

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP LOKOMOTOR,
OSIFIKASI TULANG KERAS, EKSPRESI SIRT 1 DAN
APOPTOSIS PADA LARVA ZEBRAFISH YANG
DIPAPAR TIMBAL (Pb)**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



OLEH :
FITRIA EDNI WARI
176070400111015

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




TESIS


**PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP LOKOMOTOR,
OSIFIKASI TULANG KERAS, EKSPRESI SIRT 1 DAN
APOPTOSIS PADA LARVA ZEBRAFISH YANG
DIPAPAR TIMBAL (Pb)**

Oleh :
FITRIA EDNI WARI
176070400111015

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

KOMISI PEMBIMBING


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


Prof. Dr. dr. M. Mullohadi Ali, SpFK
NIK. 171047692
Anggota

Malang, 30 JUL 2019
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,


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

TESIS

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN
(*Centella asiatica*) TERHADAP LOKOMOTOR,
OSIFIKASI TULANG KERAS, EKSPRESI SIRT 1 DAN
APOPTOSIS PADA LARVA ZEBRAFISH YANG
DIPAPAR TIMBAL (Pb)**



Oleh :
FITRIA EDNI WARI
176070400111015

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

KOMISI PENGUJI

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

Prof. Dr. dr. M. Muliohadi Ali, SpFK
NIK. 171047692
Anggota Penguji

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

dr. Brigitta Ida RVC, SpA(K), M.Kes
NIP. 197810162014102001
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 : Fitria Edhi Wari
NIM : 176070400111015
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran UB



*Karya ilmiah ini kutujukan kepada
Keluarga tercinta
Suami dan anakku tersayang
Fitria dan Serka. Antok S*

RINGKASAN

Fitria Edni Wari

Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Lokomotor, Osifikasi Tulang Keras, Ekspresi SIRT 1 dan Apoptosis pada Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb), Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Ketua Komisi Pembimbing: Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes ; Anggota: Prof. Dr. dr. Mohammad Muljohadi Ali, SpFK.

Paparan bahan kimia beracun pada awal kehidupan menjadi penyebab penting terjadinya penyakit dan gangguan perkembangan saraf. Paparan timbal yang memiliki dampak tidak terlihat pada orang dewasa dapat mempengaruhi perkembangan anak secara permanen. Kadar timbal (Pb) pada ibu hamil yang tinggal di daerah pantai melebihi ambang batas yang ditentukan oleh *Centers for Disease Controls and Prevention* (CDC) yaitu 5,0 µg/dL dengan nilai rata-rata 19,74 µg/dL. Mekanisme neurotoksisitas yang dipicu oleh timbal (Pb) sangatlah kompleks seperti peningkatan stres oksidatif, perubahan bio-fisika membran, deregulasi pensinyalan sel, dan kerusakan neurotransmisi. Peningkatan ROS menyebabkan kerusakan *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA), enzim, protein dan lipid. Hal ini menyebabkan penurunan antioksidan (superoksida dismutase, glutathione peroxidase dan glutathione reductase) dalam otak (hippocampus, korteks), menurunkan ekspresi SIRT1 (Sirtuin 1) dan meningkatkan apoptosis. Apoptosis dapat terjadi pada sel neuron motorik yang mengganggu pada saat embriogenesis seperti malformasi, disfungsi organ dan pada tahap selanjutnya terjadi gangguan fungsi motorik selain itu apoptosis pada osteoblas dan osteosit juga dapat mempengaruhi osifikasi tulang. *Centella asiatica* memiliki potensi menurunkan produksi ROS, meningkatkan antioksidan endogen yang berperan penting dalam perlindungan dopamin dengan cara menurunkan apoptosis pada neuron dopaminergik, menghambat caspase-9 pada apoptosis. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap gangguan lokomotor dan osifikasi tulang keras melalui peningkatan ekspresi SIRT 1 (Sirtuin 1) dan penurunan apoptosis pada larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).

Jenis penelitian ini adalah eksperimen murni dengan desain *post test only control group design*. Sampel penelitian menggunakan zebrafish usia 0-6 dpf dengan 5 kelompok yaitu kontrol, timbal 2,5 ppm dan kelompok perlakuan (P1, P2, P3) yang diberikan timbal dan pegagan dengan konsentrasi 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL dan 5 µg/mL mulai 2 hpf–3 dpf. Lokomotor diperiksa pada saat larva zebrafish usia 4-6 dpf, osifikasi tulang keras usia 6 dpf dengan pewarnaan alizarin red dan diukur dengan *Image J V1.50*, ekspresi SIRT 1 dengan pemeriksaan *Reverse Transcription* PCR dan pemeriksaan apoptosis dengan pewarnaan acridine orange, difoto dengan mikroskop fluorescence FSX 100 kemudian dianalisa dengan *Image J V1.50*. Analisa statistik dengan *one way ANOVA* dan dilanjutkan uji *Post Hoc* Tukey HSD dan uji korelasi pearson.

Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan signifikan lokomotor zebrafish usia 4, 5 dan 6 dpf dengan semua kelompok ($p=0,005$, $p=0,000$, dan $p=0,000$), pemberian timbal dan pegagan dengan konsentrasi 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL dan 5 µg/mL dapat meningkatkan lokomotor dan terdapat hubungan positif dan kuat antara ekstrak etanol pegagan dengan lokomotor usia 6 dpf (0,706). Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) meningkatkan *Glutathion* yang merupakan antioksidan dan menurunkan rasio Bcl 2/Bax sehingga mencegah apoptosis neuron dopaminergik, meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase melalui peningkatan *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF). Terdapat perbedaan signifikan pada osifikasi tulang keras dengan semua kelompok ($p=0,009$) dan terdapat hubungan positif dan kuat antara ekstrak etanol pegagan dengan osifikasi tulang keras (0,685). Kelompok flavonoid dalam pegagan merangsang diferensiasi osteogenik osteoblas, menghambat resorpsi tulang dan apoptosis osteoklas. Asiaticoside menghambat pembentukan osteoklas yang diinduksi oleh RANKL dan resorpsi tulang melalui NFATc1 dan NFkB. Kalsium pada pegagan dapat merangsang proliferasi dan diferensiasi osteoblas.

Pemberian pegagan dosis 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL dan 5 µg/mL secara signifikan meningkatkan ekspresi SIRT 1 ($p=0,040$) dan signifikan menurunkan apoptosis pada bagian badan (kepala sampai anus) zebrafish ($p=0,001$). Terdapat hubungan positif dan kuat antara ekstrak etanol pegagan dengan ekspresi SIRT 1 (0,605) dan hubungan negatif yang kuat antara ekstrak etanol pegagan dengan apoptosis (-0,607). Pegagan berperan sebagai stimulator SIRT 1 sehingga dengan peningkatan ekspresi SIRT 1 dapat menghambat apoptosis melalui deasetilasi p 53 dan induksi MnSOD.

Kesimpulan dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan lokomotor, osifikasi tulang keras, ekspresi SIRT 1 dan dapat menurunkan apoptosis pada larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).



SUMMARY

Fitria Edni Wari

The Effect of Ethanolic Extract Pegagan (*Cantella asiatica*) on Locomotor, Bone Ossification, Expression of SIRT 1 and Apoptosis on Lead-Induced Zebrafish Larvae. Master Study Program in Midwifery, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. The Chair of the Supervisory Commission: Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes ; Member: Prof. Dr. dr. Mohammad Muljohadi Ali, SpFK.

The toxic chemicals exposures at early life is the main cause of diseases and neurodevelopment disorders. Lead exposure which has invisible impact on parents might affect their child's development permanently. The lead levels (Pb) on pregnant women lived in the coastal area has exceeded beyond threshold which is determined by the Centers for Disease Controls and Prevention (CDC) which is 5,0 µg/dL with 19,74 µg/dL as the average value. The mechanism of lead (Pb) triggered neurotoxicity is very complex such as increased oxidative stress, changes in membrane bio-physics, deregulation of cell signaling, and damage to neurotransmission. Increased ROS causes damage to Deoxyribo Nucleic Acid (DNA), enzymes, proteins and lipids. This causes a decrease in antioxidants (superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase) in the brain (hippocampus, cortex), decreases expression of SIRT 1 (Sirtuin 1) and increases apoptosis. Apoptosis can occur in motor neuron cells. Which interferes with embryogenesis such as malformation, organ dysfunction and at a later stage motor impairment occurs in addition to apoptosis in osteoblasts and osteocytes can also affect bone ossification. *Centella asiatica* has the potential to reduce the ROS production, increase endogenous antioxidants which play an important role in the protection of dopamine by reducing apoptosis in dopaminergic neurons, inhibiting caspase-9 in apoptosis. This study aims to verify the effect of Ethanolic extract Pegagan (*Centella asiatica*) on locomotor disorders and bone ossification through increased expression of SIRT 1 (Sirtuin 1) and decreased apoptosis on lead induce zebrafish larvae.

This research was true experiment with *post - test only control group design*. Sample of this study used zebrafish aged 0-6 dpf with 5 groups including control, 2,5 ppm of lead group and treatment groups (P1,P2,P3) which got lead and concentration of *Centella asiatica* 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL and 5 µg/mL started from 2 hpf–3 dpf. Locomotor was examined when larvae aged 4-6 dpf, bone ossification at 6 dpf with alizarin red stained and measured with Image J V1.50, expression of SIRT 1 with Reverse Transcription PCR examination and apoptosis examination with acridine orange stained, photographed with using FSX 100 fluorescent microscope then analyzed with image J V1.50. Statistical analysis with one way ANOVA and continued Tukey HSD Post Hoc test and Pearson Correlation Test.

The result of this research showed that there were significant differences of zebrafish locomotor between ages of 4, 5 and 6 dpf of all groups ($p=0,005$, $p=0,000$, and $p=0,000$), administration of 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL and 5 µg/mL of ethanolic extract *Centella asiatica* increased locomotor at 6 dpf (0,706). The ethanolic extract of Pegagan (*Centella asiatica*) increased the Glutathione which is an antioxidant and decreases the ratio of Bcl 2/Bax to prevent apoptosis of dopaminergic neurons, increases the expression of tyrosine hydroxylase through an increasing the Brain – Derived Neurotrophic Factor (BDNF). There were significant differences between bone ossification with all groups ($p=0,009$) and there was a positive and strong relationship between *Centella asiatica* ethanolic extract and bone ossification (0,685). The flavonoid groups in *Centella asiatica* stimulates stimulates osteogenic differentiation of osteoblasts, inhibits bone resorption and osteoclast apoptosis. Asiaticoside inhibits osteoclast formation induced by RANKL and bone resorption through NFATc1 and NFkB. Calcium in pegagan can stimulate proliferation and differentiation of osteoblasts.

The concentration of pegagan 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL and 5 µg/mL significantly increased SIRT 1 expression ($p=0,040$) and significantly reduced apoptosis on the

zebrafish body parts (Head to anal) ($p=0,001$). There was a positive and strong relationship between ethanolic extract pegagan and SIRT 1 (0,605), and a strong negative relationship between ethanolic extract pegagan and apoptosis (-0.607). Pegagan acts as a stimulator of SIRT 1 so that the increased expression of SIRT 1 can inhibit apoptosis through deacetylation of p 53 and the induction of MnSOD.

The conclusions in this study are the administration of ethanolic extract *Centella asiatica* can increase locomotor, bone ossification, expression of SIRT 1 and can reduce apoptosis on lead induce zebrafish larvae.



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul **“Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Lokomotor, Osifikasi Tulang Keras, Ekspresi SIRT 1 dan Apoptosis pada Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb)”** sebagai salah satu prasyarat memperoleh gelar Magister Kebidanan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Dengan selesainya tesis ini penulis menyampaikan rasa hormat dan ucapan 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 selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med, SpA(K) selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, atas izin yang diberikan selama penulis menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Bambang Rahardjo, SpOG(K) selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes selaku ketua komisi pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan masukan selama proses penyusunan tesis ini.

5. Prof. Dr. dr. Mohammad Muljohadi Ali, SpFK selaku anggota pembimbing yang telah memberikan ide penelitian, bimbingan atas ilmu, dukungan, nasihat, motivasi, serta bantuan selama penyusunan tesis ini.
6. Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes selaku penguji I dan yang telah memberikan ide, ilmu, arahan, dan motivasi dalam penyusunan tesis ini.
7. dr. Brigitta Ida RVC, SpA(K), M.Kes selaku penguji II yang telah meluangkan waktu dan juga memberikan masukan untuk perbaikan penyusunan tesis ini.
8. Keluarga yang telah memberikan dukungan, do'a dan motivasi dalam menyelesaikan tesis ini.
9. Seluruh dosen Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas ilmu dan wawasan yang telah diberikan.
10. Seluruh pihak yang telah membantu proses penyusunan tesis ini.

Penulis berusaha dengan segenap kemampuan dan pengetahuan yang dimiliki agar tesis ini menjadi sempurna, namun sangat disadari bahwa masih banyak kekurangan dan keterbatasan sehingga kritik dan saran diharapkan agar tesis ini dapat lebih baik dan bermanfaat dalam menunjang perkembangan keilmuan dan peningkatan pelayanan kebidanan terhadap masyarakat luas.

Malang, Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS.....	Error! Bookmark not defined.
HALAMAN PERUNTUKAN.....	v
RINGKASAN.....	vi
SUMMARY.....	viii
KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
DAFTAR SINGKATAN.....	xix
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	7
1.4.2 Manfaat Praktis.....	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Timbal.....	8
2.1.1 Karakteristik.....	8
2.1.2 Timbal (II) Asetat.....	8
2.1.3 Paparan dan Sumber Timbal (Pb).....	9
2.1.4 Farmakokinetik Timbal (Pb).....	11
2.1.5 Mekanisme Timbal (Pb) Masuk Kedalam Otak.....	15
2.1.6 Mekanisme Toksisitas Timbal (Pb).....	16
2.2 SIRT 1.....	22
2.2.1 Definisi SIRT 1.....	22
2.2.2 Lokasi SIRT 1.....	22
2.2.3 Pentingnya SIRT 1.....	23
2.2.4 SIRT 1 di Otak.....	23
2.2.5 Faktor yang meningkatkan SIRT 1.....	25
2.2.6 Peran SIRT 1 dalam Metabolisme Tubuh.....	25
2.2.7 SIRT 1 dan Oksidatif Stres.....	26





2.3 Apoptosis	28
2.3.1 Pengertian	28
2.3.2 Mekanisme Apoptosis	28
2.3.3 SIRT 1 dan Apoptosis	31
2.4 Aktivitas Lokomotor	32
2.5 Osifikasi Tulang Keras	35
2.6 Hubungan Apoptosis, SIRT 1, Lokomotor dan Osifikasi Tulang Keras	37
2.7 Embryogenesis	38
2.7.1 Pengertian	38
2.7.2 Tahapan Embriogenesis	38
2.8 Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	41
2.8.1 Deskripsi Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	41
2.8.2 Morfologi Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	42
2.8.3 Kandungan Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	43
2.8.4 Manfaat Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	45
2.8.5 Keamanan dan Dosis Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	48
2.8.6 Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) dan Osifikasi Tulang	49
2.9 Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	49
2.9.1 Klasifikasi	49
2.9.2 Karakteristik Zebrafish	50
2.9.3 Perkembangan zebrafish	52
2.9.4 Perawatan Zebrafish	53
2.9.5 Zebrafish sebagai model penelitian	54
BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN	56
3.1 Kerangka Teori	56
3.2 Kerangka Konsep	57
3.3 Penjelasan Kerangka Konsep	58
3.4 Hipotesis	59
BAB 4 METODE PENELITIAN	60
4.1 Jenis dan Desain Penelitian	60
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian	60
4.2.1 Populasi	60
4.2.2 Besar Sampel	60
4.2.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	61
4.3 Tempat dan Waktu Penelitian	61
4.3.1 Tempat Penelitian	61
4.3.2 Waktu Penelitian	62
4.4 Bahan dan Alat	62
4.5 Variabel Penelitian	63
4.5.1 Variabel <i>Independent</i>	63
4.5.2 Variabel <i>Dependent</i>	63
4.5.3 Variabel Kendali	63
4.6 Definisi Operasional	64
4.7 Prosedur Penelitian	65
4.8 Alur Penelitian	74
4.9 Analisis Data	75
BAB 5 HASIL PENELITIAN	76
5.1 Pengaruh Ekstrak Etanol pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap Lokomotor Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb)	76

5.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap Osifikasi Tulang Keras Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).....	80
5.3 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap Ekspresi SIRT 1 Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).....	83
5.4 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap Apoptosis Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).....	86
5.5 Hubungan Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap Lokomotor, Osifikasi Tulang Keras, Ekspresi SIRT 1 dan Apoptosis pada Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).....	89
BAB 6 PEMBAHASAN	90
6.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap Lokomotor Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).....	90
6.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap Osifikasi Tulang Keras Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).....	92
6.3 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap Ekspresi SIRT 1 Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).....	96
6.4 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap Apoptosis Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).....	99
6.5 Hubungan Ekstrak Etanol Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap Lokomotor, Osifikasi Tulang Keras, Ekspresi SIRT 1 dan Apoptosis pada Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).....	102
6.6 Implikasi Hasil Penelitian dalam Asuhan Kebidanan.....	103
6.7 Keterbatasan Penelitian.....	105
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	106
7.1 Kesimpulan.....	106
7.2 Saran.....	106
DAFTAR PUSTAKA	107
LAMPIRAN	124
RIWAYAT HIDUP	153

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1	Karakteristik Timbal Asetat	9
Tabel 2. 2	Kandungan Nutrisi dalam <i>Centella asiatica</i>	45
Tabel 2. 3	Klasifikasi Zebrafish	50
Tabel 2. 4	Tahap Perkembangan Zebrafish	52
Tabel 4. 1	Definisi Operasional	64
Tabel 4. 2	Konsentrasi Timbal dan Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	68
Tabel 5. 1	Hasil Perbandingan Rerata Osifikasi Tulang Keras Larva Zebrafish Usia 6 dpf pada Semua Kelompok.	81
Tabel 5. 2	Hasil Perbandingan Rerata Ekspresi SIRT 1 Larva Zebrafish Usia 6 dpf pada Semua Kelompok.	83
Tabel 5. 3	Hasil Perbandingan Rerata Apoptosis Larva Zebrafish Usia 3 dpf pada Semua Kelompok.....	87
Tabel 5. 4	Hasil Uji Hubungan Pegagan dengan Lokomotor, Osifikasi Tulang Keras, Ekspresi SIRT 1 dan Apoptosis.	89



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Target Molekuler dari Timbal..... 17

Gambar 2. 2 Mekanisme Timbal Masuk Kedalam Sel..... 19

Gambar 2. 3 Representasi Skematik dari Timbal di Daerah Sinaptik Hipocampal..... 21

Gambar 2. 4 Lokasi Seluler SIRT 1 di Seluler Mamalia..... 23

Gambar 2. 5 Lokalisasi Seluler dan Peran SIRT 1 dalam Sistem Saraf 24

Gambar 2. 6 Jenis Kematian Sel dan Ciri Morfologisnya..... 28

Gambar 2. 7 Aktivasi Jalur Mitokondria (Intrinsik) dari Apoptosis Oleh ROS 30

Gambar 2. 8 Skematik Fungsi SIRT 1 pada Apoptosis yang Diinduksi ROS..... 32

Gambar 2. 9 Contoh Protokol Penilaian *Pattern* Lokomotor Larva Zebrafish..... 35

Gambar 2. 10 Perkembangan Zigot Tahap Dua Sel ke Tahap Morula Akhir..... 39

Gambar 2. 11 Gambar Blastokista 40

Gambar 2. 12 Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)..... 41

Gambar 2. 13 Bagian dari Pegagan (*Centella asiatica*)..... 42

Gambar 2. 14 Karakteristik Zebrafish Jantan dan Betina 50

Gambar 3. 1 Kerangka Teori..... 56

Gambar 3. 2 Kerangka Konsep 57

Gambar 4. 1 Gambar Pola Kertas untuk Pengukuran Lokomotor..... 63

Gambar 4. 2 Alur Penelitian..... 74

Gambar 5. 1 Pola Lokomotor Zebrafish Usia 4, 5 dan 6 dpf Menggunakan M-Track J pada Semua Kelompok..... 76

Gambar 5. 2 Perbandingan Rerata Lokomotor Zebrafish Usia 4, 5 dan 6 dpf pada Semua Kelompok..... 77

Gambar 5. 3 Grafik Lokomotor Zebrafish yang Dipapar Timbal dan Pegagan (*Centella asiatica*) Usia 4, 5 dan 6 dpf pada Semua Kelompok..... 78



Gambar 5. 4 Representasi Osifikasi Tulang Keras Larva Zebrafish Usia 6 dpf dengan Pewarnaan *Alizarin Red* pada Semua Kelompok.....80

Gambar 5. 5 Rerata Osifikasi Tulang Keras Larva Zebrafish Usia 6 dpf Menggunakan Software *Image J* pada Semua Kelompok.....81

Gambar 5. 6 Hasil Gradient Elektroforesis Ekspresi SIRT 1 (Gb.A) dan Beta Actin (Gb.B) pada Larva Zebrafish Semua Kelompok.....83

Gambar 5. 7 Rerata Ekspresi SIRT 1 Larva Zebrafish Usia 6 dpf dengan Pemeriksaan RT-PCR pada Semua Kelompok.....84

Gambar 5. 8 Foto Fluorescence Apoptosis Menggunakan Pewarnaan *Acridine Orange* pada Larva Zebrafish Usia 3 dpf pada Semua Kelompok.....86

Gambar 5. 9 Perbedaan *Total Fluorescence Signal* Apoptosis Daerah Badan dan Ekor Usia 3 dpf pada Semua Kelompok.....88



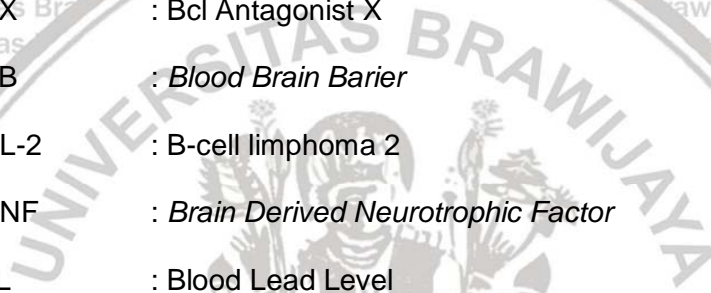
DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Keterangan Surat Kelayakan Etik.....	124
Lampiran 2 Surat Keterangan Bebas Plagiasi.....	125
Lampiran 3 Bukti Jurnal Terpublikasi.....	126
Lampiran 4 Sertifikat Zebrafish.....	127
Lampiran 5 Determinasi Tanaman Pegagan.....	128
Lampiran 6 Alur Ekstraksi Pegagan.....	129
Lampiran 7 Pembuatan Larutan Timbal.....	130
Lampiran 8 Hasil Analisa Statistik.....	131
Lampiran 9 Rekapitulasi Data Hasil Penelitian.....	144
Lampiran 10 Cara Menggunakan <i>Image J</i> Osifikasi Tulang.....	146
Lampiran 11 Cara Menggunakan <i>Image J</i> Apoptosis.....	148
Lampiran 12 Cara Menggunakan M-Track J.....	150
Lampiran 13 Dokumentasi Penelitian.....	152



DAFTAR SINGKATAN

- ALA : δ-aminolevulinic Asam
- ALAD : δ-aminolevulinic Acid Dehidratase
- ALAS : Asam Aminolevulinic Sintetase
- AMPK : AMP-Activated Protein Kinase
- APO3L : Apo3 Ligand
- ATP : Adenosina trifosfat
- ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry
- BAX : Bcl Antagonist X
- BBB : *Blood Brain Barier*
- BCL-2 : B-cell limphoma 2
- BDNF : *Brain Derived Neurotrophic Factor*
- BLL : Blood Lead Level
- Ca²⁺ : Calcium
- CaCl : Calcium chloride
- CaM : Calmodulin
- CDC : *Centers for Disease, Controls and Prevention*
- CPG : *Central Pattern Generator*
- Cu : Cuprum
- DAG : Diacylglycerol
- DNA : *Deoxyribonucleic Acid*
- DMT1 : Divalent Metal Transporter 1
- DR : *Death Receptor*
- EPA : *Environmental Protection Agency*
- FasL : *Fatty Acid Synthetase Ligand*
- FasR : *Fatty Acid Synthetase Receptor*



FDA : *Food and Drug Administration*

Fe²⁺ : Ferrous

Foxo : Forkhead O

GAPDH : *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GSH : *Glutathione*

GSHPx : *Glutathione Peroxidase*

GSSG : *Glutathione disulfide*

GSSH : *Glutathione Disulfide*

H₂O₂ : *Hydrogen Peroxide*

HDAC : *Histone deacetylase*

IGF 1 : *Insulin-like growth factor 1*

IL 6 : *Interleukin 6*

IP3 : *Inositol Triphosphate*

JNK : *C-Jun N-terminal kinase*

KCl : *Kalium klorida*

KOH : *Kalium Hidroksida*

LD50 : *Lethal Dose, 50%*

LXR : *Liver X Receptor*

MDA : *Malondialdehyde*

Mg²⁺ : *Magnesium*

MgSO₄ : *Magnesium sulfate*

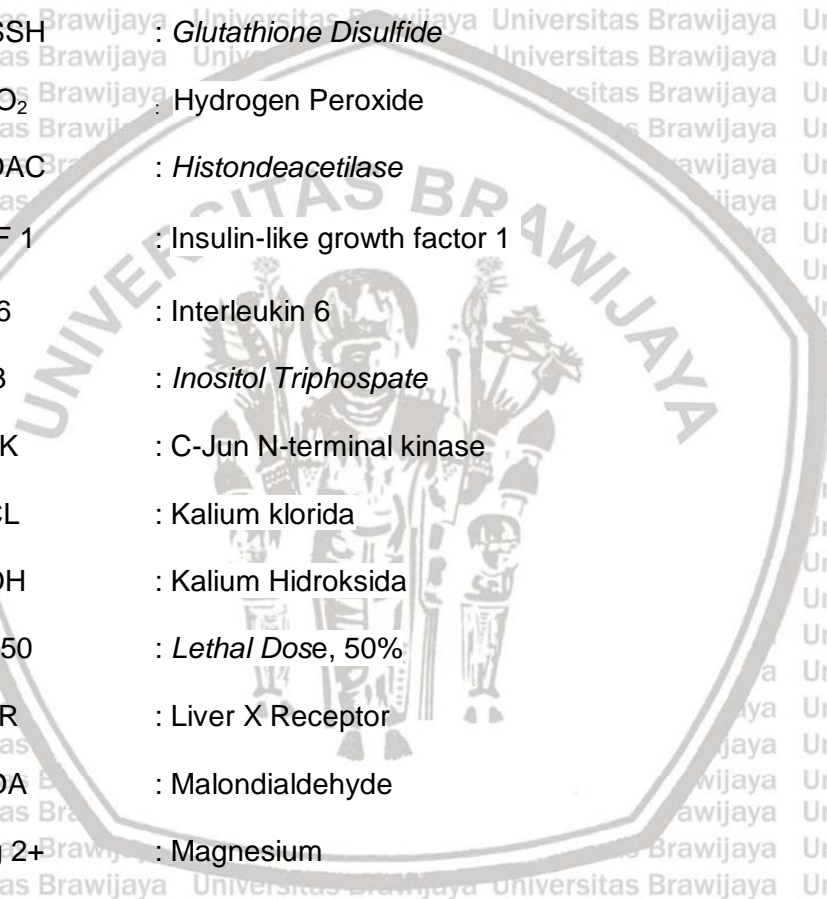
MKPs : *MAP Kinase Phosphatase*

MLR : *Mesencephalic Locomotor Region*

MnSOD : *Manganese Superoxide Dismutase*

mRNA : *Messenger RNA*

NaCl : *Natrium Klorida*



- NAD : *Nicotinamide Adenosine Dinucleotide*
- NAMPT : *Nicotinamide Phosphoribosyltransferase*
- NFATc1 : *Nuclear Factor of Activated T cells*
- NF- κ B : *Nuclear Factor Kappa B*
- NMDA : *N-Methyl-D-Aspartase*
- n-NOS : *Nitrat Oksida Sintase*
- NO : *Nitrite Oxide*
- NOAEL : *No Observed Adverse Effect Level*
- NR2 : *NMDA Reseptor*
- OMM : *Outer Mitochondrial Membrane*
- PARP-1 : *Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1*
- Pb : *Plumbum*
- PCD : *Programmed Cell Death*
- PGC-1 α : *Peroxisome Proliferator Acivated Reseptor γ Coactivator-1 α*
- PIP2 : *Phospotidylinositol 4,5-bisphospate*
- PLC : *Phospolipase C*
- Ppm : *Part per Million*
- PPAR γ : *Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma*
- PTH : *Parathyroid Hormone*
- PUMA : *p53 Upregulated Modulator of Apoptosis*
- RANKL : *Receptor Activator Nuclear Kappa β Ligan*
- ROS : *Reaktif Oksigen Spesies*
- SIRT 1 : *Sirtuin 1*
- SOD : *Super Oksida Dismutase*
- SSP : *Sistem Saraf Pusat*
- TLR 4 : *Toll Like Receptor 4*
- TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TNFR1 : Tumor Necrosis Factor Receptor 1



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Paparan bahan kimia beracun pada awal kehidupan menjadi penyebab penting terjadinya penyakit dan gangguan perkembangan saraf. Ukuran janin yang kecil dan kondisi perkembangan yang belum matang lebih rentan terhadap racun lingkungan selama periode prenatal daripada periode lainnya. Paparan zat seperti timbal yang memiliki dampak minimal atau tidak terlihat pada orang dewasa dapat mempengaruhi perkembangan anak secara permanen (Moore *et al.*, 2017).

Timbal (Pb) termasuk logam beracun yang memiliki distribusi luas. Penggunaan timbal (Pb) banyak dimanfaatkan dalam pembuatan cat, keramik, amunisi, pipa air, solder, kosmetik, pewarna rambut, peralatan pertanian, pesawat terbang, perisai untuk mesin x-ray, dan dalam pembuatan bahan tahan korosi dan asam yang digunakan dalam gedung industri (Sanders *et al.*, 2010). Berdasarkan penelitian Juliana *et al.*, (2017) menunjukkan kadar timbal (Pb) pada ibu hamil yang tinggal di daerah pantai melebihi ambang batas yang ditentukan oleh *Centers for Disease Controls and Prevention* (CDC) yaitu 5,0 µg/dL dengan rerata sebesar 19,74 µg/dL. Hasil analisis kandungan timbal di air dan sedimen sungai badek Kelurahan Ciptomulyo Kecamatan sukun Kota Malang sebesar 0,17-0,21 ppm dan 1,14-1,89 ppm melampaui batas baku menurut PP Nomor 82 tahun 2001 yaitu 0,03 ppm (Widyastuti, 2017), sedangkan data cemaran timbal di beberapa sungai di Jawa Tengah sebesar 13,89 ppm, jauh dari nilai ambang batas yang ditetapkan Kementerian Lingkungan Hidup sebesar 0,05 ppm dan *World Health Organization* sebesar 0,1 ppm (Susanti, 2014). Kadar timbal (Pb) udara ambien di daerah perindustrian Kota Malang

pada tahun 2017 menunjukkan jumlah yang lebih tinggi dibandingkan Kab/Kota lain di Jawa Timur yaitu $0,8 \mu\text{g}/\text{Nm}^3$ (DLH Pemprov Jatim, 2017). Berdasarkan penelitian Pratiwi *et al.*, (2018) masih terdapat kadar timbal (Pb) yang melebihi batas maksimum Badan Pengawas Obat dan Makanan RI No HK.00.06.1.52.4011 pada beberapa makanan dan minuman seperti tepung terigu, sayur kubis, ikan nila, tiram, kerang hijau, minuman ringan berkarbonisasi.

Program pencegahan keracunan timbal pada anak yang dicanangkan oleh CDC berkomitmen pada tahun 2020 untuk menghilangkan kadar timbal dalam darah anak $\geq 10 \mu\text{g}/\text{dL}$ (CDC, 2018).

Timbal (Pb) mempengaruhi hampir setiap organ dalam tubuh terutama pada sistem saraf yang menjadi target utama dalam toksisitas timbal (Wani *et al.*, 2015). Timbal (Pb) memiliki efek merugikan pada saat proses proliferasi, diferensiasi dan kelangsungan hidup neuron, sehingga dapat mengganggu neurogenesis (Senut *et al.*, 2014). Timbal (Pb) melewati pembuluh darah otak dengan cara menggantikan ion kalsium, menyebabkan kerusakan di korteks serebral prefrontal, hipocampus, dan cerebelum sehingga meningkatkan berbagai gangguan neurologis (Sharma *et al.*, 2015), pertumbuhan dan perkembangan yang lambat, masalah belajar dan perilaku, masalah pendengaran dan bicara (CDC, 2018), apoptosis pada sistem saraf pusat dan eksitotoksitas (Vorvolakos *et al.*, 2016). Meskipun kadar timbal telah menurun di banyak negara dalam dekade terakhir, kadar timbal yang rendah dan tidak menyebabkan gejala keracunan akut tetap dapat menyebabkan gangguan kognitif dan neurologis (Figueiredo *et al.*, 2014).

Mekanisme neurotoksisitas yang dipicu oleh timbal (Pb) sangatlah kompleks seperti peningkatan stres oksidatif, perubahan bio-fisika membran, deregulasi pensinyalan sel, dan kerusakan neurotransmisi (Lange, 2017). Pembentukan Reaktif Oksigen Spesies (ROS) akibat toksisitas timbal (Pb)

menyebabkan kerusakan pada berbagai biomolekul seperti *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA), enzim, protein dan lipid berbasis membran (Flora *et al.*, 2012). Hal ini menyebabkan penurunan antioksidan (superoksida dismutase, glutathione peroxidase dan glutathione reductase) dalam otak (hipocampus, korteks) (Lange, 2017). Peningkatan ROS dapat menurunkan ekspresi SIRT 1 dan meningkatkan apoptosis yang ditimbulkan oleh stres oksidatif (Chen *et al.*, 2013; Hori *et al.*, 2013). SIRT 1 (*Silent Information Regulator 1*), protein *histondeacetylase* (HDAC) kelas III adalah protein survival seluler, menghambat stres oksidatif dan homeostatis metabolik. Deasetilasi oleh SIRT 1 mampu mengaktifkan gen-gen antiapoptosis yang menghambat apoptosis sehingga memiliki efek penting dalam neuroproteksi, meningkatkan fungsi motoris dan survival neuron (Hurtado *et al.*, 2013; Salminen *et al.*, 2013). SIRT 1 mengatur apoptosis sel melalui jalur protein p53, merangsang ekspresi antioksidan melalui jalur *Forkhead O* (Foxo) (Hori *et al.*, 2013; Salminen *et al.*, 2013).

Paparan timbal (Pb) mengaktifasi protein p53, menyebabkan perubahan keseimbangan level BAX / BCL-2, perubahan fungsi mitokondria, dan apoptosis (Rager, 2015). Apoptosis dapat terjadi pada sel neuron motorik. Apabila terjadi pada perkembangan awal embrio dapat mengganggu embriogenesis seperti malformasi, disfungsi organ dan pada tahap selanjutnya terjadi gangguan fungsi motorik (Ahmad *et al.*, 2012) seperti gangguan pada lokomotor. ROS yang tinggi juga dapat menyebabkan apoptosis pada osteoblas dan osteosit sehingga mempengaruhi osifikasi tulang (Primihastuti, 2017).

Sel menggunakan sistem antioksidan untuk mencegah atau menunda kerusakan oksidatif karena peningkatan ROS (Sabahi *et al.*, 2018). *Centella asiatica* memiliki kandungan triterpen, yaitu asam asiatik, asam madecassic, asiaticoside, madecassoside yang memiliki potensi sebagai pembersih radikal bebas superoksida, hidrogen peroksida, oksida nitrat yang menurunkan produksi

ROS dalam tubuh, meningkatkan antioksidan endogen yang berperan penting dalam perlindungan dopamin dengan cara menurunkan apoptosis pada neuron dopaminergik (Zhao *et al.*, 2014; Khotimah *et al.*, 2018), mempromosikan perpanjangan dendrit (Tu *et al.*, 2017), menghambat aktivitas caspase-9 yang merupakan salah satu enzim dalam aktivasi jalur apoptosis (Omar *et al.*, 2011). Asam asiatic pada *Centella asiatica* dapat melindungi saraf yang diinduksi lipopolisakarida dengan cara meningkatkan ekspresi SIRT 1 dan inaktivasi NF- κ B sehingga menurunkan sitokin proinflamasi (Qian *et al.*, 2017).

Penelitian ini menggunakan zebrafish sebagai model penelitian untuk penelitian toksikologi perkembangan dari paparan berbagai bahan kimia pada awal kehidupan (Lee & Freeman, 2014). Zebrafish memiliki keunggulan berukuran kecil dan kuat, struktur genetik yang hampir sama dengan genetik manusia, selain itu zebrafish memiliki embrio yang transparan sehingga memudahkan peneliti memeriksa perkembangan struktur internal dan lebih murah (Jhamtani *et al.*, 2017). Sehingga penelitian dengan zebrafish berbeda dengan penelitian menggunakan hewan coba lainnya, pada penelitian menggunakan zebrafish dapat dengan mudah untuk menentukan pembelahan sel pada saat blastula dini dimana terjadi proses proliferasi yang sangat peka terhadap toksisitas dan jika terpapar oleh zat toksin akan mempengaruhi proses diferensiasi (endoderm, ectoderm, mesoderm) dan organogenesis yang dapat menyebabkan kelainan yang multi defek. Usia zebrafish berdasarkan ontogeni siklus bangun tidur analog dengan usia manusia dimana usia 3, 6, 9 *day post fertilitation* (dpf) analog dengan bayi baru lahir, 2 tahun dan 8 tahun (Sorribes *et al.*, 2013).

Penelitian sebelumnya tentang efek timbal pada pertumbuhan dan perkembangan menunjukkan paparan timbal (Pb) di Guiyu China 6.81 ± 1.61 μ g/dL secara signifikan menyebabkan ketidaknormalan berat badan, panjang

badan, lingkaran kepala dan lingkaran dada pada populasi anak-anak prasekolah (Zeng *et al.*, 2018). Kadar timbal pada darah ibu hamil yang melebihi 5 µg/dL menyebabkan penurunan berat badan bayi, lingkaran kepala, panjang badan dan peningkatan risiko kelahiran prematur (Taylor *et al.*, 2015). Pemberian timbal asetat 0,5 % pada air minum selama 3 bulan pada tikus dewasa menyebabkan perubahan glial dan neuron sehingga mengurangi aktivitas lokomotor (Sansar *et al.*, 2011). Paparan timbal 10 µmol/L dapat meningkatkan apoptosis dan mengubah aktifitas lokomotor (jarak berenang dan kecepatan rata-rata) pada larva zebrafish usia 3 dan 6 *day post fertilization* (dpf) (Tu *et al.*, 2018). Penelitian ini merupakan penelitian kelompok yang meneliti berbagai parameter terkait efek timbal pada pertumbuhan dan perkembangan seperti dopamin, dopamin reseptor, tyrosin hidroksilase, apoptosis, SIRT 1 yang dikaitkan dengan aktivitas lokomotor dan osifikasi tulang. Penelitian pencegahan gangguan perkembangan akibat paparan timbal (Pb) dengan memanfaatkan pegagan (*Centella asiatica*) serta pengaruhnya pada ekspresi SIRT 1 dan pencegahan apoptosis belum banyak diteliti sehingga berdasarkan pada teori diatas peneliti tertarik untuk memilih melakukan penelitian tersebut.

1.2 Rumusan masalah

1.2.1 Umum

“Apakah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat mencegah gangguan lokomotor dan osifikasi tulang keras melalui peningkatan ekspresi SIRT 1 dan penurunan apoptosis pada larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb)?”

1.2.2 Khusus

1. Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan lokomotor larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb)?
2. Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan osifikasi tulang keras larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb)?

3. Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi SIRT 1 larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb)?
4. Apakah pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat menurunkan apoptosis larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb)?
5. Apakah terdapat hubungan antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dengan lokomotor, osifikasi tulang keras, ekspresi SIRT 1 dan apoptosis pada larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb)?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Umum

Membuktikan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap gangguan lokomotor dan osifikasi tulang keras melalui peningkatan ekspresi SIRT 1 dan penurunan apoptosis pada larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).

1.3.2 Khusus

1. Membuktikan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap peningkatan lokomotor larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).
2. Membuktikan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap peningkatan osifikasi tulang keras larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).
3. Membuktikan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap peningkatan ekspresi SIRT 1 larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).
4. Membuktikan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap penurunan apoptosis larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).
5. Membuktikan hubungan antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dengan lokomotor, osifikasi tulang keras, ekspresi SIRT 1 dan apoptosis pada larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).

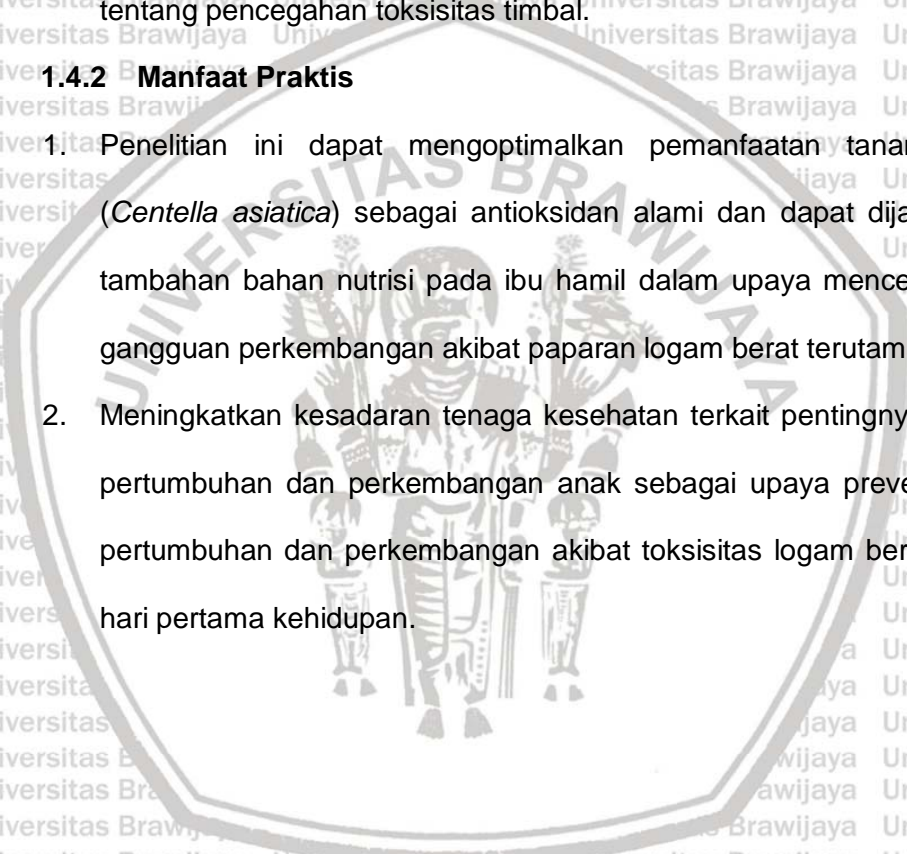
1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Penelitian ini digunakan untuk menambah ilmu pengetahuan dan pemahaman tentang patomekanisme toksisitas akibat induksi timbal asetat trihidrat dan kandungan pegagan (*Centella asiatica*) dalam mengurangi gangguan perkembangan.
2. Penelitian ini sebagai tambahan informasi dalam pengembangan penelitian tentang pencegahan toksisitas timbal.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Penelitian ini dapat mengoptimalkan pemanfaatan tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebagai antioksidan alami dan dapat dijadikan sebagai tambahan bahan nutrisi pada ibu hamil dalam upaya mencegah terjadinya gangguan perkembangan akibat paparan logam berat terutama timbal (Pb).
2. Meningkatkan kesadaran tenaga kesehatan terkait pentingnya pemantauan pertumbuhan dan perkembangan anak sebagai upaya preventif gangguan pertumbuhan dan perkembangan akibat toksisitas logam berat dalam 1000 hari pertama kehidupan.



