

BAB 2

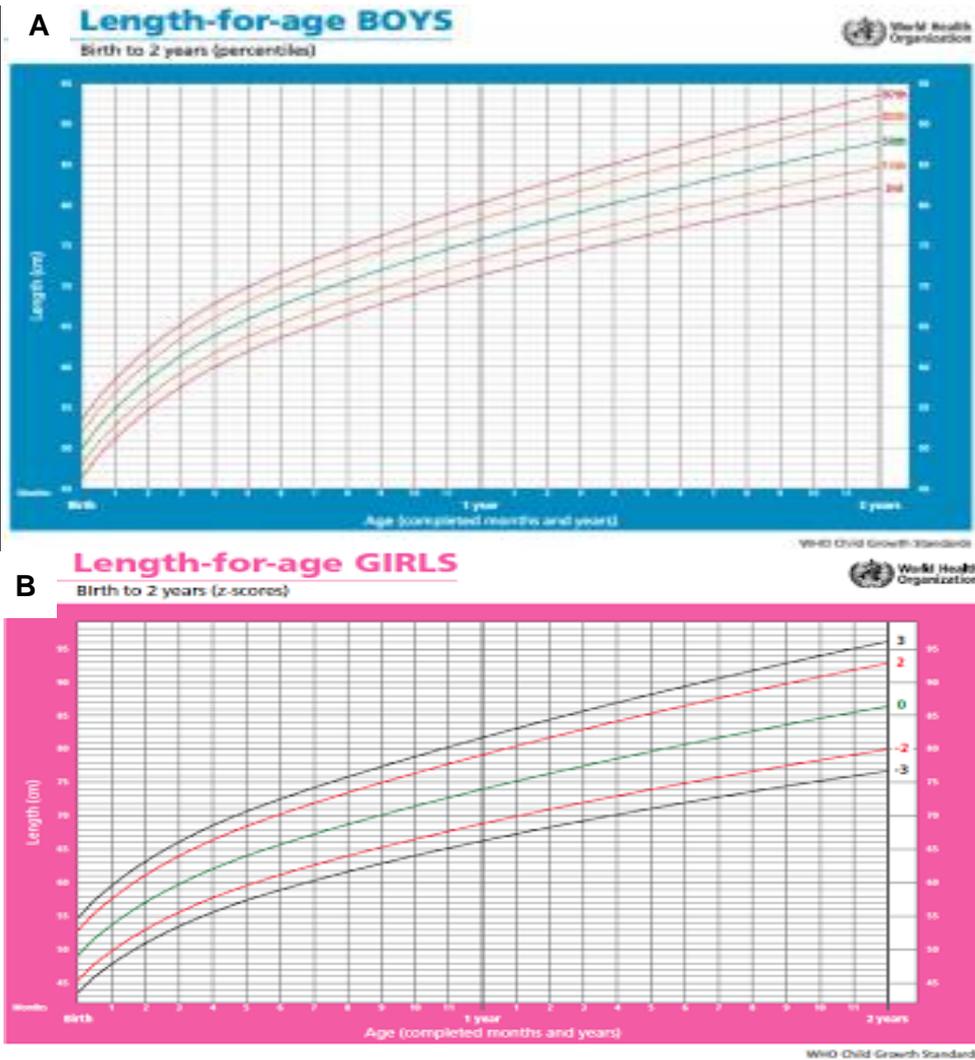
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Stunting*

2.1.1 *Pengertian Stunting*

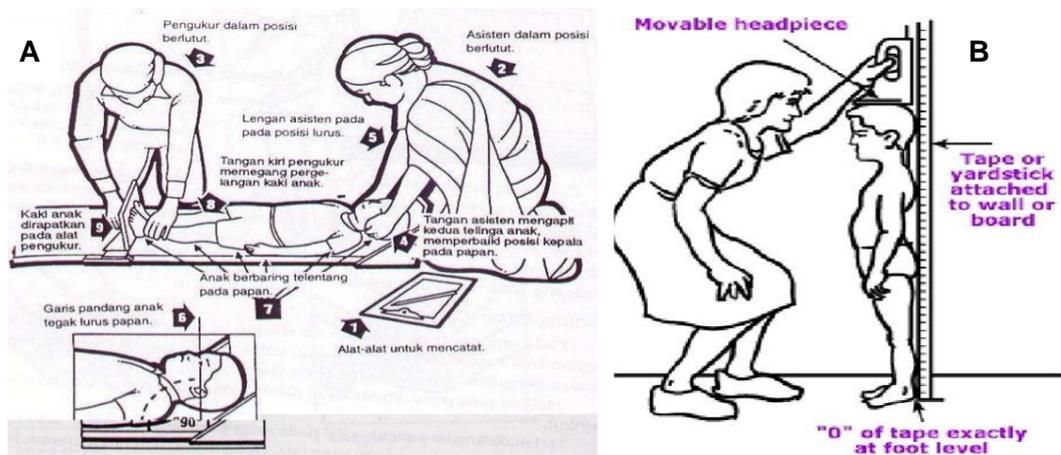
Stunting merupakan retardasi pertumbuhan, ditandai dengan kekurangan gizi kronis, dikarenakan asupan yang tidak adekuat, sehingga terjadi hambatan pertumbuhan linier pada anak balita. Berdasarkan standar baku WHO *Child Growth Standart* tahun 2010, dengan indikator pengukuran tinggi badan dibandingkan dengan umur (TB/U), atau panjang badan dibandingkan dengan umur (PB/U), dengan batasan nilai z-scorenya kurang dari -2 SD (Sudirman, 2008; Chang *et al.*, 2010; WHO, 2012; Kemenkes RI, 2016).

Tahun 2006 WHO mengeluarkan kurva pertumbuhan standar, dapat dilihat pada gambar 2.1. Kurva tersebut menggambarkan tentang pertumbuhan anak yang optimal pada usia 0-59 bulan, tanpa adanya faktor penghambat dari lingkungan. Kurva pertumbuhan ini, juga bermanfaat dalam menentukan kondisi anak *stunting* atau tidak. Salah satu penilaian dalam kurva pertumbuhan yaitu, panjang badan sesuai dengan usia. Teknik pengukuran panjang badan yaitu pada anak usia 0-2 tahun, dilakukan dengan posisi tidur telentang, sedangkan untuk anak usia lebih dari 2 tahun, teknik pengukurannya dengan berdiri, dapat dilihat pada gambar 2.2 (WHO,2009; IDAI, 2017).



Gambar 2.1 Grafik Growth chart (WHO) untuk menentukan stunting dinyatakan jika nilai SD <-2SD, sedangkan severely stunting <-3SD.

Keterangan: A. Laki-laki dan B. Perempuan (De Onis *et al.*, 2007).



Gambar 2.2 Teknik pengukuran Panjang badan/ tinggi badan.

Keterangan: A. Untuk usia 0-2 tahun dan B. untuk usia lebih dari 2 tahun (WHO, 2009; Dinkes Karanganyar, 2014).

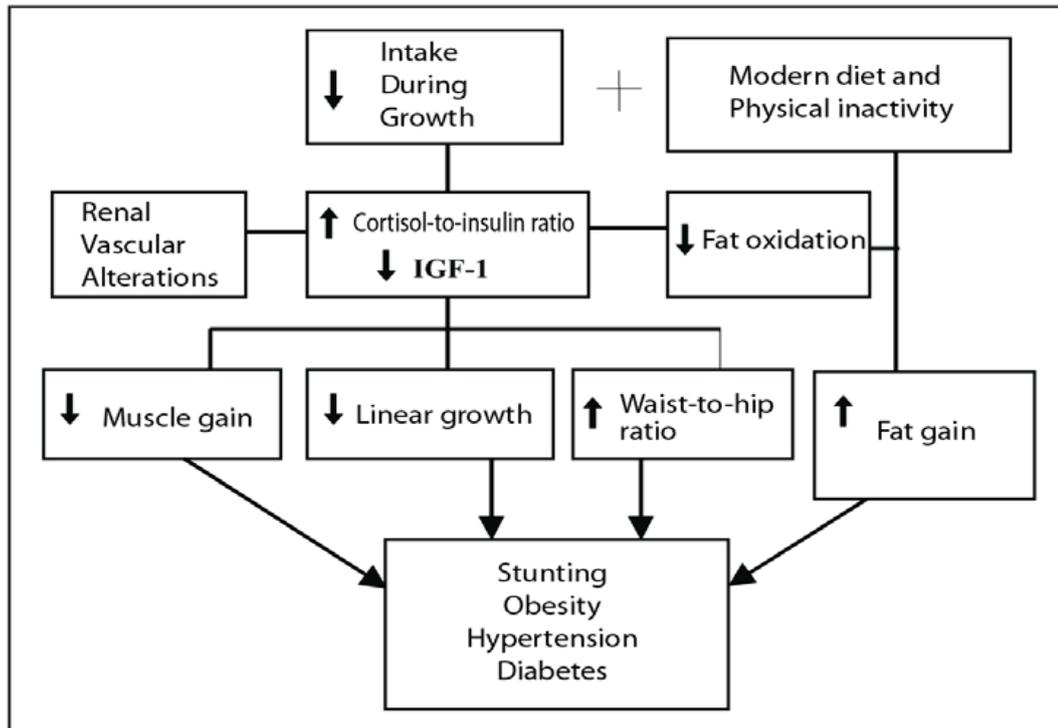
2.1.2 Faktor risiko *stunting*

Banyak faktor yang mempengaruhi *stunting*, diantaranya adalah panjang badan lahir, status ekonomi keluarga, tingkat pendidikan dan tinggi badan orang tua. Panjang badan lahir pendek, merupakan salah satu faktor penyebab *stunting* pada balita. Panjang badan lahir pendek bisa disebabkan oleh faktor genetik, maupun karena kurangnya pemenuhan zat gizi pada masa kehamilan. Panjang badan lahir pendek pada anak menunjukkan kurangnya zat gizi yang diasup Ibu selama masa kehamilan, sehingga pertumbuhan janin tidak optimal. (Rahayu et al., 2011; Anugrahenni & Kartasura, 2012). Panjang lahir berkaitan erat dengan tinggi badan orang tua. Ibu dengan tinggi badan pendek lebih berpeluang untuk melahirkan anak yang pendek pula (Zottarelli *et al.*, 2007).

Stunting dimulai dari sejak dalam kandungan dan nampak pada usia 2 tahun. Intervensi yang efektif untuk menghindari terjadinya *stunting*, dapat dimulai dari awal periode konsepsi dan difokuskan pada 1.000 hari pertama kehidupan yaitu mulai dari kehamilan, proses menyusui, dan anak 0-23 bulan, dikarenakan periode tersebut sebagai "periode emas", "periode kritis", dalam menentukan kualitas kehidupan dan masa depan generasi penerus bangsa (Kemenkes RI, 2016).

Berdasarkan studi epidemiologi, penyebab *stunting* adalah kurang optimalnya dalam pemberian ASI, pemberian makanan yang kurang tepat, defisiensi mikronutrien yang berulang. Sedangkan dari kerangka konseptual WHO *Childhood stunting* menyatakan bahwa kegagalan pertumbuhan linier dapat disebabkan oleh interaksi masyarakat yang kurang dan faktor sosial (akses pelayanan kesehatan dan pendidikan, stabilitas politik, urbanisasi dan kepadatan penduduk). Dari studi di India terjadinya keterlambatan pertumbuhan di usia 6

stunting dikarenakan kontaminasi makanan yang mengandung Aflatoxin, selain itu dengan paparan arsenic selama kehamilan berpengaruh dengan kejadian BBLR dan penurunan plasma IGF-1 di Banglades (Prendergast *et al.*, 2014).



Gambar 2.4 Kaitan antara *stunting*, obesitas, hipertensi dan diabetes.

Keterangan: Penurunan kadar IGF-1 dapat menimbulkan penurunan *Linear growth* sehingga memicu terjadinya *stunting* (Sawaya *et al.*, 2009).

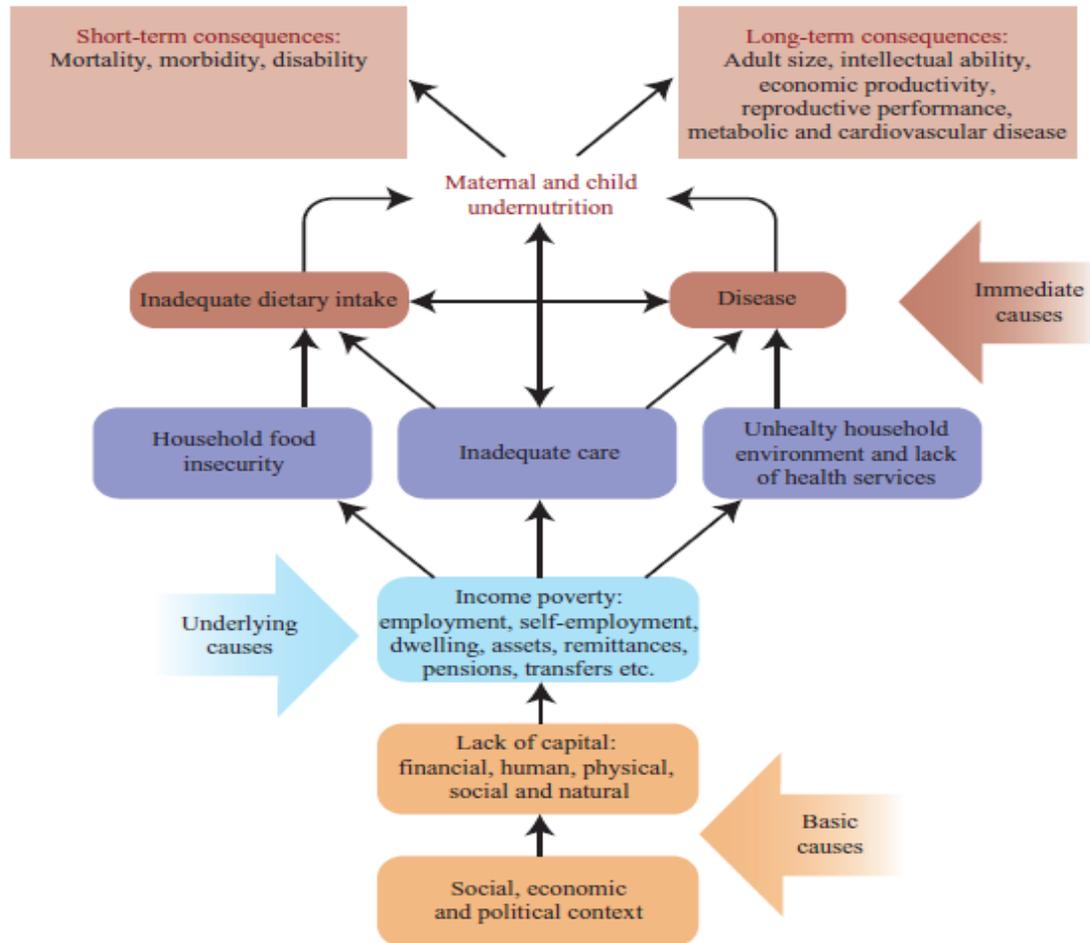
Mekanisme terjadinya *stunting* dapat terjadi pada awal kehidupan terkait dengan Inflamasi kronik dan gangguan pada hormone pertumbuhan serta malnutrisi. Infamasi yang terjadi selama maternal memiliki pengaruh pada pertumbuhan. Salah satu faktor pertumbuhan yang terkait adalah IGF-1, konsentrasi IGF-1 yang rendah pada bayi, dapat menyebabkan gangguan pada pertumbuhan linear. Tingginya tingkat CRP (*C-Reactive Protein*) dan AGP (*Alphal glikoprotein Asam*) selama masa bayi juga, dapat dikaitkan dengan terjadinya *stunting*. Selain itu, Keadaan infeksi dapat mempengaruhi pertumbuhan linear melalui mekanisme penghambatan khondrogenesis, sedangkan peningkatan interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF), dan kortisol,

dapat memperparah kerusakan tulang, sehingga berpengaruh terhadap pertumbuhan linear (Uauy, 2013; Prendergast *et al.*, 2014).

