

**EFEK EKSTRAK ETANOL PEGAGAN  
(*Centella asiatica*) TERHADAP RASIO EKSPRESI  
DOPAMIN RESEPTOR D1/DOPAMIN RESEPTOR D2,  
AKTIVITAS LOKOMOTOR DAN DENYUT JANTUNG  
PADA LARVA ZEBRAFISH (*Danio rerio*) YANG  
DIINDUKSI TIMBAL (Pb)**

**TESIS**

Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Magister



OLEH :  
**AMRINA OCTAVIANA**  
176070401111001

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





TESIS

**EFEK EKSTRAK ETANOL PEGAGAN  
(*Centella asiatica*) TERHADAP RASIO EKSPRESI  
DOPAMIN RESEPTOR D1/DOPAMIN RESEPTOR D2,  
AKTIVITAS LOKOMOTOR DAN DENYUT JANTUNG  
PADA LARVA ZEBRAFISH (*Danio rerio*) YANG  
DIINDUKSI TIMBAL (Pb)**

OLEH :  
**AMRINA OCTAVIANA**  
176070401111001

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

KOMISI PEMBIMBING

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

**Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes**  
NIP 197511252005012001  
Anggota

Malang, 30 JUL 2019  
Universitas Brawijaya  
Fakultas Kedokteran  
Dekan,



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

TESIS

EFEK EKSTRAK ETANOL PEGAGAN  
(*Centella asiatica*) TERHADAP RASIO EKSPRESI  
DOPAMIN RESEPTOR D1/DOPAMIN RESEPTOR D2,  
AKTIVITAS LOKOMOTOR DAN DENYUT JANTUNG,  
PADA LARVA ZEBRAFISH (*Danio rerio*) YANG  
DIINDUKSI TIMBAL (Pb)

OLEH :  
AMRINA OCTAVIANA  
176070401111001

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

KOMISI PENGUJI

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

Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes  
NIP 197511252005012001  
Anggota Penguji

Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc  
NIP 195502011985032001  
Anggota Penguji

dr. Eko Sulistijono, SpA(K)  
NIP 197001252006041005  
Anggota Penguji

## PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis di kutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia tesis ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 Ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 23 Juli 2019

Mahasiswa,



Nama : Amrina Octaviana  
NIM : 176070401111001  
PS : Magister Kebidanan  
Fak : Kedokteran UB



*Karya ilmiah ini kutujukan kepada*

*Ayahanda dan almarhumah ibunda tercinta*

*Ayahanda dan ibunda mertua tersayang*

*Kedua anakku dan suamiku terkasih*

*Seluruh keluarga besarku*

*Amrina Octaviana dan Bus Aprizal*

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Efek Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Rasio Ekspresi Dopamin Reseptor D1/ Dopamin Reseptor D2, Aktivitas Lokomotor dan Denyut Jantung pada Larva Zebrafish (*Danio rerio*) yang Diinduksi Timbal”**.

Penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR., MS selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med, Sp.A(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas izin yang diberikan sehingga penulis dapat menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Dr. dr. Bambang Rahardjo, Sp.OG(K) selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
4. Prof. Dr. dr. Nurdiana, M.Kes selaku ketua komisi pembimbing dan Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes selaku anggota pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan masukan selama penyusunan tesis ini.
5. Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc selaku penguji I dan dr. Eko Sulistijono, SpA(K) selaku penguji II yang telah banyak memberikan masukan dan arahan demi kesempurnaan tesis ini.

6. Prof. Dr. dr. Muljohadi Ali, Sp.FK yang telah memberikan ide, ilmu, arahan, dan motivasi dalam penyusunan tesis ini.
7. Seluruh Dosen Program Studi Magister Kebidanan dan Staf Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
8. Orang tua, suami, dan anak yang telah memberikan dukungan, motivasi dan doa kepada penulis dalam menyelesaikan tesis ini.
9. Seluruh pihak yang telah membantu dalam penyelesaian tesis ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dan keterbatasan pada tesis ini. Oleh karenanya, penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Juli 2019

Penulis



**DAFTAR ISI**

LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS.....	iv
HALAMAN PERUNTUKAN.....	v
RINGKASAN.....	vi
SUMMARY.....	viii
KATA PENGANTAR.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
DAFTAR SINGKATAN.....	xviii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Timbal.....	8
2.1.1 Pengertian dan Kegunaan.....	8
2.1.2 Struktur Fisik dan Kimia.....	8
2.1.3 Jenis dan Sumber Timbal.....	9
2.1.4 Farmakokinetik Timbal.....	10
2.1.5 Biomarker Deteksi Timbal.....	11
2.1.6 Farmakodinamik Timbal.....	12
2.1.7 Mekanisme Timbal terhadap Kehamilan.....	16
2.1.8 Mekanisme Timbal terhadap Pertahanan Anti Oksidan.....	18
2.1.9 Mekanisme Timbal terhadap Stres Oksidatif.....	21
2.2 Lokomotor.....	26
2.3 Denyut Jantung.....	29
2.3.1 Regulasi Sistem Saraf HRV.....	29
2.3.2 Sistem Saraf Simpatik.....	30
2.3.3 Sistem Saraf Parasimpatis.....	31
2.3.4 Imunitas Vagal-Komunikasi Otak.....	31
2.3.5 Faktor Humoral dan Mekanik berkontribusi terhadap HRV.....	31
2.4 Dopamin.....	32
2.4.1 Sintesis Dopamin.....	32
2.4.2 Sistem Dopaminergik.....	33





2.4.3 Dopamin Reseptor Sistem Saraf Pusat .....	35
2.4.4 Dopamin reseptor Peripheral .....	37
2.4.5 Reseptor Dopamin D1 (DRD1) .....	38
2.4.6 Reseptor Dopamin D2 (DRD2) .....	39
2.4.7 Hubungan Timbal dengan DRD1 dan DRD2 .....	39
2.4.8 Hubungan DRD1 dan DRD2 dengan Lokomotor .....	40
2.4.9 Hubungan DRD1 dan DRD2 dengan Denyut Jantung .....	42
2.5 Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) .....	42
2.5.1 Klasifikasi Pegagan .....	42
2.5.2 Habitat dan Morfologi Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) .....	43
2.5.3 Kandungan Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) .....	43
2.5.4 Manfaat Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) .....	45
2.6 Zebrafish .....	46
2.6.1 Karakteristik Zebrafish .....	46
2.6.2 Perkembangan Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) .....	47
2.6.3 Faktor Lingkungan yang Mempengaruhi Perkembangan Zebrafish .....	50
2.6.4 Zebrafish sebagai Model Penelitian .....	51
2.6.5 Aktivitas Lokomotor Zebrafish .....	53
2.6.6 Hubungan Reseptor Dopamin dan Aktivitas Lokomotor pada Zebrafish .....	54
2.6.7 Denyut Jantung pada Zebrafish .....	55
<b>BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN</b>	
3.1 Kerangka Teori .....	57
3.2 Penjelasan Kerangka Teori .....	58
3.3 Kerangka Konsep .....	59
3.4 Penjelasan Kerangka Konsep .....	60
3.5 Hipotesis .....	61
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b>	
4.1 Jenis dan Desain Penelitian .....	62
4.2 Populasi dan Sampel .....	62
4.2.1 Populasi Penelitian .....	62
4.2.2 Sampel Penelitian .....	62
4.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi .....	64
4.3.1 Kriteria Inklusi .....	64
4.3.2 Kriteria Eksklusi .....	64
4.4 Tempat dan Waktu Penelitian .....	64
4.4.1 Tempat .....	64
4.4.2 Waktu Penelitian .....	64
4.5 Variabel Penelitian .....	64
4.6 Definisi Operasional .....	65
4.7 Alat dan Bahan .....	65
4.7.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Zebrafish .....	65
4.7.2 Alat dan Bahan Pembuatan Medium Embrionik .....	66
4.7.3 Alat dan Bahan Pembuatan Konsentrasi Timbal .....	66
4.7.4 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Pegagan .....	66
4.7.5 Alat dan Bahan Pengukuran Aktivitas Lokomotor .....	66
4.7.6 Alat dan Bahan Pengukuran Denyut Jantung .....	66
4.7.7 Alat dan Bahan Pengukuran Ekspresi DRD1 dan DRD2 .....	67
4.8 Prosedur Penelitian .....	67
4.8.1 Persiapan Fertilisasi dan Pemeliharaan Embrio .....	67

4.8.2 Pembuatan Medium Embrionik.....	68
4.8.3 Pembuatan Larutan Timbal.....	68
4.8.4 Pembuatan Ekstrak Pegagan.....	69
4.8.5 Pembuatan Larutan Pegagan.....	69
4.8.6 Perlakuan pada Setiap Kelompok.....	70
4.8.7 Pengukuran Aktivitas Lokomotor.....	71
4.8.8 Pengukuran Frekuensi Denyut Jantung.....	71
4.8.9 Pengukuran Ekspresi DRD1 dan DRD2.....	72
4.9 Pengolahan dan Analisis Data.....	75
4.10 Alur Penelitian.....	77

**BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA**

5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) terhadap ktivitas Lokomotor Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal	78
5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) terhadap Aktivitas Lokomotor Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal.....	81
5.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) terhadap Ekspresi Dopamin Reseptor D1.....	83
5.4 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) terhadap Ekspresi Dopamin Reseptor D2.....	86
5.5 Rasio Ekspresi DRD1 terhadap Ekspresi DRD2.....	88
5.6 Korelasi Antara pemberian Ekstrak Etanol Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) terhadap Aktivitas Lokomotor, Denyut Jantung, Ekspresi DRD1, dan Ekspresi DRD2.....	89

**BAB 6 PEMBAHASAN**

6.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) terhadap Aktivitas Lokomotor Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal.....	91
6.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) terhadap Denyut Jantung Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal.....	93
6.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) terhadap Ekspresi Dopamin Reseptor D1.....	95
6.4 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) terhadap Ekspresi Dopamin Reseptor D2.....	97
6.5 Hubungan Aktivitas Lokomotor, Ekspresi DRD1 dan Ekspresi DRD2.....	98
6.6 Implikasi Hasil Penelitian dalam Asuhan Kebidanan.....	99

**BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN**

7.1 Kesimpulan.....	100
7.2 Saran.....	100

DAFTAR PUSTAKA.....	102
---------------------	-----

DAFTAR LAMPIRAN.....	112
----------------------	-----

RIWAYAT HIDUP.....	143
--------------------	-----



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Karakteristik Molekul Dopamin Reseptor .....	35
Tabel 2.2	Reseptor Dopamin Lokasi dan Fungsinya .....	36
Tabel 2.3	Distribusi dan Fungsi Reseptor Dopamin Periphera.....	37
Tabel 2.4	Hasil Mikrodensiti Protein Imunoreaktif dari Reseptor Dopamin di Jantung Manusia .....	38
Tabel 2.5	Klasifikasi Tanaman Pegagan .....	42
Tabel 2.6	Kandungan Nutrisi Tiap 100g Pegagan .....	44
Tabel 2.7	Klasifikasi Ikan Zebrafish .....	46
Tabel 2.8	Tahapan Perkembangan Zebrafish.....	48
Tabel 2.9	Homologi Reseptor Dopamin Manusia dan Zebrafish.....	53
Tabel 4.1	Definisi Operasional.....	65
Tabel 4.2	Rekomendasi Kondisi Siklus dan Suhu pada Pemeriksaan PCR .....	75
Tabel 4.3	Kekuatan Korelasi dan Arah Korelasi .....	76
Tabel 5.1	Pola dan Rerata Aktivitas Lokomotor pada Larva Zebrafish Usia 4 - 6 dpf antara Kelompok Kontrol, Timbal, dan Timbal ditambah Pegagan .....	78
Tabel 5.2	Hasil Perbandingan Rerata Denyut Jantung Larva Zebrafish.....	81
Tabel 5.3	Hasil Perbandingan Rerata Ekspresi Dopamin Reseptor D1 pada Larva Zebrafish usia 6 dpf .....	84
Tabel 5.4	Hasil Perbandingan Rerata Ekspresi Dopamin Reseptor D2 pada Larva Zebrafish usia 6 dpf .....	87
Tabel 5.5	Rasio Ekspresi DRD1 terhadap DRD2.....	88
Tabel 5.6	Hasil Uji Korelasi Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) terhadap Aktivitas Lokomotor, Denyut jantung, Ekspresi DRD1 dan Ekspresi DRD2.....	89

**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2.1	Struktur Kimia Timbal.....	9
Gambar 2.2	Mekanisme dan Target yang Potensial Terjadi pada Stres Oksidatif yang Diinduksi Timbal.....	18
Gambar 2.3	Mekanisme Anti Oksidan Memutus Rantai.....	19
Gambar 2.4	Mekanisme Stres Oksidatif dalam Sel Akibat Paparan Timbal.....	21
Gambar 2.5	Mekanisme Timbal Masuk ke dalam Sel dan Berikatan dengan Kamodulin.....	25
Gambar 2.6	Mekanisme Toksisitas Timbal.....	26
Gambar 2.7	Aktivitas Lokomotor.....	27
Gambar 2.8	Organisasi Struktur Saraf yang Mengendalikan Gerak Vertebrata.....	28
Gambar 2.9	Zebrafish Jantan dan Betina.....	47
Gambar 2.10	Siklus Hidup Zebrafish.....	48
Gambar 2.11	Tipe Gerak Berenang Lambat pada Larva Zebrafish.....	54
Gambar 2.12	Larva menunjukkan Peningkatan Berenang pada 5 dpf Dibandingkan dengan 3 dpf.....	55
Gambar 2.13	Letak Jantung Zebrafish usia 72 hpf.....	56
Gambar 3.1	Kerangka Teori.....	57
Gambar 3.2	Kerangka Konsep.....	59
Gambar 4.1	Alur Penelitian.....	77
Gambar 5.1	Rerata Aktivitas Lokomotor pada Larva Zebrafish Usia 4–6 dpf.....	79
Gambar 5.2	Perbandingan Rerata Aktivita Lokomotor pada Larva Zebrafish usia 4-6 dpf.....	80
Gambar 5.3	Jantung Pada Larva Zebrafish.....	81
Gambar 5.4	Rerata Denyut Jantung pada Larva Zebrafish usia 3 dan 4 dpf antara Kelompok Kontrol, Timbal, dan Perlakuan.....	82
Gambar 5.5	Elektroforegram hasil PCR Ekspresi DRD1.....	83
Gambar 5.6	Intensitas Ekspresi Dopamin Reseptor D1 pada Larva Zebrafish usia 6 dpf.....	84

Gambar 5.7 Rerata Ekspresi Dopamin Reseptor D1..... 85

Gambar 5.8 Elektroforegram hasil PCR Ekspresi DRD2..... 86

Gambar 5.9 Intensitas Ekspresi Dopamin Reseptor D2 pada Larva Zebrafish usia 6 dpf..... 86

Gambar 5.10 Rerata Ekspresi Dopamin Reseptor D2..... 87

Gambar 5.11 Rerata Ekspresi DRD1 terhadap DRD2..... 88



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat Keterangan Kelaiakan Etik..... 112

Lampiran 2 Surat Keterangan Bebas Plagiasi..... 113

Lampiran 3 Surat Keterangan Determinasi Tanaman Pegagan..... 114

Lampiran 4 Surat Keterangan Hasil Analisis Zebrafish..... 115

Lampiran 5 Bukti *Publish* Jurnal..... 118

Lampiran 6 Dokumentasi Penelitian..... 127

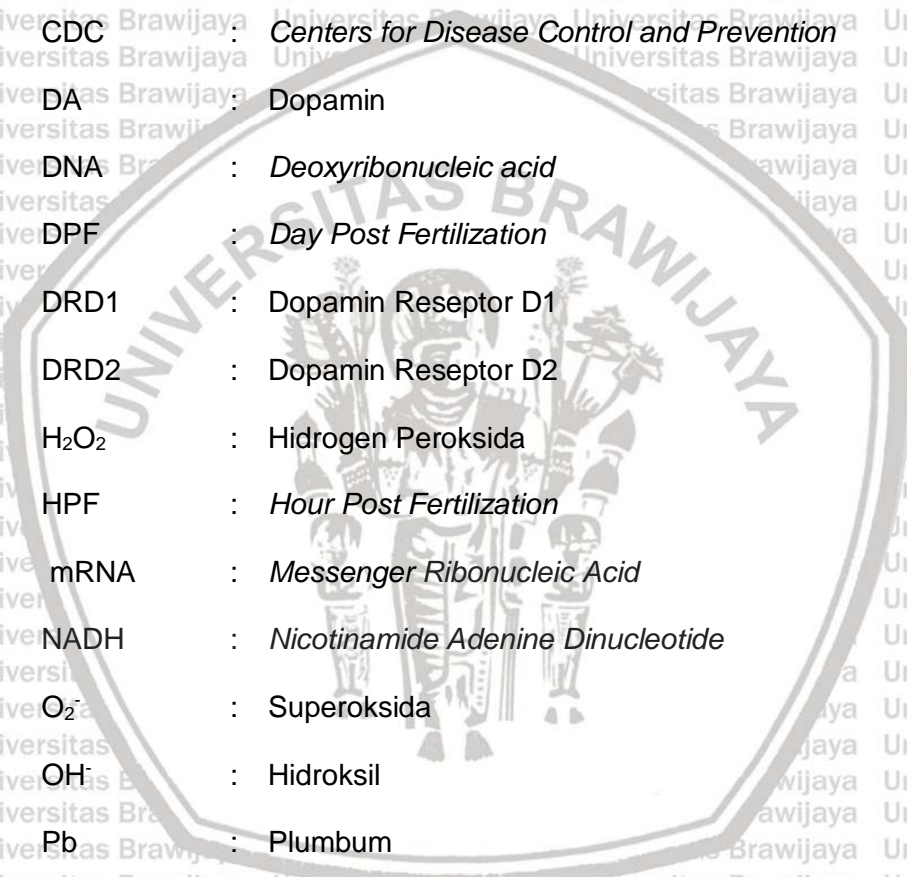
Lampiran 7 Analisis Data..... 128

Lampiran 8 Cara Menggunakan Software Image J..... 141



**DAFTAR SINGKATAN**

ALAD	:	<i>Aminolevulinic Acid Dehydratase</i>
ATSDR	:	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
BBB	:	<i>Blood Brain Barrier</i>
BLL	:	<i>Blood Lead Level</i>
CA	:	<i>Centella asiatica</i>
CDC	:	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DA	:	Dopamin
DNA	:	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPF	:	<i>Day Post Fertilization</i>
DRD1	:	Dopamin Reseptor D1
DRD2	:	Dopamin Reseptor D2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Hidrogen Peroksida
HPF	:	<i>Hour Post Fertilization</i>
mRNA	:	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
NADH	:	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	:	Superoksida
OH <sup>•</sup>	:	Hidroksil
Pb	:	Plumbum
RT-PCR	:	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RNS	:	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	:	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TF	:	Transferrin
TH	:	Tirosin Hidroksilase







## BAB 1

## PENDAHULUAN

**1.1 Latar Belakang**

Polusi adalah masalah dunia dengan dampak yang luas. Senyawa logam berat sering ditemukan sebagai sumber pencemaran yang timbul karena pengaruh atau campur tangan manusia, serta akibat aktifitas manusia (antropogenik). Emisi polutan meningkat di seluruh dunia dan membawa dampak masalah yang besar bagi kesehatan dan lingkungan, terutama di lingkungan akuatik (Richetti, *et. al.*, 2010).

Pb menempati urutan kedua bahan berbahaya setelah Arsenik. Paparan timbal dan senyawanya terhadap manusia sebagian besar berasal dari : bensin yang mengandung timbal, Hasil industri seperti peleburan timah dan pembakarannya, tembikar, pembuatan kapal, cat yang bertimbal, pipa yang bertimbal, daur ulang yang mengandung timbal, daur ulang baterai, jeruji, industri baja, pewarnaan, pencetakan buku, dan sebagainya. Meskipun penggunaannya secara meluas telah dihentikan di banyak negara di dunia, masih digunakan di banyak industri seperti perbaikan mobil, pembuatan dan daur ulang baterai, penyulingan, dan peleburan (Wani, *et. al.*, 2015).

Data cemaran timbal di udara ambien dari beberapa kota di Indonesia yaitu 0,2 – 2664,2 ng/m<sup>3</sup>. Dari beberapa kota ini, Konsentrasi timbal tertinggi terdapat di Surabaya yaitu 2664 ng/m<sup>3</sup> dan Serpong yaitu 2045 ng/m<sup>3</sup>, dan telah melebihi ambang baku mutu yaitu 2000 ng/m<sup>3</sup>. Cemaran timbal ini dihasilkan dari emisi industri dan kendaraan bermotor (Mukhtar, *et. al.*, 2013). Data cemaran timbal di beberapa sungai di Jawa Tengah sebesar 13,89 ppm, jauh dari nilai ambang batas yang ditetapkan oleh WHO sebesar 0,1 ppm dan Kementerian Lingkungan Hidup

sebesar 0,05 ppm. Konsentrasi timbal tertinggi terdapat pada Sungai Kaligarang (Semarang) yaitu 57,40 ppm. Cemaran timbal ini berasal dari limbah industri yang dibuang ke badan sungai (Susanti, *et. al.*, 2014).

Batas konsumsi harian timbal menurut *Food and Agriculture Organization* (FAO) adalah 3,5 pg/kg berat badan atau 0,0035 mg/kg berat badan. Sedangkan asupan yang diperkenankan dalam seminggu (*Acceptable Daily Intake / ADI*) untuk Timbal bagi orang dewasa 50 pg/kg berat badan dan bayi atau anak-anak 25 pg/kg berat badan (Widowati, *et. al.*, 2008). Sedangkan di Indonesia, untuk batas cemaran logam timbal dalam kosmetika adalah  $\leq 20$  mg/kg atau 20 mg/L (BPOM, 2011). Untuk produk pangan batas maksimal cemaran timbal adalah 0,25 mg/kg berat badan (BSN, 2009).

Timbal sangat beracun dan mempengaruhi hampir setiap organ dalam tubuh. Dari semua organ, sistem saraf adalah target yang paling terpengaruh dalam toksisitas timbal, baik pada anak-anak dan orang dewasa. Namun toksisitas pada anak memiliki dampak yang lebih besar daripada pada orang dewasa. Hal ini karena jaringan mereka, internal maupun eksternal, lebih lunak daripada pada orang dewasa (Wani, *et. al.*, 2015).

Kadar timbal dalam darah yang sebelumnya dianggap aman, sekarang diketahui dapat membahayakan kesehatan. Dampak dari toksisitas timbal tingkat rendah yang terjadi pada masa kehamilan adalah abortus, hipertensi dalam kehamilan, infertilitas, ruptur membran prematur, persalinan prematur, dan pre-eklamsi (Assi, *et. al.*, 2016). Sedangkan selama masa kanak-kanak adalah kerusakan perkembangan sistem saraf pusat di otak. Dampak dari cedera otak akibat terpapar timbal pada awal kehidupan adalah hilangnya kecerdasan, kurang perhatian, dan gangguan perilaku (WHO, 2010).

Timbal bersifat toksik, salah satu yang menyebabkan terjadinya toksisitas timbal adalah stres oksidatif. Stres oksidatif adalah kondisi dimana keseimbangan antara produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan tingkat antioksidan diganggu secara terus-menerus sehingga menyebabkan kerusakan sel akibat ROS yang berlebihan (Gandhi & Abramov, 2012). Ion timbal telah terbukti terkait dengan peningkatan ROS. Selain itu, timbal mampu menurunkan pertahanan antioksidan, termasuk enzim antioksidan dan antioksidan non-enzimatik (Dobrakowski, *et. al.*, 2016).

Sifat toksik timbal, menyebabkan perubahan perilaku pada tikus yang dipapar oleh Pb pada sistem neurotransmiter yang telah berulang kali terlibat dalam hal ini adalah Dopaminergik (DA) sistem (Kim, *et. al.*, 2017). Reseptor dopamin 1 dan 2 (DRD1, DRD2) merupakan bagian dari DA sistem yang sangat penting dalam memberi sinyal ke otak untuk melakukan banyak fungsi otak, salah satunya adalah aktivitas lokomotor (Stojanovic, *et. al.*, 2017). Beberapa penelitian membuktikan bahwa aktivitas lokomotor terutama dikontrol oleh reseptor dopamin D1, D2, dan D3. Aktivasi reseptor D1 terlihat pada neuron *postsynaptic* menghasilkan efek stimulasi sedang dalam aktivitas lokomotor, sedangkan Reseptor D2 umumnya terlibat lebih kompleks dari reseptor D1 karena bekerja pada kedua syaraf *pre- dan post synaptic*. Aktivasi presynaptic oleh D2 reseptor umumnya menyebabkan penurunan dopamin *release* sehingga menghasilkan penurunan aktivitas lokomotor (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). Pada penelitian Chang, *et. al.* (2014), Pb meningkatkan ekspresi tirosine hidroksilase dan dopamin transporter yang berpengaruh pada penurunan ekspresi DRD1 dan peningkatan ekspresi DRD2 pada otak tikus yang terpapar timbal konsentrasi rendah, menyebabkan peningkatan hiperaktivitas, gangguan belajar dan memori pada tikus yang terpapar timbal.

Studi epidemiologi, eksperimen, dan in vitro didapatkan bahwa paparan timbal meningkatkan tekanan darah pada hewan eksperimen maupun pada manusia (Katzung & Trevor, 2015). Dopamin menghasilkan efek *chotropic* dan *ionotropic* positif pada miokardium, menghasilkan peningkatan denyut jantung dan kontraktilitas otot jantung. Penelitian Cavallotti, *et. al* (2010), Dopamin reseptor teridentifikasi pada organ dan jaringan pada pusat dan perifer sistem saraf.

Empat sub tipe dopamin reseptor teridentifikasi di jaringan *cardiac*, yaitu Dopamin Reseptor D1, D2, D4, D5. Hal ini menunjukkan kemungkinan peran dopamin reseptor dalam mengendalikan fungsi kerja jantung manusia.

Pegagan (*Centella asiatica*) adalah tanaman yang mengandung antioksidan karena memiliki fitonutrien utama yaitu triterpenoid yang berperan sebagai antioksidan dan dapat menangkap oksidan dalam sel sehingga dapat mencegah stress oksidatif (Winarsi, 2011; Chandrika, *et. al.*, 2015). Ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) diketahui dapat melindungi neuron dopaminergik melalui peningkatan neurotropin (Khotimah, *et. al.*, 2015). Hasil penelitian Hanum (2016), menganalisa bahwa, ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dapat memperbaiki aktivitas lokomotor dan meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase pada zebrafish yang diapapar rotenon.

Zebrafish telah banyak digunakan oleh ahli genetika molekuler dan ahli biologi perkembangan untuk mempelajari mekanisme pengembangan vertebrata.

Embrio zebrafish yang transparan, memungkinkan visualisasi secara langsung dan terus menerus secara *in vivo*. Hal ini sangat baik digunakan untuk menilai fungsi gen, berkembangnya karakteristik lain dari zebrafish membuatnya ideal untuk menjawab pertanyaan tentang perilaku. Pada perkembangan terkini, Zebrafish telah dikembangkan menjadi desain yang berguna untuk memahami tidak hanya efek struktural dan kimiawi dari neurotoksikitas, tetapi juga untuk menilai gangguan perilaku yang terkait dengan paparan tersebut, dan oleh karena

itu, zebrafish sangat membantu untuk bidang toksikologi *neurobehavioral* (Bailey, et. al., 2014). Penelitan Tu, et. al. (2017), menggunakan larva zebrafish yang diinduksi timbal dosis rendah untuk menilai lokomotornya, terdapat hasil yang signifikan antara penurunan jarak dan rata-rata kecepatan berenang pada larva zebrafish yang diinduksi oleh timbal dosis rendah. Hal ini membuktikan, neurotoksisitas timbal terbukti sangat terkait perubahan perilaku aktivitas lokomotor selama tahap perkembangan awal kehidupan.

## 1.2 Rumusan Masalah

### 1.2.1 Umum

Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah toksisitas timbal pada aktivitas lokomotor, denyut jantung, ekspresi Dopamin reseptor D1, dan ekspresi Dopamin reseptor D2 larva zebrafish yang dipapar timbal?

### 1.2.2 Khusus

1. Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan aktivitas lokomotor larva zebrafish yang dipapar timbal?
2. Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat menurunkan denyut jantung larva zebrafish yang dipapar timbal?
3. Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi Dopamin reseptor D1 larva zebrafish yang dipapar timbal?
4. Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat menurunkan ekspresi Dopamin reseptor D2 larva zebrafish yang dipapar timbal?

5. Apakah terdapat hubungan antara ekspresi Dopamin reseptor D1 dan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish terpapar timbal yang diberikan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*)?

6. Apakah terdapat hubungan antara ekspresi Dopamin reseptor D2 dan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish terpapar timbal yang diberikan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*)?

### 1.3 Tujuan

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Menganalisa efek pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap lokomotor, denyut jantung, ekspresi Dopamin reseptor D1, dan ekspresi Dopamin reseptor D2 larva zebrafish yang dipapar timbal.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisa efek pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap aktivitas lokomotor larva zebrafish yang dipapar timbal.
2. Menganalisa efek pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap denyut jantung larva zebrafish yang dipapar timbal.
3. Menganalisa efek pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi dopamin reseptor D1 larva zebrafish yang dipapar timbal.
4. Menganalisa efek pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi dopamin reseptor D2 larva zebrafish yang dipapar timbal.
5. Menganalisa hubungan antara ekspresi dopamin reseptor D1 dan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish terpapar timbal yang diberikan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*).
6. Menganalisa hubungan antara dopamin reseptor D2 dan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish terpapar timbal yang diberikan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*).

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Penelitian ini dapat menambah kajian patomekanisme terjadinya neurotoksisitas pada larva zebrafish yang dipapar oleh timbal.
2. Penelitian ini dapat digunakan untuk menambah ilmu pengetahuan dan pemahaman tentang pengaruh ekstrak etanol pegagan dalam mengurangi dampak neurotoksis pada larva zebrafish yang dipapar oleh timbal.
3. Sebagai bahan informasi bagi pengembangan penelitian berikutnya tentang neurotoksisitas.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

1. Sebagai bahan acuan bagi tenaga kesehatan khususnya bidan dalam memperhatikan tumbuh kembang anak pada 1000 hari kehidupan terutama di daerah tercemar timbal.
2. Meningkatkan kesadaran orang tua dan tenaga kesehatan khususnya bidan tentang pentingnya pemeriksaan tumbuh kembang anak terutama untuk daerah yang tercemar timbal.
3. Dapat dijadikan sebagai pertimbangan bagi masyarakat untuk budidaya pegagan yang memberikan banyak manfaat bagi kesehatan sehingga dapat dijadikan konsumsi harian terutama bagi daerah yang tercemar timbal.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Timbal (Pb)

##### 2.1.1 Pengertian dan Kegunaan

Timbal adalah logam lunak berwarna biru keabu-abuan, biasanya ditemukan sebagai senyawa timbal yang dikombinasikan dengan elemen lain (ATSDR, 2017).

Timbal merupakan logam berat neurotoksik, yang dapat menyebabkan berbagai gangguan baik di sistem saraf pusat maupun perifer. Paparan timbal akut dapat terjadi dalam efek neurotoksik seperti : kelainan perilaku, gangguan belajar, pendengaran menurun, dan gangguan fungsi kognitif (Dou & Zhang, 2011).

Timbal adalah logam berat, yang telah banyak digunakan selama beberapa dekade dalam cat, bensin, pipa air, baterai penyimpanan, dan banyak produk lainnya. Timbal dapat menyebabkan banyak efek kesehatan yang merugikan pada berbagai sistem tubuh termasuk sistem saraf, hematologi, kekebalan tubuh, dan genitourinari. Namun demikian, karena kelenturannya, ketahanan terhadap korosi, dan titik leleh rendah, timbal masih banyak digunakan oleh industri (Dobrakowski, *et al.*, 2016).

##### 2.1.2 Struktur Fisik dan Kimia

Menurut Patnaik (2003), struktur fisika dan kimia dari Timbal yaitu :

Nama umum : Timbal

Rumus empiris :  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

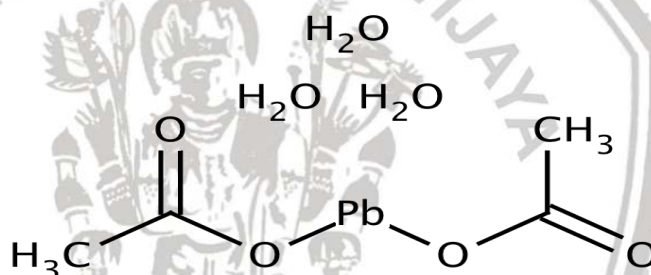
Nama Kimia : Timbal(II) asetat trihidrat

Berat molekul : 379.33g/mol

Kelarutan : Kelarutan dalam air yaitu 625 g/L @ 20°C.



Kelarutan dalam pelarut organik yang lain yaitu metanol  
 74,75 g/100g @ 15 °C; 214.95 g/100 g @ 66.1 °C; gliserol  
 143 g/100 g @ 20 °C  
 Titik lebur : ~75 °C (167 °F; 348 K)  
 Titik didih : Berdekomposisi pada suhu  $\geq 200$  °C  
 Densitas : 2.55 g/cm<sup>3</sup>  
 Bentuk : Bubuk putih atau tidak berwarna, kristal berkilau  
 Struktur kristal : Monoklinik  
 Stabilitas : Produk ini stabil secara kimiawi di bawah kondisi ruangan standar (suhu kamar).  
 Struktur :



Gambar 2.1 Struktur Kimia Timbal(II) asetat trihidrat (Patnaik, 2003).

### 2.1.3 Jenis dan Sumber Timbal

Jenis timbal menurut *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* atau yang disingkat ATSDR (2017), terdiri dari dua jenis yaitu :

#### 1. Timbal anorganik.

Timbal anorganik terdapat pada cat yang mengandung timbal tinggi, tanah, debu, dan berbagai produk konsumen. Warnanya bervariasi, tergantung pada bentuk kimianya, dan bentuk yang paling umum adalah timbal putih (senyawa karbonat timbal), timbal kuning (timbal kromat, timbal monoksida) atau timbal merah (timbal tetraoksida). Timbal Asetat memiliki rasa yang manis.

## 2. Timbal organik.

Timbal Tetraethyl dan tetramethyl adalah bentuk timbal yang digunakan dalam bensin bertimbal untuk meningkatkan peringkat oktan. Pembakaran timbal organik ketika ditambahkan ke bensin sebagai bahan bakar tambahan menghasilkan pelepasan timbal ke atmosfer. Namun, penggunaannya dihapus di Amerika Serikat mulai awal 1970-an, dan dilarang untuk digunakan dalam bensin untuk kendaraan bermotor mulai 1 Januari 1996.

Bentuk timbal organik sangat berbahaya, karena diserap melalui kulit dan sangat beracun bagi otak dan sistem saraf pusat, lebih dari timbal anorganik.

### 2.1.4 Farmakokinetik Timbal

#### 2.1.4.1 Absorpsi

Timbal dapat terserap ke dalam tubuh manusia melalui pernafasan, saluran cerna, bahkan melalui dermal. Setelah terserap, timbal didistribusikan melalui aliran darah ke berbagai organ, seperti otak, hati, dan ginjal (Dobrakowski, *et. al.*, 2016). Absorpsi timbal tergantung pada jenis senyawa timbal yang mengenai organisme tersebut, Rute absorpsi paling sering melalui saluran pencernaan dan pernafasan (Garza, *et. al.*, 2006).

