daun kelor yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun yang berasal dari *Materia Medica Batu* yang telah tersertifikasi dalam bentuk serbuk simplisia kering. Ekstrak *Moringa oleifera* diperoleh dengan menggunakan teknik maserasi (etanol). Dari hasil maserasi dibuat larutan *stock*. Kemudian larutan *stock*



dibagi menjadi 3 macam dosis, yaitu 0,56  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,12  $\mu\text{g/mL}$ ; dan 2,24  $\mu\text{g/mL}$  (Bais *et al.*, 2014 & Siswanto, 2017).

4. Panjang badan larva ikan zebra diukur menggunakan *software image raster* 3.0 yang dikalibrasi dalam satuan millimeter (mm) terlebih dahulu. Larva ikan zebra difoto dalam kondisi badan lurus terlebih dahulu menggunakan mikroskop stereo (Olympus SZ61) yang dihubungkan dengan *software optilab*. Lalu pengukuran panjang badan larva ikan zebra dimulai dari moncong mulut sampai ujung ekor (Spence *et al.*, 2008).

Panjang badan diukur pada 3 hpf, 6 hpf, dan 9 hpf.

5. *Stunting* disebut sebagai kondisi gagal tumbuh secara linear berdasarkan standar WHO dengan mean PB/U dan atau TB/U kurang dari -2 SD. proses Confidence coefficient 95% dan menetap hingga usia 9 dpf (WHO, 2010).

6. Untuk mengukur stres oksidatif, pada penelitian ini menggunakan kadar MDA dan BDNF. Nomor katalog ELISA yang digunakan untuk MDA adalah STA-869. Nomor katalog ELISA yang digunakan untuk BDNF adalah CYT-306. Pengukuran MDA dan BDNF dilakukan dengan cara ELISA sebagai berikut : (1)Memasukkan diluen uji RD1-41 sebanyak 50  $\mu\text{L}$  ke dalam semua sumur. (2)Memasukkan 50  $\mu\text{L}$  standar, control, dan sampel ke dalam masing-masing sumur dan mencampurnya dengan halus selama 1 menit lalu menutup dengan perekat dan diinkubasi selama 2 jam dalam suhu ruangan. (3)Mengaspirasi tiap sumur dan mencuci selama 5 kali. Pencucian dilakukan dengan 400  $\mu\text{L}$  *wash Buffer*. Setelah dicuci sisa *wash buffer* dibuang dan dikeringkan dengan kertas pengering. (4)Memasukkan 100  $\mu\text{L}$  *Fish MDA/BDNF Conjugate* ke dalam tiap sumur dan menutupnya dengan perekat. Kemudian menginkubasinya selama 2 jam pada suhu ruangan dan mencuci ulang sebanyak 5 kali. (5)Menambahkan *substrate solution* sebanyak 100  $\mu\text{L}$  ke dalam tiap sumur dan menginkubasinya selama 30 menit pada suhu ruangan. Langkah ini tidak boleh terpapar sinar. (6)Menambahkan *stop solution* sebanyak 100  $\mu\text{L}$  ke dalam tiap sumur.



(7) Setelah 30 menit, melakukan pembacaan pada panjang gelombang 450 nm dengan ELISA reader untuk menentukan *optical density* (OD value).

#### 4.6 Instrumen Penelitian

##### 4.6.1 Pemeliharaan *Zebrafish*

Alat dan bahan: aquarium yang dapat menampung + 60 liter, terdapat alat pengukur konduktivitas, PH meter, penyaring air, saringan ikan, trap 2 buah yang dibuat dari wadah plastik ukuran 25x19x5 cm dan penutup diganti dengan saringan kawat kecil agar telur dapat masuk ke dalam wadah trap, lampu, cawan petri, pakan ikan (tetrabits dan artemia), anti chlorin, air filtrasi, gelas ukur, pipet plastik, spuit 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  $4^{\circ}\text{C}$ , mikroskop, *software Optilab, image raster*.

##### 4.6.2 Pembuatan Larutan Rotenon

Alat dan bahan: labu ukur, timbangan analitik, mikropipet, endorff, tip (biru, kuning, putih), serbuk rotenon (nomor katalog : 557368-1GM), pelarut DMSO (*Dimethyl sulfoxida*).

##### 4.6.3 Pembuatan Medium Embrionik

Alat: timbangan digital (Mettler Toledo), kertas saring, sendok pengaduk, botol kaca 500 ml.

Bahan: CaCl 0,25 gr, KCl 0,15 gr, NaCl 5 gr, MgSO<sub>4</sub> 0,815 gr dilarutkan dalam 200 ml air filtrasi.

##### 4.6.4 Pembuatan Ekstrak Kelor

a. Alat: rotary evaporator, gelas ukur, pipet, erlenmeyer, corong buncher, kertas saring, tabung plastik, aluminium foil, waterbath, water pump, selang water pump, vacuum pump, timbangan analitik.

b. Bahan: pelarut etanol 98%, aquadest.



## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Pemeliharaan *Zebrafish*

*Zebrafish* dewasa berusia 4 bulan terdiri dari indukan betina dan jantan dengan rasio jumlah 2:1. Pembersihan aquarium dilakukan minimal 1 kali seminggu. Setelah dikuras, air diberi anti klorin dan ditunggu selama 30 menit sebelum ikan dimasukkan aquarium kembali. Penyaring air diganti 3 hari sekali. Pemberian makanan dengan tetramin 3 kali sehari (Khotimah, 2015).

Untuk mendapatkan telur hasil fertilisasi, trap dipasang di dasar aquarium. Kemudian aquarium ditutup menggunakan kardus untuk memastikan tidak ada cahaya yang masuk (siklus gelap) selama 10 jam. Fase gelap dimulai pada pukul 20.30 – 06.30 WIB. Sedangkan siklus gelap selama 14 jam. Pada pukul 06.30 lampu dinyalakan selama 30 menit untuk memberikan kesempatan untuk fertilisasi sebelum trap diangkat. Kemudian trap diangkat dan telur dipanen berdasarkan kelompok yang sudah ditetapkan.