2.1.4 Efek *Stunting* Jangka Pendek dan Panjang

Periode kritis perkembangan anak terutama pada masa balita di usia tiga tahun pertama kehidupan, pada masa tersebut rentan terjadi malnutrisi (Georgieff, 2007). *Stunting* merupakan keadaan malnutrisi kronik yang sangat berkaitan dengan perkembangan otak anak. Keterlambatan tersebut disebabkan oleh adanya keterlambatan kematangan sel-sel saraf terutama dibagian pusat koordinasi gerak motorik yaitu daerah Cerebellum (Udani, 1992; Prado & Dewey, 2014) Selain itu aspek perkembangan lain yang dapat berpengaruh adalah perkembangan kognitif yang secara tidak langsung dapat mempengaruhi kualitas sumber daya manusia (Solihin *et al.*, 2013).

Manifestasi *stunting* dari kekurangan gizi pada fase maternal dan anak, memiliki efek jangka pendek yang mendasari 14-17% dari kematian anak secara global, peningkatan angka kesakitan dan kejadian kecacatan baik secara fisik maupun psikologis. Efek jangka panjang yang dapat timbul dari permasalahan tersebut adalah stunted terlihat setelah dewasa, cacat kognitif jangka panjang menyebabkan penurunan intelektual, sehingga menunjukkan kinerja yang rendah di sekolah, produktivitas ekonomi dewasa yang lebih rendah, gangguan metabolic dan penyakit kardiovaskuler, peningkatan risiko penyakit degeneratif di masa mendatang, serta terjadi peningkatan risiko *stunting* ke generasi berikutnya (gambar 2.5) (Badham *et al.*, 2010; Anugraheni & Kartasurya, 2012; Prendergast *et al.*, 2014).



Gambar 2.5. Faktor Resiko Stunting.

Keterangan: Kekurangan gizi pada ibu hamil dan anak dapat menimbulkan efek jangka pendek yaitu kematian, kesakitan dan kecacatan, sedangkan efek jangka panjang yaitu menyebabkan ukuran tubuh yang pendek (stunted), penurunan kemampuan intelektual, produktivitas ekonomi, kinerja reproduktif, metabolik dan penyakit jantung (Badham *et al.*,2010).

2.2 Rotenon

2.2.1 Karakteristik Fisikokimia Rotenon

Rotenon adalah pestisida alami dan merupakan salah satu anggota dari senyawa isoflavan, sehingga rotenon termasuk golongan flavonoida. Flavonoida pada rotenon merupakan produk metabolisme sekunder, memiliki senyawa aktif sebagai aktivitas inhibitor rantai pernapasan. Rotenon adalah salah satu senyawa bio-aktif yang paling banyak terkandung didalam akar tuba dibandingkan pada batang, sebagai insektisida alami (Casacchia *et al.*,2009)

Menurut WHO, rotenon diklasifikasikan sebagai jenis insektisida kelas II, artinya memiliki bahaya tingkat menengah. Rotenon sering digunakan dalam bidang pertanian, sebagai bioinsektisida yang dapat dikategorikan aman, dan digunakan dalam bidang perikanan sebagai piscicide, sebagai pengontrol sebaran penyakit pada ikan, melalui teknik membunuh ikan yang telah terinfeksi. Rotenon merupakan molekul polar yang bersifat toksik pada serangga, ikan dan relative tidak toksik pada tanaman dan mamalia (Zubairi *et al.*,2014). Rotenone memiliki sifat sangat mudah rusak pada tanah dan air, dengan paparan sinar matahari secara langsung, dapat menghilangkan seluruh racun rotenone dalam waktu 2-3 hari (Sae *et al.*, 2006; Jayadipraja *et al.*,2013). Sedangkan menurut Perrone (2011), menyatakan bahwa degradasi rotenone dapat dipengaruhi oleh suhu air 25°C, pH 5 sampai dengan 9, serta pada suhu 25°C dengan paparan sinar selama 10,6 jam dan suhu 5°C dengan paparan sinar selama 23 jam (Perrone *et al.*,2011).

Formula Empiris	: $C_{23}H_{22}O_6$
Nama kimia	: (2R,6aS,12aS) -1,2,6,6a,12,12ahexahydro- 2-isopropeny l-8,9- dimethoxychromeno[3,4-b]furo[2,3-h] chromen-6- one.
Berat molekul	: 394.43 g/mol
Titik lebur/ leleh	: 163 °C
Titik didih	: 220 °C
Kelarutan	:Kelarutana dalam air sangat terbatas, karena mengandung molekul gula sehingga sedikit larut pada air. Kelarutannya adalah; 0,2 mg/L @ 20°C dan 15 mg/L @ 100°C.

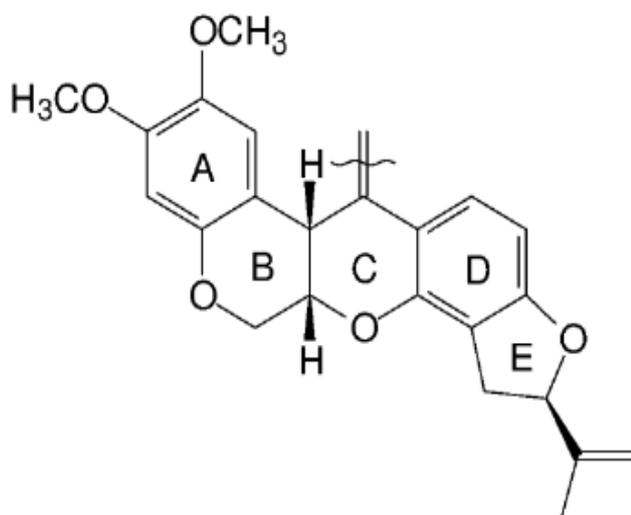
Kelarutan dalam pelarut organik lain, yaitu; etanol 2 g/L @ 20°C, karbon tetraklorid 6 g/L @ 20°C, amil asetat 16 g/L @ 20 °C, xylem 34 g/L @ 20 °C, aseton 66 g/L @ 20 °C, benzene 80 g/L @ 20 °C, klorobenzen 135 g/L @ 20 °C, ethylene dichloride 330 g/L @ 20 °C, dan chloroform 472 g/L @ 20 °C.

Tekanan penguapan : < 1 mPa-20 °C

Klas kimia : Rotenon

Sifat : Sensitif terhadap air dan cahaya

Ciri-ciri : memiliki dua bentuk yaitu bentuk Kristal tidak berwarna dan berwarna kecoklatan dan berbentuk serbuk kristal berwarna putih dan coklat keputihan.



Gambar 2.6. Struktur Molekul Rotenon (Hien et al.,2003; Zubairi et al.,2014).

2.2.2 Efek Toksikologi

Toksistas rotenon dengan konsentrasi yang tinggi, dapat menyebabkan terganggunya transport elektron pada mitokondria, sehingga berdampak pada kematian sel yang diakibatkan terganggu proses oksigenasi. Pada ikan, toksistas rotenon lebih tinggi, dikarenakan secara langsung ikan hidup dan

bernafas didalam air, sehingga rotenone yang terdapat pada air dapat masuk secara langsung pada pembuluh darah. Rotenon dapat masuk dalam tubuh ikan di fase embrio yaitu melalui korion (ukuran korion *zebrafish* adalah $0,17 \mu\text{m}^2$) dan pada tahap larva hingga dewasa melalui insang dan kulit (Cheng *et al.*, 2007). Sedangkan pada manusia dan aves, rotenon memiliki toksisitas yang lebih rendah, dikarenakan pada jenis mamalia dan aves, rotenone yang masuk kedalam tubuh tidak langsung melalui pembuluh darah, akantetapi melalui rute pencernaan terlebih dahulu, kemudian diserap oleh usus, sehingga banyak kadungan toksik dari rotenon tersebut yang rusak dan hilang sebelum masuk pada aliran darah (Ott, 2006).

Ray (1991) dalam Hien (2003) mengemukakan bahwa, rotenone dapat menimbulkan berbagai toksisitas, yaitu :

Toksisitas Akut, menimbulkan efek local pada tubuh yaitu, termasuk konjungtivitis, dermatitis dan sakit tenggorokan. Jika tertelan menghasilkan efek mulai dari iritasi ringan sampai dengan muntah. Inhalasi dosis tinggi dapat menyebabkan peningkatan respirasi diikuti oleh depresi dan kejang-kejang. Dosis toksik rotenone pada manusia yaitu $4 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{BB}$, sedangkan dosis letal yaitu 300 sampai 500 $\text{mg}/\text{kg}/\text{BB}$, akan tetapi kejadian kematian pada manusia jarang terjadi, dikarenakan konsentrasi rotenone yang dipasarkan selama ini rendah (formulasi 1 sampai 5%). Ukuran partikel rotenone dapat menentukan toksisitas inhalasi, sehingga lebih beracun ketika terhirup daripada tertelan, dikarenakan ukuran partikel sangat kecil, dapat mudah masuk kedalam paru-paru. Berdasarkan penelitian Turner *et al.* (2007), diperoleh hasil bahwa toksisitas akut terjadi pada kulit, iritasi mata dan pernafasan, dengan pemberian paparan rotenon secara oral, pada tikus betina konsentrasi 39,5 mg/kg , dibandingkan tikus jantan dengan konsentrasi 102 mg/kg (Turner *et al.*, 2007). Paparan

rotenone selama 24 jam pada ikan dengan konsentrasi 5 dan 100 µg/L dapat menimbulkan toksik (Ling, 2003).

Toksisitas kronis, dapat menyebabkan keterlambatan dalam pertumbuhan dan muntah. Anjing yang diberi makanan mengandung rotenone hingga dosis 50 mg /kg/ hari selama 28 hari, mengalami muntah dan air liur berlebihan, dan tidak menimbulkan penurunan berat badan, akan tetapi saat diberikan makan yang mengandung rotenone dengan dosis hingga 10 mg/ kg/hari selama enam bulan, diperoleh hasil bahwa nafsu makannya berkurang dan menimbulkan penurunan berat badan (Hien *et al.*,2003).

Efek reproduksi: Tikus bunting yang diberi dosis 2,5 mg/kg/hari tidak menghasilkan toksisitas atau efek buruk pada perkembangan janin (Ray 1991) sedangkan, pada dosis 10 mg/kg/hari pada hari 6 sampai 15, mengalami penurunan kesuburan, peningkatan resorpsi janin, dan mengalami berat lahir rendah, serta menimbulkan kematian yang tinggi (AS Perpustakaan Nasional of Medicine 1995). Fetotoxicity dan keguguran dilaporkan terjadi pada marmot yang dipapar dengan dosis 4,5 dan 9,0 mg/kg/hari dengan waktu yang tidak ditentukan (Ray, 1991).

Efek teratogenik: Injeksi rotenone 1 µg/kg/bb selama 8 hari, dapat mempengaruhi osteoclastogenesis pada tikus usia 6 minggu, ditandai dengan adanya pengeroposan tulang (Kwak *et al.*,2010). Berdasarkan penelitian Ridlayanti dan Wijayanti (2016), diperoleh hasil bahwa pemberian rotenon konsentrasi 10 ppb dapat menyebabkan *stunting* pada *zebrafish*, sedangkan pada konsentrasi 20 ppb dapat menyebabkan kelainan dengan ekor yang membengkok, pada konsentrasi 40 ppb menyebabkan pembengkokan pada tulang belakang, *stunted*, motilitas lambat, pigmentasi kulit yang pucat, sebagian

embrio mengalami kematian dan survival rate hanya 32 % (Ridlayanti, 2016; Wijayanti, 2016).

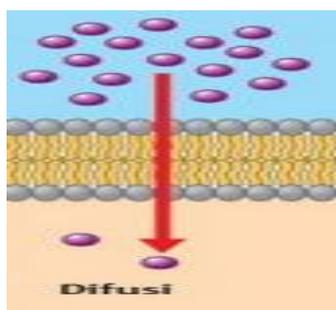
Efek karsinogenik: Studi dari program nasional toksikologi (1984) dalam Hien (2003) mengemukakan bahwa, telah memberikan bukti terdapat aktivitas karsinogenik dari paparan rotenone pada tikus dan hamster. Hamster yang diberi dosis oral 120 mg/kg/hari untuk jangka waktu 18 bulan, menunjukkan adanya aktivitas karsinogenik. Sedangkan studies dari dua spesies tikus yang dipapar rotenone dengan dosis oral hingga 75 mg / kg/hari selama 18 bulan dibuktikan secara statistik tidak ada perubahan signifikan kejadian kanker pada setiap organnya, termasuk kelenjar susu. Peningkatan yang signifikan terjadi pada tikus albino yang dipapar secara intraperitoneal dengan dosis 1,7 mg/kg/hari selama 42 hari, mengalami tumor mammae, dan studi terakhir menyatakan bahwa bagaimanapun dosis diberikan dengan konsentrasi yang lebih tinggi (3,75 dan 7,5 mg/kg/hari), selama periode yang sama, tidak menghasilkan peningkatan tumor dan dapat disimpulkan bahwa tidak ada bukti adanya karsinogenisitas (Hien *et al.*,2003).

Toksisitas Organ, Pemberian paparan rotenone dengan konsentrasi 25 g/L dapat menyebabkan kerusakan hati dan insang pada *zebrafish* ditahap juvenile (Melo *et al.*, 2015). Berdasarkan penelitian Ridlayanti dan wijayanti (2016), menyatakan bahwa dengan pemberian paparan rotenone konsentrasi 40 ppb, menyebabkan pembesaran jantung pada *zebrafish* (Ridlayanti, 2016; Wijayanti, 2016).

2.2.3 Mekanisme Kerja Rotenon

Berdasarkan klasifikasi golongan insektisida *mode of action* menurut IRAC (*Insecticide Resistance Action Commitees*) bahwa, rotenon dengan golongan (21 B) dapat masuk pada seluruh organ tubuh, termasuk pada otak

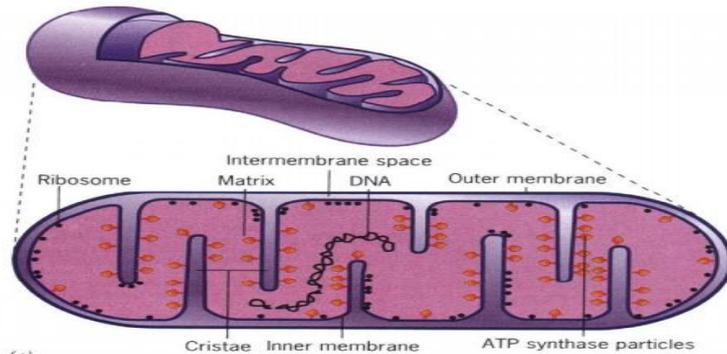
(Cairns, 2009). Rotenon bersifat lipofilik (larut lemak), sehingga dapat melintas dengan bebas pada membrane sel, dan tidak memerlukan transporter (Khotimah *et al.*, 2015). Proses masuknya rotenone pada sel yaitu melalui difusi pasif (gambar 2.7), syarat molekul dapat masuk didalam sel adalah jika berat molekulnya 1000 g/mol atau lebih kecil (Cairns, 2009), sedangkan berat molekul rotenone adalah 394.43 g/mol (Hien *et al.*,2003). Sifat rotenone yang mudah larut pada lemak, menyebabkan rotenon mudah mengumpul pada struktur subseluler termasuk pada mitokondria.



Gambar 2.7. Proses perpindahan molekul secara difusi pasif.

Keterangan: Rotenon masuk ke dalam sel secara difusi pasif, karena sifatnya non polar dan ukuran yang kecil (Marks *et al.*,2000).