Orang dewasa biasanya menyerap hingga 20% dari timbal anorganik yang tertelan setelah makan dan hingga 60-80% pada waktu perut kosong. Anak-anak menyerap sekitar 50% dari timbal yang tertelan setelah makan dan hingga 100% saat perut dalam keadaan kosong (ATSDR, 2017).

#### 2.1.4.2 Distribusi

Timbal dalam darah sebagian besar berikatan dengan protein eritosit dan plasma darah, dan sebagian kecil sebagai ion bebas beredar di pembuluh darah (Garza, *et. al.*, 2006). Waktu paruh awal timbal dalam darah adalah sekitar 35 hari. Konsentrasi timbal dalam plasma berkisar 0,1%-5,0% dari konsentrasi timbal dalam darah (CDC, 2010).

Tulang adalah reservoir dinamis untuk timbal, dalam pertukaran secara konstan dengan darah dan elemen jaringan lunak. Timbal > 90% disimpan tulang dalam struktur kristal hidroksiapatit tulang, seperti kalsium, dan juga dapat ditransfer ke dalam matriks tulang eksklusif dari penggabungan ke hidroksiapatit. Timbal dalam tulang memiliki waktu paruh hingga puluhan tahun dan karenanya mencerminkan kumulatif paparan timbal (CDC, 2010).

#### 2.1.4.3 Metabolisme

Bentuk kimia senyawa timbal atau timbal yang masuk ke dalam tubuh tergantung dari faktor penyerapan dan biologis timbal. Timbal anorganik, bentuk timah yang paling umum, tidak dimetabolisme di hati. Hampir semua timbal organik yang tertelan diserap oleh tubuh. Senyawa timbal organik (yang ditemukan dalam bensin bertimbal dan aditif) dimetabolisme di hati (ATSDR, 2017).

#### 2.1.4.4 Ekskresi

Sebagian besar timbal yang masuk ke dalam tubuh dikeluarkan urin atau melalui pembersihan bilier (feces) (ATSDR, 2017). Proses ekskresi timbal melalui urin sekitar 75-80%, dan melalui feces 15%, serta lainnya melalui keringat, empedu, kuku, dan rambut (Palar, 2004).

#### 2.1.5 Biomarker Deteksi Timbal

Biomarker umumnya diklasifikasikan menjadi tiga kelompok : biomarker paparan, efek, dan kerentanan. Berbagai biomarker tersedia untuk memantau paparan manusia terhadap timbal. Seleksi dan pengukuran yang tepat dari pajanan biomarker timbal sangat penting untuk tujuan manajemen perawatan kesehatan, pengambilan keputusan kesehatan masyarakat, dan sintesis pencegahan primer. Meski jaringan dan cairan biologis (ASI, darah, urin, tulang, gigi, rambut, dan kuku) telah digunakan untuk menguji paparan timbal, tidak ada biomarker timbal yang tersedia secara hayati yang telah diterima secara umum (Liu, *et al.*, 2013).

Biomarker timbal darah sebagai alternatif pengukuran timbal darah (BPb) atau level timbal darah (BLL) merupakan indikator yang paling dapat diandalkan untuk mengukur paparan timbal dalam darah (ATSDR, 2017). Pusat Pengendalian dan Pencegahan Penyakit Amerika Serikat (CDC) terus menerus merevisi tingkat Pb darah yang menjadi perhatian pada anak-anak dari  $\geq 25 \mu\text{g/dL}$  di 1985 hingga  $\geq 10 \mu\text{g/dL}$  pada tahun 1991, dan sampai  $\geq 5 \mu\text{g/dL}$  pada tahun 2012 (Lee & Freeman, 2014). CDC (2010), menyatakan bahwa BLL  $\geq 5 \mu\text{g / dL}$  pada wanita hamil menunjukkan bahwa wanita tersebut telah terpapar timbal jauh sebelum hamil, hal ini terjadi pada sebagian besar wanita usia subur di AS.

### 2.1.6 Farmakodinamik Timbal

Kerusakan yang diakibatkan oleh timbal dalam fisiologi seluler sebagian besar dikarenakan kemampuannya untuk menggantikan beragam polivalen kation (kalsium, zinc, dan magnesium) dalam situs ikatan mereka. Distribusi yang luas dari ikatan kation ini di dalam proses seluler, dan berbagai fungsi fisiologi gabungan kation, telah dihambat pada target molekuler timbal. Timbal mudah masuk ke dalam tubuh dan didistribusikan oleh tubuh karena menggunakan properti yang sama, yaitu menggunakan mekanisme transport untuk logam yang dibutuhkan oleh tubuh. Absorpsi timbal paling sering melalui saluran pencernaan dan pernafasan (Garza, *et. al.*, 2006).

#### 2.1.6.1 Sistem Syaraf

Pertumbuhan sistem syaraf pusat (SSP) fetus dan anak merupakan target organ yang paling sensitif dari efek toksik timbal. Timbal memiliki efek yang merugikan pada SSP. Dalam SSP, timbal menghambat reseptor yang dikenal sebagai *N-metil-D-aspartat* (NMDA), merupakan reseptor yang efektif dalam pematangan plastisitas otak. Secara fisiologis plastisitas otak (*neuroplasticity*) adalah kemampuan otak melakukan reorganisasi dalam bentuk adanya interkoneksi baru pada saraf. Plastisitas merupakan sifat yang menunjukkan

kapasitas otak untuk berubah dan beradaptasi terhadap kebutuhan fungsional.

Penyumbatan reseptor di otak mengarah ke gangguan jangka panjang, yang pada gilirannya membatasi asupan permanen dan penyimpanan pengetahuan yang baru dipelajari. Kadar timbal darah (BLL) juga meningkat sehingga mengganggu fungsi *blood-brain barrier*. *Blood-brain barrier* terdiri dari banyak sel endotel yang dihubungkan dengan *tight junctions*. Sel endotel dikelilingi oleh astrosit, yang jumlahnya melebihi jumlah neuron di otak. dalam proses ini, astrosit-astrosit ini menyusun jalur mereka diantara akson dan dendrit. Penelitian menunjukkan bahwa toksisitas timbal memainkan peran utama dalam komunikasi antara astrosit dan sel endotel (Brochin, *et. al.*, 2008).

*Blood-brain barrier* memiliki fungsi yang sangat penting dalam menjaga cairan di lingkungan sistem saraf. Sementara organ-organ lain dalam tubuh mengangkut molekul secara sederhana dengan metode difusi, *blood-brain barrier* sangat selektif dalam memilih mengangkut molekul, molekul yang dipilih adalah molekul yang larut dalam air (asam amino esensial, glukosa, kalsium, natrium, dan kalium) yang akan diangkut ke membran plasma. Selektifitas dalam transportasi molekul melalui *blood-brain barrier* dapat menjelaskan kerentanan *blood-brain barrier* terhadap trauma karena racun berbahaya (Brochin, *et. al.*, 2008).

*Blood-brain barrier* terpapar timbal konsentrasi tinggi, maka plasma bergerak ke dalam ruang interstitial otak, menghasilkan edema. Toksisitas timbal yang tinggi dalam darah pada SSP menghasilkan ensefalopati dan edema yang terutama mempengaruhi cerebelum otak. Edema menyebabkan meningkatnya tekanan di otak secara ekstrem, yang dapat membuat kerusakan otak ireversibel.

Kerusakan otak ini menyebabkan penurunan perhatian, mempengaruhi keterampilan penalaran motorik, perilaku sosial, serta dapat merusak kemampuan matematika dan kemampuan membaca (Toscano & Guilarte, 2005; Brochin, *et. al.*, 2008).

### 2.1.6.2. Darah

Timbal dapat menyebabkan anemia, merupakan kondisi yang sering terjadi terkait dengan paparan berat timbal, yang menyebabkan mempersingkat masa hidup eritrosit dan menghambat sintesis hemoglobin. Efek timbal pada sintesis heme terjadi pada hewan dan manusia melalui mekanisme penghambatan Pb terhadap *aminolevulinic acid dehydratase* (ALAD) (Mudipali, 2007) dan membloking penggabungan besi ke dalam protoporphyrin IX (Katzung & Trevor 2015). ALAD merupakan enzim kedua dalam jalur biosintesis heme yang mengkatalisis kondensasi dua molekul *aminolevulinic acid* (ALA) untuk membentuk satu molekul *porphobilinogen*. Determinasi aktivitas ALAD dalam eritrosit merupakan salah satu metode yang paling baik digunakan untuk mengevaluasi paparan timbal, karena ALAD sangat sensitif dan spesifik terhadap konsentrasi timbal darah. Aktivitas penghambatan Pb ini terjadi pada konsentasi antara 5-50 µg/100 g darah (Sakai, 2000).

Kompetisi Pb pada transporter besi DMT1 (Divalent Metal (Ion) Transporter 1) telah berimplikasi dalam penggabungan zinc ke dalam *protoporphyrin*, menghasilkan peningkatan kadar zinc *protoporphyrin*. Defisiensi besi bersamaan dengan toksisitas Pb dapat lebih memperberat efek Pb pada metabolisme sintesis heme. *Coproporphyrinuria*, kondisi yang ditandai dari keracunan Pb merupakan hasil dari efek Pb pada *porphyrin*, yang merupakan metabolit perantara dalam sintesis heme (Sakai, 2000). Transferrin (TF) adalah protein utama untuk distribusi zat besi di seluruh tubuh dan untuk transportasi dan distribusi zat besi di otak (Moos, 2002; Roy, *et. al.*, 2013). Penelitian pada hewan telah membuktikan bahwa regulasi TF reseptor pada BBB dan DMT pada *olfactory neurons* ketika kondisi besi menurun akan disertai dengan peningkatan transport logam, seperti mangan (Moos, 2002; Heilig, *et. al.*, 2005). Hal ini memungkinkan jika transportasi timbal dalam BBB dapat menggunakan cara yang sama ketika terjadi defisiensi besi.

Timbal telah terbukti mengganggu ekspresi reseptor TF dan menghambat endositosis TF pada retikulosit kelinci. Timbal dan Besi telah terbukti mempengaruhi mielinisasi dan sistem dopamin, yang mengarah pada perubahan pada konduksi syaraf, kognisi, dan perilaku (Kordas, 2010; Roy, *et. al*, 2013).

#### 2.1.6.3 Ginjal

Eksposur kronik timbal dosis tinggi, biasanya dikaitkan dengan waktu paparan pada konsentrasi tinggi timbal darah lebih dari 80mcg/dL, dapat menyebabkan fibrosis dalam intestinal ginjal dan neprosklerosis. Nephropati timbal mungkin memiliki periode laten selama bertahun-tahun. Timbal dapat mengubah sekresi asam urat oleh ginjal, menghasilkan serangan artritis gout berulang (*saturnine gout*). Eksposur kronik timbal dosis tinggi terkadang menghasilkan azotemia sementara, mungkin sebagai konsekuensi dari vasokonstriksi intrarenal. Penelitian yang dilakukan dalam sampel populasi umum memiliki dokumen hubungan antara konsentrasi timbal darah dan ukuran fungsi ginjal, termasuk kreatinin serum dan kreatinin clearance. Adanya faktor risiko lain untuk insufisiensi ginjal, termasuk hipertensi dan diabetes, dapat meningkatkan kemungkinan disfungsi ginjal yang diinduksi oleh timbal (Katzung & Trevor, 2015).

#### 2.1.6.4 Organ reproduksi

Infertilitas dan perubahan sistem reproduksi dapat terjadi karena perubahan akibat toksik sitas logam berat di lingkungan, salah satunya adalah timbal. Toksisitas timbal mempengaruhi sistem reproduksi pria dan wanita, serta pada hewan percobaan. Berdasarkan hasil penelitian, dampak yang paling umum terjadi pada wanita adalah infertilitas, Lamanya waktu menunggu untuk hamil, keguguran, preeklamsi, hipertensi kehamilan, persalinan prematur (Al-saleh, *et. al.*, 2008), *polymenorrhea*, menstruasi yang lama dan tidak normal, hipermenore, dan aborsi spontan (Tang & Zhu, 2003; Tchernitchin, *et. al.*, 2011). Pada hewan percobaan, paparan kronis timbal menyebabkan terhambatnya menstruasi, ovulasi, dan

pertumbuhan folikel pada monyet, keterlambatan pembukaan vagina pada tikus pubertas, penurunan frekuensi implantasi ovum dan kehamilan pada tikus (Tchernitchin, *et. al.*, 2011). Pada pria, tingginya konsentrasi timbal darah telah dikaitkan dengan berkurangnya produksi sperma (Katzung & Trevor, 2015).

#### 2.1.6.5 Saluran Pencernaan

Keracunan timbal moderat dapat menyebabkan hilangnya nafsu makan, sembelit, dan diare yang jarang terjadi. Pada konsentrasi tinggi, serangan intermiten nyeri perut kolik parah (kolik timbal) dapat terjadi. Mekanisme kolik timbal belum diketahui tetapi dipercaya adanya peningkatan kontraksi secara spasmodik pada otot halus dinding pencernaan, dimediasi oleh perubahan pada transmisi synaptik di persimpangan neuromuskuler otot polos. Pada individu yang terpapar dengan kebersihan gigi yang buruk, reaksi sirkulasi timbal dengan ion sulfur yang dilepaskan oleh aksi mikroba dapat menghasilkan endapan timbal sulfida yang gelap pada margin gingiva ('garis timbal gingiva') (Katzung & Trevor, 2015).

#### 2.1.6.6 Sistem kardiovaskuler

Studi epidemiologi, eksperimen, dan *in vitro* didapatkan bahwa ekposur timbal meningkatkan tekanan darah pada hewan eksperimen maupun pada manusia. Efek *pressure* timbal dapat dimediasi oleh interaksi dengan kalsium diperantarai kontraksi otot halus vaskular, serta stres oksidatif dan gangguan terkait jalur signal dalam nitrat oksida. Didalam populasi dengan lingkungan yang terpapar timbal, konsentrasi timbal darah berkaitan dengan kenaikan tekanan darah sistolik dan diastolik (Katzung & Trevor, 2015).

#### 2.1.7 Mekanisme Timbal terhadap Kehamilan

Masa kehamilan adalah masa paling penting, karena jika seorang ibu hamil mengalami keracunan timbal maka beresiko terhadap janin yang dikandungnya. Risiko yang sangat tinggi dikaitkan dengan wanita usia subur yang memiliki kadar

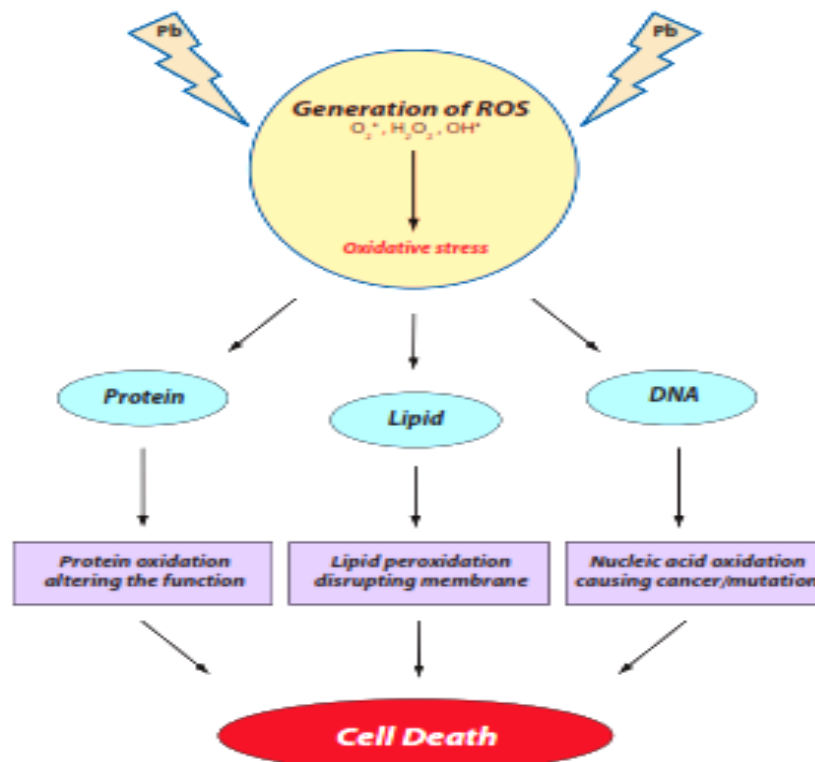


timbangan tinggi dalam tubuh mereka sebelum kehamilan. Janin rentan terhadap racun dan penyakit karena sedang dalam proses perkembangan, sehingga tidak dapat melindungi dirinya sendiri secara memadai. Paparan timbal selama periode ini dapat menyebabkan masalah berat pada fungsi neurologis dan perkembangan anak di kemudian hari. Selama kehamilan, timbal dengan mudah melewati aliran darah ibu ke janin melalui plasenta. Belum diketahui secara pasti bagaimana mekanisme pengangkutan timbal dari ibu ke janinnya, kemungkinan yang pertama adanya difusi sederhana, terjadinya pertukaran akibat adanya perbedaan kadar zat tertentu pada janin dengan ibu. Kedua, berasal dari transportasi kalsium dan metabolisme kalsium, timbal yang berada di dalam darah ibu selama kehamilan kemungkinan berasal dari tulang, tempat sebagian besar timbal di simpan, atau dari lingkungan (Brochin, *et. al.*, 2008).

Dampak dari toksisitas timbal tingkat rendah yang terjadi pada masa kehamilan adalah abortus, hipertensi dalam kehamilan, infertilitas, ruptur membran prematur, persalinan prematur, dan pre-eklamsia (Assi, *et. al.*, 2016). Pre-eklamsia dikaitkan dengan beberapa komplikasi tidak hanya selama kehamilan tetapi juga pada periode postpartum. Hasil penelitian terbaru menunjukkan bahwa wanita yang pernah hamil dengan komplikasi pre-eklamsia memiliki resiko sepanjang hidupnya untuk menderita penyakit kardiovaskuler, seperti infark miokard, stroke, dan gagal jantung. Anak-anak yang lahir dari wanita yang mengalami pre-eklamsia selama kehamilan juga berisiko lebih besar untuk kejadian kardiovaskular selama masa hidup mereka. Studi lain menunjukkan, adanya peningkatan tekanan darah dan indeks massa tubuh pada anak-anak yang lahir dari ibu dengan komplikasi pre-eklamsia (Peres, *et. al.*, 2018).

### 2.1.8 Mekanisme Timbal terhadap Pertahanan Anti Oksidan

Timbal menstimulasi stres oksidatif sebagai sebuah keadaan yang melibatkan pembentukan generasi radikal bebas melampaui batas yang diizinkan, akibatnya cadangan oksidan menipis dalam satu waktu dan menghambat kemampuan sistem biologi untuk membalikan efek yang terjadi. Generasi radikal bebas memulai reaksi berantai yang menghasilkan lipid peroksidasi, gangguan membran sel, oksidasi protein dan oksidasi dari asam nukleat seperti DNA dan RNA terpenting untuk kanker (gambar 2.2).



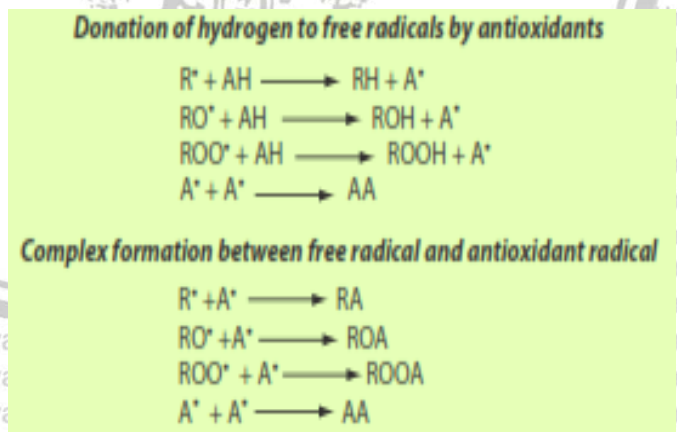
**Gambar 2.2 Mekanisme dan Target yang Potensial Terjadi pada Stres Oksidatif yang di Induksi Timbal (Flora, et. al., 2012).**

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian berbagai anti oksidan dapat mencegah atau mengatasi berbagai efek toksik timbal dan stres oksidatif pada khususnya (Flora, et. al., 2012). Antioksidan adalah zat yang, jika berada pada konsentrasi rendah dibandingkan dengan substrat yang teroksidasi, dapat

mencegah oksidasi substrat tersebut. Secara umum, antioksidan dapat mencegah toksisitas timbal dalam tiga cara (Garcia & Gonzalez, 2008) :

1. Dengan menonaktifkan ROS yang dihasilkan pada tingkat molekuler, dengan demikian mengakhiri reaksi berantai radikal (rantai pemecahan).
2. Dengan mengkelat (pengikatan suatu atom dengan suatu ligan yang mengikatnya pada dua atau lebih lokasi ikatan seolah-olah menjepit atom pusat tersebut) ion timbal dan mencegah pembentukan ROS lebih lanjut.
3. Dengan mengkelat timbal dan mempertahankannya dalam kondisi redoks, yang menyebabkan ketidakmampuannya untuk mengurangi molekul oksigen.

Antioksidan dikelompokkan berdasarkan mekanisme kerjanya yaitu : primer atau anti oksidan pemutus rantai dan antioksidan sekunder atau preventif. Antioksidan primer adalah senyawa yang mampu membersihkan radikal bebas yang bertanggung jawab atas inisiasi atau perbanyak reaksi berantai melalui mekanisme pemutus rantai (gambar 2.3).



**Gambar 2.3 Mekanisme Antioksidan Memutus Rantai.**  
 Keterangan : R : Radikal Bebas, RO, ROO, AH : Anti Oksidan, A : Anti Oksidan Radikal (Flora, *et. al.*, 2012).

Hal ini dilakukan dengan menyumbang elektron bebas ke ROS dan radikal lipid dalam sistem biologis serta mengubahnya menjadi molekul stabil. Hal ini untuk mencegah atau menunda proses oksidasi dan peroksidasi lipid yang dapat

menyebabkan kerusakan pada membran. Termasuk antioksidan primer adalah flavonoid, tokoferol, dan asam askorbat (Vaya & Aviram, 2000; Flora, *et. al.*, 2012).

Sedangkan, anti oksidan skunder (seperti polifenol) adalah anti oksidan yang bekerja memperlambat laju reaksi oksidasi. Perbedaan utama anti oksidan primer dan skunder adalah bahwa anti oksidan skunder tidak mengubah radikal bebas menjadi molekul stabil. Mereka mampu mengkelat (chelating) logam berat seperti timbal (Wanasundara & Shahidi, 2005; Flora, *et. al.*, 2012).

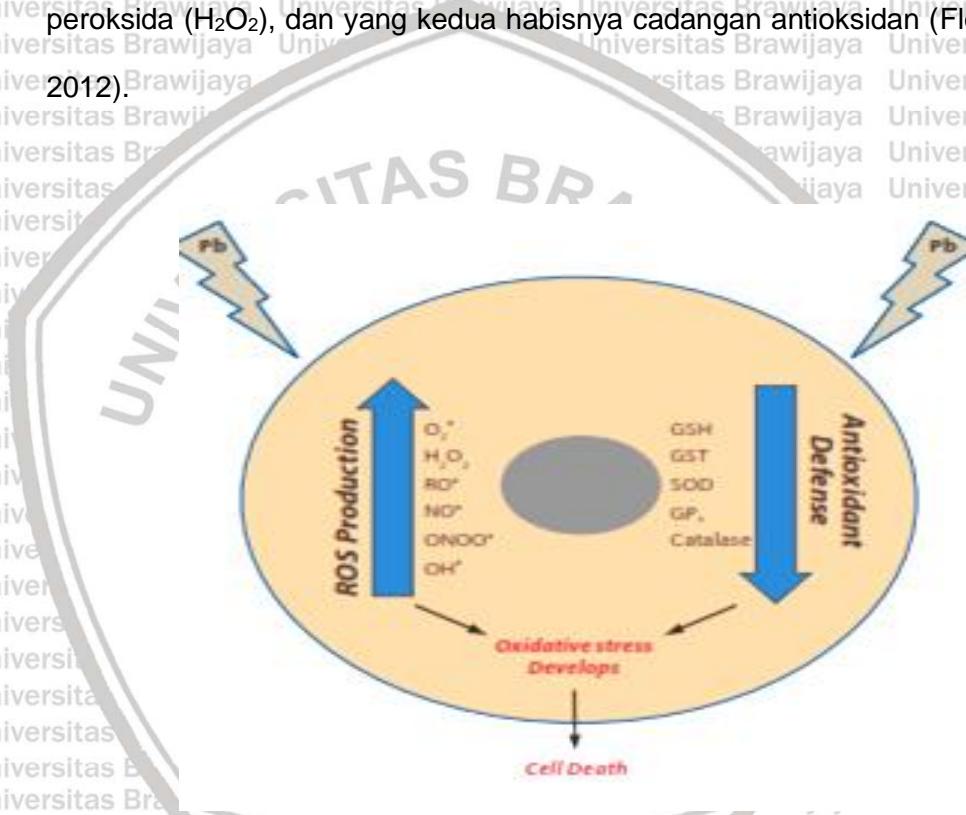
Penelitian telah mengungkapkan bahwa antioksidan memiliki kemampuan mencegah dan menyembuhkan kerusakan yang disebabkan oleh ROS di dalam tubuh. Antioksidan alami merupakan antioksidan yang terjadi secara alami dan berperan mengatasi radikal bebas yang dihasilkan oleh tubuh dibedakan menjadi antioksidan enzimatik dan non enzimatik. Antioksidan enzimatik seperti : SOD, CAT, GP adalah diproduksi secara endogen dalam sel, sedangkan antioksidan non enzimatik seperti : karotenoid, flavonoid, vitamin, mineral, dan sebagainya adalah komponen dari banyak buah-buahan, sayuran, kacang-kacangan, biji-bijian, dan daging-dagingan (Flora, 2009).

Jumlah antioksidan dalam kondisi fisiologis hanya cukup untuk mengatasi radikal bebas yang dihasilkan dalam keadaan fisiologis (normal). Adanya perbedaan konsentrasi radikal bebas dan antioksidan (karena lingkungan atau alam) dapat menyebabkan ketidak seimbangan antara radikal bebas dan antioksidan sehingga menyebabkan stres oksidatif. Peran eksogen antioksidan menjadi penting, eksogen antioksidan dapat diminum dalam bentuk suplemen makanan untuk mempertahankan homeostasis antara radikal bebas dan antioksidan mencegah berbagai efek buruk, seperti toksisitas logam berat, peradangan, kanker, penuaan, gangguan kardiovaskular dan otak (Pietta, 2000; Willcox, *et. al.*, 2004).

### 2.1.9 Mekanisme Timbal terhadap Stres Oksidatif

Stres oksidatif mewakili ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dan kemampuan sistem biologis untuk siap mendetoksifikasi zat antara yang reaktif atau untuk memperbaiki kerusakan yang terjadi (Flora, *et. al.*, 2012).

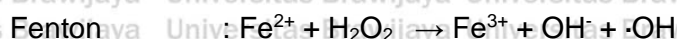
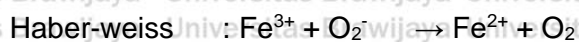
Pengaruh timbal, menyebabkan timbulnya stres oksidatif terjadi karena dua jalur yang berbeda bekerja secara bersamaan (gambar 2.4); yang pertama datangnya generasi ROS, seperti hidroperoksida ( $\text{HO}_2^+$ ), oksigen singlet dan hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), dan yang kedua habisnya cadangan antioksidan (Flora, *et. al.*, 2012).



**Gambar 2.4 Mekanisme Stres Oksidatif dalam Sel Akibat Paparan Timbal** (Flora, *et. al.*, 2012).

Proses pembentukan ROS di dalam tubuh terjadi ketika  $\text{O}_2^-$  (Superoksida) merupakan ROS yang pertama kali terbentuk terutama pada proses transpor elektron mitokondria, *NADPH oxidase*, dan *xantine oxidase*. Superoksida akan dirubah oleh enzim superoksida dismutase menjadi  $\text{H}_2\text{O}_2$  (hidrogen peroksida) yang akan dikatalisis menjadi air oleh enzim *catalase*. Jumlah hidrogen peroksida yang banyak di dalam tubuh dapat bereaksi dengan ion  $\text{Fe}^{2+}$  menghasilkan radikal

OH<sup>-</sup> (hidroksil) yang sangat reaktif (Burton & Jauniaux, 2011). Hidrogen peroksida dapat berubah menjadi radikal hidroksil melalui reaksi haber-weiss dan fenton dengan adanya logam Fe<sup>2+</sup> atau Cu<sup>2+</sup> melalui reaksi :



O<sub>2</sub><sup>-</sup> juga dapat bereaksi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mrnghasilkan OH<sup>-</sup>. Radikal hidroksil merupakan ROS yang paling reaktif dalam merusak protein, lipid, karbohidrat dan DNA (Birben *et. al.*, 2012).

Timbal diketahui memiliki efek toksik pada struktur dan fungsi membran karena timbal bersifat larut lemak (lipofilik) sehingga mudah memasuki membran sel (Bijoor, *et. al.*, 2012). Pada membran sel, adanya ikatan ganda dalam asam lemak melemahkan ikatan C – H pada atom karbon yang berdekatan dengan ikatan ganda dan membuat H lebih mudah tereliminasi. Karena itu, asam lemak yang mengandung nol hingga dua ikatan ganda lebih tahan terhadap stres oksidatif dari pada asam lemak tak jenuh ganda dengan lebih dari dua ikatan ganda. Setelah inkubasi asam linoat, linolenat, dan asam arakidonat dengan timbal, konsentrasi produk akhir dari stres oksidatif yaitu *malondialdehyde* (MDA) meningkat dengan jumlah ikatan ganda asam lemak (Ahmed & Siddiqui, 2007).

Mekanisme lain untuk kerusakan oksidatif membran yang diinduksi timbal adalah efek pada perubahan komposisi asam lemak membran. Karena panjang rantai asam lemak tidak jenuh dikaitkan dengan kerentanan membran terhadap peroksidasi, pemanjangan asam arakidonat yang diinduksi timbal bertanggung jawab atas peningkatan peroksidasi lipid dalam membran. Menyebabkan pemisahan fase lateral dan meningkatkan tingkat peroksidasi lipid, timbal dapat mempengaruhi membran terkait proses seperti aktivitas enzim membran, endo- dan eksositosis, pengangkutan zat terlarut melintasi lapisan ganda, dan proses

transduksi sinyal. Dapat disimpulkan akibat paparan timbal komposisi lipid membran berubah hal ini dapat mengakibatkan integritas, permeabilitas, dan fungsi membran berubah sehingga meningkatkan kerentanan terhadap peroksidasi lipid (Ahmed & Siddiqui, 2007).

Ion logam memiliki banyak fungsi dalam sistem biologis, seperti pembawa muatan, perantara dalam reaksi yang dikatalisasi, atau sebagai elemen struktural dalam pemeliharaan konformasi protein. Situs pengikatan untuk ion-ion ini dalam mesin seluler menggabungkan selektivitas ion dan fungsionalitas dengan tugas yang harus dilakukan ion. Selektivitas pada ion-ion itu biasanya terbatas di dalam sel. Unsur-unsur yang berada di luar lingkungan tempat organisme berevolusi membentuk masalah untuk mesin seluler, karena tidak memiliki mekanisme spesifik untuk mengelolanya. Timbal adalah salah satu logam, yang toksisitasnya didasarkan pada mimikri ion-molekul parsial dengan kation seluler (Garza, *et. al.*, 2006).

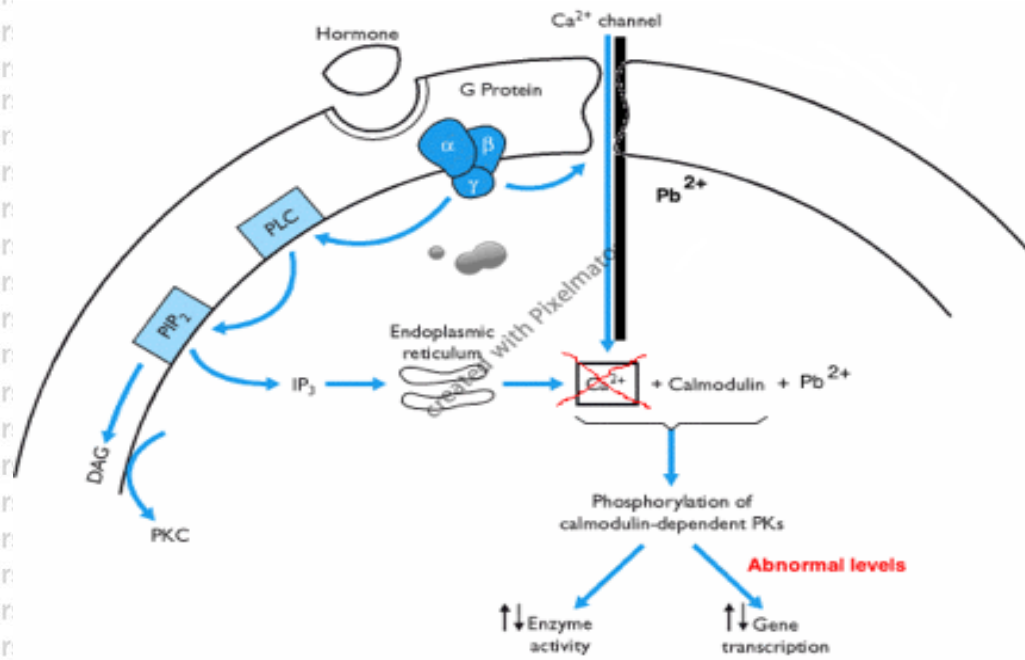
Kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sebagai *second Messenger* memiliki peran penting mengatur berbagai fungsi seluler termasuk kontraksi, sekresi, metabolisme, ekspresi gen, kelangsungan hidup sel, dan kematian sel. Meskipun  $\text{Ca}^{2+}$  terkenal karena perannya sebagai messenger kedua yang krusial dalam memodulasi banyak fungsi fisiologis seluler, kelebihan  $\text{Ca}^{2+}$  dapat merusak fungsi mitokondria dan sebagai penyebab terjadinya ROS mitokondria (Peng & Jou, 2010). Timbal dapat mengganti (substitusi) kalsium sebagai *second Messenger* (Yang, *et.al.*, 2014).

Timbal meniru kalsium secara fundamental masuk ke dalam sel dengan protein trans membran (gambar 2.5), yang disebut kanal kalsium (Gorlach, *et. al.*, 2015).