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. 72 hpf sampai 3 dpf masing-masing kelompok perlakuan diberikan perlakuan sebagai berikut:

1. Kelompok 1: Medium embrionik
2. Kelompok 2: Rotenon 12,5 ppb + medium embrionik
3. Kelompok 3: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak etanol daun kelor 0,56 ug/ml + medium embrionik
4. Kelompok 4: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak etanol daun kelor 1,12 ug/ml + medium embrionik
5. Kelompok 5: Rotenon 12,5 ppb + ekstrak etanol daun kelor 2,24 ug/ml + medium embrionik



6. Kelompok 6: ekstrak etanol daun kelor 0,56 ug/ml + medium embrionik
7. Kelompok 7: ekstrak etanol daun kelor 1,12 ug/ml + medium embrionik
8. Kelompok 8: ekstrak etanol daun kelor 2,24 ug/ml + medium embrionik

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

#### 4.7.2 Pembuatan Larutan Rotenon (Sigma R8875)

Rotenon didapatkan dari *Sigma* (R8875) dengan spesifikasi sebagai berikut :

Formula molekul :  $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_6$

Berat molekul : 394,4

CAS number : 83-79-4

Titik leleh :  $165\text{-}166^{\circ}\text{C}$

*Extinction Coefficient* :  $E^{\text{mM}} = 19,2$  (294 nm, ethanol)

*Specific Rotation* :  $-120^{\circ}$

Cara membuat larutan rotenon yaitu dengan serbuk rotenon  $2 \times 10^7$  ug/ml dilarutkan dalam pelarut DMSO 10%, kemudian diencerkan hingga mencapai konsentrasi  $2 \times 10^3$  ug/ml dengan menggunakan rumus:

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

Keterangan:

V1: volume pengencer/air filtrasi

V2: volume stok rotenon

M1: konsentrasi stok rotenon

M2: dosis yang diminta

Stok rotenon yang telah dibuat dimasukkan dalam ependorf, 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:  $2 \times 10^3$  ug/ml

M2: 12,5 ug/ml

V2: 15 ml (medium embrionik)

$V1 \times 2.10^3 = 15 \times 12,5$

$V1 = 93,75.10^{-3}$  ml = 93,75 uL (dibagi dalam 3 sumuran)

#### 4.7.3 Pembuatan Medium Embrionik

Langkah-langkah pembuatan medium embrionik sebagai berikut:

- CaCl 0,25 gr, KCl 0,15 gr, NaCl 5 gr, dan MgSO<sub>4</sub> 0,815 gr ditimbang menggunakan timbangan digital dan dimasukkan tabung reaksi yang berisi 500 ml aquadest (Khotimah *et al.*, 2018).
- Diaduk sampai bahan tercampur rata, masukkan dalam botol, diberi label (tanggal pembuatan), dan disimpan di lemari es sebagai stok.
- 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 Kelor (*Moringa oleifera*)

- Simplisia kelor yang diperoleh dari Materia Medika Batu ditimbang sebanyak 100 gram dan dimasukkan dalam gelas erlenmeyer.
- Simplisia dimaserasi dengan pelarut ethanol 98% sebanyak 900 ml sambil dikocok sampai tercampur dan didiamkan selama 24 jam sampai terdapat endapan.
- Diambil lapisan atas. Proses perendaman dilakukan sebanyak 3 kali.
- Simplisia yang telah terendam, disaring dengan kertas saring menggunakan corong buncer.



e. Filtrat dimasukkan ke dalam labu evaporasi 1 L, labu evaporasi disampungkan ke evaporator, waterbath diisi dengan air sampai penuh, semua alat evaporasi dirangkai dan disambungkan dengan aliran listrik. Waterbath dipanaskan sampai suhu 70°C dibiarkan selama  $\pm 1,5$  s/d 2 jam agar larutan etanol terpisah dengan zat aktif yang terdapat dalam labu penampungan. Hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol plastik, ditimbang dan disimpan dalam freezer (Selvi *et al.*, 2012).

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

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

Penentuan dosis daun kelor yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan penelitian Bais *et al* (2014) yang menggunakan daun kelor pada hewan coba tikus.

Konversi dosis dilakukan dengan membandingkan rerata berat badan tikus dan rerata berat *zebrafish* (Siswanto, 2017).

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

$$\frac{150 \text{ (gram)}}{200 \text{ (mg/kgBB)}} = \frac{0,42 \text{ (gram)}}{x \text{ (mg/kgBB)}}$$

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

maka dosis yang didapatkan untuk *zebrafish* :

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

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

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



#### 4.7.5 Pemberian Paparan Rotenon dan Kelor, Penggantian Medium dan Pemberian Pakan Larva

Embrio *zebrafish* yang telah dikelompokkan menjadi 8 kelompok diberikan paparan rotenon konsentrasi 12,5 ppb, rotenon dan kelor dosis 0,56 ug/ml, 1,12 ug/ml, 2,24 ug/ml sebanyak 3 kali 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 *artemia* pada usia 6 dpf untuk memenuhi kebutuhan nutrisi dan mencegah dari kematian (Wilson, 2012). *Artemia* diberikan dengan cara dihaluskan terlebih dahulu dan ditambahkan dengan air filtrasi kemudian diteteskan ke dalam masing-masing well sebanyak 5 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 berisi 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 BDNF

Pada larva *zebrafish* yang sudah mencapai usia 6 dpf dilakukan euthanasia dengan merendam larva dalam *chamber* berisi air dan es dengan perbandingan air:es 5:1 selama 10 menit (Strykowski dan Schech, 2015). Setelah itu dipindahkan dalam cawan petri yang berisi 500  $\mu\text{L}$  RIPA buffer dan dihomogenkan dengan *plunger* serta ditambahkan dengan 250  $\mu\text{L}$  RIPA *buffer*. Kemudian hasil suspense ini dimasukkan ke dalam 2 mL *microtube* dan disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 3000 rpm dalam waktu 20 menit. Supernatan dari hasil sentrifugasi ini dianalisa dengan metode ELISA untuk mengukur kadar MDA dan BDNF. Berikut prosedur assay ELISA :

1. Memasukkan diluen uji RD1-41 sebanyak 50  $\mu\text{L}$  ke dalam semua sumur.
2. Memasukkan 50  $\mu\text{L}$  standar, control, dan sampel ke dalam masing-masing sumur dan mencampurnya dengan halus selama 1 menit lalu menutup dengan perekat dan diinkubasi selama 2 jam dalam suhu ruangan.
3. Mengaspirasi tiap sumur dan mencuci selama 5 kali. Pencucian dilakukan dengan 400  $\mu\text{L}$  *wash Buffer*. Setelah dicuci sisa *wash buffer* dibuang dan dikeringkan dengan kertas pengering.
4. Memasukkan 100  $\mu\text{L}$  *Fish MDA/BDNF Conjugate* ke dalam tiap sumur dan menutupnya dengan perekat. Kemudian menginkubasinya selama 2 jam pada suhu ruangan dan mencuci ulang sebanyak 5 kali.
5. Menambahkan *substrate solution* sebanyak 100  $\mu\text{L}$  ke dalam tiap sumur dan menginkubasinya selama 30 menit pada suhu ruangan. Langkah ini tidak boleh terpapar sinar.