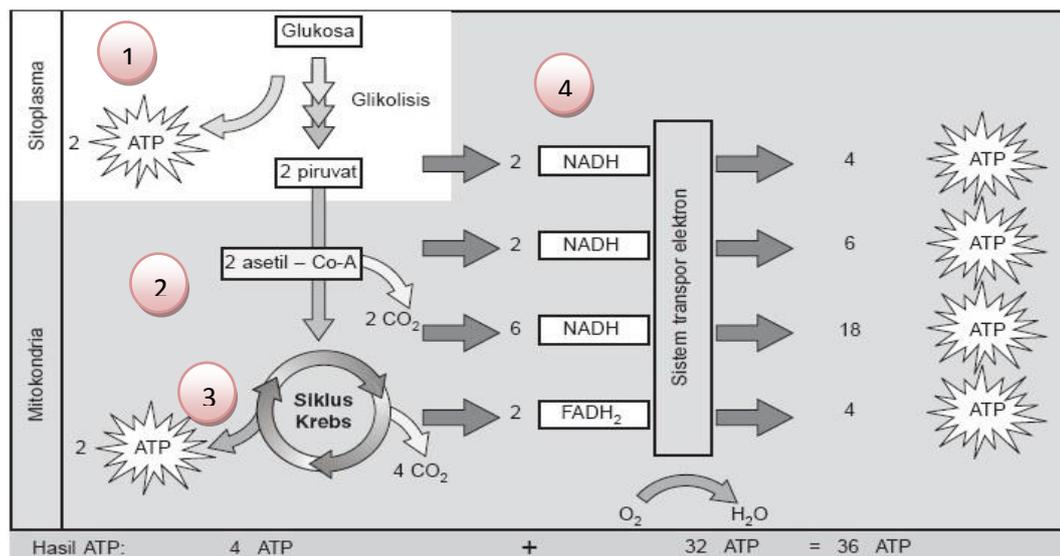
Mitokondria memiliki empat bagian utama (gambar 2.8), yaitu, membran luar (mengandung protein, lipid dan permiabel terhadap molekul yang berukuran kecil, serta berperan terhadap transport lipid ke dalam matriks), membran dalam (tempat pembentukan ATP dan terdapat krista berperan terhadap produksi ATP), ruang antar membrane (tempat berlangsungnya reaksi oksidasi asam amino, siklus Krebs dan reaksi β -oksidasi asam lemak dan bagian utama lainnya adalah matriks (mengandung materi genetik seperti, ribosom, mtDNA (DNA mitkondria), ADP, ATP, dan ion-ion lainnya) (Dewi, 2012).



Gambar 2.8 Bagian-bagian dari mitokondria

Keterangan: Mitokondria terdiri dari empat bagian utama yaitu; Membran luar/ *outer membrane* bersifat permeabel, ruang antar membrane dihasilkan nukleotida kinase, membrane dalam/ *inner membrane* berbentuk lekukan-lekukan yang disebut *cristae* yaitu tempat terjadinya respirasi sel dan sintesis fosfolipid, dan bagian terakhir adalah matriks merupakan tempat terjadinya oksidasi piruvat dan siklus asam sitrat (siklus krebs) (Dewi, 2012).

Mitokondria berperan dalam proses pembentukan ATP untuk sel, sehingga sering disebut "*The power house*". Terdapat empat proses dalam pembentukan ATP yaitu, reaksi glikolisis, tahap dekarboksilasi oksidatif, proses siklus krebs dan proses transport electron (gambar 2.9) (Paumard *et al.*, 2002).

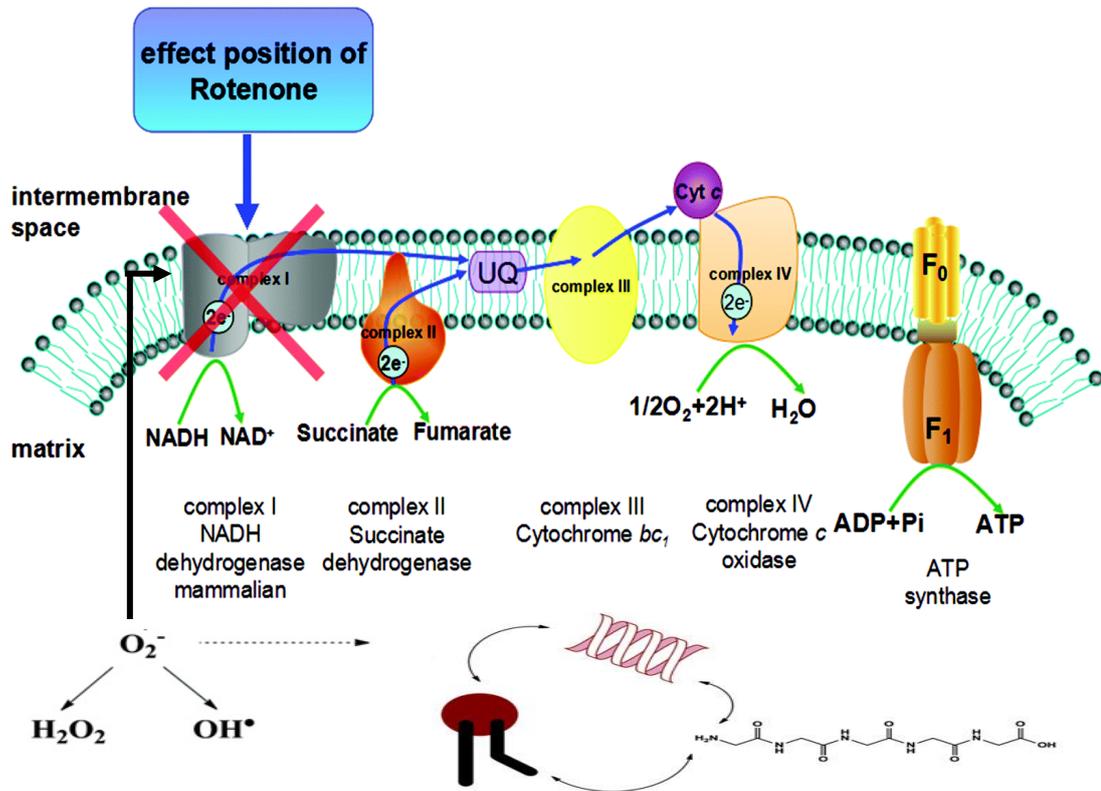


Gambar 2.9. Proses pembentukan adenosine triphosphate (ATP).

Keterangan: 1. Reaksi glikolisis proses pemecahan atau katabolisme glukosa menjadi asam, yang terjadi di sitosol. Hasil akhir dari proses glikolisis ini adalah 2 ATP dan 2 NADH dalam molekul glukosa. 2. Tahap dekarboksilasi oksidatif, proses ini terjadi pada matriks mitokondria, dengan hasil akhir yaitu mengubah asam piruvat menjadi 2 asetil Co-A, 2NADH, 2CO₂. 3. Proses siklus krebs, proses ini terjadi pada matriks mitokondria, dengan hasil akhir mengubah 2 asetil Co-A menjadi 6NADH, 2FADH₂, 4CO₂. 4. Proses transport electron, proses ini terjadi pada membran dalam mitokondria dengan memanfaatkan kompleks enzim respirasi, sehingga menimbulkan terjadinya gradien proton yang dimanfaatkan pada proses

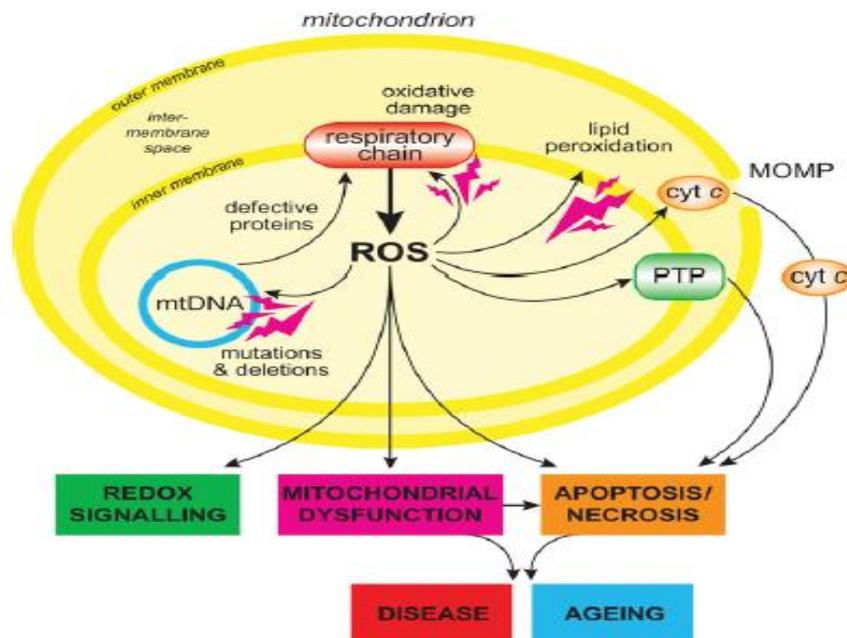
sintesis ATP oleh ATP sintase. Hasil akhir proses ini adalah mengubah NADH dan FADH₂ menjadi 32 ATP, 6H₂O (Mader *et al.*, 2007).

Rotenon merupakan inhibitor rantai respirasi mitokondria, dengan mekanisme kerja yaitu menghambat transpor elektron pada kompleks I mitokondria, dengan cara menginhibisi NADH dalam sel, sehingga banyak elektron bebas yang tersedia dan bereaksi dengan molekul oksigen, untuk menghasilkan O₂⁻ (*Superoksida*) dan kemudian membentuk H₂O₂ (*Hydrogen Peroxide*) (Gambar 2.10), hal tersebut menyebabkan produksi ROS meningkat, mencegah pemanfaatan energy oleh sel dikarenakan ATP yang menurun, hal tersebut berakibat disfungsi mitokondria, dan kematian sel melalui mekanisme apoptosis, yang dapat terlihat dari kondensasi kromatin, kerusakan DNA, protein, membrane lemak dan makromolekul lainnya. Kompleks I mitokondria merupakan point utama masuknya electron dari NADH menuju rantai respirasi, selain itu merupakan awal terjadinya proses regulasi ROS dan produksi ATP, sehingga jika terjadi hambatan aktivitas pada kompleks I mitokondria, dapat berlanjut menghambat kompleks lainnya (Hudayya *et al.*, 2010; Sanders *et al.*, 2013). Dosis rotenon 0,5-1 µM dapat menginduksi mitokondria untuk memproduksi ROS, dan menyebabkan penurunan kadar ATP secara maksimum (63% dari control) (Li *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2016).



Gambar 2.10 Mekanisme Kerja Rotenon

Keterangan: Rotenon sebagai salah satu pestisida yang bersifat toksik yang menghambat fosforilasi oksidatif pada kompleks 1 mitokondria (Sandres *et al.*,2013; Xu *et al.*,2016).



Gambar 2.11 Produksi ROS oleh Mitokondria.

Produksi ROS yang melebihi ambang batas, dapat mengakibatkan kerusakan mitokondria (kerusakan oksidatif dari protein mitokondria, bagian membrane dan DNA), sehingga tidak dapat melaksanakan fungsi metabolisme, termasuk dalam mensintesis ATP, sebagai sumber energi

bagi sel. Kerusakan tersebut, memacu pelepasan sitokrom c dan mengaktifkan proses apoptosis sel. Sehingga dapat berdampak pada kondisi patologis, yaitu penyakit dan penuaan (Murphy,2009).

Produksi ROS memiliki dampak terhadap kerusakan sel dan menimbulkan keadaan patologis, dapat terjadi hambatan reaksi reduksi oksidasi, yang menyebabkan gangguan signal dari organel keseluruhan sel yang terkait, disfungsi mitokondria merangsang timbulnya reaksi apoptosis atau nekrosis, sehingga dapat berdampak pada proses penuaan dan timbulnya penyakit (gambar 2.11) (Murphy,2009). Gangguan pada mitokondria dapat menyebabkan hambatan kebutuhan energy pada organ seperti pada otak, otot dan system endokrin, sehingga terjadi hambatan pertumbuhan dan ditandai perawakan yang pendek pada anak-anak. Hal tersebut berdasarkan penelitian dari Wolny (2008), diperoleh hasil bahwa anak-anak yang mengalami gangguan pada mitokondria menunjukkan perawakan pendek dengan skor SD -1,97 (95% tingkat kepercayaannya) dan menunjukkan BMI yang rendah -1,07 (95% tingkat kepercayaannya) (Wolny *et al.*,2009). ROS dapat mengurangi aktivitas IR kinase, fosfatase phosphotyrosine seluler (PTPases) memainkan peran sentral dalam down-regulasi aktivitas IR kinase dan Cascade, sehingga mengakibatkan signal menurun dan aktivitas reseptor dengan ligan juga mengalami penurunan, sehingga mengganggu proses proliferasi sel,diferensiasi dan jalur siklus sel yang lain (Papaconstantinou, 2009).

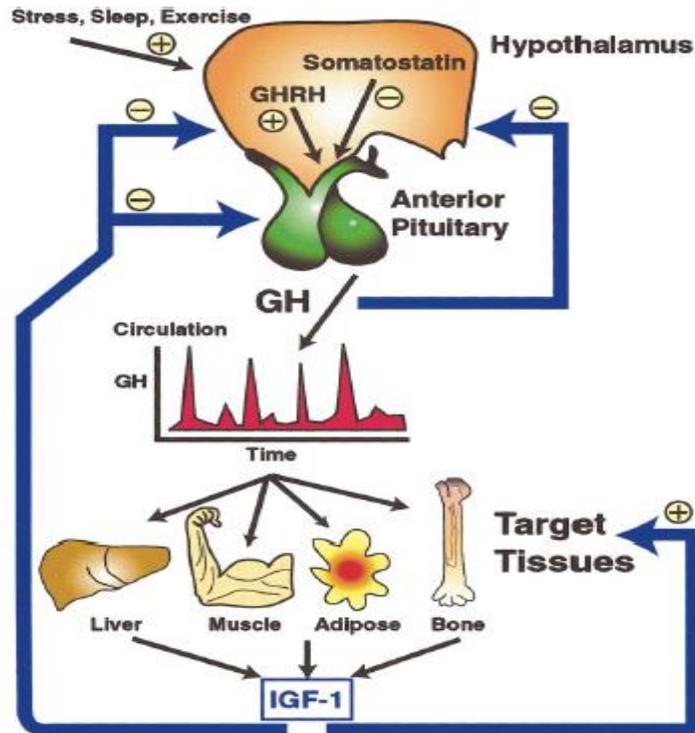
2.3 GROWTH HORMONE (GH)

Growth hormone (hormon pertumbuhan) merupakan hormon yang memiliki peran utama dalam mengatur pertumbuhan makhluk hidup dan dihasilkan oleh hipofisis anterior. Struktur *Growth hormone* terdiri dari 191 asam amino yang merupakan *polipeptida* (Marks *et al.*,2000).

Growth hormone berperan dalam pertumbuhan tulang dan metabolisme tubuh lainnya (gambar 2.12). Pengendalian ekspresi dan sekresi *growth*

hormone, terkait dengan Nutrisi, olahraga, istirahat, imunitas, metabolisme protein, regulasi lemak, pertumbuhan sel somatik dan hormon lainnya (*GHreleasing hormone* (GHRH) dan *somatostatin*). Defisiensi atau hiposekresi dari *growth hormone* pada masa kanak-kanan, dapat mengakibatkan terjadinya *kritinisme* atau *dwarfisme*, sedangkan hipersekresi dari *growth hormone* yang tidak terobati, hingga akhir dari masa pubertas, dapat menyebabkan *gigantisme* (Kopchick *et al.*,2000a).