BAB 2**TINJAUAN PUSTAKA****2.1 Timbal****2.1.1 Karakteristik**

Timbal merupakan logam berat berwarna abu-abu kebiruan yang titik cairnya rendah, terbentuk di kerak bumi. Timbal biasanya kombinasi antara dua atau lebih elemen lain untuk membentuk senyawa timbal. Saat terpapar udara atau air, terbentuk lapisan tipis yang melindungi logam dari serangan lebih lanjut.

Timbal mudah dibentuk dan dapat berkombinasi dengan logam lain untuk membentuk paduan (ATSDR, 2007).

2.1.2 Timbal (II) Asetat

Timbal (II) asetat ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), juga dikenal sebagai timah asetat, asetat timbal, asetat timbal, gula timbal, garam timbal, garam saturnus, atau bubuk goulard. Dibuat dengan memperlakukan timbal (II) oksida dengan asam asetat. Timbal asetat terlarut di air dan gliserin. Apabila terlarut di air membentuk trihidrat, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, zat kristal monoklinik tidak berwarna atau putih.

Timbal (II) asetat adalah garam yang sangat umum dengan beragam penggunaan sepanjang sejarah: sebagai pengganti pemanis dan gula (dikenal sebagai "gula timbal"), meskipun toksik; dalam kosmetik, sebagai produk pewarna rambut, lotion pemutih kulit; medis, sebagai obat untuk puting yang sakit; industri, sebagai detektor hidrogen sulfida, mordan dalam pewarnaan dan pencetakan tekstil, pengering cat dan pernis; dll. Dalam hal ini, hanya timbal (II) asetat trihidrat yang dikarakterisasi dan digunakan sampai saat ini (Riesco & Cheda, 2016).

Tabel 2.1 Karakteristik Timbal Asetat

Sifat	Keterangan
Bentuk	Padat
Berat Molekul	325,29 g/mol (Anhydrous) 379,33 g/mol (Trihidrat e)
Warna	Kristal Putih
Bau	Sedikit berbau asam
Titik Lebur	80°C (536 °F; 553 K) (Anhydrous) 75°C (167 °F; 348 K) (Trihidrat e)
Density	3,25 g/cm ³ (20°C, Anhydrous) 2,25 g/cm ³ (Trihidrat e) 1,69 g/cm ³ (Decahydrate)
Kelarutan	Larut dalam air

Sumber : Nordberg *et al.*, (2015)

2.1.3 Paparan dan Sumber Timbal (Pb)

1. Ingesti

a. Cat berbasis timbal

Meskipun sebagian besar rumah telah dicat ulang dengan cat non-timbal, timbal masih dapat dilepaskan ke rumah selama renovasi atau jika cat dikupas, terkelupas, atau retak. Serpihan cat yang tertelan diyakini menyebabkan keracunan timbal, saat ini lebih terkait dengan debu rumah tangga yang mengandung timbal, yang dihirup atau dicerna selama aktivitas memasukkan tangan ke mulut dan aktivitas memasukkan mainan ke mulut anak (Dapul & Laraque, 2014).

b. Air

Air minum dapat terkontaminasi oleh timbal yang digunakan untuk menahan pipa tembaga. Persediaan air kota biasanya diatur untuk mencegah kontaminasi di sumbernya, tetapi ketika perlengkapan yang digunakan lebih tua dan berkarat menyebabkan timbal dapat merembes ke pasokan air yang dikirim ke rumah. Menurut EPA "action level" dari timbal dalam air adalah 15 bagian per miliar. Ini tidak mungkin menyebabkan peningkatan *Blood Lead Level* yang signifikan secara klinis pada orang dewasa; namun, anak-anak mungkin lebih rentan terhadap

keracunan timbal karena ukuran tubuh mereka yang relatif lebih kecil dan spesifik dari metabolisme dan penyimpanan timbal mereka (Dapul & Laraque, 2014)

c. Tanah

Timbal dilepaskan dari pembakaran bensin bertimbal, cat bertimbal, pabrik peleburan, dan sumber industri lainnya yang dapat menjadi pencemaran udara dan akhirnya mengendap di tanah. Standar keamanan yang diterima untuk tanah di area perumahan adalah 400 bagian per juta (ppm) di area bermain dan 1200 ppm bukan area bermain (Dapul & Laraque, 2014).

d. Objek bertimbal, termasuk mainan anak-anak, kosmetik, dan barang-barang lainnya.

Mainan, perhiasan, dan furnitur anak-anak dapat mengandung cat berbasis timbal. Lipstik diproduksi menggunakan timbal. Paparan topikal atau kontak dengan benda-benda ini beresiko terkontaminasi. Sejak 2008, pemerintah federal telah melarang timbal dalam berat lebih dari 100 ppm di sebagian besar produk anak-anak (Dapul & Laraque, 2014).

2. Inhalasi

a. Industri

Debu timbal yang berasal dari industri bisa sangat berbahaya bagi pekerja yang terpapar dan keluarga mereka. Timbal dapat menempel pada kulit, rambut, dan pakaian dan dapat dibawa pulang ke rumah. Peningkatan risiko paparan pekerjaan terjadi dalam hal berikut seperti pembuatan baterai dan pabrik daur ulang, pembongkaran, renovasi, dan proyek renovasi, Industri karet dan plastik, pembuatan amunisi, perbaikan otomotif/ radiator, penyolderan timah (yaitu, manufaktur elektronik) dan pengelasan, pengecatan, pipa saluran air (Dapul & Laraque, 2014).

b. Paparan prenatal dan menyusui

Dalam uterus keracunan timbal terjadi ketika timbal memasuki aliran darah ibu karena paparan lingkungan atau dari mobilisasi simpanan timbal tulang yang terakumulasi dari paparan sebelumnya. Paparan timbal sebelum lahir ini telah dikaitkan dengan keterlambatan perkembangan saraf setelah lahir, meskipun tingkat ambang batas toksisitas belum dapat diidentifikasi. Timbal melintasi plasenta dengan mudah, oleh karena itu adanya timbal dalam darah ibu harus menjadi perhatian. Selain itu, penelitian telah memperkirakan hubungan langsung antara kadar darah ibu pada 1 bulan postpartum dan BLL pada bayi yang disusui (Ettinger & Wengrovitz, 2010).

c. Paparan kulit

Penyerapan kulit tidak dianggap sebagai model paparan yang umum. Timbal organik lebih mungkin diserap melalui kulit daripada timbal anorganik, dan sebagian besar terjadi di antara orang-orang yang bekerja dengan produk timbal (Dapul & Laraqe, 2014).

2.1.4 Farmakokinetik Timbal (Pb)

1. Absorpsi

a. Inhalasi

Timbal di udara berbentuk aerosol partikulat yang bisa diendapkan di saluran pernapasan saat dihirup. Penyerapan timbal yang disimpan dipengaruhi ukuran partikel, kelarutan dan pola pengendapan regional pada sistem pernapasan. Partikel dengan ukuran $> 2,5 \mu\text{m}$ disimpan di daerah nasofaring dan trakeobronkial dapat ditransfer dengan transportasi mukosiliar ke kerongkongan dan ditelan. Partikel yang berukuran $< 1 \mu\text{m}$, disimpan di daerah alveolar, dapat diserap setelah

pelarutan ekstraseluler atau tertelan oleh sel-sel fagositik (ATSDR, 2007).

b. Oral

Penyerapan Pb^{2+} dari usus dimediasi oleh difusi pasif dan fasilitasi, meskipun difusi pasif memainkan peran kecil dalam penyerapan total.

Beberapa bukti mendukung hipotesis bahwa Divalent Metal Transporter

1 (DMT1) bertanggung jawab untuk mengangkut timbal (Pb). DMT1 adalah transporter ion logam yang dapat mengangkut logam seperti Pb^{2+} , Cd^{2+} , dan Zn^{2+} di samping substrat fisiologisnya, besi (Fe).

Sebuah penelitian baru-baru ini menetapkan bahwa timbal (Pb) diserap baik dalam duodenum, yang menunjukkan tingkat DMT1 yang tinggi, serta ileum yang menunjukkan ekspresi DMT1 yang rendah. Jadi, sementara DMT1 kemungkinan memainkan peran dalam penyerapan timbal (Pb) dari saluran pencernaan, jelas bahwa ada protein pembawa lain. Salah satu kandidat tersebut adalah kalsium (Ca^{2+}) protein pengikat calbindin, yang bertanggung jawab untuk transfer kalsium basolateral dalam enterosit dan telah terbukti mengikat timbal (Pb) dan kalsium dengan afinitas yang sama ($5 \mu M$). Meskipun tidak pernah ditampilkan secara eksperimental, secara hipotetis calbindin dapat mengangkut timbal (Pb) secara basolateral dan juga Ca^{2+} (Neal & Guilarte, 2013).

Asupan zat besi yang rendah dan kekurangan zat besi dikaitkan dengan peningkatan timbal darah, meskipun penyebabnya belum jelas.

Vitamin D meningkatkan penyerapan timbal. Agen lain juga dapat mempengaruhi penyerapan timbal; misalnya, phytate menyebabkan penurunan dan alkohol meningkatkan penyerapan timbal (Nordberg *et al.*, 2015).

c. Kulit

Absorpsi timbal melalui kulit akan diserap hanya 0,06% dalam waktu 1 bulan (Nordberg *et al*, 2015). Sebagian besar penyerapan terjadi dalam 12 jam setelah paparan. Timbal juga tampaknya diserap di seluruh kulit manusia ketika diterapkan pada kulit sebagai timbal nitrat, namun, perkiraan kuantitatif penyerapan belum dilaporkan (ATSDR, 2007).

2. Metabolisme

Pembentukan kompleks dengan berbagai protein dan ligan nonprotein merupakan metabolisme timbal anorganik. Ligan ekstraseluler utama meliputi albumin dan sulfhidril nonprotein. Ligan intraseluler utama dalam sel darah merah adalah ALAD. Timbal juga membentuk kompleks dengan protein dalam inti sel dan sitosol (ATSDR, 2007).

3. Distribusi

Dalam darah, Pb 2+ terutama terikat dengan protein. Hingga 40% timbal (Pb) dalam darah terikat dengan serum albumin, dan sisanya terikat pada ligan yang mengandung sulfhydryl atau thiol. Bekerja dengan radiotracer 203-Pb pada tikus menunjukkan bahwa timbal (Pb) ditransfer ke otak sebagai ion bebas (Pb OH⁺) atau dikomplekskan dengan ligan-ligan berat molekul kecil. Pb OH⁺ kemungkinan besar melintasi *blood brain barrier* (BBB) melalui difusi pasif, tetapi juga dapat diangkut melalui transporter kation. DMT1 sangat diekspresikan dalam striatum, korteks, hippocampus, dan otak kecil dan dapat memfasilitasi transfer timbal (Pb) melintasi BBB. Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa timbal (Pb) secara istimewa terakumulasi di daerah otak tertentu, seperti hipocampus. Namun, penelitian lain yang menggunakan metodologi berbeda tidak mengamati adanya perbedaan dalam akumulasi otak regional timbal (Pb) (Neal & Guilarte, 2013).

Timbal akan terdistribusi ke organ lain setelah dari plasma. Dalam batas tertentu timbal dapat melewati otak dan distribusi yang paling tinggi pada hipocampus, amygdala, dan choroids pleksus (Nordberg *et al.*, 2015). Timbal didistribusikan ke bagian tubuh dengan paruh waktu yang berbeda-beda. Timbal dapat masuk kedalam darah dengan waktu paruh waktu 25 hari, kedalam otot dengan waktu paruh 40 hari, dan kedalam tulang dengan waktu paruh 20 tahun. Timbal mengikat sel darah merah sekitar 99 %, lebih banyak pada protein dalam sel daripada membran sel darah merah (ATSDR, 2007). Pengukuran darah adalah alat utama untuk biomonitoring paparan dan risiko timbal. Dalam darah, sebagian besar timbal hadir dalam eritrosit (sel darah merah), hanya menyisakan <1% dalam plasma (Nordberg *et al.*, 2015). Rasio konsentrasi timbal darah ibu / janin, ditunjukkan dari pengukuran timbal darah tali pusat adalah sekitar 0,9. Sekitar 80% timbal dalam darah tali pusat janin berasal dari penyimpanan tulang ibu (ATSDR, 2007).

4. Ekskresi

a. Ginjal

Ekskresi ke dalam urin terutama terjadi melalui filtrasi glomerulus, meskipun ada indikasi ekskresi yang berbeda pada pekerja timbal dengan paparan yang relatif tinggi (Sommar *et al.*, 2014). Filtrasi dapat diikuti oleh reabsorpsi tubular parsial. Ada ritme sirkadian pada tingkat ekskresi timbal di urin, dengan pengurangan pada malam hari (Nordberg *et al.*, 2015).

b. Pencernaan

Timbal juga diekskresikan melalui empedu dan pankreas ke dalam tinja. Ekskresi dalam empedu dalam bentuk kompleks timbal-glutathione (Nordberg *et al.*, 2015).

c. Jalur ekskresi yang lain

Sampai batas tertentu, timbal juga diekskresikan dalam air liur dan keringat. Dalam jumlah sedikit dapat diekskresikan pada kuku dan rambut. Timbal juga dapat masuk ke dalam air mani, plasenta, janin, dan susu (Nordberg *et al.*, 2015). Dalam jangka panjang, timbal akan diserap dalam tulang dan gigi sedangkan dalam jangka pendek timbal akan diekskresikan oleh tubuh setelah 24 jam. Secara umum ekskresi timbal dapat berjalan dengan lambat, sehingga menyebabkan timbal dengan mudah terakumulasi didalam tubuh (Mushak, 2011).

2.1.5 Mekanisme Timbal (Pb) Masuk Kedalam Otak

Timbal dapat masuk kedalam otak yang memiliki perlindungan sangat baik dengan cara mimikri ion kalsium. Timbal kemudian mengganggu pergerakan dan penyimpanan ion kalsium di dalam sel, meningkatkan stres sel dan menyebabkan kematian neuron dan sel otak lainnya. Timbal juga dapat menggantikan peran kalsium di otak, termasuk komunikasi antar neuron. Pada saat neuron diaktifkan, kalsium memasuki neuron dan merangsang pelepasan neurotransmitter. Neurotransmitter membawa sinyal aktivasi dari neuron pertama ke neuron berikutnya. Dengan meniru kalsium ini timbal mengubah cara neuron melewati sinyal. Timbal juga dapat menyebabkan pelepasan neurotransmitter spontan pada neuron yang tidak teraktivasi, sehingga neuron menerima sinyal yang tidak sesuai (Gearing, 2016). Selain itu ketika *Blood Brain Barriers* terpapar pada konsentrasi timbal tingkat tinggi, plasma bergerak ke ruang interstitial otak, menghasilkan edema. Toksisitas timbal dalam darah yang tinggi pada SSP menyebabkan ensefalopati dan edema yang terutama memengaruhi otak kecil otak. Edema menyebabkan peningkatan tekanan ekstrem di otak, yang dapat menyebabkan kerusakan otak (Brochin *et al.*, 2008).

2.1.6 Mekanisme Toksisitas Timbal (Pb)

1. Oksidatif stres

Efek toksik utama dari timbal yang diamati pada sel hewan dan tumbuhan adalah peningkatan tingkat reaktif oksigen spesies (ROS). Stres oksidatif adalah hasil dari ketidakseimbangan antara produksi dan detoksifikasi ROS. Pada dasarnya, ketidakseimbangan terjadi dalam dua cara, baik dengan peningkatan produksi ROS atau sistem detoksifikasi ROS yang terganggu. Overproduksi radikal bebas selama stres oksidatif menyebabkan kerusakan pada struktur seluler, kerusakan jaringan, respon inflamasi, dan apoptosis. Target ROS adalah protein, asam nukleat, dan lipid, yang menyebabkan modifikasi, kerusakan, dan inaktivasi (Djordjevic, 2004).

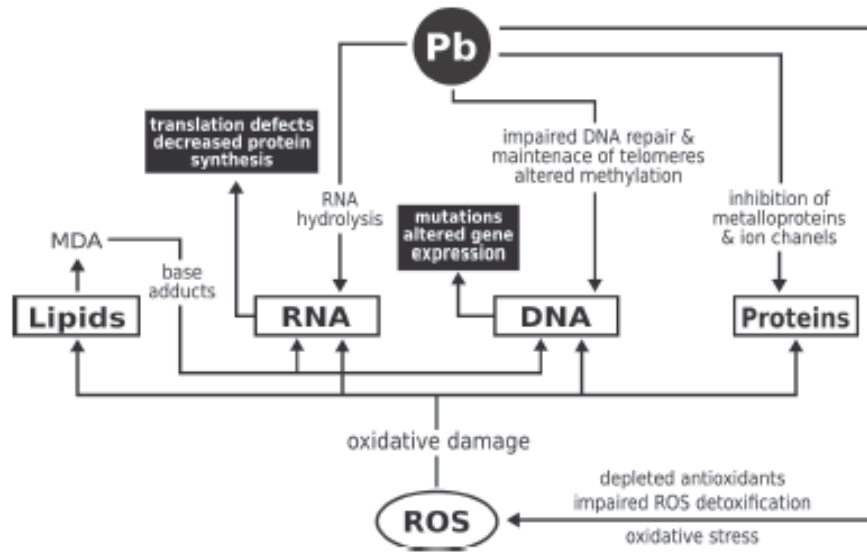
Peningkatan produksi radikal bebas juga bisa memiliki efek jangka panjang dan beberapa penyakit kronis pada manusia dikaitkan dengan stres oksidatif (Bocci & Valacchi, 2013). Pada sel saraf, peningkatan produksi ROS termasuk faktor utama penyebab peningkatan gangguan neurodegeneratif seperti Alzheimer dan Parkinson (Breitenbach *et al.*, 2013).

Timbal bukan elemen aktif redoks, tidak dapat secara langsung berpartisipasi dalam reaksi yang mengarah pada pembentukan ROS. Di dalam eritrosit, ROS telah diinduksi oleh interaksi timbal dengan oksihemoglobin. Kontribusi utama dari timbal terhadap onset dan propagasi stres oksidatif adalah dengan mengganggu enzim dan sel lainnya. Komponen dari sistem pertahanan yang menangkal kerusakan oksidatif (Szymanski, 2014).

Glutathione (GSH), tripeptide dari glutamat, sistein, dan histidin, adalah salah satu faktor terpenting yang melindungi komponen sel dari kerusakan ROS.

Glutathione mengurangi ikatan disulfida dalam protein untuk sistein menggunakan gugus sulfidril sistein sebagai donor proton. Dalam prosesnya, GSH diubah menjadi bentuk teroksidasi, glutathione disulfide (GSSH) (Franco *et*

al., 2007). Timbal memiliki efek ganda pada tingkat glutathione. Pertama, GSH ditunjukkan untuk membentuk kompleks dengan Pb^{2+} melalui gugus thiol sistein (Mah and Jalilehvand, 2012) dan kedua, timbal dapat menghambat aktivitas reduktase glutathione yang mengganggu daur ulang glutathione disulfide teroksidasi (Szymanski, 2014).



Gambar 2. 1 Target Molekuler dari Timbal.

Keterangan : Integritas dan fungsi biomolekul dipengaruhi oleh paparan timbal secara langsung atau tidak langsung dengan mempromosikan stres oksidatif dan peningkatan kadar spesies oksigen reaktif (Szymanski, 2014).

2. Interaksi dengan protein

Timbal secara signifikan mempengaruhi jalur sintesis heme dengan cara menurunkan regulasi tiga enzim utama yang terlibat dalam sintesis heme. δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD), enzim sitosol yang mengkatalisis pembentukan porphobilinogen dari asam δ -aminolevulinic (ALA), sintetase asam aminolevulinic (ALAS), enzim mitokondria yang mengkatalisis pembentukan asam aminolevulinic (ALA), dan akhirnya, enzim mitokondria ferrochelataze yang mengkatalisis penyisipan besi menjadi protoporphyrin untuk membentuk heme (Piomelli, 2002). Langkah awal dan akhir sintesis heme terjadi di mitokondria,

sedangkan langkah-langkah menengah berlangsung di sitoplasma (Flora *et al.*, 2012).

Penghambatan δ -ALAD oleh timbal bertanggung jawab atas akumulasi substrat δ -ALA, yang dapat dengan cepat teroksidasi untuk menghasilkan radikal bebas seperti ion superoksida, radikal hidroksil, dan hidrogen peroksida (H_2O_2) (Ahamed & Siddiqui, 2007).

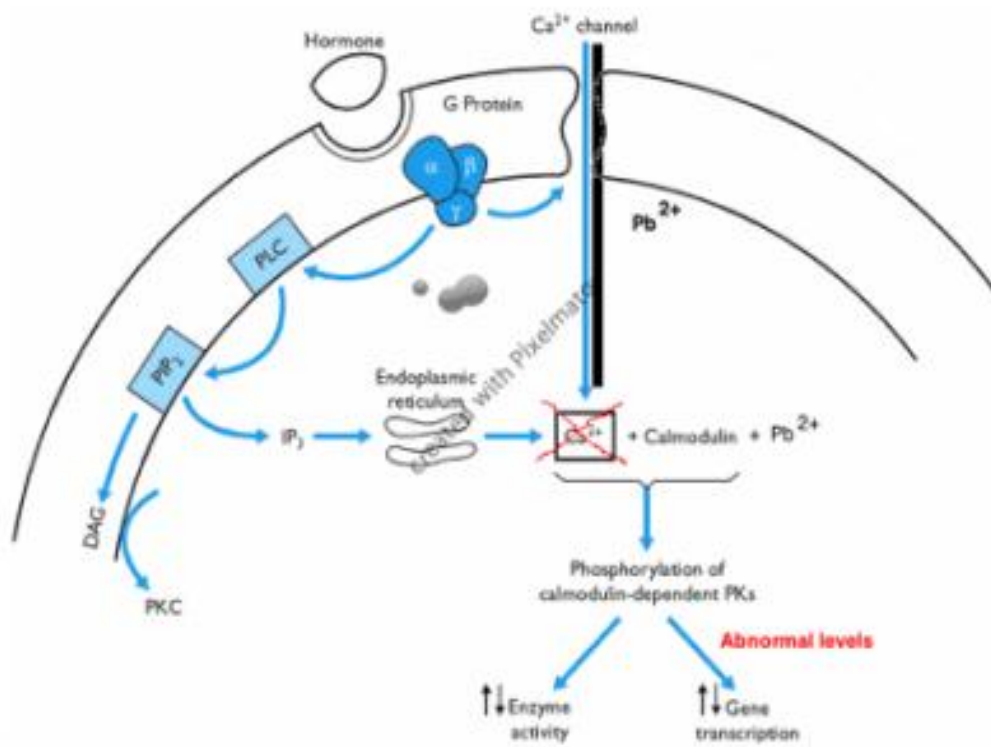
3. Timbal (Pb) menghambat sistem *second messenger*

Pada tingkat sel, banyak studi penelitian mendukung hipotesis yang menyatakan bahwa timbal memiliki efek pada perubahan sistem messenger kedua seluler. Konsentrasi Ca^{2+} intraseluler umumnya meningkat melalui pembukaan saluran kalsium di membran sel atau pelepasan kalsium yang tersimpan dalam retikulum endoplasma. Keadaan tersebut disebabkan adanya stimulasi G-protein. G-protein ini kemudian menstimulasi pembukaan saluran kalsium. Kalsium ekstraseluler kemudian masuk ke dalam sel dan bergabung dengan calmodulin, protein pengikat kalsium, yang mempengaruhi dan merangsang banyak fungsi intraseluler seperti inflamasi, metabolisme, apoptosis, kontraksi otot, gerakan intraseluler, pertumbuhan saraf dan respon imun. Dalam sebuah penelitian yang meneliti kemampuan timbal untuk mengikat CaM (calmodulin), situs pengikatan kalsium dapat diakses oleh ion timbal dalam keadaan kristal, dan pada kenyataannya, timbal memiliki afinitas yang lebih tinggi pada pengikatan CaM daripada kalsium (Brochin *et al.*, 2008).

Depolarisasi sel membran, yang disebabkan oleh G-protein, saluran kalsium terbuka. Timbal menghambat masuknya kalsium, dan depolarisasi juga menstimulasi timbal masuk. Saluran ini memiliki permeabilitas yang sangat tinggi untuk ion timbal, dalam kisaran sekitar sepuluh kali dari permeabilitasnya ion kalsium. Biasanya, saluran ini siap ditutup setelah kalsium lewat karena efek internal ion kalsium. Namun, dengan adanya timbal, saluran ini tidak dapat

menonaktifkan karena tidak adanya efek internal ini. Begitu timbal berada di sitoplasma sel, proses abnormal di atas dapat dilanjutkan (Brochin *et al.*, 2008).

Gangguan homeostasis kalsium menyebabkan peningkatan penggunaan Ca^{2+} di mitokondria, meningkatkan transpor elektron dan ROS (Sanders *et al.*, 2010), apabila berlangsung terus menerus akan menyebabkan disfungsi mitokondria, terbukanya pori transisi mitokondria yang mengarah ke depolarisasi mitokondria, pelepasan sitokrom C, aktivasi dari berbagai caspase dan menyebabkan apoptosis (Lidsky & Schneider, 2003).



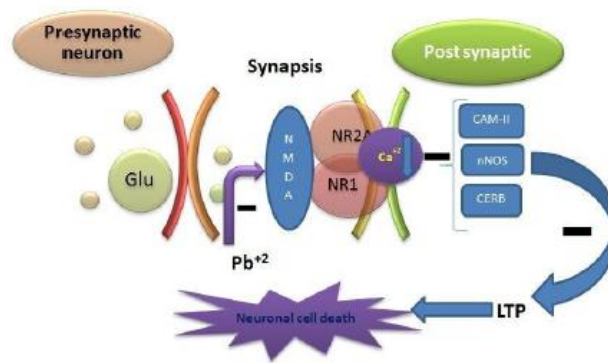
Gambar 2. 2 Mekanisme Timbal Masuk Kedalam Sel.

Keterangan : Timbal masuk kedalam sel dengan membuka kanal kalsium (stimulasi G protein) dan berikatan dengan calmodulin lebih kuat dari kalsium. Kemudian menyebabkan fosforilasi protein kinase yang mengarah ke aktivitas enzim abnormal dan transkripsi gen. Pada jalur alternatif, G protein mengaktifkan phospholipase C (PLC) kemudian mengaktifkan hidrolisis fosfotidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) menjadi inositol triphosphate (IP₃) dan diacylglycerol (DAG). IP₃ biasanya melepaskan Ca^{2+} yang bergabung dengan calmodulin, tetapi dengan adanya timbal yang disimpan dalam organel sel menyebabkan IP₃ dapat merangsang pelepasan Pb^{2+} untuk menggabungkan calmodulin (Brochin *et al.*, 2008).

4. Timbal memblok NMDA

Pada sistem saraf, timbal (Pb) memblok reseptor N-Methyl-D-Aspartase yang berfungsi dalam maturasi otak. Hal ini mengakibatkan perubahan susunan otak. Tingginya *Blood Lead Level* akan merusak fungsi barier otak. Barier otak dibuat oleh sel endothelial yang dihubungkan oleh tight junction. Sel endothelial ini mengelilingi astrosit yang merupakan jumlah besar neuron di otak. Tingginya konsentrasi timbal didalam barier otak akan mengakibatkan perpindahan plasma kedalam ruang interstitial sehingga menyebabkan edema. Edema akan meningkatkan tekanan pada otak yang akan berdampak pada kerusakan otak permanen (Brochin *et al.*, 2008).

Interaksi timbal (Pb) dengan reseptor NMDA memiliki dua langkah yaitu sinaptis dan ekstra sinapsis. Timbal (Pb) terutama mengganggu mekanisme pensinyalan ion Ca^{+2} dalam sinapsis neuron oleh proses NMDA-Glu. Timbal (Pb) memodifikasi ekspresi subunit reseptor NMDA (NR2A, NR2B), menyebabkan disregulasi Ca^{+2} - jalur sinyal sensitif di hippocampus. Paparan kronis mengurangi NR2A dan meningkatkan NR2B pada hippocampus (Karri *et al.*, 2016). Timbal dapat menurunkan regulasi reseptor NR2A-NMDA sinaptik dan secara bersamaan meningkatkan regulasi NR2B-NMDA di daerah sinaptik (Neal *et al.*, 2011).



Gambar 2.3 Representasi Skematik dari Timbal di Daerah Sinaptik Hipocampal

Keterangan : Skema representasi dari Pb^{2+} ion masuk dalam wilayah sinaptik hipocampal oleh persaingan dengan glutamat (Glu), kemudian mengikat reseptor NMDA dan mempengaruhi ekspresi NR2A hasil subunit pelepasan ion Ca^{2+} menurun dengan konsekuensi fungsi LTP terhambat (Karri *et al.*, 2016).

Timbal memasuki daerah sinaptik hippocampus dan memblokir fungsi reseptor NMDA, mendorong masuknya saluran ion NMDA tergantung deplesi Ca^{2+} . Oleh karena itu efek dari proses Ca^{2+} tergantung pada kalmodulin-II (CAM-II), neuronal nitrat oksida sintase (n-NOS) dan respon cAMP unsur-binding protein (Cerb). Kinerja reseptor yang diubah dapat mempengaruhi plastisitas neuron, karena perubahan terkait dengan disfungsi potensiasi jangka panjang (Baranowska *et al.*, 2012).

Kematian neuron yang diinduksi glutamat dimulai dengan stimulasi berlebih N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptor, menghasilkan peningkatan kalsium bebas intraseluler, diikuti oleh aktivasi enzim katabolik dan mengarah ke kaskade intraseluler peristiwa sitotoksik. Baru-baru ini, semakin banyak penelitian telah menemukan bahwa mitokondria - organel yang sangat penting untuk mengendalikan kehidupan dan kematian sel - terlibat dalam eksitotoksitas yang diinduksi glutamat karena memiliki kapasitas besar untuk penyerapan kalsium, akhirnya mengakibatkan kelebihan muatan Ca^{2+} mitokondria. Kelebihan Ca^{2+} pada mitokondria dapat mengaktifkan kematian sel saraf melalui pelepasan

faktor pro-apoptosis dan peningkatan generasi spesies oksigen reaktif (ROS) (M. F. Xu *et al.*, 2012).

2.2 SIRT 1

SIRT 1 merupakan anggota keluarga sirtuin. Pada mamalia, gen homolog pertama dari keluarga sirtuin diidentifikasi sebagai sirtuin 1 (SIRT 1). Enam gen sirtuin lainnya kemudian diidentifikasi pada mamalia, menghasilkan kelompok tujuh gen (SIRT 1 hingga SIRT 7) (Paraíso *et al.*, 2013).

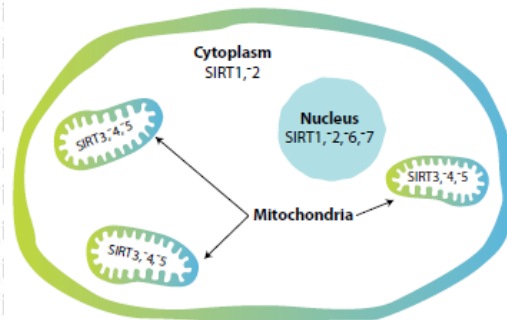
2.2.1 Definisi SIRT 1

SIRT 1 adalah *deacetylase* yang bergantung pada nicotinamide adenosine dinucleotide (NAD) dan menghilangkan gugus asetil dari banyak protein histone dan non-histone. SIRT 1 dapat mendeasetilasi berbagai substrat, oleh karena itu dapat terlibat dalam berbagai fungsi fisiologis, seperti kontrol ekspresi gen, metabolisme dan penuaan (Rahman & Islam, 2011), berperan dalam stres oksidatif, inflamasi dan apoptosis. Menurut Cohen (2015), SIRT 1 adalah protein atau kendaraan yang memerlukan fungsi NAD⁺, SIRT 1 menghilangkan gugus asetil dari protein.

2.2.2 Lokasi SIRT 1

Pada tingkat sel, SIRT 1 terutama diekspresikan dalam nukleus dan pada beberapa ditranslokasi dari nukleus ke sitoplasma. Beberapa studi menunjukkan bahwa translokasi ke nukleus mampu melindungi sel terhadap stres oksidatif melalui modulasi jalur seluler spesifik atau memediasi perlindungan sel. SIRT 1 juga diekspresikan di otak, dengan kadar tinggi di korteks, hippocampus, otak kecil, dan hipotalamus dan kadar rendah dalam *white matter* (Paraíso *et al.*, 2013). SIRT 1 juga ditemukan di jantung, ginjal, limpa dan jaringan adiposa (Kelly, 2010). Berdasarkan Zfin.org, Gen SIRT 1 terletak pada kromosom 10 manusia, band 10q21.3 start 67,884,669 bp end

67,918,390 bp. SIRT 1 di zebrafish terletak pada kromosom 13 dengan ekson 10.



Gambar 2. 4 Lokasi Seluler SIRT 1 di Seluler Mamalia (Kelly, 2010).

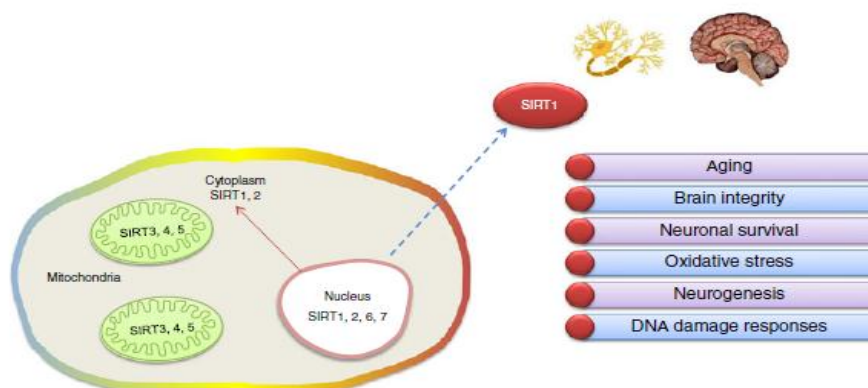
2.2.3 Pentingnya SIRT 1

Gugus asetil akan ditambahkan ke protein ketika protein mengalami stress sebagai respon terhadap perubahan yang disebabkan oleh peradangan dan oksidasi. Sirtuin menghilangkan gugus asetil untuk menjaga protein tetap bekerja lebih lama dari biasanya, sementara secara bersamaan menstabilkan kondisi muatan *backbone* karbon dalam protein untuk menahan setiap perubahan sehingga memungkinkan protein seluler lebih lama dan menghemat energi. SIRT 1 melindungi dari *nitric oxide*, apabila kadar dan aktivitas SIRT 1 dalam keadaan baik maka *nitric oxide* akan merangsang gen perbaikan DNA tetapi sebaliknya *nitric oxide* akan merangsang gen yang menyebabkan apoptosis (Cohen, 2015).

2.2.4 SIRT 1 di Otak

SIRT 1 secara luas diekspresikan di otak orang dewasa. Sebagian besar SIRT 1 terlokalisasi dalam inti neuron. Namun, SIRT 1 juga ditemukan dalam sel glial otak manusia, dan dalam sel induk saraf, mikroglia, dan astrosit dalam kultur (Koronowski & Perez, 2015). Dalam hipotalamus, pusat kontrol homeostasis, SIRT 1 mRNA sangat diekspresikan dalam arkuata, ventromedial, dorsomedial dan inti paraventricular dari hipotalamus, yang menunjukkan peran penting bagi

SIRT 1 otak dalam mengatur status metabolisme. Selain fungsi fisiologis SIRT 1 dalam hipotalamus, SIRT 1 dilaporkan memberikan perlindungan saraf pada disfungsi neurologis (Xu *et al.*, 2018).



Gambar 2. 5 Lokalisasi Seluler dan Peran SIRT 1 dalam Sistem Saraf

Keterangan : SIRT 1 terdapat di nukleus dan sitoplasma, pada otak dan sistem saraf SIRT 1 berperan pada penuaan, kelangsungan hidup neuron, stres oksidatif, neurogenesis dan respon terhadap kerusakan DNA (Paraíso *et al.*, 2013).

SIRT 1 di otak juga terlibat dalam beberapa proses yang bekerja sebagai modulator kaskade berbagai protein (Li *et al.*, 2008). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa SIRT 1 terlibat dalam pemeliharaan integritas yang mengatur aktivitas otak seperti stres oksidatif, diferensiasi neuron, dan neurogenesis (Chang *et al.*, 2009). SIRT 1 melindungi neuron dengan memprakondisikan iskemik pada hipokampus dan mencegah penyakit neurodegeneratif pada model tikus dan kehilangan mitokondria dengan memodulasi aktivitas deasetilasi melalui berbagai substrat, termasuk anggota keluarga kotak forkhead O (FoxO), penekan tumor p53, peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR γ), PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1 α), nuclear factor kappa B (NF- κ B), and liver X receptor (LXR) yang berpotensi penting untuk kelangsungan hidup neuronal (Paraíso *et al.*, 2013).

2.2.5 Faktor yang meningkatkan SIRT 1

Peningkatan NAD⁺, akan meningkatkan aktivitas SIRT 1. Menurut Cohen (2015) ada beberapa cara meningkatkan SIRT 1 yaitu :

1. Gaya hidup

Keadaan dingin, latihan, matahari (Nitric Oxide).

2. Diet

Ikan / DHA, fruktosa. Di hati, fruktosa meningkatkan produksi dan aktivitas SIRT 1 (R), minyak zaitun.

3. Suplemen

Nicotinamide Riboside, seng, nikotin, curcumin, Vitamin D, gotu kola, ekstrak biji anggur, piruvat, lycopene -metabolite meningkatkan produksi dan aktivitas SIRT 1.

4. Obat-obatan

Metformin meningkatkan produksi dan aktivitas SIRT 1.

5. Keadaan yang meningkatkan NAD⁺

Puasa, pembatasan kalori, latihan, sauna, nicotinamide riboside, ketosis / β -hydroxybutyrate, fruktosa, aktivasi AMPK (R) - AMPK meningkatkan aktivitas SIRT 1 dengan meningkatkan level NAD⁺ seluler (meningkatkan NAMPT).

Aktivasi SIRT 1 juga merangsang oksidasi asam lemak dan secara tidak langsung mengaktifkan AMPK, Oxaloacetate, Asam malat, Resveratrol, Apigenin, Leucine, Niacinamide - dosis rendah, Lithium menghambat mir-34a, yang menghambat NAMPT, enzim yang membuat NAD⁺. Asam suksinat, pada tingkat yang lebih rendah daripada asam malat. Tryptofan dan asam aspartat adalah bahan bakar untuk NAD⁺.

2.2.6 Peran SIRT 1 dalam Metabolisme Tubuh

SIRT1 bertindak sebagai sensor seluler. Penelitian sensor energi seluler SIRT 1 pada awalnya difokuskan pada penuaan, kemampuannya untuk

memodulasi keseimbangan energi dan metabolisme juga menjadi fungsi yang sangat menarik. Sekarang diketahui bahwa SIRT 1 diperlukan untuk pembatasan kalori yang memperpanjang umur ragi, sementara pada organisme yang lebih tinggi berperan memodulasi metabolisme di situs perifer termasuk hati, pankreas, jantung, otot rangka, dan jaringan adipose (Massadi *et al.*, 2013).

Pada otot rangka, SIRT 1 memainkan peran penting dalam remodeling otot glikolitik, yang cenderung lebih responsif terhadap rangsangan yang menginduksi biogenesis mitokondria, ke arah fenotip yang lebih oksidatif (Massadi *et al.*, 2013). Aktivasi SIRT 1 juga dapat meningkatkan fungsi endotel dan menekan peradangan pembuluh darah, dua proses patofisiologis sentral yang berperan dalam perkembangan penyakit kardiovaskular. Secara khusus, SIRT 1 telah terbukti melindungi sel endotel dari penuaan dini, mengatur angiogenesis dan tonus pembuluh darah (Chiara *et al.*, 2014).

Aktivator SIRT 1 dapat melindungi fungsi mitokondria dari kerusakan mitokondria yang diinduksi oksidatif dalam berbagai jenis sel melalui pengaturan PGC-1 α dan beberapa faktor transkripsi, yang terkait erat dengan biogenesis dan metastasis mitokondria. Disfungsi mitokondria menjadi salah satu penyebab cedera dan penyakit karena pengaruhnya terhadap pembentukan ATP, metabolisme, dan apoptosis. Dengan aktivasi SIRT 1 dapat meningkatkan ATP, mencegah pembentukan ROS, dan meningkatkan aktivitas Mn-SOD. Sehingga SIRT 1 melindungi fungsi mitokondria dengan meningkatkan DNA mitokondria, yang mengarah pada promosi ATP, konsumsi oksigen mitokondria, dan pengurangan pembentukan ROS (Wang *et al.*, 2016).

2.2.7 SIRT 1 dan Oksidatif Stres

Stres oksidatif dapat disebabkan oleh radikal bebas yang berlebihan. Radikal bebas, yang terdiri dari radikal bebas superoksida, hidrogen peroksida,

oksigen singlet, NO dan peroksinitrit dapat dihasilkan dalam jumlah tinggi selama pengurangan oksigen dan menyebabkan cedera sel (Maiese *et al.*, 2010).

Pada beberapa sel, SIRT 1 memberikan perlindungan terhadap stres oksidatif melalui modulasi faktor transkripsi forkhead. SIRT 1 juga melindungi sel terhadap stres oksidatif dengan meningkatkan aktivitas katalase. Ekspresi SIRT 1 yang berlebih meningkatkan toleransi terhadap toksisitas radikal bebas dalam sel neuron. SIRT 1 dapat memblokir apoptosis yang diinduksi p53 melalui deasetilasi p53 dan induksi MnSOD (Chong *et al.*, 2012).

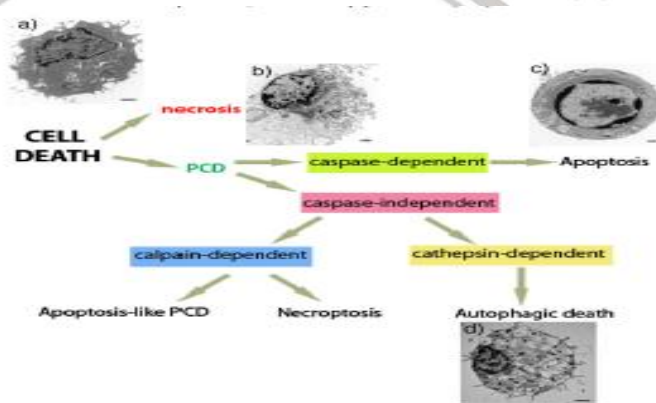
SIRT 1 dapat mendeasetilasi faktor-faktor FoxO, yaitu, FoxO 1, FoxO 3a dan FoxO 4, dan kemudian merangsang ekspresi antioksidan, misalnya, katalase, MnSOD dan Trx, dan melalui umpan balik otomatis juga memperkuat ekspresi SIRT 1. SIRT 1 / FoxO merupakan jalur survival yang secara evolusioner mengatur respon seluler terhadap perubahan metabolik dan stres oksidatif (Salminen *et al.*, 2013). Menurut Zhang *et al.*, (2017), Dalam menanggapi stres, FoxO mentranslokasi ke dalam nukleus dan menambah ekspresi proteinnya, sehingga terlibat dalam berbagai fungsi seluler yang mengatur siklus sel, meningkatkan kekebalan sel, dan menghambat stres oksidatif. Bukti menunjukkan bahwa aktivasi FoxO 3 dapat melindungi sel dari stres oksidatif dengan mengikat langsung ke promotor mangan superoksida dismutase (MnSOD) dan meningkatkan ekspresi MnSOD untuk melawan ROS.

Sebaliknya, penghambatan FoxO menyebabkan penurunan resistensi stres oksidatif dan peningkatan level ROS, yang menunjukkan peran penting FoxO dalam resistensi ROS. Selain itu SIRT 1 meningkatkan kemampuan pengikatan DNA FoxO 1 dengan deasetilasi FoxO 1 dan melemahkan respons stres oksidatif. Namun, detail interaksi antara FoxO 1 dan SIRT 1 tetap sulit dipahami yang satu berfungsi sebagai hulu dari yang lain (Daitoku *et al.*, 2004).

2.3 Apoptosis

2.3.1 Pengertian

Apoptosis, juga disebut dengan *Programmed Cell Death* (PCD) adalah cara fisiologis sel-sel berinti untuk mati dan juga merawat sel-sel yang tidak diinginkan, terluka, atau terinfeksi virus (Jayakiran, 2015). Sedangkan nekrosis adalah kematian sel yang tidak disengaja, proses patologis terjadi ketika sel-sel mengalami cedera fisik atau kimia yang serius. Seperti infeksi bakteri, jamur, kondisi hipotermia atau hipoksia, radiasi atau paparan ultraviolet (Adigun & Bhimji, 2018).