Repository Universitas Brawijaya

6. Menambahkan *stop solution* sebanyak 100  $\mu\text{L}$  ke dalam diap sumur.

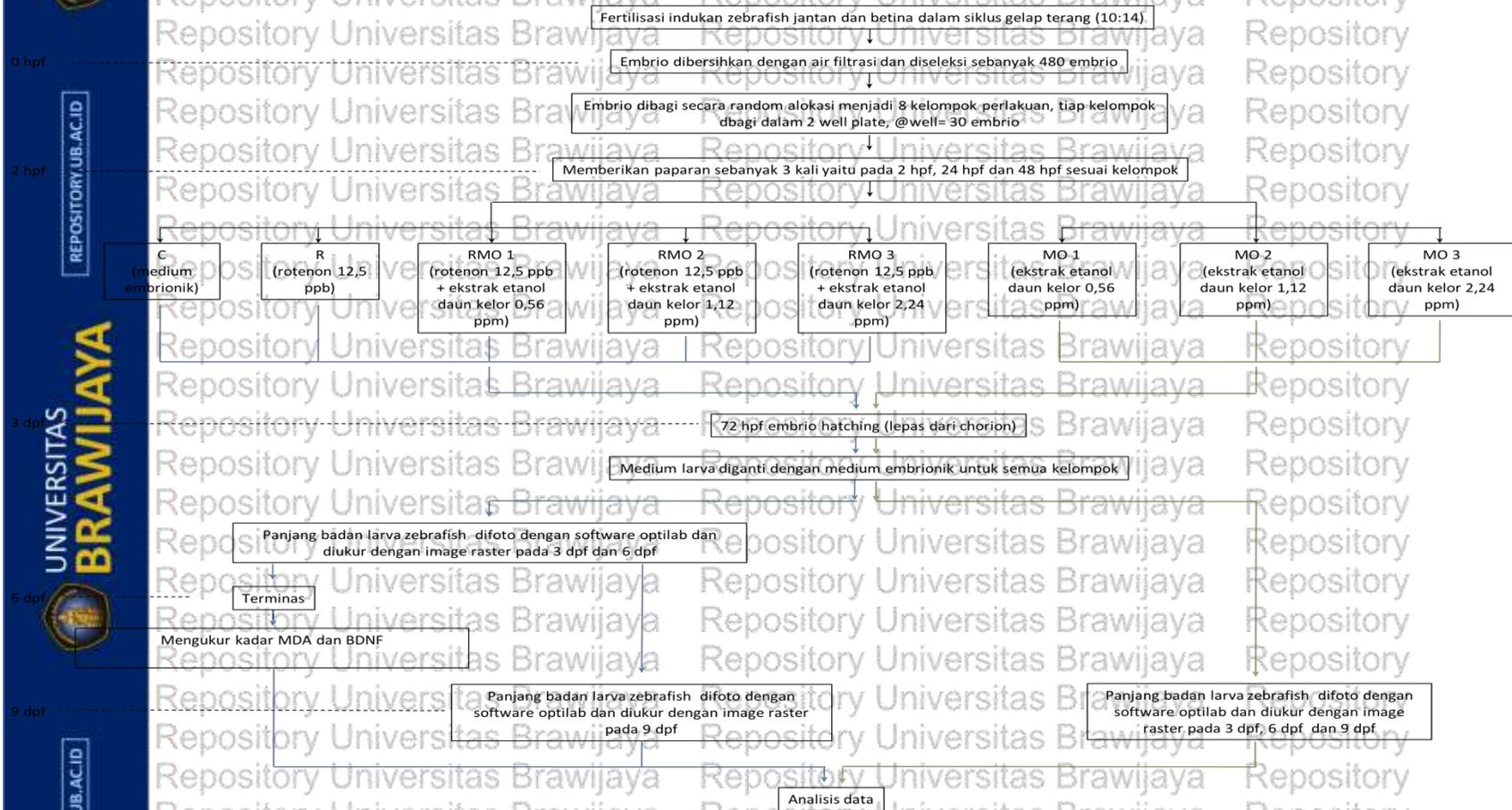
7. Setelah 30 menit, melakukan pembacaan pada panjang gelombang 450 nm dengan ELISA reader untuk menentukan *optical density* (*OD value*)

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository

#### 4.7.8 Bagan Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian



Tabel 4.2 Tabel Panjang Badan pada 3 dpf, 6 dpf, dan 9 dpf

Usia	3 dpf	6 dpf	9 dpf
Kelompok	Panjang Badan (mm)	Panjang Badan (mm)	Panjang Badan (mm)
C			
R			
RMO1			
RMO2			
RMO3			
MO1			
MO2			
MO3			

Tabel 4.3 Tabel Kadar MDA pada 6 dpf

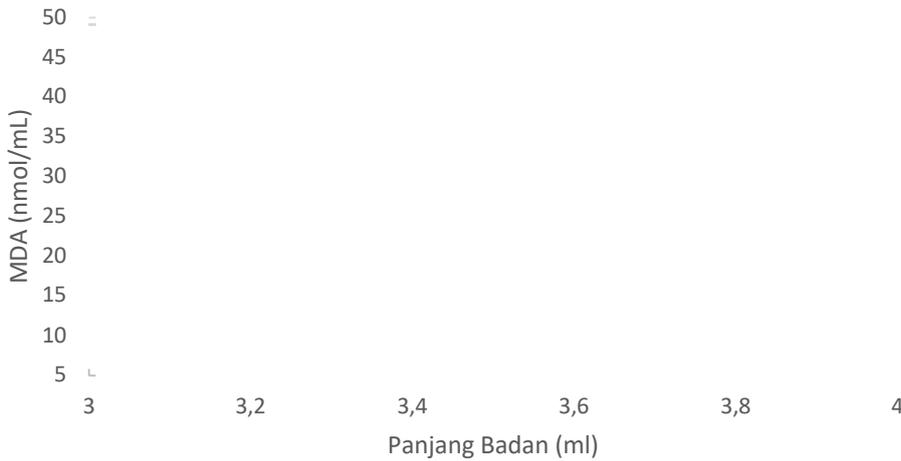
Kelompok	MDA (nmol/mL)
C	
R	
RMO1	
RMO2	
RMO3	
MO1	
MO2	
MO3	



Tabel 4.4 Tabel Kadar BDNF pada 6 dpf

Kelompok	BDNF (nmol/mL)
C	
R	
RMO1	
RMO2	
RMO3	
MO1	
MO2	
MO3	

Grafik Kadar MDA terhadap Panjang Badan



Gambar 4.2 Grafik Kadar MDA terhadap Panjang Badan



Grafik Kadar BDNF terhadap Panjang Badan



Gambar 4.3 Grafik Kadar BDNF terhadap Panjang Badan

#### 4.8 Uji Analisis Data

Data hasil penelitian disajikan dalam  $\text{mean} \pm \text{SD}$ . 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  $\alpha=0,05$ . Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara panjang badan, MDA, dan BDNF.