Produksi growth hormone dua kali lipat diproduksi pada masa pubertas, yang dapat berefek terhadap tinggi badan (Berk,2012). *Growth hormone* tidak berperan lagi pada pertumbuhan tulang jika, pertumbuhan linear telah berhenti pada masa dewasa, akan tetapi peran *growth hormone* tetap berjalan dalam metabolisme protein, karbohidrat dan lemak. *Growth hormone* banyak memiliki efek pada kerja endokrin insulin, seperti IGF-1 yang distimulus dari *growth hormone*, selain itu berefek pada paracrin dan autokrin juga. Berdasarkan penelitian diperoleh kesimpulan bahwa *growth hormone* dan IGF-1 bertanggung jawab terhadap pertumbuhan tikus. Hal tersebut dikarenakan hormon dan faktor pertumbuhan, yang diperankan oleh *growth hormone* dan IGF-1, keduanya mengatur proses remodeling tulang, metabolisme pertumbuhan sel, termasuk replikasi dan diferensiasi (Perez *et al.*,1999; Kopchick *et al.*,2000; Kopchick *et al.*,2000). *Growth hormone* dan IGF-1 berperan terhadap pertumbuhan postnatal. IGF-I merupakan mediator aksi *growth hormone* saat postnatal (Baker *et al.*,1993).



Gambar 2.12 Sekresi dan aksi dari *growth hormone*.

Keterangan: Hipotalamus berperan terhadap produksi dari somatostatin dan GHRH, serta mengontrol sekresi dari *growth hormone*, setelah berikatan dengan reseptornya, *growth hormone* mempengaruhi jaringan target yaitu hati, otot, jaringan adipose dan tulang, sehingga dapat berpengaruh terhadap meningkatnya konsentrasi serum IGF-1, dalam hal ini memiliki efek terhadap pertumbuhan dan respon jaringan (Kopchick *et al.*,2000).

Growth hormone berperan dalam mengikat reseptor pada transmembran, ikatan tersebut dapat memediasi terjadinya percepatan, perlambatan fungsi sel, sehingga dapat mempengaruhi jaringan target dan sistem organ secara keseluruhan. *Growth hormone*, merupakan hormon yang diproduksi pluripoten dari kelenjar hipofisis jenis teleosts, seperti halnya pada hewan vertebrata lainnya (Reinecke *et al.*,2005).

2.4 IGF-1 (*Insulin Like Growth factor-1*)

2.4.1 Pengertian IGF-1

IGF-1 adalah polipeptida mitogenik yang memainkan peran penting dalam regulasi perkembangan dan pertumbuhan somatik dari vertebrata (Moriyama *et al.*, 2000). Ligan IGF terdiri dari 2 macam yaitu; IGF-1 (*Insulin Like Growth*

Factor-1), Terdiri dari 70 Asam Amino, lokasinya hampir seluruh sel somatic. Reseptor IGF-1 mengikat reseptor tirosin kinase, yang kadarnya menurun saat prenatal dan meningkat pada saat postnatal. Sedangkan IGF-2 (*Insulin Like Growth Factor-2*) terdiri dari 67 Asam Amino, lokasi Hati, otak, otot, saluran cerna, ginjal dan lain sebagainya. Reseptor IGF-2 mengikat IGF2 sehingga ligan mengalami degradasi. IGF-2 meningkat pada saat prenatal dan menurun saat postnatal (Berperan dari awal embriogenesis)(Wood *et al.*,2005).

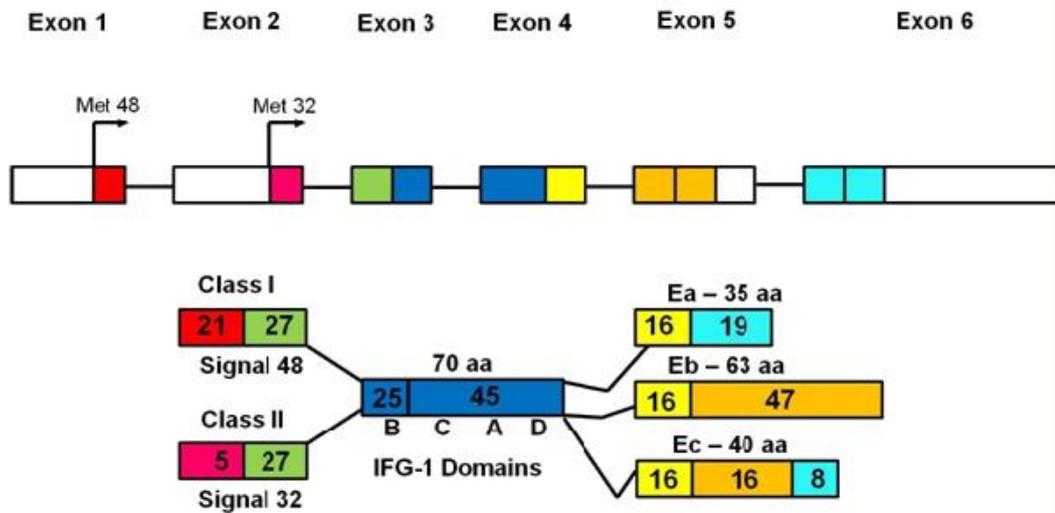
Menurut Rahmat, *et al.* (2007) IGF-1 adalah protein yang dilepas liver (75 %). Protein tersebut terbukti bisa meningkatkan sensitivitas ovarium (indung telur), untuk menampung rangsangan hormon yang akan meningkatkan ovulasi, sehingga ovulasi ganda dapat dilakukan sekaligus. IGF-1 merupakan regulator untuk pertumbuhan folikel dan peningkatan aktifitas gonadotropin pada ovary (Armstrong & Webb, 1997).

Protein IGF-1 berperan sebagai sinyal untuk meningkatkan produksi susu, pembelahan sel, embryogenesis dan mengontrol folikulogenesis, serta mampu menghasilkan potensi besar, stabilitas dan spesifitas pada jaringan. Selain itu Peran IGF-I matur, memediasi faktor pertumbuhan untuk otot dan tulang (Bikle *et al.*, 2015). Membuat Endokrin stabil dalam kompleks tersier dengan ALS (asam-labil subunit) dan IGF-1 mengikat protein 3 (IGFBP3) (Curi *et al.*,2005; Siadkowska *et al.*,2006)

2.4.2 Struktur IGF-1

IGF-1 merupakan dua ligand dari familli IGF (Spicer, 2004) berupa satu peptide kecil mengandung 70 asam amino dengan berat molekul 7649 kDa (gambar 2.13) dan homolog dengan IGF-II, proinsulin dan relaksasi. IGF-1 awalnya dikenal sebagai somatomedin C dan merupakan mediator GH. IGF-1

merangsang sintesis DNA dan sekresi E2 basal pada sel granulosa dan luteal (Laron, 2001).



Gambar 2.13. Struktur IGF-1 pada manusia (ChemNet, 2008).

2.4.3 Fungsi IGF-1

Fungsi gen IGF-I mengatur pertumbuhan sel somatic, merangsang perkembangan dan penghambat beberapa apoptosis sel, termasuk otot, tulang, epitel dan sel fibroblast (Wu *et al*, 2008). Gen IGF-I juga memediasi rangsangan aksi pembelahan sel dan proses metabolisme, yang berhubungan dengan deposisi protein. Gen IGF-I menstimulasi metabolisme protein dan berperan penting terhadap fungsi beberapa organ (Pereira *et al*, 2005 dalam Rubaeah, 2012).

Berdasarkan penelitian Shoshana *et al*, 2017 tentang Tingkat sirkulasi IGF-1 secara langsung mengatur massa otot, pertumbuhan tulang dan kepadatannya, diperoleh hasil bahwa konsentrasi ambang beredar IGF-1 diperlukan untuk pertumbuhan tulang yang normal, dikarenakan efek IGF-1 merangsang pertumbuhan linear somatik dan diferensiasi, berat badan dan pertumbuhan jaringan (Yanusaga *et al*, 2002; Garrone *et al*, 2002). IGF (*Insulin Like Growth Factor*) yang terdiri dari komponen (ligan, protein dan reseptor),

merupakan faktor pertumbuhan penting dalam pengembangan organisme dan pemeliharaan fungsi normal dari banyak sel-sel tubuh, serta memiliki efek anti-apoptosis kuat (LeRoith *et al.*, 2003).

2.4.4 Kadar IGF-1

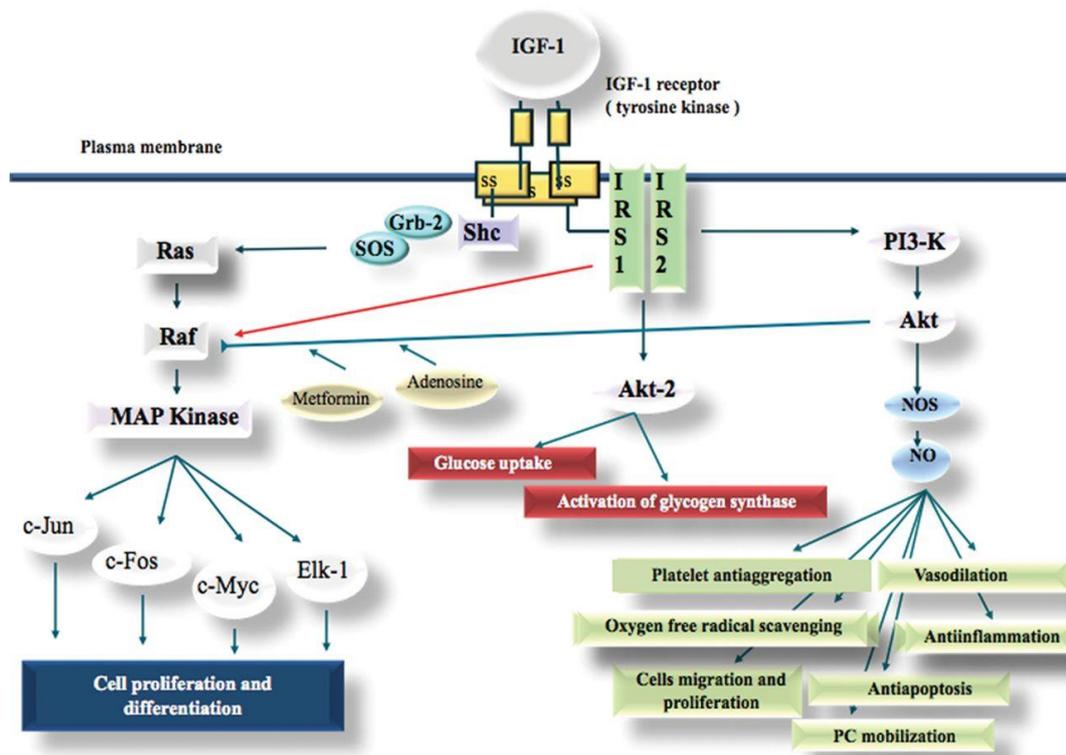
Beberapa faktor yang mempengaruhi kadar IGF-1 yaitu; pertama faktor umur. Bayi baru lahir memiliki kadar IGF-1 yang rendah, kemudian mulai meningkat pada fase anak-anak dan mencapai kadar yang tinggi pada fase pubertas, kemudian menurun sejalan dengan bertambahnya usia. Faktor kedua yaitu Jenis kelamin. Pada wanita kadar IGF-1 terlebih dahulu meningkat dibandingkan dengan laki-laki, dikarenakan fase pubertas terjadi pada wanita terlebih dahulu dibandingkan pada laki-laki. Faktor yang ketiga adalah nutrisi, faktor ini sangat berpengaruh terhadap sekresi dari IGF-1 (McMurtry, 1998).

Pada perkembangan *zebrafish* menunjukkan tingkat IGF-1 mRNA rendah sepanjang periode embrionik, akan tetapi terjadi peningkatan drastis pada fase larva (pertumbuhan anterior kepala pada saat perkembangan larva) (Wood *et al.*, 2005).

2.4.5 Jalur Molekuler IGF-1

IGF-I memiliki peran utama dalam perkembangan, modulasi pertumbuhan dan mempertahankan keadaan yang fisiologis. Termasuk pada otot rangka dan tulang. Terdapat respon yang sinergis antara IGF-1 dengan reseptornya dalam meningkatkan massa otot dan kepadatan tulang. Signaling IGF-I berperan penting untuk pengembangan kerangka selama pertumbuhan pasca-natal. Signaling IGF-I di butuhkan dalam menentukan pola skeletal, termasuk pada ukuran dan bentuk tulang, sementara tingkat pertumbuhan tulang terutama tergantung pada proliferasi, kelangsungan hidup, dan diferensiasi sel khondrogenik dan osteogenik. PI3K / AKT jalur mempromosikan kelangsungan

hidup sel seperti dengan banyak jaringan. Aktivasi dari AKT cukup untuk menginduksi hipertrofi *in vivo* melalui peningkatan luas penampang rata-rata serat otot individu yang disebabkan oleh peningkatan aktivasi jalur sintesis protein. Bahkan, hipertrofi yang disebabkan oleh AKT lebih aktif dibandingkan stimulasi IGF-I. Jalur intraseluler yang diaktifkan oleh IGF-1 (jalur Ras-Raf-ERK) telah terbukti meningkatkan proliferasi sel dalam sel otot (gambar 2.14) (Bikle *et al.*,2015).



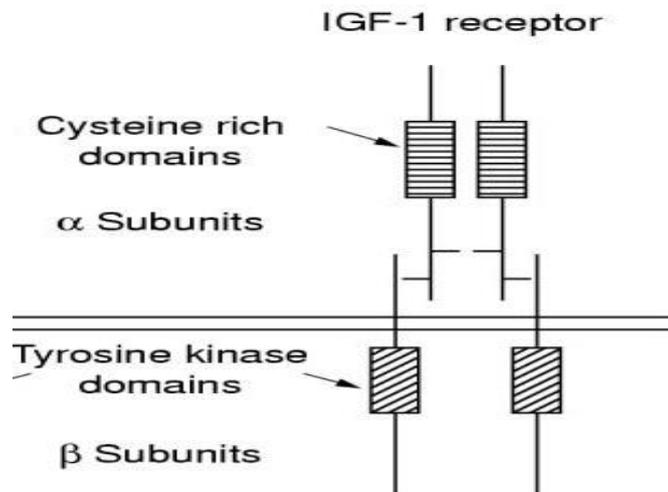
Gambar 2.14 Jalur sinyal transduksi IGF-1 dan Pi3K/MAPK

Keterangan : Jalur sinyal transduksi IGF-1, berperan terhadap proliferasi dan diferensiasi sel dan efek ke jaringan (Conti *et al.*,2011).

2.5 IGF-1R (*Insulin Like Growth Factor-1 Reseptor*)

Insulin like growth factor-1 Reseptor termasuk dalam reseptor tirosin kinase dengan bentuk dimer. Reseptor ini terdiri dari 2 sub unit α dan 2 sub unit β yang berhubungan dengan ikatan disulfide. Rantai α berada di bagian ekstraseluler dan merupakan domain ikatan insulin, sedangkan rantai β berada menembus membran. Dengan adanya ikatan ligan (insulin) pada sub unit α

reseptornya akan menyebabkan subunit β mengalami autofosforilasi yang akan memicu aktivitas katalitik reseptornya (gambar 2.15).



Gambar 2.15 IGF-1 Reseptor

Keterangan : IGF-1R memiliki 2 sub α berada pada ekstraseluler dan β berada intraseluler (Laron,2001).

2.6 IRS (*Insulin Reseptor Substrat*)

2.6.1 Pengertian IRS

IRS (*Insulin reseptor substrat*), dalam hal ini IRS-1 merupakan salah satu protein yang menjadi efektor utama bagi reseptor insulin. Memiliki peran penting dalam memediasi ligan insulin intraseluler (Ozoe *et al.*,2013).

