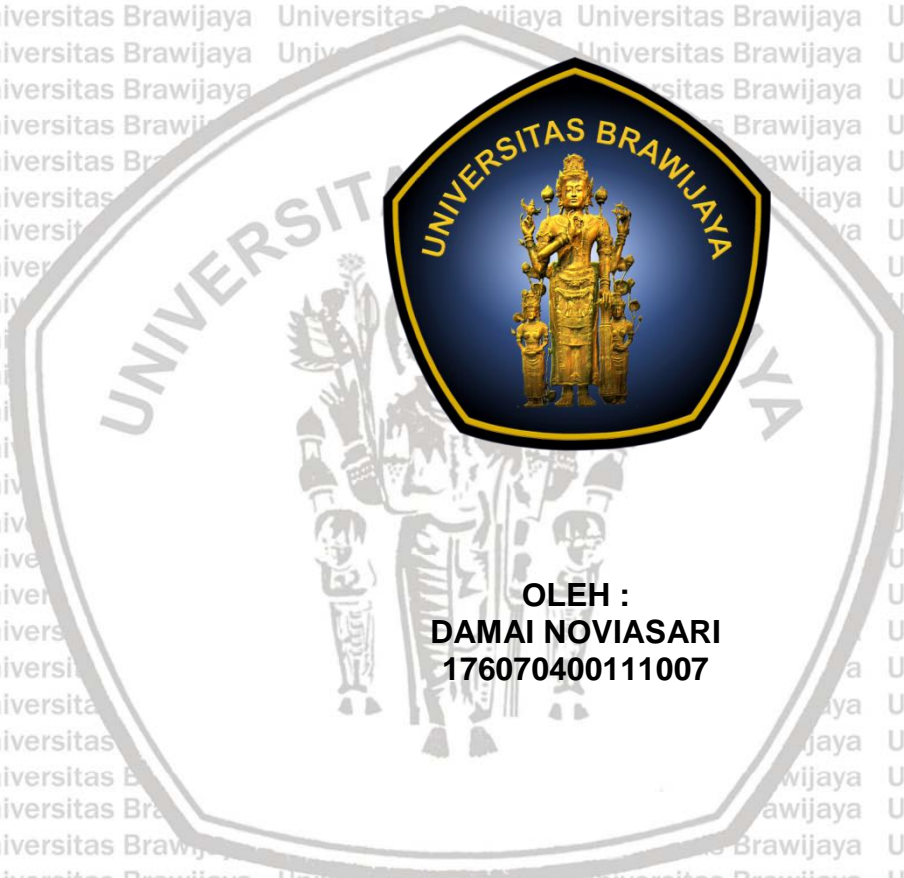


**PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN
TERHADAP EKSPRESI TIROSIN HIDROKSILASE,
KADAR DOPAMIN DAN AKTIVITAS LOKOMOTOR
PADA LARVA ZEBRAFISH YANG DIPAPAR TIMBAL**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH :
DAMAI NOVIASARI
176070400111007**

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

TESIS

PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN
TERHADAP EKSPRESI TIROSIN HIDROKSILASE,
KADAR DOPAMIN DAN AKTIVITAS LOKOMOTOR
PADA LARVA ZEBRAFISH YANG DIPAPAR TIMBAL

Oleh :
DAMAI NOVIASARI
176070400111007

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

KOMISI PEMBIMBING


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


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

Malang, 29 JUL 2019

Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,




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

TESIS

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL PEGAGAN
TERHADAP EKSPRESI TIROSIN HIDROKSILASE,
KADAR DOPAMIN DAN AKTIVITAS LOKOMOTOR
PADA LARVA ZEBRAFISH YANG DIPAPAR TIMBAL**

Oleh :
DAMAI NOVIASARI
176070400111007

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

KOMISI PENGUJI

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

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

Dr.rer.nat.Tri Yudani Mardining R, M.App.Sc
NIP 196511051993032001
Anggota Penguji

Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med, SpA(K)
NIP 197307262005011008
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 : Damai Noviasari
NIM : 176070400111007
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran UB

RINGKASAN

Damai Noviasari

Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan terhadap Ekspresi Tirosin Hidroksilase, Kadar Dopamin dan Aktivitas Lokomotor pada Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal. Program Studi Magister Kebidanan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
Ketua Komisi Pembimbing: Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes; Anggota Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes.