**BAB 5**

**HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**

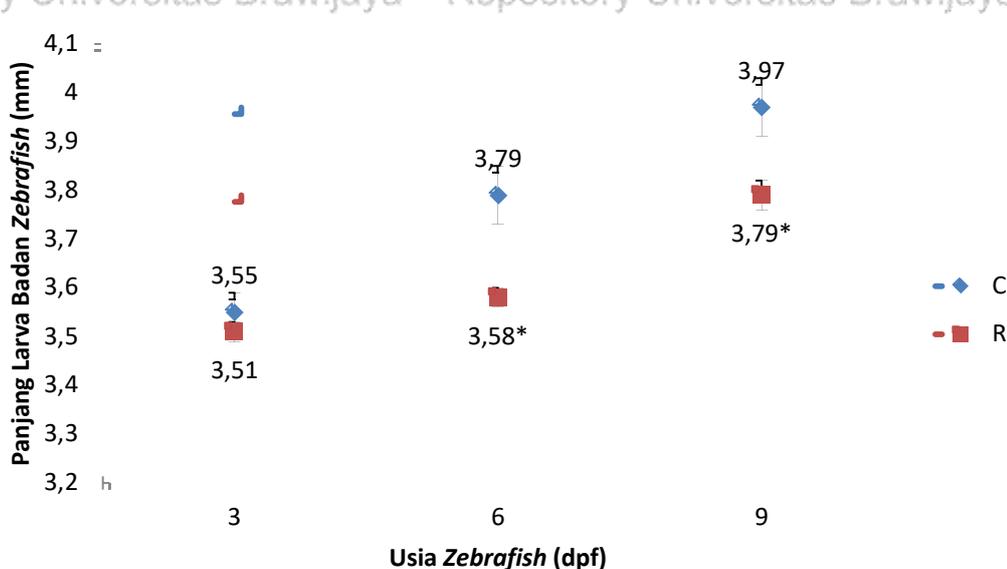
Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober – Desember 2018 dengan tujuan membuktikan bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat mencegah kejadian *stunting* pada larva zebrafish (*Danio rerio*) dengan induksi rotenon melalui kadar MDA dan BDNF. Berikut hasil penelitian yang telah dilakukan :

**5.1 Pengaruh Paparan Rotenon [12,5 ppb] pada Usia 0-3 dpf terhadap Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish pada Usia 3, 6, dan 9 dpf (day post fertilization)**

**Tabel 5.1 Rerata panjang badan larva zebrafish pada 3 dpf, 6 dpf, 9 dpf.**

<b>Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish (mm ± SD)</b>			
	<b>3 dpf</b>	<b>6 dpf</b>	<b>9 dpf</b>
<b>C</b>	3,55 ± 0,04	3,79 ± 0,06	3,97 ± 0,36
<b>R</b>	3,51 ± 0,02	3,58 ± 0,02	3,79 ± 0,03
<b>p</b>	0,214	0,004*	0,04*

Keterangan :C: kontrol, R: Rotenon



**Gambar 5.1 Grafik rerata panjang badan larva zebrafish pada 3dpf, 6dpf, dan 9dpf.**



Keterangan : C: kontrol, R: Rotenon, \*:  $p < 0,05$

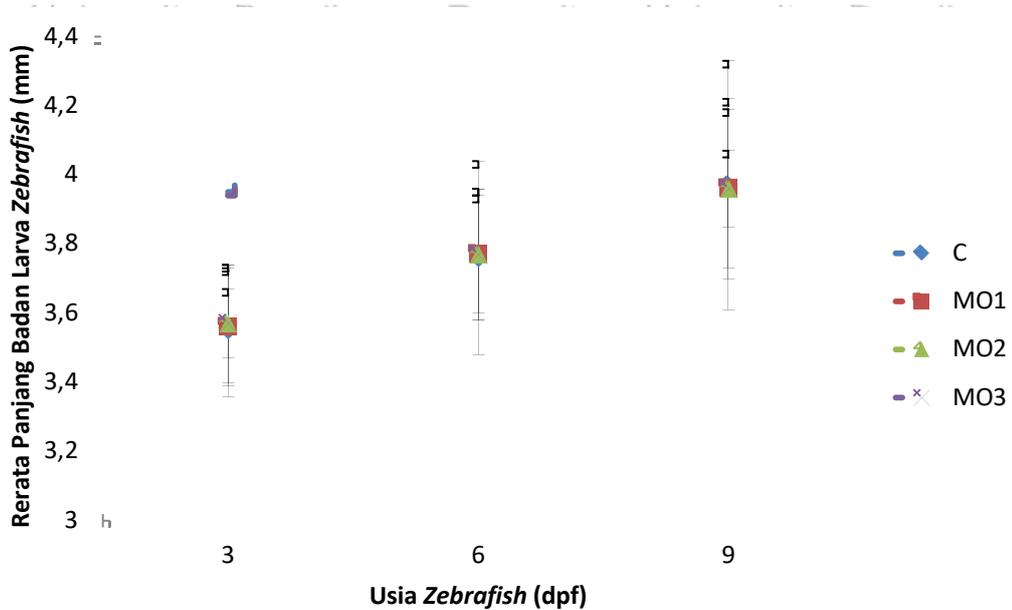
Tabel 5.1 dan gambar 5.1 dan menunjukkan perbandingan antara pertumbuhan panjang badan kelompok kontrol dan kelompok rotenon. Pada usia 3 dpf ukuran panjang kelompok rotenon terdapat perbedaan yang tidak signifikan ( $p=0,214$ ). Perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan rotenone terlihat pada usia zebrafish 6 dpf ( $p < 0,05$ ) dan 9 dpf ( $p < 0,05$ )

**5.2 Pengaruh Paparan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleivera*) pada Usia 0-3 dpf terhadap Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish usia 3, 6, dan 9 dpf (day post fertilization)**

**Tabel 5.2 Rerata panjang badan larva zebrafish pada 3 dpf, 6 dpf, dan 9 dpf.**

	Rerata Panjang Badan Larva Zebrafish (mm ± SD)		
	3 dpf	6 dpf	9 dpf
C	3.55 ± 0.19	3.76 ± 0.28	3.97 ± 0.36
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	0,968	0,999	0,941

Keterangan : C: kontrol, MO1: *M.oleifera* 0,56 µg/mL, MO2: *M.oleifera* 1,12 µg/mL, MO3: *M.oleifera* 2,24 µg/mL