2.6.2 Fungsi IRS

IRS-1 terfosforilasi akan memicu jalur signaling, yaitu :

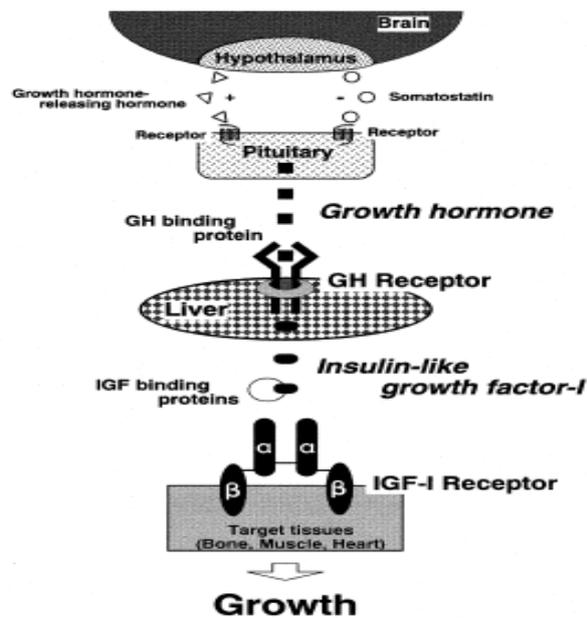
1. Jalur IRS/PI3-K (Phosphatidylinositol 3 kinase), melalui proses awal yaitu mengikat protein SH2 Homolog, mengkativkan PI3K, Grb-2/SOS secara kompleks. Jalur ini memiliki fungsi yaitu translokasi GLUT-4, transporter glukosa dari sitoplasma menuju membran sel, kemudian memfasilitasi transport glukosa masuk ke dalam sel. Jalur ini mengarah pada sintesis glikogen, protein dan lipid.
2. Jalur Ras/MAPK (Mitogen-aktivatd protein kinase). Jalur ini mengarah pada pertumbuhan dan proliferasi sel serta ekspresi gen secara umum.

3. Jalur Cbl/CAP. Jalur ini juga berkontribusi terhadap proses translokasi GLUT-4 ke membran sel (Haruta *et al.*,2000; Bikle *et al.*,2015).

Fungsi IRS secara biologis adalah mengatur jalur sinyal transduksi dalam proses metabolisme dan mitogenik. Berdasarkan penelitian, pada tikus KO (*Knocked Out*) ditandai adanya kekurangan IRS-1, menunjukkan adanya gangguan pertumbuhan dan mengalami penurunan berat badan sebesar 50 % dari berat pada tikus normal (Gual *et al.*,2005).

2.7 Kaitan *Growth Hormone*, IGF-1 dan IGF-1 Reseptor yang Memediasi Pertumbuhan

Hipotalamus menghasilkan polipeptida antagonis, *growth hormone-releasing hormone* dan penghambat hormon pertumbuhan atau *somatostatin*. Hipotalamus berperan dalam mengatur stabilitas hormon, sedangkan kelenjar pituitary menghasilkan *growth hormone*. *Growth hormone* berikatan dengan reseptornya pada permukaan organ target, terutama pada hati dan merangsang sintesis, serta pelepasan *insuline like growth faktor-1 (IGF-1)*. IGF-1 berperan dalam regulasi lipid, protein, karbohidrat, metabolisme mineral didalam sel, dan berperan penting dalam pertumbuhan sel somatik. Peran IGF-1 tersebut dimediasi oleh reseptor IGF, berpengaruh pada berbagai jaringan, seperti otak, otot,tulang,jantung, ginjal, dan usus juga memproduksi IGF-1 secara lokal, sedangkan pada hati merupakan organ utama yang memproduksi IGF-1 (gambar 2.13). Pada mamalia *growth hormone* berperan dalam meregulasi IGF-1, begitupula pada jenis teleost (ikan), *growth hormone* adalah regulator utama produksi IGF-1 dan status gizi juga memiliki peran dalam aksi *growth hormone* dan IGF-1 pada ikan (Moriyama *et al.*,2000).



Gambar 2.16 Skema Regulasi *Endocrine* Pada Pertumbuhan

Keterangan: Reseptor transmembran memediasi aksi dari hipotalamus adalah hormon, *growth hormone* dan IGF-1. Sirkulasi *growth hormone* dan IGF-1, terkait erat pada darah khususnya pada Binding Proteins (Moriyama *et al.*, 2000).

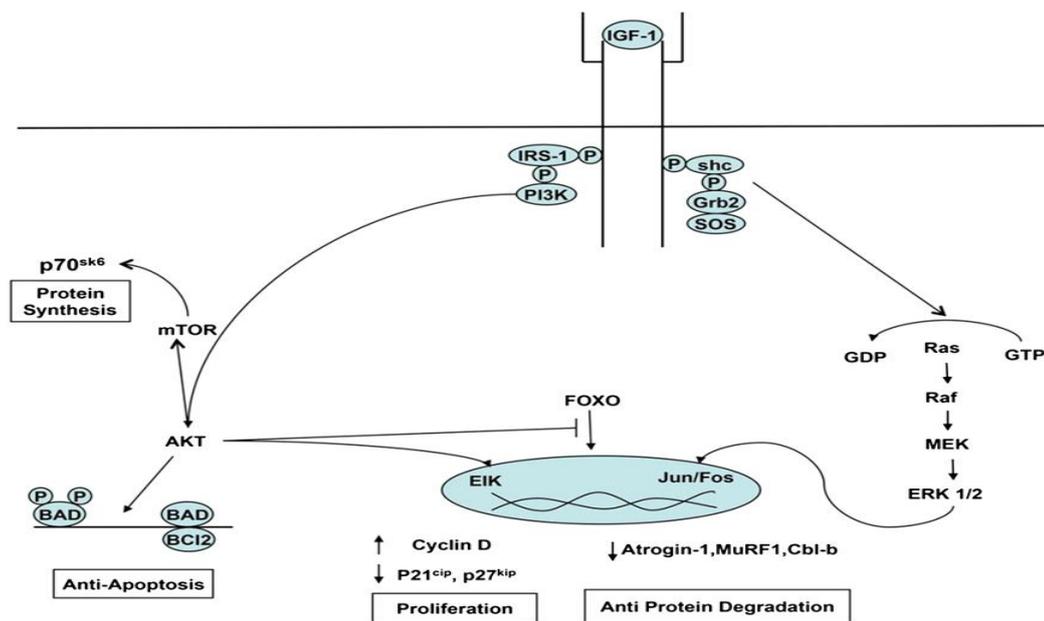
2.8 Kaitan IGF-1 dan IRS dengan *Stunting*

IGF-1 memiliki peran penting dalam menstimulus fosforilasi IRS-1, melalui aktivasi PI3Kinase, membentuk jalur signal Akt (gambar 2.16), sehingga dapat berperan dalam diferensiasi osteoblast, regulasi glukosa, metabolisme protein, lemak, pertumbuhan dan perkembangan embrio, serta pertumbuhan somatik saat postnatal (Ozoe *et al.*, 2013; Xi *et al.*, 2016). IGF-1 secara fisiologis memediasi sebagian tindakan hormon pertumbuhan, menjadi promotor utama pertumbuhan longitudinal serta metabolisme tulang rawan (Leger *et al.*, 1996). Tingkat IGF-1 yang menurun terdapat pada anak-anak yang kekurangan gizi (Palacio *et al.*, 2002), dikarenakan efek IGF-1 merangsang pertumbuhan linear somatik dan diferensiasi, berat badan dan pertumbuhan jaringan (Yanusaga *et al.*, 1998; Garrone *et al.*, 2002).

Penelitian Mamabolo *et al.*, 2007 mengevaluasi tingkat faktor pertumbuhan dan hubungan status gizi dengan penekanan pada *stunting* anak usia 1 dan 3

tahun. Diperoleh hasil bahwa analisis faktor pertumbuhan seperti (IGF) -1, IGF mengikat protein (BP) -1, IGFBP-3, leptin, glukosa dan insulin, pada anak-anak usia 1 tahun dengan *stunting*, memiliki kadar leptin lebih rendah sementara tingkat IGFBP-1 mereka lebih tinggi dibandingkan anak normal. IGF-1 terlibat dalam mengendalikan sekresi leptin pada individual dengan gizi kurang. Pembatasan protein telah terbukti menurunkan konsentrasi IGF (Mamabolo *et al.*,2007).

Terjadinya kecacatan pada sinyal dari reseptor hormon pertumbuhan, menyebabkan Mutasi gen STAT5b, dengan adanya mutasi tersebut menyebabkan pertumbuhan abnormal postnatal, dysmorphism wajah, dan menyebabkan berkurang atau rendahnya konsentrasi dari IGF-I, IGFBP-3, dan subunit asam-labil termasuk pada IRS serta terjadi ketidakpekaan hormon pertumbuhan (Kofoed *et al.*,2003).



Gambar 2.17 Peran IGF-1 dengan IRS

Keterangan : IGF-1 dan IRS berperan dalam Anti Apoptosis, Proliferasi dan anti protein degradation (Laron, 2001).

Mekanisme yang dapat terjadi dalam proses interaksi antara IGF-1 dengan IRS adalah *up regulation*, yaitu dengan adanya peningkatan efek secara biologis, dimediasi dengan adanya peningkatan reseptor, ikatan antara ligan dan

reseptor dapat berjalan dengan optimal (LeRoith *et al.*, 2003). Akan tetapi dalam kondisi tertentu, dapat terjadi *down regulation*, yaitu dengan adanya penurunan efek biologis, dimediasi dengan adanya penurunan reseptor sehingga signal menurun dan aktifitas reseptor dengan ligan juga menurun, hal tersebut dapat dikarenakan adanya gangguan dari faktor lain, seperti terjadinya peningkatan ROS dan terjadinya stress oksidatif dalam jangka waktu lama dengan konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan signal *downstream* sehingga menurunkan respon insulin. Penelitian menunjukkan bahwa ekspresi yang berlebih dari gen *klotho* pada tikus, dapat memperpanjang rentang hidupnya. *Klotho* protein berfungsi sebagai hormon yang berperan dalam mengikat reseptor sel-permukaan dan mengekspresi sinyal intraseluler insulin dan insulin-like growth factor 1 (IGF1), selain itu peningkatan ekspresi gen, juga dapat menunjukkan penurunan reseptor dan aktifitas signal insulin, terkait dengan penuaan dan usia lanjut (Kurosu *et al.*,2005). Sedangkan *cross talk* dapat terjadi jika terjadi gangguan antara ligan dengan reseptor, memacu peran dari jalur lain. Stres oksidatif menunjukkan potensi penting pada *crosstalk* jalur signal IGF1 dengan jalur signal ROS yang memidiasi terjadinya penuaan/ aging. Berdasarkan penelitian pada tikus KO bahwa modulasi signal IGF-1 yang dihasilkan dari mutasi reseptor dan mempengaruhi peran IRS dalam memediasi terjadinya jalur signal Pi3K, Akt, dan protein lainnya (Blüher *et al.*, 2003; Holzenberger *et al.*, 2003). Dalam sebuah studi menyebutkan bahwa ekspresi IRS-1 meningkat dikarenakan adanya koordinasi dari reseptor insulin dan Glut 4 (Papaconstantinou, 2009).

2.9 Pegagan (*Centella Asiatica*)

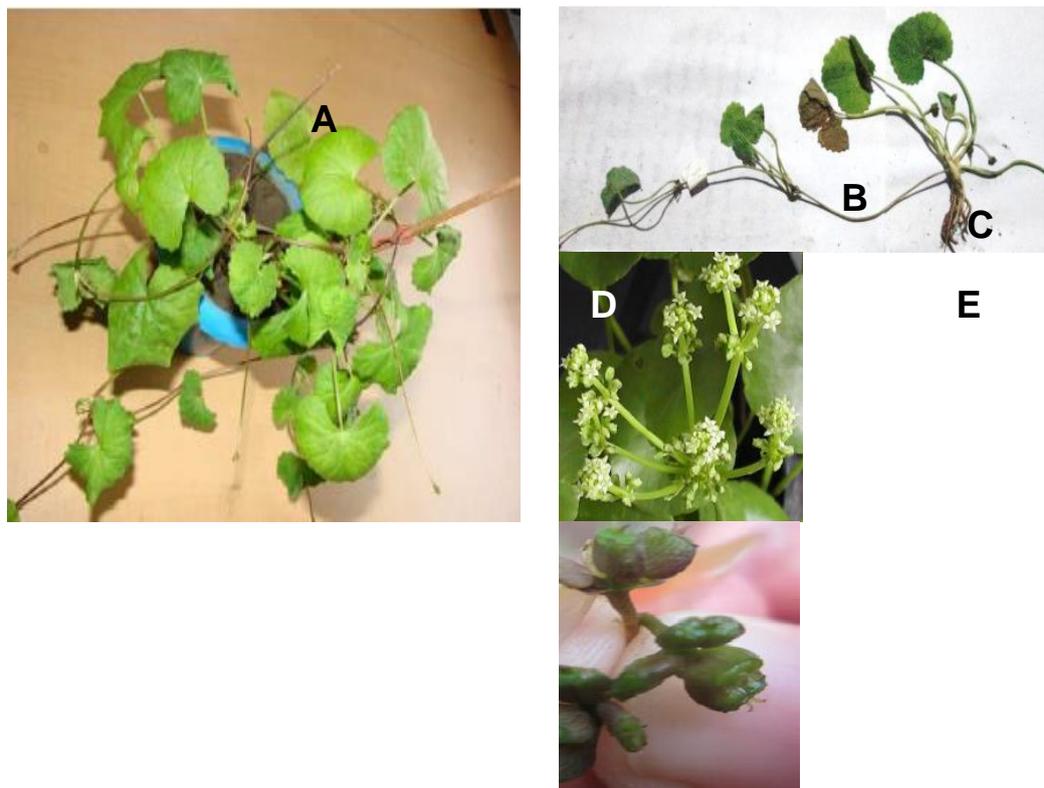
2.9.1 Klasifikasi Pegagan

Tabel 2.1 Klasifikasi pegagan

Klasifikasi	Keterangan
Kingdom	Plantal

Subkingdom	Embryophyta
Division	Spermatophyta
Subdivision	Angiospermae
Klas	Dicotyledonae
Subklas	Rosidae
Suborder	Araliales
Order	Araliales
Family	Apiaceae
Subfamily	Hydrocotyle
Genus	Centella
Species	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban

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



Gambar 2.18 Penampilan Fisik (*Centella asiatica* (L.) Urban.).

Keterangan: A. Daun, B. Batang, C. Akar, D. Bunga dan E. Buah (Badan POM RI, 2008; Joshi & Caturvedi, 2013; Rohmawati, 2015).

Pegagan dikenal dengan nama latin *Centella asiatica* (L.) Urban. atau *Hydrocotyle asiatica* Linn. Pegagan termasuk ke dalam famili *Umbelliferae* (*Apiaceae*). Pegagan memiliki nama asing *asiatic pennywort* dan *Indian pennywort*. Pegagan memiliki nama Hindi (India) *gotu kola*, di Cina pegagan

disebut *jixue cau*, di Belanda disebut *paardevoet*, sedangkan di Indonesia, pegagan memiliki nama yang beragam, diantaranya pegago (Minangkabau); antanan gede, antanan rambat (Sunda); ganggagan, kerok batok, pantegowang, panegowang, rendeng, calingan rambat, pegagan, atau gagan-gagan (Jawa); taidah (Bali); balele (Sasak, Nusa Tenggara); kelai lere (Sawo, Nusa Tenggara); wisu-wisu, pegaga (Makasar); daun tungke-tungke, cipubalawo (Bugis); hisuhisu (Aselayar, Sulawesi); kos tekosan, gan gagan (Madura), sarowati, kori-kori (Halmahera), kolotidi menora (Ternate), dan dogakue, gogakue, atau sandanan (Irian). Pegagan sering disebut daun kaki kuda, hal ini dikarenakan bentuk daun pegagan yang menyerupai bentuk kaki kuda (Rohmawati, 2015).

2.9.2 Habitat dan Morfologi Pegagan

1. Habitat

Pegagan merupakan tanaman liar yang banyak ditemukan didaerah teduh, berawa, tempat yang lembap dan basah, seperti disekitar sawah dan sungai, atau hidup didekat sumber air. Pegagan dapat tumbuh pada berbagai macam jenis tanah, seperti tanah lembap, tanah berpasir, tanah lempung, dan tanah kaya humus. Habitat pegagan umumnya didaerah tropis dan sub tropis. Tersebar di Asia Tenggara (Indonesia), India, Tiongkok, Jepang dan Australia (Nurjanah, 2008; Das, 2011).