Gambar 2. 6 Jenis Kematian Sel dan Ciri Morfologisnya.

Keterangan : Klasifikasi diagram berbagai jenis kematian sel. PCD: kematian sel terprogram. Gambaran morfologis dari a) sel yang sehat, b) sel nekrotik, c) sel apoptosis dan d) sel autophagi (Nikoletopoulou *et al.*, 2013).

Secara morfologis, sel nekrotik ditandai dengan pembengkakan organel, seperti retikulum endoplasma dan mitokondria, pecahnya membran plasma dan lisis sel. Pada apoptosis, nukleus menjadi mengembang dan sebagian besar tetap utuh. Kematian nekrotik biasanya diikuti oleh reaksi peradangan (Nikoletopoulou *et al.*, 2013).

2.3.2 Mekanisme Apoptosis

Apoptosis seluler dapat dirangsang melalui dua rute utama yaitu jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik. Jalur ekstrinsik, juga dikenal sebagai jalur reseptor kematian, melibatkan interaksi yang dimediasi reseptor transmembran yang

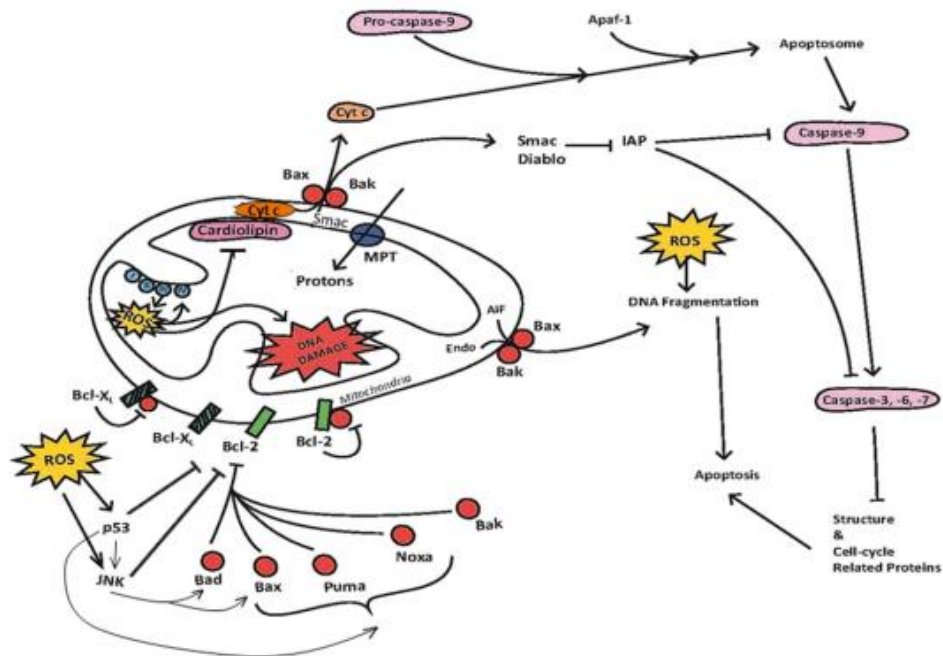
distimulasi oleh reseptor kematian superfamili reseptor TNF. Beberapa contoh pasangan ligan / reseptor kematian yang terlibat dalam jalur pensinyalan ini meliputi : *Fatty Acid Synthetase Ligand (FasL) / Fatty Acid Synthetase Receptor (FasR)*, *TNF α /Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (TNFR1)*, *Apo3 Ligand (APO3L) / Death Receptor 3 (DR3)*, *Apo2 Ligand (APO2L or TRAIL) / Death Receptor 4 (DR4)*, dan *APO2L atau TRAIL / death receptor 5 (DR5)*. Reseptor kematian yang diaktifkan kemudian merekrut protein adaptor, domain kematian terkait Fas. Rekrutmen ini mengarah pada pembentukan kompleks pensinyalan yang menginduksi kematian, yang pada gilirannya mengaktifkan caspase 8. Caspase-8 kemudian mengaktifkan caspases efektor hilir seperti caspase-3 dan caspase-7. Setelah aktivasi caspase 3 / caspase-7 terjadi, eksekusi kematian sel dimulai (Rager, 2015).

Mekanisme apoptosis dengan jalur internal juga disebut sebagai jalur termediasi mitokondria. Ini adalah jalur yang diaktifkan dengan sinyal ekstraseluler atau cedera DNA. Jalur ini dimulai ketika adanya sinyal kerusakan DNA yang dapat mengaktifkan p 53, kemudian menginduksi apoptosis melalui beberapa mekanisme. Jalur apoptosis yang bergantung pada caspase dipengaruhi oleh beberapa sistem kontrol, termasuk anggota keluarga Bcl-2 dan Bcl-X1. Selain itu terdapat anggota keluarga Bcl-2 yang memiliki efek pro-apoptosis dengan memfasilitasi pelepasan sitokrom C yaitu Bax dan Bid (Fan *et al.*, 2005).

Di membran luar mitokondria sel sehat, protein Bcl-2 diekspresikan sebagai protein permukaan membran. Protein Bcl-2 terikat pada Apaf-1. Peristiwa ini menyebabkan sitokrom-c yang ada di mitokondria bocor ke sitoplasma. Bersama dengan sitokrom-c dan Apaf-1 yang dilepaskan, mereka melekat pada molekul caspase-9. Molekul sitokrom-c, Apaf-1 dan caspase-9

bersatu di hadapan ATP, membentuk kompleks yang disebut sebagai apoptosom (Onal *et al.*, 2016).

Aktivitas caspase-9 akan mengaktifkan efektor caspase lain yaitu caspase-3, 6 dan 7. Dari kedua jalur intrinsik dan ekstrinsik akan mengaktifkan caspase-3 yang menyebabkan apoptosis (Fan *et al.*, 2005).



Gambar 2. 7 Aktivasi Jalur Mitokondria (Intrinsik) dari Apoptosis Oleh ROS (Dutordoier *et al.*, 2016).

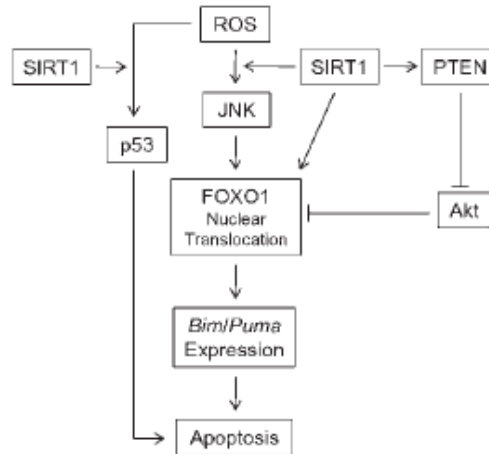
Berdasarkan gambar 2.7 ROS yang dihasilkan secara eksogen atau endogen dapat mengaktifkan p53 dan / atau c-Jun N-terminal kinase (JNK), yang mengaktifkan protein Bcl-2 pro-apoptotik (lingkaran merah) Bad, Bax, Puma, Noxa, Bak yang dapat menghambat fungsi protein anti-apoptosis Bcl-2 (oblong hijau). ROS menyebabkan oksidasi kardiolipin, yang melepaskan sitokrom C, yang memungkinkan pelepasannya ke dalam sitosol. Selain itu, ROS menyebabkan depolarisasi membran mitokondria dan / atau pembukaan saluran Bax / Bak pada OMM, yang memungkinkan pelepasan AIF, Endo G, sitokrom c dan Smac / Diablo ke sitosol. Sitokrom C kemudian membentuk kompleks

apoptosome di sitosol dengan Apaf-1 dan procaspase-9, yang mengarah ke aktivasi caspase-9. Caspase-9 kemudian mengaktifkan caspase efektor seperti caspase-3, mengakibatkan pembelahan protein seluler dan kematian sel oleh apoptosis. AIF dan Endo G mentranslokasi ke nukleus dan tampaknya terlibat dalam fragmentasi DNA. ROS dapat secara langsung menyebabkan kerusakan pada DNA dan mitokondria (Dutordoir *et al.*, 2016).

2.3.3 SIRT 1 dan Apoptosis

Keterlibatan SIRT 1 dalam kontrol siklus sel dan apoptosis didokumentasikan dengan baik. Dalam sel sehat, SIRT 1 memiliki efek anti-apoptosis yang diberikan melalui penghambatan protein Bax dan p53 melalui stimulasi protein Bcl-xL (Sirotkin *et al.*, 2014). Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa SIRT 1 memiliki efek anti apoptosis. Represi SIRT 1 membuat sel-sel menjadi apoptosis. Hori *et al.*, (2013) melaporkan bahwa efek pengatur apoptosis dari SIRT 1 termasuk deasetilasi protein tumor 53 (p53), Forkhead box Os (FoxOs) dan Ku70. Berdasarkan penelitian Duan *et al.*, (2015), nanopartikel NiO menekan SIRT 1 dan kemudian menginduksi apoptosis melalui hiperasetilasi p53 dan aktivasi Bcl-2-associated X protein (Bax). FoxO diketahui memainkan peran penting dalam banyak proses seluler, termasuk proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis (Zhang *et al.*, 2017). ROS mengaktifkan JNK dengan menghambat MAP kinase fosfatase (MKPs) dan mengaktifkan sinyal apoptosis yang mengatur kinase 1. Meskipun SIRT 1 telah diterima secara umum untuk melakukan deasetilasi dan mengaktifkan FoxO, fungsi SIRT 1 dalam regulasi FoxO tetap tidak jelas (Chae & Broxmeyer, 2011). Aktivasi transkripsional mereka dapat diatur oleh asetilasi dan deasetilasi. Sebagai contoh, B10 mengurangi ekspresi SIRT 1, menghasilkan peningkatan ekspresi FoxO 3a dan asetilasi diikuti oleh peningkatan ekspresi Bim dan PUMA (Huo *et al.*, 2017). Knockdown SIRT 1 menghasilkan peningkatan jumlah Bax, anggota

pro-apoptosis dari keluarga Bcl. Sebaliknya, jumlah Bcl-2, anggota anti-apoptosis dari keluarga Bcl, sangat berkurang. Pengamatan ini menunjukkan bahwa peningkatan Bax ditambah dengan berkurangnya ekspresi Bcl-2 adalah salah satu mekanisme yang menghasilkan peningkatan apoptosis oleh knockdown SIRT 1 (Zhou *et al.*, 2017).



Gambar 2. 8 Skematik Fungsi SIRT 1 pada Apoptosis yang Diinduksi ROS (sel mES).

Keterangan : SIRT 1 diperlukan untuk aktivasi JNK yang diinduksi ROS, yang menghasilkan aktivasi dan translokasi nuklir FOXO1 untuk menginduksi ekspresi Bim/Puma. SIRT 1 juga secara positif mengatur FOXO1 dengan deasetilasi langsung dan melalui inaktivasi Akt. Bersama dengan p53, Bim/Puma memulai apoptosis yang dimediasi mitokondria (Chae & Broxmeyer, 2011).

2.4 Aktivitas Lokomotor

Lokomotor adalah aktivitas motorik berulang yang melibatkan aktivitas pada otot tungkai dan tubuh dengan ritme dan pola yang tepat. (Kiehn & Dougherty, 2013). Lokomotor penting untuk mencari makan, memberi makan, melarikan diri dari ancaman dan menghasilkan keturunan. Perilaku lokomotor seperti berenang, berjalan, merangkak, dan terbang semuanya dihasilkan oleh jaringan neuron yang dikenal sebagai *Central Pattern Generator (CPGs)*, yang terletak di sumsum tulang belakang di vertebrata dan di saraf ventral pada invertebrata (Berg *et al.*, 2018).

Penelitian pada vertebrata, termasuk manusia, tahapan lokomotor yang tepat dihasilkan oleh sirkuit di sumsum tulang belakang. Perilaku lokomotor dilakukan oleh basal ganglia kemudian diaktifkan sirkuit di daerah lateral dan medial hipotalamus. Output neuron dari ganglia basal ke thalamus kemudian diproyeksikan ke motor cortex dan ke daerah lokomotor mesencephalic. Inisiasi lokomotor dimediasi neuron yang berada di *Mesencephalic Locomotor Region* (MLR) kemudian diproyeksikan ke neuron dalam pembentukan medial reticular di batang otak bagian bawah. Neuron dalam reticular medial ke *Central Pattern Generator* (CPG) di sumsum tulang belakang dan terjadi suatu gerakan. Serabut neuro dari jalur tulang belakang vestibular dan rubrospinal (*Brainstem nuclei*) mempertahankan keseimbangan dan memodulasi aktivitas CPG lokomotor yang sedang berlangsung. Cerebellum mengkoordinasikan perilaku motorik dengan memediasi *generate feedback*, umpan balik internal dan memodulasi aktivitas jalur retikulospinal, rubrospinal, dan vestibulospinal yang menurun. Umpan balik sensorik proprioaktif memodulasi aktivitas lokomotor CPG dan dikirim ke otak kecil. Otak kecil menerima sinyal yang memantau aktivitas internal CPG. Aktivitas kortikal memberikan koreksi visuomotor melalui pergerakan korteks parietal posterior (Kiehn & Dougherty, 2013).

Granato et al. (1996) menggambarkan perkembangan normal aktivitas lokomotor pada embryogenesis zebrafish. Pada 18 hpf, kontraksi otot spontan dimulai, dan pada 24 hpf stimulasi mekanik akan menyebabkan embrio berkedut.

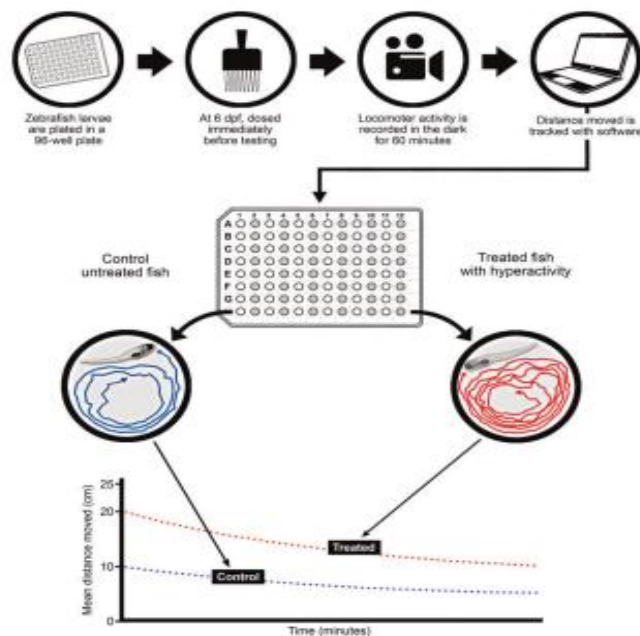
Pada 48 hpf, embrio mampu melakukan respons ekor-balik ketika ujung ekor disentuh serta respon berlari cepat ketika disentuh di kepala. Penelitian lain menunjukkan bahwa lokomotor pada larva zebrafish terdiri dari sekelompok kecil elemen motorik yang khas (Colwill & Creton, 2012). Rangsangan sensoris dari depan menyebabkan perubahan gerakan kesisi yang berlawanan, sementara rangsangan dari belakang menyebabkan pergerakan kedepan. Keadaan ini

diperkirakan terjadi karena informasi sensorik diintegrasikan pada retikulospinal batang otak termasuk neuron mauthner (neuron yang bertanggung jawab terhadap pembentukan reflek yang cepat, seperti melarikan diri) untuk mengaktifkan neuron motorik kontra lateral (Umeda *et al.*, 2016). Aktivitas lokomotor dan motilitas ini dapat terjadi fungsi sistem saraf pusat sebagai perencanaan dan koordinasi. Perencanaan gerakan yang sesuai dengan informasi dari rangsang sensoris diperlukan agar gerakan dapat mencapai tujuan yang tepat. Selain itu diperlukan kontraksi beberapa otot secara bersamaan sehingga terjadi kontraksi otot yang terstruktur dan dapat menghasilkan gerakan yang diinginkan. Apabila terdapat gangguan pada sistem saraf pusat atau struktur lain, maka dapat menyebabkan perubahan aktivitas lokomotor dan motilitas (Dunn *et al.*, 2016).

Pattern lokomotor pada zebrafish berubah secara dinamis sejak embriogenesis, mencerminkan perkembangan yang terkoordinasi antara otot, sirkuit saraf, dan sambungan neuromuskuler. Rangkaian gerak yang mendasari sirkuit dalam zebra larva telah dipelajari dengan sangat rinci. Kontraksi embrio spontan yang paling awal disebabkan oleh depolarisasi periodik dari jaringan premotor yang secara elektrik mendahului transmisi neurotransmisi kimia di sumsum tulang belakang. Larva 27 hpf menunjukkan renang lambat yang sebagian besar digerakkan oleh sinyal ritmik dari pensinyalan glutamatergik yang digabungkan dengan input glikinergik tonik yang merupakan *drive* sinaptik. Pada 3 hari perkembangan, sumsum tulang belakang larva membentuk generator pola sentral yang memungkinkan sirkuit lokomotor berfungsi secara mandiri bahkan tanpa adanya input otak belakang. Secara paralel, proyeksi dari otak belakang mencapai sumsum tulang belakang, menyebabkan input dari sistem visual dan sistem sensorik lainnya diintegrasikan. Pada tahap perkembangan selanjutnya, bagian dada dan ekor berkembang dan pola renang pada akhirnya berubah

menjadi model dewasa. Pada tahap matang ada beberapa neurotransmitter yang berbeda yang mengontrol fleksibilitas dan *fine tuning output* lokomotor, seperti serotonin, dopamin, GABA, glutamat, glisin dan neurotransmitter lainnya (Norton, 2012).

Perbedaan aktivitas lokomotor pada zebrafish jantan dan betina tidak tergantung pada panjang atau berat zebrafish meskipun zebrafish betina rata-rata lebih besar daripada jantan. Perbedaan aktivitas lokomotor pada zebrafish dikaitkan dengan perbedaan fungsi otak masing-masing individu (Tran & Gerlai, 2013). Gerakan lokomotor pada zebrafish dapat diukur dengan menghitung jarak yang ditempuh persatuan waktu (menit) (de Esch *et al.*, 2012), frekuensi, kecepatan berenang, waktu berenang aktif (Ingebretson & Masino, 2013).



Gambar 2. 9 Contoh Protokol Penilaian *Pattern* Locomotor Larva Zebrafish.

Keterangan : Zebrafish diberikan paparan sebelum penilaian. Aktivitas lokomotor direkam dengan perangkat lunak kemudian di analisis untuk mendapatkan jarak (cm) / satuan waktu (min) (Stevens *et al.*, 2017).

2.5 Osifikasi Tulang Keras

Osifikasi tulang atau osteogenesis merupakan proses pembentukan tulang. Proses ini dimulai pada minggu keenam dan ketujuh perkembangan

embriodik dan berlanjut sampai usia dua puluh lima, walaupun akan berbeda pada setiap orang. Ada dua jenis osifikasi tulang, intramembran dan endokondral. Masing-masing proses ini dimulai dengan prekursor jaringan mesenchymal. Osifikasi intramembran secara langsung mengubah jaringan mesenkim menjadi tulang dan membentuk tulang tengkorak, klavikula, dan sebagian besar tulang tengkorak. Osifikasi endokondral di mana jaringan tulang menggantikan tulang rawan hialin yang sudah ada sebelumnya, misalnya selama pembentukan dasar tengkorak. Sel formatif yang sama membentuk dua jenis pembentukan tulang dan struktur akhir tidak jauh berbeda (Setiawati & Rahardjo, 2018).

Pada fase awal perkembangan, tulang embrio sekitar usia minggu ke 3 dan ke 4 terbentuk 3 lapisan germinal yaitu ektoderm, mesoderm dan endoderm. Lapisan ini multipotensial yang dapat menjadi mesenkim dan selanjutnya berdiferensiasi membentuk jaringan tulang rawan (Helmi, 2013).

Pada zebrafish, seperti pada semua ikan bertulang, dua jenis osifikasi terjadi yaitu osifikasi endochondral atau osifikasi intramembran. Dalam zebrafish, neurocranium (perichondral) dan lengkung faring (endochondral) berkembang dengan penggantian prekursor tulang rawan. Sementara sebagian besar tulang neurokranial mengeras relatif terlambat, banyak tulang lengkung endokondral memulai osifikasi dari 6 hingga 7 hari pasca fertilisasi (dpf). Di sisi lain, dalam pengembangan tulang intramembran, sel punca mesenkim berdiferensiasi menjadi osteoblas mulai membentuk matriks tulang mineral. Tulang dermal pertama berkembang awal dan termasuk opercle (3 dpf), parasphenoid (4 dpf), dan sinar branchiostegal (4 hingga 5 dpf) sedangkan lempeng dermal yang menutupi tengkorak muncul kemudian. Kolom vertebral dibentuk oleh osifikasi intramembran dan tubuh vertebralisasi secara progresif dalam arah kranio-

kaudal. Dalam ikan zebra, tubuh vertebral terbentuk tanpa adanya tulang rawan melalui mineralisasi notochord (Mariotti *et al.*, 2015).

2.5.1 Kaitan ROS dengan Osifikasi Tulang

ROS menginduksi apoptosis pada osteoblas dan osteosit, sel-sel terlokalisasi dalam matriks tulang dan berasal dari osteoblas dewasa, sehingga mendukung osteoklastogenesis (Domazetovic, 2017). ROS menginduksi apoptosis melalui aktivasi protein p38 dan merangsang aktivasi transkripsi FoxOs.

Aktivasi FoxOs menurunkan β catenin yang merupakan faktor transkripsi T-cell dan berperan pada osteoblastogenesis (Almeida *et al.*, 2010). Dalam prekursor osteoklas, aktivasi RANKL diinduksi oleh RANK yang merangsang produksi ROS, yang penting untuk osteoklastogenesis. ROS menginduksi terjadinya resorpsi tulang melalui modulasi kinase dan kegiatan faktor transkripsi di kedua osteoklas dan osteoblas (Kajarabille *et al.*, 2013). ROS memperoleh spektrum respons mulai dari proliferasi, pertumbuhan, hingga diferensiasi kematian sel, dengan mengaktifkan banyak jalur pensinyalan. Tingginya kadar ROS menghalangi dan mengurangi aktivitas dan diferensiasi osteoblas. Kejadian-kejadian ini meningkatkan pergantian remodeling tulang dengan perubahan yang berakibat dan penurunan massa tulang (Domazetovic, 2017).

2.6 Hubungan Apoptosis, SIRT 1, Lokomotor dan Osifikasi Tulang Keras

Timbal dapat menyebabkan kematian sel melalui jalur apoptosis mitokondria. Neuroapoptosis yang dipicu oleh timbal terdeteksi di sejumlah daerah otak. Daerah yang paling parah yaitu lapisan kortikal superfisial, caudat nukleus, dan subkulum. Paparan timbal kronis pada anak-anak terjadi selama perkembangan saraf, mengakibatkan gangguan kognitif dan perilaku (Dribbena *et al.*, 2011). Apoptosis karena toksisitas timbal juga dapat mengurangi osifikasi tulang. Mekanisme apoptosis yang diinduksi timbal melalui pengaktifan simpanan kalsium intraseluler karena penurunan kadar protein dan aktivitas enzim PC-

PLC. Kalsium memiliki peran penting dalam pergantian tulang dengan mengatur osteoblas dan osteoklas. Jalur pensinyalan kalsium memainkan peran penting pada osteoblastogenesis, aktivitas osteoblas dan apoptosis osteoblas (Ma *et al.*, 2015). Akson motor neuron fungsional penting untuk aktivitas lokomotor pada embrio dan larva, dan motor neuron akson yang rusak menyebabkan gangguan lokomotor (Zhang *et al.*, 2015). Aktivitas gerak zebrafish juga dipengaruhi oleh sistem otot aksial, apabila terdapat gangguan pada otot aksial akan menyebabkan penurunan aktivitas lokomotor. Apoptosis dapat dihambat melalui aktivasi SIRT 1. Aktivasi SIRT 1 memainkan peran penting pada neuroprotektif dapat menjadi pelindung selama apoptosis karena kerusakan mitokondria dengan mendeasetilasi berbagai substrat seperti foxo, p 53, PGC 1 α (Zhou *et al.*, 2018).

2.7 Embryogenesis

2.7.1 Pengertian

Embriogenesis merupakan proses pembelahan dan diferensiasi sel pada perkembangan dan pertumbuhan embrio. Di mulai dari implantasi hingga akhir minggu kedelapan setelah pembuahan, setelah itu disebut janin (Brevini & Pennarossa, 2012).

2.7.2 Tahapan Embriogenesis

1. Fertilisasi

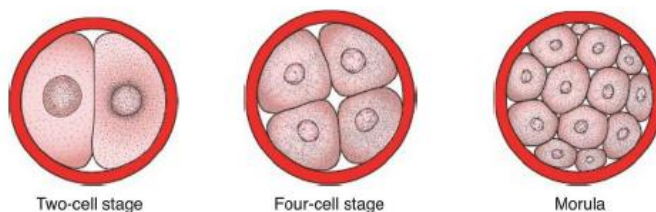
Fertilisasi adalah proses dimana spermatozoon dan oosit bersatu untuk menghasilkan organisme baru yang secara genetik unik. Pada mamalia, peristiwa ini terjadi di daerah ampull saluran telur (Brevini & Pennarossa, 2012).

Fertilisasi dimulai dengan masuknya spermatozoa ke ovum, fusi spermatozoa dan ovum dan fusi materi genetik. Spermatozoa harus melewati korona radiata dan zona pelusida agar dapat mencapai ovum. Ketika spermatozoa mampu masuk kedalam zona pelusida maka terjadi reaksi korteks

ovum yang menyebabkan glikoprotein yang terdapat di zona pelusida akan berikatan satu sama lainnya. Masuknya spermatozoa di ovum menyebabkan nukleus ovum mengalami pembelahan meiosis kedua. Beberapa jam setelah fertilisasi terjadi proses pembelahan. Dalam 3 hari berada pada fase morula, dimana sel memiliki besar sama. Kemudian hasil konsepsi ini disalurkan ke arah kavum uteri melalui pars ismika dan pars interstitial tuba (Saifuddin *et al.*, 2008).

2. Pembelahan (Cleavage)

Zigot mengalami serangkaian pembelahan mitosis mencapai tahap dua sel untuk meningkatkan jumlah sel. Sel-sel ini dikenal sebagai blastomer. Setelah pemuahan, kurang lebih 3 hari sel-sel dari embrio yang dipadatkan membelah lagi sehingga terbentuk 16-sel (mulberry). Sel-sel yang berada di morula membentuk *inner mass cell*, dan sel-sel diluar menjadi *outer mass cell*. *Inner mass cell* membentuk jaringan embrio yang tepat, dan *outer mass cell* membentuk trofoblast, yang kemudian berkontribusi pada plasenta (Sadler, 2017).



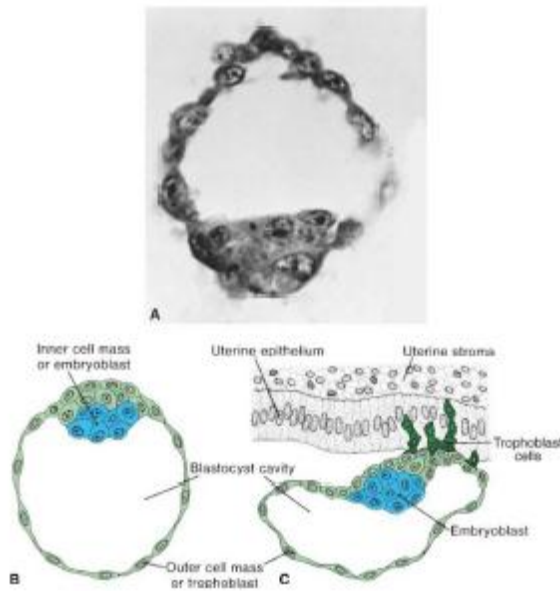
Gambar 2. 10 Perkembangan Zigot Tahap Dua Sel ke Tahap Morula Akhir

(Sadler, 2017).

3. Blastokista

Ketika morula berada di rongga rahim, cairan mulai menembus zona pelusida ke dalam ruang interselular dari *inner mass cell*. Secara bertahap, ruang antar sel menjadi pertemuan, dan akhirnya, rongga tunggal, blastokista terbentuk. Embrio berada pada fase blastokista. Sel-sel dari *inner mass cell*, sekarang disebut embryoblast, berada pada satu kutub, dan mereka dari *out*

mass cell, atau trofoblast, meratakan dan membentuk dinding epitel blastokista. Implantasi dapat dimulai. Sel trofoblastik embrioblast mulai masuk ke sel-sel epitel mukosa rahim pada hari keenam. Perkembangan pada akhir minggu pertama, zigot telah melewati tahap morula, blastokista dan mulai implantasi di dinding uterus (Sadler, 2017).



Gambar 2. 11 Gambar Blastokista

Keterangan : A. Bagian dari blastokista manusia dengan 107 sel. B. Representasi skematis dari blastokista 4,5 hari. Biru, massa sel embrioblast; hijau, trofoblas. C. Representasi skematis dari blastokista hari keenam perkembangan, dimana trofoblas dari blastokista yang menembus dinding uterus (Sadler, 2017).

4. Gastrulasi

Proses yang terjadi pada minggu ketiga adalah gastrulasi, dimana dimulai dengan terbentuknya garis primitif, memiliki nodus primitif di ujung sefalik. Pada daerah nodus dan garis, epiblas bergerak masuk (invaginasi) untuk membentuk lapisan sel baru, endoderm dan mesoderm. Sel-sel yang tetap berada di epiblas membentuk ektoderm. Oleh sebab itu, epiblas membentuk ketiga lapisan germinativum pada mudigah, ektoderm, mesoderm, dan endoderm, dan lapisan-lapisan ini membentuk seluruh jaringan dan organ. Pada akhir minggu ketiga, ketiga lapisan germinativum

dasar, yang terdiri dari ektoderm, mesoderm, dan endoderm, dibentuk di daerah kepala, dan berlanjut membentuk ketiga lapisan germinativum ke bagian lebih kaudal mudigah sampai minggu keempat akhir. Jaringan dan organ mulai mengalami diferensiasi, dengan arah sefalokaudal seiring dengan berlanjutnya gastrulasi. Sementara itu, trofoblas berkembang pesat.

Lapisan germinativum ektoderm membentuk bagian organ yang kontak dengan dunia luar seperti sistem saraf pusat, sistem saraf tepi, pitel sensorik telinga, hidung dan mata, kulit, termasuk rambut dan kuku; dan hipofisis, kelenjar mamaria dan keringat, serta enamel gigi. Lapisan germinativum endoderm membentuk epitel yang melapisi saluran cerna, saluran napas, kandung kemih, parenkim tiroid, paratiroid, hati dan pankreas. Terakhir, epitel yang melapisi kavitas timpanika dan tuba auditiva juga berasal dari lapisan germinativum endoderm (Sadler, 2017).

2.8 Pegagan (*Centella asiatica*)

2.8.1 Deskripsi Pegagan (*Centella asiatica*)

Centella asiatica (Linn.) Urban, rumpun herba abadi klonal milik keluarga Umbelliferae (Apiaceae) adalah tanaman penting dengan berbagai nilai tradisional, obat dan terapeutik. Ramuan ini ditemukan hampir di seluruh dunia dan dimanfaatkan sebagai sumber makanan, minuman, obat-obatan (Gohil *et al.*, 2010).



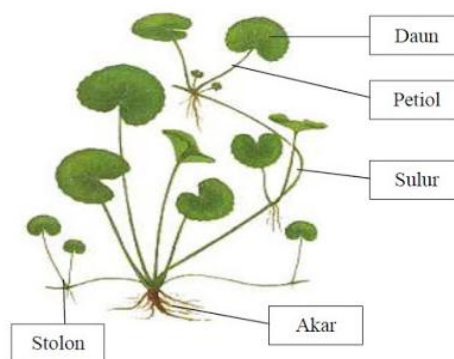
Gambar 2. 12 Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) (Das, 2011).

Taxonomy Pegagan (*Centella asiatica*)

- Kingdom : Plantae
- Division : Tracheophyta
- Subdivision : Spermatophytina
- Clas : Magnoliopsida
- Order : Apiales
- Family : Apiaceae
- Genus : *Centella*
- Species : *Centella asiatica*

2.8.2 Morfologi Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan (*Centella asiatica*) termasuk dalam tumbuhan herba aromatik dimana mengandung minyak esensial seperti resin dibagian tubuhnya, pertumbuhannya merayap diatas tanah dan dapat berbunga setiap tahun (Das, 2011). Pegagan (*Centella asiatica*) tumbuh subur di tempat yang teduh, berawa, lembab dan basah seperti sawah, tepi sungai membentuk seperti karpet hijau yang padat, bukan di tanah liat, tanah liat berpasir (60% pasir) merupakan tanah yang paling subur untuk regenerasinya (Singh *et al.*, 2010).



Gambar 2. 13 Bagian dari Pegagan (*Centella asiatica*)

Daun, 1-3 dari setiap simpul batang, panjang tangkai daun 2-6 cm dan lebar 1,5-5 cm, orbicular-renniform, dasar daun selubung, margin crenate,

glabrous pada kedua sisi. Bunga-bunga berada dalam *umbels fascicled*, masing-masing umbel yang terdiri dari 3-4 putih ke unguan atau bunga merah muda, berbunga di bulan April-Juni. Berbuah sepanjang musim tanam, kira-kira panjang 2 inci, bujur, bentuk bulat dan sangat menebal pericarp. Tanaman ini asli Asia Tenggara, India, Sri-Lanka, bagian dari Cina, Kepulauan Laut Selatan Barat, Madagaskar, Afrika Selatan, Amerika Serikat Tenggara, Meksiko, Venezuela, Columbia, dan Amerika Selatan Bagian Selatan (Tiwari & Gehlot, 2011).

2.8.3 Kandungan Pegagan (*Centella asiatica*)

1. Triterpenoid

Saponin, asiaticoside dan madecassoside, dan aglikon, asam asiatik dan asam madecassic, adalah triterpenoid pentasiklik yang paling melimpah di *Centella asiatica*. Jumlah saponin hingga 8% dari berat ramuan kering (James & Dubery 2011).

Asam brahmik, asam isobrahmik, brahminosida, dan brahmosida yang ada di Pegagan (*Centella asiatica*) telah menunjukkan beberapa sifat psikotropika, obat penenang, dan antikonvulsan. Ini juga berguna dalam demensia, gangguan mental, dan kecemasan (Singh *et al.*, 2010). Dengan demikian, formulasi polyherbal yang mengandung Pegagan (*Centella asiatica*) memberikan kontribusi untuk peningkatan memori, perhatian, dan konsentrasi pada anak-anak dengan ketidakmampuan belajar (Upadhyay *et al.*, 2002).

2. Karotenoid

Karotenoid adalah salah satu fitonutrien terpenting yang ditemukan di pegagan (*Centella asiatica*). Karotenoid, pigmen tanaman berwarna-warni, beberapa di antaranya dapat berubah menjadi vitamin A, yang merupakan antioksidan kuat yang dapat membantu mencegah penyakit kanker dan penyakit kardiovaskuler dan bertindak untuk menambah respons kekebalan terhadap infeksi (Chandrika & Kumarab, 2015).

3. Glikosida

Glikosida adalah molekul di mana kelompok gula terikat melalui karbon anomernya ke kelompok lain dengan ikatan glikosida. Pegagan (*Centella asiatica*) menyimpan glikosida dalam bentuk tidak aktif. Glikosida ini diaktifkan dengan hidrolisis. Asiaticoside, madecosside, dan centelloside adalah glikosida yang ada di dalam tanaman. Pada hidrolisis, mereka menghasilkan asam terpene, asam asiatik, asam madegascari, dan asam centellic, dan semua ini terdapat dalam bentuk bebas di tanaman (Das, 2011).

4. Volatiles dan Fatty Oils

Tanaman ini mengandung sekitar 36% dari volatil dan minyak lemak. Minyak lemak terdiri dari gliserida asam palmitat, stearat, lignoserat, oleat, linoleat, dan linolenat. Konstituen utama yang ada dalam minyak pegagan (*Centella asiatica*) terdiri dari terpenic asetat, sementara konstituen utama lainnya adalah β -caryophyllene, farnesene, trans- β -farnesene, germacrene-D, α -humulene, bicyclogermacrene, sesquiterpene, dan p-cymol (Das, 2011; Joshi & Chaturvedi, 2013).

5. Flavonoid

3- β glucosyl quercetin, 3- β glucosylkaempferol, 7- β - glucosylkaempferol, kaempferol & quercetin diisolasi dari daun (Pal & Pal, 2016).

6. Kandungan lainnya

Tanaman ini dilaporkan mengandung tanin, asam anorganik, gula, resin, dan asam amino, yaitu asam aspartat, glisin, asam glutamat, α -alanin, dan fenilalanin. Tanin bertindak sebagai antioksidan (Rahman *et al.*, 2013).

7. Komposisi Nutrisi

Centella asiatica memiliki sumber mineral yang kaya (termasuk zat besi, kalsium, kalium, dan magnesium) dan vitamin, termasuk vitamin K, C, E, dan banyak vitamin B. Pada *Centella asiatica* juga banyak ditemukan makronutrien

terutama protein, karbohidrat dan serat. Pegagan juga mengandung fitonutrien seperti β -karoten, lutein, neoxanthin, dan zeaxanthin (Chandrika & Kumarab, 2015).

Tabel 2. 2 Kandungan Nutrisi dalam Pegagan (*Centella asiatica*)

Komposisi	Jumlah
Moisture	84,6 %
Protein	2,4 %
Serat (per 100 gr)	5,43 g
Soluble Dietary	0,49 g
Mineral	
Ca (mg/100g)	174
P	17
K	345
Na	107,8
Mg	87
Fe	14,86
Zn	0,97
Cu	0,24
Cr	0,046
Vitamin (mg/100 gr)	
Asam Askorbic	11
Thiamin	0,04
Caroten	25,93
B Caroten	3,90

Sumber : (Das, 2011; Hashim, 2011)

2.8.4 Manfaat Pegagan (*Centella asiatica*)

1. Antioksidan

Centella asiatica memiliki aktivitas antioksidan yang kuat, yang dapat memberikan efek neuroprotektif dan efek terhadap kerusakan oksidatif yang terkait usia pada tikus otak (Subathra *et al.*, 2005). Enzim anti-oksidan, seperti superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathione peroxidase (GSHPx) meningkat secara signifikan, dan anti-oksidan seperti glutathione (GSH) dan asam askorbat menurun pada tikus yang mengandung limfoma setelah pengobatan oral dengan 50mg / kg berat badan per hari dari ekstrak metanol mentah pegagan (*Centella asiatica*) selama 14 hari (Jayashree *et al.*, 2003).

Administrasi ekstrak air dari pegagan (*Centella asiatica*) menunjukkan untuk

melawan stres oksidatif tikus yang diinduksi oleh timbal (Sainath *et al.*, 2011). Senyawa flavonoid hadir dalam ekstrak air pegagan (*Centella asiatica*), menunjukkan properti antioksidan tertinggi (Pittella *et al.*, 2009). Kemampuan flavonoid untuk bertindak sebagai antioksidan tergantung pada struktur molekulnya, ditandai oleh dua atau lebih cincin aromatik dengan setidaknya satu atau lebih gugus hidroksil masing-masing dan elektron terkonjugasi yang juga memberikan sifat pengikat logam. Quercetin salah satu flavonoid yang dapat berfungsi sebagai chelator pada timbal (Pb) dengan membentuk ikatan koordinasi antara logam timbal dan kelompok orto-fenoliknya. Liu dan rekan kerja mempelajari mekanisme perlindungan quercetin terhadap cedera hati dan ginjal yang diinduksi timbal. Mereka menemukan bahwa quercetin secara signifikan menurunkan tingkat malondialdehyde (MDA), H_2O_2 , dan ROS dan menurunkan rasio GSH / GSSG di hati dan ginjal tikus yang diberi timbal. Lebih lanjut, bioflavonoid ini secara nyata memulihkan aktivitas Cu / Zn SOD, CAT dan GPx dan mengurangi kerusakan oksidatif DNA dan apoptosis di hati dan ginjal tikus yang diberi timbal (Carocci *et al.*, 2016).

2. Anti inflamasi

Ekstrak *Centella asiatica* memberikan efek anti-inflamasi melalui pengurangan reaksi radiasi akut pada tikus. Ekstrak air *Centella asiatica* dan asiaticoside memiliki sifat anti-inflamasi yang disebabkan oleh inhibisi sintesis Nitrite Oxide dan dengan demikian memfasilitasi penyembuhan ulkus. Ekstrak kasar *Centella asiatica* menunjukkan aktivitas anti inflamasi pada tikus dengan prostaglandin E2 yang menginduksi edema paw. Asam terpen bioaktif seperti asam asiatic dan asam madecassic dapat ditemukan dalam ekstrak kasar yang dapat menjelaskan aktivitas anti inflamasi (Uddin *et al.*, 2017).

3. Antimikroba

Pegagan (*Centella asiatica*) sebagai antibakteri terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. Pertumbuhan penghambatan Gram positif *Bacillus subtilis* dan Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cichorii* dan *Escherichia coli* diamati pada uji difusi cakram ekstrak heksana dan etil asetat pegagan (*Centella asiatica*). 1.000 µg / disc ekstrak metanol panas cukup efektif pada *Staphylococcus aureus* dan Methicillin Resistant *S. aureus* (Wild Type) (Zaidan *et al.*, 2005). *Micobacterium tuberculosis* dan *M. leprae* dilaporkan lebih sensitif terhadap asiaticoside liposomal daripada asiaticoside gratis. Aktivitas antivirus yang lebih tinggi juga dilaporkan dengan ekstrak air pegagan (*Centella asiatica*) terhadap tipe 2 Herpes simpleks virus (Roy & Barman, 2013).

4. Antidiabetes

Ekstrak etanolik dan metanol pegagan (*Centella asiatica*) telah menunjukkan perlindungan yang signifikan dan menurunkan glukosa darah ke tingkat normal dalam tes toleransi glukosa yang dilakukan pada tikus dengan diabetes dipapar aloksan (Chauhan *et al.*, 2010).

5. Neuroprotektif

Ekstrak berair menunjukkan efek neuroprotektif dengan meningkatkan tingkat enzim antioksidan pada tikus corpus striatum dan hipocampus (Haleagrahara & Ponnusamy, 2010). Ekstrak daun segar pegagan (*Centella asiatica*) menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam panjang dendritik dan poin bercabang (Rao *et al.*, 2012). Ekstrak air pegagan (*Centella asiatica*) menghambat aktivitas subtipe fosfolipase A2, yang terkait dengan penyakit neurodegeneratif (Defillipo *et al.*, 2012). D-galaktosa menginduksi disfungsi oksidatif dan mitokondria dan gangguan kognitif pada tikus, yang dapat meningkat secara signifikan dalam enam minggu dengan pemberian pegagan (*Centella asiatica*) (150 dan 300 mg / kg berat badan) (Kumar *et al.*, 2011).

Paparan aluminium kronis pada tikus menginduksi disfungsi kognitif, apoptosis, stres oksidatif dan perubahan enzim mitokondria dan administrasi pegagan (*Centella asiatica*) menemukan penurunan konsentrasi aluminium secara signifikan, peningkatan kinerja memori, pertahanan oksidatif, aktivitas acetylcholinestrase, caspase-3 dan pembalikan aktivitas enzim mitokondria dibandingkan untuk mengendalikan (Prakash & Kumar, 2012). Peran psikoaktif dan antioksidan dari ekstrak etanolik pegagan (*Centella asiatica*) pada oklusi arteri serebral media pada tikus dievaluasi dan mengungkapkan bahwa pemberian ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) memulihkan morfologi histologis otak, volume infark yang berkurang, sangat meningkatkan aktivitas neurobehavioral (Prakash & Kumar, 2012).