**Gambar 5.2 Rerata panjang badan larva zebrafish pada 3 dpf, 6 dpf, dan 9 dpf.**



Keterangan : C: kontrol, MO1: *M.oleifera* 0,56 µg/mL, MO2:*M.oleifera* 1,12 µg/mL, MO3: *M.oleifera* 2,24 µg/mL

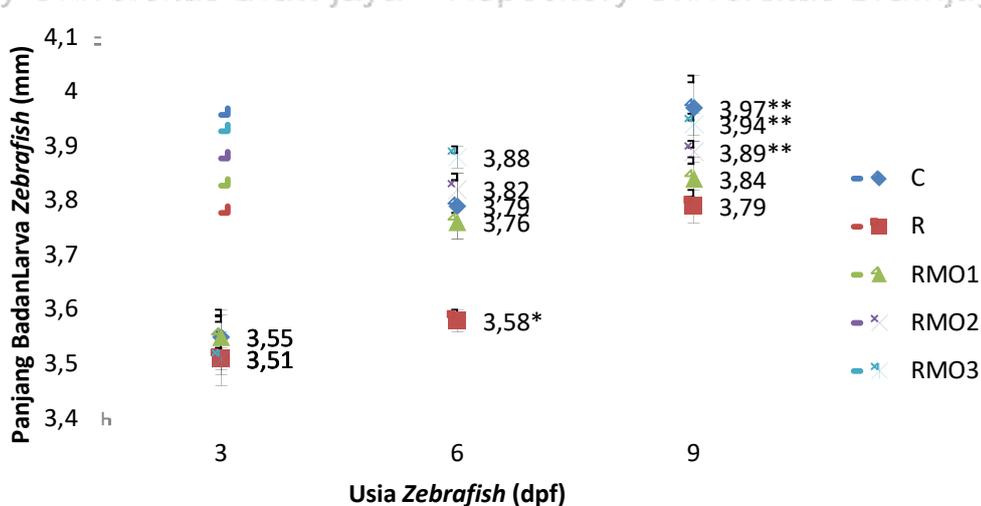
Tabel 5.2 dan grafik 5.2 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan rerata panjang larva *zebrafish* yang signifikan antara kelompok kelompok kontrol dengan kelompok moringa 0,56, moringa 1,12, dan moringa 2,24 µg/mL pada usia 3, 6 maupun 9 dpf ( $p > 0,05$ ).

**5.3 Pengaruh Paparan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleivera*) dan Rotenon [12,5 ppb] pada Usia 0-3 dpf terhadap Rerata Panjang Badan Larva *Zebrafish* Model *Stunting* usia 3, 6, dan 9 dpf (*day post fertilization*)**

**Tabel 5.3. Rerata panjang badan larva *zebrafish* pada 3 dpf, 6 dpf, dan 9 dpf.**

	Rerata Panjang Badan <i>Zebrafish</i> (mm ± SD)		
	3 dpf	6 dpf	9 dpf
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	0,90	< 0,001*	0,021*

Keterangan : C: kontrol, R: rotenon, RMO1: Rotenon dan *M.oleifera* 0,56 µg/mL, RMO2: Rotenon dan *M.oleifera* 1,12 µg/mL, RMO3: Rotenon dan *M.oleifera* 2,24 µg/mL



**Gambar 5.3. Rerata panjang badan larva *zebrafish* usia 3, 6 dan 9 dpf.**

Keterangan : C: kontrol, R: rotenon, RMO1: Rotenon dan *M.oleifera* 0,56 µg/mL, RMO2: Rotenon dan *M.oleifera* 1,12 µg/mL, RMO3: Rotenon dan *M.oleifera* 2,24 µg/mL



\*:  $p < 0,05$  dibandingkan dengan kelompok C, RMO1, RMO2, dan RMO3

\*\* :  $p < 0,05$  dibandingkan dengan kelompok R

Tabel dan grafik 5.3 menunjukkan bahwa pada 3 dpf tidak terdapat pada 3 dpf tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok ( $p > 0,05$ ). Sedangkan pada 6 dan 9 dpf terdapat perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ). Kelompok Rotenon menunjukkan perbedaan bermakna jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok yang diberi ekstrak etanol daun kelor. Hal serupa juga didapatkan pada 9 dpf, kecuali antar R dengan RMO1 ( $p = 0,596$ ).

#### 5.4 Pengaruh Paparan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleivera*) dan Rotenon [12,5 ppb] pada Usia 0-3 dpf terhadap Kadar MDA (*Malondialdehyde*) pada Larva Zebrafish Stunting usia 6 dpf (day post fertilization)

Tabel 5.4. Kadar MDA dan BDNF pada larva zebrafish usia 6 dpf.

	Kadar	
	MDA (nmol/mL ± SD)	BDNF (ng/mL ± SD)
C	4,84 ± 0,51	3,68 ± 0,20
R	12,63 ± 2,08	5,22 ± 0,21
RMO1	219,45 ± 7,97	4,04 ± 0,89
RMO2	227,23 ± 7,43	2,96 ± 0,26
RMO3	200,75 ± 6,16	3,91 ± 0,12

Keterangan : C: kontrol, R: rotenon, RMO1: Rotenon dan *M.oleifera* 0,56 µg/mL, RMO2: Rotenon dan *M.oleifera* 1,12 µg/mL, RMO3: Rotenon dan *M.oleifera* 2,24 µg/mL



Gambar 5.4. Kadar MDA larva *zebrafish* pada 6 dpf.

Group

Gambar 5.4. Kadar MDA larva *zebrafish* pada 6 dpf. Keterangan : C: kontrol, R: rotenon, RMO1: Rotenon dan *M.oleifera* 0,56 µg/mL, RMO2: Rotenon dan *M.oleifera* 1,12 µg/mL, RMO3: Rotenon dan *M.oleifera* 2,24 µg/mL; notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Kadar MDA kelompok C lebih rendah dibandingkan dengan kelompok R dan memiliki perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Antara kelompok R dan RMO1, RMO2, serta RMO3 juga memiliki perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Kenaikan kadar MDA yang signifikan juga didapatkan antara kelompok C dibandingkan RMO1, RMO2, maupun RMO3 ( $p < 0,05$ ). Hasil uji korelasi Spearman menunjukkan bahwa tiap dosis pemberian ekstrak etanol daun kelor tidak memiliki korelasi yang signifikan ( $p = 0,069$ ).