Konsentrasi intraseluler  $\text{Ca}^{2+}$  umumnya meningkat dengan dua cara melalui pembukaan saluran kalsium dalam membran sel atau pelepasan kalsium yang disimpan di endoplasma, keduanya adalah hasil dari stimulasi G-protein. G-protein

sebagai mesengger pertama yang melekat pada membran sel akan merangsang pembukaan saluran kalsium sehingga kalsium ekstraseluler memasuki sel dan berikatan dengan kalmodulin (protein pengikat kalsium, yang mempengaruhi dan menstimulasi banyak intraseluler fungsi-fungsi seperti peradangan, metabolisme, apoptosis, kontraksi otot, gerakan intraseluler, pertumbuhan saraf dan respons imun). Timbal dapat mengganggu ke-2 jalur ini. Timbal memiliki afinitas tinggi terhadap kalmodulin bahkan mampu mengikatnya pada level rendah (Brochin, *et al.*, 2008). Pada otak tikus yang terpajan  $Pb^{2+}$ , neurotoksisitas diduga disebabkan oleh akumulasi  $Ca^{2+}$  (Cao, *et al.*, 2008; Pachauri, *et al.*, 2009) dan disregulasi sinyal  $Ca^{2+}$  / kalmodulin-dependent (She, *et al.*, 2009; Zhang, *et al.*, 2012).  $Pb^{2+}$  di dalam sel dapat menyebabkan kerusakan mitokondria kompleks I dan III, dan mengganggu homeostasis  $Ca^{2+}$  intraseluler dengan mengikat kelompok *sulfhydryl* pada protein dan bersaing dengan  $Ca^{2+}$  (Flora *et al.*, 2007). Akibat terganggu homeostasis kalsium, terjadi Peningkatan penggunaan  $Ca^{2+}$  oleh mitokondria, meningkatkan transpor elektron mitokondria, dan generasi ROS (Sanders, *et al.*, 2009). Jika hal ini terus berlangsung maka akan terjadi disfungsi mitokondria, yang ditandai dengan terbukanya pori transisi mitokondria mengarah kedepolarisasi mitokondria, pelepasan sitokrom C, aktivasi dari berbagai caspases dan pembelahan hilir protein efektor kematian, dan akhirnya menghasilkan apoptosis kematian sel (Lidsky & Schneider, 2003).

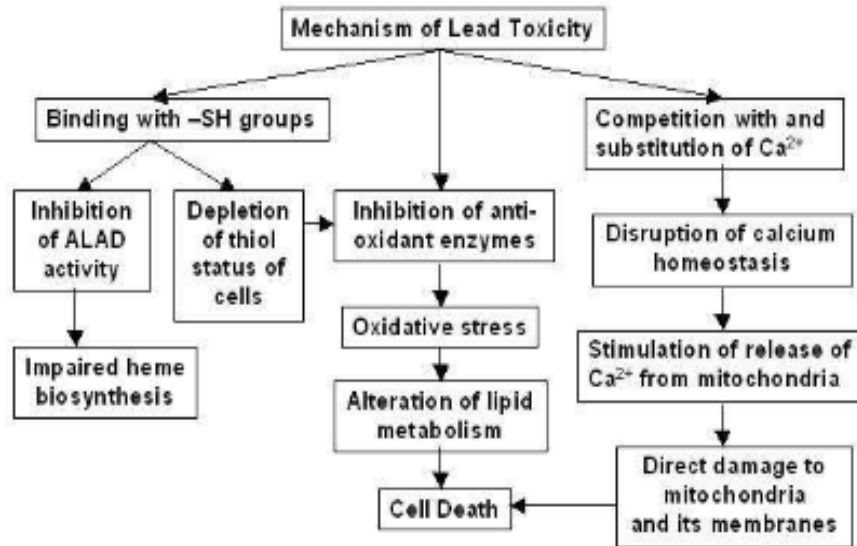




**Gambar 2.5 Mekanisme Timbal Masuk ke Dalam Sel dan Berikatan dengan Kalmodulin** (Brochin, *et. al.*, 2008).

Calmodulin (CaM) adalah protein dengan empat situs EF (situs pengikat kalsium yang ditemukan dalam ratusan protein) dalam strukturnya, salah satunya adalah sensor utama kalsium sel. Timbal tidak hanya mengikat keempat situs ini, tetapi juga ke situs kelas dua pengikatan kalmodulin yang tidak mengikat kalsium. Ikatan ion timbal inilah yang mengubah konformasi protein dan mungkin menyebabkan perubahan aktivasi protein kinase. Protein kinase mentransfer gugus fosfat dari molekul ATP ke molekul substrat protein; fosforilasi ini mengubah bentuk substrat molekul dari tidak aktif menjadi aktif. Protein teraktivasi kemudian mengubah berbagai proses seluler seperti enzim pengaktif lebih lanjut, mengubah permeabilitas membran, mendorong sintesis protein tertentu, merangsang atau menghambat metabolisme jalur, dan memulai sekresi hormon dan zat lain. Ketika protein kinase diaktifkan secara tidak tepat menyebabkan semua proses seluler dapat terganggu. Akibat paparan ini akan mempengaruhi dua kompleks protein spesifik yaitu protein kinase C dan *N-methyl-D-aspartate* sub tipe reseptor glutamat (Brochin, *et. al.*, 2008). Timbal memberikan efek neurotoksik dengan

mengganggu pelepasan neurotransmitter yang dimediasi  $\text{Ca}^{2+}$  / kalmodulin, mengaktifkan protein kinase yang bergantung pada calmodulin menghasilkan pengurangan kumpulan asetilkolin yang tersedia di terminal saraf dan akhirnya bertanggung jawab untuk defisit memori dan motorik yang terkait paparan timbal (Gill, *et. al.*, 2003).

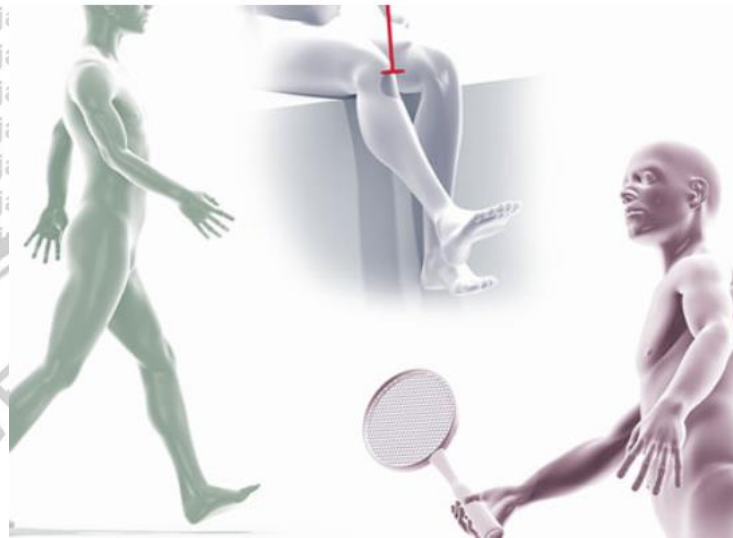


Gambar 2.6. Mekanisme Toksisitas Timbal (Flora, *et. al.*, 2007).

## 2.2 Lokomotor

Lokomotor adalah Gerak motorik yang memungkinkan hewan atau manusia bergerak di lingkungan. Lokomotor diekspresikan dalam banyak bentuk dan mencakup beragam aksi motorik seperti berenang, terbang, berjalan, berlari, dan melompat. Gerak motorik sangat penting untuk kelangsungan hidup dan memungkinkan individu untuk menemukan makanan, melarikan diri dari bahaya, pasangan, dan bermigrasi ke lingkungan yang sesuai. Gerakan lokomotor berbeda dari aksi motorik lain yang dihasilkan oleh sistem saraf, seperti refleks lutut yang secara stereotip diulang sebagai respons terhadap stimulasi sensorik, atau gerakan terampil, seperti bermain tenis atau piano yang dipelajari dan melibatkan koordinasi otot yang kompleks sering kali dalam perilaku tidak berulang (Gambar 2.7). Lokomotor adalah aktivitas motorik berulang yang melibatkan urutan aktivitas

dalam otot tungkai dan tubuh dalam ritme dan pola yang tepat. Meskipun ada beberapa adaptasi dan pematangan lokomotor, hal itu merupakan perilaku alami yang ada pada vertebrata, termasuk manusia, ketika dalam kandungan perilaku ini dikontrol dalam sistem saraf, dan digunakan ketika seluruh pelengkap dan aktivitas postur tubuh matang (Kiehn & Dougherty, 2013).



**Gambar 2.7 Aktivitas Locomotor.**

Keterangan : Locomotor adalah gerak motorik ritmik alami yang berbeda dari refleks sederhana yang diulang secara stereotip sebagai respons terhadap stimulasi sensorik atau gerakan terampil, seperti bermain tenis, yang dipelajari dan melibatkan koordinasi otot yang kompleks sering dalam perilaku yang tidak berulang (Kiehn & Dougherty, 2013).

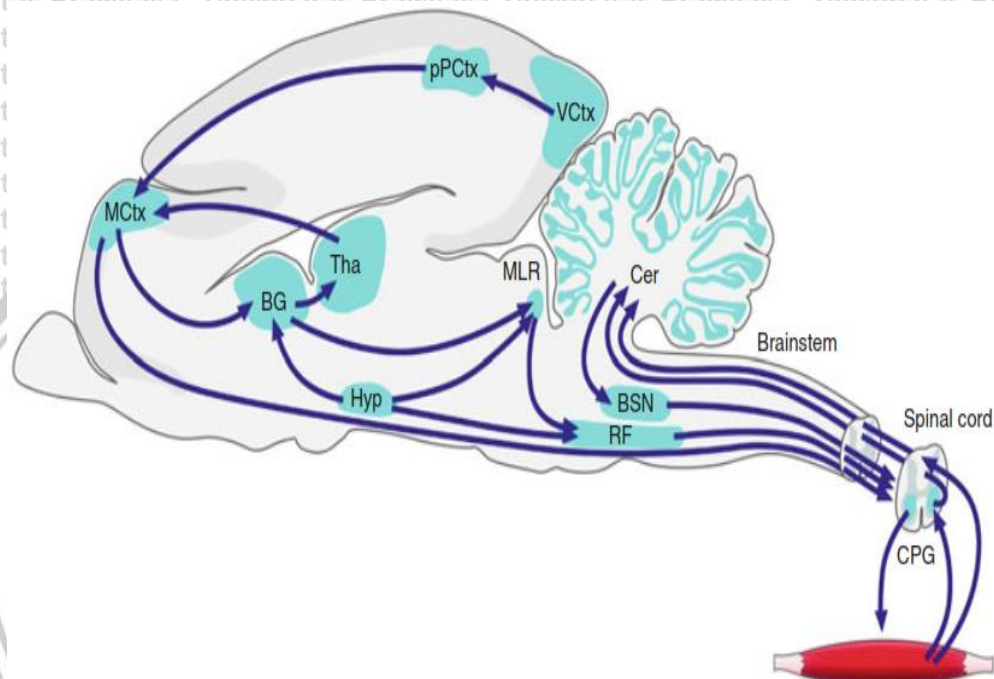
Semua perilaku dalam semua lokomotor dikendalikan oleh sejumlah komponen neuron regulator yang berbeda (gambar 2.8) :

1. Sistem saraf di otak yang memilih perilaku.
2. Sistem saraf di *midbrain* dan *lower brainstem* yang mengawali perilaku.
3. Jaringan saraf di sumsum tulang belakang yang menghasilkan perilaku.
4. Sinyal sensorik yang beradaptasi dan menyempurnakan aktivitas jaringan saraf di sumsum tulang belakang dengan lingkungan.
5. Sinyal sensorik yang dikirim ke struktur supraspinal, termasuk otak kecil, dan digunakan untuk memperbaiki dan mengadaptasi perilaku alat gerak.

6. Sistem saraf di korteks yang melakukan penyesuaian visual gerakan lokomotor.

7. Sistem neuromodulator yang memodulasi aktivitas alat gerak dengan menyebabkan perubahan aktivitas jaringan yang berlangsung lama.

Akhirnya, lokomotor membutuhkan integrasi yang erat dengan postur tubuh sehingga aktivitas dapat dilakukan dengan baik (Kiehn & Dougherty, 2013).



**Gambar 2.8 Organisasi struktur saraf yang mengendalikan gerak di vertebrata.**

Keterangan : Pemilihan perilaku lokomotor dilakukan oleh basal ganglia (BG) dan diaktifkan oleh sirkuit di lateral dan medial hipotalamus (Hyp). Output neuron dari proyek ganglia basal ke thalamus yang kemudian diproyeksikan ke motor cortex (MCTX) dan ke daerah lokomotor mesencephalic (MLR). Inisiasi penggerak dimediasi oleh neuron dalam MLR yang diproyeksikan neuron dalam pembentukan medial reticular (RF) di batang otak bagian bawah. Neuron dalam proyek pembentukan reticular medial ke CPG lokomotor di sumsum tulang belakang yang mengeksekusi gerak. Serabut bawah dari jalur tulang belakang vestibular dan rubrospinal (nuclei batang otak, BSN) mempertahankan keseimbangan dan memodulasi aktivitas CPG lokomotor yang sedang berlangsung. Otak kecil (Cer) mengkoordinasikan perilaku motorik dengan memediasi gerakan yang menghasilkan umpan balik dan umpan balik internal serta dengan memodulasi aktivitas dalam jalur retikulospinal, rubrospinal, dan jalur vestibulospinal. Umpan balik sensorik propioseptif memodulasi aktivitas CPG alat gerak dan dikirim ke otak kecil. Otak kecil juga menerima sinyal yang memantau aktivitas internal CPG. Aktivitas kortikal (MCTX) memberikan koreksi visuomotor (VCTX) dari penggerak melalui posterior parietal korteks (pPCTX) (Kiehn & Dougherty, 2013).

## 2.3 Denyut Jantung

Denyut jantung merupakan salah satu ukuran yang paling mendasar untuk menilai kehidupan dan kesehatan. Selama persalinan kisaran normal denyut jantung janin yang sehat cukup diketahui dan telah divalidasi oleh ratusan ribu sumber rekaman yang didokumentasikan dari jantung janin menggunakan salah satunya Ultrasonografi Doppler atau elektrokardiogram janin (EKG). Kisaran normal DJJ 110 bpm hingga 160 bpm. Pola denyut dalam rentang normal juga dapat dikenali, menunjukkan janin yang sehat atau tidak sehat. Dengan janin masuk utero dan tertutup dari pandangan, denyut jantung adalah satu-satunya parameter fisiologis yang dapat diukur dengan mudah. Mungkin karena alasan ini kemampuan untuk mengukur dan mendokumentasikan secara *real-time* jantung janin selama perawatan klinis dan rutin berkembang jauh melampaui kemampuan untuk mengukur dan mendokumentasikan denyut jantung neonatal segera setelah lahir (Hutchon, 2016).

Pada hewan dan manusia yang sehat, interval antara detak jantung tidak konstan melainkan terus berubah. Variabilitas beat-to-beat diatur oleh input saraf ke jantung, dengan cabang simpatis dan parasimpatis dari sistem saraf otonom berkontribusi akselerasi dan perlambatan detak jantung, masing-masing. Denyut jantung dan denyut jantung variabilitas (HRV) terkait dengan tanda-tanda vital lainnya, pernapasan, suhu, dan tekanan darah, melalui umpan balik refleks dari sistem saraf pusat ke sel alat pacu jantung (Fairchild & O'Shea, 2010).

Sistem denyut jantung yang bekerja pada tubuh manusia menurut Fairchild & O'Shea (2010) adalah :

### 2.3.1 Regulasi Sistem Saraf HRV

Regulasi kronotropik jantung terjadi terutama melalui persarafan otonom sinoatrial (SA) node sel alat pacu jantung. SA node adalah daerah kecil dari segmentasi impuls khusus sel-sel pada dinding posterolateral atrium kanan pada

titik dengan superior vena cava. Sementara kardiomiosit lain memiliki potensi alat pacu jantung, sel-sel simpul SA memiliki yang lebih cepat laju pacu dan dengan demikian sinyalnya mengesampingkan laju intrinsik sel atrium dan ventrikel lainnya. SA node dipersarafi oleh saraf otonom eferen yang melepaskan neurotransmitter dan memicu perubahan fluks ion yang mengakibatkan akselerasi dan perlambatan denyut jantung.

### 2.3.2 Sistem saraf simpatik

Sistem saraf simpatik (SNS) bertanggung jawab untuk stres akut terhadap respon "*fight* atau *flight*" respons, yang meliputi peningkatan denyut jantung dan kontraktilitas jantung serta penghambatan lainnya fungsi visceral, dimediasi sebagian besar oleh pelepasan epinefrin adrenomedulla. Dibawah kondisi dasar SNS juga memainkan peran dalam pemeliharaan homeostasis fisiologis di semua sistem organ. sistem organ termasuk sistem kekebalan tubuh. Neuron sensorik simpatis mengirim sinyal aferen ke ganglia paravertebralis anterior ke segmen toraks medula spinalis. Dari sana, neuron simpatis postganglionik meluas ke batang otak dan kemudian ke jantung, paru-paru, dan *viscera* di mana mereka mengatur fungsi melalui pelepasan norepinefrin.

SNS memainkan peran utama dalam mengatur detak jantung, curah jantung, resistensi pembuluh darah perifer, dan tekanan darah. Sinyal aferen muncul dari baroreseptor dan kemoreseptor di batang otak (medula oblongata), arteri karotis, dan lengkung aorta. Baroreseptor merasakan peningkatan dan penurunan tekanan darah, dan memicu simpatis dan respons parasimpatis pada tekanan darah dan detak jantung untuk mengembalikan homeostasis. Chemoreceptors merasakan perubahan kandungan karbon dioksida, oksigen, dan ion hidrogen darah, yang mengarah ke sinyal yang dikirim melalui saraf simpatis ke diafragma dan jantung. Reseptor ini terutama terlibat dalam kontrol pernapasan tetapi juga dapat menanggapi penurunan tekanan darah menyebabkan penurunan

pengiriman oksigen ke reseptor. Ujung saraf simpatis di SA node dari jantung melepaskan norepinefrin, yang berikatan dengan reseptor beta1-adrenergik terkemuka untuk aktivasi *adenylyl cyclase*, peningkatan cAMP, perubahan fluks ion, depolarisasi lebih cepat, dan peningkatan denyut jantung dan kontraktilitas.

### 2.3.3 Sistem Saraf Parasimpatis

Sistem saraf parasimpatis (PNS) memainkan peran penting dalam pengaturan denyut jantung dan banyak fungsi vital lainnya. Saraf vagus (saraf kranial X) baik indera maupun sinyal perubahan fisiologis dalam keadaan sehat dan sakit. di jantung, saraf vagal parasimpatis ujungnya melepaskan asetilkolin, yang berikatan dengan reseptor kolinerjik muskarinik pada sel alat pacu jantung, menyebabkan pembukaan saluran kalium, hiperpolarisasi potensi membran, dan penurunan detak jantung.

### 2.3.4 Imunitas Vagal-Komunikasi Otak

Saraf vagus, selain memainkan peran utama dalam pengaturan denyut jantung dan fungsi gastrointestinal dan paru-paru, juga merupakan modulator kunci pertahanan inang terhadap infeksi. Ada interaksi dua arah antara sistem kekebalan dan otak, dengan aferen dan sinyal eferen diteruskan melalui serat vagal. Adanya infeksi peradangan atau inflamasi diteruskan ke otak oleh serabut saraf aferen vagal.

### 2.3.5 Faktor Humoral dan Mekanik berkontribusi terhadap HRV

Sementara pelepasan neurotransmitter langsung pada SA node adalah mediator utama dari denyut jantung akselerasi dan deselerasi, ada juga bukti humoral dan mekanik tidak langsung (stretch) efek pada detak jantung dan variabilitasnya. Dalam jantung yang lemah, variabilitas terbatas pada tingkat irama denyut jantung telah diamati. Mekanoreseptor di atrium merespons peregangan (seperti apa yang terjadi selama respirasi normal dengan perubahan volume intrathoracic dan vena) dan memberi sinyal perubahan denyut jantung secara

langsung tanpa input saraf. Rilis sistemik dari katekolamin adrenomedullary dalam menanggapi stres dapat menyebabkan peningkatan denyut jantung di *sympathetic nerve firing* ke sel *pacemaker* jantung.

## 2.4 Dopamin

Dopamin (DA) adalah katekolamin utama neurotransmitter di otak mamalia.

DA mengendalikan berbagai fungsi termasuk aktivitas lokomotor, kognisi, emosi, penguatan positif, asupan makanan, dan regulasi endokrin. Katekolamin ini juga memainkan banyak peran di perifer sebagai modulator fungsi kardiovaskuler, pelepasan katekolamin, sekresi hormon, tonus pembuluh darah, fungsi ginjal, dan motilitas gastrointestinal (Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

Dopamin umumnya menunjukkan kerja inhibitorik yang lambat pada neuron-neuron Sistem Saraf Pusat (SSP). Kerja ini banyak ditemui pada neuron-neuron substansia nigra yang mengandung dopamin (Katzung & Trevor, 2015). Karena luasnya lokalisasi reseptor dopamin di area otak dan perannya dalam berbagai fungsi, disfungsi dopaminergik telah terlibat dalam patofisiologi skizofrenia, gangguan mood, *obsessive-compulsive disorder* (OCD), gangguan spektrum autisme, *attention deficit-hyperactivity disorder* (ADHD), tourette's sindrom, ketergantungan zat, penyakit Parkinson dan gangguan lainnya (Ayano, 2016).

### 2.4.1 Sintesis Dopamin

Dopamin disintesis dari asam amino tirosin, yang dibawa ke otak melalui mekanisme transpor aktif. Tirosin diproduksi di hati dari fenilalanin melalui aksi fenilalanin hidroksilase. Tirosin kemudian diangkut ke neuron yang mengandung dopamin di mana serangkaian reaksi mengubahnya menjadi dopamin. Dalam neuron katekolaminergik, tirosin hidroksilase mengkatalisasi penambahan gugus hidroksil ke posisi meta tirosin, menghasilkan L-dopa. Langkah pembatas laju dalam sintesis katekolamin ini dapat dihambat oleh katekolamin tingkat tinggi



(penghambatan produk akhir). Karena tirosin hidroksilase biasanya dengan substrat jenuh, manipulasi kadar tirosin tidak mudah berdampak pada laju sintesis katekolamin. Setelah terbentuk, L-dopa secara cepat dikonversi menjadi dopamin oleh dopa decarboxylase, yang terletak di sitoplasma. Sekarang diakui bahwa enzim ini bekerja tidak hanya pada L-dopa tetapi juga pada semua asam L-amino aromatik yang terjadi secara alami, termasuk triptofan, dan lebih tepat disebut asam amino dekarboksilase aromatik (Musacchio, 2013).

#### 2.4.2 Sistem Dopaminergik

Empat jalur utama untuk sistem dopaminergik di otak (Ayano, 2016) :

1. Jalur Nigrostriatal, Di mana serabut berasal dari substantia nigra (pars compacta) dan memproyeksikan secara rostral untuk didistribusikan secara luas di basal ganglia (caudate nucleus dan putamen). Dalam jalur ini dopamin memainkan peran penting dalam pergerakan (kontrol fungsi motorik dan dalam mempelajari keterampilan motorik baru). Degenerasi sistem nigrostriatal menyebabkan penyakit Parkinson. Badan sel Dopamin bagian pars compacta wilayah ini mengirimkan proyeksi naik ke dorsal striatum (terutama ke kaudat dan putamen) dan dengan demikian memodulasi kontrol motorik. Piramidal ekstra efek obat antipsikotik diduga dihasilkan dari blokade reseptor dopamin striatal ini.
2. Jalur Mesolimbik, tempat proyeksi dopaminergik berasal dari daerah tegmental ventral, dan kemudian menyebar ke amigdala, korteks piriform, inti septum lateral dan nukleus accumbens. Dalam jalur ini dopamin berfungsi dalam sistem emosi dan penghargaan. Dopamin mesolimbik memediasi kesenangan di otak. Dopamin dilepaskan selama situasi yang menyenangkan dan merangsang seseorang untuk mencari aktivitas atau pekerjaan yang menyenangkan, seperti makanan, seks, dan beberapa penyalahgunaan obat merangsang stimulan pelepasan dopamin di otak,

terutama di daerah-daerah seperti nucleus accumbens dan pre-frontal cortex. Selain itu dopamin memainkan peran utama dalam kecanduan di jalur ini. Semua penyalahgunaan obat yang diketahui mengaktifkan jalur mesolimbik, dan perubahan plastis pada jalur ini dianggap mendasari kecanduan narkoba. Obat antipsikotik yang menurunkan gejala positif skizofrenia dengan memblokir reseptor dopamin di jalur mesolimbik.

3. Jalur Mesokortikal, dimana serat dopaminergik juga muncul dari daerah A10 (daerah tegmental ventral) dan memproyeksikan ke korteks frontal dan daerah septohippocampal. Dopamin mesokortikal memediasi perilaku kognitif dan emosional. Tingkat dopamin di otak, terutama korteks prefrontal, membantu meningkatkan memori dan perhatian. Bagaimanapun, level ini mempunyai keseimbangan yang lemah dan apabila level bertambah atau berkurang dapat menjurus ke tingkat abnormal, memori cedera. Obat antipsikotik memperburuk gejala skizofrenia negatif dengan memblokir reseptor dopamin di jalur mesokortikal.

4. Jalur Tuberoinfundibular yang berasal dari arkuatanukleus dari hipotalamus (arkuata dan inti paraventrikular) dan memproyeksikan ke kelenjar hipofisis (median eminence). Dopamin dalam jalur ini menghambat pelepasan prolaktin. Obat-obatan antipsikotik yang menghambat reseptor dopamin di hipofisis dapat menghambat pelepasan prolaktin dan menyebabkan galaktorea. Dopamin adalah neuroendokrin utama inhibitor sekresi prolaktin dari hipofisis anterior kelenjar. Dopamin yang diproduksi oleh neuron dalam nukleus arkuata hipotalamus dilepaskan dalam pembuluh darah hipotalamohipofisial dari median eminence, yang memasok kelenjar hipofisis. Dopamin ini bekerja pada sel-sel lactotrope yang menghasilkan prolaktin. Sel-sel ini dapat menghasilkan prolaktin tanpa adanya dopamin.

Dopamin kadang-kadang disebut faktor penghambat prolaktin (PIF), hormon penghambat prolaktin (PIH), atau prolaktostatin.

### 2.4.3 Dopamin Reseptor Sistem Saraf Pusat

Adanya penemuan baru dibidang kloning gen mengungkapkan tingkat kompleksitas reseptor DA. DNAs Komplementer 5 reseptor yang berbeda dari Subtipe DA (D1-D5) telah disolasi dan dikarakterisasi seperti pada tabel 2.1 di bawah ini :

**Tabel 2.1 Karakteristik Molekuler Dopamin Reseptor**

Dopamine Receptor Subtype	D1	D2	D3	D4	D5
Gene symbol	<i>DRD1</i>	<i>DRD2</i>	<i>DRD3</i>	<i>DRD4</i>	<i>DRD5</i>
Chromosomal gene map locus	5q35.1	11q23.1	3q13.3	11p15.5	4p16.1
Number of introns in the coding region	None	6	5	3	None
Pseudogenes	None	None	None	None	<i>DRD5P1, DRD5P2</i>
Presence of splice variants	None	Yes D2S, D2L	Yes	Yes	None
Number of amino acids	446	D2S, 414; D2L, 443	400	387	477
Molecular weight	49,300	D2S, 47,347; D2L, 50,619	44,225	41,487	52,951
G protein coupling	G $\alpha_s$ , G $\alpha_{olf}$	G $\alpha_s$ , G $\alpha_o$	G $\alpha_s$ , G $\alpha_o$	G $\alpha_s$ , G $\alpha_o$	G $\alpha_s$ , G $\alpha_q$
Selective agonists	Fenoldopam, SKF-38393, SKF-81297	Bromocriptine, pergolide, cabergoline, ropinirole	7-OH-DPAT, pramipexole, rotigotine, (+)-PD-128907	A-412997, ABT-670, PD-168,077	None
Selective antagonists	SCH-23390, SCH-39166, SKF-83566	Haloperidol, spiperone, raclopride, sulpiride, risperidone	Nafadotride, GR 103,691, GR 218,231, SB-277011A	A-381393, FAUC 213, L-745,870, L-750,667	None

7-OH-DPAT, hydroxy-2-dipropylaminotetralin; A-381393, 2-[4-(3,4-dimethylphenyl)piperazin-1-ylmethyl]-1H-benzimidazole; A-412997, N-(3-methylphenyl)-2-(4-pyridin-2-yl)pyridin-1-ylacetamide; ABT-670, 3-methyl-N-(1-oxo-3',4',5',6'-tetrahydro-2'H-[2,4'-bipyridine]-1'-ylmethyl)benzamide; FAUC 213, 2-[4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-ylmethyl]pyrazolo[1,5-a]pyridine; GR 218,231, (+)-(2R)-1,2,3,4-tetrahydro-6-[[4-methoxyphenylsulfonyl]methyl]-N,N-dipropyl-2-naphthalenamine; GR 103,691, 4'-acetyl-N-[4-(4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl)butyl][1,1'-biphenyl]-4-carboxamide; L-745,870, 3-(4-[4-chlorophenyl]piperazin-1-yl)-methyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine; L-750,667, 3-[4-(4-iodophenyl)piperazin-1-yl]methyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine; PD-128907, (4*a*R,10*b*R)-3,4*a*,4,10*b*-tetrahydro-4-propyl-2*H*,5*H*[1]benzopyrano[4,3-*b*]-1,4-oxazin-9-ol; PD-168,077, N-[[4-(2-cyanophenyl)piperazin-1-yl]methyl]-3-methylbenzamide-(2*Z*)-but-2-enedioic acid; ; SB-277011A, N-(*trans*-4-[2-(6-cyano-3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)ethyl]cyclohexyl)quinoline-4-carboxamide; SCH-39166, (-)-*trans*-6,7,7*a*,8,9,13*β*-hexahydro-3-chloro-2-hydroxy-N-methyl-5*H*-benzo[*d*]naphtho[2,1-*b*]azepine; SKF-38393, 2,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-1-phenyl-1*H*-3-benzazepine; SKF-81297, (±)-6-chloro-7,8-dihydroxy-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-3-benzazepine hydrobromide; SKF-83566, 8-bromo-2,3,4,5-tetrahydro-3-methyl-5-phenyl-1*H*-3-benzazepin-7-ol.

Sumber : Beaulieu & Gainetdinov (2011).

Neurotransmitter/messenger kimia dopamine memberikan efek biologinya melalui 2 subfamili reseptor dopamine, menyerupai D1 (DRD1 dan reseptor dopamine D5) dan menyerupai D2 (DRD2, reseptor dopamine D3, dan reseptor dopamine D4), yang memicu reaksi biokimia dan farmakologis. Reseptor menyerupai D1 merangsang aktivitas *adenylyl cyclase* dan meningkatkan intraseluler cAMP dengan mengganggeng G protein  $\alpha$  subunit Gas, sedangkan reseptor menyerupai D2 mengasosiasikan dengan menghambat subunit G $\alpha_i$  dan

menurunkan tingkat cAMP. DRD1 dan DRD2, diekspresikan oleh neuron berduri sedang di striatum, merupakan reseptor dominan dopamin sub tipe di otak yang diaktifkan oleh dopamin, dan fungsi integratif mereka bertanggung jawab atas mayoritas efek dopaminergik (Lee, et. al., 2017). Semua reseptor Dopamin bersifat metabotropik merupakan reseptor yang terhubung dengan G protein, membentuk second messenger sebagai salah satu jalur transduksi sinyal (Katzung & Trevor, 2015).

**Tabel 2.2 Reseptor Dopamin Lokasi dan Fungsinya**

Reseptor	Lokasi	Fungsinya
D <sub>1</sub> (DA <sub>1</sub> )	Ditemukan dalam konsentrasi tinggi di daerah mesolimbik, nigrostratal, dan mesokortikal, seperti substancia nigra, bulbus olfaktorius, nukleus accumbens, cuadate, putamen, striatum, diekspresi level rendah dalam cerebellum, hippocampus, thalamus, hipotalamus, ginjal	Stimulasi <i>adenylyl cyclase</i> dan peningkatan cAMP, gerakan bebas, mengatur pertumbuhan dan perkembangan, regulasi pemberian makan, emosi, perhatian, penghargaan, tidur, kontrol impuls, perilaku reproduksi, memori kerja, pembelajaran, kontrol rennin di ginjal
D <sub>2</sub> (DA <sub>2</sub> )	Dinyatakan dalam level tinggi sebagai substancia nigra, bulbus olfaktorius, cuadate, putamen, ventral tagemental area (VTA), nucleus accumbens, ditemukan dalam level rendah di hipotalamus, septum, ginjal, korteks, jantung, pembuluh darah, kelenjar adrenal, saluran pencernaan, simpatik ganglia	Penghambatan <i>adenylyl cyclase</i> dan peningkatan konduktan kalium. Terlibat dalam memori kerja, fungsi penghargaan-motivasi mengatur tekanan darah, fungsi ginjal, motilitas gastrointestinal, vasodilatasi, mengatur reseptor penggerak presinaptic menghambat penggerak dan post reseptor sinaptik mengaktifkan penggerak
D <sub>3</sub>	Dinyatakan hanya dalam CNS dan tidak ditemukan di luar CNS. Ditemukan di bulbus olfaktorius, nucleus accumbens	Penghambatan <i>adenylyl cyclase</i> , terlibat dalam fungsi kognitif endokrin, emosi, regulasi fungsi alat gerak dan memodulasi fungsi endokrin
D <sub>4</sub>	Substancia nigra, hippocampus, amygdala, thalamus, hipotalamus, ginjal, korteks frontal, jantung, pembuluh darah, kelenjar adrenal, saluran gastrointestinal, ganglia simpatik, globus palidum, reseptor terendah yang ditemukan di CNS daripada semua reseptor dopamin	Penghambatan <i>adenylyl cyclase</i> , regulasi fungsi ginjal, motilitas gastrointestinal, vasodilatasi, tekanan darah, modulasi fungsi kognitif
D <sub>5</sub>	Substantia nigra, hipotalamus, hippocampus, dentate gyrus, ginjal, jantung, pembuluh darah, kelenjar adrenal, saluran pencernaan, ganglia simpatik	Terlibat dalam proses nyeri, fungsi afektif, fungsi endokrin dopamin

Sumber : Katzung & Trevor ( 2015); Ayano (2016).

#### 2.4.4 Dopamin Reseptor *Peripheral*

Dopamin (DA) adalah prekursor metabolisme noreadrenalin dan adrenalin, memiliki kapasitas intrinsik untuk mengaktifkan reseptor adrenergik dan dopaminergik perifer. Pada kondisi fisiologis, DA meningkatkan curah jantung dan tekanan aorta, mengurangi resistensi pembuluh darah ginjal dan meningkatkan laju filtrasi glomerulus dan pengeluaran urin (Ciarka, *et. al.*, 2010). Reseptor dopamin telah diidentifikasi dalam sejumlah organ dan jaringan, yang meliputi pusat dan perifer sistem saraf, saluran pencernaan, ginjal, berbagai pembuluh vaskular, dan jantung. Reseptor *D1-like* terletak di otot polos yang memiliki efek vasodilatasi langsung, sedangkan stimulasi reseptor *D2-like* terletak di presinaptik menyebabkan dilatasi vaskular tidak langsung menghambat aktivitas vasokonstriktor serat saraf simpatik.