2.8.5 Keamanan dan Dosis Pegagan (*Centella asiatica*)

Penggunaan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dalam dosis yang disarankan tidak akan menyebabkan efek samping yang serius, penggunaan topikal pegagan (*Centella asiatica*) dalam jumlah besar dapat menyebabkan alergi kulit dan sensasi terbakar, sakit kepala, sakit perut, mual, pusing dan kantuk. Fresh *Centella asiatica* dapat menyebabkan ruam kulit. Penggunaan pegagan (*Centella asiatica*) secara berlebihan atau overdosis dapat menyebabkan sakit kepala dan ketidaksadaran sementara. Penggunaan pegagan (*Centella asiatica*) dalam jangka waktu yang lama dapat menghambat kehamilan dengan menyebabkan aborsi spontan dan karena pegagan (*Centella asiatica*) dapat menyebabkan sedasi, telah diperingatkan bahwa individu harus membatasi mengkonsumsi pegagan dengan obat yang meningkatkan tidur atau mengurangi kecemasan (Uddin *et al.*, 2017). Penelitian lainnya menunjukkan bahwa pemberian oral dosis tunggal dan dalam 90 hari tidak menghasilkan efek toksik yang bermakna dengan median $LD_{50} > 2000$ mg/kg,

NOAEL 1000 mg/kg/hari untuk kedua jenis kelamin, dan tidak ada potensi mutagenisitas (Deshpande *et al.*, 2015).

2.8.6 Pegagan (*Centella asiatica*) dan Osifikasi Tulang

Asiaticoside salah satu kandungan pegagan memiliki efek positif terhadap aktivitas dan mineralisasi osteoblas pada sel-sel ligamen periodontal manusia.

Asiaticoside memiliki efek supresif pada pembentukan osteoklas yang diinduksi oleh RANKL dan resorpsi tulang, melalui pelemahan pensinyalan NFATc1 dan jalur NF- κ B (He *et al.*, 2018). Pegagan (*Centella asiatica*) juga memiliki

kandungan kalsium yang cukup besar. Pemberian suplemen kalsium selama periode neonatal mempengaruhi deposisi mineral tulang neonatal dan *Mesenchymal Stem cells* (MSC) sumsum tulang. Kekurangan kalsium pada masa neonatal dapat mengurangi osteogenik MSC (Li & Stahl, 2014).

Berdasarkan penelitian *in vivo* dan *in vitro* Feng *et al.*, (2015), diet tinggi kalsium dikombinasikan dengan *Parathyroid Hormone* (PTH) yang tinggi dapat merangsang proliferasi dan diferensiasi osteoblas, dan merangsang pembentukan tulang osteoblastik dengan mengatur ekspresi *Calcium Sensing Receptor*, *Thrombin Receptor Activator Peptide 6*, dan IGF-1.

2.9 Zebrafish (*Danio rerio*)

2.9.1 Klasifikasi

Habitat alami zebrafish adalah di Asia Selatan, sungai Gangga dan cekungan sungai Brahmaputra, di timur laut India, Bangladesh, Nepal, dan Myanmar utara. Bagian selatan Asia ditandai oleh musim hujan yang panjang, musim hujan dan kekeringan, terdefinisi dengan baik, secara konstan memvariasikan ekstensi habitat perairan (Simonetti *et al.*, 2015).

Tabel 2. 3 Klasifikasi Zebrafish

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

Sumber : Richards (2011)

2.9.2 Karakteristik Zebrafish

Ukuran zebrafish tidak melebihi 40 mm (dari ujung moncong ke sirip ekor). Bentuk tubuhnya fusiform dan kompresi lateral, dengan mulut miring terminal mengarah ke atas. Rahang bawah menonjol lebih jauh dari atas dan mata sebagai pusat dan tidak terlihat dari atas. Gambaran diagnostik zebrafish adalah memiliki garis lateral tidak lengkap yang memanjang ke dasar sirip perut, dua pasang barel dan lima hingga tujuh garis memanjang biru gelap yang membentang dari belakang operculum ke dalam sirip ekor. Sirip pada dekat anus bergaris-garis, sedangkan pada sirip punggung memiliki tepi atas biru gelap, berbatasan dengan putih. Pola warna terdiri dari tiga jenis sel pigmen, melanofor biru tua, xanthophores emas dan iridofor warna-warni. Dua garis pertama terbentuk secara terpusat dengan garis-garis berikutnya ditambahkan secara berurutan di atas dan di bawah (Spence *et al.*, 2007).

Male Zebrafish

Female Zebrafish

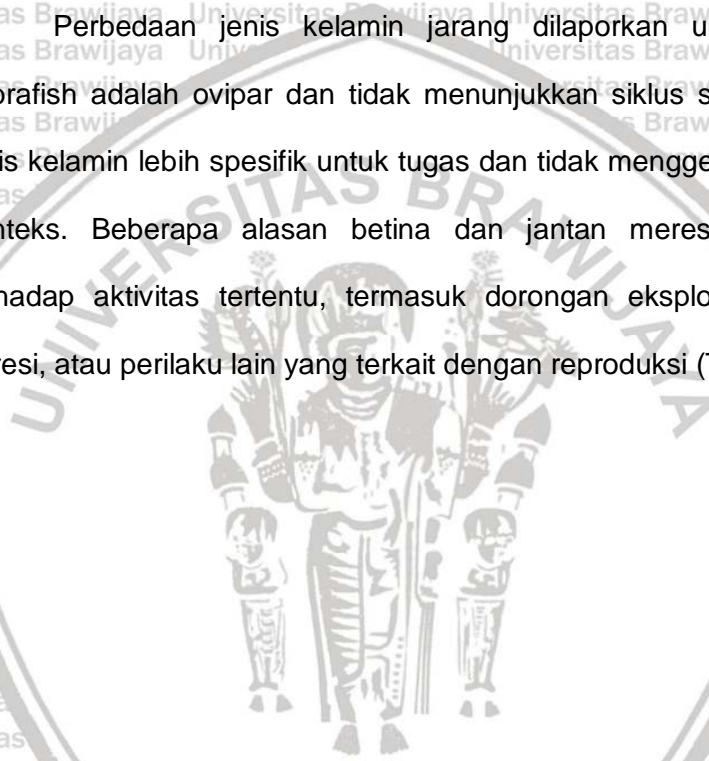


Gambar 2. 14 Karakteristik Zebrafish Jantan dan Betina

Zebrafish jantan dan betina memiliki karakteristik yang berbeda dapat dilihat dari penampilannya. Zebrafish jantan memiliki warna tubuh yang lebih

gelap, garis tubuh lebih kontras pada warna kuning atau coklat, permukaan pinggang bagian ventral lebih pipih, warna kuning lebih gelap pada bagian sirip, memiliki gerak yang lebih aktif, sedangkan zebrafish betina memiliki warna tubuh yang lebih terang dibanding jantan, ukuran betina rata-rata lebih besar, pada permukaan ventral terlihat lebih bulat, terdapat warna abu-abu kilat kebiruan pada bagian lateral tubuhnya dan gerakannya lebih lambat dibandingkan zebrafish jantan (Schilling, 2002).

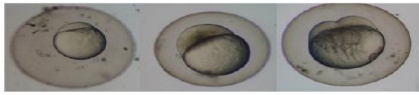
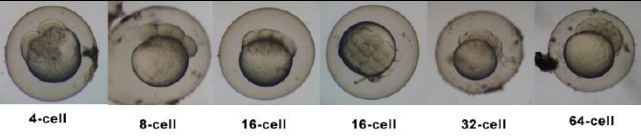
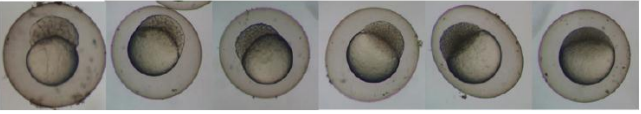
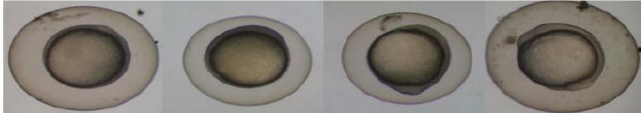

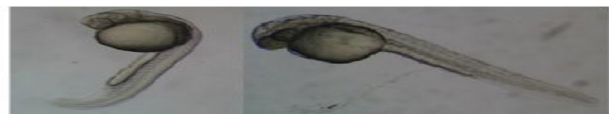


Perbedaan jenis kelamin jarang dilaporkan untuk zebrafish, betina zebrafish adalah ovipar dan tidak menunjukkan siklus seperti tikus. Perbedaan jenis kelamin lebih spesifik untuk tugas dan tidak menggeneralisasi untuk semua konteks. Beberapa alasan betina dan jantan merespons secara berbeda terhadap aktivitas tertentu, termasuk dorongan eksplorasi, kewilayahan dan agresi, atau perilaku lain yang terkait dengan reproduksi (Tran & Gerlai, 2013).



2.9.3 Perkembangan zebrafish

Tahapan perkembangan zebrafish menurut Kimmel *et al.*, (1995) adalah sebagai berikut :

Tabel 2. 4 Tahap Perkembangan Zebrafish

Periode	Keterangan
Zygote (0-0.75 jam)	 <p>zygote 1-cell 2-cell</p>
Cleavage/ Pembuahan (0.75-2.25 jam)	 <p>4-cell 8-cell 16-cell 16-cell 32-cell 64-cell</p>
Blastula (2.25-5.25 jam)	 <p>128-cell 256-cell 512-cell 1K-cell 2K-cell oblong</p>
Gastrula (5.25-10.33 jam)	 <p>80% epiboly 90% epiboly tailbud 2-somite</p>
Segmentasi (10.33-24 jam)	 <p>5-somite 10-somite 12-somite 14-somite 17-somite 18-somite 20-somite</p>
Pharingula (24-48 jam)	 <p>prim-5 prim-11</p>
Hatching (48-72 jam)	 <p>48-hour 72-hour</p>
Post Embrionic development Larva (4-29 hari)	

2.9.4 Perawatan Zebrafish

1. Karakteristik air

Kualitas air adalah faktor yang paling penting untuk kesehatan dan kesejahteraan ikan. Kualitas air yang buruk dapat menyebabkan stres dan penyakit, dan dapat mempengaruhi pembiakan (Reed & Jennings, 2011).

Tingkat kontaminasi harus diminimalkan. Ini dapat difasilitasi dengan pertukaran air yang baik, penghapusan makanan berlebih dari tangki, menjaga tangki dan sistem pembersihan dan memastikan biofilter sehat (Vargesson, 2007).

2. Kebersihan

Untuk memelihara ikan zebra dalam kondisi yang sehat, penting untuk menyediakan lingkungan yang bersih dalam sistem akuarium berfungsi dengan baik. Bagian penting dari ini adalah mengganti sistem filter secara teratur sehingga semua tangki menerima aliran air yang tepat dan air bersih. Pipa-pipa dapat dibersihkan menggunakan air yang lebih tinggi dari tekanan dan aliran normal jika terjadi penyumbatan. Idealnya, sekitar 10% dari air sistem harus diganti setiap hari untuk menjaga kualitas air yang baik. Alternatifnya, air dapat diganti saat mengganti Canister atau Carbon filter. Ini memastikan kotoran yang tersimpan di sambungan pipa filter ini dihapus. Tangki ikan harus dibersihkan secara teratur. Untuk membersihkan tangki ikan, tutup aliran air ke tangki ini, tiriskan kelebihan air dengan memiringkan tangki ke belakang dan lepaskan tangki dengan hati-hati dari sistem. Pertumbuhan kotoran dan alga akan terlihat di bagian bawah dan sisi tangki (Avdesh *et al.*, 2012).

3. Pencahayaan

Cahaya memicu zebrafish untuk berkembang biak, sehingga periode kegelapan penting untuk memungkinkan hewan beristirahat (Vargesson, 2007).

Salah satu cara tercepat untuk memastikan ikan tidak bertelur adalah dengan membiarkan lampu menyala sepanjang waktu. Siklus 14 jam cahaya, 10 jam

gelap telah disarankan, dan akan menjadi standart umum (Matthews *et al.*, 2002).

4. Makanan

Pemberian makan ikan pada tahap remaja pertengahan hingga akhir dan seterusnya, diberikan dua kali (satu kali di pagi dan sore) atau tiga kali sehari.

Untuk larva stadium awal dan yang mengalami metamorfosis, pemberian makan yang lebih sering dapat bermanfaat. Zebrafish dewasa dapat mentolerir beberapa hari tanpa makanan tetapi membutuhkan makan sehari-hari untuk produksi telur yang optimal (Matthews *et al.*, 2002).

Zebrafish yang baru menetas dapat memakan Paramecium (800 μm x 80 μm), serta berbagai makanan siap saji, infusoria dan rotifera. Ketika mereka tumbuh lebih besar, larva zebrafish dapat menambahkan makanan mereka dengan makanan yang lebih besar seperti cuka belut, microworms, atau makanan siap saji yang lebih besar. Akhirnya mereka cukup besar untuk makan *Artemia nauplii* (udang laut yang baru menetas), yang memiliki kandungan protein yang tinggi, dapat bertelur sesuai permintaan, tetapi harganya mahal.

Ikan ukuran dewasa dapat diberi makan makanan siap saji orang dewasa (*flakes food* ikan tropis, micropellet ikan tropis) dan udang air asin hidup (Reed & Jennings, 2011). Setelah ikan mencapai usia satu bulan: serpihan makanan yang ditambah dengan makanan hidup seperti *Artemia*. Dua kali sehari dan sekali sehari pada akhir pekan. Ikan dewasa yang sedang dipersiapkan untuk pembiakan diberi makanan hidup dua kali seminggu (Howells & Betts, 2009).

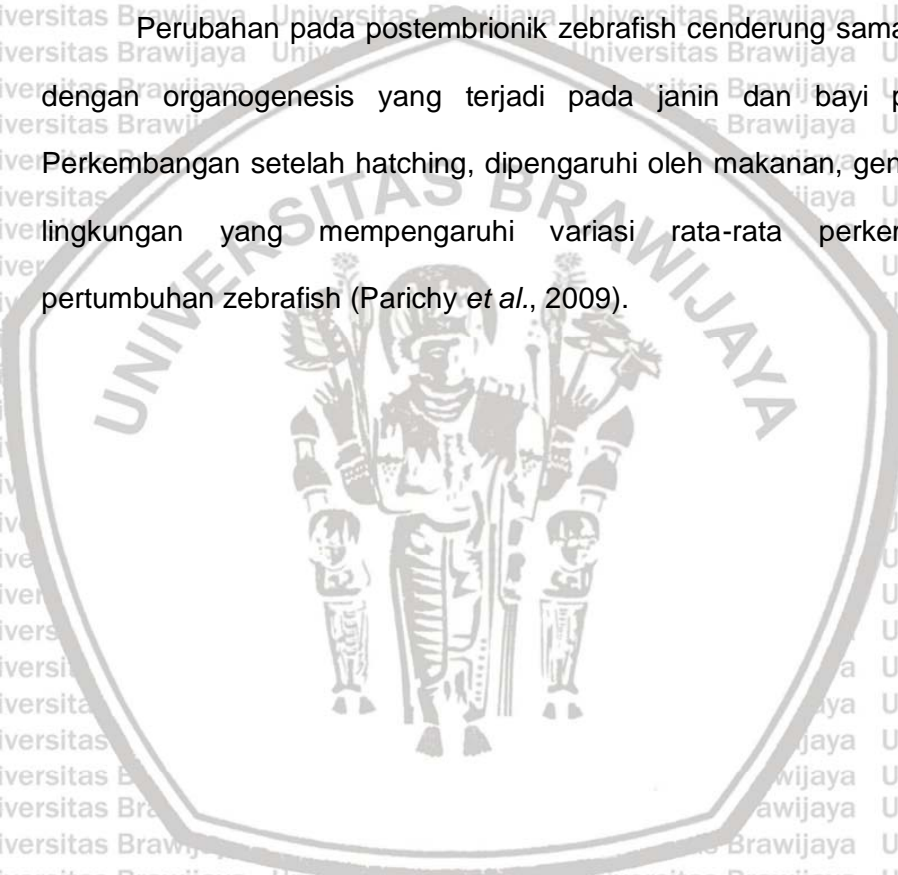
2.9.5 Zebrafish sebagai model penelitian

Zebrafish adalah organisme model vertebrata yang sangat baik untuk penelitian, terdapat beberapa alasan yang mendukung yaitu : Zebrafish memiliki 25 kromosom dan genomnya terdiri dari sekitar 1,5 x 10 miliar *base pair*, dibandingkan dengan ukuran genom mamalia sekitar 3 x 10 miliar *base pair*.

Saat ini belum diketahui dengan tepat berapa banyak gen zebrafish, tetapi sangat mungkin jika jumlah total akan sangat dekat dengan yang diharapkan sesuai genom mamalia, proses pembiakan zebrafish cepat dan memiliki kemampuan untuk menghasilkan telur mencapai 200-300 telur/minggu. Zebrafish memiliki embrio yang transparan dan berkembang di luar tubuh, proses pertumbuhan dan perkembangannya cepat dimana organ utama sudah terbentuk dalam 24 jam *post fertilisasi* (Postlethwait *et al.*, 2004; Howe *et al.*, 2013).

Perubahan pada postembrionik zebrafish cenderung sama atau homolog dengan organogenesis yang terjadi pada janin dan bayi pada mamalia.

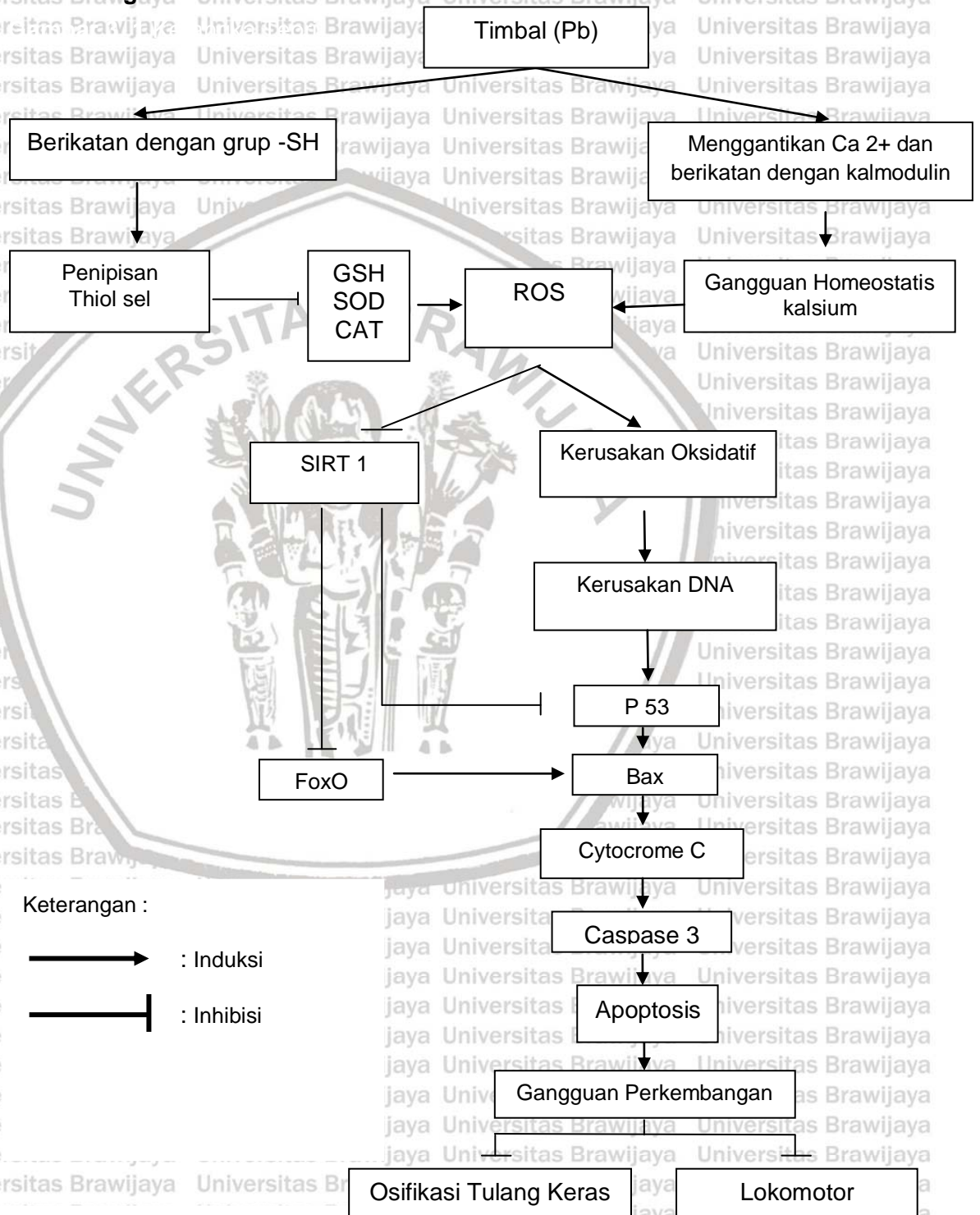
Perkembangan setelah hatching, dipengaruhi oleh makanan, genetik, dan faktor lingkungan yang mempengaruhi variasi rata-rata perkembangan dan pertumbuhan zebrafish (Parichy *et al.*, 2009).



BAB 3

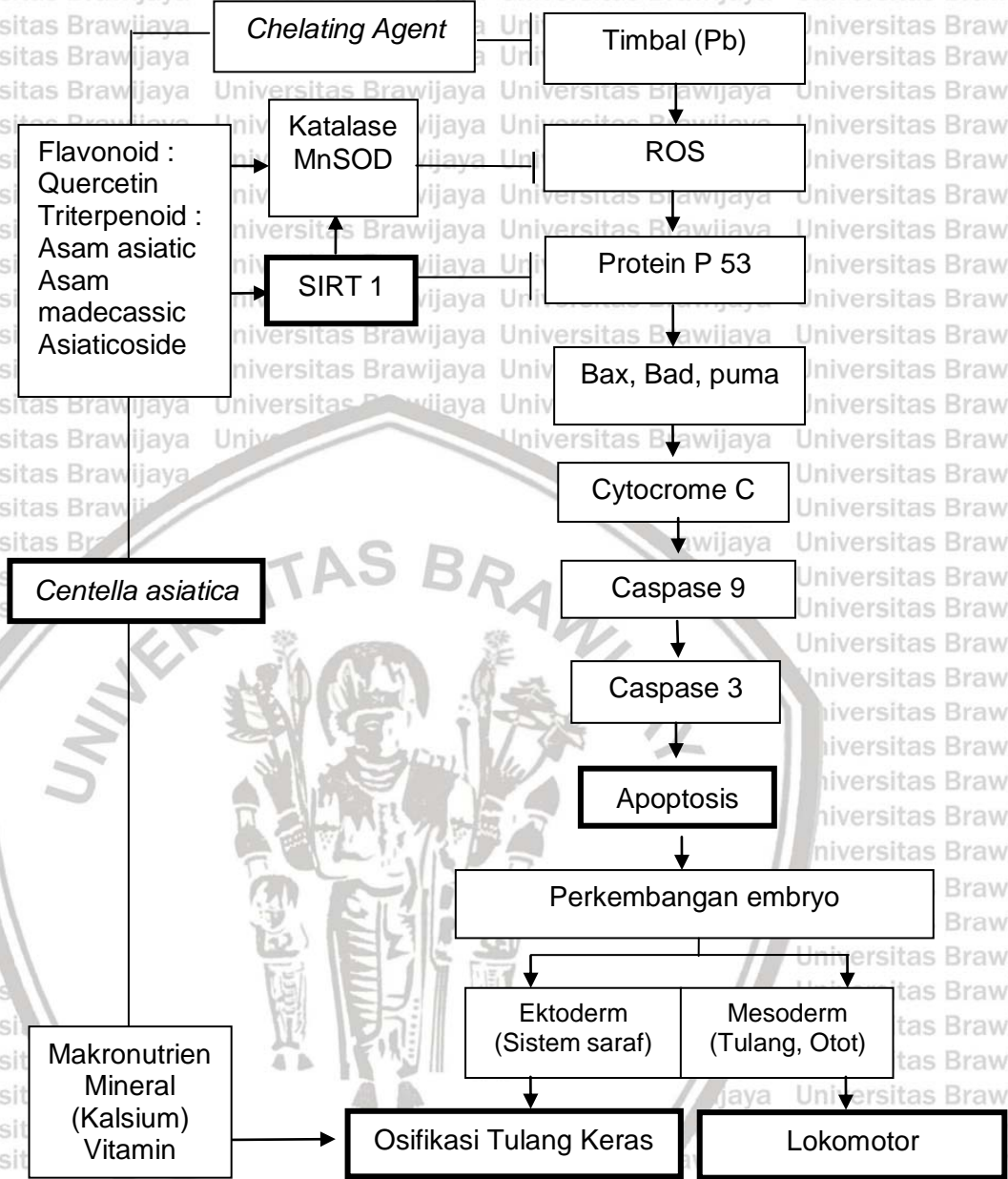
KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1 Kerangka Teori

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep

Keterangan :

- : Induksi
- ⊥ : Inhibisi
- ▭ (thick border) : Di Teliti
- ▭ (thin border) : Tidak Diteliti

3.3 Penjelasan Kerangka Konsep

Toksikitas timbal dapat terjadi melalui mekanisme stres oksidatif. Timbal didalam sel akan memicu pembentukan radikal bebas yang berlebihan.

Peningkatan konsentrasi ROS mengaktifkan protein p53 kemudian meningkatkan protein Bcl 2 pro-apoptotik seperti Bad, Bax, Puma, Noxa, Bak yang dapat menghambat fungsi protein Bcl-2 anti-apoptosis, ROS juga mendepolarisasi membran mitokondria sehingga sitokrom c terlepas ke dalam sitosol. Sitokrom C yang berada di sitosol berinteraksi dengan Apaf 1 membentuk apoptosom yang mengaktifkan caspase-9. Aktivitas caspase-9 mengaktifkan caspase-3 menyebabkan pembelahan protein seluler dan apoptosis. ROS yang tinggi juga dapat menekan ekspresi SIRT 1 dan menginduksi apoptosis melalui aktivasi Bcl-2-associated X protein (Bax) dan melalui Foxo.

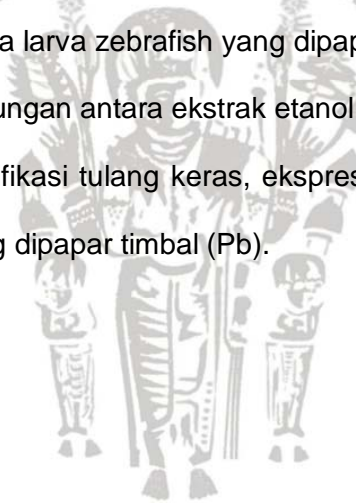
Apoptosis dapat mempengaruhi perkembangan embrio pada saat pembentukan jaringan spesifik pada *germ layer*, ectoderm pada saat pembentukan sistem saraf, mesoderm pada pembentukan tulang dan otot, dan endoderm. Apoptosis yang terjadi pada sel saraf dapat mempengaruhi aktifitas lokomotor, selain itu apoptosis juga dapat mempengaruhi proses pembentukan tulang.

Quersetin pada pegagan dapat berfungsi sebagai *chelating agent* logam timbal. Asam asiatic yang merupakan golongan triterpenoid, salah satu kandungan pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi SIRT 1. SIRT 1 menghambat ROS dengan cara meningkatkan aktivitas enzim antioksidan seperti katalase, Mn-SOD. SIRT 1 juga menghambat apoptosis melalui penghambatan protein pro-apoptosis, p 53 dan merangsang protein anti-apoptosis Bcl-xL. Sehingga dengan menghambat apoptosis dapat menurunkan gangguan perkembangan yang mempengaruhi aktivitas lokomotor dan osifikasi

tulang, selain itu nutrisi yang terkandung dalam pegagan (*Centella asiatica*) seperti kalsium juga berperan dalam peningkatan proses pertumbuhan dan perkembangan pada osifikasi tulang.

3.4 Hipotesis

1. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).
2. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan osifikasi tulang keras pada larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).
3. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat meningkatkan ekspresi SIRT 1 pada larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).
4. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat menurunkan apoptosis pada larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).
5. Terdapat hubungan antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dengan lokomotor, osifikasi tulang keras, ekspresi SIRT 1 dan apoptosis pada larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).



BAB 4**METODE PENELITIAN****4.1 Jenis dan Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen murni (*True Experimental*) *in vivo* dengan *post test only control group design*. Pada penelitian ini terdapat kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian**4.2.1 Populasi**

Populasi penelitian ini adalah zebrafish usia 0-6 dpf yang diperoleh dari hasil fertilisasi zebrafish *wild type* antara induk jantan dan betina dengan perbandingan 1:2. Zebrafish yang dipilih memiliki ciri strip horizontal berwarna biru tua kehitaman yang dipelihara di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang serta telah tersertifikasi di Laboratorium Hidrologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang (Darwitri, 2018).

4.2.2 Besar Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah zebrafish usia 0-6 dpf yang terdiri dari 5 kelompok, pengambilan sampel secara random alokasi dengan pembagian kelompok zebrafish sebagai berikut :

1. Kelompok kontrol, sampel yang sama sekali tidak diberikan paparan baik paparan timbal asetat trihidrat maupun ekstrak pegagan (*Centella asiatica*).
2. Kelompok timbal asetat trihidrat, sampel diberikan paparan timbal asetat trihidrat 2,5 ppm pada 2 hpf – 3 dpf.

Konsentrasi timbal asetat trihidrat 2,5 ppm ditentukan peneliti berdasarkan hasil eksplorasi pendahuluan, yang tidak menimbulkan efek teratogenik pada larva zebrafish.

3. Kelompok perlakuan 1 (P1), sampel diberikan paparan timbal asetat trihidrat 2,5 ppm dan pegagan (*Centella asiatica*) 1,25 µg/mL pada 2 hpf – 3 dpf.
4. Kelompok perlakuan 2 (P2), sampel diberikan paparan timbal asetat trihidrat 2,5 ppm dan pegagan (*Centella asiatica*) 2,5 µg/mL pada 2 hpf – 3 dpf.
5. Kelompok perlakuan 3 (P3), sampel diberikan paparan timbal asetat trihidrat 2,5 ppm dan pegagan (*Centella asiatica*) 5 µg/mL pada 2 hpf – 3 dpf.

Embrio zebrafish yang diperlukan dengan mempertimbangkan *survival rate* yaitu 20 embrio/well untuk 5 perlakuan dan dilakukan ulangan sebanyak 2 kali sehingga total embrio yang diperlukan sebanyak 200 telur. Kemudian diambil 5 larva zebrafish pada masing-masing kelompok perlakuan untuk pemeriksaan 3 parameter yaitu pemeriksaan lokomotor, osifikasi tulang keras dan apoptosis (García-camero *et al.*, 2015; Kurnianingsih *et al.*, 2016; Zahara *et al.*, 2018).

Pemeriksaan ekspresi SIRT 1 menggunakan 20 larva zebrafish pada masing-masing kelompok perlakuan.

4.2.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi

Embrio zebrafish berusia 0-2 hpf, berwarna jernih transparan, tidak terdapat serabut putih atau jamur saat dilihat dibawah mikroskop optilab, dan tidak ada embrio yang kosong atau tidak terbuahi.

2. Kriteria Eksklusi

Embrio zebrafish yang hatching atau menetas sebelum 3 dpf, embrio yang cacat.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

1. Pemeliharaan zebrafish, pembuatan stok larutan timbal asetat trihidrat, ekstrak pegagan (*Centella asiatica*), pemeriksaan lokomotor dan osifikasi

tulang keras dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

2. Pemeriksaan apoptosis dilakukan di Institute Biosains Universitas Brawijaya Malang.
3. Pemeriksaan ekspresi SIRT 1 dilakukan di Laboratorium UIN Malang dan laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei – Juni 2019.

4.4 Bahan dan Alat

4.4.1 Bahan dan Alat Pemeliharaan Zebrafish

Bahan yang diperlukan yaitu embrionik medium, pakan ikan (tetramin), fish all untuk menetralkan air, well plate 6 sumuran. Alat digunakan yaitu aquarium dengan kapasitas 60 L, filtrasi dan aerasi air, pH meter, alat pengukur suhu, tempat penakaran telur ikan, inkubator suhu $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, pompa air.

4.4.2 Bahan dan Alat Pembuatan Ekstrak Pegagan

Bahan yang digunakan adalah simplisia pegagan, pelarut etanol dan air bersih. Alat yang digunakan adalah timbangan, oven, blender, gelas erlenmeyer, labu penampung etanol, gelang corong, kertas saring, evaporator, rotary evaporator, selang *water pump*, *water bath*, *water pump*, *vaccum pump*, botol tempat hasil ekstraksi, lemari pendingin.

4.4.3 Bahan dan Alat Pembuatan Medium Embrionik

Bahan yang digunakan yaitu CaCl, KCL, NaCl, MgSO₄ dan aquadest. Alat yang digunakan yaitu tabung reaksi 500 mL, timbangan digital dengan merk Metter Toledo dan alat pengaduk.

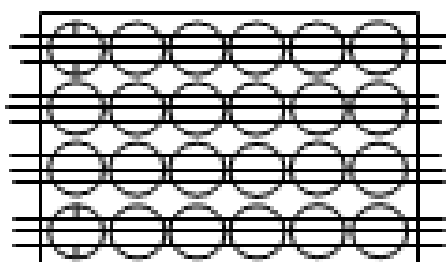
4.4.4 Bahan dan Alat Pemeriksaan Apoptosis

Apoptosis pada penelitian diamati dengan menggunakan pewarnaan *acridine orange* dengan bahan yang diperlukan yaitu embrio zebrafish, *acridine*

orange, PTU, tricain, pipet plastik, aluminium foil, blue tip dan alat yang diperlukan yaitu mikroskop *fluorescence* FSX-100, cawan petri, *object glass*, micro pipet, erlenmeyer 100 ml.

4.4.5 Bahan dan Alat Pengukuran Lokomotor

Bahan yang digunakan yaitu embrionik medium dan alat yang digunakan yaitu cawan petri, kamera untuk merekan dan kertas pola lingkaran.



Gambar 4. 1 Gambar Pola Kertas untuk Pengukuran Lokomotor

Keterangan: Pembuatan pola garis-garis dengan ukuran yang sama disesuaikan dengan jumlah dan besar well plate yang digunakan. Pergerakan larva zebrafish dihitung seberapa banyak larva berenang melewati garis tersebut.

4.4.6 Bahan dan Alat Pengukuran Osifikasi Tulang Keras

Bahan yang digunakan adalah alkohol 96%, aquadest, *alizarin red*, gliserol, KOH, H₂O₂. Alat yang digunakan adalah mikroskop olimpus, kamera, laptop dengan software *Image J* versi 1.50.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Independent

Ekstrak pegagan (*Centella asiatica*), konsentrasi timbal asetat trihidrat.

4.5.2 Variabel Dependent

Lokomotor, osifikasi tulang keras, apoptosis dan ekspresi SIRT 1.

4.5.3 Variabel Kendali

Embrionik medium, kebersihan *well plate* dan inkubator, temperatur, dan pakan larva.

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4. 1 Definisi Operasional

Konsentrasi Timbal Asetat Trihidrat	Serbuk putih timbal asetat trihidrat dengan merk E Merck yang dilarutkan menggunakan aquadest dan konsentasi yang digunakan berdasarkan studi eksplorasi yaitu 2,5 ppm yang diberikan pada usia 2 hpf – 3 dpf (<i>days post fertilization</i>).
Ekstrak etanol pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	Ekstrak pegagan yang diberikan pada masing-masing kelompok perlakuan dengan konsentrasi 1,25; 2,5; 5 µg/mL yang diberikan pada usia 2 hpf – 3 dpf (<i>days post fertilization</i>).
Apoptosis	Luas area apoptosis pada daerah badan (mulai dari kepala sampai anus) dan daerah ekor (mulai dari anus sampai ujung ekor) larva zebrafish usia 3 dpf yang diwarnai dengan <i>acridine orange</i> dan diperiksa dengan mikroskop fluorescence FSX-100 dengan pembesaran 42x ditandai dengan warna hijau berpendar kemudian dianalisa dengan software <i>Image J</i> versi 1.50 untuk mengukur densitas warna dan menggunakan satuan pixel.
Ekspresi SIRT 1	Ekspresi dari mRNA SIRT 1 pada larva zebrafish yang diperiksa pada usia 6 dpf dan diperiksa dengan menggunakan <i>Reverse Transkriptase</i> PCR dan elektroforesis dengan satuan AU.
Lokomotor	Aktivitas berpindah tempat larva zebrafish yang diperiksa pada usia 4-6 dpf menggunakan pola berbentuk lingkaran direkam selama 1 menit setelah beradaptasi ± 3 menit kemudian dihitung jumlah pergerakannya dengan satuan kali lintasan / menit (Pratama, 2017).
Osifikasi Tulang Keras	Pembentukan tulang pada larva zebrafish usia 6 dpf yang diamati dengan metode pewarnaan alizarin-Red dan dilihat pada mikroskop stereo (Olympus SZ61), pembesaran 40x kemudian visualisasi densitas warna merah untuk mengetahui kepadatan tulang dengan <i>integrated density</i> pada software <i>Image J</i> versi 1.50 dengan satuan pixel (Primiastuti, 2017).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio

Zebrafish dipelihara dalam lingkungan air tawar didalam aquarium dengan kapasitas 60 liter. Air yang digunakan adalah air yang sudah diberikan antiklorin dan diendapkan selama semalam dengan suhu 26-28,5°C, dan pH 6,8-7,5 (Avdesh *et al.*, 2012). Zebrafish diberi makan 3 kali sehari dengan menggunakan tetramin flakes (Khotimah *et al.*, 2015). Pembiakan zebrafish disesuaikan dengan siklus gelap 10 jam dan terang 14 jam, pembiakan dilakukan dalam lingkungan yang tenang dan terhindar dari lingkungan stres (Avdesh *et al.*, 2012).

Pembiakan zebrafish diawali dengan siklus terang selama 14 jam. Setelah zebrafish diberi makan, tempat penerangan telur (trap) dipasang, dan siklus gelap selama 10 jam dapat dimulai. Trap diangkat 30 menit setelah lampu menyala untuk memberikan kesempatan fertilisasi dan pelekatan telur pada tempat trap yang dipasang (Avdesh *et al.*, 2012). Setelah trap diangkat, embrio dipindahkan ke cawan petri dan dibersihkan menggunakan air aqua hingga tidak ada kotoran dan jamur. Setelah embrio diperiksa menggunakan mikroskop stereo (Olympus SZ61), dipindahkan ke *well plate* 6 serta diberikan perlakuan yang sesuai untuk masing-masing kelompok. Kemudian *well plate* dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 28°C. Prosedur ini dilakukan dengan cepat sebelum embrio berusia 2 hpf.

4.7.2 Pembuatan Medium Embrionik

Pembuatan 500 ml larutan stok medium embrionik dengan kepekatan 10 kali menggunakan bahan CaCl 0,25 gr, KCl 0,15 gr, NaCl 5 gr dan MgSO₄ 0,815 gr dan 500 ml *aquadest* yang dimasukkan dalam tabung reaksi (Modified from Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2011). Larutan stok disimpan di lemari pendingin dengan suhu 2-8°C. Pada saat akan digunakan, medium

embriolik ditambahkan air aqua dengan perbandingan medium embriolik dan air aqua adalah 1:9.

4.7.3 Pembuatan Larutan Timbal asetat trihidrat

Timbal asetat trihidrat ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) dengan merk E Merck berbentuk serbuk putih yang memiliki berat molekul 379,33 gr/mol dilarutkan dengan aquadest sehingga didapatkan stok dengan konsentrasi 3793,3 ppm kemudian dihitung berdasarkan rumus untuk mendapatkan konsentrasi timbal 2,5 ppm, perhitungan terlampir.

4.7.4 Pembuatan Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan yang digunakan berasal dari UPT Material Medica Batu Jawa Timur dan sudah memiliki sertifikat. Bagian dari tanaman yang digunakan dalam pembuatan ekstrak adalah bagian atas tanpa stolon dan akar (Darwitri, 2018).

Prosedur pembuatan ekstrak pegagan adalah :

1. Pegagan dicuci bersih kemudian dikeringkan dan dimasukkan kedalam oven dengan suhu 40°C.
2. Pegagan kering dihaluskan dengan blender.
3. Simplisia pegagan (dengan berat 100 gr) dimasukkan dalam tabung erlenmeyer kemudian direndam dalam 900 ml larutan etanol 98%. Di lakukan pengadukan \pm 30 menit selanjutnya diendapkan 1x24 jam.
4. Lapisan atas rendaman serbuk pegagan (campuran etanol dan zat aktif) diambil dan disaring dengan corong buncher.
5. Proses evaporasi dengan *rotary evaporator* selama \pm 1,5-2 jam.
6. Hasil ekstraksi ditimbang, didapatkan ekstrak sebanyak 10 gram ekstrak kental (kira-kira 1/5 dari bahan kering) dan dimasukkan dalam botol plastik dan disimpan dalam lemari pendingin (*freezer*) (Selvi *et al.*, 2012).

4.7.5 Pembuatan Larutan Pegagan (*Centella asiatica*)

Konsentrasi pegagan yang digunakan pada penelitian ini adalah 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL. Stok pegagan yang tersedia yaitu 10 mg pegagan ditimbang dan dilarutkan dengan 10 ml aquadest sehingga menjadi 1 mg/mL atau 1000 µg/mL.

Rumus perhitungan konsentrasi paparan yaitu :

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

Keterangan :

V_1 = Volume ekstrak pegagan yang diperlukan

V_2 = Volume akhir yang diinginkan (15 mL yang diisikan 5 mL/whell)

M_1 = Larutan stok ekstra pegagan (1000 µg/mL)

M_2 = Konsentrasi pegagan yang diinginkan (1,25; 2,5; 5 µg/mL)

Perhitungan konsentrasi 5 µg/mL

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

$$V_1 \times 1000 = 5 \times 5$$

$$V_1 = 0,025 \text{ mg/mL} = 25 \text{ µg/mL}$$

Pembuatan konsentrasi pegagan 5 µg/mL dengan cara mengambil 25 µg/mL pegagan dari stok 1000 µg/mL, kemudian ditambah dengan larutan

embrionik medium yang sudah tercampur dengan timbal asetat trihidrat 1,25 mL

sampai menjadi 5 mL. Konsentrasi pegagan 2,5 µg/mL diambil dari pegagan 5

µg/mL yang sudah diencerkan dengan larutan embrionik sampai 5mL, diambil

2,5 mL kemudian ditambah dengan larutan embrionik medium yang sudah

dicampur dengan timbal asetat trihidrat 1,25 mL menjadi 5mL dengan

perbandingan 1 : 1. Konsentrasi 1,25 µg/mL diambil dari pegagan 2,5 µg/mL

yang sudah diencerkan sebelumnya sebanyak 2,5 mL kemudian ditambah

dengan larutan embrionik medium yang sudah dicampur dengan timbal asetat

trihidrat 1,25 mL menjadi 5mL dengan perbandingan 1 : 1.

4.7.6 Pemberian Paparan pada Setiap Kelompok

1. Kontrol

Kelompok kontrol negatif diberikan 5 mL medium embrionik pada setiap sumuran.

2. Kontrol positif

Larutan Timbal Asetat Trihidrat 2,5 ppm diberikan pada usia 2 hpf sampai dengan 3 dpf dengan penggantian medium setiap 24 jam.

3. Perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2), perlakuan 3 (P3)

Cara membuat campuran larutan timbal asetat trihidrat + pegagan untuk 1 sumuran (5 mL) diperoleh dengan mencampurkan stok timbal asetat trihidrat dan stok pegagan kemudian ditambahkan medium embrionik sampai 5 mL dengan rincian sebagai berikut :

Tabel 4. 2 Konsentrasi Timbal dan Pegagan (*Centella asiatica*)

Perlakuan	Konsentrasi yang diinginkan		Konsentrasi Timbal Asetat Trihidrat (mL)	Stok pegagan (1) µg/mL	Embrionik Medium hingga (mL)	Jumlah whell	Volume tiap whell
	Timbal Asetat Trihidrat (mL)	Pegagan µg/mL					
TP 1	1,25	1,25	3,75	18,75	15	3	15
TP 2	1,25	2,5	3,75	37,5	15	3	15
TP 3	1,25	5	3,75	75	15	3	15

Paparan pada penelitian ini dilakukan mulai zebrafish berusia 2 hpf sampai 3 dpf. Pemberian paparan dimulai sebelum embrionik *hatching* pada usia 3 dpf dengan asumsi pemberian paparan terjadi saat intrauterine. Setelah selesai pemberian paparan pada masing-masing kelompok, larva dibilas dengan medium embrionik sebanyak 3 kali dan selanjutnya diberikan medium embrionik saja. Semua medium diganti setiap hari untuk menghindari kontaminasi.