Pegagan merupakan tanaman herba tahunan yang tumbuh di daerah tropis dan berbunga sepanjang tahun (Rohmawati, 2015). Pegagan merupakan tanaman obat yang dapat dikonsumsi sebagai sayuran, memiliki bau aromatik karena adanya kandungan minyak esensial yaitu resin pada organ tubuhnya, Tanaman obat ini mudah untuk dibudidayakan dan diperbanyak secara vegetatif. Tanaman pegagan di habitat aslinya banyak tumbuh di ladang, perkebunan, tepi

jalan maupun di pekarangan. Tanaman yang berasal dari Asia tropik ini menyukai tanah yang agak lembab, cukup sinar atau agak terlindung. Pegagan mempunyai kisaran agroekologi yang luas dari dataran rendah hingga dataran tinggi sampai dengan ketinggian 2500 m dpl (Musyarofah *et al.*,2007; Das,2011).

2. Morfologi

Pegagan termasuk dalam tumbuhan terna. Tumbuhan terna merupakan tumbuhan yang tumbuh menjalar dan bercabang-cabang membentuk tumbuhan baru yang berumpun menutupi tanah. Batang pegagan lunak dan beruas, setiap ruas tumbuh akar dan daun dengan tangkai daun yang panjang. Akar berwarna putih, dengan rimpang pendek dan stolon yang merayap dengan panjang 10 cm sampai 80 cm. Stolon merupakan tunas horizontal yang tumbuh disepanjang permukaan tanah (Campbell *et al.*,2010). Stolon memungkinkan pegagan untuk bereproduksi secara aseksual, seiring terbentuknya anak tumbuhan pada setiap nodus batang tumbuhan. Pegagan (memiliki sistem akar tunggang. Akar pokok atau batang akar dapat dibedakan dengan jelas dengan cabang-cabangnya, hal ini disebabkan karena pertumbuhan akar pokok jauh lebih cepat daripada pertumbuhan cabang. Batang akar sangat jelas terlihat, karena akar lembaga tumbuh terus menjadi batang akar pokok yang bercabang-cabang menjadi akar-akar yang lebih kecil. Akar pokok yang berasal dari akar lembaga disebut akar tunggang (*radix primaria*). Bentuk akar tunggang pada pegagan yaitu berbentuk seperti benang (*filiformis*). Akar tunggang berbentuk kecil panjang seperti akar serabut dan sedikit percabangan (Rosanti, 2013).

Daun tanaman Pegagan tumbuh dari setiap buku, berupa daun tunggal. Terdapat 2-10 daun berbentuk ginjal dengan tepi daun beringgit bergerigi terutama kearah pangkal daun, berwarna hijau pada setiap buku dan dan bundar dengan garis tengah 1 sampai 7 cm. Struktur daun pegagan merupakan daun

lengkap, karena memiliki pelepah pada tangkai daunnya, Tangkai daun panjang sampai 50 mm. Daun pelindung berjumlah 2 dengan panjang 3 sampai 4 mm dan berbentuk bundar telur. Tajuk berwarna merah lembayung, panjang 1 mm sampai 1.5 mm, lebar sampai 0.75 mm. Tipe daging daun pegagan yaitu tipis seperti kertas, dengan tekstur permukaan atas daun licin dan tekstur permukaan bawah daun kesat berkerut. Bunga pegagan biseksual, pada umumnya berjumlah 3, yang ditengah duduk, yang disamping bertangkai pendek, memiliki putik, benang sari dan daun pelindung. Mahkota bunga berwarna merah muda sampai keunguan. Buah pegagan merupakan buah sejati tunggal kering yang berbelah (*schizocarpium*). Buah berbentuk pipih lebar, dengan lebar lebih kurang 7 mm dan tinggi lebih kurang 3 mm bertekuk (beruang) dua, jelas berusuk, dan berdinding agak tebal, berwarna kuning kecoklatan, dan berdinding agak tebal. Setiap lekuk (ruang) terdapat satu biji, ketika biji masak buah akan pecah, tetapi biji tidak dapat keluar (Nurjanah, 2008).

2.9.3 Kandungan Pegagan

Pegagan mengandung fitonutrien yang penting, yaitu terdiri dari triterpenoid, karotenoid, glikosida, flavonoid, alkaloid dan minyak atsiri (Chandrika *et al.*, 2015). Pegagan mengandung pentacyclic triterpenoid saponins dalam jumlah besar, secara umum dikenal dengan sebutan centelloids. Terpenoid terdiri dari asiaticoside, madecassoside, centelloside, brahminoside, brahmoside, sceleffoleoside, madecassic, centellose, asiatic-, asam centellic-, brahmic-, dan thankuniside. Triterpenoid merupakan salah satu bahan alami yang berasal dari metabolit sekunder, sehingga sering digunakan dalam penelitian di bidang pertanian, kedokteran dan industry, mengenai aktivitas secara biologi suatu zat, sintesis dan biosintesis. Bahkan lebih dari 40% produk alami digunakan sebagai obat, termasuk produk dari terpena dan terpenoid

derivatif. Berdasarkan hasil studi literature, ekstrak dari *centella asiatica* terdiri dari, " TECA (*titrated extract of centella asiatica*), TTFCA (*total triterpenoid fraction of centella asiatica*) dan TTF (*total triterpenoid fraction*)". Kombinasi dari TECA dan TTFCA mengandung asam madecassic (30%), asam Asiatik (30%), dan asiaticosides (40%), sedangkan pada TTF mengandung asam madecassic dan asam asiatik (60%) dan asiaticosides (40%) (James *et al.*, 2009).

Triterpenoid terdapat pada bagian daun *centella asiatica* dengan kandungan sebanyak; 3.10 ± 4.58 mg/mL (madecassic acid), 1.97 ± 2.65 mg/ML (asiticoside), hasil pengukuran tersebut menggunakan HPLCPAD pada Excil ODS 5 μ m (C18) (James *et al.*, 2009). Selain itu, triterpenoid juga terdapat pada batang *centella asiatica* dengan kandungan sebanyak; 5.3 mg/mL (madecassoside), 2.6 mg/mL (asiticoside), dan 3.4 mg/mL (asitic acid) (Orhan, 2012).

Tabel 2.2. Hasil Ekstrak *Centella asiatica*, kandungan kimia serta penggunaannya

Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	Kandungan kimia	Penggunaan dalam pengobatan
Titrated Extract dari <i>Centella asiatica</i> (TECA)	55-66% Genins 34-44% Asiaticoside	Produk pelangsing, menghilangkan stretch marks, anti selulit, menghilangkan bekas luka pada kulit, bahan kosmetik sebagai anti penuaan, krim payudara, pelembab kulit
Asiatic acid	>95% Asiatic acid	Penggunaan dalam terapi laser, bahan kosmetik sebagai anti penuaan
TECA cosmetics	>40% Genins > 36% Asiaticoside	Menghilangkan stretch marks, Produk pelangsing, anti selulit, pelembab kulit , bahan kosmetik sebagai anti penuaan, krim payudara, menghilangkan bekas luka pada kulit
Heteroside	>55% Madecassoside >14% Asiaticoside	Bahan kosmetik anti proses penuaan, krim pelembab untuk malam hari.
Genins	>25% Asiatic acid >60% Madecassic acid	Anti bacterial, antibiotik alami, bahan untuk membersihkan organ kelamin bagian luar dan anti jerawat.
Asiaticoside	>95% Asiaticoside	Anti alergi, anti inflamasi dan pengobatan pada iritasi kulit

Keterangan : Hasil ekstrask *centella asiatica* kandungan Asiaticoside >95% dan berguna terhadap pengobatan inflamasi (James *et al.*, 2009)

Kandungan lain dari *Centella asiatica* adalah karotenoid, yaitu merupakan hidrokarbon yang berperan sebagai antioksidan kuat. Terdapat empat kandungan utama yaitu; Neoxanthin, β -karoten, Violaxanthin, dan Lutein (terdapat kandungan antioksidan). Glikosida yang terkandung dalam *Centella asiatica* tersimpan dalam bentuk tidak aktif, sehingga dapat diaktifkan melalui proses *hidrolisis*. Glikosida terdiri dari asiaticoside, centelloside, dan madecosside. Pada proses hidrolisis menghasilkan asam trepene, asam asiatik, dan asam centellic dalam bentuk bebas dan asam madegascari. Flavonoid merupakan antioksidan penting yang diperlukan oleh tubuh manusia (Chandrika *et al.*, 2015).

Tabel 2.3. Komposisi Nutrisi yang terkandung dalam *Centella asiatica*

Komposisi	Nilai
Moisture	84,6 %
Protein	2,4 %
Fiber (Per 100 g) (Insoluble dietary)	5,43 g
Soluble dietary	0,49 g
Mineral content	
Ca (mg/ 100 g)	174
P	17
K	345
Na	107.8
Mg	87
Fe	14,86
Zn	0,97
Cu	0,24
Cr	0,046
Vitamin (mg/ 100 g)	
Asam Askorbit	11
Thiamin	0,04
Caroten	25,93
B Caroten	3,90

Keterangan: *Centella asiatica* banyak mengandung moisture, kandungan mineral yang paling banyak adalah kalium dan untuk vitamin adalah Caroten (Joshi & Caturvedi, 2013).

Berdasarkan hasil penelitian Abou-Chaar (1963) dalam James *et al* (2009), menyatakan bahwa efek toksik dapat timbul pada tikus dan kelinci yang diberi paparan asiaticoside, secara intramuskuler dengan dosis 40-50 mg/kgBB. Akan tetapi, dalam sebuah penelitian menunjukkan bahwa penggunaan

asiaticoside dengan dosis 1 gr/kgBB belum terbukti adanya reaksi toksik, bahkan dari keseluruhan percobaan secara kimia, dengan penggunaan ekstrak dari *centella asiatica* atau asiaticoside masih menunjukkan toleransi yang baik. Dengan pemberian suntikan madecassol, yang merupakan ekstrak *centella asiatica*, dengan kandungan asam Asiatik 29-30%, asiaticoside 40%, dan asam madasiatic 1%, diperoleh hasil tidak menunjukkan adanya kasus intoleransi. (James *et al.*,2009).

2.9.4 Manfaat utama pegagan dalam kesehatan

Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban.) telah lama digunakan di daerah timur untuk keperluan farmakologi. Pegagan memiliki khasiat untuk mengobati penyakit kulit, menyembuhkan luka, untuk revitalisasi saraf dan sel-sel otak, karena itu di India pegagan dikenal sebagai "*Brain food*" (Vasantharuba *et al.*, 2012). Bagian tanaman yang dapat dikonsumsi sebagai sayuran adalah daun, sedangkan yang berfungsi obat adalah seluruh bagian tanaman kecuali akar (Dalimartha, 2000)

Asiaticosida, Asiatic acid, madekasid, steroid (madekasoid, sitosterol, dan stigmasterol) serta saponin (brahmosida, brahminosida, dan valerian) merupakan kandungan yang banyak ditemukan pada daun Pegagan. Kandungan Centella Asiaticoside Selected Triterpenoid (CAST) terutama asam asiatikosida (glikosida asiaticosida) berkhasiat untuk revitalisasi tubuh dan otak (Wahyuno *et al.*, 2015)

Kandungan karatenoid pada *centella asiatica* juga merupakan antioksidan kuat sehingga, dapat mencegah stress oksidatif, meningkatkan system imunitas, mencegah kanker dan penyakit jantung atau penyakit degenerative lainnya (Chandrika *et al.*, 2015).

2.9.5 Efek Farmakologi Pegagan

1. Antioksidan

Pegagan merupakan antioksidan kuat yang dapat menghambat terjadinya stress oksidatif, stress oksidatif dapat terjadi dikarenakan adanya ketidakseimbangan antara pro-oksidan dengan antioksidan, sehingga menimbulkan kerusakan pada sel. Antioksidan utama yang mampu membersihkan radikal bebas seperti ROS adalah Vitamin A, C dan E, asiaticoside, karatenoid Glutathione, selenium, zink dan lain sebagainya, serta enzim antioksidan SOD (Superoxide dismutase), GPX (Glutathione peroxide) dan CAT (Catalase) (Young & Woodside, 2001; Bosnak *et al.*,2010).

Berdasarkan penelitian Frethernety et al (2015), diperoleh hasil bahwa pemberian kombinasi ekstrak Etanol *Acalypha indica* dosis 200mg/kgBB dan *Centella asiatica* dosis 150mg/kgBB, yang diberikan selama 7 hari pada Fungsi Hati Tikus spraque dawley Pascahipoksia Sistemik, mampu memperbaiki fungsi hati, menghambat stres oksidatif dan peningkatan aktivitas antioksidan pada organ hati, ditandai dengan peningkatan aktivitas SOD (Frethernety *et al.*, 2015)

2. Efek Antiinflamasi

Efek antiinflamasi dapat terlihat dengan adanya proliferasi sel limfosit yang terhambat, ekspresi enzim siklooksigenase menurun, produksi tumor necrosis factor (TNF α) dan Interleukin (IL)6 mengalami penurunan. Efek antiinflamasi tersebut tampak dari hasil studi histology jaringan hiperplasiasinovial pada mencit yang diinduksi dengan kolagen sapi tipe 2, yang diberi madekasosida dengan dosis 3, 10 dan 30 mg/kgBB menunjukkan ukuran sel menjadi lebih kecil (Li *et al.*, 2009).

3. Tukak Lambung (Gastric Ulcer)

Aktivitas penyembuhan Tukak lambung dapat berjalan melalui pemberian ekstrak pegagan sebanyak 250 mg/kgBB dan asiatikosida sebanyak 10 mg/kgBB. Hal tersebut ditandai dengan pembentukan pembuluh darah

(angiogenesis) dan terjadinya regenerasi sel mukosa, proliferasi epitel dan menghambat aktivitas mieloperoksidase penyebab tukak lambung (Cheng *et al.*, 2004).

4. Antihipertensi

Kandungan triterpenoid pada pegagan memiliki efek stimulant pada sintesis kolagen, akan tetapi dengan pemberian dosis tinggi akan menghambat sintesis kolagen dan asam mukopolisakarida. Hal tersebut terbukti dari hasil kultur sel fibroblast embrional manusia bahwa triterpenoid berperan dalam sintesis dinding pembuluh darah vena (Incandela *et al.*, 2001).

5. Mencegah Kerusakan Kulit

Berdasarkan hasil studi pada 28 wanita dengan umur 34 sampai dengan 67 tahun, menunjukkan adanya peningkatan kelembutan dan elastisitas kulit wajah setelah diberikan pegagan dalam campuran tumbuhan obat lainnya, dibandingkan dengan penggunaan placebo (Sommerfeld, 2007).

6. Sitotoksik

Dibandingkan asam asiatic pegagan, ekstrak methanol pegagan memiliki aktivitas sitotoksitas yang kuat. Hal tersebut terbukti dari hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak methanol pegagan dengan konsentrasi LD50 mg/100ml dan dosis 82 mg/100ml mampu menghambat proliferasi sel kanker payudara pada manusia (MCF-7) (Babykutty *et al.*, 2009).

7. Efek Kardioprotektif

Ekstrak air pegagan yang mengandung senyawa aktif (asiaticosida dan asam arjunolat) mampu meningkatkan aktivitas enzim pada serum yang dikenal sebagai marker diagnostic dari disfungsi jantung, melalui pengurangan secara bermakna kadar keratin posfokinase, enzim laktat dehidrogenase, glutamate

oksaloasetat transaminase dan glutamate piruvat transaminase. (Gnanapragasam *et al.*, 2004; Gnanapragasam *et al.*, 2007)

8. Neuroprotektif

Dengan pemberian ekstrak pegagan pada tikus sebanyak 150 dan 300 mg/kgBB peroral selama 25 hari yang dimulai 4 hari sebelum diberi kolsisin mampu menurunkan aktivitas dari asetilkolinesterase, serta menimbulkan efek protektif pegagan terhadap penurunan kognitif dan kerusakan oksidatif yang diinduksi kolsisin. Selain itu, dengan pemberian pegagan mampu mengurangi stress oksidatif yang ditimbulkan oleh 3-NPA, yaitu dengan pemberian pegagan sebanyak 5 mg/kgBB selama 10 hari kemudian diikuti dengan pemberian 3-NPA dengan dosis 75 mg/kgBB/hari pada 2 hari terakhir. Stres oksidatif yang timbul ditandai dengan adanya peningkatan kadar ROS (*Reactive Oxygen Species*), kadar malondialdehid dan hidroperoksida pada striatum (Shinomol, 2008; Haleagrahara & Ponnusamy, 2010).