**Tabel 2.3 Distribusi dan Fungsi Reseptor DopaminPeripheral**

Tissue	Receptor Type	Function
Blood vessels		
Adventitia	D <sub>2</sub> -like	Inhibition of NE release
Media	D <sub>1</sub> -like	Vasodilatation
Intima	D <sub>2</sub> -like	Unknown
Adrenal gland		
Glomerulosa	D <sub>1</sub> -like	Unknown
	D <sub>2</sub> -like	Inhibition of aldosterone secretion
Medulla	D <sub>1</sub> -like	Stimulation of E/NE release
	D <sub>2</sub> -like	Inhibition of E/NE release
Kidney		
Glomerulus	D <sub>1</sub> -like	Increase of filtration rate
Juxtaglomerular apparatus	D <sub>1</sub> -like	Stimulation of renin secretion
Proximal tubule	D <sub>1</sub> -like	Inhibition of Na <sup>+</sup> reabsorption
Ascending limb of loop of Henle	D <sub>1</sub> -like	Inhibition of Na <sup>+</sup> reabsorption
Cortical collecting duct	D <sub>1</sub> -like	Inhibition of Na <sup>+</sup> reabsorption
	D <sub>2</sub> -like	Inhibition of vasopressin action
Sympathetic ganglia/ endings	D <sub>2</sub> -like	Inhibition of NE release
Heart	D <sub>4</sub>	Unknown

NE, norepinephrine; E, epinephrine.

Sumber : Missale, *et. al.*, (1998).

Penelitian Cavallotti, *et. al.* (2010), menemukan adanya reseptor Dopamin D1, D2, D4, dan D5 di jaringan jantung. Reseptor Dopamin ini terdeteksi pada endokardium, miokardium, dan epikardium.

**Tabel 2.4 Hasil Mikrodensiti Protein Imunoreaktif dari Reseptor Dopamin di Jantung manusia**

RPI	Endocardium	Myocardium	Epicardium
<b>Left and right ventricle</b>			
D1-RPI	64.2 ± 1.5 <sup>a</sup>	30.6 ± 1.1	n.d.
D2-RPI	n.d.	25.2 ± 0.9	41.1 ± 1.3 <sup>b</sup>
D3-RPI	n.d.	n.d.	n.d.
D4-RPI	n.d.	11.6 ± 0.8 <sup>d</sup>	29.7 ± 1.1 <sup>d</sup>
D5-RPI	41.3 ± 1.6 <sup>c</sup>	32.6 ± 1.2	n.d.
<b>Left and right atrium</b>			
D1-RPI	52.3 ± 1.8 <sup>a</sup>	19.3 ± 0.8	n.d.
D2-RPI	n.d.	16.9 ± 0.6	35.4 ± 1.3 <sup>b</sup>
D3-RPI	n.d.	n.d.	n.d.
D4-RPI	n.d.	13.2 ± 1.4	28.5 ± 1.6 <sup>d</sup>
D5-RPI	39.4 ± 1.8 <sup>c</sup>	21.8 ± 0.9	n.d.

Data are expressed in conventional units (CU) proportional to the intensity of immune staining and are the mean values ± SEM. Microdensitometric analysis was performed as indicated in Material and methods

RPI, receptor protein immunoreactivity; n.d., not detectable

<sup>a</sup>P < 0.05, endocardium versus myocardium; <sup>b</sup>P < 0.05, epicardium vs myocardium; <sup>c</sup>P < 0.05, D5 vs D3; <sup>d</sup>P < 0.05, D4 vs D2

Sumber : Cavallotti, *et. al.* (2010)

Tabel di atas menunjukkan bahwa hanya endokardium yang mengandung reseptor Dopamin D1-like (D1 dan D5) yang berkaitan dengan stimulasi *adenylyl-siklase*. Semua sub tipe reseptor dopamin memiliki hubungan sangat dekat dengan semua struktur jantung.

#### 2.4.5 Reseptor Dopamin D1 (DRD1)

Reseptor D1 ditandai oleh sebuah gen pada kromosom 5. Berfungsi mengaktifkan *adenylyl cyclase* dan peningkatan cAMP. Lokasinya terutama di putamen, nukleus *accumben*, tuberkel olfaktorius. Reseptor Dopamin tipe D1 terletak di zona kompakta substansia nigra dan secara prasinaptik terletak pada akson striatal yang berasal dari neuron-neuron kortikal dan juga dari sel-sel dopaminergik di dalam substansia nigra (Neve, *et. al.*, 2004). Dalam korteks serebral, D1DR diekspresikan pada dendrit sel piramidal dan pada interneuron. Dalam striatum, D1DR diekspresikan pada *medium spiny neurons* (MSNs) (Kim, *et. al.*, 2015). Gen reseptor dopamin D1 dan D5 tidak mengandung intron di daerah pengkodean mereka (Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

#### 2.4.6 Reseptor Dopamin D2 (DRD2)

Reseptor D2 merupakan anggota ke-2 dari subfamili ini. D2 ditandai oleh sebuah gen pada kromosom 4, juga meningkatkan cAMP, dan ditemukan di hipocampus dan hipotalamus. Reseptor D2 yang ditandai di kromosom 11, menurunkan cAMP (dengan menghambat *adenylyl cyclase*), dan menyekat kanal kalsium tapi membuka kanal kalium. Reseptor tersebut ditemukan pada, baik pada pra maupun pasca sinapneuron-neuron di putames-kaudatus, nukleus acumben, dan tuberkel olfaktorius (Neve, *et. al.*, 2004).

Reseptor kelas D2 memiliki beberapa intron, dengan enam intron ditemukan dalam gen yang mengkode D2 dopamin reseptor, lima dalam gen untuk D3 dopamin reseptor, dan tiga di gen untuk d4 dopamin reseptor. Karena itu, secara genetik organisasi reseptor kelas D2 menyediakan dasar untuk penyambungan generasi varian reseptor. Untuk contoh, penyambungan alternatif ekson 87-basis-pasangan antara intron 4 dan 5 dari reseptor dopamin D2 mengarah pada generasi dua reseptor dopamin D2 utama varian yang telah disebut D2S (D2-pendek) dan D2L (D2-panjang). Kedua isoform disambung alternatif berbeda dalam Kehadiran 29 asam amino tambahan di ketiga loop intraseluler. Varian ini dari D2 dopamin reseptor memiliki anatomi, fisiologis, pensinyalan yang berbeda, dan sifat farmakologis. D2S telah terbukti sebagian besar diekspresikan secara presinaptik dan menjadi sebagian besar terlibat dalam fungsi autoreceptor, sedangkan D2L tampaknya sebagian besar merupakan isoform postsinaptik (De Mei *et al.*, 2009; Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

#### 2.4.7 Hubungan Timbal dengan DRD1 dan DRD2

Paparan timbal mempengaruhi metabolisme dopamin dan serotonin. Timbal secara selektif mengurangi ikatan dopamin dengan reseptor dopamin dan Dopamin transporter dalam nukleus accumbens, hal menunjukkan bahwa paparan timbal bisa menjadi predisposisi penyakit neurodegeneratif yang terkait

dengan disfungsi dopaminergik. Keracunan Timbal juga terkait dengan penurunan kadar molekul yang terlibat dalam pergantian monoamina, termasuk monoamina vesikular transporter 2, serotonin, dan dopamin- $\beta$ -hidroksilase, di otak auditori. Pada penelitian Chang, *et. al.* (2014), didapatkan adanya peningkatan kadar tirosin hidroksilase dan transporter dopamin (DAT) pada ekspresi protein terkait dopamin di otak tikus setelah paparan timbal, disertai adanya penurunan kadar reseptor dopamin D1 dan peningkatan kadar reseptor dopamin D2.

Penelitian tentang dampak neurologis toksisitas timbal memberikan alasan yang meyakinkan tentang bagaimana timbal dapat berkontribusi pada perkembangan ADHD pada beberapa anak. Anak-anak kecil menyerap timbal pada tingkat yang lebih besar daripada orang dewasa, dan begitu diserap ke dalam tubuh, timbal dengan mudah melintasi sawar darah-otak. Di antara daerah otak yang paling terpengaruh oleh timbal adalah korteks prefrontal, hippocampus, ganglia basal, dan otak kecil (Costa, *et. al.*, 2004, Nigg, *et. al.*, 2008). Semua daerah ini telah terlibat dalam ADHD, termasuk bukti disfungsi dalam jaringan serebelum-prefrontal-striatal (Valera, *et. al.*, 2007; Goodlad, *et. al.*, 2013). Timbal merusak sejumlah sistem neurotransmitter termasuk jalur dopaminergik, glutamatergik, dan kolinergik. Ketiga sistem neurotransmitter ini, terutama sistem dopaminergik, telah dikaitkan dengan gejala ADHD (Goodlad, *et. al.*, 2013).

Penelitian Kim, *et. al.* (2018), terdapat Interaksi antara dopamin reseptor D2 dan paparan timbal pada ketebalan kortikal dari lobus frontal pada anak dengan gangguan *attention-deficit/hyperactivity* (ADHD). Hal ini menegaskan bahwa paparan timbal berdampak buruk bagi kecerdasan anak.

#### **2.4.8 Hubungan DRD1 dan DRD2 dengan Lokomotor**

Dopamin terlibat secara kritis dalam sejumlah proses fisiologis, peran fungsional berbeda sub tipe reseptor dopamin telah banyak ditandai. Peran yang



paling banyak dipelajari melibatkan efek dopamin pada aktivitas alat gerak.

Beberapa penelitian menghasilkan bahwa aktivitas alat gerak terutama dikontrol oleh reseptor dopamin D1, D2, dan D3. Aktivasi D1 reseptor dopamin yang diekspresikan secara eksklusif neuron post-sinaptik memiliki stimulasi sedang yang berpengaruh pada aktivitas lokomotor (Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

Peran D2 dan D3 reseptor dopamin jauh lebih kompleks daripada reseptor dopamin D1 karena mereka dihasilkan dari dua ekspresi yaitu presinaptik dan postsinaptik dari reseptor subtype ini. Autoreseptor yang dilokalkan secara presinaptik umumnya menyediakan mekanisme umpan balik negatif yang penting itu menyesuaikan laju pembakaran neuron, sintesis, dan pelepasan neurotransmitter sebagai respons terhadap perubahan ekstraseluler tingkat neurotransmitter. Aktivasi pre-sinaptik autoreseptor kelas D2 umumnya menyebabkan penurunan pelepasan dopamin yang menghasilkan penurunan alat gerak aktivitas, sedangkan aktivasi reseptor post-sinaptik merangsang gerak. Karena autoreseptor kelas D2 umumnya diaktifkan oleh konsentrasi agonis dopamin yang lebih rendah dari yang diperlukan untuk mengaktifkan reseptor post-sinaptik, agonis dopamin yang sama dapat menyebabkan biphasic efek, menyebabkan aktivitas menurun pada dosis rendah dan aktivasi perilaku pada dosis tinggi. Reseptor dopamin D2 tampaknya merupakan jenis autoreseptor dominan yang terlibat dalam regulasi presinaptik laju pembakaran, sintesis dopamin dan pelepasan dopamin. Perlu dicatat bahwa varian penyambungan reseptor dopamin D2, D2L dan D2S, tampaknya memiliki distribusi neuron yang berbeda, D2S dominan presinaptik dan D2L menjadi postsinaptik. Karena itu, peran yang bervariasi dari postsinaptik dan presinaptik Reseptor dopamin D2 mungkin ditentukan oleh perbedaan kontribusi isoform ini (De Mei, *et al.*, 2009; Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

## 2.4.9 Hubungan DRD1 dan DRD2 dengan Denyut Jantung

Dopamin memainkan peran penting dalam patogenesis hipertensi dengan mengatur transportasi epitel natrium dan vasodilatasi langsung atau tidak langsung dengan hormon lain dan faktor humoral, seperti reaktif oksigen spesies (ROS) dan sistem Renin-Angiotensin. Disfungsi reseptor Dopamin pada hipertensi mungkin melibatkan kelainan modifikasi post-translational dari reseptor Dopamin.

Aktivasi resptor D1-*like* pada endokardium dapat menghambat pertukaran Na/H dan aktivitas Na/K-adenosin trifosfatase. Isoform Dopamin D2S yang berada di membran plasma banyak ditemukan di jantung, berfungsi menginduksi aktivasi *Calcineurin*. *Calcineurin* membantu pertumbuhan dan diferensiasi miosit jantung, aktifitas sel-T, memori, dan apoptosis. *Calcineurin* ditemukan dalam kadiomiosit manusia, fibroblast, dan sel mesotelial epikardial, dan tingkat protein. Reseptor dopamin mampu mengendalikan banyak banyak hal dari fungsi jantung manusia, termasuk jaringan koroner (Cavallotti, *et. al.*, 2010).

## 2.5 Pegagan (*Centella asiatica*)

### 2.5.1 Klasifikasi Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan (*Centella asiatica*) diklasifikasikan sebagai berikut :

**Tabel 2.5 Klasifikasi Pegagan**

Klasifikasi	Keterangan
Kingdom	Plantal/Eukaryota
Subkingdom	Embryophyta
Divisi	Spermatophyta
Subdivisi	Angiospermae
Kelas	Dicotyledone
Subkelas	Rosidae
Superorder	Aralianae
Order	Araliales (umbelliflorae)
Family	Apiaceae / Umbelliferae
Subfamily	Hydrocotyle
Genus	Centella
Spesies	Centella asiatica (L.) Urban

Sumber : Joshi & Caturvedi (2013).

Tanaman pegagan (*Centella asiatica*) memiliki nama yang berbeda-beda : Pegaga (Aceh); Pugago (Padang); kaki kuda (Melayu); Cowet gompeng (Sunda), Gangangan (Jawa), Paiduh Pegaga (Bali), Pegaga (Makasar), Sandanan (Irian) (BPOM, 2010).

### 2.5.2 Habitat dan Morfologi Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan (*Centella asiatica*) tumbuh di daerah tropis dan subtropis, di Indonesia tanaman ini dikenal dengan nama "pegagan". Pegagan (*Centella asiatica*) daunnya berbentuk seperti ginjal, tumbuh di daerah teduh, lembab dan berawa. Pegagan (*Centella asiatica*) tumbuh merayap menutupi tanah, tidak memiliki batang, tinggi tanaman 10 – 50 cm, memiliki bunga yang umumnya berjumlah 3, memiliki putik, benang sari dan pelindung, bunga berwarna putih atau merah muda yang tersusun dalam karangan berbentuk payung (Winarto, 2003; Nurjanah 2008)

Pegagan (*Centella asiatica*) berkembang biak secara vegetatif dengan stolon, pada setiap stolon akan tumbuh tunas tanaman baru dan secara degeneratif menggunkan biji yang berbentuk lonjong dan pipih, berbau harum dan berasa pahit, panjang buah 2-2,5 mm (Winarto, 2003; Agoes, 2010).

### 2.5.3 Kandungan Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan (*Centella asiatica*) mengandung triterpenoid, karotenoid, flavonoid, alkaloid, glikosida, dan minyak atsiri (Chandrika & Kumarab, 2015). Pegagan (*Centella asiatica*) mengandung pentacyclik triterpenoid saponins dalam jumlah besar yang dikenal dengan centelloids (Hashim, *et. al.*, 2011). Triterpene yang terkandung pada daun Pegagan (*Centella asiatica*) mengandung komponen aktif seperti kolagen, anti oksidan, anti selulit, dan perlindungan terhadap sinar UV (James & Dubery, 2009). Hasil ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) menggunakan HPLC (High Performance Liquid Chromatoggraphy) didapatkan kandungan asiatic acid, madecassic acid, asiaticoside, dan madecassoside. Madecassic Acid

merupakan kandungan tertinggi triterpene pada ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) (Hashim, *et. al.*, 2011).

**Tabel 2.6 Kandunga Nutrisi tiap 100 g Pegagan (*Centella asiatica*)**

Kandungan Nutrisi	Jumlah
Kalori	37,0 kkal
Moisture	84,6%
Protein	2,4%
Karbohidrat	6,7%
Lemak	0,2%
Air	87,7%
Serat	5,43 g
Soluble dietary	0,49 g
Ca	174 mg
P	17 mg
K	345 mg
Na	107,8 mg
Mg	87 mg
Fe	14,86 mg
Zn	0,97 mg
Cu	0,24 mg
Cr	0,046 mg
Vitamin C	48,5 mg
Vitamin B1	0,09 mg
Vitamin B2	0,19 mg
Vitamin A	442 µg
Niasin	0,1 mg
Karotin	2649 µg

Sumber : Hashim, *et. al.* ( 2011); Joshi & Caturvedi (2013)

Pegagan (*Centella asiatica*) juga banyak mengandung bahan aktif antioksidan yaitu polyphenol, flavonoid, karatenoid (neoxantin,  $\beta$ -carotene, violaxanthin, dan lutein), tannin, dan vitamin C (Rahman, *et. al.*, 2013; Chandrika & Kumarab, 2015). Selain itu, kandungan quercetin dan kaempferol, castilicetin, castiliferol, isochlorogenic acid, catenin, rutin, dan naringin juga berkontribusi terhadap aktivitas antioksidatif dari Pegagan (*Centella asiatica*) (Zainol, *et. al.*, 2008; Subban, *et. al.*, 2008).

Pegagan (*Centella asiatica*) tidak bersifat toksis walau diberikan hingga dosis 2000 mg/kg/BB, hal ini sudah dibuktikan pada hewan coba yang diberi pegagan tidak menunjukkan gejala klinis toksis (Sulastry, 2009)

#### 2.5.4 Manfaat Pegagan (*Centella asiatica*)

Manfaat pegagan (*Centella asiatica*) bagi kesehatan tubuh antara lain :

##### 1. Anti oksidan

Triterpene yang terkandung pada daun Pegagan (*Centella asiatica*) mengandung komponen aktif seperti kolagen, antioksidan, antiselulit, dan perlindungan terhadap sinar UV. (James & Dubery, 2009). Pegagan (*Centella asiatica*) juga banyak mengandung bahan aktif antioksidan yaitu polyphenol, flavonoid, karatenoid (neoxantin,  $\beta$ -carotene, violaxanthin, dan lutein), tannin, dan vitamin C (Rahman, *et. al.*, 2013; Chandrika & Kumarab, 2015). Selain itu, kandungan quercentin dan kaempferol, castilicetin, castiliferol, isochlorogenic acid, catenin, rutin, dan naringin juga berkontribusi terhadap aktivitas antioksidatif dari Pegagan (*Centella asiatica*) (Zainol, *et. al.*, 2008; Subban, *et. al.*, 2008;).

##### 2. Anti Inflamasi

Hasil ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) menggunakan HPLC (High Performance Liquid Chromatography) didapatkan kandungan asiatic acid, madecassic acid, asiaticoside, dan madecassoside (Hashim, *et. al.*, 2011). Madecassoside berguna untuk menurunkan proliferasi sel limpa, tingkat plasma TNF- $\alpha$  dan IL-6, PGE2 jaringan sinovial dan ekspresi protein COX-2 pada penyakit arthritis (Li, *et. al.*, 2009).

##### 3. Kardioprotektif

Asiaticoside dan asam arjunolat merupakan senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) diketahui dapat mengurangi enzim laktat dehidrogenase, glutamat oksaloasetat, keratin posfokinase, serta glutamat piruvat transaminase yang diketahui sebagai marker penyebab disfungsi jantung (Gnanapragasam, *et. al.*, 2007)

4. Neuroprotektif

Ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) diketahui dapat melindungi neuron dopaminergik melalui peningkatan neurotropin seperti BDNF (Khotimah, *et. al.*, 2015). Selain itu, hasil penelitian Hanum (2016) membuktikan bahwa ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dapat memperbaiki aktivitas lokomotor dan meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase pada zebrafish yang diapapar rotenon .

5. Manfaat lain Ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) adalah anti hipertensi (Incadela, *et. al.*, 2001), obat bagi tukak lambung (Cheng & Koo, 2000), anti cemas, anti diabetes, anti protozoa, mengurangi retardasi mental dan penyakit vaskuler (Jamil, *et. al.*, 2007), anti selulit, dan perlindungan terhadap sinar UV (James & Dubery, 2009).

2.6 Zebrafish (*Danio rerio*)

2.6.1 Karakteristik Zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) merupakan ikan air tawar yang banyak ditemukan di perairan Nepal dan India. Ikan air tawar ini juga banyak ditemukan di Asia Tenggara dan Amerika (Spence, *et. al.*, 2008).

**Tabel 2.7 Kalsifikasi Ikan Zebrafish (*Danio rerio*)**

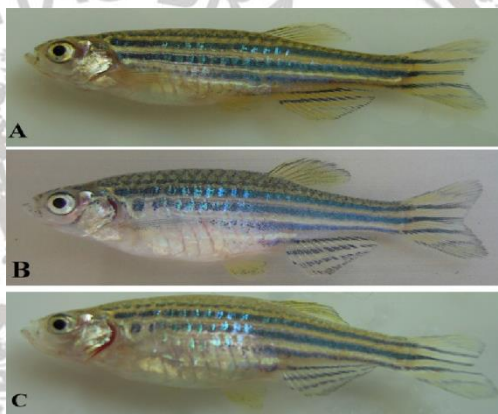
Tingkatan	Nama
Kingdom	Animal
Filum	Chordata
Kelas	Actynoptergii
Ordo	Cypriniformes
Family	Cyprinidae
Subfamily	Rasborone
Genus	Brachydanio
Spessies	Brachydanio rerio

Sumber : Richard (2011)

Zebrafish (*Danio rerio*) hidup berkelompok dengan rentang hidup antara 2-3 tahun dan jika dirawat dan dipelihara dengan baik dapat bertahan hidup hingga 5

tahun. Zebrafish dewasa memiliki panjang badan sekitar 40 mm bila diukur dari moncong ke arah sirip ekor (Spence, *et. al.*, 2008; Richard, 2011).

Ikan zebrafish dewasa tampak seperti zebra karena memiliki garis-garis hitam/biru dan putih horizontal mulai dari sirip hingga *caudal*. Zebrafish jantan dan betina dapat dibedakan dari bentuk dan garis warna pada tubuhnya. Jika zebrafish betina memiliki bentuk tubuh lebih besar dengan perut lebih besar dan terdapat garis berwarna putih sedang pada sisi tubuh dipenuhi garis-garis keperakan. Berbeda dengan zebrafish jantan yang memiliki tubuh lebih *slim* dan panjang dari zebrafish betina, pada sisi tubuhnya terdapat garis biru dan emas terutama pada sirip dubur jantan (Aoyama, *et. al.*, 2015)



**Gambar 2.9. Zebrafish Jantan dan Betina.**

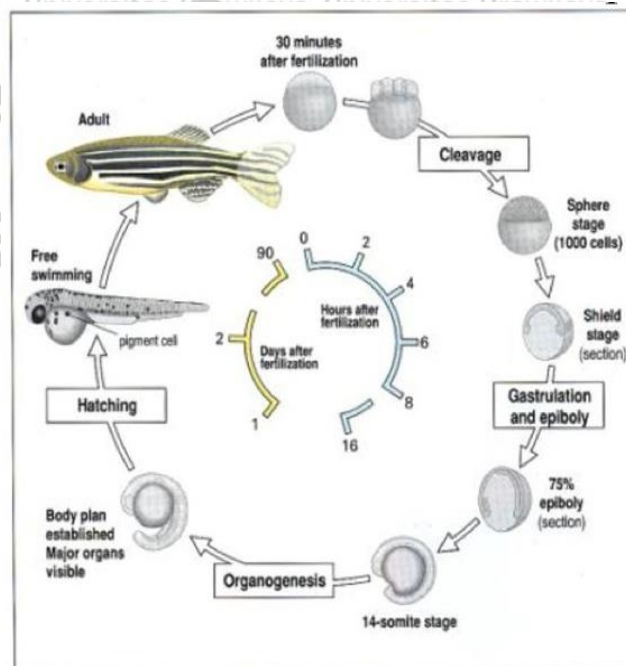
Keterangan : (A) Zebrafish jantan, (B, C) Zebrafish betina (Avdesh, *et. al.*, 2012).

### 2.6.2 Perkembangan Zebrafish (*Danio rerio*)

Embriogenesis adalah proses yang sangat dinamis yang ditandai oleh pembelahan sel yang cepat, diferensiasi, migrasi sel, dan morfogenesis. Zebrafish, merupakan model embriogenesis vertebrata yang populer, telah banyak membantu dalam memahami perkembangan seluler dan molekuler. Embrio zebrafish transparan dan perkembangannya berlangsung di eksternal sehingga memudahkan para peneliti untuk melakukan manipulasi, serta dapat diamati secara langsung di bawah mikroskop. Perkembangan embrio *zebrafish* terjadi secara cepat sehingga pengamatan tidak perlu dilakukan dalam waktu lama.

Dalam 24 jam, organ-organ yang penting sudah mulai terbentuk, jantung sudah berkontraksi dan sirkulasi darah sudah berjalan (Baskin, et. al., 2010).

Usia zebrafish analogi dengan usia manusia, jika usia zebrafish 6-10 hari analog dengan usia anak-anak 2 – 8 tahun. Usia zebrafish 4-6 minggu analog dengan usia pra remaja dan remaja pada manusia yaitu 11-16 tahun. Usia zebrafish dewasa awal 4-6 bln analog dengan usia manusia 23-43 tahun, dan usia zebrafish 12 bulan analog dengan usia manusia 50 tahun ke atas (Sorribes, 2013).



Gambar 2.10. Siklus Hidup Zebrafish (Baskin, et. al., 2010).

Tahapan perkembangan zebrafish diuraikan pada tabel 2.5 di bawah ini :

Tabel 2.8 Tahap Perkembangan zebrafish

Periode	Usia	Deskripsi	Gambar
Zygot	0 - 3/4 hpf	Telur baru dibuahi hingga berlangsung pembelahan pertama.	
Pembelahan	3/4 - 2 1/4 hpf	Siklus pembelahan sel sangat cepat dari 4 menjadi 8, 16, 32 sampai 64 sel.	



Periode	Usia	Deskripsi	Gambar
<b>Fase Embrio</b>			
Blastula	2 <sup>1</sup> / <sub>4</sub> - 5 <sup>1</sup> / <sub>4</sub> hpf	Mulai terbentuk epiboly yaitu penipisan kedua yolk sincitial layer dan blastoderm yang melewati yolk sel (gerakkan menurut bakal posterior-anterior tubuh), diawali dengan terbentuknya kubah dan berubahnya blastodisk ke blastoderm.	
Gastrula	5 <sup>1</sup> / <sub>4</sub> - 10 <sup>1</sup> / <sub>3</sub> hpf	Akhir pembentukan epiboly, terbentuk tail bud, primary germ layer, dan embrionik axis mulai terbentuk	
Segmentasi	10 <sup>1</sup> / <sub>3</sub> - 24 Hpf	Awal perkembangan neural, opic primordium terbentuk, awal ginjal terbentuk, tampak pembentukan telinga, lengkung pharyngeal primordial, awal organogenesis dan diferensiasi sel darah, ekor mulai terlihat dan terjadi pemanjangan ekor di anterior dan terbentuk kurva di ventral. Panjang embrio : 0,9 - 1,6 mm	
Pharyngula	24-48 hpf	Tahap phylotic dari embrio, body axis lurus mulai dari lengkungan sampai yolksac, sirkulasi mulai terdapat pigmentasi, dan sirip mulai terbentuk. Panjang embrio : 1,9 - 2,9 mm	
Hatching	48-72 hpf	Pembentukan yang cepat pada sistem organ, perkembangan kartilago pada kepala, dan sirip pectoral, dan persiapan terjadinya hatching. Panjang embrio : 3,1 - 3,5 mm	

**Post Embryonic development**

Early larva	72 hpf – 30 dpf	Mulai berenang dan mencari makan, serta menunjukkan gerakan aktif Panjang Larva : 3,7 – 4,2 mm	 6.4
Mild Larva	30-60 dpf	Individu mulai tumbuh, tidak lagi embrio namun belum menjadi remaja. Panjang Larva : 10 – 14 mm	 7.6  8.6  10.4
Juvenile	60-89 dpf	Sebagian besar sudah ada karakteristik dewasa, tapi kematangan seksual belum ada. Sisik (squamation) lengkap. Panjang larva : 14 mm - 2 cm	 13.0
Adult	90-180 dpf	Telah terjadi maturasi seksual dan siap bereproduksi. Panjang larva : 2 - 5 cm	 26.4

Sumber : Mcmenamin & Parichy (2013); Thomas (2019).

**2.6.3 Faktor Lingkungan Yang Mempengaruhi Perkembangan Zebrafish**

1. Kebersihan

Kebersihan aquarium merupakan hal penting, kebersihan yang harus dijaga diantaranya adalah kebersihan air, kebersihan spon penyaring. Aquarium dikuras setidaknya seminggu sekali, spon penyaring juga diganti minimal 3 hari sekali. Sebelum ikan dimasukan dalam aquarium, air terlebih dahulu diberikan anti chlorin (fish all) selama 30 menit.

2. Temperatur

Suhu yang digunakan untuk pemeliharaan zebrafish yang baik yaitu berkisar 26 - 28°C, suhu yang tinggi dapat mengakibatkan kandungan oksigen pada air berkurang.

### 3. pH

Kadar pH untuk pemeliharaan zebrafish adalah 6,8-7,5. Apabila pH terlalu asam (2-3,5) dapat menyebabkan ikan hipoksia yang disebabkan pengeluaran lendir yang banyak dari pH yang tinggi sehingga mengganggu insang untuk bernafas. Kadar pH 4,0-4,5 menyebabkan asidosis pada ikan, menyebabkan pengentalan darah akibat pengaruh ion Na dan Cl (Avdesh *et al.*, 2012).

### 4. Pencahayaan

Ikan Zebrafish sangat peka terhadap cahaya. Ikan ini memiliki siklus gelap terang dengan perbandingan 10 jam gelap : 14 jam terang, penentuan awal mulainya siklus gelap terang sesuai dengan keinginan peneliti. Siklus gelap terang diatur dengan cara menghidupkan dan mematikan lampu aquarium yang telah diatur secara otomatis. Seketika cahaya dihidupkan ikan dewasa betina merespon untuk bertelur dan ikan jantan membuahi (Nusslein & Dahm, 2002 ; Avdesh *et al.*, 2012).

### 5. Stressor

Zebrafish merupakan ikan yang mudah stress, sehingga untuk pemeliharaan zebrafish diperlukan tempat yang tenang dan tidak bising suara, ikan ini tipe ikan yang suka bergerombol.

### 6. Jauhkan dari bahan yang bersifat toksin.

## 2.6.4 Zebrafish Sebagai Model Penelitian

### 2.6.4.1 Homologi Manusia dan Zebrafish

Keempat gen reseptor dopamin manusia (DRD1-4), transporter dopamin (SLC6A2-3), dan enzim pembatas laju terkait dopamin beta-hydroxylase (DBH) dan TH memiliki ortolog dengan zebrafish. DRD1, DRD3, DBH, SLC6A2, dan SLC6A3 memiliki ortolog tunggal zebrafish. Sebaliknya, TH, DRD2, dan DRD4 memiliki sepasang homolog. Identitas urutan protein antar homolog rata-rata

adalah 68% (kisaran: 58-80%) mencakup rata-rata 89% (kisaran: 62-99%) dari urutan protein manusia. Perbandingan homolog dalam konteks kedelapan gen yang terkait dopamin menghasilkan hubungan gen lengkap yang paling dekat dengan gen zebrafish pada masing-masing homolog manusia (Klee, *et. al.*, 2012).

#### 2.6.4.2 Lokasi Neurotransmitter Zebrafish

Pada Zebrafish, neuron dopaminergik diatur setidaknya dalam 13 kelompok neuron yang berbeda di seluruh otak (Panula, *et. al.*, 2010). Neuron yang paling relevan dengan kecanduan obat adalah neuron DA dari jalur *reward* terletak di VTA (wilayah otak mamalia A10) dari mesencephalon (*mid brain*) dan menghasilkan proyeksi naik ke NAcc yang terletak di striatum di telencephalon. Perbedaan utama antara sistem zebrafish dan mamalia adalah bahwa neuron DA mesencephalic, termasuk neuron dari daerah ventral tegmental (VTA) dan substantia nigra (SN), tidak ditemukan di otak zebrafish (Mahler, *et. al.*, 2010).

Ekspresi reseptor DA zebrafish dan gen terkait telah dijelaskan dengan baik.

Gen *drd1*, *drd2a*, *drd2b*, *drd2c*, *drd2b*, dan *drd4b* (Tabel 2.8) menunjukkan yang terkuat ekspresi dalam tegmentum atau diencephalon. Ekspresi reseptor D1 zebrafish (*drd1*) telah terdeteksi pada tahap pertengahan embrio pada 30 hpf.

Pada saat ini, gennya diekspresikan dalam otak (diencephalon, hindbrain). Pada tahap akhir embrionik (48 hpf), ekspresi gen dapat dideteksi dalam hipotalamus dan telah menyebar di dalam sel-sel otak belakang di retina menunjukkan ekspresi dalam larva zebrafish pada 120 hpf. Sedangkan ekspresi *drd1* dalam diencephalon, hindbrain, hipotalamus dan retina adalah mirip dengan pola ekspresi pada mamalia, tidak ada ekspresi *drd1* yang telah dijelaskan dalam umbi

olfaktori ikan zebra yang menunjukkan ekspresi kuat pada mamalia (Li, *et. al.*, 2007). Percobaan hibridisasi *in situ* menunjukkan bahwa ketiga homolog gen reseptor DRD2, *drd2a*, *drd2b* dan *drd2c* diekspresikan dalam wilayah otak tertentu seperti diencephalon, tegmentum, dan hindbrain. Reseptor *drd2c* lebih banyak

diekspresikan secara difus otak dan sumsum tulang belakang, sedangkan gen drd2a dan drd2b diekspresikan dalam epifisis. Secara keseluruhan, pola ekspresi reseptor drd2 zebrafish mirip dengan ekspresi pola reseptor DRD2 pada mamalia (Boehmler, *et. al.*, 2004)

**Tabel 2.9 Homologi Reseptor Dopamin Manusia dan Zebrafish**

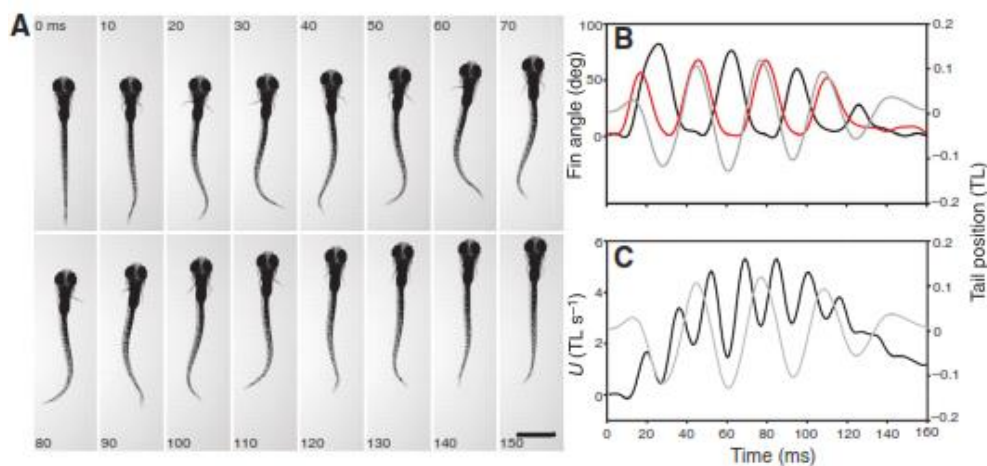
	Human Gene Symbol	ZF Gene Name	Human Protein ID	ZF Protein ID	Homology	% Identity	% Coverage
Dopamine	DBH	dbh	NP_000778.3	NP_001103164.1	AA, CL	61%	94%
	DRD1	drd1	NP_000785.1	NP_001129448.1	AA	74%	96%
	DRD2	drd2a	NP_000786.1	NP_898891.1	AA, CL	69%	96%
	DRD2	drd2b/drd2c	NP_000786.1	NP_922918.1	AA, CL	69%	99%
	DRD3	drd3	NP_000787.2	NP_898890.1	AA, CL	58%	95%
	DRD4	drd4a	NP_000788.2	NP_001012634.1	AA, CL	66%	62%
	DRD4	drd4b	NP_000788.2	NP_001012636.1	AA, CL	66%	63%
	SLC6A2	LOC565776	NP_001034.1	XP_694138.3	n/a	72%	98%
	SLC6A3	slc6a3	NP_001035.1	NP_571830.1	AA, CL	80%	95%
	TH	th	NP_000351.2	NP_571224.1	AA, CL	71%	89%
TH	th2	NP_000351.2	NP_001001829.1	n/a	63%	96%	

Sumber : Klee, *et. al.* (2012)

### 2.6.5 Aktivitas Lokomotor pada Zebrafish

Aktivitas lokomotor pada zebrafish, sirip dada (*forelimbs*) dan aksial morfologi digerakkan ritmis secara teratur selama berenang dan dapat digunakan secara mandiri atau bersama-sama. Mirip dengan anggota badan vertebrata air lainnya, sirip dada biasanya aktif pada frekuensi rendah, dengan atau tanpa gerakan aksial (Gambar 2.9). Ketika axis saling aktif selama berenang lambat, sirip dada kiri dan kanan bergantian secara ritmis dan tampaknya terkoordinasi dengan undulasi aksial. Final aksial transisi pola pergerakan ke gerakan aksial-hanya pada posisi frekuensi tinggi, di mana sirip dada berhenti berdetak dan sedang diposisikan di sepanjang sisi tubuh (Thorsen, *et. al.*, 2004). Morfologi sirip dada dalam larva zebrafish relatif sederhana, dengan satu abduktor dan satu otot adduktor menerima input dari empat saraf dada untuk memperkuat gerakan (Ma,

*et. al.*, 2010). Otot-otot ini terletak di sebelah dinding tubuh di kedua sisi *disk* endoskeletal, dan sepanjang sirip, melewati otot-otot lain, sebagai membran perifer. Saat sirip bergerak jauh dari tubuh selama abduksi, proximodistal axis dari sirip melengkung ke posterior dan ditarik secara rostral sepanjang tubuh. Pada saat adduksi dilakukan lagi, secara otomatis sirip membentuk seperti terbang datar dan dibawa kembali ke tubuh (Green, *et. al.*, 2011; Green & Hale, 2012).