### 5.5 Pengaruh Paparan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleivera*) dan Rotenon [12,5 ppb] pada Usia 0-3 dpf terhadap Kadar BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) pada Larva Zebrafish Stunting usia 6 dpf (day post fertilization)

63

#### Group

#### Gambar 5.5. Kadar BDNF larva zebrafish pada 6 dpf.

Keterangan : C: kontrol, R: rotenon, RMO1: Rotenon dan *M.oleifera* 0,56  $\mu\text{g/mL}$ , RMO2: Rotenon dan *M.oleifera* 1,12  $\mu\text{g/mL}$ , RMO3: Rotenon dan *M.oleifera* 2,24  $\mu\text{g/mL}$ ; Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Kadar BDNF antara kelompok C dan R memiliki perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) ; kelompok R memiliki kadar BDNF yang lebih tinggi.

Perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) juga terjadi antara kelompok R dan RMO1, dimana ekspresi BDNF kelompok R lebih tinggi dibandingkan RMO1. Ekspresi BDNF pada kelompok RMO2 dan RMO3 juga lebih rendah dibandingkan kelompok R dan memiliki perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Perbedaan tidak signifikan terjadi antara kelompok C dan RMO1, RMO2, maupun RMO3.

Hasil uji korelasi Pearson menunjukkan antara tiap dosis pemberian ekstrak etanol daun kelor memiliki nilai koefisien korelasi sebesar  $-0,499$  ( $p < 0,05$ ),



artinya terdapat hubungan yang bermakna antara dosis ekstrak etanol daun kelor dengan kadar BDNF pada larva *zebrafish stunting*.

## 5.6 Uji Korelasi Pearson

### 5.6.1 Korelasi antara Panjang Badan Larva *Zebrafish* dengan Kadar MDA

Tabel 5.5 Korelasi antara Panjang Badan Larva *Zebrafish* dengan Kadar MDA

Variabel	Uji korelasi		Kesimpulan
	p-value	r-value	
Panjang badan dan kadar MDA	0,292	0,505	Tidak ada hubungan signifikan

Dari Tabel 5.5 terlihat bahwa antara panjang badan larva *zebrafish* dan kadar MDA tidak memiliki hubungan yang signifikan.

### 5.6.2 Korelasi antara Panjang Badan Larva *Zebrafish* dengan Kadar BDNF

Tabel 5.6 Korelasi antara Panjang Badan Larva *Zebrafish* dengan Kadar BDNF

Variabel	Uji korelasi		Kesimpulan
	p-value	r-value	
Panjang badan dan kadar BDNF	0,000	-0,757	Terdapat hubungan signifikan

Tabel 5.6 menyatakan bahwa antara panjang badan larva *zebrafish* dan kadar BDNF memiliki korelasi kuat dengan arah negatif dan hubungan yang signifikan.

### 5.6.3 Korelasi antara Kadar MDA dan Kadar BDNF

Tabel 5.7 Korelasi antara Kadar MDA dengan Kadar BDNF

Variabel	Uji korelasi		Kesimpulan
	p-value	r-value	
Kadar MDA dan kadar BDNF	0,011	-0,5	Terdapat hubungan signifikan





## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kelor Berpengaruh Terhadap Kadar MDA dan BDNF pada Larva *Zebrafish Stunting*.

Penelitian ini memperlihatkan pengaruh pemberian ekstrak etanol daun kelor berpengaruh terhadap kadar MDA maupun BDNF pada larva *zebrafish stunting*. Terlihat bahwa kadar MDA meningkat secara signifikan setelah pemberian moringa 0,56, moringa 1,12, dan moringa 2,24 µg/mL dibandingkan dengan kelompok C (kontrol) maupun kelompok R (Rotenon) ( $p < 0,05$ ). Kadar BDNF menurun secara signifikan dibandingkan dengan kelompok R ( $p < 0,05$ ), namun tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok C.

Sesuai dengan hipotesis peneliti, bahwa dalam penelitian ini ekstrak etanol daun kelor berpengaruh terhadap kadar *malondialdehyde* dan *Brain Derived Neurotrophic Factor* pada larva *zebrafish stunting*.

#### 6.2 Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kelor dapat Mencegah *Stunting* pada Larva *Zebrafish*.

Rotenon dapat menghambat pertumbuhan panjang badan dengan cara menghambat NADH dehydrogenase (kompleks 1 mitokondria). Proses ini kemudian akan menurunkan kemampuan oksidasi fosforilasi sehingga pembentukan ATP di mitokondria terhambat dan membentuk ROS. Peningkatan ROS yang signifikan di dalam sel akan memicu terjadinya kematian sel (Li, *et al.*, 2003).

Hasil dari penelitian ini memperlihatkan bahwa rotenon dapat menghambat pertumbuhan panjang badan *zebrafish*. Dapat dilihat dari gambar 5.1 dan tabel 5.1 dimana pada 3 dpf, antara kelompok C (kontrol) dan kelompok R (rotenon) tidak memiliki perbedaan rerata panjang badan yang signifikan ( $p = 0,214$ ). Terdapat pengecualian kriteria *stunting* pada awal kelahiran. Individu pada awal kelahiran



dapat dikatakan stunting bukan  $\leq -2$  SD, namun  $< -0,5$  SD (Victora, 2010). Dalam penelitian ini panjang kelompok C usia 3 dpf memiliki panjang  $3,55 \pm 0,04$ . Maka batas panjang badan dikatakan *stunting* adalah  $3,55 - 0,02 = 3,53$  mm. Kelompok R usia 3 dpf memiliki rerata panjang badan  $3,51 \pm 0,02$  mm, maka kelompok R bisa dikatakan *stunting* jika dibandingkan dengan kelompok C. Potensi rotenon dalam menghambat pertumbuhan panjang badan larva *zebrafish* juga terlihat di usia 6 dan 9 dpf, dimana rerata panjang kelompok R lebih kecil dibandingkan dengan rerata panjang kelompok C dan memiliki perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ).

Sesuai dengan hasil penelitian ini yang dapat dilihat pada gambar 5.2 dan tabel 5.2, rerata panjang kelompok C (kontrol) dibandingkan dengan kelompok MO1 (*M. Oleivera* 0,56  $\mu\text{g/mL}$ ) tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Begitu juga kelompok C apabila dibandingkan dengan kelompok MO2 (*M.oleifera* 1,12  $\mu\text{g/mL}$ ) maupun MO3 (*M.oleifera* 2,24  $\mu\text{g/mL}$ ) juga tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa memang paparan daun kelor di seluruh dosis dalam penelitian ini tidak mengakibatkan hambatan pertumbuhan panjang badan larva *zebrafish*.

Berdasarkan pada teori yang sudah ditemukan, daun kelor banyak mengandung protein, mineral, antioksidan, dan beta karoten. Antioksidan flavonoid yang dikandung dalam daun kelor antara lain quarcetin, beta-sitosterol, dan kaempferol (Bose et al., 2007). Selain sebagai antioksidan, flavonoid yang terkandung di daun kelor juga berfungsi sebagai anti kanker, antiinflamasi, dan antihipertensi (Formika, 1995). Telah diketahui sebelumnya bahwa *stunting* disebabkan karena stres oksidatif berlebih di dalam sel. Dapat disimpulkan bahwa kandungan daun kelor dapat menghambat terjadinya *stunting*.