9. Imunomodulator

Berdasarkan hasil dari uji aktivitas imunomodulator pada ekstrak methanol herbal *Centella asiatica* yang mengandung 0,18 % asiatikosida pada 5 dosis dari 100 hingga 500 mg/kgBB, menunjukkan adanya peningkatan indeks dan rasio fagositik serta nilai leukosit (Jayathirtha & Mishra, 2004).

2.9.6 Kaitan stress oksidatif dengan Aktifitas antioksidan pegagan.

Stres oksidatif terjadi ketika dihasilkan radikal bebas atau spesies oksigen reaktif (ROS) melebihi kapasitas antioksidan dari sistem biologi (Zima *et al.*, 2001). Radikal bebas yang berlebihan dan serangan ROS molekul biologis seperti lipid, protein dan asam nukleat dapat menyebabkan kerusakan jaringan atau sel (Stadtman, 2004; Halliwell & Gutteridge, 2015). Antioksidan adalah penangkal radikal bebas yang memberikan perlindungan bagi organisme hidup

dari kerusakan yang disebabkan oleh ROS. Meskipun hampir semua organisme memiliki pertahanan dan perbaikan sistem antioksidan, tetapi sistem ini tidak cukup untuk mengatasi lebih dari seluruh kerusakan. Penggunaan ekstrak pegagan menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat dengan bahan aktif yang dimiliki diantaranya adalah polyphenol, flavonoid, β -carotene, tannin dan vitamin C. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa fraksi air dan fraksi etanol herba pegagan mempunyai kemampuan menghambat oksidasi (Rahman *et al.*, 2013). *Centella asiatica* bekerja di 3 jalur : menghambat peroksidasi asam linolet (98,2%), aktivitas scavenging radikal (92,7%) dan aktivitas radikal bebas superoksid (86,4%) (Vimala *et al.*, 2003). Berdasarkan penelitian salamah dan farahana, 2014 tentang aktivitas antioksidan ekstrak etanol herba pegagan dengan mekanisme reaksi redoks diperoleh hasil bahwa Pegagan merupakan tanaman yang banyak tumbuh di Indonesia dan mengandung golongan senyawa antioksidan dengan mekanisme penangkapan radikal bebas (Salamah & Farahana, 2014).

2.10 Zebrafish (*Danio rerio*)

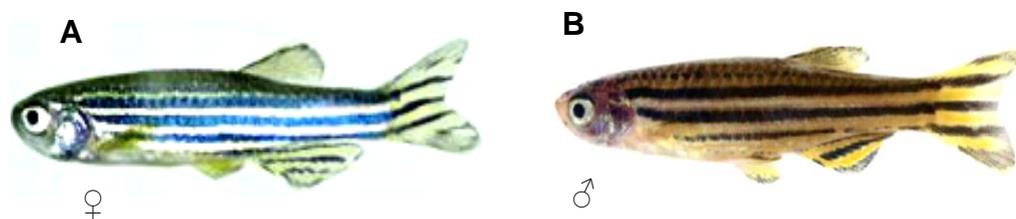
2.10.1 Karakteristik Zebrafish

Zebrafish merupakan jenis *teleost* kecil hidup di air tawar dari famili *cyprinid* (*carps* dan ikan kecil), memiliki tulang belakang (vertebrata), menyerupai mamali baik dalam perkembangannya maupun metabolismenya, sehingga lebih mudah untuk dimanipulasi dan diamati, sehingga banyak jalur molekuler yang mengatur organogenesis diidentifikasi dengan cara analisis mutasi pada *zebrafish* (Eimon *et al.*, 2010; Jurczyk *et al.*, 2011). Ikan ini memiliki pigmentasi dan tubuhnya ditandai dengan garis-garis biru horizontal yang meluas ke ujung sirip hingga ekor. *Zebrafish* jantan memiliki ciri-ciri yaitu bentuknya lebih kecil, perut ramping, warna strip lebih gelap, berwarna merah muda kekuningan dan lebih berwarna keemasan, sedangkan betina perutnya bulat menonjol putih,

warnanya biru keputihan dan terdapat warna perak diantara warna biru (gambar 2.18) (Slanchev *et al.*, 2005; Villamizar *et al.*, 2012). Nama Danio berasal dari nama Bengali "dhani" yang berarti "dari sawah" (Talwar & Jhingran, 1991). Penjabaran Taksonomi *zebrafish* sebagai berikut (Tabel 2.3) (Fang & Douglas, 2003) :

Tabel 2.4 Klasifikasi *Zebrafish (Danio Rerio)*

Klasifikasi	Keterangan
Kingdom	Animalia
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclass	Osteichthyes
Class	Actinopterygii
Order	Cypriniformes
Family	Cyprinidae
Genus	Danio
Species	Danio rerio (Hamilton, 1822)



Gambar 2.19 Morfologi *Zebrafish (Danio rerio)*.

Keterangan : A. Betina dan B. Jantan (Slanchev *et al.*, 2005; Villamizar *et al.*, 2012)

2.10.2 Perkembangan *Zebrafish*

Pada awal perkembangan embrio *zebrafish* terdapat struktur yang menyerupai ovarium. Struktur ini akan berkembang menjadi ovarium pada betina, jika oosit mati akan menjadi testis pada ikan jantan (Slanchev *et al.*, 2005).

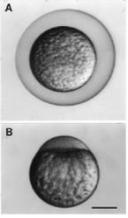
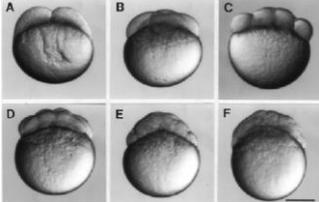
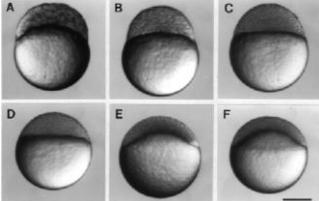
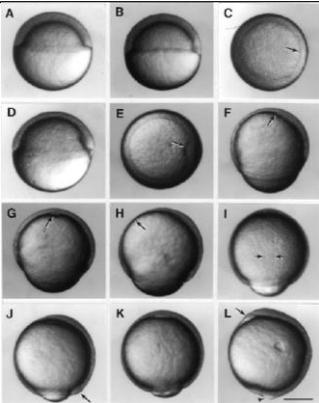
Matangnya *zebrafish* secara seksual adalah ketika berumur 3 - 6 bulan (kematangan seksual terjadi sekitar 100 hari), tetapi perbedaan jenis kelamin dapat diketahui pada 21-23 hari setelah fertilisasi. Pembentukan ovarium diawali pada hari ke-10 setelah fertilisasi dan berkembang sampai hari ke-20 sedangkan testis mulai terbentuk pada hari ke-21 sampai hari ke-30 bersamaan dengan apoptosis dari ovarium (Hill *et al.*, 2005; Von Hofsten & Olsson, 2005).

Fase perkembangan *zebrafish* dapat dibedakan menjadi 5 (lima) fase yaitu :

1. Fase Embrio : Fase ini dimulai dari 0-72 hpf (hours post fertilization). Tahap perkembangannya dapat dibagi menjadi 7 (tujuh) tahapan yaitu : Zigot, Pembelahan, Blastula, Gastrula, Segmentasi, Faringula dan penetasan. Keseluruhan tahapan tersebut berlangsung pada 3 hari setelah fertilisasi. (Kimmel *et al.*, 1995)
2. Fase Early Larva : Fase ini dimulai pada 72 hpf-13 dpf (day post fertilization)
3. Fase Mid Larva : Fase ini dimulai 14-29 dpf
4. Fase Juvenile : Fase ini dimulai 30 dpf hingga 3-4 bulan
5. Fase Dewasa (Mature) : Fase ini dimulai bila sudah terjadi maturitas seksual (Fleming, 2007)

Tahapan perkembangan morfologi tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.4)

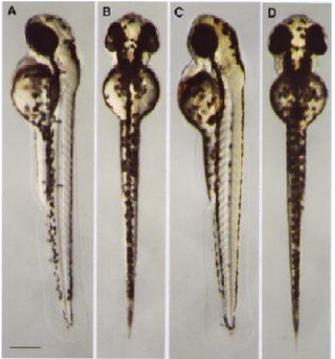
Tabel 2.5. Tahap Perkembangan Zebrafish (*Danio Rerio*)

Stadium	Waktu (Jam)	Panjang Badan	Perkembangan	Gambar
I. Periode Embrio				
1. Zygote	0 hpf	-	A.Zygot berada dalam Chorion, terjadi beberapa menit setelah fertilisasi.B. Zygot memiliki rongga diatasnya, terjadi setelah 10 menit fertilisasi dan yolk mulai memisah dari kutubnya.	 <p>Scale bar: 250 µm.</p>
2. Cleavage	¾ hpf	-	Sel membelah menjadi beberapa tahapan : A: tahap 2 sel (0,75 jam). B: 4 sel tahap (1 jam). C.Tahap 8 sel (1,25 jam). D: tahap 16 sel (1,5 jam). E: 32-sel tahap (1,75 h). F. tahap 64 sel (2 jam).	 <p>Scale bar: 250 µm.</p>
3. Blastula	2 1/4 hpf	-	Terbentuknya kubah, perubahan blastokis menjadi blastoderm.A. tahap 256-sel (2,5 jam). B. stadium tinggi (3,3 jam). C. transisi antara stadium tinggi dan lonjong (3,5 jam). D. transisi antara tahap lonjong dan bola (3,8 h). E: tahap kubah (4,3 h). F. 30% tahap -epiboly (4,7 jam). Pembentukan epiboly, yaitu penipisan dari kedua yolk syncitial layer dan blastoderm melewati yolk cell, yang pada akhirnya yolk cell akan terliput.	 <p>Scale bar: 250 µm.</p>
4. Grastula	5 1/4 hpf	-	A. Tahap epiboly 50% pembelahan (5.25 jam). B. Tahap lingkaran germ (5,7 jam). C. Menuju arah lingkaran germ, perisai embrio akan berkembang dari lingkaran di kanan bawah. D.Tahap perisai (6 jam). E. Tampilan kutub dari perisai; Panah menunjukkan perisai embrio. F. Tahap epiboly 70% (7,7 jam). G. Tahap epiboly 70% pelat prechordal tampak jelas. H. Tahap epiboly 75%(8 jam). I. Tahap epiboly 80 (8.4 jam), J. Tahap epiboly 90% (9 jam). Kuncup ekor mulai terlihat. K. Tahap epiboly 90%. L. Tahap Bud (10 jam). Panah menunjukkan kuncup ekor. Epiboly terbentuk sempurna,terbentuk tail bud,terbentuk primary germ layer dan embryonic axis	 <p>Scale bar: 250 µm.</p>

5. Segmentasi	10 hpf	0,9-1,6 mm	<p>A.Tahap 2-somite (10,7 jam). B.tahap 2-somite, terlihat secara dorsal C. tahap 2-somite, terlihat secara ventral. D. tahap 4-somite (11,3 jam). E. tahap 4-somite, terlihat secara dorsal, fokus pada notochord batas antara somites 2 dan 3. F: tahap 5 somite (11,7 jam). G. Tahap 8-somite (13 jam). H. tahap 13-somite (15,5 jam). I. Tahap 14-somite (16 jam). J. tahap 15-somite (16,5 jam). K. tahap 15-somite menunjukkan primordia optik. L.tahap 17-somite (17,5 jam). M. tahap 20-somite (19 jam). N.tahap 25-somite (21,5 jam). O. tahap 25 somite, Tahapan segmentasi ini adalah awal pembentukan neuron, Optic primordium dapat diidentifikasi,awal Pembentukan ginjal, Otic placode, yang merupakan awal pembentukan telinga,Olfactory primordium dapat diidentifikasi, awal terjadinya pembangiaan dan deferensiasi sel darah.</p>	
---------------	--------	------------	---	--

Scale bar: 250 μ m.

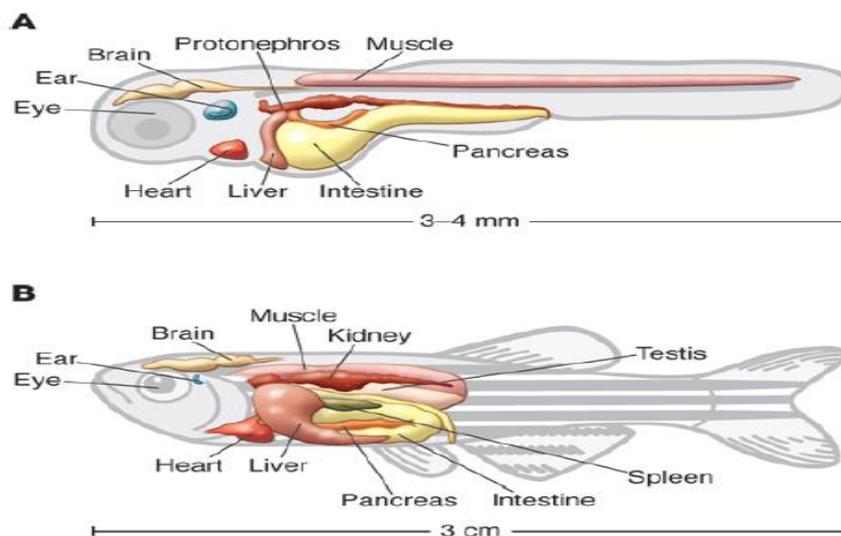
6. pharyngula	24 hpf	1,9-2,9 mm	<p>A. Tahap prima 5 (24 jam). B, C. Tahap prima-12 (28 jam). D, E: Tahap prima 20 (33 jam). F, G: Tahap prima ke-25 (36 jam). Pigmen hampir sampai ke ujung ekor. Panah di F menunjukkan tanduk ventral melanophores. H, I: Panggung tinggi (42 jam). Pigmen sekarang memperpanjang seluruh panjang embrio. Garis-garis tubuh pigmen dorsal dan ventral terisi, tapi tidak begitu rapi seperti nantinya. Garis lateral belum terlihat. Pembentukan system sirkulasi, jantung mulai berdenyut, mulai ada aliran darah, Sirip mulai terbentuk dan muncul sensitifitas terhadap rangsangan taktil.</p>	
---------------	--------	------------	---	--

			Scale bar: 250 µm.	
7. Hatching/ penetasan	48 hpf	3,1-3,5 mm	Perkembangan selama periode penetasan. Embriogenesis (A-F), dan larva awal (G, H). Kantung kemih meningkat pada tahap ini, perkembangan rahang bawah yang terus berlanjut, yang menonjol di anterior, membawa rahang bawah dan atas saling berdekatan di depan mata. perkembangan mulai melambat, morphogenesis hampir sempurna dan penetasan secara spontan.	
				Scale bar: 250 µm.
0 Periode Larva Awal				
	<72 hpf/ 3 dpf		Disebut sebagai larva awal dikarenakan embrio keluar dari corion, mulai berenang secara aktif, mulai ada respon untuk melarikan diri dan mencari makan.	
				Scale bar: 250 µm.
	5 s.d 7 dpf	3,9 mm s.d 4,5 mm	Memiliki 6 gigi s.d 8 gigi	
1 Mid Larva				
	14 dpf	6,2 mm	Memiliki 10 gigi	
	21 dpf	7-7,8 mm		
2 Juvenile				
	30 dpf	9-10 mm	Pola pigmentasi pada kulit telah muncul dan sirip dewasa.	
	45 dpf	12,5-14 mm	Memiliki 12 gigi	
3 Adulths				
Early adulth	90 dpf	2 cm	Organ sexual telah matur dan telah siap Breeding (masa kawin)	

1000 dpf	4-5 cm	Mati
-------------	--------	------

Keterangan ; Proses perkembangan *zebrafish* begitu cepat dibandingkan dengan hewan model coba lainnya, dan pengukuran panjang badan larva *zebrafish* dapat dimulai pada usia 48 hpf (Kimmel *et al.*, 1995).