**Gambar 2.11 Tipe Gerak Berenang Lambat pada Larva Zebrafish.**

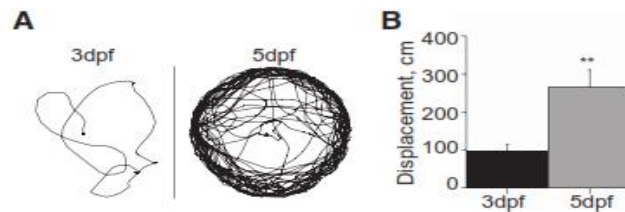
Keterangan : (A) Gambar Demonstrasi selama berenang yang menunjukkan ko-aktivasi sirip dan tubuh melalui banyak perilaku. Kecuali saat inisiasi dan saat hewan berhenti berenang, sirip berganti secara berirama. (B) *Fin angles* (data berasal dari sirip utama berwarna hitam, data dari sirip trailing berwarna merah) dan posisi ekor dalam panjang total (TL, abu-abu) melalui perbandingan berenang yang diperlihatkan dalam A, menggambarkan koordinasi antara sirip dan frekuensi antara sirip dan ekor. (C) speed Kecepatan instan ( $U$ ) tubuh (hitam) menunjukkan sifat tidak stabil dari berenang lambat pada larva zebrafish. Posisi ekor berwarna abu-abu. Skala Bar 1mm (Green, *et. al.*, 2011).

### 2.6.6 Hubungan Reseptor Dopamin dan Aktivitas Lokomotor pada zebrafish

Gerakan pada larva zebrafish berevolusi dari ujung ekor yang lambat pada 18 *postfertilization* (hpf), berenang untuk melarikan diri pada 28 hpf, serta kemampuan kekuatan berenang spontan pada 5 *days postfertilization* (dpf) (Brustein, *et. al.*, 2003; Thirumalai & Cline, 2008). Pada fase 3 dpf Lambat, larva menunjukkan sedikit berenang spontan, tetapi pada 5 dpf, larva berenang aktif untuk mencari makan. Pada zebrafish, neuron dopaminergik terlihat sejak dini

pada 24 hpf. Pada 3 dpf, neuron dopaminergik terlihat di ventral diencephalon, hipotalamus, daerah preoptik, dan pretectum. Juga, serat dopaminergik diduga menginervasi mesencephalon, neuron reticulospinal rhombencephalic, dan sumsum tulang belakang (Thirumalai & Cline, 2008).

Pada penelitian Thirumalai & Cline (2008), menunjukkan bahwa pola motorik dihasilkan oleh larva zebrafish pada 3 dpf sangat berbeda dengan 5 dpf (gambar 2.12). Sumsum tulang belakang pada larva zebrafish 3 dpf mampu menginisiasi frekuensi tinggi episode reflektif berenang spontan, tetapi dopamin, bekerja melalui reseptor D2, secara selektif menekan inisiasi episode reflektif berenang spontan. sedangkan, pada 5 dpf, pelepasan dopamin endogen tidak menekan episode berenang spontan, menunjukkan dopamin memodulasi diferensial sirkuit yang terlibat dalam inisiasi berenang spontan pada kedua tahap ini.



**Gambar 2.12 Larva Menunjukkan Peningkatan Renang pada 5 dpf Dibandingkan dengan 3 dpf.**

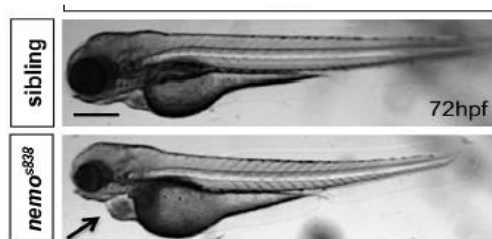
Keterangan : A: lintasan renang larva 3 dan 5 dpf selama 15 menit rekaman video. Bilah skala: 5 cm. B: perpindahan total larva 3 dan 5 dpf dalam 15 menit. N = 7 larva masing-masing pada 3 dpf dan 5 dpf (Thirumalai & Cline, 2008).

### 2.6.7 Denyut Jantung pada zebrafish

Pengukuran denyut jantung penting untuk menilai fungsi jantung karena variasi dan ritme jantung dapat menjadi penyebab serta efek patologis tersembunyi bagi kondisi jantung. Zebrafish (*Danio rerio*) telah muncul sebagai salah satu model organisme yang berguna untuk penelitian jantung. Jantung zebrafish mudah dianalisis dengan optik tanpa melakukan prosedur invasif dan menunjukkan kesamaan anatomi dengan jantung manusia. Variasi denyut jantung

pada embrionik zebrafish diberbagai tahap perkembangan dan fluktuasi denyut jantung disebabkan oleh faktor-faktor seperti : suhu, perubahan genetik, dan induksi kimiawi (De Luca, *et. al.*, 2014).

Jantung adalah organ pertama yang terbentuk di zebrafish. Pada awal perkembangan (24 hpf), berupa tabung linear yang mengalami proses *remodeling* (pengulangan), dan berakhir pada proses pembentukan dua ruang (atrium tunggal dan ventrikel tunggal), dipisahkan oleh katup atrio-ventrikel yang mencegah arus darah balik, dan mengalir ke luar (bulbous aterosus). Jantung embrionik zebrafish menunjukkan pola eksitasi listrik yang sama dengan jantung manusia. Pada manusia normal denyut jantung istirahat adalah antara 60 dan 90 dpm. Pada zebrafish, denyut jantung embrionik normal jauh lebih dekat dengan manusia dibandingkan tikus (300-600 dpm), dengan 120 – 180 dpm. Kontraksi jantung zebrafish meningkat seiring perkembangan embrio berlangsung untuk memastikan pertumbuhan perfusi semua jaringan embrio (De Luca, *et. al.*, 2014).



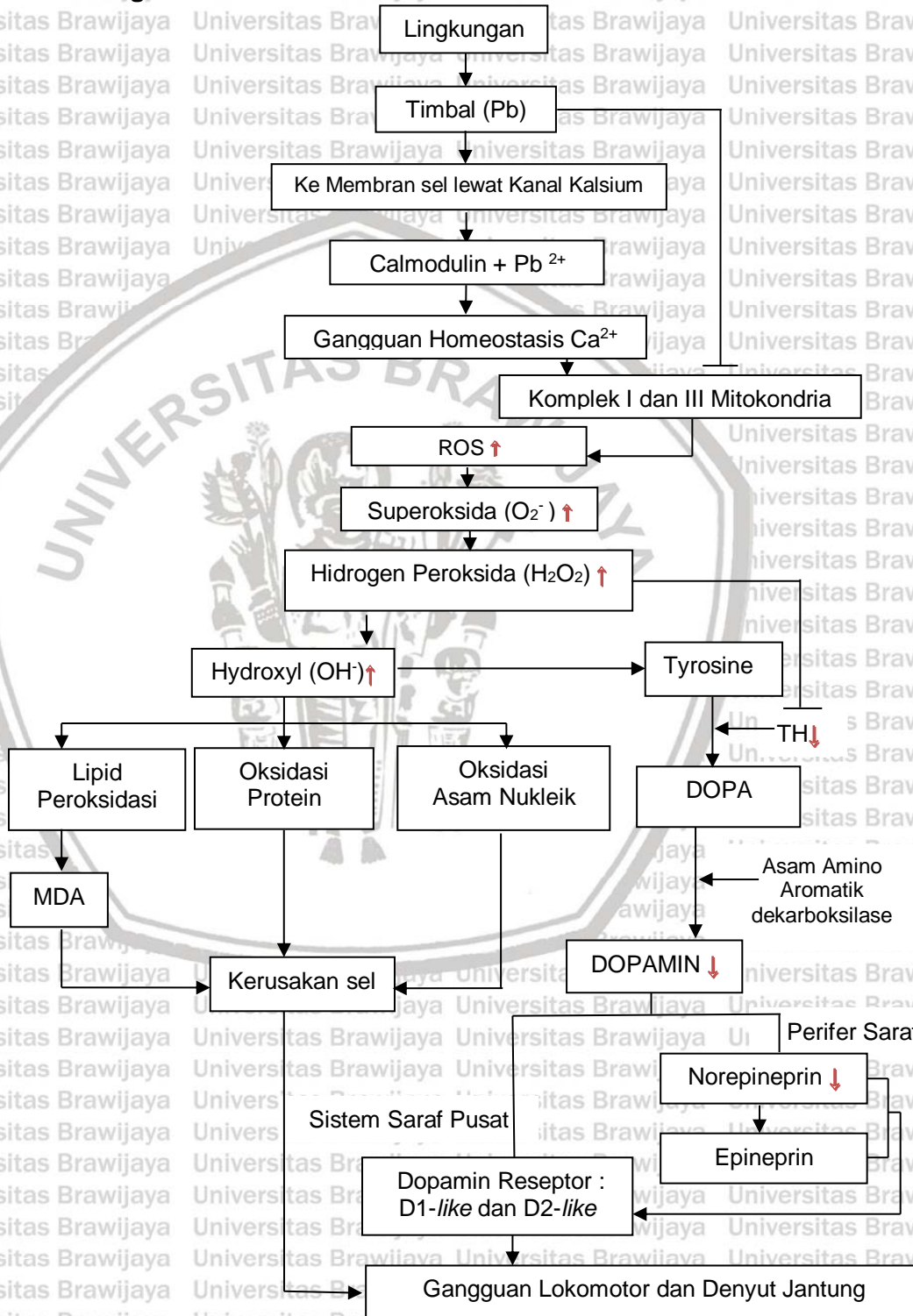
**Gambar 2.13 Letak Jantung zebrafish usia 72 hpf**  
 Keterangan : Tanda panah menunjukkan letak jantung zebrafish berada di bawah kepala, diantara rongga perikardial, *hatching gland*, dan *yolksac* (De Luca, *et. al.*, 2014).



BAB 3

KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Teori

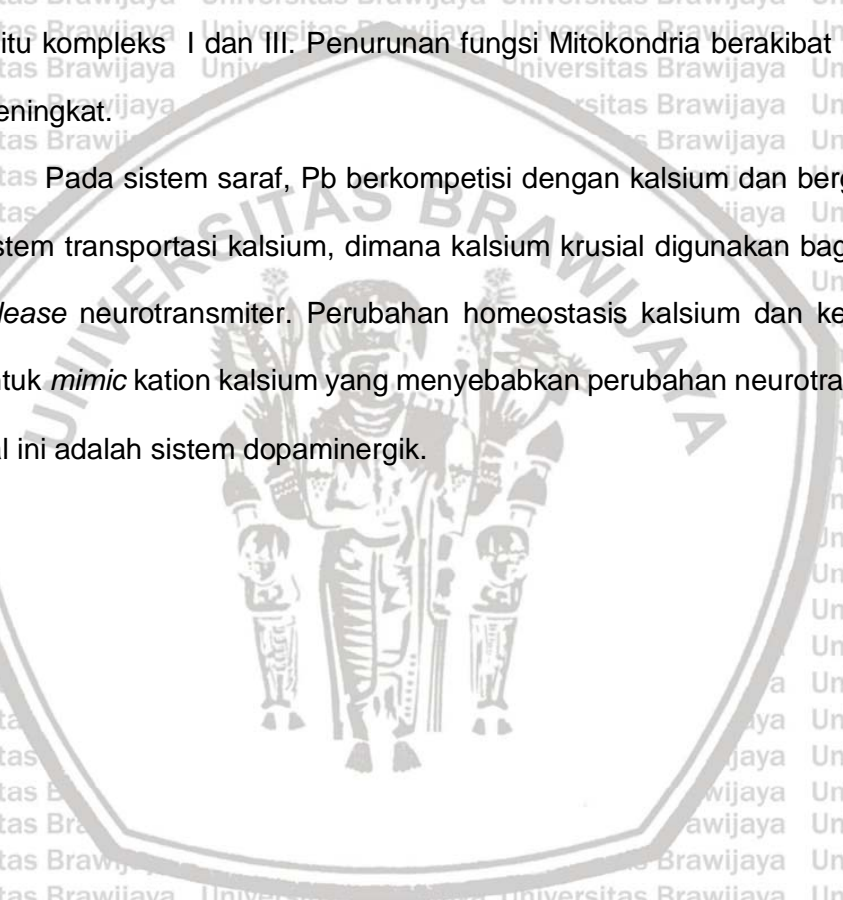


Gambar 3.1 Kerangka Teori

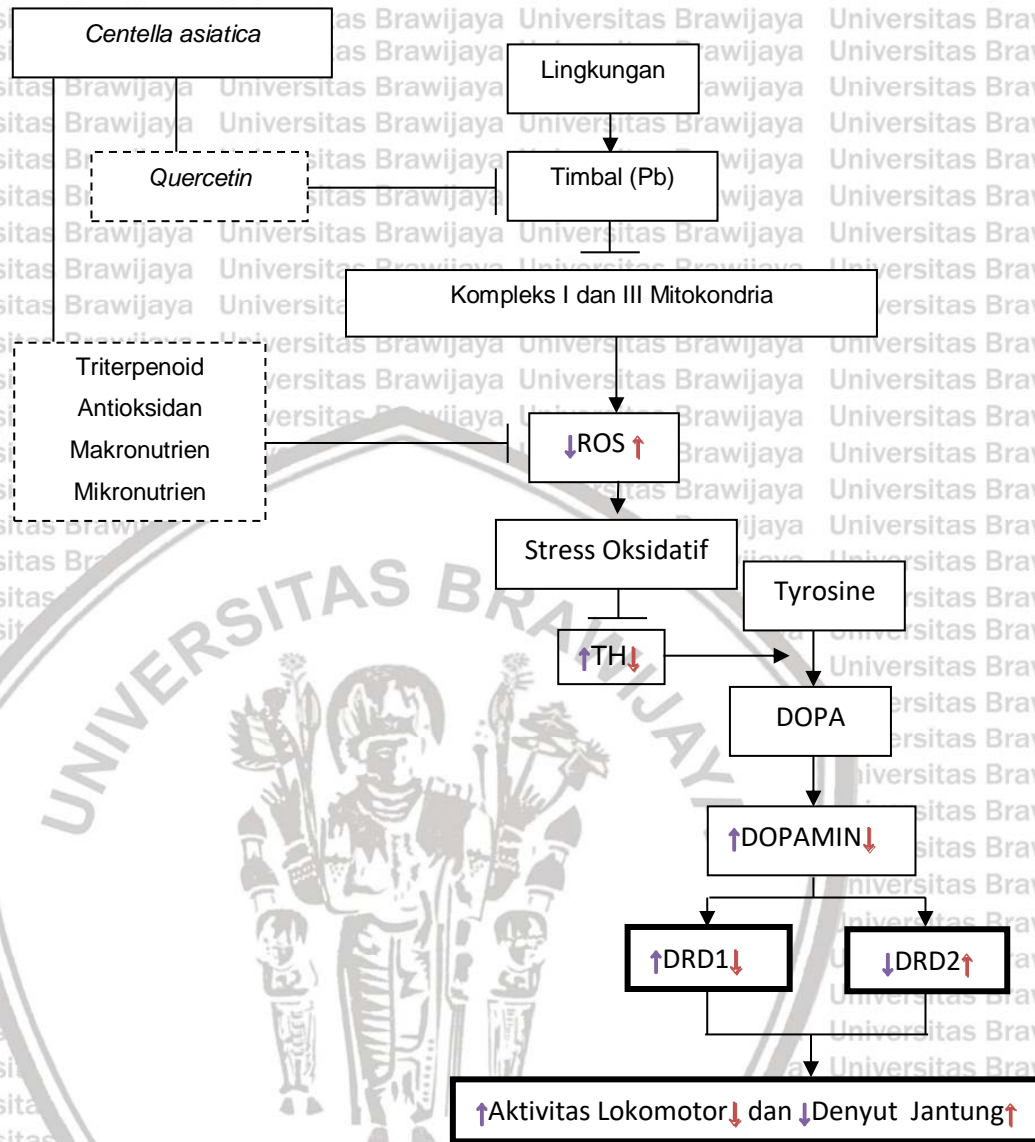
### 3.2 Penjelasan Kerangka Teori

Timbal (Pb) dapat mengganti (substitusi) kalsium sebagai *second Messenger*, meniru kalsium masuk ke dalam sel lewat kanal kalsium. Berikatan dengan kalmodulin dan mengganggu homeostasis kalsium intraseluler. Akibat terganggu homeostasis kalsium, terjadi Peningkatan penggunaan  $\text{Ca}^{2+}$  oleh mitokondria, meningkatkan transpor elektron mitokondria, dan generasi ROS. Selain itu, paparan Pb juga menghambat aktivitas enzim kompleks pernafasan mitokondria yaitu kompleks I dan III. Penurunan fungsi Mitokondria berakibat produksi ROS meningkat.

Pada sistem saraf, Pb berkompetisi dengan kalsium dan bergabung dalam sistem transportasi kalsium, dimana kalsium krusial digunakan bagi regulasi dan *release* neurotransmitter. Perubahan homeostasis kalsium dan kemampuan Pb untuk *mimic* kation kalsium yang menyebabkan perubahan neurotransmitter dalam hal ini adalah sistem dopaminergik.



### 3.3 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep

Keterangan :

- : Parameter yang di teliti
- : Parameter yang tidak diteliti
- : Mempengaruhi
- : Menghambat
- : Setelah pemberian pegagan
- : Setelah diinduksi Pb

### 3.4 Penjelasan Kerangka Konsep

Faktor lingkungan sangat berpengaruh pada tumbuh kembang anak.

Paparan timbal prenatal telah diketahui pengaruh pada kesehatan ibu hamil, bayi, dan perkembangan saraf anak. Timbal meniru aksi kalsium ( $\text{Ca}_2^+$ ) (konsentrasi lebih rendah dari kalsium) dengan stimulasi langsung protein kinase 'C' yang memfosforilasi protein, dan stimulasi protein kinase oleh cAMP. Timbal menggantikan peran kalsium pada ekstraseluler (kalsium berguna untuk mengikat stabilitas struktural protein), akibatnya timbal menimbulkan kerusakan peroksidatif pada lipid dan protein, mengganggu mekanisme antioksidan dan efek oksidatif pada membran sel, menghambat kerja enzim pernafasan mitokondria pada kompleks I dan III, akibatnya ROS meningkat berlebihan terjadilah stress oksidatif.

ROS yang meningkat dalam membran sel menyebabkan TH menurun, Menurunnya TH membuat sistem dopaminergik menurun. Akibatnya timbul gangguan pada pertumbuhan dan perkembangan dalam hal ini berpengaruh pada lokomotor yang lambat.

Pegagan (*Centella asiatica*) mengandung triterpenoid tinggi yang memiliki efek sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan nutrisi. Triterpenoid dapat menangkap radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi oksidasi serta reaksi pembentukan ROS. Quercetin berfungsi pegagan juga mampu mengkelat logam berat seperti Pb. Penambahan antioksidan dari luar dapat meningkatkan kadar Dopamin Reseptor D1 dan menurunkan kadar Dopamin Reseptor D2 pada sistem Dopaminergik, serta meningkatkan aktivitas lokomotor dan menurunkan denyut jantung pada zebrafish yang dipapar timbal.

### 3.5 Hipotesis

Hipotesis umum penelitian ini adalah : “Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah penurunan aktivitas lokomotor, peningkatan denyut jantung, penurunan ekspresi DRD1 dan peningkatan ekspresi DRD2 pada larva zebrafish (*Danio rerio*) yang dipapar timbal”.

Sub Hipotesis penelitian ini adalah :

1. Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish (*Danio rerio*) yang dipapar Timbal.
2. Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) dapat menurunkan denyut jantung pada larva zebrafish (*Danio rerio*) yang dipapar Timbal
3. Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi Dopamin reseptor D1 pada larva zebrafish (*Danio rerio*) yang dipapar Timbal.
4. Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) dapat menurunkan ekspresi Dopamin reseptor D2 pada larva zebrafish (*Danio rerio*) yang dipapar Timbal.
5. Ada hubungan antara Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi DRD1 dan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish (*Danio rerio*) yang dipapar Timbal.
6. Ada hubungan antara Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi DRD2 dan aktivitas lokomotor dpada larva zebrafish (*Danio rerio*) yang dipapar Timbal.

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan larva zebrafish yang diinduksi Timbal 2,5 ppm dan diberi pegagan (*Centella asiatica*) berbagai konsentrasi (1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, dan 5 µg/mL) sebagai tindakan preventif bagi larva zebrafish yang terpapar timbal dilihat melalui mekanisme stress oksidatif.

#### 4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimen murni (*true experiment*) yang menggunakan *post test only control group design*.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

##### 4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah embrio sampai larva zebrafish usia 0-6 dpf yang didapat dari hasil fertilisasi zebrafish jenis *wild type* antara induk jantan dan betina dengan perbandingan 1:2 yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Zebrafish yang digunakan telah teruji dan tersertifikasi di Laboratorium Hidrologi Fakultas Ilmu Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya Malang (Khotimah, *et. al.*, 2015)

##### 4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah embrio zebrafish sampai dengan larva usia 2 hpf - 6 dpf. Pengambilan sampel secara random alokasi. Penentuan jumlah sampel untuk pemeriksaan dopamin reseptor D1 dan D2 berdasarkan penelitian lain yang menggunakan zebrafish dengan jumlah sampel 20-30 embrio untuk masing-masing kelompok (Luccit, *et. al.*, 2008). Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan sehingga jumlah embrio yang

digunakan : 20 embrio x 5 kelompok = 100 embrio. Keseluruhan kelompok dilakukan pengulangan 3 kali (*triplicate*) jadi sampel yang digunakan berjumlah 300 embrio.

Pengambilan sampel untuk aktivitas lokomotor dan denyut jantung menggunakan rumus :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan :

$$(5-1)(r-1) \geq 15$$

t = jumlah perlakuan = 5

$$(4)(r-1) \geq 15$$

r = jumlah ulangan

$$4r \geq 20$$

(Hanafiah, 2016)

$$r \geq 5$$

Jadi jumlah sampel yang digunakan untuk aktivitas lokomotor adalah 5 embrio per *well* dan denyut jantung adalah 10 embrio per *well*, mewakili 5 kelompok.

Pembagian kelompok terdiri dari :

1. Kontrol Negatif (KN) merupakan sampel yang tidak diberi paparan apapun.
2. Kontrol Positif Timbal (KP) merupakan sampel yang diberi paparan Timbal 2,5 ppm (2-72 hpf).
3. Perlakuan 1 (TP1) merupakan sampel yang diberi paparan Timbal 2,5 ppm dan pegagan konsentrasi 1,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pada 2-72 hpf.
4. Perlakuan 2 (TP2) merupakan sampel yang diberi paparan Timbal 2,5 ppm dan pegagan konsentrasi 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pada 2-72 hpf.
5. Perlakuan 3 (TP3) merupakan sampel yang diberi paparan Timbal 2,5 ppm dan pegagan konsentrasi 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pada 2-72 hpf.

### 4.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

#### 4.3.1 Kriteria Inklusi

Embrio zebrafish usia 0-2 hpf, berwarna jernih transparan, tidak terdapat serabut putih (jamur) saat dilihat di bawah mikroskop optilab.

#### 4.3.2 Kriteria Eksklusi

Embrio zebrafish berwarna putih keabu-abuan, kosong (tidak terbuahi), lengket dengan telur lainnya, *haching* (menetas) dini sebelum usia 3 dpf, dan embrio yang mati atau cacat sebelum penelitian selesai dilaksanakan.

### 4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 4.4.1 Tempat Penelitian

1. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang : Pemeliharaan zebrafish, pembuatan konsentrasi timbal dan ekstrak pegagan, penilaian aktivitas lokomotor, dan denyut jantung.
2. Laboratorium UIN Malang : Pemeriksaan Ekspresi Dopamin reseptor-D1 dan Dopamin reseptor-D2 menggunakan RT-PCR.

#### 4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan bulan Februari – Juni 2019.

### 4.5 Variabel Penelitian

#### 1. Variabel *Independent*

Pemberian ekstrak etanol Pegagan (*Centella asiatica*) dan Induksi Timbal pada larva zebrafish.

#### 2. Variabel *Dependent*

Aktivitas Locomotor dan frekuensi denyut jantung

#### 3. Variabel Antara

Dopamin reseptor D1 dan Dopamin reseptor D2



## 4.6 Definisi Operasional

**Tabel 4.1 Definisi Operasional**

Variabel	Definisi Operasional
Pemberian ekstrak pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) dan Induksi Timbal pada larva zebrafish	Paparan ekstrak pegagan yang diberikan pada masing-masing kelompok perlakuan dengan konsentrasi 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, dan 5 µg/mL (Wijayanti, 2016) pada larva zebrafish yang telah dipapar Timbal dengan konsentrasi 2,5 ppm (Peterson, <i>et. al.</i> , 2011).
Aktivitas lokomotor larva zebrafish	Aktivitas berpindah tempat dari larva zebrafish usia 4, 5, dan 6 dpf dilihat dari kemampuan ikan berenang melewati pola lingkaran, direkam selama 1 menit (Goody & Henry, 2013)
Denyut Jantung	Frekuensi denyut jantung per menit pada larva zebrafish usia 3 dan 4 dpf yang direkam selama 1 menit (De Luca, <i>et. al.</i> , 2014)
Ekspersi Dopamin reseptor D1	Salah satu dari 5 sub tipe reseptor Dopamin mamalia yang masuk kedalam grup D1-likes reseptor (Neve, <i>et. al.</i> , 2004), merupakan ekspresi reseptor Dopamin D1 pada larva zebrafish usia 6 dpf, dilakukan terminasi dan diukur menggunakan RT-PCR (Klee, <i>et. al.</i> , 2012).
Ekspresii Dopamin reseptor D2	Salah satu dari 5 sub tipe reseptor Dopamin mamalia yang masuk kedalam grup D2-likes reseptor (Neve, <i>et. al.</i> , 2004), merupakan ekspresi reseptor Dopamin D2 pada larva zebrafish usia 6 dpf, dilakukan terminasi dan diukur menggunakan RT-PCR (Klee, <i>et. al.</i> , 2012).

## 4.7 Alat dan Bahan

### 4.7.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan zebrafish

1. Alat : aquarium dengan kapasitas 60 L, pompa dan aerator, PH meter, alat pengukur suhu, tempat penakaran embrio ikan, *well plate* 6 sumuran, inkubator suhu  $28^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ , mikroskop, laptop, *software* optilab, dan *image raster*.
2. Bahan : pipet plastik, mikropipet, *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, air, medium embrionik, *fish all*, dan pakan ikan (*tetramin flakes*)

#### 4.7.2 Alat dan Bahan Pembuatan Medium Embrionik

1. Alat : tabung reaksi 500 mL, timbangan digital (Metter Toledo), dan alat pengaduk.
2. Bahan : CaCl, KCl, NaCl, MgSO<sub>4</sub>, Aquadest, dan kertas saring.

#### 4.7.3 Alat dan Bahan Pembuatan Konsentrasi Timbal

1. Alat : tabung eppendorpf 1,5 mL (sentrifugasi) dan timbangan digital (Metter Toledo)
2. Bahan : Timbal Asetat Trihidrat (MERCK) dan Aquadest

#### 4.7.4 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Pegagan

1. Alat : timbangan, oven, blender, gelas erlenmeyer, eveporator, corong gelas, labu penampungan etanol, *rotary evaporator*, *water pump*, selang *water pump*, *water bath*, *vaccum pump*, botol tempat hasil ekstraksi, lemari pendingin.
2. Bahan : tanaman pegagan, pelarut etanol, kertas saring, dan alumunium foil.

#### 4.7.5 Alat dan Bahan Pengukuran Aktivitas Lokomotor

1. Alat : Alat perekam (kamera), *well plate* 12 sumuran
2. Bahan : jarum kecil (poker), pipet plastik, kertas transparan yang telah dibuat pola lingkaran dibagi dengan jarak yang sama sehingga akan membagi *well* menjadi 4 zona (panjang dari masing-masing zona 15 mm), serta larutan medium embrionik.

#### 4.7.6 Alat dan Bahan Pengukuran Denyut Jantung

1. Alat : Mikroskop stereometri (Olympus SZ61), Optilab versi 2.0, stopwatch, dan *object glass*.
2. Bahan : Larutan medium embrionik

#### 4.7.7 Alat dan Bahan Pengukuran Ekspresi DRD1 dan DRD2

1. Bahan : PCR *machine*, alikuot segar, DNase / Rnase, probe fluoresen dan pewarna asam nukleat fluoresen, amplikon sintetik, plasmid linierisasi.
2. Alat lain yang digunakan adalah : mikropipet dan tip, ependorft 1,5 mL, vortex, centrifuge, tabung reaksi, dan *microplate reader*.

#### 4.8 Prosedur penelitian

##### 4.8.1 Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio

Pemeliharaan zebrafish dilakukan di dalam aquarium dengan kapasitas 60 Liter, air yang digunakan adalah air tawar pada suhu 26-28,5<sup>o</sup> C, dan PH 6,8-7,5 (Avdesh, *et. al.*, 2012). Pakan ikan yang diberikan adalah *tetramin flakes* dengan frekuensi 3 kali sehari (Khotimah, *et. al.*, 2015). Zebrafish dibiakan dengan siklus gelap : terang (10 jam : 14 jam) (Avdesh, *et. al.*, 2012). Zebrafish rentan untuk stress oleh sebab itu lingkungan harus dijaga kebersihan dan ketenangannya.

Zebrafish yang siap untuk *breeding* terlihat dari tanda-tanda perutnya yang membesar. Zebrafish diberi makan terlebih dahulu sebelum diletakkan trap pada dasar aquarium, setelah itu siklus gelap pun di mulai selama 10 jam. Trap diangkat setelah 30 menit lampu otomatis menyala (siklus terang dimulai selama 14 jam), hal ini memberikan waktu pada ikan untuk bertelur dan fertilisasi pada tempat trap yang dipasang (Avdesh, *et. al.*, 2012).

Telur yang didapat dipindahkan pada cawan petri dan dibersihkan dengan air aqua hingga tidak ada kotoran ataupun jamur yang menempel. Telur yang telah dibersihkan diperiksa di bawah mikroskop dipilih telur yang terbaik untuk menjadi sampel bagi penelitian. Telur yang terpilih diletakkan pada well plat 6 sumuran sebanyak 30 telur per sumur untuk kemudian diberi perlakuan sesuai dengan

masing-masing kelompok. Prosedur ini dilakukan sebelum embrio berusia 2 hpf.

Telur yang telah diberi perlakuan disimpan dalam inkubator dengan suhu 28° C.

#### 4.8.2 Pembuatan Medium Embrionik

Bahan CaCl 0,02 gr, KCl 0,15 gr, NaCl 5 gr, MgSO<sub>4</sub> 0,815 gr, ditimbang dan dicampur dengan Aquadest 500 mL ke dalam tabung reaksi sehingga didapatkan stok larutan medium embrionik 500 mL dengan kepekatan 10 kali (Avdesh, *et. al.*, 2012). Larutan embrionik disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 2-8° C.

Ketika digunakan, medium embrionik di encerkan dengan larutan aqua perbandingan 1 : 9

#### 4.8.3 Pembuatan Larutan Timbal

Timbal Asetat Trihidrat (Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O) dengan berat molekul 379.33 g/mol dalam bentuk serbuk putih yang dilarutkan dalam aquadest sehingga didapatkan konsentrasi stok sebesar 3793,3 ppm. Stok tersebut di encerkan menjadi 50 ppm, dengan rumus :

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

Keterangan :

V<sub>1</sub> = Volume Awal

M<sub>1</sub> = Konsentrasi Stok

V<sub>2</sub> = Volume yang diinginkan

M<sub>2</sub> = Konsentrasi akhir yang diinginkan

Kemudian stok diturunkan menjadi 10 ppm = 10.000 ppb sehingga didapatkan 2 mL Timbal dalam 10 mL aquadest. Untuk membuat Timbal 2,5 ppm sebanyak 5 mL (1 sumuran) dari konsentrasi stok 1 x 10<sup>4</sup> ppb, stok Timbal diambil sebanyak 1,25 mL dan ditambah medium embrionik sampai 5 mL. Pembuatan larutan Timbal ini berdasarkan penelitian Peterson, *et. al.* (2011) dan studi pendahuluan sebelumnya.

#### 4.8.4 Pembuatan Ekstrak Pegagan

1. Pegagan dicuci bersih kemudian diangin-anginkan, setelah kering pegagan dioven pada suhu 40° C.
2. Pegagan kering kemudian di blender untuk mendapatkan serbuk halus.
3. Serbuk pegagan ditimbang sebanyak 100 gr dimasukkan dalam tabung erlenmeyer dan direndam dalam 900 mL larutan etanol 98%. Diaduk ± 30 menit dan didiamkan selama 24 jam sampai terdapat endapan.
4. Lapisan atas diambil dan disaring menggunakan corong buncher.
5. Filtrat pegagan dimasukkan ke dalam labu evaporasi 1L yang terpasang pada evaporator. *Water bath* diisi penuh, dan dipanaskan hingga suhu 70° C, proses evaporasi berlangsung selama ± 1,5-2 jam.
6. Hasil ekstraksi ditimbang dan dimasukkan ke dalam botol palstik dan disimpan dalam lemari pendingin *freezer* (Selvi, *et. al.*, 2012).