Peran daun kelor yang dapat menghambat *stunting* terlihat pada hasil penelitian ini (tabel 5.3 dan gambar 5.3). Pada 3 dpf rerata panjang badan larva *zebrafish* kelompok R masuk dalam kategori *stunting* apabila dibandingkan dengan kelompok C. Kelompok R memiliki rerata panjang badan yang lebih kecil dibandingkan dengan kelompok RMO1, RMO2, dan RMO3 pada usia 3 dpf, 6 dpf dan 9 dpf.

Hasil ini menunjukkan bahwa rotenon memang menyebabkan hambatan pertumbuhan panjang badan larva *zebrafish*. Namun dengan pemberian daun kelor akan memperbaiki panjang badan, dimana semakin tinggi dosis daun kelor yang diberikan, semakin baik perbaikan panjang badan.

### **6.3 Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) Meningkatkan Kadar MDA (*Malondialdehyde*) pada Larva *Zebrafish Stunting***

MDA (*Malondialdehyde*) merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid di sel. Peningkatan radikal bebas akan mengakibatkan produksi MDA berlebih. Tingginya kadar MDA merupakan tanda terjadinya peroksidasi lipid dan stres oksidatif. Pada penelitian ini, rotenon secara signifikan meningkatkan kadar MDA jika dibandingkan dengan kelompok C (Tabel 5.4 dan grafik 5.4). Hasil ini berkaitan dengan aktivitas rotenon yang menyebabkan disfungsi dari mitokondria yang kemudian akan meningkatkan ROS.

Daun kelor (*Moringa Oleifera*) mampu menghambat terjadinya peroksidasi lipid membran sel dan mencegah radikal bebas dengan kandungan antioksidan yang terkandung di dalamnya (Gouda, 2018). Pada kelompok R, RMO1, RMO2, dan RMO3 menunjukkan peningkatan kadar MDA yang signifikan disbanding dengan kelompok C. Hasil ini berkebalikan dengan teori sebelumnya yang menyatakan bahwa daun kelor dapat menghambat radikal bebas, dalam hal ini radikal bebas dapat diproyeksikan dengan kadar MDA (Rajan, 2015).

ROS awalnya terbentuk dari mitokondria dengan produk  $O_2^{\cdot-}$  dan  $H_2O$ .  $O_2^{\cdot-}$  berperan sebagai radikal bebas yang berbahaya.  $O_2^{\cdot-}$  dapat diubah menjadi  $H_2O_2$  oleh SOD (*Superoxide Dismutase*). Kemudian  $H_2O_2$  diubah oleh catalase menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$ . Dari hasil penelitian lain menyatakan bahwa pemberian daun kelor dapat meningkatkan kadar SOD (Wangta, 2018). Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian daun kelor dapat meningkatkan produksi  $H_2O_2$ .

Selain antioksidan, daun kelor juga mengandung mineral. Salah satu mineral yang terkandung adalah Fe. Kandungan Fe dalam daun kelor diketahui 155,2 – 435,9 mg/kg (Maida, 2005). MDA yang meningkat pada penelitian ini terjadi karena  $H_2O_2$  bereaksi dengan  $Fe^{2+}$  yang terkandung dalam daun kelor. Apabila  $H_2O_2$  bereaksi dengan  $Fe^{2+}$ , senyawa ini akan berubah menjadi  $OH^{\cdot}$  yang dapat mengakibatkan kerusakan membran sel (Hessam, 2018). Kerusakan membran sel akan memicu terjadinya peroksidase lipid dengan produk akhir MDA (Niki, 2009).

**6.4 Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) Meningkatkan Kadar BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) pada Larva *Zebrafish*.**

Berdasarkan hasil yang didapatkan (Grafik 5.5 dan tabel 5.4), kadar BDNF kelompok R meningkat secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok C. Kelompok RMO1, RMO2, dan RMO3 berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok C ( $p < 0,05$ ). Pada kelompok RMO2 kadar BDNF memiliki kadar yang paling rendah dan berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok RMO1 dan RMO2.

BDNF merupakan salah satu protein neurotrophin yang berperan untuk memicu neurotransmitter, daya tahan hidup sel, diferensiasi, dan migrasi sel (Dutheil, 2016). Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa BDNF meringankan *brain injury* dengan memperbaiki konektivitas saraf dan melindungi saraf.



Penelitian lain menyatakan bahwa kadar BDNF meningkat pada kelenjar adrenal ketika dipapar oleh stres yang kronik (Saruta, 2010).

Ekstrak daun kelor diketahui mengandung glikosida, fitosterol, dan polifenol yang berperan untuk menekan lipid peroksidase yang disebabkan oleh stres yang kronik (Pasha, 2010). Dengan turunnya paparan stres kronik karena peran ekstrak daun kelor, pada penelitian ini didapatkan kadar BDNF menurun signifikan di semua kelompok paparan ekstrak etanol daun kelor, terutama pada dosis 1,12 µg/mL.

**6.5 Peningkatan Kadar MDA Tidak Mempengaruhi Panjang Badan Larva Zebrafish.**

Berdasarkan dari hasil peneletian ini kadar MDA tidak memiliki hubungan yang signifikan terhadap panjang badan larva *zebrafish* (p=0,292). Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan kadar MDA tidak berpengaruh signifikan terhadap peningkatan panjang badan larva *zebrafish*. Dalam penelitian ini perbaikan rerata panjang badan larva *zebrafish* dipengaruhi oleh kadar BDNF.

Penelitian yang dilakukan oleh Chandra juga menunjukkan bahwa kadar IL-6 yang meningkat memiliki hubungan yang bermakna dan memiliki korelasi positif dengan panjang badan *zebrafish*. BDNF, IL-6, dan IL-10 merupakan parameter yang berperan pada proses inflamasi. Sedangkan MDA, SOD, dan catalase merupakan parameter yang berperan dalam proses ROS. Hasil dalam penelitian ini menunjukkan bahwa peran inflamasi dalam proses terjadinya *stunting* lebih berperan dibandingkan dengan ROS. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa *stunting* disebabkan karena inflamasi kronis (Prendergast, 2014).