4.7.7 Pengukuran Aktifitas Lokomotor Zebrafish

Pengukuran aktifitas lokomotor zebrafish dilakukan pada usia 4 – 6 dpf dengan cara sebagai berikut :

1. Larva zebrafish diadaptasikan selama \pm 3 menit.
2. Kertas pola diletakkan diatas well plate.
3. Well plate dipusatkan diatas kertas pola.
4. Larva zebrafish diposisikan pada bagian tengah sumuran dengan menggunakan pipet plastik.
5. Perekaman video dimulai saat embrio tidak bergerak.
6. Dilakukan penilaian gerakan larva zebrafish dalam melewati garis lingkaran pada kertas pola selama 1 menit (Pratama, 2017).
7. Dilakukan penilaian *pattern* lokomotor untuk mengetahui pola lintasan pergerakan zebrafish dengan menggunakan software *Image J V1.50* dan *M-Track J*.

4.7.8 Pengukuran Osifikasi Tulang Keras

Prosedur pewarnaan *alizarin red* menggunakan teori modifikasi dari (Knight, 2009) dengan tahapan berikut ini :

1. Larva zebrafish dieutanasia menggunakan air es.
2. Larva zebrafish di fiksasi dengan menggunakan alkohol 96% selama 12 jam.
3. Larva direndam dalam aquadest selama 24 jam.
4. Larva direndam dalam KOH 1 % dengan Hidrogen Peroksida 3 % (Sekitar 5 ml 3 % H₂O₂ dalam larutan KOH 1 % 100 ml) selama 15 menit.
5. Pigmen hitam harus berubah menjadi warna coklat sampai coklat muda.
6. Larva dibilas dengan aquadest selama 10 menit.
7. Larva dibilas dalam larutan pewarna *alizarin red* 1 mg/ml selama 3 hari.
8. Dicuci dengan aquadest sebanyak 5 kali pembilasan.

9. Larva hasil pewarnaan *alizarin red* diamati dibawah mikroskop stereo dan diukur densitas warnanya untuk mengetahui kepadatan tulang dengan *integrated density* menggunakan software *Image J* versi 1.50.

10. Larva dapat disimpan pada glycerol 87% dapat bertahan hingga 6 bulan.

4.7.9 Pemeriksaan Apoptosis

Pemeriksaan apoptosis sel dilakukan pada seluruh tubuh (badan dan ekor) zebrafish dengan asumsi apoptosis pada seluruh tubuh dapat mempengaruhi perkembangan neuron yang dapat menyebabkan gangguan lokomotor dan perkembangan tulang, apoptosis diidentifikasi menggunakan pewarnaan *Acridine Orange* menurut (Xia *et al.*, 2017) dengan cara sebagai berikut :

1. Meskipun melanin telah muncul pada titik ini, gangguan pengamatan apoptosis berada pada tingkat yang dapat diterima untuk analisis kualitatif
2. Embrio diinkubasi dengan embrionik medium yang ditambah PTU 0,0003 % selama 3 hari dimulai 2 hpf – 48 hpf.
3. Pewarnaan dengan *acridine orange*
Embrio diinkubasi dengan embrionik medium yang mengandung *Acridine Orange* dengan konsentrasi 5 µg/ml selama 60 menit (3 hpf) dalam kondisi gelap dibungkus aluminium foil.
4. Dibilas sebanyak 3 kali selama 5 menit dengan medium embrionik
5. Dibius dengan 0,016 % tricaine selama 3 menit.
6. Diamati menggunakan mikroskop fluorescence FSX-100 (embrio berpendar hijau).
7. Dianalisis dengan mengukur *Integrated density* menggunakan software *Image J* versi 1.50. Kemudian dilakukan penilaian total fluorescent signal yang dihitung dengan mengurangi nilai *Integrated density* seluruh tubuh larva

zebrafish dengan nilai *Integrated density* bagian *background* sekitar larva zebrafish (Patibandla *et al.*, 2018).

4.7.10 Pemeriksaan Ekspresi SIRT 1

Pemeriksaan ekspresi SIRT 1 dilakukan menggunakan metode *Reverse Transcriptase* PCR dan hasil yang terbaca dinormalisasi dengan gen referensi.

Ekspresi SIRT 1 diukur melalui 3 tahap yaitu isolasi RNA, sintesa cDNA dan

Reverse Transcriptase PCR. Primer SIRT 1 larva zebrafish yaitu F: CAA GGA

AAT CTA CCC CGG ACA GT, R: CAG TGT GTC GAT ATT CTG CGT GT

sedangkan primer beta aktin yaitu F: ATG GAT GAG GAA ATC GCT GCC, R:

CTC CCT GAT GTC TGG GTC GTC.

1. Pengumpulan Sampel

Larva zebrafish usia 6 dpf dilakukan euthanasia dengan dimasukkan ke air es (0 – 4°C) dengan komposisi 5 bagian es dan 1 bagian air selama 20 menit.

Untuk pengumpulan embrio, 25 larva dimasukkan ke dalam tabung *microcentrifuge* 1,5 mL yang sudah dicuci. Kelebihan cairan diambil menggunakan pipet transfer sekali pakai.

2. Isolasi RNA total

Isolasi RNA dilakukan menggunakan Geneaid dengan beberapa step

yaitu : a) Lisis sel dengan cara 400 µL RB Buffer ditambah R-mercaptoethanol 4

µL dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml. jaringan digiling dengan mikropestle,

jaringan dipotong dengan lysate dan diinkubasi selama 3 menit pada suhu ruang

selanjutnya disentrifugasi 30 detik pada 1000 x g kemudian dikeluarkan dari filter

column dan dipindah ke tube mikrosentrifugasi yang baru. b) RNA Binding

dengan cara 400 µL Etanol 70% ditambah ddH₂O, diaduk sampai tercampur. RB

Column diletakkan pada 2 ml collection tube kemudian pindahkan campuran ke

dalam RB Column, disentrifugasi 14 – 16000 x g selama 1 menit, RB Column

diletakkan di dalam tube collection 2 ml. c) Wash dengan cara : W1 buffer

ditambahkan ke RB Column, disentrifugasi pada 14 – 16000 x g selama 30 detik, 600 μ L wash buffer ditambah ke RB Column, dilakukan sentrifugasi, wash buffer 600 μ L ditambahkan ke dalam RB Column kemudian disentrifugasi pada 14 – 16000 x g selama 30 detik. Dilakukan sentrifugasi pada 14 – 16000 x g selama 3 menit untuk mengeringkan column matrix. d) RNA Elution dengan cara RB Column diletakkan pada tube mikrosentrifugasi 1,5 ml, column matrix ditambah RNase-free Water 50 μ L, didiamkan selama 2 menit, disentrifugasi pada 14 – 16000 x g selama satu menit.

3. Sintesis cDNA

Sintesis cDNA dilakukan sesuai prosedur (Toyobo, n.d.). Template RNA disiapkan dari sampel yang berisi total RNA 30 ng/ μ L. 4x DN Master mix dan gDNA Remover dicampur ke dalam sampel dengan perbandingan 1 : 50. Denaturasi RNA dengan cara inkubasi selama 5 menit pada suhu 65 $^{\circ}$ C, selanjutnya diletakkan di aluminium plate. Sampel ditambah dengan 20 μ L dan 50 μ L Nuclease-free water. Segera inkubasi selama 5 menit pada suhu 37 $^{\circ}$ C. 5x master mix II 20 μ L ditambahkan. Inkubasi lagi selama 15 menit pada suhu 37 $^{\circ}$ C dan dilanjutkan inkubasi selama 5 menit pada suhu 50 $^{\circ}$ C kemudian dipanaskan selama 5 menit pada suhu 98 $^{\circ}$ C. Sampel dapat disimpan dengan suhu 4 $^{\circ}$ C - 20 $^{\circ}$ C.

4. Reverse transcriptase PCR sesuai prosedur pada Thermo Scientific.

Master mix PCR di vorteks dan sentrifugasi. Campurkan bahan-bahan PCR master mix 12,5 μ L, primer forward dan reverse masing-masing 1 μ L, template DNA 5 μ L, dan 5,5 μ L water nuclease free. Pada saat pengerjaan tabung PCR berada di atas aluminium plate yang sudah beku. Dilakukan vortex dan masukkan kedalam mesin PCR dengan rekomendasi siklus suhu, predenaturasi pada suhu 95 $^{\circ}$ C selama 1-3 menit dengan 1 siklus, denaturasi pada suhu 95 $^{\circ}$ C selama 30 detik, Annealing SIRT 1 pada suhu 60 $^{\circ}$ C selama 30

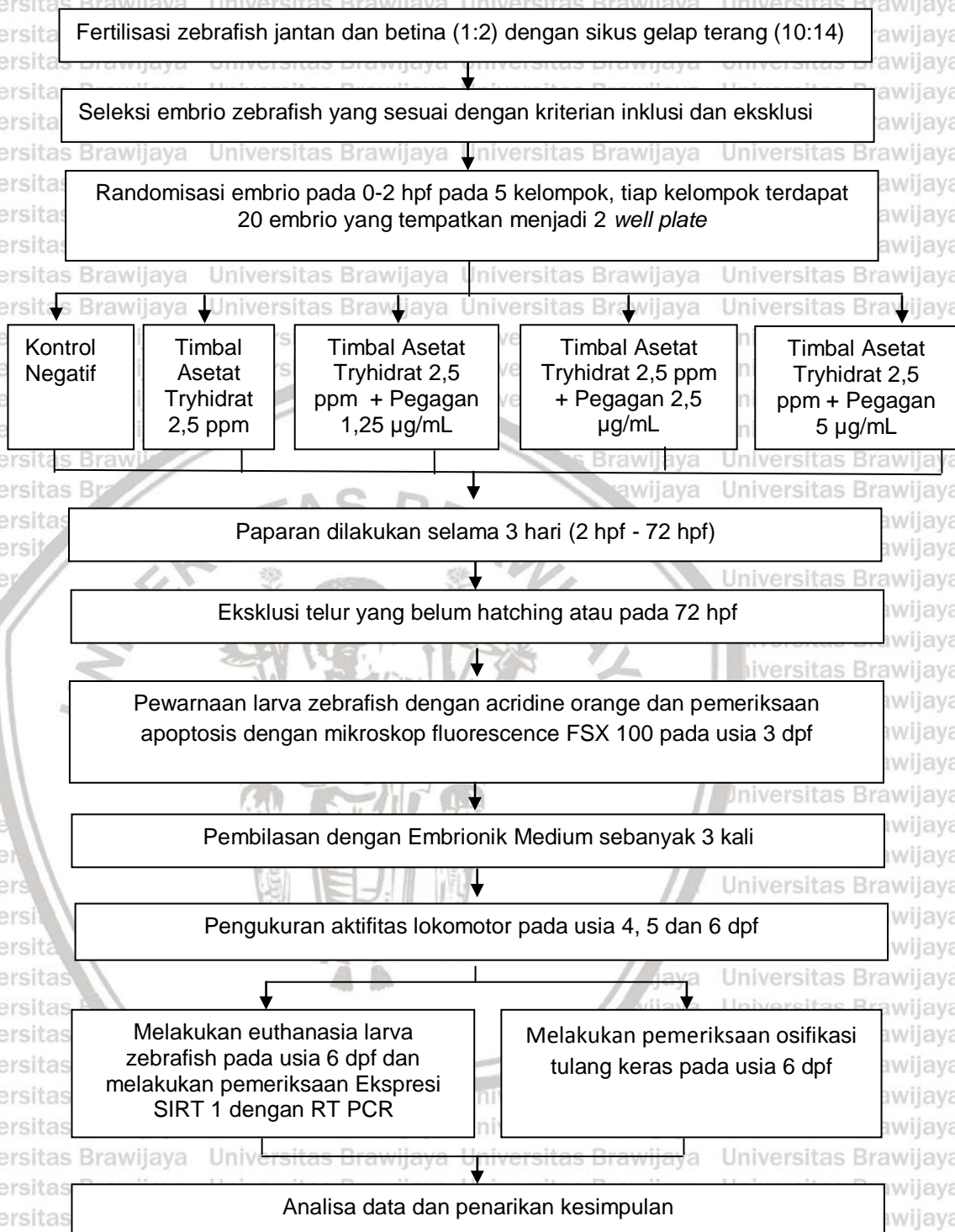
detik dengan siklus 25-40, extension pada suhu 72°C selama 1 menit dan final extension pada suhu 72 °C selama 5-15 menit dengan 1 siklus.

Hasil proses PCR selanjutnya dilakukan elektroforesis dengan cara menyiapkan gel agarose 1,5 %. Sampel 5 μ L dan loading dye 1 μ L (dengan perbandingan 5 :1) dengan marker 100 base pair dimasukkan ke gel agarose.

Elektroforesis di running selama 60 menit dengan voltage 50 V. Hasil agarose dibaca pada mesin gel doc untuk melihat ekspresi gen dan dihitung volume (Int).



4.8 Alur Penelitian



Gambar 4. 2 Alur Penelitian

4.9 Analisis Data

Pengolahan data menggunakan SPSS versi 23.0 dengan tingkat kepercayaan 95% dan nilai $p < 0,05$. Data akan dianalisis dengan menggunakan

uji statistik yaitu :

1. Uji normalitas menggunakan uji *Saphiro Wilk*. Berdistribusi normal apabila $p \text{ value} > 0,05$. Uji *Levene* untuk uji homogenitas. Data homogen apabila $p \text{ value} > 0,05$.

2. Uji adanya perbedaan paparan ekstrak pegagan terhadap lokomotor, osifikasi tulang keras, ekspresi SIRT 1 dan apoptosis pada masing-masing kelompok kontrol, Timbal asetat trihidrat, Perlakuan 1, Perlakuan 2, Perakuan 3 dengan melakukan uji *One Way ANOVA*. Jika $p \text{ value} < 0,05$, maka dapat diinterpretasikan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok sehingga dilanjutkan dengan analisis *post hoc* Tukey HSD yang bertujuan untuk mengetahui pada kelompok mana yang terdapat perbedaan yang bermakna, sehingga dapat diketahui paparan ekstrak pegagan pada kelompok mana yang berpengaruh pada masing-masing variabel dependen yang diuji.

3. Uji korelasi dengan menggunakan uji Pearson atau Spearman rank. Jika $p \text{ value} < 0,05$ maka dapat diinterpretasikan terdapat korelasi antara dua variabel yang di uji.

Interpretasi uji hipotesis berdasarkan kekuatan korelasi dan arah korelasi menunjukkan korelasi sangat lemah (0,00-0,199), korelasi lemah (0,20-0,399), korelasi sedang (0,40-0,599), korelasi kuat (0,60-0,799), dan korelasi sangat kuat (0,80-1,000). Arah korelasi positif dapat diinterpretasikan searah, semakin besar nilai satu variabel maka semakin besar nilai variabel lainnya. Arah korelasi negatif jika berlawanan arah atau semakin besar nilai variabel maka semakin kecil nilai variabel yang lainnya.

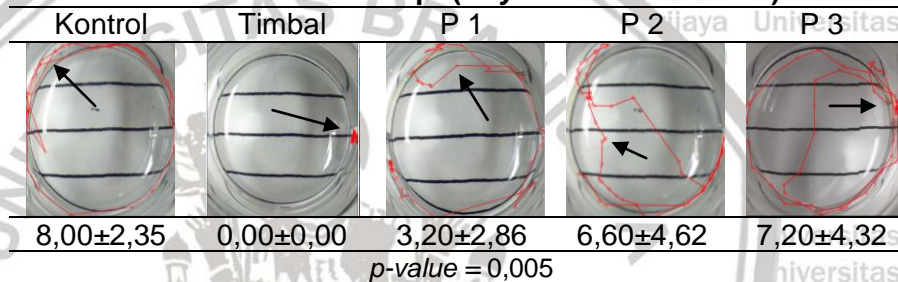
BAB 5

HASIL PENELITIAN

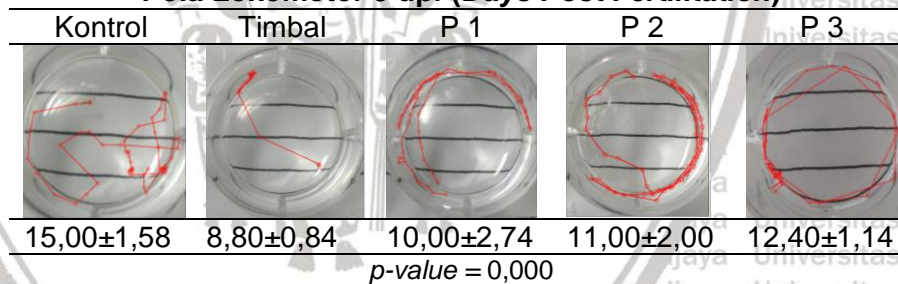
Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan pengaruh ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan mulai 2 hpf sampai dengan 3 dpf dapat meningkatkan lokomotor, osifikasi tulang keras, ekspresi SIRT 1 dan dapat menurunkan apoptosis pada larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb). Adapun penjabaran hasil penelitian yaitu :

5.1 Pengaruh Ekstrak Etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Locomotor Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).

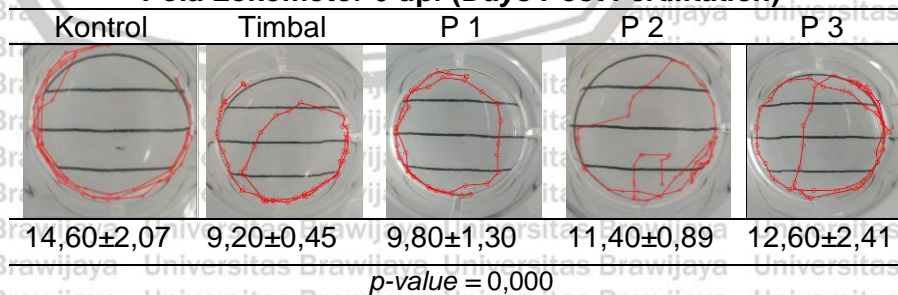
Pola Locomotor 4 dpf (Days Post Fertilitation)



Pola Locomotor 5 dpf (Days Post Fertilitation)



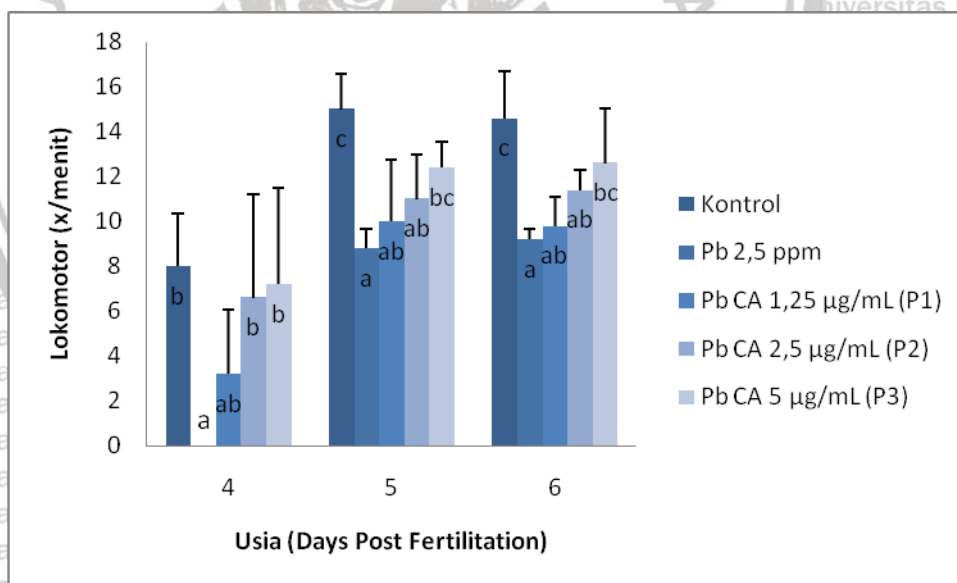
Pola Locomotor 6 dpf (Days Post Fertilitation)



Gambar 5. 1 Pola Locomotor Zebrafish Usia 4, 5 dan 6 dpf Menggunakan M-Track J pada Semua Kelompok.

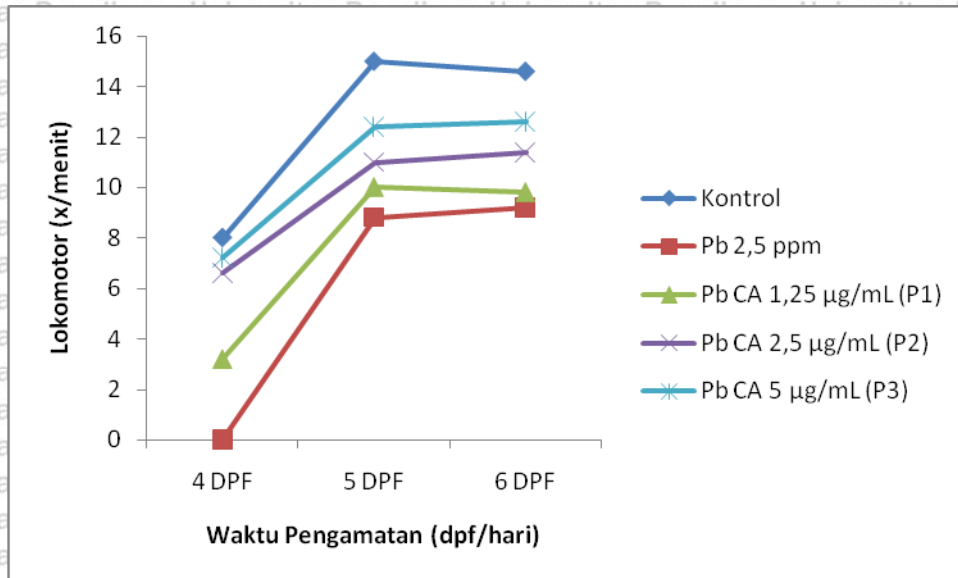
Keterangan : Gambar pola lokomotor merupakan contoh *pattern* yang dapat direkam dari software M-Track J pada semua kelompok, tetapi untuk mengetahui hasil jumlah lokomotor tetap menggunakan hitungan manual. Gambar merah menunjukkan pola lokomotor zebrafish.

Variabel lokomotor pada usia ke 4, 5 dan 6 dpf dilakukan uji normalitas dengan uji *Shapiro Wilk* dan homogenitas data dengan uji *Levene Statistic* yang digunakan sebagai syarat uji *One Way ANOVA*. Hasil uji normalitas pada usia ke 4, 5 dan 6 dpf nilai *p-value* > 0,05 dengan nilai masing-masing adalah $p=0,055$, $p=0,794$ dan $p=0,495$ sedangkan hasil uji homogenitas data lokomotor usia 4, 5 dan 6 dpf juga didapatkan nilai *p-value* > 0,05 dengan nilai *p-value* masing-masing adalah $p=0,168$, $p=0,200$ dan $p=0,369$ sehingga dapat disimpulkan bahwa variabel lokomotor memiliki data berdistribusi normal dan ragam data homogen. Berdasarkan gambar 5.1 hasil uji *one way ANOVA* perbandingan rerata lokomotor usia 4, 5 dan 6 dpf menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok dengan nilai *p-value* masing-masing adalah $p=0,005$, $p=0,000$ dan $p=0,000$ ($p < 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji perbandingan berganda dengan uji *post hoc Tukey HSD*.



Gambar 5. 2 Perbandingan Rerata Locomotor Zebrafish Usia 4, 5 dan 6 dpf pada Semua Kelompok.

Keterangan : Rerata lokomotor kelompok timbal pada usia 4, 5 dan 6 dpf lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, P 1, P 2, dan P 3. Pada kelompok perlakuan pada semua usia mengalami peningkatan rerata aktivitas lokomotor dibandingkan kelompok timbal. Huruf berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$).



Gambar 5.3 Grafik Lokomotor Zebrafish yang Dipapar Timbal dan Pegagan (*Centella asiatica*) Usia 4, 5 dan 6 dpf pada Semua Kelompok.

Keterangan : Kelompok timbal menunjukkan lokomotor lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Garis lokomotor pada kelompok P 1, P 2 dan P 3 mendekati kelompok kontrol.

Berdasarkan Gambar 5.2 hasil uji *post hoc* Tukey HSD pada lokomotor hari ke 4, rerata aktivitas lokomotor kelompok timbal (Pb) menunjukkan perbedaan signifikan dengan kelompok kontrol dengan nilai *p-value* = 0,008.

Kelompok timbal (Pb) juga menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok P 2 dan P 3 dengan nilai *p-value* masing-masing adalah $p=0,034$ dan $p=0,018$. Pada kelompok P 1, P 2 dan P 3 dibandingkan dengan kelompok kontrol tidak memiliki perbedaan signifikan dengan nilai *p-value* adalah $p=0,181$, $p=0,959$ dan $p=0,995$. Hal ini dapat disimpulkan bahwa kelompok P 2 dan P 3 dapat meningkatkan lokomotor yang tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol.

Pada lokomotor hari ke-5 kelompok timbal (Pb) berbeda signifikan dengan kelompok kontrol ($p=0,000$), selain itu kelompok timbal (Pb) juga berbeda signifikan dengan kelompok P 3 dengan nilai $p=0,034$. Kelompok P 1 dan P 2 berbeda signifikan dengan kelompok kontrol dengan nilai $p=0,002$ dan $p=0,016$

(p -value $< 0,05$), sedangkan kelompok P3 tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol dengan nilai $p=0,187$. Sehingga dapat disimpulkan pada lokomotor usia 5 dpf kelompok P 3 dapat meningkatkan lokomotor dan dosis pegangan pada kelompok P 3 tidak berbeda secara signifikan dengan kontrol. Pada lokomotor hari ke-6 kelompok timbal (Pb) berbeda signifikan dengan kelompok kontrol ($p=0,000$), selain itu kelompok timbal juga berbeda signifikan dengan kelompok P 3 dengan nilai $p=0,023$. Pada kelompok P1 dan P 2 berbeda signifikan dengan kelompok kontrol dengan nilai $p=0,001$ dan $p=0,035$ (p -value $< 0,05$), sedangkan kelompok P 3 tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol ($p=0,312$). Hal ini menunjukkan bahwa kelompok P 3 dapat meningkatkan lokomotor usia 6 dpf secara signifikan dan kelompok P 3 tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol.



5.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Osifikasi Tulang Keras Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb)

Hasil pewarnaan osifikasi tulang keras dengan menggunakan *alizarin red* pada masing-masing kelompok disajikan pada gambar 5.4.



Gambar 5. 4 Representasi Osifikasi Tulang Keras Larva Zebrafish Usia 6 dpf dengan Pewarnaan *Alizarin Red* pada Semua Kelompok.

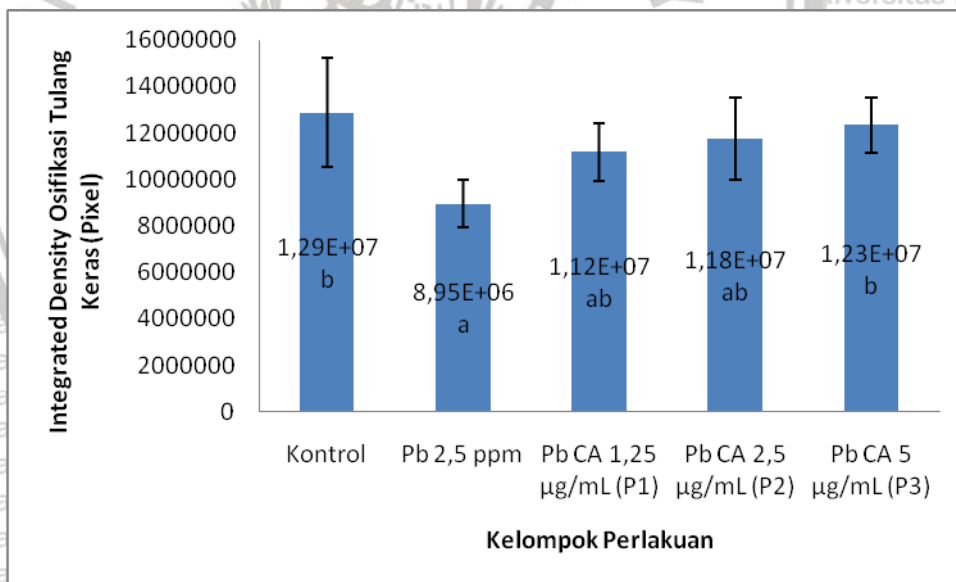
Keterangan : A. Kelompok kontrol, B. Kelompok timbal 12,5 ppb, C. Kelompok P 1 (Pb+CA 1,25 µg/mL), D. Kelompok P 2 (Pb+CA 2,5 µg/mL), E. Kelompok P 3 (Pb+CA 5 µg/mL). Gambar B kelompok timbal lebih berwarna terang dibandingkan dengan gambar kelompok lainnya (A, C, D dan E). Representasi gambar belum dapat menentukan nilai dari densitas warna, dan perhitungan densitas warna dilakukan dengan menggunakan software *Image J* versi 1.50.

Tabel 5.1 Hasil Perbandingan Rerata Osifikasi Tulang Keras Larva Zebrafish Usia 6 dpf pada Semua Kelompok.

Kelompok Perlakuan	Rerata ± SD	<i>p-value</i>
Kontrol	12881138 ± 2356410	0,009
Timbal	8949331 ± 1018492	
P 1. (Pb+CA 1,25 µg/mL)	11183635 ± 1258426	
P 2. (Pb+CA 2,5 µg/mL)	11758689 ± 1762209	
P 3. (Pb+CA 5 µg/mL)	12341707 ± 1195709	

Variabel osifikasi tulang keras dilakukan uji normalitas data dan homogenitas ragam data dengan hasil nilai *p-value* masing-masing adalah $p=0,431$ dan $p=0,473$ ($p\text{-value} > 0,05$), maka dapat disimpulkan bahwa variabel osifikasi tulang keras memiliki data berdistribusi normal dan ragam data yang homogen. Selanjutnya dilakukan analisis statistik dengan uji *one way ANOVA* dan didapatkan nilai *p-value* sebesar 0,009 ($p\text{-value} < 0,05$) yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok osifikasi tulang keras.

Selanjutnya dilakukan analisis statistik dengan uji *post hoc test* Tukey HSD.



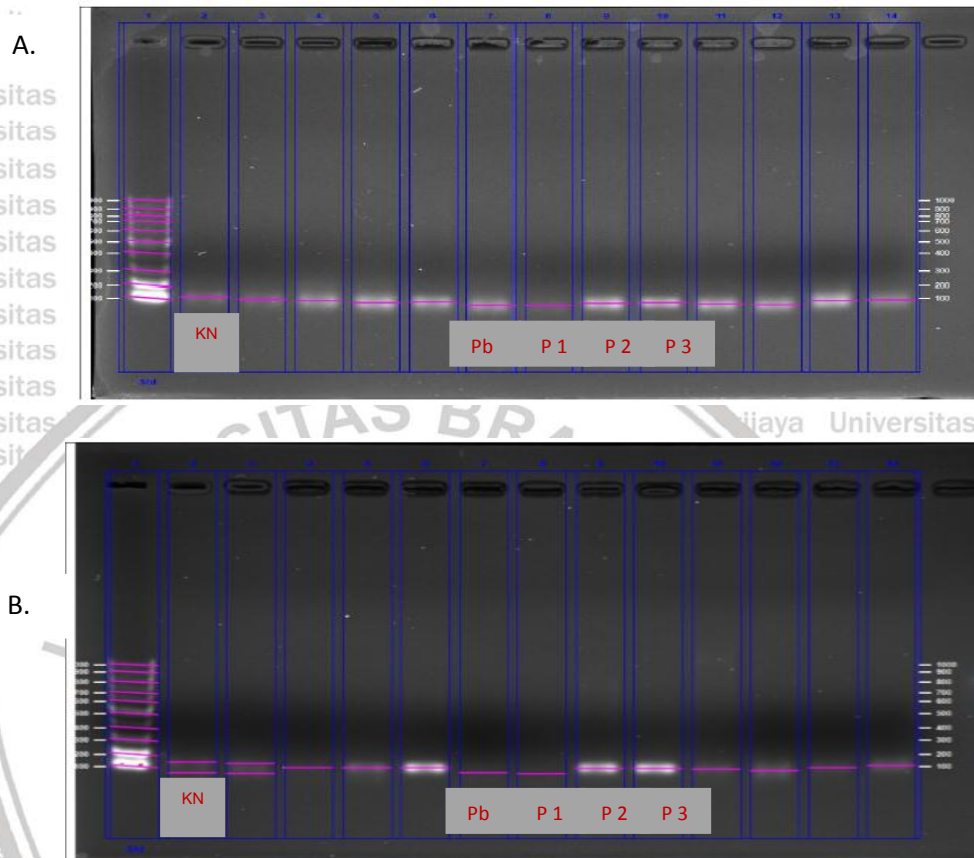
Gambar 5.5 Rerata Osifikasi Tulang Keras Larva Zebrafish Usia 6 dpf Menggunakan Software *Image J* pada Semua Kelompok.

Keterangan : Terdapat perbedaan signifikan ekspresi osifikasi tulang keras antar semua kelompok dengan $p\text{-value} = 0,009$. Ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan osifikasi tulang keras. Huruf berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan $p\text{-value} < 0,05$.

Berdasarkan gambar 5.5 hasil analisis statistik *post hoc test* Tukey HSD menunjukkan bahwa ekspresi osifikasi tulang keras kelompok timbal (Pb) mengalami perbedaan signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan nilai $p=0,007$ ($p\text{-value} < 0,05$). Kelompok timbal (Pb) dengan kelompok P 1 dan P 2 tidak terdapat perbedaan signifikan dengan nilai $p=0,214$ dan $p=0,978$, tetapi pada kelompok P 3 menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p\text{-value} = 0,023$. Hal ini berarti kelompok P 3 dengan penambahan pegagan $5 \mu\text{g/mL}$ dapat meningkatkan ekspresi osifikasi tulang keras secara signifikan dibandingkan dengan kelompok P 1 dan P 2. Kelompok P 1, P 2 dan P 3 tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol dengan nilai $p\text{-value} > 0,05$. Sehingga dapat disimpulkan bahwa paparan timbal yang ditambah dengan pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dalam berbagai dosis pada penelitian ini dapat meningkatkan ekspresi osifikasi tulang keras yang secara signifikan tidak berbeda dengan kelompok kontrol.

5.3 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi SIRT 1 Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).

Hasil pemeriksaan SIRT 1 dengan menggunakan pemeriksaan Reverse Transcriptase PCR pada masing-masing kelompok disajikan pada gambar 5.6.



Gambar 5. 6 Hasil Gradient Elektroforesis Ekspresi SIRT 1 (Gb.A) dan Beta Actin (Gb.B) pada Larva Zebrafish Semua Kelompok.

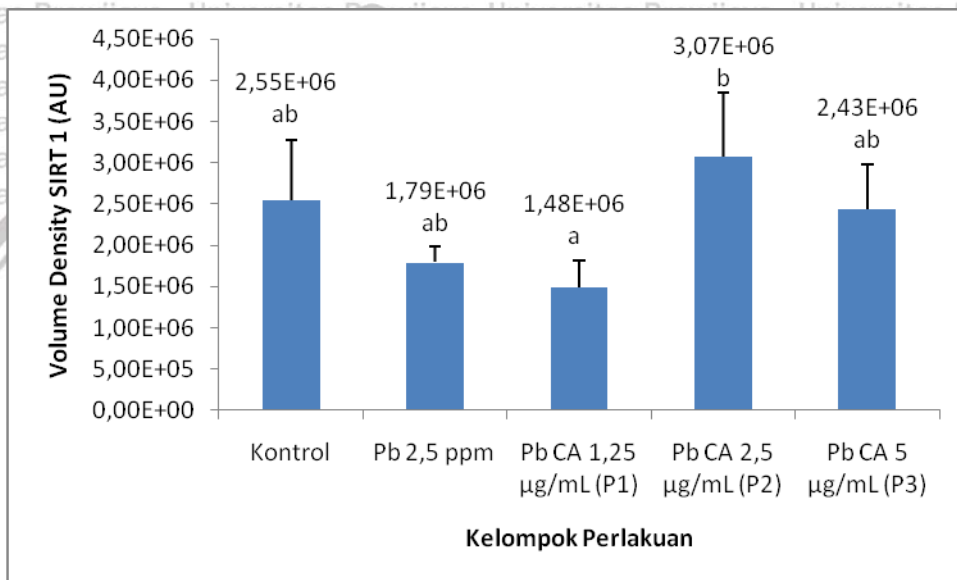
Tabel 5. 2 Hasil Perbandingan Rerata Ekspresi SIRT 1 Larva Zebrafish Usia 6 dpf pada Semua Kelompok.

Kelompok Perlakuan	Rerata ± SD	p-value
Kontrol	2548350 ± 726983	0,040
Timbal	1790508 ± 196738	
P 1 (Pb+CA 1,25 µg/mL)	1481973 ± 337055	
P 2 (Pb+CA 2,5 µg/mL)	3073805 ± 783166	
P 3 (Pb+CA 5 µg/mL)	2432306 ± 539898	

Variabel ekspresi SIRT 1 dilakukan uji normalitas data dengan uji *shapiro-wilk* dan homogenitas ragam data menggunakan uji *Lavene Test*. Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan hasil nilai *p-value* masing-masing

adalah $p=0,437$ dan $p=0,356$ ($p\text{-value} > 0,05$), maka dapat disimpulkan bahwa variabel ekspresi SIRT 1 memiliki data yang berdistribusi normal dan homogen.

Selanjutnya dilakukan analisis statistik dengan uji *one way* ANOVA. Hasil uji statistik *one way* ANOVA didapatkan nilai $p\text{-value}$ sebesar 0,040 ($p\text{-value} < 0,05$) yang menunjukkan bahwa ekspresi SIRT 1 pada semua kelompok memiliki perbedaan yang signifikan. Selanjutnya dilakukan analisis statistik *post hoc test* Tukey HSD.



Gambar 5.7 Rerata Ekspresi SIRT 1 Larva Zebrafish Usia 6 dpf dengan Pemeriksaan RT-PCR pada Semua Kelompok.

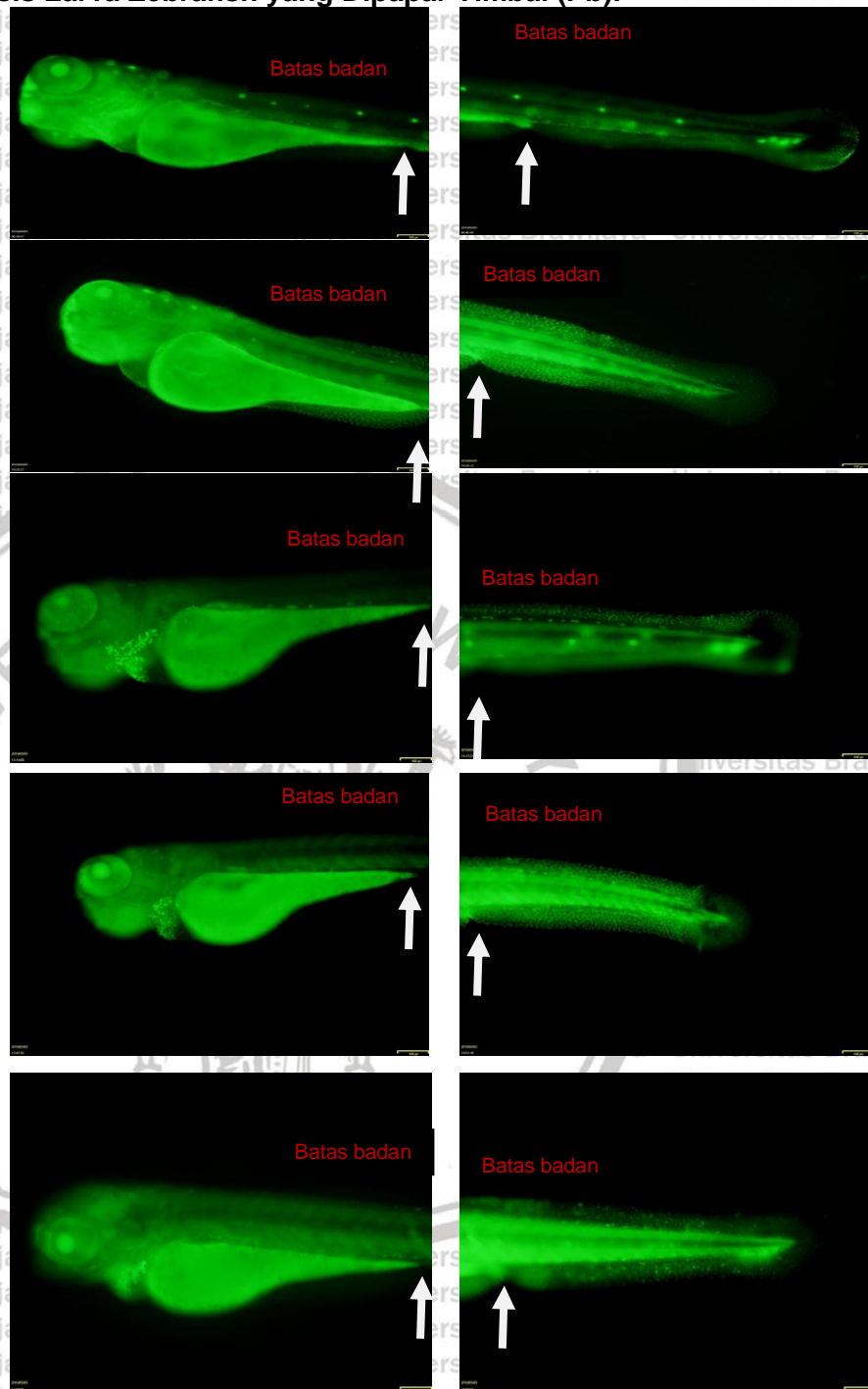
Keterangan : Terdapat perbedaan signifikan antara ekspresi SIRT 1 dengan semua kelompok dengan $p\text{-value} = 0,040$. Ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan ekspresi SIRT 1 dibandingkan kelompok timbal. Huruf berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan $p\text{-value} < 0,05$.

Hasil uji *post hoc* Tukey HSD diperoleh hasil ekspresi ekspresi SIRT 1 kelompok timbal tidak memiliki perbedaan signifikan dibandingkan kelompok kontrol dengan nilai $p\text{-value}$ sebesar 0,503 ($p\text{-value} > 0,05$), kelompok timbal juga tidak memiliki perbedaan signifikan dengan kelompok P 1, P 2 dan P 3 dengan nilai $p\text{-value} > 0,05$. Kelompok P 1, P2 dan P 3 tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol dengan $p\text{-value} > 0,05$. Kelompok P 2 berbeda signifikan dengan kelompok P 1 tetapi tidak berbeda signifikan dengan kelompok

P 3. Hal ini dapat disimpulkan bahwa kelompok P 2 secara signifikan dapat meningkatkan ekspresi SIRT 1 dibandingkan kelompok P 1 dan tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol.



5.4 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Apoptosis Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).



Gambar 5. 8 Foto Fluorescence Apoptosis Menggunakan Pewarnaan Acridine Orange pada Larva Zebrafish Usia 3 dpf pada Semua Kelompok.

Keterangan : A. Kelompok kontrol, B. Kelompok timbal 12,5 ppb , C. P 1 (Pb+CA 1,25 µg/mL), D. P 2 (Pb+CA 2,5 µg/mL), E. P 3 (Pb+CA 5 µg/mL). Hasil gambar belum dapat mempresentasikan nilai apoptosis. Tanda panah putih menunjukkan batas anus sebagai batas badan zebrafish.

Berdasarkan gambar 5.8 menunjukkan Gambar B (kelompok timbal) memiliki pendaran hijau yang lebih banyak dibandingkan kelompok kontrol negatif (Gambar A). dan kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 (Gambar C, D dan E) memiliki pendaran warna hijau yang lebih sedikit dibandingkan kelompok timbal (gambar B).