#### 4.8.5 Pembuatan Larutan Pegagan

Pembuatan konsentrasi stok pegagan didapatkan dengan perhitungan :

$$\frac{10 \text{ mg pegagan}}{10 \text{ mL aquadest}} = 1 \text{ mg/mL} = 1000 \text{ }\mu\text{g/mL}$$

Membuat larutan pegagan dengan konsetrasi 5  $\mu\text{g/mL}$  sebanyak 5 mL (1 sumuran) dari konsentrasi stok 1000  $\mu\text{g/mL}$  menggunakan rumus :

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

Keterangan :

$V_1$  = Volume Awal

$M_1$  = Konsentrasi Stok

$V_2$  = Volume yang diinginkan

$M_2$  = Konsentrasi akhir yang diinginkan

Jadi, untuk konsentrasi 5  $\mu\text{g/mL}$  diambil dari Stok pegagan 1000  $\mu\text{g/mL}$  sebanyak 25  $\mu\text{L}$  dan ditambah medium embrionik sampai 5 mL. Konsentrasi 2,5  $\mu\text{g/mL}$  dibuat dari ekstrak pegagan 5  $\mu\text{g/mL}$  yang sudah dibuat sebelumnya sebanyak 2,5 mL dan ditambah medium embrionik sampai 5 mL. Lalu untuk

konsentrasi 1,25 µg/mL dibuat dari ekstrak pegagan 2,5 µg/mL yang sudah dibuat sebelumnya sebanyak 2,5 mL dan ditambah medium embrionik sampai 5 mL.

Pembuatan Larutan Pegagan berdasarkan penelitian Wijayanti (2016).

#### 4.8.6 Perlakuan pada Setiap Kelompok

##### 1. Kontrol Negatif (KN)

Pada KN setiap sumuran diberi 5 mL medium embrionik

##### 2. Kontrol Postif Pumbum (KP)

Larutan Timbal 2,5 ppm diberikan pada usia 2-72 hpf dengan penggantian medium setiap 24 jam.

##### 3. Perlakuan 1 (TP1), 2 (TP2), 3 (TP3)

a) TP 1 : membuat campuran larutan Timbal 2,5 ppm + pegagan konsentrasi 1,25 µg/mL untuk 1 sumuran (5mL) diperoleh dengan mencampurkan 1,25 mL stok Timbal dan 2,5 mL stok pegagan kemudian ditambahkan medium embrionik sampai 5 mL.

b) TP 2 : membuat campuran larutan Timbal 2,5 ppm + pegagan konsentrasi 2,5 µg/mL untuk 1 sumuran (5mL) diperoleh dengan mencampurkan 1,25 mL stok Timbal dan 2,5 mL stok pegagan kemudian ditambahkan medium embrionik sampai 5 mL.

c) TP 3 : membuat campuran larutan Timbal 2,5 ppm + pegagan konsentrasi 5 µg/mL untuk 1 sumuran (5mL) diperoleh dengan mencampurkan 1,25 mL stok Timbal dan 25 µL stok pegagan kemudian ditambahkan medium embrionik sampai 5 mL.

Pemberian paparan Timbal dan Pegagan pada usia 2-72 hpf diasumsikan masih di dalam kandungan (intra uterin). Penggantian medium setiap 24 jam.

Setelah 72 hpf larva dibilas dengan medium embrionik sebanyak 3 kali dan dilanjutkan pemberian medium embrionik saja sampai usia 6 dpf. Semua medium

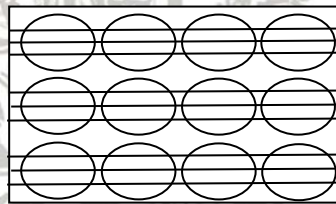
diganti setiap hari untuk menghindari kontaminasi dan mencegah kematian larva.

#### 4.8.7 Pengukuran Aktivitas Lokomotor

Setiap kelompok perlakuan dipilih secara acak 10 larva zebrafish yang ditempatkan pada well 12. Pengukuran aktivitas lokomotor pada usia 4 - 6 dpf berdasarkan modifikasi Goody & Henry (2013), dengan cara kertas pola diletakkan di bawah well, larva zebrafish dipusatkan pada bagian tengah well dengan menggunakan pipet plastik. Rekam video selama 1 menit dimulai saat larva tidak bergerak dan berada di tengah pola lingkaran, kemudian kuantifikasi berapa jumlah garis yang dilewati larva menggunakan software *free video jpg convert*.

Dilanjutkan dengan pemeriksaan menggunakan software image J V1.50. Pengukuran dilakukan pada semua kelompok.

Bentuk pola :



#### 4.8.7 Pengukuran Frekuensi Denyut Jantung

Setiap kelompok perlakuan dipilih secara acak 10 larva zebrafish yang ditempatkan pada well 12. Pengukuran frekuensi denyut jantung pada usia larva zebrafish 3 dan 4 dpf, dengan meletakkan larva pada *object glass* dengan embrionik medium minimal dilakukan perekaman selama 1 menit menggunakan Mikroskop stereometri (Olympus SZ61) dan Optilab versi 2.0, kemudian kuantifikasi berapa jumlah frekuensi denyut jantung dengan menggunakan *stopwacth* selama 1 menit. Pengukuran dilakukan pada semua kelompok perlakuan (Monaco, *et. al.*, 2017).

#### 4.8.8 Pengukuran Ekspresi Dopamin Reseptor D1 dan Dopamin Reseptor D2

1. Persiapan sampel dilakukan dengan cara homogenisasi jaringan yaitu :

a. Larva zebrafish dieutanasia dengan cara memasukkan pada air es dengan komposisi 5 bagian air es dan 1 bagian air selama 40 menit. Suhu air es dipertahankan pada suhu 0°C yang dipantau menggunakan termometer (Strykowski & Schech, 2015).

b. Larva zebrafish (n = 20 larva/perkelompok) segera dikeluarkan dan diletakkan dalam *dry ice*, kemudian dimasukkan ke pendingin -80°C.

2. Isolasi RNA (Hostelley, *et. al.*, 2017) :

a. Siapkan sampel 25 mg (20 ekor larva) untuk isolasi RNA. Pindahkan sampel ke dalam eppendorf 1,5 mL.

b. Siapkan bahan untuk isolasi RNA

- *Washing* : *wash buffer* sebanyak 25 mL ditambahkan ethanol 100 % (absolut) yang telah di encerkan sebanyak 100 mL.
- Ethanol 70 % : 21 mL ethanol 100% diencerkan dengan 7 mL aquadest sehingga didapatkan 30 mL ethanol 70% dibagi ke dalam 2 tube volume 15 mL.

c. Ekstraksi RNA

- *Sentrifuge eppendorf* yang berisi sampel dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit sehingga cairan dan sampel terpisah.
- Buang cairan yang masih terdapat dalam eppendorf

d. Cell lysis

- Tambahkan 400  $\mu$ l buffer dalam masing-masing eppendorf lalu homogenisasi dengan micropestel lalu masukkan 4  $\mu$ l 2-mercaptoethanol pada masing-masing eppendorf
- Vortex sampel



- Pindahkan sampel ke dalam filter coloum 2 mL sehingga terpisah antara pellet (atas) dan supernatan (bawah), sentrifugasi 30 detik dengan kecepatan 1000 rpm
  - Pindahkan filtrat supernatan dalam eppendorf baru, tambahkan 400µl ethanol 70 % /masing-masing tube, kocok terlebih dahulu sehingga tercampur. Kemudian pindahkan dalam Rb Column dan di *sentrifudge* selama 1 menit dengan kecepatan 14.000-16.000 rpm
  - Ambil peletnya lalu tambahkan W1 (*wash 1*) sebanyak 400µl, *sentrifudge* selama 30 detik dengan kecepatan 14.000 rpm.
  - Ambil peletnya, tambahkan *wash buffer* yang telah di campur ethanol sebanyak 600µl/tube lalu *sentrifudge* selama 30 detik dengan kecepatan 14.000 rpm dan buang cairan ( lakukan ini 2x).
  - Keringkan Rb Column dengan cara mensentrifugasi selama 3 menit
  - Pindahkan filter Rb Column dalam evendorf lalu tambahkan *Rnase Free water* sebanyak 50 µl, diamkan selama 2 menit.
  - Sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 14.000 rpm
- e. Mengukur tingkat kemurnian isolasi RNA
- Masukkan 2 µl hasil isolasi Rna dalam nanodrop spektrofotometri.
- Kemurnian yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1.8 – 2.0
- f. Sintesis cDNA (Toyobo, n.d)

- Stok dihitung agar semua sampel dalam konsentrasi yang sama

- Reaksikan gDNA dengan cara :

- Campur 264 4x DNA *Master Mix* dengan 5,4 gDNA

- Masukkan stok yang kemudian di tambah *diasetilasi water* dengan total volume 10µl

- Denaturasi sampel selama 5 menit pada suhu 65°C lalu letakkan di atas es

- Tambahkan 20µl reaksi gDNA ( pada langkah 2) dan 50 µl Nuclease water free

- Inkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit

- Tambahkan 20 µl 5x RT Mix II. lalau sentrifugasi

- Inkubasi sampai pada suhu 37°C selama 15 menit, pada suhu 50°C selama 5 menit dan suhu 98 °C selama 5 menit.

- Simpan sampel dalam suhu 4°C hingga -20°C

- Reverse transcriptase PCR untuk mengukur Ekspresi DRD 1 dan DRD 2, dilakukan dengan cara (Meritet *et al.*, 2017) :

- *Primer sequences* untuk DRD1 : F “TGG TTC CTT TCT GCA ACC CA”, R “AGT GAT GAG TTC GCC CAA CC”. *Primer sequences* untuk DRD2 : F “TCC ACA AAA TCA GGA AAA GCG T”, R “CAG CCA ATG TAA ACC GGC AA”. *β-actin zebrafish primers* : F “ATG GAT GAG GAA ATC GCT GCC”, R “ CTC CCT GAT GTC TGG GTC GTC”. Desain suhu *annealing* pada zebrafish *primers* adalah 60 °C.

- Sintesis cDNA dari hasil isolasi RNA

- Master mix PCR di vorteks dan sentrifugasi setelah diletakkan di suhu ruang beberapa saat.

- Tabung PCR diletakkan di atas alumunium plate yang telah didinginkan dan campurkan bahan-bahan PCR master mix, primer forward dan reverse, template DNA dan water nuclease free.

- Campuran kemudian divortex dan dilakukan PCR mengikuti rekomendasi kondisi siklus suhu berikut :

Tabel 4.2 Rekomendasi kondisi siklus dan suhu pada pemeriksaan PCR

Langkah	Suhu (°C)	Waktu	Jumlah Siklus
Pra Denaturasi	95	1-3 menit	1
Denaturasi	95	30 detik	
Annealing	Tm-5	30 detik	25 – 40
Extension	72	1 menit	
Final Extension	72	5 – 15 menit	1

Hasil dari proses PCR kemudian dilakukan elektroforesis dan divisualisasikan menggunakan *Gel doc*.

#### 4.9 Pengolahan dan Analisa Data

Pengolahan data akan dilakukan menggunakan program SPSSversi 24.0, dengan tingkat kepercayaan yang digunakan 95% (nilai  $p < 0,05$ ). Data akan dianalisis menggunakan uji statistik yaitu :

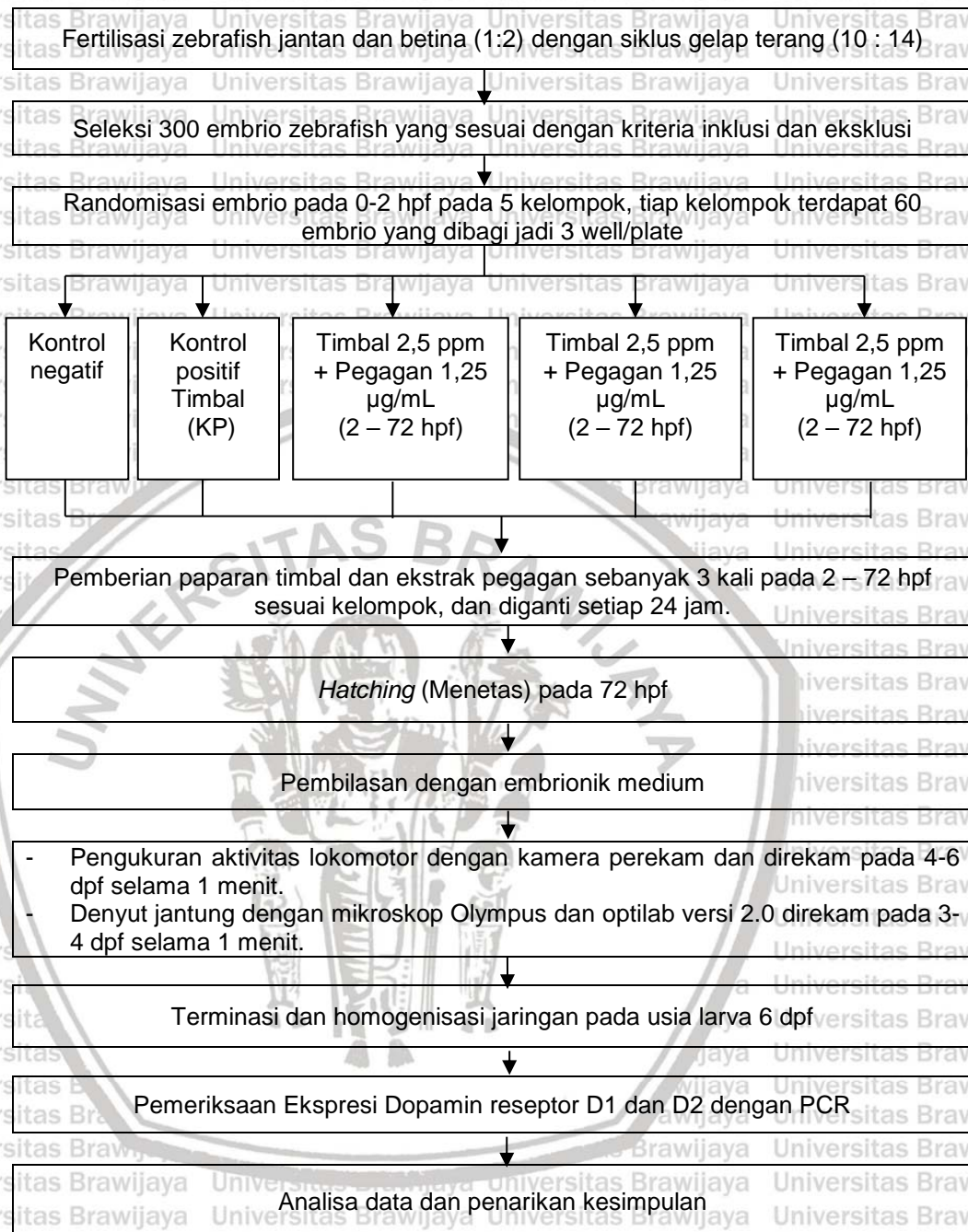
1. Uji normalitas data dilakukan dengan uji *Shapiro-Wilk*. Data dikatakan terdistribusi normal jika  $p\text{value} > 0,05$ .
2. Uji homogenitas data dilakukan dengan *levenes's test*. Jika  $p\text{value} > 0,05$ , maka data memiliki varians yang sama (homogen).
3. Menguji adanya perbedaan efek paparan ekstrak pegagan terhadap DRD1 dan DRD2 antar masing-masing kelompok (KN, KP, TP1, TP2, TP3) dilakukan uji *One Way ANOVA*, jika  $p\text{value} < 0,05$ , maka dapat diinterpretasikan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan sehingga dilanjutkan dengan analisis *Post-Hoc LSD (Least Signifikan Difference)*. Tujuan uji *Post-Hoc LSD* adalah untuk mengetahui kelompok manakah terdapat perbedaan yang bermakna, sehingga dapat diketahui dosis ekstrak pegagan yang berpengaruh pada masing-masing variabel dependen yang diuji.
4. Jika syarat uji *One Way ANOVA* tidak terpenuhi, maka analisis yang digunakan adalah *Kruskal-Wallis*.

5. Menguji adanya perbedaan efek paparan ekstrak pegagan terhadap aktivitas lokomotor antar masing-masing kelompok (KN, KP, TP1, TP2, TP3) menggunakan uji *Friedman*. Jika *pvalue* < 0,05, maka dapat diinterpretasikan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok sehingga dilanjutkan dengan analisis *Post-Hoc Wilcoxon*.
6. Uji korelasi dilakukan menggunakan uji korelasi *spearma*. Jika *pvalue* < 0,05, maka dapat diinterpretasikan terdapat korelasi yang bermakna antara dua variabel yang diuji. Interpretasi uji hipotesis berdasarkan kekuatan korelasi dan arah korelasi dapat dilihat pada tabel 4.3

**Tabel 4.3 Kekuatan Korelasi dan Arah Korelasi**

No	Parameter	Nilai	Interpretasi
1	Kekuatan korelasi (r)	0,00-0,199	Sangat lemah
		0,20-3,99	Lemah
		0,40-5,99	Sedang
		0,60-0,799	Kuat
		0,80-1,000	Sangat kuat
2	Arah Korelasi	+ (positif)	Searah, semakin besar nilai satu variabel semakin besar pula nilai variabel lainnya.
		- (negatif)	Berlawanan arah, semakin besar nilai satu variabel, semakin kecil nilai variabel lainnya.

#### 4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian



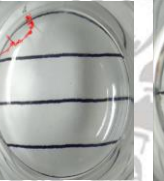
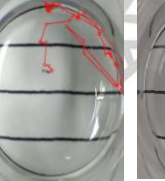
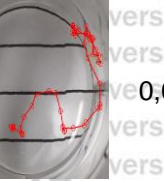
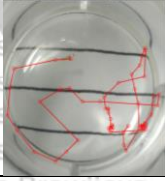

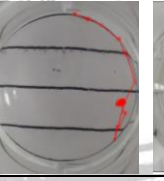
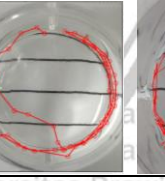
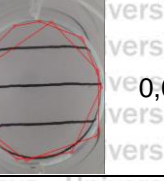
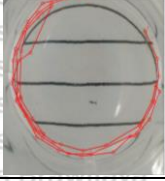
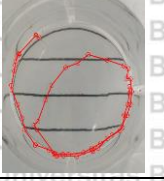
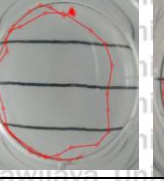

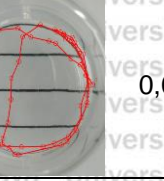
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

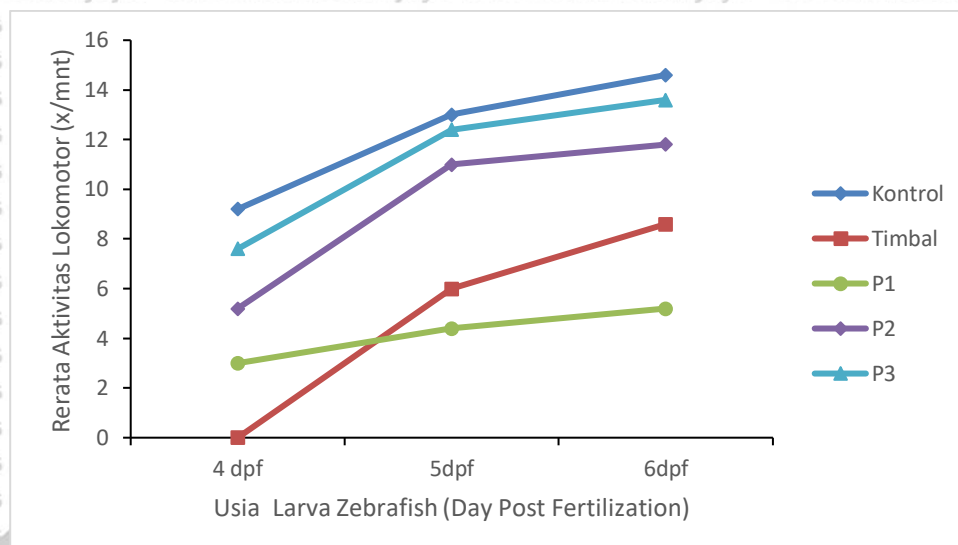
5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Aktivitas Lokomotor Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal

Aktivitas lokomotor larva zebrafish diukur dengan merekam gerak berpindah larva zebrafish selama 1 menit usia 4 – 6 dpf. Rerata aktivitas lokomotor antara kelompok kontrol, kelompok timbal, dan kelompok perlakuan yang diberikan timbal 2,5 ppm ditambah pegagan konsentrasi 1,25 µg/mL (P1), 2,5 µg/mL (P2), dan 5 µg/mL (P3) dengan lama paparan 2 hpf – 3 dpf dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Pola dan Rerata aktivitas lokomotor pada Larva Zebrafish usia 4, 5, dan 6 dpf

Lokomotor 4 dpf ( day post fertilization)					
Kontrol	Timbal	P1	P2	P3	P-value
					0,000
Mean ± SD 9,2 x/mnt ± 1,483	Mean ± SD 0±0	Mean ± SD 3 x/mnt ± 1,58	Mean ± SD 5,2 x.mnt ± 1,79	Mean ± SD 7,6 x/mnt ± 1,52	
Lokomotor 5 dpf ( day post fertilization)					
Kontrol	Timbal	P1	P2	P3	P-value
					0,000
Mean ± SD 13 x.mnt ± 1,581	Mean ± SD 6 x/mnt ± 3,24	Mean ± SD 4,4 x/mnt ± 2,074	Mean ± SD 11 x/mnt ± 2	Mean ± SD 12,4 x/mnt ± 1,14	
Lokomotor 6 dpf ( day post fertilization)					
Kontrol	Timbal	P1	P2	P3	P-value
					0,000
Mean ± SD 14,6 x/mnt ± 2,074	Mean ± SD 8,6 x/mnt ± 1,140	Mean ± SD 5,2 x/mnt ± 2,489	Mean ± SD 11,8 x/mnt ± 0,84	Mean ± SD 13,6 x/mnt ± 1,67	

Grafik aktivitas lokomotor antar kelompok dapat dilihat pada gambar 5.1 berikut ini :



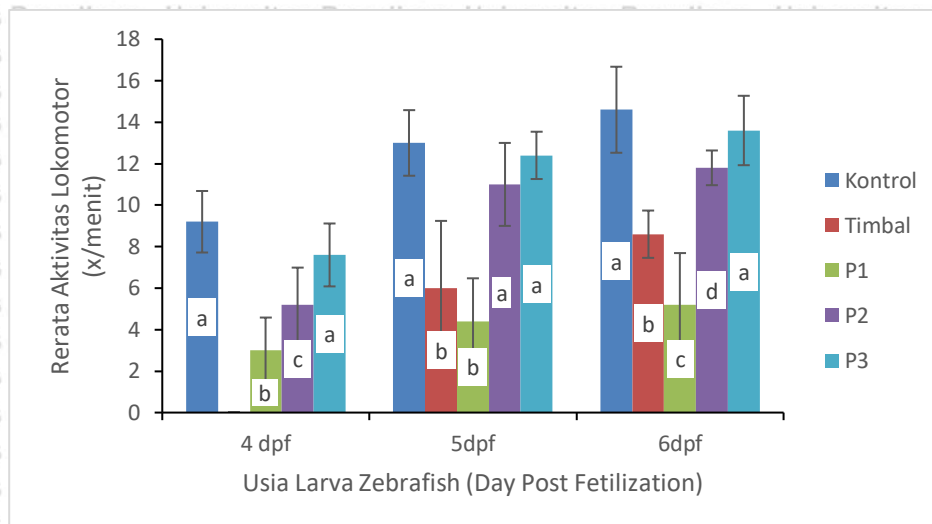
**Gambar 5.1 Rerata Aktivitas Locomotor pada Larva Zebrafish usia 4 – 6 dpf.**

Keterangan : Kelompok timbal menunjukkan rerata aktivitas lokomotor menurun dibandingkan kelompok kontrol dan Perlakuan (P2 dan P3)

Berdasarkan tabel 5.1 dapat diketahui bahwa Kelompok timbal mengalami penurunan secara signifikan aktivitas lokomotor dibandingkan kelompok kontrol.

Pada kelompok perlakuan P2 dan P3 yang diberi pegangan terdapat peningkatan rerata aktivitas lokomotor dibandingkan dengan kelompok timbal.

Rata-rata aktivitas lokomotor usia 4, 5, dan 6 dpf pada kelompok kontrol, P2, dan P3 lebih tinggi dari kelompok timbal. Pada gambar 5.1 dapat dilihat jika rata-rata aktivitas lokomotor kelompok timbal lebih rendah dibanding kelompok kontrol, P2, dan P3. Hasil uji normalitas dan homogenitas aktivitas lokomotor usia 4, 5, dan 6 dpf di dapat nilai yang signifikan dengan  $p\text{-value} > 0,05$ . Selanjutnya data aktivitas lokomotor di analisa dengan ANOVA didapatkan hasil yang signifikan  $P\text{-value} = 0,000 (p\text{-value} < 0,05)$  artinya terdapat perbedaan yang signifikan aktivitas lokomotor antar kelompok perlakuan terlihat pada gambar 5.2.



**Gambar 5.2 Perbandingan Rerata Aktivitas Lokomotor pada Larva Zebrafish usia 4-6 dpf.**

**Keterangan :** Rerata aktivitas lokomotor larva zebrafish berbeda secara signifikan antar semua kelompok. Kelompok P3 mampu menghasilkan rata-rata aktivitas lokomotor lebih tinggi dari kelompok timbal dan tidak signifikan dengan kelompok kontrol. Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Berdasarkan gambar 5.2, hasil uji LSD 5% aktivitas lokomotor 4 dpf menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok timbal dan kontrol ( $p\text{-value} = 0,000$ ). Kelompok kontrol juga berbeda secara signifikan dengan kelompok perlakuan P1 dan P2 ( $p\text{-value} = 0,000$ ). Kelompok perlakuan dengan konsentrasi pegagan 5  $\mu\text{g/mL}$  (P3) tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol.

Aktivitas lokomotor 5 dpf, terlihat kelompok timbal rerata aktivitas lokomotor mengalami penurunan dibandingkan kelompok kontrol, berdasarkan hasil uji LSD menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok timbal dan kontrol ( $P\text{-value} = 0,000$ ). Aktivitas lokomotor pada kelompok kontrol tidak berbeda signifikan dengan kelompok Perlakuan P2 ( $p\text{-value} = 0,124$ ) dan P3 ( $p\text{-value} = 0,635$ ). kelompok perlakuan P2 dan P3 mengalami peningkatan aktivitas lokomotor sebesar  $11 \pm 2$  (P2) dan  $12,4 \pm 1,14$  (P3).

Usia larva zebrafish 6 dpf setara dengan usia dua tahun pada manusia.

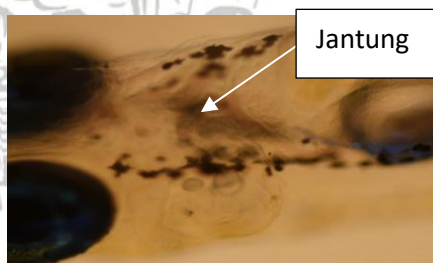
Terdapat perbedaan yang signifikan antara aktivitas lokomotor kelompok timbal dan kontrol ( $p\text{-value} = 0,000$ ). Adanya peningkatan aktivitas lokomotor pada



kelompok yang diberi pegagan 5 µg/mL (P3). Meskipun kelompok P2 (2,5 µg/mL) juga mengalami peningkatan rerata aktivitas lokomotor, hasil uji LSD 5% aktivitas lokomotor kelompok P2 berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol. Rerata aktivitas lokomotor kelompok P3 hampir mendekati kelompok kontrol, diperkuat dengan hasil uji LSD 5% tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan P3 (*p-value* = 0,377). Peningkatan rerata aktivitas lokomotor pada perlakuan P3 sebesar  $13,6 \pm 1,67$  atau 58,14% dari rerata kelompok timbal.

### 5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Denyut Jantung Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal

Denyut Jantung larva zebrafish diukur dengan merekam frekuensi denyut jantung larva zebrafish selama 1 menit usia 3 dan 4 dpf. Rerata denyut jantung antara kelompok kontrol, kelompok timbal, dan kelompok perlakuan yang diberikan timbal 2,5 ppm ditambah pegagan konsentrasi 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, dan 5 µg/mL dengan lama paparan 2 hpf – 3 dpf dapat dilihat pada tabel 5.2.



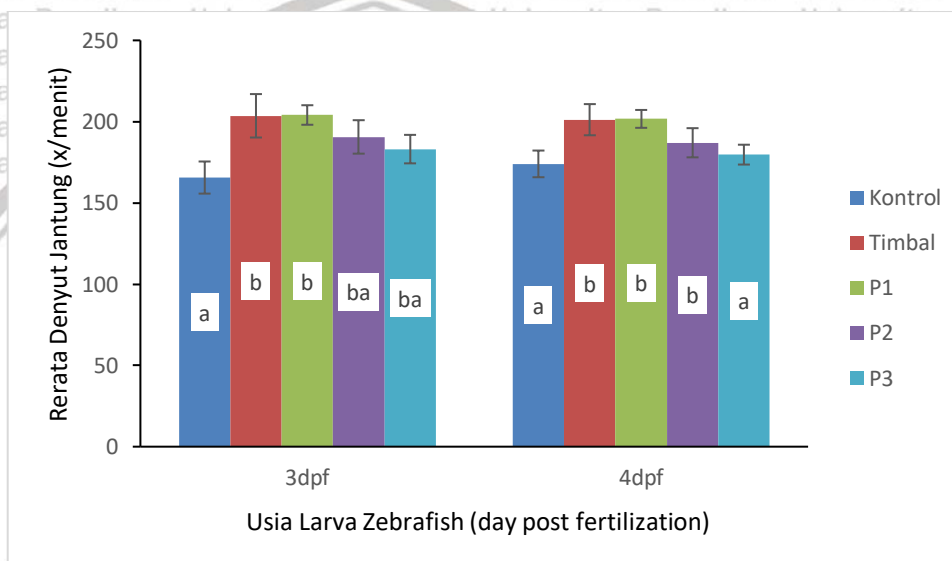
**Gambar 5.3** Jantung pada Larva Zebrafish.

Keterangan : Jantung larva zebrafish (yang diberi tanda panah) berada dibagian bawah kepala dekat dengan *yolksac*.

**Tabel 5.2** Hasil Perbandingan Rerata Denyut Jantung Larva Zebrafish

	Kelompok	Mean±SD	p-value
Denyut Jantung 3 dpf	Kontrol	170,3 x/mnt ± 10,42	a
	Timbal	203,6 x/mnt ± 13,37	b
	P1	204,1 x/mnt ± 6,01	b
	P2	190,6 x/mnt ± 10,29	ba
	P3	183,1 x/mnt ± 8,76	ba
Denyut Jantung 4 dpf	Kontrol	174 x/mnt ± 8,21	a
	Timbal	201,2 x/mnt ± 9,59	b
	P1	201,7 x/mnt ± 5,49	b
	P2	187 x/mnt ± 8,98	b
	P3	179,7 x/mnt ± 6,11	a

Pada tabel 5.2, Hasil uji normalitas dan homogenitas rerata denyut jantung usia 3 dan 4 dpf menunjukkan nilai signifikansi lebih besar dari  $\alpha$  ( $p > 0,05$ ), data sudah memenuhi dua kriteria asumsi, maka dilanjutkan dengan pengujian ANOVA, diperoleh nilai F hitung lebih besar dari F tabel ( $F_{hit} > 2,58$ ) dan nilai signifikansi lebih kecil dari  $\alpha$  ( $0,000 < 0,05$ ) sehingga dapat disimpulkan terdapat perbedaan yang signifikan rerata denyut jantung usia 3 dan 4 dpf pada masing-masing perlakuan.



**Gambar 5.4 Rerata Denyut Jantung pada Larva Zebrafish usia 3 dan 4 dpf antara Kelompok Kontrol, Timbal, dan Perlakuan.**

Keterangan : Kelompok timbal menunjukkan rerata denyut jantung lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok perlakuan terdapat penurunan denyut jantung dibandingkan kelompok timbal. Notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan secara signifikan.

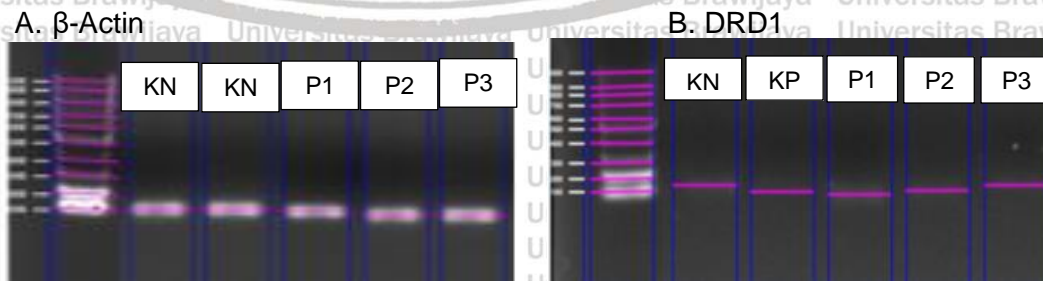
Berdasarkan gambar 5.4 dapat diketahui pada usia 3 dpf terdapat perbedaan yang signifikan antar semua kelompok perlakuan. Pada kelompok timbal terjadi peningkatan denyut jantung, berdasarkan uji LSD 5% terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok timbal dan kontrol. Pemberian pegagan konsentrasi konsentrasi 1,25  $\mu\text{g/mL}$  belum mampu menurunkan denyut jantung secara signifikan, hal ini didukung dengan hasil uji LSD didapatkan nilai  $p\text{-value} = 0,912$  bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan P1 dan

timbangan. Pada pemberian konsentrasi pegagan 2,5 µg/mL dan 5 µg/mL, sudah terdapat penurunan rerata denyut jantung tetapi berbeda signifikan dengan kelompok kontrol.

Pada usia 4 dpf, rerata denyut jantung kelompok timbal masih tinggi dibanding kelompok kontrol, hal ini di dukung dengan hasil uji LSD 5% diperoleh hasil rerata denyut jantung kelompok timbal berbeda signifikan dengan denyut jantung kelompok kontrol ( $p\text{-value} = 0,000$ ). Pemberian pegagan konsentrasi konsentrasi 5 µg/mL mampu menurunkan denyut jantung secara signifikan, hal ini didukung dengan hasil uji LSD 5% didapatkan nilai  $p\text{-value} = 0,000$  bahwa ada perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan P3 dan timbal. Rerata Penurunan tersebut sebesar 10,7% dibandingkan dengan rerata denyut jantung kelompok timbal. Rerata denyut jantung pada perlakuan P3 juga tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol, hal ini berdasarkan hasil uji LSD didapatkan  $p\text{-value} = 1,111$  ( $p\text{-value} > 0,005$ ).