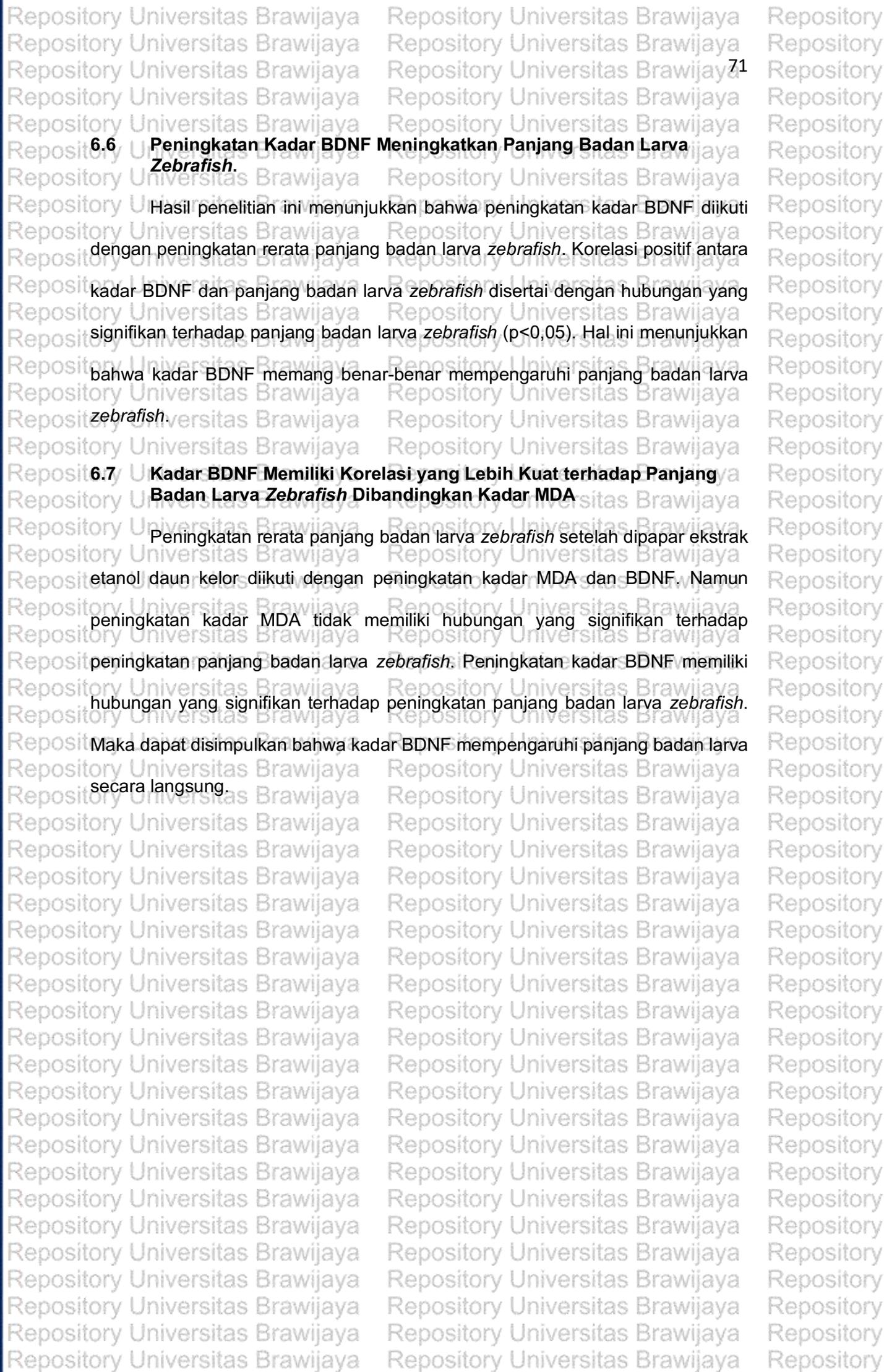
**6.6 Peningkatan Kadar BDNF Meningkatkan Panjang Badan Larva Zebrafish.**

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan kadar BDNF diikuti dengan peningkatan rerata panjang badan larva *zebrafish*. Korelasi positif antara kadar BDNF dan panjang badan larva *zebrafish* disertai dengan hubungan yang signifikan terhadap panjang badan larva *zebrafish* ( $p < 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa kadar BDNF memang benar-benar mempengaruhi panjang badan larva *zebrafish*.

**6.7 Kadar BDNF Memiliki Korelasi yang Lebih Kuat terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish Dibandingkan Kadar MDA**

Peningkatan rerata panjang badan larva *zebrafish* setelah dipapar ekstrak etanol daun kelor diikuti dengan peningkatan kadar MDA dan BDNF. Namun peningkatan kadar MDA tidak memiliki hubungan yang signifikan terhadap peningkatan panjang badan larva *zebrafish*. Peningkatan kadar BDNF memiliki hubungan yang signifikan terhadap peningkatan panjang badan larva *zebrafish*.

Maka dapat disimpulkan bahwa kadar BDNF mempengaruhi panjang badan larva secara langsung.





## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak etanol daun kelor dengan konsentrasi [0,56 ug/ml], [1,12 ug/ml], dan [2,24 ug/ml] berpengaruh terhadap kadar MDA dan BDNF pada larva *zebrafish stunting*.
2. Pemberian ekstrak etanol daun kelor dengan konsentrasi [0,56 ug/ml], [1,12 ug/ml], dan [2,24 ug/ml] dapat mencegah *stunting* pada larva *zebrafish*.
3. Pemberian ekstrak etanol daun kelor dengan konsentrasi [0,56 ug/ml], [1,12 ug/ml], dan [2,24 ug/ml] meningkatkan kadar MDA (*Malondialdehyde*) pada larva *zebrafish*.
4. Pemberian ekstrak etanol daun kelor dengan konsentrasi [0,56 ug/ml], [1,12 ug/ml], dan [2,24 ug/ml] meningkatkan kadar BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) pada larva *zebrafish (Danio rerio)*.
5. Peningkatan kadar MDA (*Malondialdehyde*) tidak mempengaruhi panjang badan larva *zebrafish*.
6. Peningkatan kadar BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) meningkatkan panjang badan larva *zebrafish*.
7. Pemberian daun kelor (*Moringa oleifera*) untuk pencegahan *stunting* perlu diberikan dengan dosis yang tepat untuk memperoleh hasil yang diinginkan.
8. Daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat dibudidayakan sebagai solusi untuk memperbaiki permasalahan gizi.



## 7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian serupa menggunakan dosis ekstrak etanol daun kelor dengan dosis yang berbeda untuk mengetahui ambang batas dosis daun kelor sebagai antioksidan.
2. Perlu dilakukan penelitian serupa, namun pengukuran parameter MDA dan BDNF dilakukan pada usia *zebrafish* yang lebih lama.
3. Perlu dilakukan penelitian serupa, namun menggunakan daun kelor yang kandungannya sudah diisolasi.