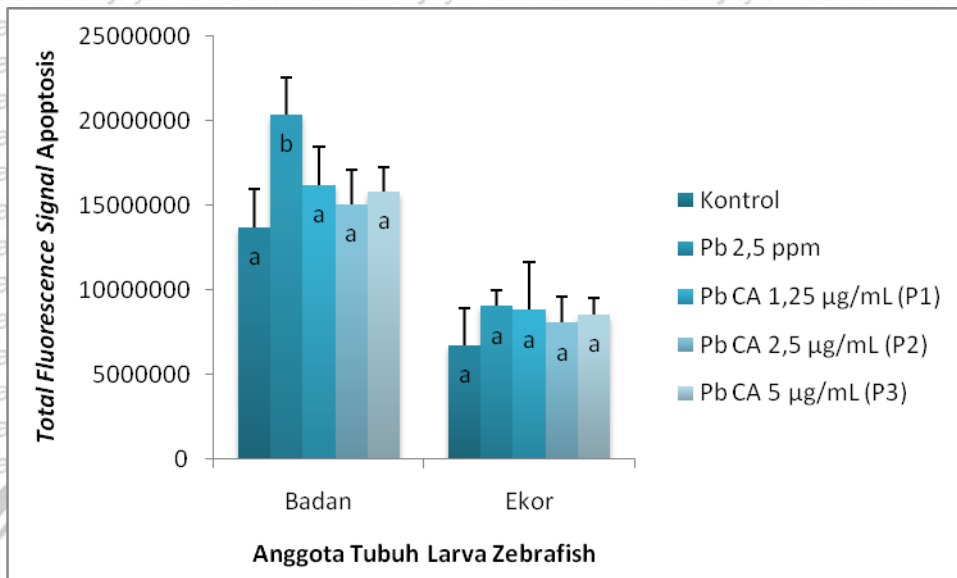
Tabel 5. 3 Hasil Perbandingan Rerata Apoptosis Larva Zebrafish Usia 3 dpf pada Semua Kelompok.

Kelompok Perlakuan	Rerata ± SD	p-value
Kontrol	13703977 ± 2245068	
Timbal	20378567 ± 2167297	
Apoptosis Badan		0,001
P 1 (Pb+CA 1,25 µg/mL)	16201978 ± 2234570	
P 2 (Pb+CA 2,5 µg/mL)	15063730 ± 2056936	
P 3 (Pb+CA 5 µg/mL)	15813521 ± 1418265	
Kontrol	6743399 ± 2202075	
Timbal	9036229 ± 965898	
Apoptosis Ekor		0,321
P 1 (Pb+CA 1,25 µg/mL)	8824564 ± 2785750	
P 2 (Pb+CA 2,5 µg/mL)	8044767 ± 1519590	
P 3 (Pb+CA 5 µg/mL)	8563819 ± 942345	

Berdasarkan tabel 5.3 data apoptosis pada bagian badan dan ekor dilakukan uji normalitas data dengan uji *shapiro-wilk* dan homogenitas ragam data menggunakan uji *Lavene Test*. Hasil uji normalitas dan homogenitas apoptosis pada badan menunjukkan hasil nilai *p-value* masing-masing adalah $p=0,731$ dan $p=0,782$ ($p-value > 0,05$) dan hasil uji normalitas dan homogenitas apoptosis pada ekor menunjukkan hasil nilai *p-value* masing-masing adalah $p=0,327$ dan $p=0,077$ ($p-value > 0,05$) maka dapat disimpulkan bahwa variabel apoptosis badan dan ekor memiliki data yang berdistribusi normal dan homogen.

Selanjutnya dilakukan analisis statistik dengan uji *one way ANOVA*. Berdasarkan uji *one way ANOVA* pada variabel apoptosis yang terjadi pada bagian badan (kepala sampai anus) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan nilai $p-value = 0,001$ ($p-value < 0,05$) sehingga dilakukan uji *post hoc test* Tukey HSD. Pada apoptosis di daerah ekor (dari anus ke ujung ekor) setelah dilakukan

uji statistik menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan dengan nilai $p\text{-value} = 0,321$ ($p > 0,05$). Sehingga tidak dilakukan uji *post hoc test* Tukey HSD.



Gambar 5. 9 Perbedaan *Total Fluorescence Signal Apoptosis* Daerah Badan dan Ekor Usia 3 dpf pada Semua Kelompok.

Keterangan : Terdapat perbedaan signifikan antara ekspresi apoptosis bagian badan dengan semua kelompok ($p\text{-value} < 0,005$). Sedangkan pada kelompok ekor tidak memiliki perbedaan signifikan antar kelompok ($p\text{-value} > 0,05$). Huruf berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan $p\text{-value} < 0,05$.

Berdasarkan gambar 5.9 hasil uji *post hoc* Tukey HSD menunjukkan bahwa pada kelompok timbal (Pb) mengalami peningkatan apoptosis yang berbeda signifikan dengan kelompok kontrol dimana nilai $p=0,00$ ($p\text{-value} < 0,05$). Pada kelompok P 1, P 2 dan P 3 menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok timbal (Pb) dimana didapatkan nilai $p\text{-value}$ masing-masing sebesar $p=0,031$, $p=0,004$ dan $p=0,016$ ($p\text{-value} < 0,05$). Penurunan apoptosis pada kelompok P 1, P 2 dan P 3 secara statistik tidak berbeda signifikan dibandingkan kelompok kontrol dengan nilai $p\text{-value} > 0,05$. Hal ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) pada kelompok P 1, P 2 dan P 3 dapat menurunkan apoptosis pada bagian

kepala sampai badan (batas badan adalah anus) secara signifikan dan tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol.

5.5 Hubungan Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Lokomotor, Osifikasi Tulang Keras, Ekspresi SIRT 1 dan Apoptosis pada Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).

Berdasarkan hasil analisis, didapatkan hasil uji korelasi sebagai berikut :

Tabel 5. 4 Hasil Uji Hubungan Pegagan dengan Lokomotor, Osifikasi Tulang Keras, Ekspresi SIRT 1 dan Apoptosis.

Hubungan	p-value	Koefisien Korelasi	Keterangan
Pegagan dengan Lokomotor 6 dpf	0,000	0,706	Kuat
Pegagan dengan Osifikasi Tulang Keras	0,001	0,685	Kuat
Pegagan dengan SIRT 1	0,037	0,605	Kuat
Pegagan dengan Apoptosis Badan	0,005	-0,607	Kuat

Hasil uji korelasi antara dosis pemberian ekstrak etanol pegagan dengan lokomotor didapatkan koefisien korelasi bernilai 0,706 yang menunjukkan tingkat keeratan hubungan yang kuat, dimana dengan dosis yang lebih besar akan diikuti dengan perbaikan lokomotor yang semakin tinggi. Pada pengujian korelasi antara pemberian ekstrak etanol pegagan dengan osifikasi tulang keras, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0,685 sehingga menunjukkan adanya tingkat keeratan hubungan yang kuat. Hasil uji korelasi antara dosis pemberian ekstrak etanol pegagan dengan ekspresi SIRT 1 menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang kuat antara pemberian ekstrak etanol pegagan dan ekspresi SIRT 1 dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,605. Pada pengujian korelasi antara dosis pegagan dengan apoptosis pada badan larva zebrafish didapatkan koefisien korelasi sebesar -0,607 yang berarti peningkatan dosis ekstrak etanol pegagan akan diikuti dengan penurunan kadar apoptosis.

BAB 6

PEMBAHASAN

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

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan timbal 2,5 ppm secara signifikan dapat menurunkan aktifitas lokomotor pada larva zebrafish sampai usia 6 dpf. Penelitian ini sejalan dengan penelitian Tu *et al.*, (2018) dimana pemberian timbal 10 $\mu\text{mol/L}$ menghambat ekspresi gen *nr2a*, yang berperan dalam perkembangan sistem saraf yang selanjutnya dapat menghambat aktifitas lokomotor zebrafish. Timbal mengubah fungsi sistem saraf yang sangat mendasar seperti persinyalan yang termodulasi kalsium pada konsentrasi yang sangat rendah. Pada usia 2 tahun ketika kadar timbal bertambah menyebabkan penurunan dalam koneksi dendrit diantara perubahan lain yang penting dalam perkembangan (*American Academy of Pediatric*, 2016).

Mekanisme utama toksisitas timbal dengan meningkatkan stres oksidatif. Timbal menginduksi ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dan detoksifikasi intermediet reaktif atau perbaikan kerusakan yang terjadi. Stres oksidatif dapat terjadi melalui dua jalur yaitu melalui ROS dan menipisnya cadangan antioksidan. Mekanisme ionik dan apoptosis juga diketahui sebagai mekanisme toksisitas timbal. Timbal dapat mengganti kation bivalen lainnya seperti Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan Fe^{2+} serta kation monovalen seperti Na^{+} , yang mempengaruhi berbagai proses fisiologis dasar (Kim *et al.*, 2018).

Paparan timbal dalam jangka pendek menghasilkan peningkatan yang signifikan baik superoksida dan H_2O_2 , sedangkan paparan timbal kronis menghasilkan peningkatan H_2O_2 , tetapi tidak superoksida karena kompensasi superoksida dismutase (SOD), yang mengkatalisis pemindahan superoksida

menjadi H_2O_2 , sehingga terjadi reduksi superoksida dan peningkatan H_2O_2 pada fase kronis. Konsentrasi H_2O_2 yang lebih tinggi merangsang ekspresi gen yang mengkode enzim katalase, mewakili respon kompensasi terhadap stress oksidatif (Lopes *et al.*, 2016). Timbal menghambat enzim katalase untuk merusak pembersihan radikal superoksida selain itu juga menggantikan ion seng yang berfungsi sebagai kofaktor penting untuk enzim antioksidan dan menonaktifkannya (Flora *et al.*, 2012).

Otak berkembang sangat sensitif terhadap semua neurotoksikan, Pada anak-anak dengan konsentrasi timbal darah relatif rendah menyebabkan defisit motorik. Fungsi motorik yang terpengaruh oleh kadar timbal yang rendah seperti ketangkasan, koordinasi bilateral dan kemampuan visuo-motorik. Kadar timbal yang lebih tinggi dikaitkan dengan disfungsi motorik yang lebih parah termasuk masalah dengan keseimbangan posisi, gaya berjalan dan aktivitas lokomotor (Mansouri & Cauli, 2009).

Pada zebrafish hampir sama dengan mamalia, kelainan motor neuron, axon, *neuromuscular junction*, dan otot menyebabkan penurunan lokomotor (LeDoux, 2015). Keracunan timbal mempengaruhi korteks serebral dan ganglia basal yang merupakan area otak yang berperan dalam kontrol motorik. Efek neurotoksik timbal disebabkan karena kerusakan oksidatif, bersaing dengan sistem transportasi kalsium dan penyerapannya ke terminal saraf serta oleh reseptor kalsium digabungkan dengan fungsi *second messenger*. Persaingan antara timbal dan kalsium menyebabkan penghambatan pelepasan neurotransmitter (Reckziegel *et al.*, 2011). Intoksikasi timbal secara signifikan mengganggu aktivitas lokomotor serta koordinasi motorik, dimana disebabkan karena pengurangan yang signifikan tingkat noradrenalin di korteks dan metabolisme dopamin di striatum (Sabbar *et al.*, 2018). Kerusakan saraf akibat paparan timbal menghasilkan pengurangan transmisi katekolaminergik, baik

dengan menghambat sintesis dopamin dan pelepasannya dalam celah sinaptik, atau dengan menghambat reseptor D2 post sinaptik (Nouredine *et al.*, 2004).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa yang terdapat pada pegagan mampu meningkatkan aktivitas lokomotor yang menurun secara signifikan karena paparan timbal. Penelitian ini sejalan dengan penelitian Hanum *et al.*, (2016), dimana ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) pada dosis 5 µg/mL diketahui dapat membantu memperbaiki lokomotor yang mengalami penurunan karena induksi rotenon. Salah satu kandungan dari pegagan yaitu asam asiatic mengurangi ekspresi bax, faktor penginduksi apoptosis, caspase-3 dan menginduksi ekspresi Bcl-2 di striatum. Peningkatan ekspresi tirosin hidrosilase melalui peningkatan *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), dan penurunan α -synuklein serta ekspresi *Toll Like Receptor 4* (TLR4) dalam striatum menunjukkan perbaikan neurodegenerasi dopaminergik, meningkatkan kadar dopamin di striatum dan meningkatkan faktor pertumbuhan saraf otak dan faktor neurotropik sel glial, yang memodulasi berbagai kaskade pensinyalan. Pemberian asam asiatic memperbaiki disfungsi motorik dan mengurangi ekspresi faktor neurotropik dan reseptor tirosin kinase bersama dengan peningkatan kadar dopamin (Meeran *et al.*, 2018). Meningkatkan *Glutathion* yang merupakan antioksidan dan menurunkan rasio Bcl 2/Bax, sehingga apoptosis neuron dopaminergik dapat dicegah dengan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) (Octaviana *et al.*, 2019; Trisnawati *et al.*, 2019).

6.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Osifikasi Tulang Keras Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).

Terjadi penurunan osifikasi tulang keras secara signifikan pada kelompok timbal dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sejalan dengan penelitian Octaviana *et al.*, (2019) menunjukkan bahwa timbal dengan dosis 2,5 ppm menyebabkan penurunan osifikasi tulang. Timbal mempengaruhi pertumbuhan

tulang yang menyebabkan penurunan perawakan, pertumbuhan kerangka aksial, dan lingkaran dada selama masa anak-anak. Pada masa perkembangan, timbal menjadi lebih beracun pada jaringan tulang berkaitan dengan kalsium dan fosfor dalam matriks tulang. Penurunan kandungan kalsium terjadi karena adanya peningkatan resorpsi tulang (Bhardwaj & Rai, 2016).

ROS yang disebabkan karena paparan timbal dapat terlibat dalam resorpsi tulang dengan kontribusi langsung superoksida yang dihasilkan osteoklas terhadap degradasi tulang, sehingga stres oksidatif meningkatkan diferensiasi dan fungsi osteoklas dan menghambat produksi protein tulang seperti osteocalcin, kolagen, dan osteopontin (Gargouri *et al.*, 2016; Tarasco *et al.*, 2019). Osteoklastogenesis dapat disebabkan karena peningkatan ROS seperti terbentuknya radikal bebas, ion oksigen serta peroksidase. Stres oksidatif menginisiasi respon imun IL-6, dimana IL-6 berperan dalam mengaktifkan osteoklastogenesis, sehingga jika terjadi peningkatan osteoklastogenesis maka akan menekan osteoblastogenesis yang berdampak pada pertumbuhan tulang (Wauquier, *et al.*, 2009). Keracunan timbal mempengaruhi metabolisme mineral kalsium dan fosfor dengan menghambat enzim ginjal 1-hidrohidroksilase, yang diperlukan untuk sintesis 1,25 dihidroksi vitamin D3 sehingga menyebabkan hipokalsemia dan hipofosfatemia karena penurunan penyerapan di usus kedua mineral ini (Dongre *et al.*, 2013). Selain itu kerusakan ini karena timbal menghambat sel-sel osteoblas dan sintesis vitamin D untuk osteocalcin. Timbal mengganggu homeostasis kalsium dan sistem *messenger sekunder* yang diatur kalsium melalui gangguan sinyal cAMP. Secara signifikan timbal mengurangi kandungan asam nukleat dan aktivitas alkali fosfatase yang dianggap sebagai biomarker dari fungsi osteoblast (Ronis *et al.*, 2001; Payal *et al.*, 2009).

Penelitian *in vivo* menunjukkan bahwa keracunan timbal menurunkan kandungan mineral tulang dan sifat mekanik tulang panjang dan tulang

mandibula (Conti *et al.*, 2012; Olchowiak *et al.*, 2014). Selain itu, menghasilkan ketidakseimbangan dalam remodeling tulang, menyebabkan peningkatan pembentukan tulang dan resorpsi. Proses pembentukan / mineralisasi tulang dan resorpsi dipercepat, menghasilkan pembentukan tulang berkualitas buruk (Monir *et al.*, 2010). Studi *in vitro* memberikan bukti bahwa timbal menghambat aktivitas osteoblastik dengan menghambat jalur pensinyalan Wnt dan menginduksi apoptosis osteoblas (Rodr & Mandalunis, 2018).

Pada penelitian ini pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) secara signifikan meningkatkan osifikasi tulang keras dibandingkan kelompok timbal. Sejalan dengan penelitian Nuraenah (2018) bahwa pemberian ekstrak etanol pegagan 5 µg/mL yang diberikan pada 4, 5 dan 6 dpf terbukti dapat meningkatkan osifikasi tulang keras pada larva zebrafish. Pegagan (*Centella asiatica*) memiliki sifat antioksidan di samping sebagai agen anti inflamasi dan mengandung zat gizi mikro termasuk kalsium sebagai mineral yang bertanggung jawab untuk pembentukan tulang (Octaviana *et al.*, 2019). Peningkatan asupan kalsium dapat mengurangi penyerapan timbal di gastrointestinal dan juga mencegah paparan timbal yang dimobilisasi dari kerangka selama demineralisasi tulang. Interaksi antara timbal dan kalsium terjadi pada beberapa situs dalam tubuh, termasuk mekanisme seluler yang mengatur transpor ion melintasi membran (Prasanthi *et al.*, 2010).

Berdasarkan penelitian *in vivo* dan *in vitro* Feng *et al.*, (2015), diet tinggi kalsium dikombinasikan dengan *Parathyroid Hormone* (PTH) yang tinggi dapat merangsang proliferasi dan diferensiasi osteoblas, dan merangsang pembentukan tulang osteoblastik dengan mengatur ekspresi *Calcium Sensing Receptor*, *Thrombin Receptor Activator Peptide 6*, dan IGF-1. Asiaticoside memiliki efek supresif pada pembentukan osteoklas yang diinduksi oleh *Receptor Activator Nuclear Kappa β Ligan* (RANKL) dan resorpsi tulang, melalui

pelemahan pensinyalan *Nuclear Factor of Activated T cells 1* (NFATc1) dan jalur NFkB (He *et al.*, 2018).

Terdapat beberapa kelompok flavonoid dalam pegagan termasuk quercetin, kaempferol, berbagai glikosida, katekin, rutin, naringin, castilliferol, dan castillicetin yang berperan dalam perkembangan tulang. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kaempferol merangsang diferensiasi osteogenik osteoblas secara *in vitro* melalui pensinyalan reseptor estrogen. Selain itu, quercetin dan kaempferol menunjukkan efek penghambatan pada resorpsi tulang dan apoptosis osteoklas. Quercetin, yang juga terdapat dalam pegagan, menunjukkan efek stimulasi yang signifikan terhadap proliferasi dan mineralisasi osteoblas pada tikus, sehingga mendorong proses pembentukan tulang (Karis *et al.*, 2019). Kelompok orto-fenolik quersetin yang terletak di cincin kuersetin B juga dikenal sebagai agen *Chelating* timbal yang dapat membentuk ikatan koordinasi dengan timbal. Quercetin secara nyata menurunkan tingkat ROS dan menurunkan rasio GSH/GSSG, menekan peningkatan level 8-hydroxy deoxy guanosine, bersama dengan pemulihan aktivitas Cu / Zn-SOD, CAT dan GPx di ginjal tikus yang diberi timbal (Flora *et al.*, 2012).

Kelompok flavonoid lain yang terkandung dalam pegagan telah terbukti memperpanjang usia osteoblas dan meningkatkan aktivitas alkali fosfatase. Terapi katekin mengurangi produksi sitokin yang menginduksi resorpsi tulang dan apoptosis pada osteoblas. Naringin, flavonoid lain yang ditemukan dalam pegagan, dapat mengurangi jumlah osteoklas yang terbentuk melalui diferensiasi yang diinduksi interleukin 1 (IL 1). Selain itu, naringin meningkatkan massa tulang dengan menekan pembentukan osteoklas pada tikus (Yang *et al.*, 2006).

6.3 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi SIRT 1 Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).

Berdasarkan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi SIRT 1 pada kelompok timbal lebih rendah dengan kelompok kontrol tetapi secara statistik tidak berbeda secara signifikan. SIRT 1 merupakan protein kelangsungan hidup seluler yang juga terlibat dalam memerangi stres oksidatif.

Penelitian terbaru menunjukkan bahwa ROS dapat mengontrol aktivitas enzim SIRT 1, seperti ROS dapat menghambat aktivitas SIRT 1 dan aktivitas SIRT 1 yang mneurun meningkatkan persinyalan NF κ B (Salminen *et al.*, 2013). Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Feng *et al.*, (2016), dimana timbal sebagai logam berat beracun dapat mengaktifkan respons kerusakan DNA dan meningkatkan ekspresi protein p53, yang mengarah ke pemblokiran aktivitas transkripsi SIRT 1, sehingga terjadi penurunan SIRT 1. Paparan timbal dapat menurunkan fosforilasi SIRT 1 dan *cAMP response element-binding protein* CREB pada hipokampus tikus. Paparan timbal kronis mengurangi mRNA SIRT 1 di otak yang menua tanpa mempengaruhi kadar protein totalnya (Zhang *et al.*, 2017).

Status redoks, terutama tingkat tiol intraseluler dapat mempengaruhi hilangnya SIRT 1 selama paparan stres lingkungan. Stres oksidatif juga dapat menginduksi transien S-glutationilasi SIRT 1. SIRT 1 juga dapat menjadi nitrosilasi melalui reaksi transnitrosilasi yang dimediasi GAPDH, yang jelas mengurangi aktivitas SIRT 1. Selain itu, stres oksidatif dapat menurunkan tingkat NAD⁺ dan dengan demikian menghambat aktivitas SIRT 1 (Salminen *et al.*, 2013). Stres oksidatif dapat menyebabkan hilangnya NAD⁺ melalui mekanisme aktivasi enzim yang mengkonsumsi NAD⁺ PARP-1, pembukaan saluran penghubung connexin-43 (Cx43), yang akan memungkinkan lewatnya NAD⁺ ke

dalam ruang ekstraseluler dan penurunan regulasi NAMPT, enzim kunci dalam biosintesis NAD⁺ (Pillai *et al.*, 2010).

Stres oksidatif ringan menginduksi ekspresi sirtuin sebagai mekanisme kompensasi, sementara kondisi oksidan yang berat atau berkepanjangan mengakibatkan sirtuin yang disfungsi lebih rentan terhadap degradasi oleh proteasome (Santos *et al.*, 2016). SIRT 1 dianggap berfungsi sebagai ^{sensor} nutrisi yang memediasi aksi neuroprotektif dalam berbagai model toksisitas.

Penghambatan ekspresi SIRT 1 dapat mendorong aktivasi apoptosis mitokondria, sebaliknya overekspresi SIRT 1 mengurangi kehilangan aksonal dalam hipocampus dan efek peradangan pada sumsum tulang belakang (Nimmagadda *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017). SIRT 1 dapat berpartisipasi dalam kerusakan sel yang disebabkan oleh zat beracun, berinteraksi dengan substrat protein, seperti keluarga faktor transkripsi Forkhead-box (FOXO), *nuklear factor kappa B* (NF-κB), dan penekan tumor p53 di beberapa jalur pensinyalan tetapi juga dapat memainkan peran antagonis di bawah aktivasi aktivator SIRT 1 (Ren *et al.*, 2019).

Pegagan berperan sebagai stimulator SIRT 1 (Cheng *et al.*, 2014). Penelitian terbaru melaporkan bahwa quercetin salah satu komponen pegagan dapat menekan apoptosis sel dengan mengatur ekspresi SIRT 1 (Feng *et al.*, 2019). Aktivasi enzim seperti NAMPT yang terlibat dalam penyelamatan NAD⁺ berperan penting dalam mengatur aktivitas SIRT 1. Quercetin merupakan salah satu aktivator tidak langsung SIRT 1 yang dapat mengaktifkan aktivitas/ekspresi NAMPT dan AMP *activated kinase* (AMPK). AMPK juga dapat mengaktifkan NAMPT sehingga meningkatkan tingkat NAD⁺ (Chung S, *et al.*, 2010). Dalam analisis ekspresi gen, pemberian asam asiatic menyebabkan peningkatan regulasi gen SIRT 1 dan *Peroxisome Proliferator Activated Reseptor Gamma Coactivator 1* (PGC-1) yang bertanggung jawab untuk biogenesis dan fungsi

mitokondria, sehingga secara positif mempengaruhi kelangsungan hidup (Lokanathan *et al.*, 2016). Disfungsi mitokondria merupakan salah satu gangguan dikarenakan pengaruhnya terhadap pembentukan ATP, metabolisme dan apoptosis. Peningkatan SIRT 1 dapat meningkatkan ATP, mencegah pembentukan ROS dan meningkatkan aktivitas Mn-SOD, sehingga SIRT 1 dapat melindungi fungsi mitokondria dengan meningkatkan DNA mitokondria yang mengarah pada promosi ATP, peningkatan oksigen mitokondria dan penurunan ROS (Wang *et al.*, 2016). SIRT 1 dapat memberikan perlindungan sel dari stres oksidatif melalui modulasi faktor transkripsi forkhead dan meningkatkan aktivitas katalase. Pada sel neuron ekspresi SIRT 1 berlebih dapat meningkatkan toleransi radikal bebas. SIRT 1 dapat menghambat apoptosis yang disebabkan protein p53 melalui deasetilasi p53 dan induksi MnSOD (Chong *et al.*, 2012).

Antioksidan endogen berfungsi sebagai satu sistem besar yang menjaga keseimbangan redoks dalam tubuh. Ketika kadar ROS naik dan mengancam proses homeostatis tubuh, antioksidan endogen diaktifkan. Sebagian besar diekspresikan ketika beberapa faktor diaktifkan seperti Nrf 2. Antioksidan endogen juga bekerja sama dengan antioksidan eksogen dari makanan hingga menurunkan kadar ROS. Walaupun semuanya bekerja bersama, mungkin protein antioksidan yang memiliki aktivitas enzimatik, seperti superoksida dismutase, katalase, dan glutathione peroksidase merupakan garis pertahanan pertama melawan stres oksidatif (Aguilar, T.A.F., Navarro, B.C.H. & Perez, 2016). Hal ini diduga menjadi penyebab penurunan kadar SIRT 1 pada kelompok perlakuan 3 menurun dibandingkan kelompok perlakuan 2. Pada penelitian lain yang dilakukan Farghali (2019) dalam keadaan hepatotoksitas subkronik, quercetin dapat menurunkan ekspresi SIRT 1 namun lebih tinggi dari normal, keadaan ini masih efektif untuk menangani hepatotoksitas yang diinduksi xenobiotik.

6.4 Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Apoptosis Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok timbal mengalami apoptosis pada sekitar badan yang lebih tinggi dan berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, tetapi apoptosis pada daerah ekor tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Hal ini dapat disebabkan karena luas area ekor yang lebih kecil dibanding badan dan dapat juga disebabkan karena apoptosis yang diinduksi oleh timbal sebagian besar terjadi dibagian otak sehingga tidak begitu tereksprei dibagian ekor.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Mousa *et al.*, (2015), paparan timbal selama gestasional pada tikus menginduksi toksisitas janin, dan kelainan perkembangan, juga mengganggu perkembangan lapisan serebelar, menginduksi perubahan struktural, dan apoptosis pada korteks serebelar janin. Kelebihan timbal menyebabkan neurotoksisitas pada manusia dan hewan, termasuk defisit perilaku pada otak, kerusakan hipocampus dan apoptosis pada sel adrenal medula pheochromocytoma tikus (Nan *et al.*, 2016). Ketidakmatangan penghalang darah di otak janin dan sel endotel memungkinkan cairan dan kation termasuk timbal untuk mencapai astrosit dan neuron. Timbal yang terdeposit dapat dihilangkan dengan sangat lambat dan tidak dapat dihilangkan dengan *chelating* agen dari otak (Mousa *et al.*, 2018).

Kelebihan dosis timbal dapat menyebabkan stres oksidatif, yang merupakan salah satu mekanisme kemungkinan efek negatif dari timbal pada organisme. Stres oksidatif dapat mengganggu keseimbangan prooxidant/antioksidan dalam sel mamalia (Wang *et al.*, 2013) dan juga dapat menginduksi apoptosis. Protein pro-apoptosis seperti Bax dapat meningkatkan apoptosis. p53 terakumulasi selama proses apoptosis. p53 dapat mempromosikan apoptosis neuron dengan meningkatkan transkripsi Bax. Induksi p53 mengarah ke rilis

sitokrom c. Pelepasan sitokrom c mengaktifkan Caspase-3. Aktivasi Caspase-3 menginduksi apoptosis (Mousa *et al.*, 2018).

Timbal mendepolarisasi mitokondria sel karena pembukaan pori transisi permeabilitas, menghasilkan pelepasan sitokrom c, aktivasi caspase, dan apoptosis. Pada apoptosis yang diinduksi timbal, pembukaan pori transisi permeabilitas mitokondria disebabkan oleh stres oksidatif (Ranjbar *et al.*, 2014). Paparan timbal dapat menyebabkan cacat struktural dan fungsional di berbagai organ yang menyebabkan kelainan fisiologis dan biokimia dengan mengganggu proses genetik yang memerintahkan jalur perkembangan normal, migrasi sel dan kematian sel yang terlibat dalam organogenesis normal, yang mengarah ke kelainan (Mousa *et al.*, 2015). Kelainan tersebut dapat terjadi pada neuron motorik yang mengatur aktivitas lokomotor dan juga kelainan pada pembentukan tulang.

Apoptosis pada osteoblas dapat terjadi melalui faktor-faktor fisiologis atau patologis, seperti apoptosis osteoblas dapat diinduksi oleh lipid teroksidasi yang kemudian menghambat diferensiasi osteoblas melalui mekanisme independen ROS. Selanjutnya, protein matriks, seperti fibronectin dan osteopontin terlibat dalam apoptosis osteoblas dan kelangsungan hidup. Keseimbangan antara pembentukan osteoblas dari prosesor mesenchymal dan apoptosis akan menentukan jumlah sel. Aktivitas caspase juga berperan penting dalam apoptosis osteoblas dan mungkin juga penting dalam osteogenesis (Mollazadeh *et al.*, 2015).

Pemberian ekstrak etanol pegagan pada penelitian ini secara signifikan dapat menurunkan apoptosis pada bagian badan maupun ekor larva zebrafish.

Semua dosis ekstrak etanol pegagan tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Priyantiningrum *et al.*, (2015) yang menunjukkan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dengan

dosis terapi 300 mg/kg/hari selama 21 hari pada tikus yang mengalami stres kronis dapat meningkatkan jumlah neuron di korteks prefrontal. Peningkatan jumlah neuron ini disebabkan oleh pegagan (*Centella asiatica*) dapat menghambat apoptosis. Asiaticoside yang terkandung dalam pegagan (*Centella asiatica*) memiliki efek neuroprotektif dan dapat menghambat kematian sel (Kuswati, 2015).

Pemberian pegagan (*Centella asiatica*), sebagai antioksidan yang dikaitkan dengan berbagai mekanisme, seperti pencegahan inisiasi rantai, pengikatan meta transisi, penguraian peroksida, dan kekuatan dalam membersihkan radikal bebas (Sugunabai *et al.*, 2015). Pemberian pegagan (*Centella Asiatica*) pada tikus meningkatkan aktivitas SOD, katalase, GPx dan glutathione reductase, dan tingkat GSH di daerah otak dapat menunjukkan bahwa pegagan (*Centella asiatica*) menawarkan perlindungan sel terhadap stres oksidatif. Peningkatan aktivitas enzim antioksidan dapat bertindak sebagai mekanisme kompensasi tambahan untuk menjaga integritas sel dan perlindungan terhadap ROS (Chintapanti *et al.*, 2018).

Pegagan (*Centella asiatica*) juga dapat bertindak dengan menghambat aktivitas caspase-9, salah satu enzim yang terlibat dalam aktivasi jalur apoptosis. Ada beberapa mekanisme yang mungkin berkontribusi terhadap efek penghambatan pegagan (*Centella asiatica*) pada aktivitas caspase-9. Pegagan (*Centella asiatica*) dapat bekerja dengan menghambat protein proapoptotik seperti p53, Bax dan Bad atau mendorong produksi anggota keluarga anti-apoptosis seperti Bcl-2 dan Bcl-xL. Pegagan (*Centella asiatica*) juga diperkirakan dapat meniru anggota keluarga anti-apoptosis, sehingga mengurangi heterodimerisasi anggota keluarga BCL dan menghambat pelepasan sitokrom c yang menghasilkan pengurangan pembentukan apaf-1 dan procaspase-9 untuk mengaktifkan aktivitas caspase-9 (Omar *et al.*, 2011).

Pada kelompok perlakuan P 3 dengan pemberian pegagan 5 µg/mL dapat meningkatkan apoptosis dibandingkan dengan kelompok perlakuan P 2 pada apoptosis daerah badan dan ekor. Hal ini kemungkinan dapat disebabkan adanya salah satu kandungan pegagan (*Centella asiatica*) yaitu asiatic acid apabila diberikan dalam konsentrasi tinggi dapat mengurangi kemampuan perlindungan dan bahkan menunjukkan efek toksik, karena jika diberikan dalam dosis tinggi asiatic acid dapat menginduksi apoptosis melalui aktivasi caspase 9 dan 3 serta dapat meningkatkan kalsium intraseluler (Xu M *et al.*, 2012).

6.5 Hubungan Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Lokomotor, Osifikasi Tulang Keras, Ekspresi SIRT 1 dan Apoptosis pada Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal (Pb).

Hasil uji korelasi menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara ekstrak etanol pegagan dengan koefisien korelatif positif yang kuat terhadap lokomotor, osifikasi tulang keras, terdapat korelasi positif dan kuat terhadap ekspresi SIRT 1 dan terdapat korelasi negatif yang kuat terhadap apoptosis. Hal ini dapat diartikan bahwa pemberian ekstrak etanol pegagan dengan dosis yang berbeda dapat meningkatkan lokomotor, osifikasi tulang keras, ekspresi SIRT 1 dan secara signifikan dapat menurunkan apoptosis pada larva zebrafish yang dipapar timbal.

Pegagan (*Centella asiatica*) mengandung glikosida triterpenoid dalam jumlah yang tinggi, seperti asam asiatik, asiaticoside, asam madecassic, madecassoside, asam madasiatic, asam betulinic, asam thankunic, asam isothankunic, noxyasiaticoside, dan centellosides (Orhan, 2012). Asam asiatik yang terkandung dalam pegagan merupakan antioksidan pemecah rantai yang sangat efektif, yang bertindak dalam mengurangi ROS. Asam asiatik melemahkan aktivasi myeloperoksidase dan menghambat peroksidase lipid. Asam asiatik juga meningkatkan aktivitas antioksidan baik enzimatis maupun nonenzimatis. Asam asiatik memodulasi aktivitas beberapa faktor transkripsi

seperti NFkB, SIRT 1 dan jalur persinyalannya (Meeran, 2018). Madecascoside dapat meningkatkan viabilitas sel, meningkatkan kadar glutation, menurunkan tingkat laktat dehidrogenase dan malondialdehid yang disebabkan oleh hidrogen peroksida. Menurunkan apoptosis, mencegah aktivitas caspase 3 dan hilangnya potensi membran mitokondria (Bian, 2012).

Beberapa zat gizi yang terkandung pada pegagan banyak dibutuhkan pada proses pembentukan tulang seperti fosfor sangat dibutuhkan pada resorpsi tulang dalam proses remodeling tulang (Tjandranegara, 2017), zink diperlukan untuk meningkatkan IGF 1 dalam proses percepatan pertumbuhan anak-anak dan kandungan kalsium dalam pegagan dibutuhkan pada proses pembentukan tulang (Candrika, 2015).

6.6 Implikasi Hasil Penelitian dalam Asuhan Kebidanan

Toksisitas timbal disebabkan karena pencemaran lingkungan, dan memiliki pengaruh yang sangat buruk terhadap tubuh manusia baik pada anak-anak maupun orang dewasa. Namun, toksisitas timbal pada anak-anak memiliki dampak yang lebih besar dibandingkan pada orang dewasa karena anak-anak dalam masa pertumbuhan dan perkembangan. Ibu hamil, janin, bayi, balita dan anak-anak sangat sensitif bahkan pada kadar timbal yang rendah, yang dapat berkontribusi pada masalah perilaku, kekurangan belajar, dan dapat menurunkan IQ. Logam ini sangat mudah menembus plasenta dan dapat ditransfer melalui air susu ibu. Hampir seluruh organ tubuh yang terpengaruh oleh toksisitas timbal. Meskipun di negara maju penggunaan timbal sudah dapat dikendalikan sampai batas tertentu tetapi di negara berkembang seperti Indonesia masih banyak digunakan dalam proses industri (Wani *et al.*, 2015).

Penduduk di negara berkembang sebagian besar belum mengetahui apa saja ancaman atau bahaya yang disebabkan oleh adanya paparan timbal didalam tubuh, hal ini dapat terjadi karena masyarakat belum menemukan

secara langsung gejala dari orang yang mengalami keracunan karena paparan timbal. Sehingga masyarakat tidak peduli dampak timbal pada kesehatan meskipun sudah banyak kejadian keracunan timbal di negara lain.

Penelitian ini digunakan untuk mengetahui patomekanisme toksisitas timbal dan untuk memanfaatkan peluang tanaman herbal pegagan dapat digunakan untuk mencegah toksisitas timbal yang dapat menyebabkan kelainan pada embriogenesis sehingga dengan pemberian pegagan dapat meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan anak-anak.

Mengingat prevalensi timbal yang ada di lingkungan, bidan sebagai penyedia layanan kebidanan dapat bertemu dengan wanita hamil dan tidak hamil yang beresiko terhadap paparan timbal. Bidan diharuskan memiliki pengetahuan tentang bahaya lingkungan yang ditemui selama prakonsepsi, kehamilan, dan periode postpartum dan secara ideal diposisikan untuk mencegah atau membatasi paparan racun pada wanita usia reproduksi, janin, dan bayi. Bidan dapat berperan penting dalam membatasi kontak wanita dengan bahaya lain yang terdokumentasi dengan baik, termasuk polusi udara, pestisida dan logam.

Bidan dapat mengidentifikasi faktor risiko yang dapat dilihat dari status sosial ekonomi rendah, kualitas perumahan yang buruk, paparan pekerjaan, kesehatan yang buruk, gizi buruk, dan stresor psikososial .

Pencegahan lebih baik dari pengobatan. Bidan dapat memberikan informasi atau pendidikan kesehatan terkait pencegahan terhadap paparan timbal seperti meminimalkan paparan timbal dalam pekerjaan, atau lingkungan sekitar. Asupan nutrisi sebelum kehamilan harus diperhatikan karena dapat menentukan kualitas generasi yang dilahirkan seperti meningkatkan konsumsi kalsium, zat besi, dan vitamin C yang dapat mengurangi penyerapan timbal dalam tubuh (Hackley & Katz-Jacobson, 2003). Pegagan yang kaya zat gizi dan bahan aktif lainnya tergolong dalam kriteria tanaman praktis dan tidak toksik

sehingga berpotensi dijadikan sebagai bahan makanan alternatif yang dapat meningkatkan antioksidan dalam pencegahan toksisitas akibat paparan bahan kimia dari lingkungan sekitar.

6.7 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dalam penelitian ini tidak melakukan pemeriksaan terhadap kadar timbal yang terdapat pada larva zebrafish, tidak melakukan pemeriksaan marker penanda peningkatan ROS dan kematian sel.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) meningkatkan lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).
2. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) meningkatkan osifikasi tulang keras pada larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).
3. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) meningkatkan ekspresi SIRT 1 pada larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).
4. Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) menurunkan apoptosis pada larva zebrafish yang dipapar timbal (Pb).
5. Terdapat hubungan positif dan kuat antara ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dengan lokomotor, osifikasi tulang keras, dan ekspresi SIRT 1, terdapat hubungan negatif dan kuat dengan apoptosis.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efektifitas pemberian pegagan terhadap apoptosis yang diperiksa secara biomolekuler seperti kadar Bax, p 53.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengukuran lokomotor dengan menggunakan *Danioscope*.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efektifitas pemberian pegagan terhadap pencegahan gangguan perkembangan karena timbal dengan pemeriksaan DNA pada organ tubuh zebrafish.

DAFTAR PUSTAKA

Adigun R, Bhimji SS. Necrosis, Cell (Liquefactive, Coagulative, Caseous, Fat, Fibrinoid, and Gangrenous) [Updated 2018 Oct 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018

Aguilar, T.A.F., Navarro, B.C.H. & Pérez, J.A.M. 2016. Endogenous antioxidants: a review of their role in oxidative stress. In *A Master Regulator of Oxidative Stress-The Transcription Factor Nrf2*. IntechOpen.

Ahamed, M. & Siddiqui, M.K.J. 2007. Low level lead exposure and oxidative stress : Current opinions. *Clinica Chimica Acta*, 383: 57–64.

Ahmad, F., Noldus, L.P.J.J., Tegelenbosch, R.A.J. & Richardson, M.K. 2012. Zebrafish embryos and larvae in behavioural assays. *Behaviour*, 149(10–12): 1241–1281.

Almeida, M., Han, L., Ambrogini, E., Bartell, S.M. & Manolagas, S.C. 2010. Oxidative stress stimulates apoptosis and activates NF- κ B in osteoblastic cells via a PKC β /p66shc signaling cascade: counter regulation by estrogens or androgens. *Molecular Endocrinology*, 24(10): 2030-2037.

American Academy of Pediatric. 2016. *Lead Exposure in Children* [Online; 03 Juli 2019;08.00].

Anegundi, N. & Pancharatna, K. 2017. 7-Hydroxycoumarin Elicit Anti-Angiogenic Effects Through Cellular Apoptosis in Developing Embryos of Zebrafish (Danio Rerio). *European Scientific Journal*, 13(21).

ATSDR. 2007. Agency for Toxic Substance and Disease Registry. US. Department of Health and Human Service Public Health Service : Toxicological Profile for Lead. Atlanta, Georgia.

Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M.T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., et al. 2012. Regular care and maintenance of a zebrafish (Danio rerio) laboratory: an introduction. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (69).

Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., Rybicka, M., Nowacki, P. & Chlubek, D. 2012. Neurotoxicity of lead. Hypothetical molecular mechanisms of synaptic function disorders. *Neurologia i neurochirurgia polska*, 46(6): 569-578.

Berg, E.M., Bjornfors, E.R., Pallucchi, I., Picton, L.D. & El Manira, A. 2018. Principles Governing Locomotion in Vertebrates: Lessons From Zebrafish. *Frontiers in neural circuits*, 12.

Bhardwaj, P. & Rai, D. V, 2016. Effect of lead toxicity on bone calcium content and morphometric parameters. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 4(1), pp.177–180.

Bian, D., Liu, M., Li, Y., Xia, Y., Gong, Z. & Dai, Y. 2012. Madecassoside, a



- triterpenoid saponin isolated from *Centella asiatica* herbs, protects endothelial cells against oxidative stress. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 26(10), pp.399-406.
- Bocci, V. & Valacchi, G. 2013. Free radicals and antioxidants: how to reestablish redox homeostasis in chronic diseases? *Current Medicinal Chemistry*, 20(27): 3397–3415.
- Breitenbach, M., Ralser, M., Perrone, G.G., Iglseider, B., Rinnerthaler, M. & Dawes, I.W. 2013. Oxidative stress and neurodegeneration: the yeast model system. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 18: 1174-1193.
- Brevini, T.A.L. & Pennarossa, G. 2012. *Gametogenesis, Early Embryo Development and Stem Cell Derivation*. Springer Science & Business Media.
- Brochin, R., Leone, S., Phillips, D., Shepard, N., Zisa, D. & Angerio, A. 2014. The cellular effect of lead poisoning and its clinical picture. *Management*, 8(1).
- Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., et al. 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *science*, 303(5666): 2011-2015.
- Carocci, A., Catalano, A., Lauria, G., Sinicropi, M.S. & Genchi, G. 2016. Lead toxicity, antioxidant defense and environment. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Volume 238 (pp. 45-67). Springer, Cham.
- CDC. 2018, *Prevent Children's Exposure to Lead*. Available at: <https://www.cdc.gov/features/leadpoisoning/index.html>. Diakses tanggal 20 Desember 2018.
- Chae, H. & Broxmeyer, H.E. 2011. Pathway to Block Reactive Oxygen Species-Induced Apoptosis in Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells And Development*, 20(7).
- Chandrika, U.G. & Kumarab, P.A.A.S.P. 2015. "Gotu kola (*Centella asiatica*): nutritional properties and plausible health benefits." In *Advances in food and nutrition research*, vol. 76: 125-157. Academic Press, 2015.
- Chang, H., Wu, U. & Lan, C. 2009. Melatonin preserves longevity protein (sirtuin 1) expression in the hippocampus of total sleep-deprived rats. *Journal of pineal research*, 47(3): 211–220.
- Chauhan, P.K., Pandey, I.P. & Dhatwalia, V.K. 2010. Evaluation of the Anti-diabetic Effect of Ethanolic and Methanolic Extracts of *Centella asiatica* Leaves Extract on Alloxan Induced Diabetic Rats. *Advances in Biological Research*, 4(1): 27–30.
- Chen, Z., Shentu, T.P., Wen, L., Johnson, D.A. & Shyy, J.Y.J. 2013. Regulation of SIRT1 by oxidative stress-responsive miRNAs and a systematic approach to identify its role in the endothelium. *Antioxidants & redox signaling*, 19(13): 1522-1538.