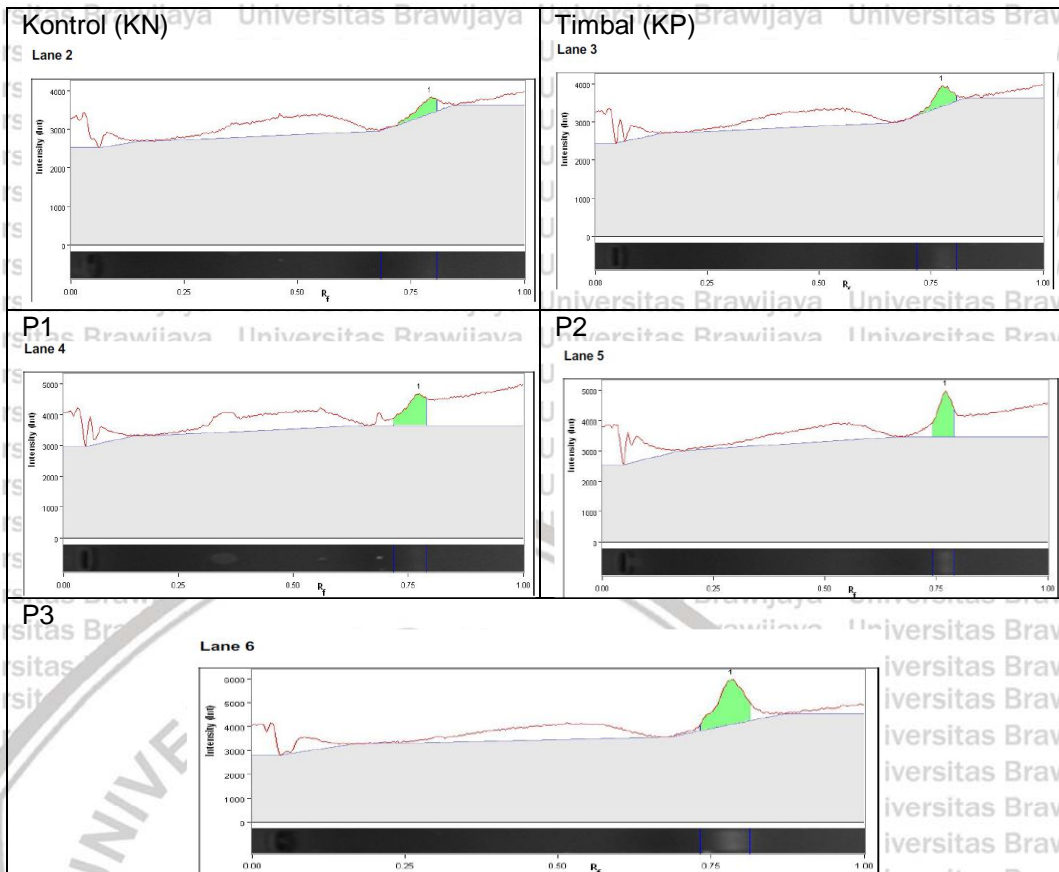
### 5.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Dopamin Reseptor D1 (DRD1).

Ekspresi Dopamin Reseptor D1 (DRD1) diukur saat larva usia 6 dpf menggunakan RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*). Hasil PCR kemudian di elektroforesis dan dievaluasi menggunakan *gel doc*. Adapun hasil visualisasi ekspresi DRD1 dapat dilihat pada gambar 5.5 berikut.



**Gambar 5.5 Elektroforegram hasil PCR Ekspresi DRD1.**

Keterangan : Ekspresi Dopamin Reseptor D1 pada Larva Zebrafish usia 6 dpf menggunakan elektroforesis gel agarose 1,5%. Ekspresi DRD1 direplikasi 3 kali untuk kemudian diuji secara statistik.



Gambar 5.6. Intensitas Ekspresi Dopamin Reseptor D1 pada Larva Zebrafish usia 6 dpf

Tabel 5.3 Hasil Perbandingan Rerata Ekspresi Dopamin Reseptor D1 pada Larva Zebrafish usia 6 dpf

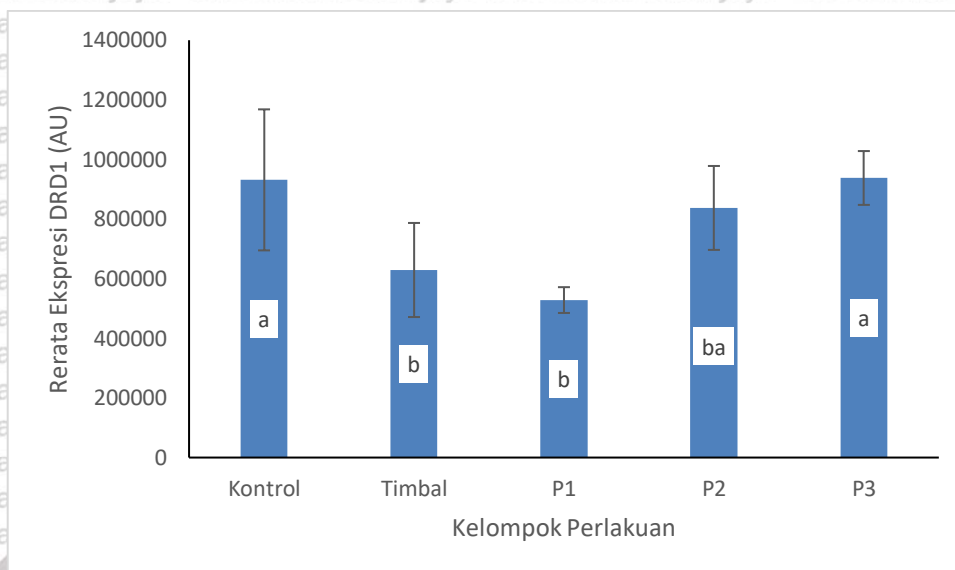
	Kelompok	Mean±SD	p-value
Ekspresi DRD1	Kontrol	9315043 AU ± 2365500,6	a
	Timbal	629168 AU ± 157827,1	b
	P1	528288 AU ± 43288,81	b
	P2	837360 AU ± 140782,2	ba
	P3	937818,7 AU ± 90289,67	a

Hasil pengujian asumsi normalitas dan homogenitas ragam pada variabel ekspresi Dopamin Reseptor D1 didapatkan p-value > 0,005 sehingga dapat disimpulkan data ekspresi Dopamin Reseptor D1 terdistribusi normal dan homogen.

Berdasarkan hasil analisa dengan uji ANOVA, diperoleh nilai F hitung lebih besar dari F tabel (4,642 > 3,48) dan nilai signifikansi lebih kecil dari  $\alpha$  (0,022 < 0,05)

Sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi DRD1 antar kelompok. Hasil uji LSD 5% menunjukkan ada perbedaan rerata

ekspresi DRD1 secara bermakna. Perbandingan rerata ekspresi DRD1 pada usia 6 dpf dapat dilihat pada gambar 5.7.



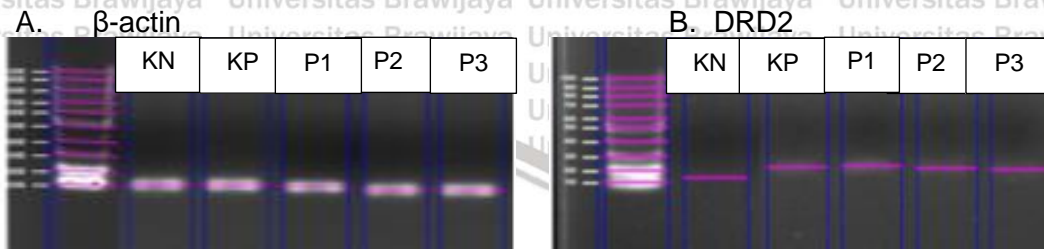
**Gambar 5.7 Rerata Ekspresi Dopamin Reseptor D1.**

Keterangan : Terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi Dopamin Reseptor D1 antar semua kelompok ( $n=3$ ) dengan  $p$ -value 0,022. Ekstrak Pegagan mampu meningkatkan kadar DRD1 pada larva zebrafish yang dipapar timbal. Notasi yang sama artinya tidak berbeda secara signifikan.

Pada Kelompok timbal terjadi penurunan ekspresi DRD1 yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol ( $p$ -value = 0,032). Pemberian pegagan pada konsentrasi 1,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (P1) tidak menunjukkan perubahan ekspresi DRD1. Hal ini didukung hasil uji LSD 5% yang menunjukkan ekspresi DRD1 pada kelompok timbal tidak berbeda signifikan pada kelompok P1 ( $p$ -value = 0,426). Pada Kelompok P2 dan P3 terdapat peningkatan ekspresi DRD1, Walaupun ekspresi DRD1 pada kelompok P2 terjadi peningkatan, hasil uji LSD 5% kelompok perlakuan P2 tidak berbeda secara signifikan dibandingkan kelompok timbal ( $p$ -value = 0,117). Kelompok P3 memiliki ekspresi DRD1 yang lebih tinggi dan berbeda signifikan dibanding Kelompok timbal ( $p$ -value = 0,029). Rerata peningkatan ekspresi DRD1 pada kelompok P3 paling mendekati kelompok kontrol, Hasil uji LSD 5% didapatkan kelompok perlakuan P3 tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol ( $p$ -value = 0,960).

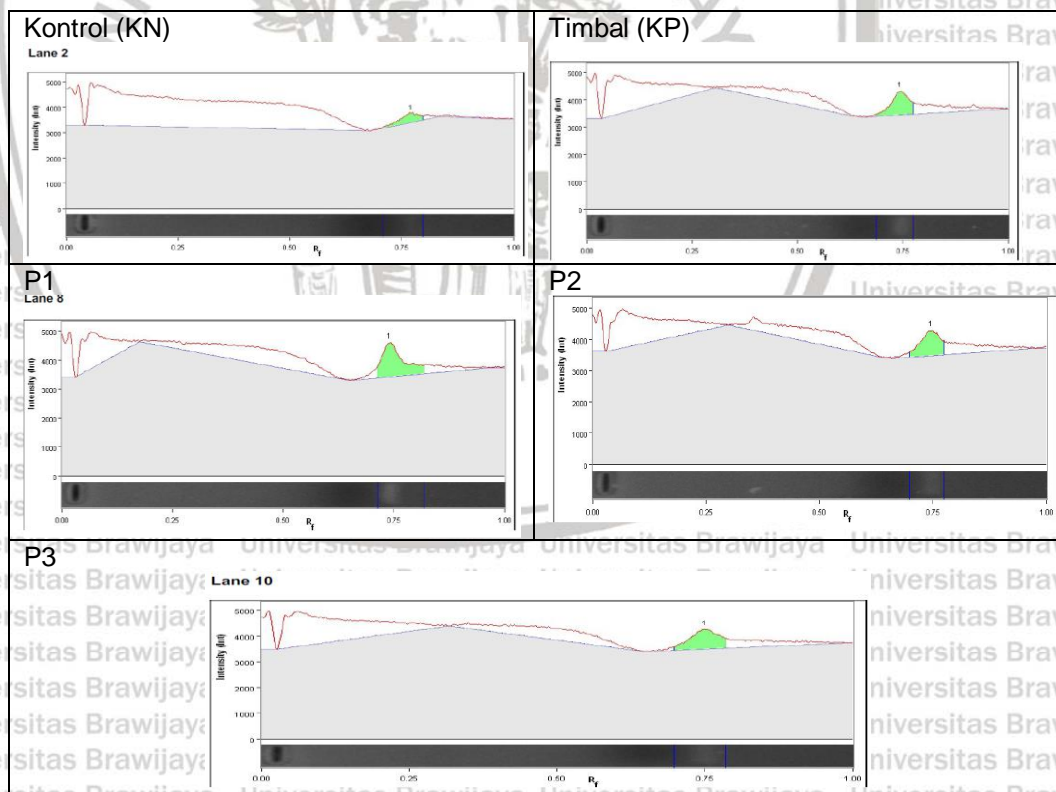
#### 5.4 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Dopamin Reseptor D2 (DRD2)

Ekspresi Dopamin Reseptor D2 (DRD2) diukur saat larva usia 6 dpf menggunakan RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*). Hasil PCR kemudian di elektroforesis dan dievaluasi menggunakan *gel doc*. Adapun hasil visualisasi ekspresi DRD1 dapat dilihat pada gambar 5.8 berikut.



**Gambar 5.8 Elektroforegram hasil PCR Ekspresi DRD2.**

Keterangan : Ekspresi Dopamin Reseptor D2 pada Larva Zebrafish usia 6 dpf menggunakan elektroforesis gel agarose 1,5%. Ekspresi DRD2 direplikasi 3 kali untuk kemudian diuji secara statistik



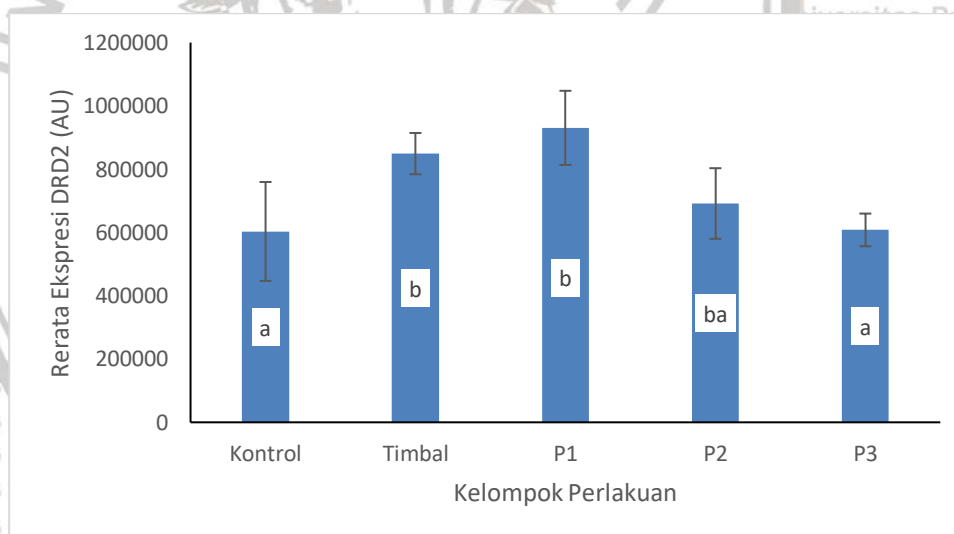
**Gambar 5.9. Intensitas Ekspresi Dopamin Reseptor D2 pada Larva Zebrafish usia 6 dpf**

**Tabel 5.4 Hasil Perbandingan Rerata Ekspresi Dopamin Reseptor D2 pada Larva Zebrafish usia 6 dpf**

Kelompok	Mean±SD	p-value
Ekspresi DRD2		
Kontrol	603065 AU ± 156297,2	a
Timbal	849049,33 AU ± 65224,94	b
P1	930434,67 AU ± 117117,71	b
P2	691464,33 AU ± 111520,81	ba
P3	607937,67 AU ± 51709,30	a

Hasil pengujian asumsi normalitas dan homogenitas ragam pada variabel ekspresi Dopamin Reseptor D2 didapatkan p-value > 0,005 sehingga dapat disimpulkan data ekspresi Dopamin Reseptor D2 terdistribusi normal dan homogen.

Dilakukan analisa dengan uji ANOVA, diperoleh nilai F hitung lebih besar dari F tabel (5,649 > 3,48) dan nilai signifikansi lebih kecil dari  $\alpha$  (0,012 < 0,05) Sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi DRD2 antar kelompok. Perbandingan rerata ekspresi DRD1 pada usia 6 dpf dapat dilihat pada gambar 5.10.



**Gambar 5.10 Rerata Ekspresi Dopamin Reseptor D2.**

Keterangan: Terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi Dopamin Reseptor D2 antar semua kelompok (n=3) dengan p-value 0,012. Ekstrak Pegagan mampu menurunkan kadar DRD2 pada larva zebrafish yang dipapar timbal. Notasi yang sama artinya tidak berbeda secara signifikan.

Hasil uji LSD 5% menunjukkan pada kelompok timbal terjadi peningkatan ekspresi DRD2 yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol (p-value = 0,019).

Pemberian pegagan pada konsentrasi 1,25 µg/mL (P1) tidak menunjukkan perubahan ekspresi DRD2. Hal ini didukung hasil uji LSD 5% yang menunjukkan

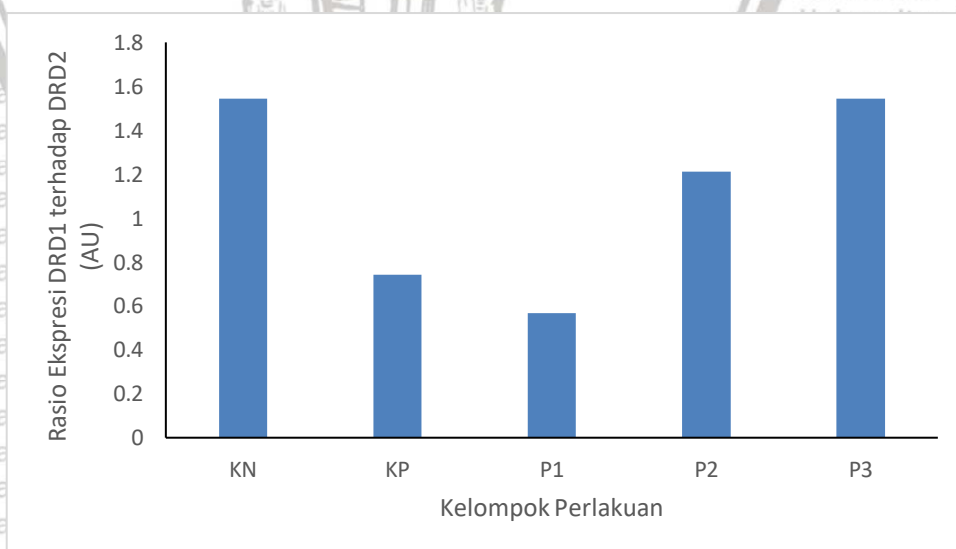
ekspresi DRD1 pada kelompok timbal tidak berbeda signifikan pada kelompok P1 ( $p\text{-value} = 0,375$ ). Pada Kelompok P2 dan P3 dengan pemberian konsentrasi pegangan 2,5  $\mu\text{g/mL}$  dan 5  $\mu\text{g/mL}$  terdapat penurunan ekspresi DRD2, Meskipun demikian, hasil uji LSD 5% kelompok perlakuan P2 tidak berbeda secara signifikan dibandingkan kelompok timbal ( $p\text{-value} = 0,102$ ). Kelompok P3 memiliki penurunan ekspresi DRD2 yang lebih tinggi dan berbeda signifikan dibanding Kelompok timbal ( $p\text{-value} = 0,029$ ). Rerata penurunan ekspresi DRD2 pada kelompok P3 paling mendekati kelompok kontrol, Hasil uji LSD 5% didapatkan kelompok perlakuan P3 tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol ( $p\text{-value} = 0,957$ ).

### 5.5 Rasio Ekspresi DRD1 terhadap Ekspresi DRD2

Berdasarkan hasil rerata ekspresi DRD1 dan ekspresi DRD2, maka rasio ekspresi keduanya sebagai berikut :

**Tabel 5.5 Rasio Ekspresi DRD1 terhadap DRD2**

	Kontrol	Timbal	P1	P2	P3
DRD1	931504	629168	528288	837360	937818,7
DRD2	603065,1	849049,3	930434,7	691464,3	607937,6
Rasio	1,544	0,741	0,568	1,21	1,542



**Gambar 5.11 Rerata Ekspresi DRD1 terhadap DRD2.**

Keterangan : Pada kelompok perlakuan P3 rasio ekspresi dopamine reseptor D1/D2 lebih tinggi dari kelompok perlakuan yang lain.



Hasil rasio Ekspresi DRD1 terhadap DRD2 terendah pada kelompok P1, hal ini sejalan dengan hasil pengamatan pada aktivitas lokomotor pada larva zebrafish. Kelompok P1 aktivitas lokomotor lebih rendah diantara kelompok perlakuan.

**5.6 Korelasi Antara Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Aktivitas Locomotor, Denyut Jantung, Ekspresi DRD1 dan Ekspresi DRD2**

Korelasi antara pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap aktivitas lokomotor, denyut jantung, ekspresi DRD1 dan ekspresi DRD2 dilakukan dengan uji *Spearman correlation*. Hasil korelasi antar variabel tersebut di tampilkan pada tabel 5.3.

**Tabel 5.6 Hasil Uji Korelasi Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Aktivitas Locomotor, Denyut Jantung, Ekspresi DRD1 dan Ekspresi DRD2**

Korelasi	<i>Spearman correlation</i>	p-value	Keterangan
Pemberian pegagan dengan Aktivitas Locomotor	0,773**	0,000	Hubungan yang kuat
Pemberian pegagan dengan Denyut Jantung	-0,741**	0,000	Hubungan yang kuat
Pemberian pegagan dengan Ekspresi DRD1	0,713**	0,009	Hubungan yang kuat
Pemberian pegagan dengan Ekspresi DRD2	-0,799**	0,002	Hubungan yang kuat
Aktivitas Locomotor dengan Ekspresi DRD1	0,809**	0,001	Hubungan yang sangat kuat
Aktivitas Locomotor dengan Ekspresi DRD2	-0,872**	0,000	Hubungan yang sangat kuat

Berdasarkan tabel 5.6 terdapat adanya korelasi yang signifikan antar pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap :

1. Aktivitas lokomotor, nilai koefisien sebesar 0,773 menunjukkan hubungan positif yang kuat, artinya pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) usia 2 hpf – 72 hpf dapat meningkatkan aktivitas lokomotor sebesar 77,3% pada larva zebrafish yang dipapar timbal.
2. Denyut jantung, nilai koefisien sebesar -0,741 menunjukkan hubungan negatif yang kuat, artinya pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) usia

2 hpf – 72 hpf dapat menurunkan denyut jantung sebesar 74,1% pada larva zebrafish yang dipapar timbal.

3. Ekspresi DRD1, nilai koefisien sebesar 0,713 menunjukkan hubungan positif yang kuat, artinya pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) usia 2 hpf – 72 hpf dapat meningkatkan ekspresi DRD1 sebesar 71,3% pada larva zebrafish yang dipapar timbal.

4. Ekspresi DRD2, nilai koefisien sebesar -0,799 menunjukkan hubungan negatif yang kuat, artinya pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) usia 2 hpf – 72 hpf dapat menurunkan ekspresi DRD2 sebesar 79,9% pada larva zebrafish yang dipapar timbal.

5. Korelasi antar aktivitas lokomotor terhadap ekspresi DRD 1 didapatkan *P-value* = 0,001 yang berarti ada korelasi yang signifikan. Nilai koefisien sebesar 0,809 menunjukkan hubungan positif yang kuat, artinya dengan peningkatan ekspresi DRD1 dapat disertai dengan peningkatan aktivitas lokomotor sebesar 80,9% pada larva zebrafish yang dipapar timbal.

6. Korelasi antar aktivitas lokomotor terhadap ekspresi DRD 2 didapatkan *P-value* = 0,000 yang berarti ada korelasi yang signifikan. Nilai koefisien -0,872 menunjukkan hubungan negatif sangat yang kuat, artinya dengan penurunan ekspresi DRD2 dapat disertai dengan peningkatan aktivitas lokomotor sebesar 87,2% pada larva zebrafish yang dipapar timbal.

## BAB 6

## PEMBAHASAN

**6.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Aktivitas Lokomotor Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal**

Aktivitas Lokomotor pada zebrafish dilihat dari kemampuan larva zebrafish berenang melewati pola garis yang ditentukan. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa toksisitas timbal dapat menurunkan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish dimana terjadi penurunan aktivitas lokomotor secara signifikan. Pada kelompok perlakuan yang diberi pegagan terdapat peningkatan rerata aktivitas lokomotor dibandingkan dengan kelompok timbal. Pada penelitian ini juga didapatkan perbedaan yang signifikan aktivitas lokomotor antar kelompok perlakuan, timbal mempengaruhi penurunan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish, dan pemberian ekstrak etanol pegagan memiliki pengaruh yang signifikan terhadap peningkatan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish usia 4 dpf – 6 dpf.

Timbal (Pb) dapat mengganti (substitusi) kalsium sebagai *second Messenger*, meniru kalsium masuk ke dalam sel lewat kanal kalsium. Berikatan dengan kalmodulin dan mengganggu homeostasis kalsium intraseluler. Akibat terganggu homeostasis kalsium, terjadi Peningkatan penggunaan  $Ca^{2+}$  oleh mitokondria, meningkatkan transpor elektron mitokondria, dan generasi ROS (Sanders, *et al.*, 2009). Selain itu, paparan Pb juga menghambat aktivitas enzim kompleks pernafasan mitokondria yaitu kompleks I dan III, dan secara signifikan menurunkan reduksi MTT (*Mitochondria Transport Chain*) yang mengubah fungsi mitokondria (Ma, *et al.*, 20017; Venkareddy & Muralidhara, 2015). Penurunan fungsi Mitokondria berakibat produksi ROS meningkat dan ketidak mampuan untuk menangani kelebihan kalsium sitosol karena gangguan eflux kalsium di

mitokondria, yang menyebabkan overload kalsium di mitokondria. Gangguan produksi ROS dan kalsium mitokondria ini menyebabkan terbukanya mitokondria *permeability transition pore* (PTP), yang diikuti dengan translokasi molekul proapoptosis dari mitokondria ke sitosol yang menjadi penyebab kematian cell akibat apoptosis (Gandhi & Abramov, 2012).

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Zhu, *et. al.* (2015), Timbal secara signifikan meningkatkan ROS, lipid peroksidasi, kerusakan DNA, menurunkan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish usia 144 hpf. Didukung pula oleh penelitian Dou & Zhang (2011), paparan timbal sejak awal embrionik pada zebrafish, embrio menunjukkan gejala neutotoksik dengan aksi lambat, seperti gerakan berenang yang lambat dan aksi meloloskan diri yang lambat

Pada sistem saraf, Pb berkompetisi dengan kalsium dan bergabung dalam sistem transportasi kalsium, dimana kalsium krusial digunakan bagi regulasi dan *release* neurotransmitter. Perubahan homeostasis kalsium dan kemampuan Pb untuk *mimic* kation kalsium yang menyebabkan perubahan neurotransmitter dalam hal ini adalah sistem dopaminergik (Sandra, *et. al.*, 2008). Penurunan aktivitas lokomotor secara signifikan pada penelitian ini berkaitan dengan penurunan kadar dopamin yang diteliti oleh rekan satu tim (Noviasari, *et. al.*, 2019). Dopamin sebagai neurotransmitter eksitator berperan pada fungsi motorik. Dopamin berkaitan pada reseptornya melalui *G protein-coupled receptors* (GPCR) mengakibatkan respon biologis berupa fungsi gerak (Khotimah, 2015). Selain itu, menurunnya dopamin juga disebabkan karena degenerasi dari sistem nigrostriatal (*substantia nigra pars compacta*), pada sistem ini dopamin memainkan peran penting dalam pergerakan (kontrol fungsi motorik dan dalam mempelajari keterampilan motorik baru) (Ayano, 2016).

Hasil penelitian ini juga membuktikan pemberian pegagan 5 µg/mL selama 2 hpf – 3dpf secara signifikan dapat meningkatkan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal.

Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya, Ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan neuron dopaminergik melalui peningkatan neurotropin (Khotimah, *et. al.*, 2015). Sejalan dengan hasil tersebut, Penelitian Hanum, *et. al.* (2016), juga membuktikan ekstrak pegagan memperbaiki aktivitas lokomotor pada zebrafish dewasa yang dipapar rotenon.

Pegagan (*Centella asiatica*) mengandung fitonutrien berupa triterpenoid, karotenoid, flavonoid, glikosida, dan minyak atsiri. Triterpene yang terkandung dalam daun pegagan (asiatic acid, madecassic, asiaticoside, dan madecassoside) berperan sebagai anti oksidan (Chandrika & Kumarab, 2015; Rahman, *et. al.*, 2013; Hashim, *et. al.*, 2011). Pegagan juga banyak mengandung bahan aktif antioksidan seperti polyphenol, flavonoid, karatenoid, tannin, dan vitamin C (Rahman, *et. al.*, 2013). Penggunaan pegagan sebagai antioksidan diharapkan dapat menurunkan ROS akibat paparan timbal, sehingga dapat meningkatkan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal. Kandungan quercetin pegagan juga mampu mengkelat logam berat seperti Pb dengan mengikat ion Pb melalui ikatan ion pada cincin B quercetin. Selain itu, ion quercetin tersusun dari gugus hidroksil dan gugus karbonil dapat menstabilkan radikal bebas dengan menyumbangkan elektronnya, dan menurunkan ROS sehingga mencegah terjadinya stres oksidatif (Flora, *et. al.*, 2012).

## **6.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Denyut Jantung Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal**

Studi terbaru paparan kronik timbal tingkat rendah dapat menyebabkan hipertensi, disfungsi / kerusakan endothelial, arteriosklerosis, dan penyakit jantung. Hasil penelitian ini menunjukkan kelompok timbal mengalami peningkatan

rerata denyut jantung dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok perlakuan yang diberi pegagan terdapat penurunan rerata denyut jantung dibandingkan dengan kelompok timbal. Pada penelitian ini juga didapatkan perbedaan yang signifikan rerata denyut jantung antar kelompok perlakuan, timbal mempengaruhi peningkatan denyut jantung pada larva zebrafish, dan pemberian ekstrak etanol pegagan memiliki pengaruh yang signifikan terhadap penurunan denyut jantung pada larva zebrafish usia 3 – 4 dpf.

Paparan timbal menyebabkan stress oksidatif di ginjal dan jaringan kardiovaskuler secara *invivo*, dan sel endothelial serta otot polos vaskuler secara *invitro*. Timbal meningkatkan produksi  $O_2$  diikuti dengan peningkatan generasi  $H_2O_2$  pada sel koronari endothelial dan Otot polos vaskuler, menyebabkan peningkatan tekanan atrial dan meningkatkan konsentrasi plasma endothelin-3. Selain itu kemampuan timbal berkompetisi dengan kalsium dan bergabung dalam sistem transportasi kalsium, dimana kalsium darah memainkan peran penting dalam pengaturan detak dan ritme jantung. Selain itu timbal juga berhubungan dengan peningkatan *nitric oxide* (NO) yang menyebabkan *down-regulation* enzim *soluble guanylate cyclase* yang menghasilkan *cyclic guanosine monophosphate* (mediator vasodilatasi), meningkatkan tekanan darah, merubah sistem adrenergik (seperti peningkatan plasma norepineprin, mengurangi densitas reseptor vaskuler  $\beta$ -adrenergik, dan meningkatkan aktivitas sistem saraf pusat), berakibat dengan peningkatan tekanan darah dan kerusakan jantung, menyebabkan penyakit kardiovaskuler dan hipertensi (Assi, *et. al.*, 2016).

Sejalan dengan peneltian Vaziri & Khan (2007), Paparan timbal kronik dapat meningkatkan tekanan atrial dan menyebabkan komplikasi pada ginjal dan sistem kardiovaskuler. Paparan timbal kronik juga menyebabkan hipertensi dan penyakit kardiovaskuler hal ini dikarenakan stres oksidatif sebagai mediator utama dari paparan timbal.

Jantung adalah organ pertama yang terbentuk di zebrafish pada awal perkembangan (24 hpf). Secara anatomi, jantung zebrafish berbeda dengan jantung manusia. Jantung zebrafish terdiri dari satu atrium dan satu ventrikel yang dipisahkan oleh katup atrioventrikuler. Jantung embrionik zebrafish menunjukkan pola eksitasi listrik yang sama dengan jantung manusia. Pada manusia normal denyut jantung istirahat adalah antara 60 dan 90 dpm. Pada zebrafish, denyut jantung embrionik normal jauh lebih dekat dengan manusia dibandingkan tikus (300-600 dpm), dengan 120 – 180 dpm (De Luca, *et. al.*, 2014).

Pada penelitian ini menunjukkan perbedaan yang signifikan rerata denyut jantung antar kelompok perlakuan. Pemberian ekstrak pegagan 5 µg/mL mampu menurunkan denyut jantung secara signifikan, rerata penurunan tersebut sebesar 10,7% dibandingkan dengan rerata denyut jantung kelompok timbal pada larva zebrafish diusia 4 dpf.

Ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) mengandung Asiaticoside dan asam arjunolat merupakan senyawa aktif yang diketahui dapat mengurangi enzim laktat dehidrogenase, glutamat oksaloasetat, keratin posfokinase, serta glutamat piruvat transaminase yang diketahui sebagai marker penyebab disfungsi jantung. Asam arjunolat berfungsi sebagai kadiotonik mencegah kematian sel jantung (myocardial necrosis), antiplatelet dan antikoagulan, menurunkan tekanan darah, dan menstabilkan detak jantung serta kadar kolesterol dalam darah (Gnanapragasam, *et. al.*, 2007).

### 6.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Dopamin Reseptor D1 (DRD1) Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal

Paparan timbal mempengaruhi metabolisme dopamin dan serotonin. Timbal secara selektif mengurangi ikatan dopamin dengan reseptor dopamin dan dopamin transporter dalam nukleus accumbens, hal menunjukkan bahwa paparan timbal bisa menjadi predisposisi penyakit neurodegeneratif yang terkait

dengan disfungsi dopaminergik (DA). Hal ini sejalan dengan hasil penelitian rekan satu tim (Noviasari, *et. al.*, 2019), paparan timbal menyebabkan penurunan pada ekspresi TH dan berdampak pada penurunan kadar dopamin.

Hasil penelitian menunjukkan timbal menyebabkan *downregulation* pada ekspresi DRD1, menunjukkan adanya penurunan pada jumlah dopamin reseptor D1.

Reseptor dopamin 1 dan 2 (DRD1, DRD2) merupakan bagian dari DA sistem yang sangat penting dalam memberi sinyal ke otak untuk melakukan banyak fungsi otak, salah satunya adalah aktivitas lokomotor (Stojanovic, *et. al.*, 2017). Aktivasi reseptor D1 terlihat pada neuron *postsynaptic* menghasilkan efek stimulasi sedang dalam aktivitas lokomotor. Reseptor D1 juga berfungsi mengaktifkan *adenylyl cyclase* dan peningkatan cAMP (Neve, *et. al.*, 2004). Paparan timbal menyebabkan stres oksidatif mengakibatkan degenerasi dari sistem nigrostriatal (*substantia nigra pars compacta*), pada sistem ini dopamin memainkan peran penting dalam pergerakan (kontrol fungsi motorik dan dalam mempelajari keterampilan motorik baru) (Ayano, 2016). Hal ini memungkinkan juga terjadinya penurunan dari ekspresi DRD1 karena letak Reseptor Dopamin tipe D1 terletak di zona kompakta substansia nigra dan secara prasinaptik terletak pada akson striatal yang berasal dari neuron-neuron kortikal dan juga dari sel-sel dopaminergik di dalam substansia nigra (Neve, *et. al.*, 2004).

Pemberian ekstrak etanol pegagan 5 µg/mL mampu meningkatkan ekspresi DRD1 secara signifikan. Korelasi antara pegagan dan ekspresi DRD1 menunjukkan hubungan yang kuat dan positif sehingga semakin besar konsentrasi pegagan yang diberikan maka akan semakin tinggi ekspresi DRD1.

Kandungan antioksidan yang tinggi pada pegagan mampu menangkap radikal bebas hasil paparan timbal sehingga dapat melindungi sel dari kerusakan akibat ROS yang berlebih. Ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) diketahui



dapat melindungi neuron dopaminergik melalui peningkatan neurotropin seperti BDNF (Khotimah, *et. al.*, 2015).