Teknik pengukuran panjang *zebrafish* berdasarkan standart length (SL) dapat dilihat pada (gambar 2.20) yaitu dari ujung hidung (*tip of the snout*) sampai dengan pangkal ekor (*caudal fin*). (Spence *et al.*, 2008)



Gambar 2.20 .Teknik Pengukuran Panjang *Zebrafish*.

Keterangan : A. larva dan B. dewasa (Santoriello dan Zon, 2012).

2.10.3 Faktor lingkungan yang mempengaruhi perkembangan *zebrafish*

1. Temperatur

Temperatur air yang dibutuhkan *zebrafish* yaitu berkisar antara 25^oC sampai 28^oC. Untuk mencegah kondensasi air dan pertumbuhan jamur pada dinding akuarium, diharapkan suhu ruangan harus lebih tinggi dibandingkan dengan suhu air. Jika suhu air sangat tinggi, dapat mengakibatkan kandungan oksigen pada air akan semakin rendah, hal tersebut akan berpengaruh pada masa hidup ikan (Nusslein *et al.*, 2002).

2. Pencahayaan

Zebrafish membutuhkan pencahayaan yang telah diatur berdasarkan siklus gelap terang (14 jam dalam kondisi terang dan 10 jam dalam kondisi gelap). Ketika lampu dinyalakan *zebrafish* mulai bertelur. Pengaturan pencahayaan dapat menggunakan lampu yang telah diletakkan pada aquarium, dan dapat diprogram sesuai dengan tujuan penelitian (Nusslein *et al.*, 2002).

3. Kebersihan

Pentingnya menjaga kebersihan aquarium agar ikan yang hidup didalamnya dalam kondisi yang sehat. Kotoran yang terdapat dalam aquarium harus segera dibersihkan secara teratur, dan alat penyaring untuk mengatur sirkulasi aquarium harus tetap berjalan. Jika sirkulasi air pada aquarium tidak berjalan dalam satu malam, dapat mengakibatkan kematian pada ikan tersebut (Nusslein *et al.*, 2002).

4. pH

Kondisi pH air sangat menentukan perkembangan *zebrafish*. Kondisi pH yang normal sebagai media hidup *zebrafish* adalah 6,8 sd 7, sedangkan pH yang asam (pH 2 – 3,5) dapat mempengaruhi insang, peningkatan leukosit, hipoksia dikarenakan akumulasi dari lendir yang berlebihan. pH 4,0-4,5 dapat mengakibatkan hambatan penyerapan dari Na⁺ aktif dan meningkatkan Na⁺ pasif, sehingga kadar Na⁺ dalam plasma menurun, selain itu paparan asam dapat menghambat penyerapan Cl⁻ dan menurunkan kadar Cl⁻ pada plasma ikan (Asidosis metabolic). Pengurangan volume plasma dan peningkatan kekentalan darah dapat menimbulkan kematian pada *zebrafish* dikarenakan gagal jantung (Kwong *et al.*, 2014).

2.10.4 Perawatan *zebrafish*

Pemberian makan pada *zebrafish* dalam bentuk serpihan makanan kering, dapat dimulai pada usia sekitar satu bulan. Pemberian pakan pada ikan dewasa sebanyak 2 sd 3 kali sehari. Biasanya makan tersebut akan habis dalam waktu 10 menit. Pemberian makan yang terlalu banyak dapat merusak kondisi air, dan jika dibiarkan makanan tersebut dapat membusuk, sehingga menghambat filter dari aquarium sehingga bakteri dapat berkembangbiak didalamnya. Jenis makanan yang dapat diberikan yaitu, makanan kering seperti artemia atau makanan alternative lainnya makanan dari mahluk hidup atau yang telah dibekukan (tubifex, daphnia and larva hironomus) (Nusslein *et al.*, 2002).

2.10.5 *Zebrafish* sebagai hewan coba

Beberapa kelebihan *Zebrafish* sebagai hewan coba dalam penelitian antara lain :

1. *Zebrafish* memiliki ukuran tubuh yang kecil ukuranya yang kecil sehingga dapat memberikan kemudahan dalam perawatan dalam jumlah yang banyak. Dengan ukuran yang kecil yaitu embrio 0,7 mm pada saat pembuahan dan tumbuh menjadi 3,5 mm dalam waktu 3 hari dan panjang *zebrafis* dewasa sekitar 1-1,5 cm/mm, hanya membutuhkan dosis yang kecil dalam berbagai perlakuan di dalam penelitian.
2. Zebrafis memiliki kemampuan berkembang biak atau produktifitas yang tinggi, dan dapat menghasilkan ratusan embrio dalam perminggu sehinggann pengamatan dalam skala besar mungkin dilakukan. Seekor betina *zebrafish* dapat bertelur setiap 5-7 hari sekali, dengan menghasilkan 200-300 telur setiapkali peneluran di pagi hari dan dengan perawatan yang baik. Dalam penelitian *zebrafish* berumur antara 3-6

bulan baik digunakan dikarenakan produktifitas pada umur tersebut dapat ditingkatkan.

3. Dengan proses embryogenesis yang cepat, sehingga mempermudah dalam penelitian, hal tersebut dikarenakan keseluruhan rangka telah tersusun pada 24 jam setelah fertilitasi, sedangkan organ internal seperti jantung, ginjal, hepar, dan usus berkembang sempurna pada 96 jam setelah fertilisasi.
4. Larva *Zebrafish* transparan sehingga memudahkan dalam penelitian, dikarenakan organ, sel dan jaringan dapat terlihat secara in vivo dan diikuti secara real time pada hewan coba yang masih hidup.
5. Sistem kardiovaskuler, sistem saraf dan sistem pencernaannya menyerupai mamalia
6. Mudah diamati secara genetik. Embrio yang dibuahi secara eksternal, mengalami perkembangan yang cepat dan sinkron, serta transparan sehingga memudahkan pengamatan. Sebagiaian besar organ menjadi fungsional antara 3-5 day post fertilisasi (DPF) (Eimon *et al.*, 2010).

2.10.6 *Zebrafish* sebagai model penelitian biomedis

Pengembangan *zebrafish* sebagai hewan coba dalam pelaksanaan penelitian biomedis, baik dibidang biologi maupun kedokteran sudah banyak digunakan. Beberapa penelitian yang telah dikembangkan menggunakan model *zebrafish* adalah sebagai berikut; penelitian tumbuh kembang, pathogenesis penyakit manusia baik ditingkat sel maupun secara molekuler, ekspresi gen, pengembangan transgenik dan mutagenesis, penemuan serta pengembangan obat, toksikologi, diabetes militus, neurologi, penyakit neurodegenerative, gangguan metabolisme lemak, mekanisme insulin dengan metabolisme glukosa,

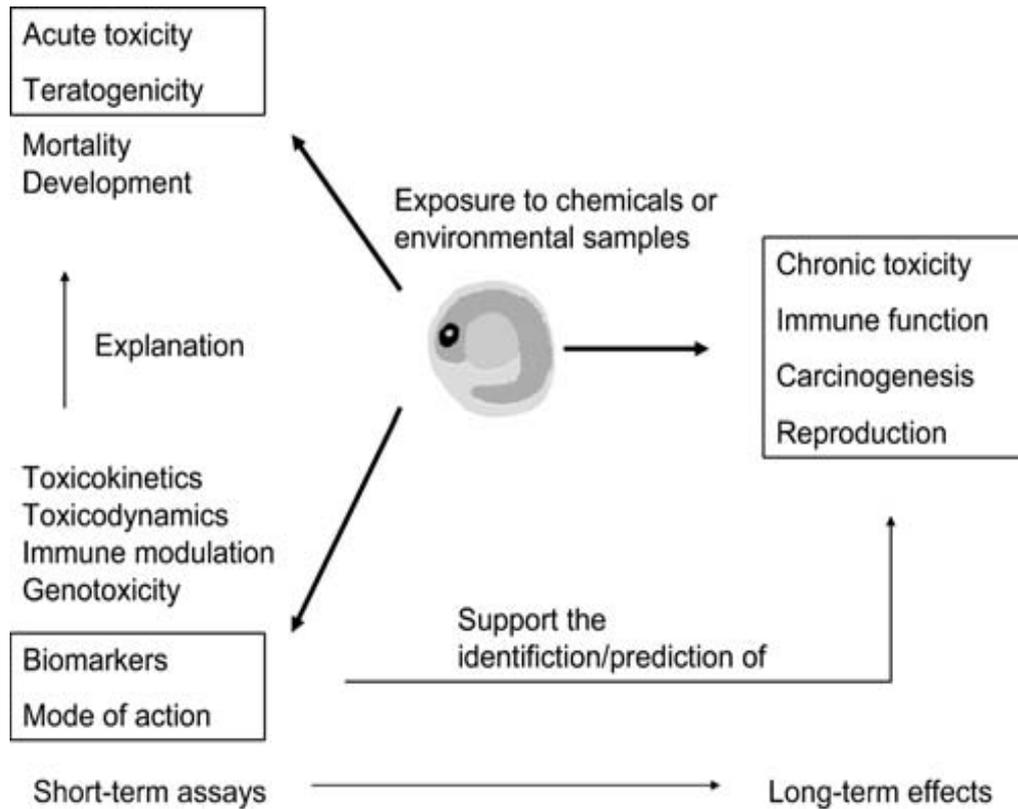
penyakit imun, hemofili, distrofi otot, angiogenesis, mekanisme apoptosis dan tumor (Belyaeva *et al.*, 2009).

Zebrafish saat ini sering digunakan sebagai model hewan vertebrata dalam menentukan pertumbuhan awal melalui signal dari IGF (Cunming *et al.*, 2003). Hambatan aktivitas IGF dapat menyebabkan retardasi pertumbuhan dan perkembangan pada *zebrafish*. Penelitian lain menyebutkan bahwa hipoksia pada *zebrafish* terkait dengan ekspresi IGF, reseptor IGF dan IGFBP-1. Hipoksia tersebut dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan dan perkembangan embrio, serta morfogenesis dari organ *zebrafish*. (Kajimura *et al.*, 2005). Penelitian pertumbuhan lainnya terkait dengan *zebrafish* yaitu, malformasi terjadi pada *zebrafish* yang dipapar monosodium glutamate dengan konsentrasi 100 mg/ml hingga 96 hpf, paparan tersebut mengganggu fungsi endokrin *zebrafish*, sehingga terjadi *stunting* dan kelainan bagian tubuh *zebrafish* (Abdelkader *et al.*, 2012)

Zebrafish sensitif terhadap paparan bahan-bahan kimia tertentu selama perkembangan awal kehidupan. Pada penelitian Hill *et al* (2005), paparan TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) pada telur yang baru difertilisasi, menyebabkan terjadinya edema perikardial dan yolk sac, penurunan denyut jantung, gangguan nafas, fungsi kardiovaskuler yang menyebabkan penurunan curah jantung dan iskemia pada jaringan perifer, gangguan pada perkembangan rahang, dan perdarahan. Namun, dibandingkan dengan spesies ikan yang lain, embrio *zebrafish* kurang sensitif terhadap paparan TCDD tergantung paparan tersebut diberikan saat tahap perkembangan apa. *Zebrafish* yang terpapar TCDD segera setelah fertilisasi akan mengalami edema saat 72 jam setelah fertilisasi. Namun, jika paparan baru diberikan setelah 96 jam setelah fertilisasi, edema tidak akan terjadi (Hill *et al.*, 2005)

Zebrafish memiliki sensitifitas tinggi terhadap pengaruh lingkungan, sehingga sering digunakan sebagai model hewan coba untuk uji toksisitas (Dai *et al.*, 2014). Uji toksisitas pada *zebrafish* memiliki hubungan dengan toksisitas akut pada manusia. Efek toksik yang dapat timbul dari paparan bahan kimia (pestisida, biocides dan obat-obatan) dapat dibedakan menjadi dua yaitu, efek jangka pendek dan jangka panjang (gambar 2.21). Efek jangka pendek yang dialami *zebrafish* yaitu, gangguan pertumbuhan embrio, gangguan pada saat *hatching*, terjadi gerakan spontan dan perubahan detak jantung, sedangkan efek jangka panjang yaitu, dapat menimbulkan gangguan perkembangan saraf, gangguan kardiovaskuler, terjadi toksisitas kronis, modulasi sistem imun, gangguan endokrin, hingga kematian (Scholz *et al.*, 2008). Efek endokrin terhadap senyawa kimia dapat mengganggu reseptor tiroid, estrogen dan endogen (Muncke *et al.*, 2006; Muncke, Jane *et al.*, 2007). Air yang telah terkontaminasi oleh bahan kimia, dapat menyebabkan gangguan reproduksi terutama pada ikan (Tyler *et al.*, 1998).

Berdasarkan penelitian Perrone (2011) menyatakan bahwa, stabilitas rotenone sebagai bahan toksik tidak terganggu, walupun dengan penambahan ekstrak pegagan pada satu medium yang digunakan untuk paparan *zebrafish*, dengan menunjukkan perubahan $PH \pm 0,15$ ($< 0,2$ Ph) larutan organik. menurut khotimah (2015), tidak terdapat interaksi antara ekstrak pegagan dengan medium rotenon, dikarenakan kedua memiliki mekanisme kerja yang berbeda. Ekstrak pegagan bersifat hidrofobik, sehingga mudah masuk kedalam sel dengan secara difusi, sedangkan rotenone bersifat lipofilik, masuk kedalam sel dengan mekanisme khusus (Khotimah *et al.*, 2015).



Gambar 2.21 Efek toksik pada *zebrafish* yang dipapar bahan kimia.

Keterangan : Paparan bahan kimia pada embrio *zebrafish*, menimbulkan efek jangka pendek yaitu, terjadi kematian, gangguan pertumbuhan dari efek toksik yang diperoleh, sedangkan efek jangka panjang yaitu, dapat menjadi toksisitas kronik, gangguan fungsi imun, kanker dan gangguan reproduksi (Scholz *et al.*, 2008).

Pengujian bahan kimia terhadap toksisitas akut dan efek teratogenik, tidak terlepas dari toksikokinetik dalam absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi toksikan didalam tubuh *zebrafish*. Korion bertanggung jawab terhadap masuknya molekul dan penyerapan bahan kimia didalam tubuh ikan. Korion *zebrafish* memiliki pori-pori sebesar $0,17 \mu\text{m}^2$ (Cheng *et al.*, 2007). Ukuran molekul yang besar tidak dapat masuk kedalam korion yaitu dengan berat molekul 3 kDa (Creton, 2004), sedangkan berat molekul 5-6 kDa dapat menyebabkan inflamasi oleh lipopolisakarida, diamati pada dechorionated embrio (Watzke *et al.*, 2007).

Efek toksik dapat berpengaruh pada tingkat molekuler yaitu, berpengaruh terhadap reseptor dalam mengikat protein dan DNA, sehingga mempengaruhi transkripsi gen dan ekspresi protein melalui toxcigenomik (Scholz *et al.*, 2008). Interaksi toksik pada sel atau jaringan, dapat dideteksi dengan penggunaan hewan coba model embrio zebrafish. Interaksi toksik tersebut mengganggu jalur MAPK, gangguan tersebut menimbulkan respon stress seluler (Cowan & Store, 2003). Respon stress tersebut mengganggu ikatan reseptor, fosforilasi, sehingga tidak dapat mengaktifkan MAPK dan mempengaruhi aktivitas intraseluler seperti gangguan pertumbuhan sel, ekspresi gen, metabolisme, homeostasis dan apoptosis (Lemeer *et al.*, 2007)