Cheng, Y., Takeuchi, H., Sonobe, Y., Jin, S., Wang, Y., & Suzumura, A., 2014. Sirtuin 1 attenuates oxidative stress via upregulation of superoxide dismutase 2 and catalase in astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 269(1-2), pp.38-43.

Chiara, B., Ilaria, C., Antonietta, C., Francesca, C., Marco, M., Lucia, A. et al. 2014. SIRT1 inhibition affects angiogenic properties of human MSCs. *BioMed research international*, 2014.

Chintapanti, S., Reddy, K.P. & Reddy, P.S., 2018. Behavioral and neurochemical consequences of perinatal exposure to lead in adult male Wistar rats: protective effect by *Centella asiatica*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(13), pp.13173–13185.

Chong, Z.Z., Shang, Y.C., Wang, S. & Maiese, K. 2012. SIRT1: new avenues of discovery for disorders of oxidative stress. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(2): 167–178.

Chung, S., Yao, H., Caito, S., Hwang, J.W., Arunachalam, G. & Rahman, I. 2010. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Archives of biochemistry and biophysics*, 501(1), pp.79-90.

Cohen, J. 2015, *SIRT1: Role In Chronic Health Issues + How to Increase / Decrease It* [Online]. Available at: <https://selfhacked.com/blog/nad-and-sirt1-their-role-in-chronic-health-issues/> [Accessed: 12 January 2019].

Conti, M.I., Terrizzi, A.R., Lee, C.M., Mandalunis, P.M., Bozzini, C., & del Pilar Martínez, M., 2012. Effects of lead exposure on growth and bone biology in growing rats exposed to simulated high altitude. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 88(6), pp.1033-1037.

Colwill, R.M. & Creton, R. 2012. Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Behav Processes*, 86(2): 222–229.

Daitoku, H., Hatta, M., Matsuzaki, H., Aratani, S., Ohshima, T., Miyagishi, M., et al. 2004. Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(27): 10042-10047.

Dapul, H. & Laraque, D. 2014. Lead Poisoning in Children. *Advances In Pediatrics*, 61: 313–333.

Darwitri. 2018. *Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (Centella Asiatica) Pada Masa Pre Sampai Dengan Pot Hatching Terhadap Panjang Badan, Catalase dan Malondialdehyde Larva Zebrafish (Danio Rerio) Stunting*. Universitas Brawijaya. 2018.

Das, A.J. 2011. Review on Nutritional, Medicinal and Pharmacological Properties of *Centella asiatica* (Indian pennywort). *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 4: 216–228.

Defillipo, P.P., Raposo, A.H., Fedoce, A.G., Ferreira, A.S., Polonini, H.C., Gattaz, W.F. et al. 2012. Inhibition of cPLA2 and sPLA2 activities in primary

- cultures of rat cortical neurons by *Centella asiatica* water extract. *Natural product communications*, 7(7): 841-843.
- Deshpande, P.O., Mohan, V. & Thakurdesai, P. 2015. Preclinical safety assessment of standardized extract of *Centella asiatica* (L.) urban leaves. *Toxicology international*, 22(1): 10.
- Djordjevic, V.B. 2004. Free radicals in cell biology. *International review of cytology*, 237: 57–91.
- DLH Pemrov Jatim. 2017. Dokumen Informasi Kinerja Pengelolaan Lingkungan Hidup Daerah Provinsi Jawa Timur Tahun 2017.
- Domazetovic, V. 2017. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 14(2): 209.
- Dongre, N.N., Suryakar, A.N., Patil, A.J., Hundekari, I.A. & Devarnavadagi, B.B. 2013. Biochemical effects of lead exposure on battery manufacture workers with reference to blood pressure, calcium metabolism and bone mineral density. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 28(1), pp.65-70.
- Dribben, W.H., Creeley, C.E. & Farber, N. 2011. Low-level lead exposure triggers neuronal apoptosis in the developing mouse brain. *Neurotoxicology and teratology*, 33(4): 473-480.
- Duan, W.X., He, M.D., Mao, L., Qian, F.H., Li, Y.M., Pi, H.F., et al. 2015. NiO nanoparticles induce apoptosis through repressing SIRT1 in human bronchial epithelial cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 286(2): 80-91.
- Dunn, T.W., Mu, Y., Narayan, S., Randlett, O., Naumann, E.A., Yang, C.T., et al. 2016. Brain-wide mapping of neural activity controlling zebrafish exploratory locomotion. *Elife*, 5: e12741.
- Dutordoir, M.R., A., D. & Bates., A. 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(12): 2977–2992.
- de Esch, C., van der Linde, H., Sliker, R., Willemsen, R., Wolterbeek, A., Woutersen, R. et al. 2012. Locomotor activity assay in zebrafish larvae: influence of age, strain and ethanol. *Neurotoxicology and teratology*, 34(4): 425-433.
- Ettinger AS, Gurthrie Wengrovitz A, editors. Guidelines for the identification and management of lead exposure in pregnant and lactating women. Atlanta (GA): National Center for Environmental Health/Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Centers for Disease Control and Prevention; 2010.
- Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S. & Liang, J. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11): 719–727.
- Farghali, H., Kemelo, M.K. & Canová, N.K. 2019. SIRT1 Modulators in



- Experimentally Induced Liver Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
- Feng, C., Gu, J., Zhou, F., Li, J., Zhu, G., & Zhang, S. 2016. The effect of lead exposure on expression of SIRT1 in the rat hippocampus. *Environmental toxicology and pharmacology*, 44, pp.84-92.
- Feng, K., Chen, Z., & Wang, X., 2019. Quercetin attenuates oxidative stress - induced apoptosis via SIRT1 / AMPK - mediated inhibition of ER stress in rat chondrocytes and prevents the progression of osteoarthritis in a rat model. , (December 2018), pp.1-14.
- Feng, Y., Zhou, M., Zhang, Q., Liu, H., Xu, Y., Shu, L., et al. 2015. Synergistic effects of high dietary calcium and exogenous parathyroid hormone in promoting osteoblastic bone formation in mice. *British Journal of Nutrition*, 113(6): 909-922.
- Figueiredo, F.A.T., Gerlach, R.F., da Veiga, M.A.M.S., Nakadi, F.V., Ramos, J., Kawakita, E.R., et al. 2014. Reduced bone and body mass in young male rats exposed to lead. *BioMed research international*.
- Flora, G., Gupta, D. & Tiwari, A. 2012. Toxicity of lead : A review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology*, 5(2): 47-58.
- Franco, R., Schoneveld, O.J., Pappa, A. & Panayiotidis, M.I. 2007. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Archives of physiology and biochemistry*, 113(4-5): 234-258.
- García-camero, J.P., García-cortés, H., Valcárcel, Y. & Catalá, M. 2015. Environmental concentrations of the cocaine metabolite benzoylecgonine induced sublethal toxicity in the development of plants but not in a zebrafish embryo – larval model. *Journal of Hazardous Materials*, 300, pp.866-872. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.08.019>.
- Gargouri, M., Saad, H.B., Magné, C. & El Feki, A., 2016. Toxicity of Lead on Femoral Bone in Suckling Rats: Alleviation by Spirulina. *Res Rev Biosci*, 11(3), p.105.
- Gearing, M., 2016, *The Deadly Biology of Lead Exposure* [Online]. Available at: <http://sitn.hms.harvard.edu/flash/2016/deadly-biology-lead-exposure/>.
- Gohil, K.J., Patel, J.A. and Gajjar, A.K. 2010. Pharmacological review on Centella asiatica: a potential herbal cure-all. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 72(5): 546.
- Gupta, P., Khobragade, S.B., Shingatgeri, V.M. & Rajaram, S.M. 2014. Assessment of locomotion behavior in adult Zebrafish after acute exposure to different pharmacological reference compounds. *Drug Development and Therapeutics*, 5(2): 127-133.
- Hackley, B. & Katz-Jacobson, A., 2003. Lead poisoning in pregnancy: a case study with implications for midwives. *Journal of midwifery & women's*

health, 48(1), pp.30–38.

Haleagrahara, N. & Ponnusamy, K. 2010. Neuroprotective effect of *Centella asiatica* extract (CAE) on experimentally induced parkinsonism in aged Sprague-Dawley rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 35(1): 41–47.

Hanafiah, K.A. 2016. Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi, PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.

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

Hashim, P. 2011. *Centella asiatica* in food and beverage applications and its potential antioxidant and neuroprotective effect. *International Food Research Journal*, 18(4): 1215.

He, L., Hong, G., Zhou, L., Zhang, J., Fang, J., He, W., et al. 2018. Asiaticoside, a component of *Centella asiatica* attenuates RANKL-induced osteoclastogenesis via NFATc1 and NF- κ B signaling pathways. *Journal of cellular physiology*, 234(4): 4267-4276.

Helmi, Z.N. 2013. Buku Ajar Gangguan Muskuloskeletal Edisi Ke-2., Salemba Medika, Jakarta.

Hori, Y.S., Kuno, A., Hosoda, R. & Horio, Y. 2013. Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 modulators under oxidative stress. *PloS one*, 8(9): 13–15.

Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., et al. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446): 498.

Howells, L. & Betts, T. 2009. A beginner's guide to the zebrafish (*Danio rerio*). *Animal Technology and Welfare*, 8(3): 117–163.

Huo, L., Bai, X., Wang, Y. & Wang, M. 2017. Betulinic acid derivative B10 inhibits glioma cell proliferation through suppression of SIRT1, acetylation of FOXO3a and upregulation of Bim/PUMA. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92: 347–355.

Hurtado, O., Hernández-Jiménez, M., Zarruk, J.G., Cuartero, M.I., Ballesteros, I., Camarero, G., et al. 2013. Citicoline (CDP-choline) increases Sirtuin1 expression concomitant to neuroprotection in experimental stroke. *Journal of neurochemistry*, 126(6): 819-826.

Ingebretson, J.J. & Masino, M.A. 2013. Quantification of locomotor activity in larval zebrafish: considerations for the design of high-throughput behavioral studies. *Frontiers in neural circuits*, 7: 109.

Jayakiran, M. 2015. Apoptosis-Biochemistry : A Mini Review Clinical & Experimental Pathology. *Clinical & Experimental Pathology*, 5(1): 8–11.

Jayashree, G., Muraleedhara, G.K., Sudarshani, S. & Jacob, V.B. 2003. Antioxidant activity of *Centella asiatica* on lymphoma-bearing mice. *Fitoterapia*, 74: 431–434.

Jhamtani, R.C., Shukla, S., Dahiya, M.S. & Agarwal, R. 2017. Research Article Evaluation of Acute Effects of Lead at Sub-Lethal Concentrations in Zebrafish. *Res. J. Environ. Toxicol.* 11 (3): 97-103.

Joshi, K. & Chaturvedi, P. 2013. Therapeutic efficiency of *Centella asiatica* (L.) Urb. An underutilized green leafy vegetable: an overview. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(1): 135–149.

Juliana, C., Nurjazuli & Suhartono. 2017. Hubungan Kadar Timbal dalam Darah dengan Jumlah Eritrosit, MCV dan MCH pada Ibu Hamil di Daerah Pantai. *Higiene*, 3: 161–168.

Kajarabille, N., Díaz-Castro, J., Hijano, S., López-Frías, M., López-Aliaga, I. & Ochoa, J.J. 2013. A new insight to bone turnover: Role of 3 polyunsaturated fatty acids. *The Scientific World Journal*, 2013.

Karis, V., Soekanto, S.R.I.A. & Idrus, E. 2019. Effect of *Centella asiatica* L. On the number of osteoclasts, osteoblasts, and osteocytes in the tibiae of ovariectomized rats. , 11(1), pp.1–4.

Karri, V., Schuhmacher, M. & Kumar, V. 2016. Heavy metals (Pb, Cd, As and MeHg) as risk factors for cognitive dysfunction: A general review of metal mixture mechanism in brain. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48: 203–213.

Kelly, G.S. 2010. A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: Part 1. *Alternative Medicine Review*, 15(4): 313–328.

Khotimah, H., Yuliyani, T., Nuraenah, E., Zahara, E. & Umi Kalsum, N. 2018. *Centella asiatica* increased the body length through the modulation of antioxidant in rotenone-induced zebrafish larvae. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 11(2): 827-833.

Kiehn, O. & Dougherty, K. 2013. Locomotion: circuits and physiology. *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*, pp.1337-1365.

Kim, S.H., Shin, S.H., Go, Y.Y., Chae, S.W. & Song, J.J. 2018. Effect of lead on human middle ear epithelial cells. *BioMed research international*, 2018.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. & Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203(3): 253-310.

Knight, J. 2009. Clearing And Staining For Larval Fish Cartilage And. pp.7–8.

Koronowski, K.B. & Perez, M.A. 2015. Sirt1 in cerebral ischemia. *Brain circulation*, 1(1): 69.

Kumar, A., Prakash, A. and Dogra, S. 2011. Centella asiatica attenuates D-galactose-induced cognitive impairment, oxidative and mitochondrial dysfunction in mice. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011.

Kurnianingsih, N., Utami, J.P., Nurdiana, N. & Lyrawati, D. 2016. Monosodium glutamate exposure at early developmental stage increases apoptosis and stereotypic behavior risks on zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 27(3), p.128.

Kuswati, 2015. The effect of centella asiatica ethanolic extract on caspase-3 expression in prefrontal cortex of chronic restraint stress induced sprague dawley rat. *Indonesian Journal of Medicine and Health Journal*, 7(2), pp.65–72.

Lan, C.C., Tang, R., San Leong, I.U. & Love, D.R. 2009. Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) of zebrafish transcripts: optimization of RNA extraction, quality control considerations, and data analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(10).

Lange, J.H. 2017. Lead: An Environmental Neurotoxic Agent. *Journal of Headache & Pain Management*, 2: 10–11.

LeDoux, M.S. 2015. *Movement Disorders: Genetics and Models*, Elsevier Inc All rights reserved.

Lee, J. & Freeman, J.L. 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.

Li, Y., Xu, W., Mc Burney, M.W. & Longo, V.D. 2008. SirT1 inhibition reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. *Cell metabolism*, 8(1): 38–48.

Li, Y. & Stahl, C.H. 2014. Dietary calcium deficiency and excess both impact bone development and mesenchymal stem cell lineage priming in neonatal piglets. *The Journal of nutrition*, 144(12): 1935-1942.

Lokanathan, Y., Omar, N., Puzi, N.N.A., Saim, A. & Idrus, R.H. 2016. Recent updates in neuroprotective and neuroregenerative potential of Centella asiatica. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 23(1), p.4.

Lopes, A.C.B.A., Peixe, T.S., Mesas, A.E. & Paoliello, M.M.B., 2016. Lead exposure and oxidative stress: a systematic review. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 236*. Springer, pp. 193–238.

Ma, Y., Fu, D. & Liu, Z. 2012. Effect of lead on apoptosis in cultured rat primary

- osteoblasts. *Toxicology and industrial health*, 28(2): 136-146.
- Mah, V. & Jalilehvand, F. 2012. Lead (II) complex formation with glutathione. *Inorganic chemistry*, 51(11): 6285–6298.
- Maiese, K., Chong, Z.Z., Hou, J. & Shang, Y.C. 2010. Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways. *Experimental gerontology*, 45(3): 217–234.
- Mansouri, M.T. & Cauli, O. 2009. Motor alterations induced by chronic lead exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27(3), pp.307–313.
- Mariotti, M., Carnovali, M. & Banfi, G. 2015. Danio rerio: The Janus of the bone from embryo to scale. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 12(2), pp.188–194.
- Massadi, OA., Quiñones, M., Lear, P., Dieguez, C. & Nogueiras, R. 2013. The brain: a new organ for the metabolic actions of SIRT1. *Hormone and Metabolic Research*, 45(13): 960-966.
- Matthews, M., Trevarrow, B. & Matthews, J.L. 2002. A virtual tour of the Guide for zebrafish users. *Lab animal*, 31(3): 34–40.
- Meeran, M.F.N., Goyal, S.N., Suchal, K., Sharma, C., Patil, C.R. & Ojha, S.K. 2018. Pharmacological properties, molecular mechanisms, and pharmaceutical development of asiatic acid: a pentacyclic triterpenoid of therapeutic promise. *Frontiers in pharmacology*, 9.
- Mollazadeh, S., Sedigheh, B., Bazzaz, F. & Kerachian, M.A. 2015. Role of apoptosis in pathogenesis and treatment of bone-related diseases. pp.1–7.
- Monir, A.U., Gundberg, C.M., Yagerman, S.E., van der Meulen, M.C.H., Budell, W.C., & Dowd, T.L. 2010. The effect of lead on bone mineral properties from female adult C57/BL6 mice. *Bone*, 47(5), pp.888-894.
- Moore, T., Arefadib, N., Deery, A., Keyes, M., West, S. 2017. *The First Thousand Days The First Thousand Days: An Evidence Paper-Summary Centre for Community Child Health*,
- Mousa, A.M., Al-Fadhli, A.S., Rao, M.S. & Kilarkaje, N. 2015. Gestational lead exposure induces developmental abnormalities and up-regulates apoptosis of fetal cerebellar cells in rats. *Drug and chemical toxicology*, 38(1), pp.73–83.
- Mousa, A.M.A., Elshahat, M.A. & Renno, W.M. 2018. Effect of developmental lead exposure on neurogenesis and cortical neuronal morphology in Wistar rats.
- Mushak, P. 2011. *Lead and Public Health: Science, Risk and Regulation*, Elsevier B.V.

Nan, A., Zhou, X., Chen, L., Liu, M., Zhang, N., et al. 2016. A transcribed ultraconserved noncoding RNA, Uc. 173, is a key molecule for the inhibition of lead-induced neuronal apoptosis. *Oncotarget*, 7(1), p.112.

Neal, A.P., Worley, P.F. & Guilarte, T.R. 2011. Lead exposure during synaptogenesis alters NMDA receptor targeting via NMDA receptor inhibition. *Neurotoxicology*, 32(2): 281–289.

Neal, A.P. & Guilarte, T.R. 2013. Mechanisms of lead and manganese neurotoxicity. *Toxicology Research*, 2(2): 99–114.

Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K. & Tavernarakis, N. 2013. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(12): 3448–3459.

Nimmagadda, V.K., Bever, C.T., Vattikunta, N.R., Talat, S., Ahmad, V., et al. 2013. Overexpression of SIRT1 protein in neurons protects against experimental autoimmune encephalomyelitis through activation of multiple SIRT1 targets. *The Journal of Immunology*, 190(9), pp.4595-4607.

Nordberg, G.F., Fowler, B.A. & Nordberg, M. eds. 2015. *Handbook on the Toxicology of Metals* Fourth Edi., Elsevier.

Norton, W.H. 2012. Measuring larval zebrafish behavior: locomotion, thigmotaxis, and startle. In *Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research* (3-20). Humana Press, Totowa, NJ.

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

Nuraenah, E. 2018. *Pengaruh Ekstrk Etanol Pegagan (Centella asiatica) pada Masa Pre Sampai Dengan Post Hatching terhadap Interleukin 6, Interleukin 10 dan Osifikasi Tulang Keras pada Stunting Larva Zebrafish (Danio rerio)*. Universitas Brawijaya. 2018.

Octaviana, A., Wari, F.E., Noviasari, D., Khotimah, H., Ali, M.M., Nurdiana & Kalsum, U. 2019, June. Effect of Centella asiatica to developmental process of lead-induced zebrafish larvae. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2108, No. 1, p. 020033). AIP Publishing.

Olchowiak, G., Widomska, J., Tomaszewski, M., Gospodarek, M., Tomaszewska, M. & Jagiello-Wojtowicz, E. 2014. The influence of lead on the biomechanical properties of bone tissue in rats. *Annals of agricultural and environmental medicine*, 21(2).

Omar, N.S., Akmal, Z., Zakaria, C. & Mian, T.S. 2011. Centella asiatica modulates neuron cell survival by altering caspase-9 pathway. *Journal of medicinal plant research*, 5(11): 2201-2109.

Onal, M., Ovet, G. & Onal, O. 2016. Review of Apoptosis. *MOJ Immunology*, 3(1): 1–4.

Orhan, I.E. 2012. Centella asiatica (L.) Urban: from traditional medicine to modern medicine with neuroprotective potential. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2012.

Pal, R.S. & Pal, Y. 2016. Pharmacognostic review and phytochemical screening of Centella asiatica Linn. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(4): 132–135.

Paraíso, A.F., Mendes, K.L. & Santos, S.H.S. 2013. Brain activation of SIRT1: Role in neuropathology. *Molecular Neurobiology*, 48(3): 681–689.

Parichy, D.M., Elizondo, M.R., Mills, M.G., Gordon, T.N. and Engeszer, R.E. 2009. Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental dynamics*, 238(12): 2975-3015.

Patibandla, S., Zhang, Y., Tohari, A.M., Gu, P., Reilly, J., et al. 2018. Comparative analysis of the toxicity of gold nanoparticles in zebrafish. *Journal of Applied Toxicology*, 38(8), pp.1153-1161.

Payal, B., Kaur, H. & Rai, D. 2009. New insight into the effects of lead modulation on antioxidant defense mechanism and trace element concentration in rat bone. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), pp.18–23.

Pillai, V.B., Sundaresan, N.R., Kim, G., Gupta, M., Rajamohan, S.B., et al. 2010. Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 285(5), pp.3133-3144.

Piomelli, S. 2002. Childhood lead poisoning History of lead poisoning. *Pediatr Clin N Am*, 49: 1285–1304.

Pittella, F., Dutra, R., Junior, D., Lopes, M.T. & Barbosa, N. 2009. Antioxidant and cytotoxic activities of Centella asiatica (L) Urb. *International journal of molecular sciences*, 10(9): 3713-3721.

Postlethwait, J., Amores, A., Cresko, W., Singer, A. & Yan, Y.L. 2004. Subfunction partitioning, the teleost radiation and the annotation of the human genome. *Trends in Genetics*, 20(10): 481-490.

Prakash, A. & Kumar, A. 2012. Mitoprotective effect of Centella asiatica against aluminum-induced neurotoxicity in rats: Possible relevance to its antioxidant and anti-apoptosis mechanism. *Neurological Sciences*, 34(8): 1403–1409.

Prasanthi, R.J., Devi, C.B., Basha, D.C., Reddy, N.S. & Reddy, G.R. 2010. Calcium and zinc supplementation protects lead (Pb)-induced perturbations in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in developing mouse brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 28(2), pp.161-167.

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



- Dengan Etanol. Universitas Brawijaya, 2017.
- Pratiwi, R., Tristi, J., Saputri, F.A. 2018. Kontaminasi timbal pada berbagai jenis makanan dan minuman. *Jurnal sains dan teknologi farmasi Indonesia*, 7(1).
- Primihastuti, D. *Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (Centella Asiatica) pada Osifikasi Tulang dan Osteoklastogenesis pada Model Stunting Larva Zebrafish (Danio rerio) yang Diinduksi Rotenon*. Universitas Brawijaya; 2017.
- Priyantiningrum, A.K., Kuswati, K. & Handayani, E.S. 2015. Pengaruh Ekstrak Etanol Centella Asiatica Terhadap Jumlah Sel Neuron Di Korteks Prefrontalis Tikus Yang Diberi Perlakuan Stres. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, 6(4), pp.198–207.
- Qian, Y., Xin, Z., Lv, Y., Wang, Z., Zuo, L., Huang, X., et al. 2018. Asiatic acid suppresses neuroinflammation in BV2 microglia via modulation of the Sirt1/NF- κ B signaling pathway. *Food & function*, 9(2): 1048-1057.
- Rager, J.E. 2015. *The Role of Apoptosis-Associated Pathways as Responders to Contaminants and in Disease Progression*, Elsevier Inc.
- Rahardianti, R. & Nur, E.M. 2017. Akurasi Metode Real Pcr Untuk Analisa Ekspresi Gen PmVRP15. *Prosiding Pertemuan Teknis Teknisi Litkayasa Lingkup BBPBAP Jepara*. 2017: 1–166.
- Rahman, M., Hossain, S., Rahaman, A., Fatima, N., Nahar, T., Uddin, B. et al. 2013. Antioxidant activity of Centella asiatica (Linn.) Urban: Impact of extraction solvent polarity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6): 27–32.
- Rahman, S. & Islam, R. 2011. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. *Cell Communication and Signaling*, 9(1): 11.
- Ranjbar, A., Ghasemi, H. & Rostampour, F., 2014. The role of oxidative stress in metals toxicity; mitochondrial dysfunction as a key player. *Galen Medical Journal*, 3(1), pp.2–13.
- Rao, M., Ao, M.S. & Rao, G.S. 2012. Evaluation of amygdaloid neuronal dendritic arborization enhancing effect of Centella asiatica (Linn) fresh leaf extract in adult rats. *Chinese Journal of Integrative Medicine*: 1–2.
- Reckziegel, P., Dias, V.T., Benvegnú, D., Boufleur, N., Barcelos, R.C.S., et al. 2011. Locomotor damage and brain oxidative stress induced by lead exposure are attenuated by gallic acid treatment. *Toxicology letters*, 203(1), pp.74-81.
- Reed, B. & Jennings, M. 2011. *Guidance on the housing and care of Zebrafish (Danio rerio) Notes regarding this Reference Resource : Guidance on the housing and care of Zebrafish Danio rerio*, Research Animals Department, Science Group, RSPCA.

Ren, Z., He, H., Zuo, Z., Xu, Z., Wei, Z. & Deng, J. 2019. The role of different SIRT1-mediated signaling pathways in toxic injury. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 24(1), p.36.

Richards, J.G., 2011. Bony fishes | Zebrafish. In: *Encyclopedia of Fish Physiology*: 1819–1823.

Riesco, M.R. & Cheda, J.A.R. 2016. Lead (II) acetate : anhydrous polymorphs , hydrates and by-products . Room temperature phosphorescence. pp.10–11.

Rodr, J. & Mandalunis, P.M., 2018. A Review of Metal Exposure and Its Effects on Bone Health. , 2018.

Ronis, M.J., Aronson, J., Gao, G.G., Hogue, W., Skinner, R.A., et al. 2001. Skeletal effects of developmental lead exposure in rats. *Toxicological sciences*, 62(2), pp.321-329.

Roy, D.C. & Barman, S.K. 2013. Current updates on *Centella asiatica* : Phytochemistry , pharmacology and traditional uses Current Updates on *Centella asiatica* : Phytochemistry , Pharmacology and Traditional Uses. *Medicinal Plant Research*, 3(3): 13–19.

Sabahi, Z., Soltani, F. & Moein, M. 2018. Insight into DNA protection ability of medicinal herbs and potential mechanisms in hydrogen peroxide damages model. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8(2): 120.

Sabbar, M., Delaville, C., De Deurwaerdère, P., Lakhdar-Ghazal, N. & Benazzouz, A. 2018. Lead-Induced Atypical Parkinsonism in Rats: Behavioral, Electrophysiological, and Neurochemical Evidence for a Role of Noradrenaline Depletion. *Frontiers in neuroscience*, 12, p.173.

Sadler, T.W. Langman's Medical Embryology-13th Edition, 2017.

Saifuddin, A.B., Rachimhadhi, T. & Wiknjosastro, G.H. eds., 2008. Ilmu Kebidanan Sarwono Prawirohardjo 4th ed., PT. Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo.

Sainath, S.B., Meena, R., Supriya, C.H., Reddy, K.P. & Reddy, P.S. 2011. Protective role of *Centella asiatica* on lead-induced oxidative stress and suppressed reproductive health in male rats. *environmental toxicology and pharmacology*, 32(2): 146-154.

Salminen, A., Kaarniranta, K. & Kauppinen, A. 2013. Crosstalk between oxidative stress and SIRT1: Impact on the aging process. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2): 3834–3859.

Sanders, T., Liu, Y., Buchner, V. & Tchounwou, P.B. 2010. NIH Public Access. , 24(1): 15–45.

Santos, L., Escande, C. & Denicola, A. 2016. Potential modulation of sirtuins by oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

Sansar, W., Ahboucha, S. & Gamrani, H. 2011. Acta Histochemica Chronic lead intoxication affects glial and neural systems and induces hypoactivity in adult rat. *Acta Histochemica*, 113: 601–607.

Schilling, T. 2002. Zebrafish: A practical approach, NY: Oxford University Press.

Selvi, P.T., Kumar, M.S., Rajesh, R. & Kathiravan, T. 2012. Antidepressant activity of ethanolic extract of leaves of *Centella asiatica*. Linn by In vivo methods. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science*, 2(2): 76–79.

Senut, M.C., Sen, A., Cingolani, P., Shaik, A., Land, S.J. & Ruden, D.M. 2014. Lead exposure disrupts global DNA methylation in human embryonic stem cells and alters their neuronal differentiation. *Toxicological Sciences*, 139(1): 142-161.

Sharma, P., Chambial, S. & Shukla, K.K. 2015. Lead and Neurotoxicity. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1): 1–2.

Singh, S., Gautam, A., Sharma, A. & Batra, A. 2010. *Centella asiatica* (L.): a plant with immense medicinal potential but threatened. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research Available*, 4(2): 9–17.

Sirotkin, A.V., Dekanova, P., Harrath, A.H., Alwasel, S.H. & Vasicek, D. 2014. Interrelationships between sirtuin 1 and transcription factors p53 and NF- κ B (p50/p65) in the control of ovarian cell apoptosis and proliferation. *Cell and tissue research*, 358(2): 627-632.

Sommar, J.N., Hedmer, M., Lundh, T., Nilsson, L., Skerfving, S. and Bergdahl, I.A. 2014. Investigation of lead concentrations in whole blood, plasma and urine as biomarkers for biological monitoring of lead exposure. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 24(1): 51.

Sorribes, A., Þorsteinsson, H., Arnardottir, H., Johannesdottir, I.H., Sigurgeirsson, B., De Polavieja, G.G. 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. 2007. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Review*, 83: 13–34.

Stevens, J.S., Padilla, S., DeMarini, D.M., Hunter, D.L., Martin, W.K., Thompson, L.C., et al. 2017. Zebrafish locomotor responses reveal irritant effects of fine particulate matter extracts and a role for TRPA1. *Toxicological Sciences*, 161(2): 290-299.

Subathra, M., Shila, S., Devi, M.A. & Panneerselvam, C. 2005. Emerging role of *Centella asiatica* in improving age-related neurological antioxidant status. *Experimental Gerontology*, 40: 707–715.

Sugunabai, J., Jeyaraj, M. & Karpagam, T. 2015. Analysis of functional



- compounds and antioxidant activity of *Centella asiatica*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, pp.1982-1993.
- Susanti, R.A., Mustikaningtyas, D. & Sasi, F.A. 2014. Analisis kadar logam berat pada sungai di Jawa Tengah. *Saintekno: Jurnal Sains dan Teknologi*, 12(1).
- Szymanski, M. 2014. Molecular mechanisms of lead toxicity. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 95(2): 137–149.
- Tarasco, M., Cardeira, J., Viegas, M.N., Caria, J., Martins, G., et al. 2019. Anti-Osteogenic Activity of Cadmium in Zebrafish. *Fishes*, 4(1), p.11.
- Taylor, C.M., Golding, J. & Emond, A.M. 2015. Adverse effects of maternal lead levels on birth outcomes in the ALSPAC study: a prospective birth cohort study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 122(3): 322-328.
- Tiwari, S. & Gehlot, S. 2011. *Centella Asiatica*: a Concise Drug Review With Probable Clinical Uses. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 7(1): 38–44.
- Tjandranegara, F. 2017. Perbedaan jumlah osteoklas di daerah tekanan dan tarikan ligamen periodontal akibat pemberian terapi oksigen hiperbarik dan teripang emas (*Stichopus hermannii*) pada pergerakan gigi ortodonti. Skripsi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah.
- Tran, S. & Gerlai, R. 2013. Individual differences in activity levels in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural brain research*, 257: 224-229.
- Trisnawati, A., Anasrulloh, A., Rianawati, S.B., Khotimah, H., Ali, M. & Susetya, B. 2018. COMPARISON EFFECT BETWEEN PEGAGAN (*Centella asiatica*) EXTRACT AND PRAMIPEXOLE TOWARD LOCOMOTOR ACTIVITIES, α -SYNUCLEIN, AND Nrf2 EXPRESSION IN ZEBRAFISH PARKINSON MODEL. *Malang Neurology Journal*, 5(1), pp.5-13.
- 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 neurexin 2a expression in zebrafish. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(8): 2147-2154.
- Tu, H., Peng, T., Liu, J., Chen, X., Fan, C., Huang, Z., et al. 2018. Role of neurexin2a in lead-induced locomotor defect in developing zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 194: 167-175.
- Uddin, S., Alam, K., Hoq, O. & Nuri, Z.N. 2017. The therapeutic use of *Centella asiatica*. *International Journal of Chemistry Studies*, 1(2): 21–26.
- Umeda, K., Ishizuka, T., Yawo, H. & Shoji, W. 2016. Position-and quantity-dependent responses in zebrafish turning behavior. *Scientific reports*, 6:

27888.

Upadhyay, M., Saha, A. & Bhatia, B. 2002. Evaluation of the Efficacy of Mentat in Children with Learning Disability: A Placebo-Controlled Double-Blind Clinical Trial. *Neurosciences Today*, VI(3): 184–188.

Vargesson, N.A. Zebrafish in Manual of Animal Technology. 2007.

Vorvolakos, T., Arseniou, S. & Samakouri, M. 2016. There is no safe threshold for lead exposure: alpha literature review. *Psychiatriki*, 27(3), pp.204–214.

Wang, L., Lin, S., Li, Z., Yang, D. & Wang, Z. 2013. Protective effects of puerarin on experimental chronic lead nephrotoxicity in immature female rats. *Human & experimental toxicology*, 32(2), pp.172-185.

Wang, Y., Liang, X., Chen, Y. & Zhao, X. 2016. Screening SIRT1 activators from medicinal plants as bioactive compounds against oxidative damage in mitochondrial function. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

Wani, A.L., Ara, A. & Usmani, J.A. 2015. Lead toxicity: A review. *Interdisciplinary Toxicology*, 8(2): 55–64.

Wauquier, F., Leotoing, L., Coxam, V., Guicheux, J., & Wittrant, Y. 2009. Oxidative stress in bone remodeling and disease. *Trend in molecular medicine*. 15(10): 468-477

Widyastuti, H. 2017. Analisis Kandungan Timbal (Pb) dan Cadmium (Cd) Pada Air Dan Sedimen Di Sungai Badek Kelurahan Ciptomulyo Kecamatan Sukun Kota Malang. Universitas Brawijaya. 2017.

Xia, Q., Luo, J., Mei, X., Wang, Y., Huang, W., Wang, J., et al. 2017. A developmental toxicity assay of *Carpesii Fructus* on zebrafish embryos/larvae. *Toxicology research*, 6(4): 460-467.

Xia, Q., Ma, Z., Mei, X., Luo, J., Wang, Y., Li, T., et al. 2017. Assay for the developmental toxicity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) to zebrafish embryos/larvae. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, 4(1): 71-81.

Xu, J., Jackson, C.W., Khoury, N., Escobar, I. & Perez-Pinzon, M.A. 2018. Brain SIRT1 mediates metabolic homeostasis and neuroprotection. *Frontiers in endocrinology*, 9: 702.

Xu, M.F., Xiong, Y.Y., Liu, J.K., Qian, J.J., Zhu, L. & Gao, J. 2012. Asiatic acid, a pentacyclic triterpene in *Centella asiatica*, attenuates glutamate-induced cognitive deficits in mice and apoptosis in SH-SY5Y cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(5): 578-587.

Yang, H., Gu, Z.T., Li, L., Maegele, M., Zhou, B.Y., Li, F., et al. 2017. SIRT1 plays a neuroprotective role in traumatic brain injury in rats via inhibiting the p38 MAPK pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(2), p.168.

Yang, Y.J., Yang, Z.L., Wang, D.C., Xiao, X.C. & Li, P. 2006. Comparative study

on effects of rutin and quercetin on metabolism in osteoblast cells. *Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese medicinal materials*, 29(5), pp.467-470.

Zahara, E., Nuraenah, E., Yuliani, T., Darwitri., Khotimah, H., et al. 2018. Ekstrak ethanol pegagan (*Centella asiatica*) meningkatkan osifikasi tulang dan panjang badan larva zebrafish (*Danio rerio*) model stunting usia 9 hari pasca fertilisasi. *AcTion: Aceh Nutrition Journal*, 3(2), pp.95–102.

Zaidan, M.R., Noor Rain, A., Badrul, A.R., Adlin, A., Norazah, A. & Zakiah, I., 2005. In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Trop biomed*, 22(2): 165-170.

Zeng, X., Xu, X., Qin, Q., Ye, K., Wu, W. & Huo, X. 2018. Heavy metal exposure has adverse effects on the growth and development of preschool children. *Environmental geochemistry and health*, 1-13.

Zhang, L., Tu, R., Wang, Y., Hu, Y., Li, X., Cheng, X., et al. 2017. Early-life exposure to lead induces cognitive impairment in elder mice targeting SIRT1 phosphorylation and oxidative alterations. *Frontiers in physiology*, 8, p.446.

Zhang, M., Zhang, Q., Hu, Y., Xu, L., Jiang, Y., Zhang, C., et al. 2017. miR-181a increases FoxO1 acetylation and promotes granulosa cell apoptosis via SIRT1 downregulation. *Cell death & disease*, 8(10): e3088.

Zhang, W., Huang, Q., Zeng, Z., Wu, J., Zhang, Y. & Chen, Z. 2017. Sirt1 inhibits oxidative stress in vascular endothelial cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.

Zhao, Y., Shu, P., Zhang, Y., Lin, L., Zhou, H., Xu, Z., et al. 2014. Effect of *Centella asiatica* on oxidative stress and lipid metabolism in hyperlipidemic animal models. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014: 1–7.

Zhou, Y., Wang, S., Li, Y., Yu, S. & Zhao, Y., 2018. SIRT1/PGC-1 α Signaling Promotes Mitochondrial Functional Recovery and Reduces Apoptosis after Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10: 443.

Lampiran 1 Keterangan Surat Kelayakan Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 95 / EG / KEPK / 03 / 2019

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

JUDUL : Toksisitas PbSO₄, CdCl₂, dan AlCl₃ pada Larva *Zebrafish* yang Diberikan Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*).

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

ANGGOTA : Nanda Norisa
Tesza Rezky Permata
Damai Noviasari
Fitria Edni Wari
Yuyun Diestika
Rizky Febriyanti Supriadi
Risnawati
Amrina Octaviana

UNIT / LEMBAGA : Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya Malang.

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

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang
Ketua



Prof. Dr. Moch Istiajid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr(HK)
NIPK. 20160246051611001

Catatan :

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

Lampiran 2 Surat Keterangan Bebas Plagiasi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755
<http://www.fk.ub.ac.id> e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

SURAT KETERANGAN

Nomor : 399 /UN10.F08.08/PN/2019

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

Judul : Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Lokomotor,
Osifikasi Tulang Keras, Ekspresi SIRT1 Dan Apoptosis Pada Larva
Zebrafish Yang Dipapar Timbal (Pb)

Penulis : Fitria Edni Wari

NIM : 176070400111015

Jumlah Halaman : 102

Jenis Artikel : Tesis (Program Studi Magister Kebidanan)

Kemiripan : 4 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.



Ketua Badan Penerbitan Jurnal,

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

Lampiran 3 Bukti Jurnal Terpublikasi

AIP Conference Proceedings



Effect of *Centella asiatica* to developmental process of lead-induced zebrafish larvae

Cite as: AIP Conference Proceedings 2108, 020033 (2019); <https://doi.org/10.1063/1.5110008>
Published Online: 04 June 2019

Amrina Octaviana, Fitria Edni Wari, Damai Noviasari, Husnul Khotimah, M. Muljohadi Ali, Nudiana, and Umi Kalsum



ARTICLES YOU MAY BE INTERESTED IN

About the nature of the barrier inhomogeneities at Au/Ti/n-InAlAs(001) Schottky contacts
Applied Physics Letters 114, 221602 (2019); <https://doi.org/10.1063/1.5091598>

The effect of ethanol extract of *Centella asiatica* on tactile motility and body length of hypoxic larval zebrafish
AIP Conference Proceedings 2108, 020001 (2019); <https://doi.org/10.1063/1.5109976>

Increasing number of fibroblast, capillary and collagen amount in rat's achilles tendon with diabetic mellitus after application of stromal vascular fraction derived from adipose tissue
AIP Conference Proceedings 2108, 020034 (2019); <https://doi.org/10.1063/1.5110009>

AIP | Conference Proceedings

Get **30% off** all print proceedings!

Enter Promotion Code **PDF30** at checkout

AIP Conference Proceedings 2108, 020033 (2019); <https://doi.org/10.1063/1.5110008>

2108, 020033

© 2019 Author(s).