#### **6.4 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Dopamin Reseptor D2 Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal**

Hasil penelitian menunjukkan timbal menyebabkan *upregulation* pada ekspresi DRD2, menunjukkan adanya peningkatan pada jumlah dopamin reseptor D2.

Reseptor D2 berfungsi menurunkan cAMP (dengan menghambat *adenylyl cyclase*). Peran reseptor dopamin D2 jauh lebih kompleks daripada reseptor dopamin D1 karena mereka dihasilkan dari dua ekspresi yaitu presinaptik dan postsinaptik dari reseptor subtype ini. Aktivasi pre-sinaptik autoreseptor DRD2 umumnya menyebabkan penurunan pelepasan dopamin yang menghasilkan penurunan alat gerak aktivitas, sedangkan aktivasi reseptor post-sinaptik merangsang gerak. Reseptor dopamin D2 merupakan jenis autoreseptor dominan yang terlibat dalam regulasi presinaptik laju pembakaran, sintesis dopamin dan pelepasan dopamin. Hal inilah yang menyebabkan meningkatnya ekspresi DRD2, karena menurunnya kadar dopamin akibat paparan timbal (De Mei, *et. al.*, 2009).

Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian Goodlad, *et. al.*, 2013, Timbal merusak sejumlah sistem neurotransmitter termasuk jalur dopaminergik, glutamatergik, dan kolinergik.

Pemberian ekstrak etanol pegagan 5 µg/mL mampu menurunkan ekspresi DRD2 secara signifikan. Korelasi antara pegagan dan ekspresi DRD2 menunjukkan hubungan yang kuat dan negatif sehingga semakin besar konsentrasi pegagan yang diberikan maka akan semakin turun ekspresi DRD2.

Ekstrak pegagan dapat memperbaiki jaringan otak yang mengatur proses interaksi di otak sehingga pegagan banyak digunakan untuk terapi terhadap anak-anak penderita keterbelakangan mental dan hiperaktif. Pegagan juga dapat

merevitalisasi pembuluh darah sehingga peredaran darah ke otak menjadi lancar (Surbakti, 2003). Pegagan sebagai neuroproteksi karena mampu melindungi sel-sel dari kerusakan oksidatif, menghancurkan kelebihan radikal bebas, dan menjaga keseimbangan ROS (Chandrika & Kumara, 2015).

### **6.5 Hubungan Aktivitas Lokomotor terhadap Rasio Ekspresi Dopamin Reseptor D1 dan Dopamin Reseptor D2**

Hasil uji korelasi antar aktivitas lokomotor terhadap ekspresi DRD 1 didapatkan hubungan yang signifikan. Nilai koefisien sebesar 0,809 menunjukkan hubungan positif yang kuat, artinya dengan peningkatan ekspresi DRD1 dapat disertai dengan peningkatan aktivitas lokomotor sebesar 80,9% pada larva zebrafish yang dipapar timbal. Hasil uji korelasi antar aktivitas lokomotor terhadap ekspresi DRD 2 didapatkan hubungan yang signifikan. Nilai koefisien -0,872 menunjukkan hubungan negatif sangat yang kuat, artinya dengan penurunan ekspresi DRD2 dapat disertai dengan peningkatan aktivitas lokomotor sebesar 87,2% pada larva zebrafish yang dipapar timbal.

Hal ini juga diperkuat dengan rasio ekspresi DRD1 terhadap DRD2, dimana dapat diketahui Kelompok timbal rasionya lebih rendah dari kontrol maupun kelompok perlakuan yang diberi pegagan (P2 dan P3), dibuktikan dengan aktivitas lokomotor yang lebih lambat.

Hasil ini sesuai dengan penelitian Sandra, *et. al.*, 2008, Paparan Timbal menyebabkan perubahan neurotransmitter dalam hal ini adalah sistem dopaminergik. Didukung oleh penelitian Khotimah (2015), Dopamin sebagai neurotransmitter eksitator berperan pada fungsi motorik. Dopamin berikatan pada reseptornya (D1-like dan D2-like) melalui *G protein-coupled receptors* (GPCR) mengakibatkan respon biologis berupa fungsi gerak. Peningkatan dopamin menyebabkan peningkatan lokomotor dan sebaliknya.

## 6.6 Implikasi Hasil Penelitian dalam Asuhan Kebidanan

Timbal bersifat toksik yang berada bebas di udara bahkan diperairan menimbulkan pencemaran di lingkungan aquatik. Limbah pabrik dan rumah tangga banyak dibuang ke sungai-sungai sehingga mengotori dan mencemari badan sungai. Sebagian besar rakyat Indonesia tinggal dilingkungan perairan dan menggunakan air sungai sebagai kebutuhan rumah tangga. Jika hal ini dibiarkan terus menerus maka pencemaran ini akan mempengaruhi tumbuh kembang anak terutama pada ibu yang sedang hamil. Timbal dapat masuk ke dalam janin melalui transfer plasenta ibu ke janin. Akibat toksisitas timbal menimbulkan masalah berat pada fungsi neurologis dan perkembangan anak di kemudian hari.

1000 hari pertama (konsepsi sampai usia 2 tahun) merupakan periode kritis untuk pertumbuhan dan perkembangan anak (Victori, *et. al.*, 2008). Penelitian ini diharapkan dapat membuka wawasan tenaga kesehatan khususnya bidan dalam pemantauan tumbuh kembang anak pada 1000 hari kehidupan pertama (HPK) terutama untuk daerah-daerah yang beresiko tercemar timbal seperti daerah pinggir sungai atau dekat dengan aliran sungai, terutama daerah lingkungan pabrik yang buangan limbahnya ke sungai. Meningkatkan kesadaran orang tua dan bidan akan bahaya pencemaran timbal bagi kesehatan tumbuh kembang anak.

Pegagan merupakan tanaman yang banyak tumbuh di wilayah Indonesia, masyarakat mengkonsumsi pegagan sebagai sayuran yang diolah ataupun dimakan mentah sebagai lalapan. Sebagian besar masyarakat belum mengetahui manfaat tumbuhan pegagan terutama bagi pencegahan toksisitas logam berat.

Oleh sebab itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan dosis dan keamanan konsumsi pegagan bagi masyarakat khususnya konsumsi bagi ibu hamil.

**BAB 7****KESIMPULAN DAN SARAN****7.1 Kesimpulan**

Berdasarkan dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan secara umum bahwa ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah toksisitas timbal pada larva zebrafish yang dipapar timbal usia 2 hpf – 3 dpf. Secara khusus dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal.
2. Ekstrak etanol pegagan dapat menurunkan denyut jantung pada larva zebrafish yang dipapar timbal.
3. Ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan ekspresi DRD1 pada larva zebrafish yang dipapar timbal.
4. Ekstrak etanol pegagan dapat menurunkan ekspresi DRD2 pada larva zebrafish yang dipapar timbal.
5. Terdapat hubungan yang sangat kuat dan positif antara Ekspresi Dopamin Reseptor D1 dengan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal.
6. Terdapat hubungan yang sangat kuat dan negatif antara Ekspresi Dopamin Reseptor D2 dengan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal.

**7.2 SARAN**

1. Perlu penelitian lebih lanjut konsentrasi ekstrak pegagan yang aman di konsumsi bagi ibu hamil untuk pencegahan gangguan tumbuh kembang akibat toksisitas logam berat pada masa kehamilan.

2. Perlu dilakukan uji kadar logam berat pada air dan sampel yang digunakan dengan metode *Atomic Absorbtion Spectrophotometer* (ASS) untuk menganalisa seberapa besar kandungan logam berat pada air atau sampel yang digunakan.
3. Penelitian lebih lanjut untuk melihat toksisitas timbal pada studi epigenetik terhadap sampel yang digunakan.



## DAFTAR PUSTAKA

- Agoes, A., 2010. *Tanaman Obat Indonesia (Buku 1)*. Jakarta : Salemba Medika.
- Ahmed, M., & Siddiqui, M.K.J., 2007. Low Level Lead Exposure and Oxidative Stress : Current Opinions. *Clinica Chimica Acta : Invited Critical Review*, **383** : 57-64.
- Al-Saleh, I., Coskun, S., Mashhour, A., Shinwari, N., El-Doushet, I., et. al., 2008. Exposure to heavy metals (lead, cadmium and mercury) and its effect on the outcome of in-vitro fertilization treatment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **211** (5-6) : 560–579.
- Aoyama, Y., Moriya, N., Tanaka, S., Taniguchi, T., Hosokawa, H., & Maegawa, S., 2015. A Novel Method for Rearing Zebrafish by Using Freshwater Rotifers (*Brachionus calyciflorus*). *Zebrafish*, **12** (4) : 288-295.
- Assi, M.A., M.Hezme, M.N., Haron, A.W., M. Sabri, & Rajion M.A., 2016. The Detrimental Effects of Lead on Human and Animal Health. *Veterinary World*; **9** (2016) : 2231-0916.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2017. *Lead Toxicity*. Case Studies In Environmental Medicine (CSEM). Atlanta, GA : Departement of Health and Human Services, US; P. 16-17, 64-74.
- Avdesh, A., Chen, M., Iverson, MTM., Mondal, A., Ong, D., Smith, SR., et. al., 2012. Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory : An Introduction. *Journal of Visualized Experiments*, **69** (e4196) : 1-8.
- Ayano, G., 2016. Dopamine : Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders : Review of Literatures. *J Ment Disord Treat*, **2** (2) : 1-4.
- Bailey, J., Oliveri, A., & Levin, E.D., 2013. Zebrafish Model Systems for Developmental Neurobehavioral Toxicology. *Birth Defects Res C Embryo Today*. PMC, **99** (1) : 14–23.
- Baskin, JM., Dehnet, KW., Laughlin, ST., Amacher SL., & Bertozzi, CR., 2010. Visualizing Enveloping Layer Glycans During Zebrafish Early Embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107** (23) : 10360-10365.
- Beaulieu, JM., & Gainetdinov, RR., 2011. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. Associate Editor : Sibley, DR., *Pharmacol Rev*, **63** (1) : 182–217.
- Bijoor, A.R., Sudha, S., & Venkatesh, T., 2012. Neurochemical and Neurobehavioral Effects of Low Lead Exposure on the Developing Brain. *Ind J Clin Biochem*, **27** (2) : 147–151.
- Birben, E., Murat, U., Sahiner, M.D., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, **5** : 9-19.

Boehmler, W., Obrecht-Pflumio, S., Canfield, V., Thisse, C., Thisse, B., & Levenson, R., 2004. Evolution and Expression of D2 and D3 Dopamine Receptor Genes in Zebrafish. *Developmental Dynamics : an Official Publication of The American Association of Anatomists*. **230** : 481–493.

BPOM RI, 2010. *Pegagan-Centella asiatica (L) Urban*. Jakarta : Direktorat Obat Asli.

\_\_\_\_\_, 2011. Peraturan Kepala BPOM RI Nomor HK.03.1.23.08.11.07517 Tentang Persyaratan Teknis Bahan Kosmetika, Cite this page: 2018, Desember 22. Available from : <https://notifikos.pom.go.id/>.

Brochin, R., Leone, S., Philips, D., Shepard, N., Zisa, D., & Angerio, A., 2008. The Cellular Effect of Lead Poisoning and Its Clinical Picture. *The Georgetown Undergraduate Journal Of Health Sciences*, **5** (2).

Brustein, E., Chong, M., Holmqvist, B., & Drapeau, P., 2003. Serotonin Patterns Locomotor Network Activity in the Developing Zebrafish by Modulating Quiescent Periods. *J Neurobiol*, **57**: 303–322.

BSN, 2009. Standar Nasional Indonesia (SNI) No : 7388-2009 Tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba Dan Batas Maksimum Residu Dalam Bahan Makanan Asal Hewan, Cite this page : 2018, Desember 22. Available : <http://bsn.go.id/>.

Burton, GJ., & Jauniaux, E., 2011. Oxidative Stress. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, **25** (3) : 287-299.

Cao, X., Huang, S., & Ruan, D., 2008. Enriched Environment Restores Impaired Hippocampal Long-term Potentiation and Water Maze Performance Induced by Developmental Lead Exposure in Rats. *Dev. Psychobiol.*, **50** : 307–313.

Cavallotti, C., Mancone, M., Bruzzone, P., Sabbatini, M., & Mignini F., 2010. Dopamine Receptor Subtypes in The Native Human Heart. *Heart Vessels, Springer*, **25** (2010) : 432 – 437.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2010. *Guidelines For The Identification And Management Of Lead Exposure In Pregnant And Lactating Women*. Atlanta, GA : Departement of Health and Human Services, US; P. 27-35

Chandrika, UG., & Peramune, KA., 2015. Gotu Kola (Centella asiatica) : Nutritional Properties and Plausible Health Benefits. *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier : 125-153.

Chandrika, UG., & Kumarab, PAAS., 2015. Gotu Kola (Centella asiatica) : Nutritional Properties and Plausible Health Benefits. *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier, **1** (76).

Chang, J., Kueon, C., & Kim, J., 2014. Influence of Lead on Repetitive Behavior and Dopamine Metabolism in a Mouse Model of Iron Overload. *Toxicol. Res.*, **30** (4) : 267-276.

Cheng, CL., & Koo, MW., 2000. Effects of Centella asiatica on Ethanol Induced Gastric Mucosal Lesions in Rats. *Life Sci*, **67** (21) : 2647-2653.

Costa, LG., Aschner, M., Vitalone, A., Syversen, T., & Soldin, OP., 2004. Developmental Neuropathology of Environmental Agents. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **44** : 87–110.

De Luca, E., Zaccaria, GM., Hadhoud, M., Rizza, G., Ponzini, R., *et. al.*, 2014. ZebraBeat : a Flexible Platform For The analysis of The Cardiac Rate in Zebrafish. *Scientific Reports*; **4** (4898) : 1 – 13.

De Mei, C., Ramos, M., Iitaka, C., & Borrelli, E., 2009. Getting Specialized : Presynaptic and Postsynaptic Dopamine D2 Receptors. *Curr Opin Pharmacol*, **9** : 53–58.

Dobrakowski, M., Kasperczyk, A., Pawlas, N., Birkner, E., Hudziec, E., Chwalinska, E., Kasperczyk, S., 2016. Association Between Subchronic and Chronic Lead Exposure and Levels of Antioxidants and Chemokines. *Int Arch Occup Environ Health*. Springer, **89** : 1077–1085.

Dou, C., & Zhang, J., 2011. Effects of Lead on Neurogenesis During Zebrafish Embryonic Brain Development. *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier, **194** : 277–282.

Fairchild, K.D. & O'Shea, M., 2010. Heart Rate Characteristics : Physiometers for Detection of Late-Onset Neonatal Sepsis. *Clin Perinatal*; **37** (3) : 581 – 598.

Flora, G., Gupta, D., & Tiwari, A., 2012. Toxicity of Lead : A review with Recent Updates. *Interdisciplinary Toxicology : A. Review*. PubMed Central, **5** (2) : 47-58.

Flora, SJS., Flora, G., Saxena, G., & Mishra, M., 2007. Arsenic and Lead Induced Free Radical Generation and Their Reversibility Following Chelation. *Cellular and Molecular Biology*, **53** : 26-47.

Flora, SJS., 2009. Structural, Chemical and Biological Aspects of Antioxidants for Strategies Against Metal and Metalloid Exposure. *Oxid Med Cell Longev* **2**: 191–206.

Gandhi, S. & Abramov, A.Y., 2012. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Publishing Corporation, **2012** : 1-11.

Garcia, MTA., & Gonzalez, ELM., 2008. Toxic Effects of Perinatal Lead Exposure on the Brain of Rats: Involvement of Oxidative Stress and the Beneficial Role of Antioxidants. *Fd Chem Toxicol*, **46** : 2089–2095.

Garza, A., Vega, R., & Soto, E., 2006. Cellular Mechanisms of Lead Neurotoxicity. *Med Sci Monit : A. Review*, **12** (3) : 57-65.



Gill, K.D., Gupta, V., & Sandhir R., 2003.  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-Mediated Neurotransmitter Release and Neurobehavioral Deficits Following Lead Exposure. *Cell Biochemistry and Function. InterScience*, **21** : 345-353.

Gnanapragasam, A., Yogetta, S., Subhashini, R., Ebenezer, KK., Sathish, V., & Devaki, T., 2007. Adriamycin-Induced Myocardial Failure in Rats : Protective Role of *Centella asiatica*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **294** : 55-63.

Goody, M. F., & Henry, C. A. 2013. Motility Assay for Zebrafish Embryos. *Bio-Protocol*, **3** (11) : e787.

Gorlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova O., 2015. Calcium and ROS : A Mutual Interplay. *Redox Biology : A. Review*, **6** : 260-271.

Goodlad, JK., Marcus DK., & Fulton, JJ., 2013. Lead and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) Symptoms : a Meta-Analysis. *Clinical Psychology Review. Elsevier*, **33** : 417-425

Green, MH., Ho, R.K., & Hale, ME., 2011. Movement and Function of the Pectoral Fins of the Larval Zebrafish (*Danio rerio*) During Slow Swimming. *The Journal of Experimental Biology*, **214** : 3111-3123

Green, MH., and Hale, ME., 2012. Activity of Pectoral fin Motoneurons During Two Swimming Gaits in the Larval Zebrafish (*Danio rerio*) and Localization of Upstream Circuit Elements. *J Neurophysiol*, **108** : 3393-3402.

Greydanus, DE. & Merrick, J., 2016. From Nicander of Colophon, Ludwig van Beethoven, Vincent van Gogh, and now the children of Flint, Michigan, United States: The long, lethal legacy of lead neurotoxicity tragically lingers. *J Pain Manage*, **9** (1) : 23-31.

Hanafiah, KA., 2016. *Rancangan Percobaan Teori & Aplikasi*. Jakarta : PT. Raja Garfindo Persada, P. 9-10.

Hanum, S., Widodo, M., & Rahayu, M., 2016. Pengaruh Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi Tirosin Hidroksilase (TH) serta Aktivitas Lokomotor Ikan Zebra (*Danio rerio*). *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, **29** (2) : 99-103.

Hashim, P., Sidek, H., Helan, MHM., Sabery, A., Palanisamy, UD., & Ilham, M., 2011. Triterpene Composition and Bioactivities of *Centella asiatica*. *Molecules*, **16** : 1310-1322.

Heilig, E., Molina, R., Donaghey, T., Brain, JD., & Wessling-Resnick, M., 2005. Pharmacokinetics of Pulmonary Manganese Absorption : Evidence for Increased Susceptibility to Manganese Loading in Iron-Deficient Rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. PubMed*; **288** : L887-L893.

Hutchon, D. JR., 2016. The Normal Range of Heart Rate at Birth in a Healthy Term Neonate: A Critical Review of The Evidence. *Curr Pediatr Res*; **20** (1&2) : 7- 10.

Incandela, L., Cesarone, M.R., Chacchio, M., De Sanctis, MD., Santavenere, C., D'Auro, MG., et. al., 2001. Total Triterpenic Fraction of Centella asiatica in Chronic Venous Insufficiency and in High-Perfusion Microangiopathy. *Angiol*, **52** (2) : 9-13.

James, JT., & Dubery, IA., 2009. Pentacyclic Triterpenoids from the Medicinal Herb, Centella asiatica (L.) Urban. *Molecules*, **14** : 3922-3941.

Jamil, SS., Nizami, Q., & Salam, M., 2007. Centella asiatica (Linn.) Urban òA Review. *Natural Product Radiance*, **6** (2) : 158-170.

Joshi, K., & Chaturvedi, P., 2013. Therapeutic Efficiency of Centella Asiatica (L.) Urb. An Underutilized Green Leafy Vegetable : An Overview. *Int J Pharm Bio Sci*, **4** (1) : 135 - 149.

Katzung, BG., & Trevor, AJ., 2015. *Basic & Clinical Pharmacology*. 13th ed. New York : Lange Medical Books/Mc Graw-Hill; P. 987-991

Khotimah, H., Sumitro, S., Ali, M., & Widodo, MA., 2015. Standardized Centella asiatica Increased Brain-Derived Neurotropic Factor and Decreased Apoptosis of Dopaminergic Neuron in Rotenone-induced Zebrafish. *GSTF Journal of Psychology (JPsyCh)*, **2** (1) : 22-27

Kiehn, O., & Dougherty, K., 2013. Locomotion : Circuit and Physiology. *Neuroscience in the 21 st Century*. Springer, **2013** : 1209-1236.

Kim, JI., Kim, JW., Lee, JM., Yun, HJ., Sohn, Ch., Shin, MS., et. al., 2017. Interaction Between DRD2 and Lead Exposure on The Cortical Thickness of The Frontal Lobe in Youth With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, **82** : 169-176

Kimmel CB., Ballard, WW., Kimmel, SR., Ullmann, B., & Schilling TF., 1995. Stage of Embryonic Development of the Zebrafish. *Dev Dyn*, **203** (3) : 253-310.

Klee, EW., Schneider, H., Clark, K., Cousin, M., Ebbert, J., Hooten, M., et. al., 2012. Zebrafish : A Model for the Study of Addiction Genetics. *Hum Genet*, **131** (6) : 1- 49.

Kordas, K., 2010. Iron, lead, and children's behavior and cognition. *Annu Rev Nutr. PubMed*, **30** :123-148.

Lee, J., & Freeman, JL., 2014. Zebrafish as a Model for Investigating Developmental Lead (Pb) Neurotoxicity as a Risk Factor in Adult Neurodegenerative Disease: A Mini-Review. *Neurotoxicology*, **43** : 57-64.

Lee, SA., Suh, Y., Lee, S., Jeong, J., Kim, SJ., Kim, SJ., & Park, S.K., 2017. Functional Expression of Dopamine D2 Receptor is Regulated by Tetraspanin 7-Mediated Postendocytic Trafficking. *FASEB J.*, **31** : 2301-2313.

Li, H., Gong, X., Zhang, L., Zhang, Z., Luo, F., Zhou, Q., et. al., 2009. Madecassoside Attenuates Inflammatory Response on Collagen-Induced Arthritis in DBA/1 Mice. *Phytomedicine*, **16** : 538-546.

Li, P., Shah, S., Huang, L., Carr, AL., Gao, Y., Thisse, C., et. al., 2007. Cloning and Spatial and Temporal Expression of the Zebrafish Dopamine D1 Receptor. *Developmental Dynamics : an Official Publication of The American Association Of Anatomists*. PubMed, **236** : 1339-1346.

Lidsky, T.I., & Schneider J.S., 2003. Lead Neurotoxicity in Children : Basic Mechanisms and Clinical Correlates. *Brain*, **126** : 5-19.

Liu, KS., Hao, JH., Zeng, Y., Dai, FC., & Gu, PQ., 2013. Neurotoxicity And Biomarkers Of Lead Exposure: A Review. *Chin Med Sci J*, **28** (3) : 178-188.

Lucitt, MB., Price, TS., Pizarro, A., Wu, W., Yocum, AK., Seiler, C., et. al., 2008. Analysis Zebrafish Proteome During Embryonic Development. *Molecular & Cellular Proteomics*, **7** (5) : 981-994.

Ma, L., Liu, JY., Dong, JX., Xiao, Qi., et. al., 2017. Toxicity of Pb<sup>2+</sup> on Rat Liver Mitochondria Induced by Oxidative Stress and Mitochondrial Permeability Transition. *Toxicology Research*; **6** (2017).

Ma, LH., Gilland, E., Bass, AH., Baker, R., 2010. Ancestry of motor Innervation to Pectoral fin and Forelimb. *Nat Commun* **1** : 49,

Mahler, J., Filippi, A., Driever, W., 2010. DeltaA/DeltaD Regulate Multiple and Temporally Distinct Phases of Notch Signaling During Dopaminergic Neurogenesis in Zebrafish. *Journal of Neuroscience*. PubMed, **30** : 16621–16635.

McLean, DL., & Fetcho, JR., 2004a. Ontogeny and Innervation Patterns of Dopaminergic, Noradrenergic, and Serotonergic Neurons in Larval Zebrafish. *J Comp Neurol*, **480** : 38–56.

McLean, DL., & Fetcho, JR., 2004b. Relationship of Tyrosine Hydroxylase and Serotonin Immunoreactivity to Sensorimotor Circuitry in Larval Zebrafish. *J Comp Neurol*, **480** : 57–71,

McMenamin, S.K., Parichy, D.M., 2013. Chapter Five - Metamorphosis in Teleosts. *Jurnal Current Topics in Developmental Biology*, **103** : 127 – 165.

Moos, T., 2002. Brain iron homeostasis. *Dan Med Bull*. PubMed, **49** : 279–301.

Mukhtamar, R., Wahyudi, H., Hamonangan, E., Lahtiani, S., Santoso, M., Lestuani, D. D., et. al. 2013. *Ecolab*, **7** (2) : 49-108.

Musacchio, JM., 2013. Chapter 1: Enzymes Involved in the Biosynthesis and Degradation of Catecholamines. *Biochemistry of Biogenic Amines*. Springer **2013** : 1-35.

Mudipali, A.; (2007). Lead hepatotoxicity and potential health effect. *Indian Journal of Medical Research*, **126** : 518-527

Neve, K. A., Seamans, J. K., & Davidson, H. T. 2004. Dopamine Receptor Signaling. *Journal of Receptor and Signal Transduction*, **24** (3) : 165-205.

Nigg, JT., Knottnerus, GM., Martel, MM., Nikolas, M., Cavanagh, K., Karmaus, W., et. al. 2008. Low Blood Lead Levels Associated with Clinically Diagnosed Attentiondeficit/Hyperactivity Disorder and Mediated by Weak Cognitive Control. *Biological Psychiatry*, **63** : 325–331.

Nouredine, D., Miloud, S., & Abdelkader, A., 2004. Effect of Lead Exposure on Dopaminergic Transmission in the Rat Brain. *Int. J. Ch. Neuropsychiatry*, **1** (1) : 97-105.

Nurjanah, NN., 2008. *Studi Karakter Agronomi pada 17 Akses Pegagan (Centella asiatica (L.) Urban)*. Institut Pertanian Bogor.

Nusslein, VC., & Dahm, 2002. *Zebrafish*. Oxford University Press.

Palar, H., 2004. *Pencemaran dan Toksikologi Logam Berat*. Jakarta : Rineka Cipta.

Pachauri, V., Saxena, G., Mehta, A., Mishra, D., Flora, S.J., 2009. Combinational Chelation Therapy Abrogates Lead-Induced Neurodegeneration in Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **240** : 255–264.

Patnaik, P., 2003. *Handbook of Inorganic Chemicals*. US : McGraw-Hill.

Patra, R.C., Rautray A. K., & Swarup, D., 2011. Oxidative Stress in Lead and Cadmium Toxicity and Its Amelioration. *Veterinary Medicine International : A. Review*, **2011** : 1-9.

Peng, TI., & Jou, MJ., 2010. Oxidative Stress Caused by Mitochondrial Calcium Overload. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, **1201** (1) : 183-188.

Peterson, S. M., Zhang, J., Weber, G., & Freeman, J. L. 2011. Global Gene Expression Analysis Reveals Dynamic and Developmental Stage-Dependent Enrichment of Lead-Induced Neurological Gene Alterations. 2011. *Environmental Health Perspectives*, **119** (5) : 615- 621.

Pietta, PG., 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, **63** : 1035–1042.

Rahman, M., Hossain, S., Rahaman, A., Fatima, N., Nahar, T., & Uddin, B., 2013. Antioxidant activity of *Centella asiatica* (Linn.) Urban : Impact of Extraction Solvent Polarity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **1** (6) : 27-32.

Richetti, SK., Rosemberg, DB., Ventura-Lima, J., Monserrat, JM., Bogo, MR., & Bonan, CD., 2010. Acetylcholinesterase Activity and Antioxidant Capacity of Zebrafish Brain is Altered by Heavy Metal Exposure. *Neurotoxicology*, **32** : 116-122.

Richards, JG., 2011. *Bony Fishel Zebrafish*. University of British Columbia.

Roy, A., Ettinger AS., Hu, H., Bellinger, D., Schwartz, J., Modali, R., et. al., 2013. Effect modification by Transferrin C2 polymorphism on lead exposure, hemoglobin levels, and IQ. *Neurotoxicology*, **38** : 17-22

Sakai, T., 2000. Biomarkers of Lead Exposure. *Industrial Health*, **38** : 127–142.

Sanders, T., Liu, Y., Buchner, V., & Tchounwou, P.B., 2009. Neurotoxic Effects and Biomarkers of Lead Exposure : A Review. *Review on Environmental Health*, **24** (1) : 15-45.

She, J.Q., Wang, M., Zhu, D.M., Tang, M., Chen, J.T., Wang, L., et. al., 2009. Monosialoanglioside (GM1) Prevents Lead-Induced Neurotoxicity on Long-Term Potentiation, SOD Activity, MDA Levels, and Intracellular Calcium Levels of Hippocampus in Rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **379** : 517–524.

Sorribes, A., Porsteinsson, H., Arnardottir, H., Jaohannesdottir, IP., Sigurgeirsson, B., de Polavieja, GG., et. al., 2013. The Ontogeny of Sleep-Wake Cycles in Zebrafish : a Comparison to Humans. *Frontiers in Neural Circuits*, **7** : 178.

Spence R., Gerlach, G. Lawrence, C., & Smith C., 2008. The Behavior and Wcology of Zebrafish, *Dano rerio*. *Biological Reviews*, **83** (1) : 13-34.

Stojanovic, T., Orlova, M., Sialana, FJ., Hoger, H., Stuchlik, S., Milenkovic, I., et. al., 2017. Validation of Dopamine Receptor DRD1 and DRD2 Antibodies Using Receptor Deficient Mice. *Amino Acids*, **49** (6) : 1101-1109.

Strykowski, JL., & Schech, JM., 2015. Effectiveness of Recommended Euthanasia Methods in Larva Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, **54** (1) : 81-84.

Subban, R., Veerakumar, A., Manimaran, R., Hashim, KM., & Balachandran, I., 2008. Two new flavonoids from *Centella asiatica* (Linn.) J. Nad. Med, **62** (3) : 369–373.

Sulastry, F. 2009. Uji Toksisitas Akut yang Diukur dengan Penentuan LD50 Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) Terhadap Mencit Balb/C. Universitas Dipenegoro, Thesis.

Susanti, R., Mustikaningtyas, D., & Sasi, F. A. 2014. Analisa Kadar Logam Berat pada Sungai di Jawa Tengah. *Saintekno*, **12** (1) : 35-40.

Tang, N., & Zhu, ZQ., 2003. Adverse Reproductive Effects in Female Workers of Lead Battery Plants. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, **16** (4) : 359–361.

Tchernitchin, AN., Gaete, L., Bustamante, R., & Baez, A., 2011. Effect of Prenatal Exposure to Lead on Estrogen Action in the Prepubertal Rat Uterus. *ISRN Obstetrics and Gynecology*, **2011** : 1-8.

Thirumalai, V., & Cline, HT., 2008. Endogenous Dopamine Suppresses Initiation of swimming in Prefeeding Zebrafish Larvae. *J. Neurophysiol* **100** (3) : 1635-1648.

Thomas, J.C., 2019, Embryology Zebrafish Development. Cite this page: Hill, MA (2019, January 21). Available from : [https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Zebrafish\\_Development](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Zebrafish_Development).

Thorsen, DH., Cassidy, JJ., and Hale, ME., 2004. Swimming of Larval Zebrafish : Fin-Axis Coordination and Implication for Function and Neural Control. *J. Exp. Biol.*, **207** : 4175-4183.

Toscano, CD., & Guilarte, TR., 2005. Lead neurotoxicity: From exposure to molecular effects. *Brain Research Reviews*. Elsevier, **49** : 529 – 554.

Tu, H., Fan, C., Chen, X., Liu, J., Wang, B., Huang, Z., et. al., 2017. Effects Of Cadmium, Manganese And Lead On Locomotor Activity And Neurexin2a Expression In Zebrafish. *Environ Toxicol Chem*, **36** (8) : 2147-2154.

Valera, EM., Faraone, SV., Murray, KE., & Seidman, LJ., 2007. Meta-analysis of Structural Imaging Findings in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biological Psychiatry*, **61** : 1361-1369.

Vaya, J., & Aviram, M., 2000. Nutritional Antioxidants Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications. *Curr Med Chem-Immunol Endo Metabolic Agents*, **1** : 99–117.

Vaziri, N.D & Khan, M., 2007. Interplay of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in The Pathogenesis of Experimental Lead Induced Hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*; **34** (9) : 920-925.

Vaziri, N.D., 2008. Mechanisms of Lead-Induced Hypertension and Cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; **295** : H454 – H465.

Venkareddy, L.K. & Muralidhara, 2015. Potential of Casein as a Nutrient Intervention to Alleviate Lead (Pb) Acetat-Mediated Oxidative Stress and Neurotoxicity : First Evidence in Drosophila Melanogaster. *Neurotoxicology*; **48** (2015) : 142 – 151.

Verstraeten, S.V., Aimo, L., & Oteiza, P.I., 2008. Aluminium and Lead : Molecular Mechanisms of Brain Toxicity. *Arch Toxicol* (2008) **82** : 789-802

Wani, A.L., Ara, A., & Usmani, J.A., 2015. Lead Toxicity : a Review. *Interdisciplinary Toxicology : A. Review. PubMed Central*, **8** (2) : 55–64.

Wang, X., & Seed, B., 2003. A PCR Primer Bank for Quantitative Gene Expression Analysis. *Nucleic Acids Research*, **31** (24): e154; 1-8.

Widowati, W., Sastiono, A., & Jusuf, R., 2008. *Efek Toksik Logam Pencegahan dan Penanggulangan Pencemaran*. Yogyakarta : ANDI.

Wijayanti, A. R., Ali, M., & Khotimah, H. 2016. Proteksi Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) Melalui Ekspresi *Hsp60* dan *Bax* terhadap Model *Stunting* Larva Zebrafish (*Danio rerio*) yang diinduksi Rotenon. (Tesis). Universitas Brawijaya.

Willcox, JK., Ash, SL., & Catignani, GL., 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **44** : 275–295.

Winarto, IW., & Surbakti, IM., 2003. *Khasiat & Manfaat Tanaman Penambah Daya Ingat*. Agromedia.

WHO. *Childhood lead poisoning*. Switzerland : WHO Press; 2010. P. 11 -12

Yang, X., Wang, B., Zeng, H., Cai, C., Hu, Q., Cai, S., Xu, L., Meng, X., & Zou, F., 2014. Research Report : Role of The Mitochondrial  $Ca^{2+}$  Uniporter in  $Pb^{2+}$ -Induced Oxidative Stress in Human Neuroblastoma Cells. *Brain Research*, **1575** : 12-21.

Zainol, NA., Voo, SC., Sarmidi, MR., & Aziz, RA., 2008. Profiling of *Centella Asiatica* (L.) Urban Extract. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, **12** (2) : 322 -327.

Zhang, G.S., Ye, W.F., Tao, R.R., Lu, Y.M., Shen, G.F., Fukunaga, K., et. al., 2012. Expression Profiling of  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-Dependent Signaling Molecules in the Rat Dorsal and Ventral Hippocampus After Acute Lead Exposure. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **64** : 619–624.

Zhu, B., Wang, Q., Shi, X., Guo, Y., Xu, T., et. al., 2015. Effect of Combined Exposure to Lead and Decabromodiphenyl Ether on Neurodevelopment of Zebrafish Larvae. *Chemosphere*, **144** (2016) : 1646 – 1654.