Lampiran 4 Sertifikat Zebrafish



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
JL. VETERAN TELP. (0341) 575838 MALANG 65145**

LAPORAN HASIL ANALISA
NO : 02/LAB.IP/HA/FPIK/2012

- Data Konsumen :**
 - Nama Konsumen : Husnul Khotimah S.Si, M Kes
 - Instansi : Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
 - Alamat : Perum Bumi Palapa J 4 Malang
 - Telepon : 081136946739
 - Status : Mahasiswa S3
 - Keperluan Analisis : Identifikasi Ikan
- Sampling Yang dilakukan** : Oleh Konsumen
- Identifikasi Sampel :**
 - Nama Sampel : *Danio rerio*
 - Warna : Kuning strip hitam
- Prosedur Analisa** : Dari Lab. Ilmu - Ilmu Perairan FPIK UB
- Penyampaian Laporan Hasil Analisis** : Dikirim sendiri
- Tanggal Terima Sampel** : 05 November 2012
- Analisa** : Nuriyani
- Data Hasil Analisa** : terlampir pada buku kerja

Malang, 09 November 2012

Kalab Ilmu Ilmu Perairan
FPIK
Prof. Dr. Ir. Diana Ariati, MS
NIP. 19591230 198503 2 002

Lampiran 5 Determinasi Tanaman Pegagan



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
JL. VETERAN TELP. (0341) 575838 MALANG 65145**

LAPORAN HASIL ANALISA

NO : 02/LAB.IIP/HA/FPIK/2012

1. Data Konsumen :
 - Nama Konsumen : Husnul Khotimah S.Si, M Kes
 - Instansi : Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
 - Alamat : Perum Bumi Palapa J 4 Malang
 - Telepon : 081136946739
 - Status : Mahasiswa S3
 - Keperluan Analisis : Identifikasi Ikan
2. Sampling Yang dilakukan : Oleh Konsumen
3. Identifikasi Sampel :
 - Nama Sampel : *Danio rerio*
 - Warna : Kuning strip hitam
4. Prosedur Analisa : Dari Lab. Ilmu - Ilmu Perairan FPIK UB
5. Penyampaian Laporan Hasil Analisis : Dikirim sendiri
6. Tanggal Terima Sampel : 05 November 2012
7. Analis : Nuriyani
8. Data Hasil Analisa : terlampir pada buku kerja

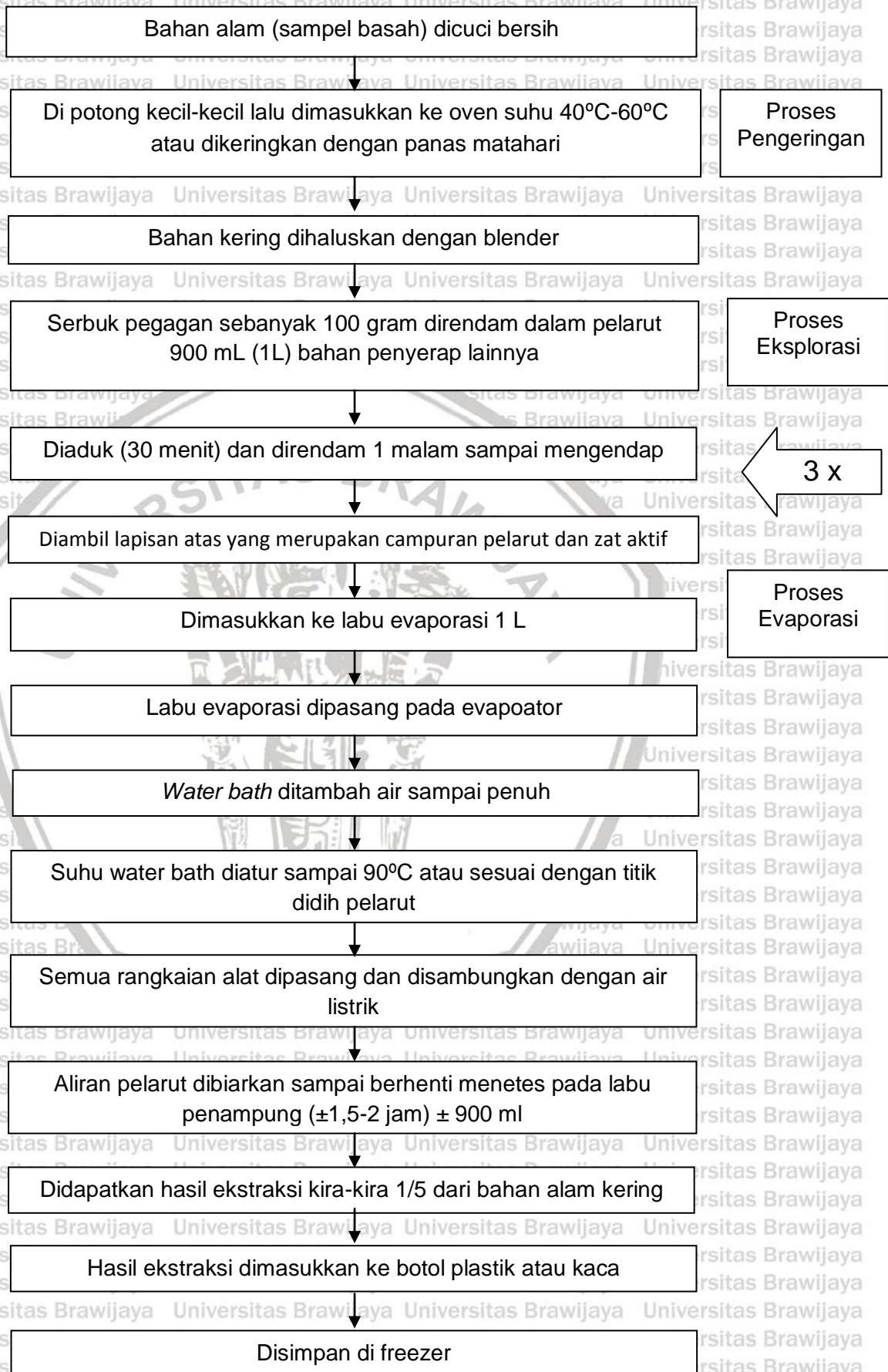
Malang, 09 November 2012



Kalab Ilmu Ilmu Perairan

Prof. Dr. Ir. Diana Ariati, MS
NIP. 19591230 198503 2 002

Lampiran 6 Alur Ekstraksi Pegagan



Lampiran 7 Pembuatan Larutan Timbal

Timbal asetat trihidrat ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) dengan merk E Merck berbentuk serbuk putih yang memiliki berat molekul 379,33 gr/mol dilarutkan dengan aquadest sehingga didapatkan stok dengan konsentrasi 3793,3 ppm dan untuk perhitungan konsentrasi timbal secara. Kemudian diencerkan menjadi 50 ppm.

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 3793,3 &= 10 \text{ mL} \times 50 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{500 \text{ mL}}{3793,3} \\ &= 0,13 \text{ mL} \\ &= 130 \mu\text{L timbal (Pb) dalam 10 mL aquadest} \end{aligned}$$

Selanjutnya stok diturunkan menjadi 10 ppm = 10.000 ppb, dengan

hitungan sebagai berikut :

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 50 \text{ ppm} &= 10 \text{ mL} \times 10 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{100 \text{ mL}}{50} \\ &= 2 \text{ mL timbal (Pb) dalam 10 mL aquadest} \end{aligned}$$

Kemudian membuat larutan timbal (Pb) 2,5 ppm 5 mL untuk 1 sumuran dari stok 1×10^4 ppb dengan hitungan sebagai berikut :

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 1 \times 10^4 &= 5 \text{ mL} \times 2,5 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{5 \text{ mL} \times 2,5 \text{ ppm}}{1 \times 10^4} \\ &= \frac{12500 \text{ mL}}{1 \times 10^4} \\ &= 1,25 \times 10^{-2} \\ &= 1,25 \text{ mL} \end{aligned}$$

Keterangan :

- V_1 = Volume awal
- M_1 = Konsentrasi stok
- V_2 = Volume yang diinginkan
- M_2 = Konsentrasi akhir yang diinginkan

Lampiran 8 Hasil Analisa Statistik

1. Lokomotif

Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Lokomotif ZF 4	.121	25	.200*	.921	25	.055

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

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway ANOVA

Descriptives

Lokomotif ZF 4								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	5	8.00	2.345	1.049	5.09	10.91	6	11
Timbal	5	.00	.000	.000	.00	.00	0	0
P1	5	3.20	2.864	1.281	-.36	6.76	0	7
P2	5	6.60	4.615	2.064	.87	12.33	2	12
P3	5	7.20	4.324	1.934	1.83	12.57	3	14
Total	25	5.00	4.272	.854	3.24	6.76	0	14

Test of Homogeneity of Variances

Lokomotif ZF 4			
Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
1.804	4	20	.168

ANOVA

Lokomotif ZF 4					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	223.200	4	55.800	5.196	.005
Within Groups	214.800	20	10.740		
Total	438.000	24			



Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Lokomotor ZF 4
 Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Timbal	8.00*	2.073	.008	1.80	14.20
	P1	4.80	2.073	.181	-1.40	11.00
	P2	1.40	2.073	.959	-4.80	7.60
	P3	.80	2.073	.995	-5.40	7.00
Timbal	Kontrol	-8.00*	2.073	.008	-14.20	-1.80
	P1	-3.20	2.073	.548	-9.40	3.00
	P2	-6.60*	2.073	.034	-12.80	-.40
	P3	-7.20*	2.073	.018	-13.40	-1.00
P1	Kontrol	-4.80	2.073	.181	-11.00	1.40
	Timbal	3.20	2.073	.548	-3.00	9.40
	P2	-3.40	2.073	.490	-9.60	2.80
	P3	-4.00	2.073	.334	-10.20	2.20
P2	Kontrol	-1.40	2.073	.959	-7.60	4.80
	Timbal	6.60*	2.073	.034	.40	12.80
	P1	3.40	2.073	.490	-2.80	9.60
	P3	-.60	2.073	.998	-6.80	5.60
P3	Kontrol	-.80	2.073	.995	-7.00	5.40
	Timbal	7.20*	2.073	.018	1.00	13.40
	P1	4.00	2.073	.334	-2.20	10.20
	P2	.60	2.073	.998	-5.60	6.80

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Lokomotor ZF 4

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Timbal	5	.00	
P1	5	3.20	3.20
P2	5		6.60
P3	5		7.20
Kontrol	5		8.00
Sig.		.548	.181

Means for groups in homogeneous subsets are display ed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Correlations

		Kelompok	Lokomotor ZF 4
Kelompok	Pearson Correlation	1	.659**
	Sig. (2-tailed)	.	.002
	N	20	20
Lokomotor ZF 4	Pearson Correlation	.659**	1
	Sig. (2-tailed)	.002	.
	N	20	20

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

2. Lokomotor 5 dpf

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Lokomotor ZF 5	.141	25	.200*	.976	25	.794

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

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	5	15.00	1.581	.707	13.04	16.96	13	17
Timbal	5	8.80	.837	.374	7.76	9.84	8	10
P1	5	10.00	2.739	1.225	6.60	13.40	6	13
P2	5	11.00	2.000	.894	8.52	13.48	9	14
P3	5	12.40	1.140	.510	10.98	13.82	11	14
Total	25	11.44	2.725	.545	10.32	12.56	6	17

Test of Homogeneity of Variances

Lokomotor ZF 5			
Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
1.653	4	20	.200

ANOVA

Lokomotor ZF 5					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	114.160	4	28.540	8.919	.000
Within Groups	64.000	20	3.200		
Total	178.160	24			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Lokomotor ZF 5
Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Timbal	6.20*	1.131	.000	2.81	9.59
	P1	5.00*	1.131	.002	1.61	8.39
	P2	4.00*	1.131	.016	.61	7.39
	P3	2.60	1.131	.187	-.79	5.99
Timbal	Kontrol	-6.20*	1.131	.000	-9.59	-2.81
	P1	-1.20	1.131	.824	-4.59	2.19
	P2	-2.20	1.131	.327	-5.59	1.19
	P3	-3.60*	1.131	.034	-6.99	-.21
P1	Kontrol	-5.00*	1.131	.002	-8.39	-1.61
	Timbal	1.20	1.131	.824	-2.19	4.59
	P2	-1.00	1.131	.900	-4.39	2.39
	P3	-2.40	1.131	.250	-5.79	.99
P2	Kontrol	-4.00*	1.131	.016	-7.39	-.61
	Timbal	2.20	1.131	.327	-1.19	5.59
	P1	1.00	1.131	.900	-2.39	4.39
	P3	-1.40	1.131	.730	-4.79	1.99
P3	Kontrol	-2.60	1.131	.187	-5.99	.79
	Timbal	3.60*	1.131	.034	.21	6.99
	P1	2.40	1.131	.250	-.99	5.79
	P2	1.40	1.131	.730	-1.99	4.79

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Lokomotor ZF 5

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Timbal	5	8.80		
P1	5	10.00	10.00	
P2	5	11.00	11.00	
P3	5		12.40	12.40
Kontrol	5			15.00
Sig.		.327	.250	.187

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Correlations

Correlations

		Kelompok	Lokomotor ZF 5
Kelompok	Pearson Correlation	1	.626*
	Sig. (2-tailed)	.	.003
	N	20	20
Lokomotor ZF 5	Pearson Correlation	.626**	1
	Sig. (2-tailed)	.003	.
	N	20	20

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

3. Lokomotor 6 dpf

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Lokomotor ZF 6	.125	25	.200*	.964	25	.495

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

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Kontrol	5		
Timbal	5	9.20	.447	.200	8.64	9.76	9	10
P1	5	9.80	1.304	.583	8.18	11.42	8	11
P2	5	11.40	.894	.400	10.29	12.51	10	12
P3	5	12.60	2.408	1.077	9.61	15.59	10	16
Total	25	11.52	2.468	.494	10.50	12.54	8	17

Test of Homogeneity of Variances

Lokomotor ZF 6

Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
1.133	4	20	.369

ANOVA

Lokomotor ZF 6

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	95.040	4	23.760	9.281	.000
Within Groups	51.200	20	2.560		
Total	146.240	24			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Lokomotor ZF 6

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Timbal	5.40*	1.012	.000	2.37	8.43
	P1	4.80*	1.012	.001	1.77	7.83
	P2	3.20*	1.012	.035	.17	6.23
	P3	2.00	1.012	.312	-1.03	5.03
Timbal	Kontrol	-5.40*	1.012	.000	-8.43	-2.37
	P1	-.60	1.012	.975	-3.63	2.43
	P2	-2.20	1.012	.230	-5.23	.83
	P3	-3.40*	1.012	.023	-6.43	-.37
P1	Kontrol	-4.80*	1.012	.001	-7.83	-1.77
	Timbal	.60	1.012	.975	-2.43	3.63
	P2	-1.60	1.012	.525	-4.63	1.43
	P3	-2.80	1.012	.079	-5.83	.23
P2	Kontrol	-3.20*	1.012	.035	-6.23	-.17
	Timbal	2.20	1.012	.230	-.83	5.23
	P1	1.60	1.012	.525	-1.43	4.63
	P3	-1.20	1.012	.759	-4.23	1.83
P3	Kontrol	-2.00	1.012	.312	-5.03	1.03
	Timbal	3.40*	1.012	.023	.37	6.43
	P1	2.80	1.012	.079	-.23	5.83
	P2	1.20	1.012	.759	-1.83	4.23

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Lokomotor ZF 6

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Timbal	5	9.20		
P1	5	9.80	9.80	
P2	5	11.40	11.40	
P3	5		12.60	12.60
Kontrol	5			14.60
Sig.		.230	.079	.312

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Correlations

Correlations

		Kelompok	Lokomotor ZF 6
Kelompok	Pearson Correlation	1	.706**
	Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	20	20
Lokomotor ZF 6	Pearson Correlation	.706**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	20	20

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

4. Osifikasi Tulang Keras

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Osifikasi Tulang Keras	.148	25	.167	.961	25	.431

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

Descriptives

Osifikasi Tulang Keras

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	5	12881138	2356410.469	1053819	9955268.16	15807008.24	9000079	15090928
Timbal	5	8949330.8	1018491.945	455483.4	7684706.02	10213955.58	7498418	10341542
P1	5	11183635	1258425.804	562785.1	9621092.98	12746177.02	9803792	12493222
P2	5	11758689	1762209.028	788083.8	9570617.29	13946760.31	9791519	13817056
P3	5	12341707	1195709.242	534737.4	10857037.88	13826376.12	10423490	13515693
Total	25	11422900	2011746.635	402349.3	10592491.76	12253308.16	7498418	15090928

Test of Homogeneity of Variances

Osifikasi Tulang Keras

Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
.917	4	20	.473

ANOVA

Osifikasi Tulang Keras

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	46296056984037	4	11574014246009	4.554	.009
Within Groups	50834931584686	20	2541746579234.3		
Total	97130988568723	24			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Osifikasi Tulang Keras
 Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Timbal	3931807.40*	1008315	.007	914551.95	6949062.85
	P1	1697503.20	1008315	.466	-1319752.25	4714758.65
	P2	1122449.40	1008315	.798	-1894806.05	4139704.85
	P3	539431.20	1008315	.983	-2477824.25	3556686.65
Timbal	Kontrol	-3931807.4*	1008315	.007	-6949062.85	-914551.95
	P1	-2234304.2	1008315	.214	-5251559.65	782951.25
	P2	-2809358.0	1008315	.076	-5826613.45	207897.45
	P3	-3392376.2*	1008315	.023	-6409631.65	-375120.75
P1	Kontrol	-1697503.2	1008315	.466	-4714758.65	1319752.25
	Timbal	2234304.20	1008315	.214	-782951.25	5251559.65
	P2	-575053.80	1008315	.978	-3592309.25	2442201.65
	P3	-1158072.0	1008315	.779	-4175327.45	1859183.45
P2	Kontrol	-1122449.4	1008315	.798	-4139704.85	1894806.05
	Timbal	2809358.00	1008315	.076	-207897.45	5826613.45
	P1	575053.80	1008315	.978	-2442201.65	3592309.25
	P3	-583018.20	1008315	.977	-3600273.65	2434237.25
P3	Kontrol	-539431.20	1008315	.983	-3556686.65	2477824.25
	Timbal	3392376.20*	1008315	.023	375120.75	6409631.65
	P1	1158072.00	1008315	.779	-1859183.45	4175327.45
	P2	583018.20	1008315	.977	-2434237.25	3600273.65

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Osifikasi Tulang Keras

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Timbal	5	8949330.80	
P1	5	11183635.0	11183635.00
P2	5	11758688.8	
P3	5		12341707.00
Kontrol	5		12881138.20
Sig.		.076	.466

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

5. Ekspresi SIRT 1

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekspresi_SIRT1	,153	15	,200*	,944	15	,437

a. Lilliefors Significance Correction

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

Test of Homogeneity of Variances

Ekspresi_SIRT1

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,236	4	10	,356

ANOVA

Ekspresi_SIRT1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,802E12	4	1,201E12	3,786	,040
Within Groups	3,171E12	10	3,171E11		
Total	7,973E12	14			

Multiple Comparisons

Ekspresi_SIRT1

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Timbal	757842,667	459804,885	,503	-755412,98	2271098,31
	P 1	1066377,667	459804,885	,216	-446877,98	2579633,31
	P 2	-525454,833	459804,885	,782	-2038710,48	987800,81
	P 3	116044,667	459804,885	,999	-1397210,98	1629300,31
Timbal	Kontrol	-757842,667	459804,885	,503	-2271098,31	755412,98
	P 1	308535,000	459804,885	,958	-1204720,64	1821790,64
	P 2	-1283297,500	459804,885	,108	-2796553,14	229958,14
	P 3	-641798,000	459804,885	,643	-2155053,64	871457,64
P 1	Kontrol	-1066377,667	459804,885	,216	-2579633,31	446877,98
	Timbal	-308535,000	459804,885	,958	-1821790,64	1204720,64
	P 2	-	459804,885	,038	-3105088,14	-78576,86
		1591832,500*				



	P 3	-950333,000	459804,885	,304	-2463588,64	562922,64
P 2	Kontrol	525454,833	459804,885	,782	-987800,81	2038710,48
	Timbal	1283297,500	459804,885	,108	-229958,14	2796553,14
	P 1	1591832,500*	459804,885	,038	78576,86	3105088,14
	P 3	641499,500	459804,885	,644	-871756,14	2154755,14
P 3	Kontrol	-116044,667	459804,885	,999	-1629300,31	1397210,98
	Timbal	641798,000	459804,885	,643	-871457,64	2155053,64
	P 1	950333,000	459804,885	,304	-562922,64	2463588,64
	P 2	-641499,500	459804,885	,644	-2154755,14	871756,14

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

Ekspresi_SIRT1

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
P 1	3	1481972,50	
Timbal	3	1790507,50	1790507,50
P 3	3	2432305,50	2432305,50
Kontrol	3	2548350,17	2548350,17
P 2	3		3073805,00
Sig.		,216	,108

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Correlations

		Kelompok	Ekspresi_SIR T1
Spearman's rho	Kelompok	1,000	,605*
	Correlation Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,037
	N	12	12
Ekspresi_SIRT1	Correlation Coefficient	,605*	1,000
	Sig. (2-tailed)	,037	
	N	12	12

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

Correlations

		Kelompok	Ekspres_i_SIR T1
Kelompok	Pearson	1	,530 ⁺
	Correlation		
	Sig. (1-tailed)		,038
	N	12	12
Ekspres_i_SIR 1	Pearson	,530 ⁺	1
	Correlation		
	Sig. (1-tailed)	,038	
	N	12	12

6. Apoptosis

a. Badan

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Apoptosis Badan	,106	25	,200*	,973	25	,731

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

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

Descriptives

Apoptosis Badan

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	5	1,4E+07	2245067,805	1004025	10916357,53	16491597,27	10648762	16666818
Timbal	5	2,0E+07	2167296,908	969244,6	17687512,86	23069621,94	18440148	23928227
P1	5	1,6E+07	2234570,295	999330,2	13427392,51	18976563,49	12724598	18246795
P2	5	1,5E+07	2056936,056	919889,8	12509706,95	17617753,85	12927112	17707490
P3	5	1,6E+07	1418264,972	634267,4	14052512,04	17574529,16	13458022	17260029
Total	25	1,6E+07	2954672,007	590934,4	15012726,10	17451983,42	10648762	23928227

Test of Homogeneity of Variances

Apoptosis Badan

Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
,434	4	20	,782

ANOVA

Apoptosis Badan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,26E+14	4	3,141E+13	7,487	,001
Within Groups	8,39E+13	20	4,195E+12		
Total	2,10E+14	24			



3. Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Apoptosis Badan
Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Timbal	-6674590,0*	1295323	,000	-10550681,7	-2798498,32
	P1	-2498000,6	1295323	,335	-6374092,28	1378091,076
	P2	-1359753,0	1295323	,829	-5235844,68	2516338,676
	P3	-2109543,2	1295323	,497	-5985634,88	1766548,476
Timbal	Kontrol	6674590,0*	1295323	,000	2798498,324	10550681,68
	P1	4176589,4*	1295323	,031	300497,7242	8052681,076
	P2	5314837,0*	1295323	,004	1438745,324	9190928,676
	P3	4565046,8*	1295323	,016	688955,1242	8441138,476
P1	Kontrol	2498000,6	1295323	,335	-1378091,08	6374092,276
	Timbal	-4176589,4*	1295323	,031	-8052681,08	-300497,7242
	P2	1138247,6	1295323	,901	-2737844,08	5014339,276
P2	Kontrol	1359753,0	1295323	,829	-2516338,68	5235844,676
	Timbal	-5314837,0*	1295323	,004	-9190928,68	-1438745,32
	P1	-1138247,6	1295323	,901	-5014339,28	2737844,076
P3	Kontrol	-749790,20	1295323	,977	-4625881,88	3126301,476
	Timbal	2109543,2	1295323	,497	-1766548,48	5985634,876
	P1	-4565046,8*	1295323	,016	-8441138,48	-688955,1242
P2	P1	-388457,40	1295323	,998	-4264549,08	3487634,276
	P2	749790,20	1295323	,977	-3126301,48	4625881,876

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Apoptosis Badan

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Kontrol	5	1,4E+07	
P2	5	1,5E+07	
P3	5	1,6E+07	
P1	5	1,6E+07	
Timbal	5		2,0E+07
Sig.		,335	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Correlations

Correlations

		Kelompok	Apoptosis Badan
Kelompok	Pearson Correlation	1	-,607**
	Sig. (2-tailed)	,	,005
	N	20	20
Apoptosis Badan	Pearson Correlation	-,607**	1
	Sig. (2-tailed)	,005	,
	N	20	20

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

a. Ekor

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Apoptosis_ekor	,146	25	,179	,955	25	,327

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Apoptosis_ekor

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,481	4	20	,077

ANOVA

Apoptosis_ekor

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,679E13	4	4,198E12	1,254	,321
Within Groups	6,696E13	20	3,348E12		
Total	8,375E13	24			

Lampiran 9 Rekapitulasi Data Hasil Penelitian

Data Lokomotor Larva Zebrafish Usia 4 dpf

Nomor Sampel	Kelompok				
	Kontrol	Timbal	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
1	7	0	7	11	7
2	6	0	5	3	8
3	11	0	3	2	4
4	6	0	1	5	3
5	10	0	0	12	14

Data Lokomotor Larva Zebrafish Usia 5 dpf

Nomor Sampel	Kelompok				
	Kontrol	Timbal	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
1	17	8	6	9	11
2	13	8	9	10	12
3	14	9	10	10	13
4	15	9	13	12	14
5	16	10	12	14	12

Data Lokomotor Larva Zebrafish Usia 6 dpf

Nomor Sampel	Kelompok				
	Kontrol	Timbal	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
1	12	9	9	12	11
2	13	9	10	11	10
3	15	10	11	12	12
4	16	9	11	12	14
5	17	9	8	10	16

Data Osifikasi Tulang Keras Larva Zebrafish Usia 6 dpf

Nomor Sampel	Kelompok				
	Kontrol	Timbal	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
1	9000079	9025275	12476965	10108768	12077703
2	15090928	10341542	10188106	12972701	12641967
3	14353883	7498418	9803792	13817056	10423490
4	13175601	9164302	10956090	9791519	13049682
5	12785200	8717117	12493222	12103400	13515693

Data Apoptosis Badan Zebrafish Usia 3 dpf

Nomor Sampel	Kelompok				
	Kontrol	Timbal	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
1	14856322	20863173	16810150	16602479	16082779
2	13455849	23928227	15391454	17707490	13458022
3	10648762	19327245	17836893	12927112	15880391
4	12892136	18440148	18246795	14714863	17260029
5	16666818	19334044	12724598	13366708	16386382

Data Apoptosis Ekor Zebrafish Usia 3 dpf

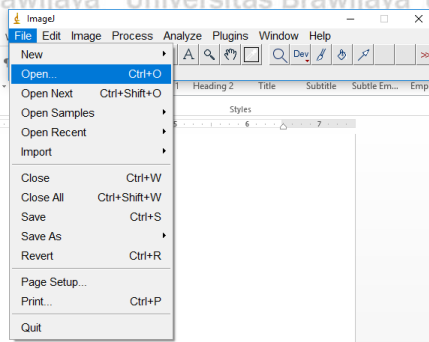
Nomor Sampel	Kelompok				
	Kontrol	Timbal	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
1	6087868	8620751	12978259	5654380	8666345
2	9551013	10572067	8538620	8239136	8135267
3	8547976	8083141	5988089	7723009	7593935
4	4769618	9325451	6707471	8978267	10099897
5	4760520	8579736	9910381	9629043	8323652

Data Ekspresi SIRT 1 Zebrafish Usia 6 dpf

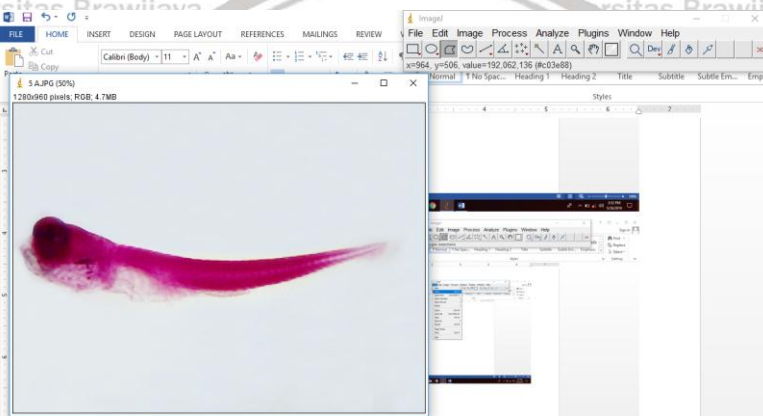
Nomor Sampel	Kelompok				
	Kontrol	Timbal	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
replikasi 1	2179726	1987245	1144918	3856971	2972203
replikasi 2	3385802	1790508	1819027	3073805	2432306
replikasi 3	2079523	1593770	1481973	2290639	1892408

Lampiran 10 Cara Menggunakan Image J Osifikasi Tulang

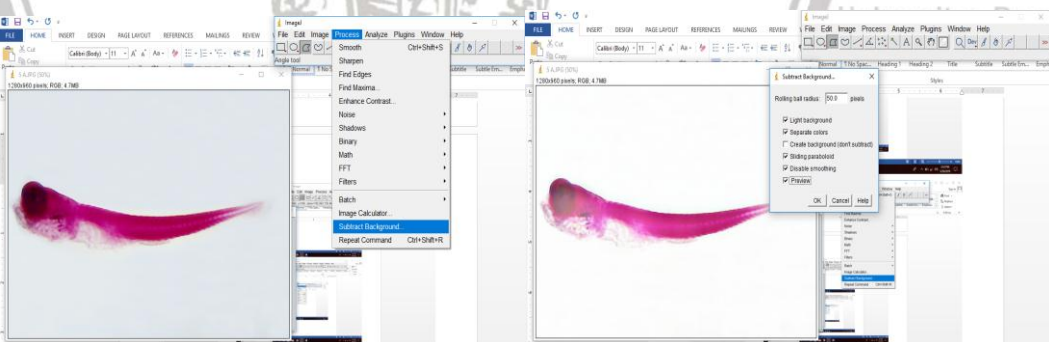
1. Buka software image J



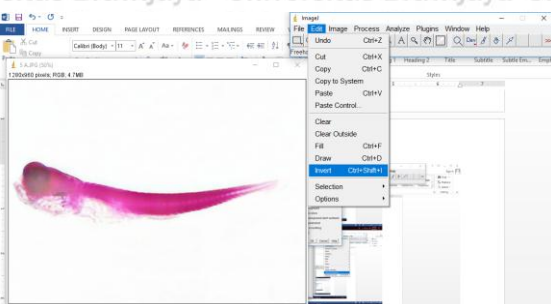
2. Buka foto yang akan diukur densitas warna



3. Klik process pilih substract baground



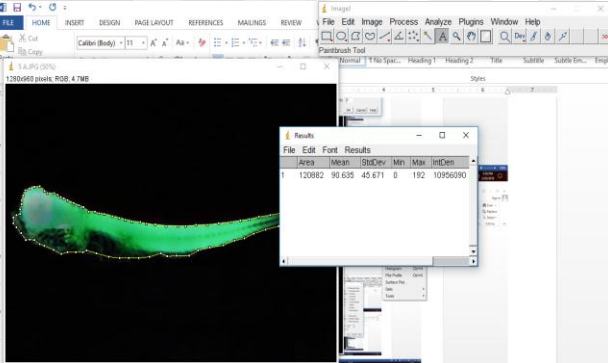
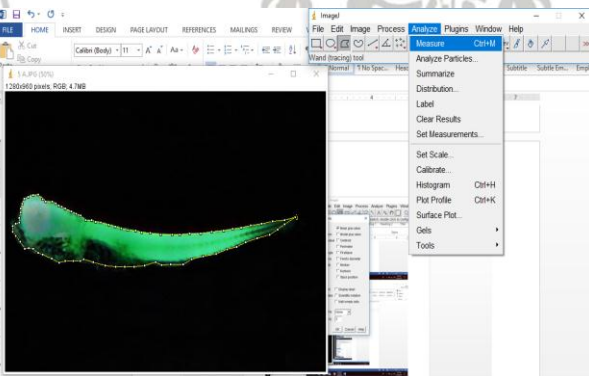
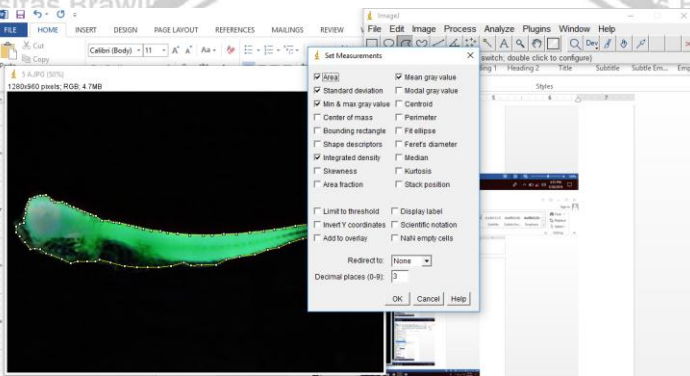
4. Klik edit pilih invert



5. Pilih type untuk memberi tanda bagian pinggir object

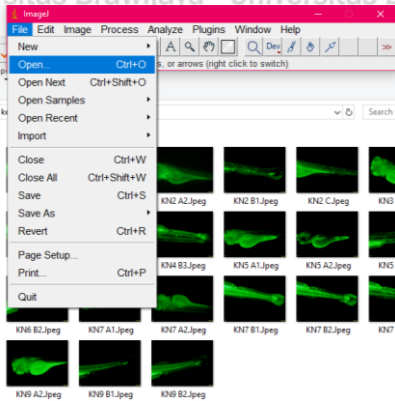


6. Untuk menilai klik analyze pilih measure. Hasil akan muncul dilaman result

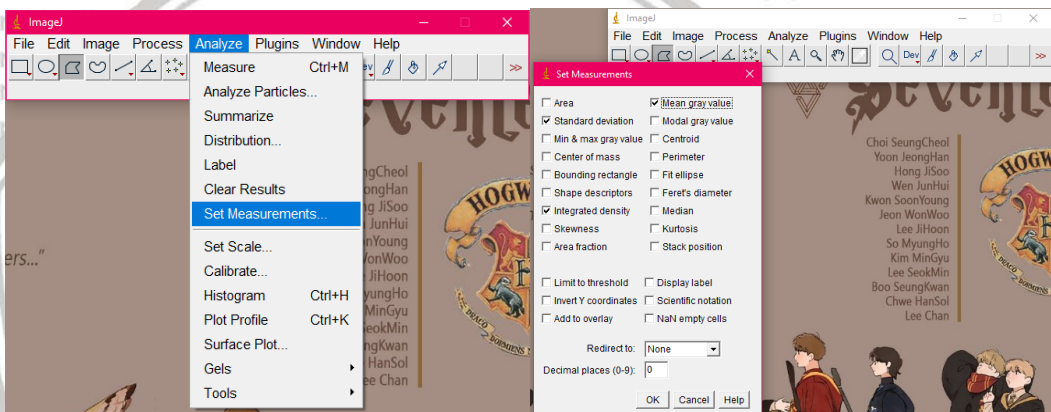


Lampiran 11 Cara Menggunakan Image J Apoptosis

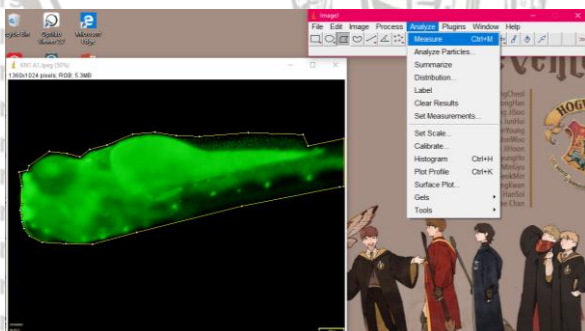
1. Buka File foto apoptosis yang akan diukur densitas warnanya



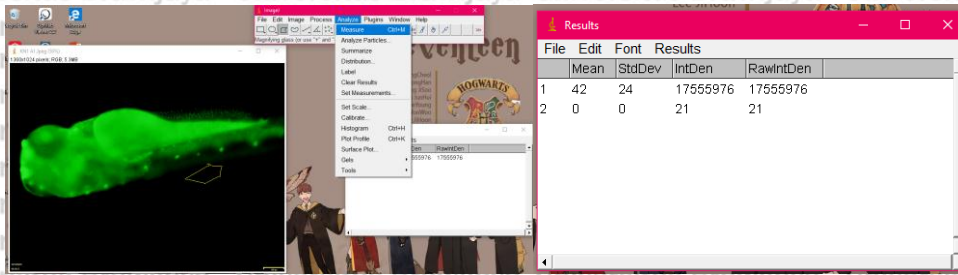
2. Klik analyze untuk mengatur apa saja yang akan diukur



3. Beri batas pada larva zebrafish dan klik measurement pada analyze



4. Hasil akan muncul dilayar



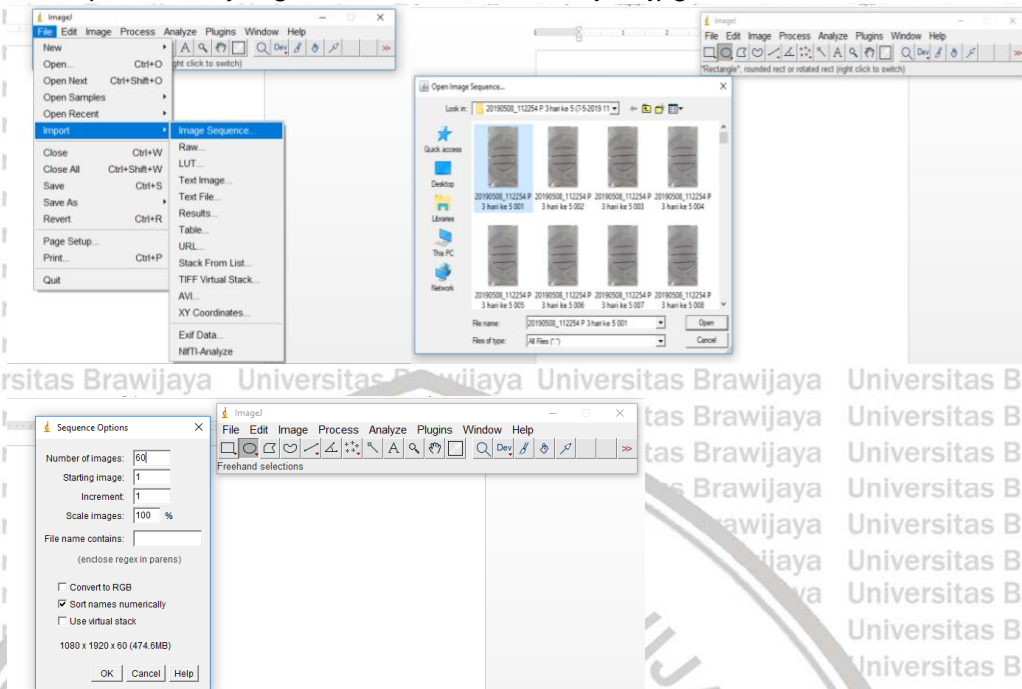
Total fluorescent signals = integrated density – mean fluorescent signals of the background

$$= 17555976 - 21 = 17555755$$

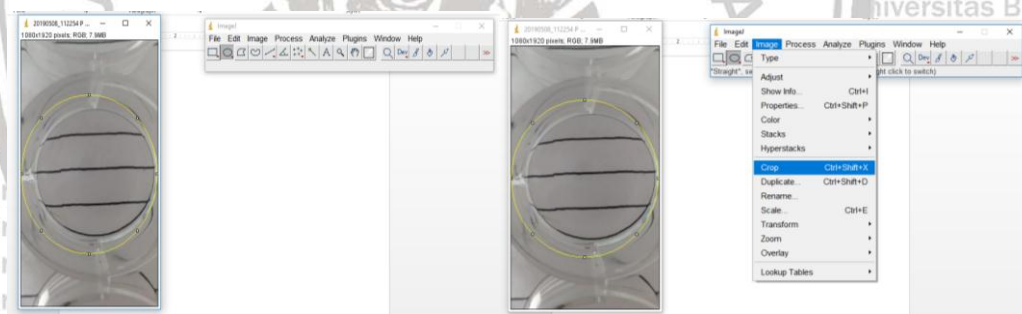


Lampiran 12 Cara menggunakan M-Track J

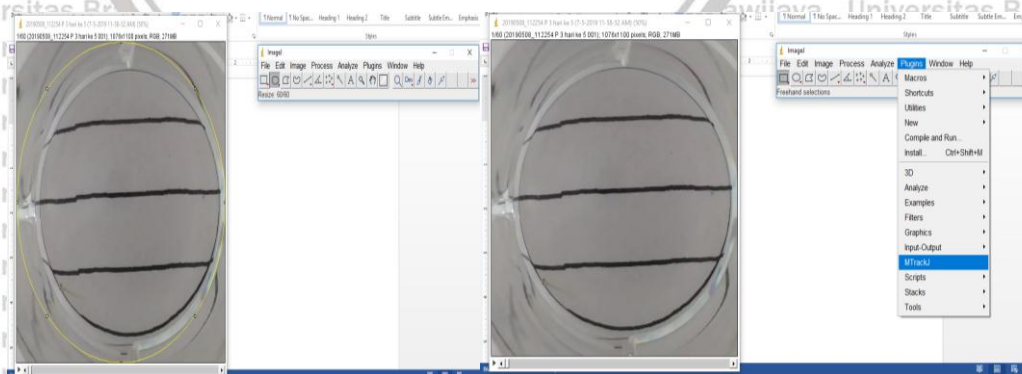
1. Import video yang sudah dikonverter menjadi jpg



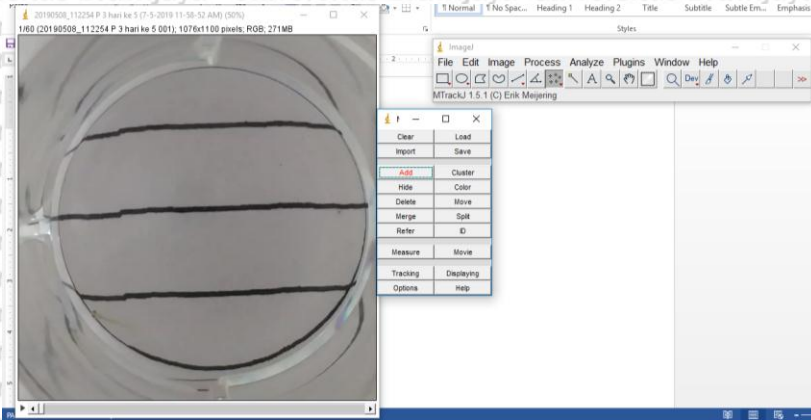
2. Lakukan crop pada batas well dan klik ok



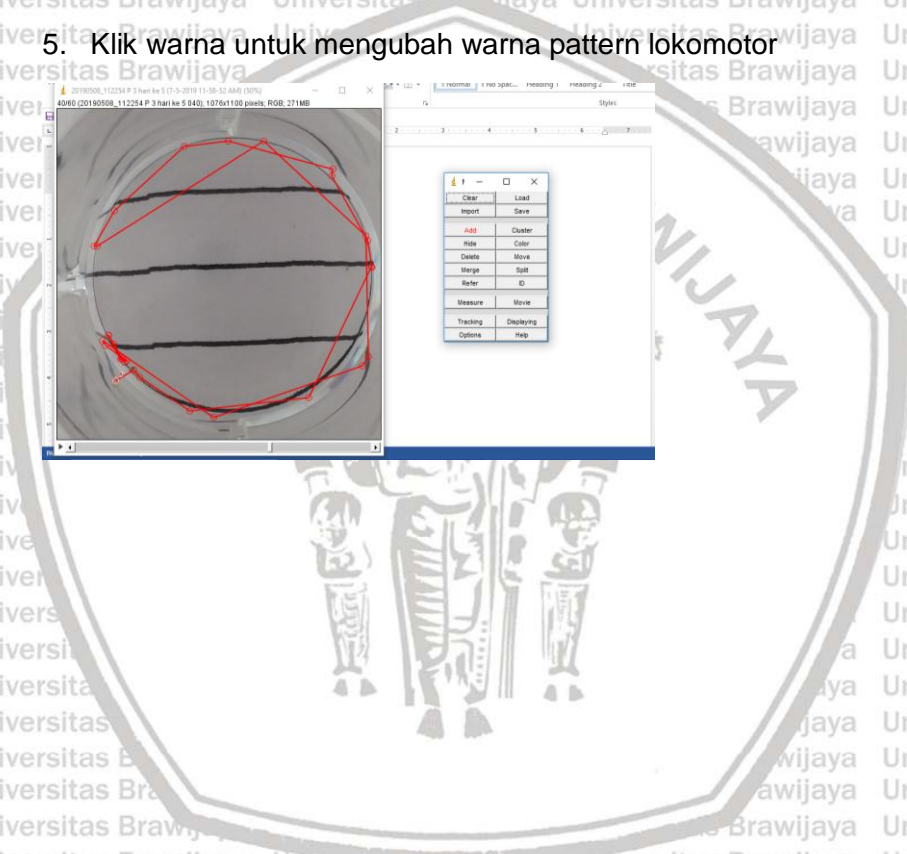
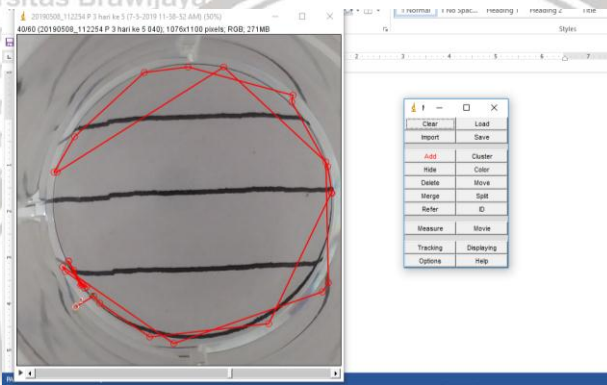
3. Klik Plug in kemudian pilih M Track J



4. Klik add kemudian klik pada bagian kepala zebrafish sampai 60 foto



5. Klik warna untuk mengubah warna pattern lokomotif



Lampiran 13 Dokumentasi penelitian

Pemijahan zebrafish dan pemilihan telur



Pemberian paparan timbal dan pegangan



Alat dan bahan Reverse Transkriptase PCR



RIWAYAT HIDUP

Fitria Edni Wari, lahir di Sidoarjo, 12 Juni 1986 anak pertama dari dua bersaudara putri dari bapak Edy Sunarto (Alm) dan Ibu Basri Aini. Lulus SD Negeri Sambungrejo 1 tahun 1998, lulus SLTP Negeri 1 Sukodono tahun 2001 dan lulus SMA Negeri 1 Taman tahun 2004. Tahun 2004 melanjutkan D III Kebidanan di Akademi Kebidanan Siti Khodijah Sepanjang, lulus tahun 2007. Melanjutkan pendidikan S 1 Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, lulus tahun 2011. Pada tahun 2017 mengambil pendidikan program studi Magister Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tahun 2011 sampai dengan sekarang bekerja di Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Majapahit Mojokerto.