Timbal merupakan contoh logam berat yang dapat menyebabkan keracunan pada saraf sehingga dapat menyebabkan gangguan integritas, struktural bahkan fungsi syaraf sehingga terjadi penurunan kecerdasan, fungsi kognitif, penurunan minat serta perubahan aktivitas dan gangguan motorik kasar. Kemenkes menyebutkan bahwa 5-10 % balita mengalami keterlambatan perkembangan sedangkan 1-3 % diperkirakan mengalami gangguan perkembangan motorik, bahasa, sosio-emosional dan kognitif. Masuknya timbal ke dalam tubuh akan meningkatkan jumlah radikal bebas sehingga menyebabkan stres oksidatif. Keadaan stres oksidatif dapat menghambat kerja enzim tirosin hidroksilase serta menyebabkan penurunan dopamin sehingga mengakibatkan perubahan aktivitas lokomotor. Pegagan merupakan tumbuhan yang mengandung triterpen yang berfungsi sebagai antioksidan dan quarcetin yang berfungsi sebagai pengikat (*chelator*) logam berat. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan ekstrak etanol pegagan dapat mencegah penurunan ekspresi tirosin hidroksilase, kadar dopamin serta aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal mulai 2 hpf – 72 hpf.

Penelitian ini adalah *true experimental* menggunakan *post test only control group design*. Paparan timbal 2.5 ppm dan ekstrak etanol pegagan dengan konsentrasi 1.25 µg/ml, 2.5 µg/ml, 5 µg/ml diberikan secara bersamaan pada larva zebrafish mulai usia 2 hpf sampai dengan 72 hpf (*hour post fertilization*). Ekspresi tirosin hidroksilase larva zebrafish diukur saat usia 6 dpf dengan menggunakan *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*. Hasil elektroforesis dikuantifikasikan menggunakan *Bio-Rad Gel Doc Imaging system*, sedangkan kadar dopamin diukur menggunakan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Data dianalisis menggunakan uji *One Way Anova*. Lokomotor zebrafish diukur dengan menggunakan hasil kuantifikasi pergerakan larva melewati pola kemudian dibuat pattern dengan menggunakan Image J.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi tirosin hidroksilase antar kelompok tidak terdapat perbedaan signifikan ($p > 0.05$), namun terdapat kecenderungan kelompok kontrol positif memiliki rata-rata terendah bila dibandingkan dengan kontrol negatif. Pemberian ekstrak pegagan dengan konsentrasi berbeda membuktikan bahwa semakin tinggi konsentrasi semakin meningkat ekspresi tirosin hidroksilase. Kadar dopamin pada larva zebrafish mengalami peningkatan pada kelompok yang diberi pegagan dengan konsentrasi berbeda bila dibandingkan dengan kontrol positif. Analisis data menunjukkan terdapat perbedaan signifikan kadar dopamin dengan $p < 0.05$. Hasil pengamatan yang dilakukan terhadap aktivitas lokomotor larva zebrafish usia 4 – 6 dpf menunjukkan adanya perbedaan signifikan $p < 0.05$. Pada usia 5 dpf dan 6 dpf timbal menurunkan aktivitas lokomotor secara signifikan dan pemberian ekstrak pegagan meningkatkan aktivitas lokomotor seiring dengan peningkatan konsentrasi. Korelasi *Spearman* antara ekspresi tirosin hidroksilase dengan kadar dopamin menunjukkan adanya hubungan positif (searah) dan kuat (0.700) artinya semakin tinggi ekspresi tirosin hidroksilase maka semakin tinggi kadar dopamin. Hubungan antara kadar dopamin dengan aktivitas lokomotor menunjukkan hubungan positif (searah) dan sempurna (1.000) yang berarti bahwa peningkatan kadar dopamin akan diikuti dengan peningkatan aktivitas lokomotor.

Timbal mampu menurunkan ekspresi tirosin hidroksilase, kadar dopamin serta aktivitas lokomotor pada larva zebrafish. Pemberian ekstrak etanol pegagan mampu meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase, kadar dopamin serta aktivitas lokomotor. Paparan timbal diketahui menyebabkan peningkatan Ca^{2+} intraseluler sehingga terjadi

disfungsi mitokondria. Kerusakan pada mitokondria akan mengakibatkan stress oksidatif serta menghambat kerja dari tirosin hidroksilase bahkan terjadi apoptosis. Tirosin hidroksilase merupakan enzim yang berfungsi untuk biosintesis dopamin. Penurunan ekspresi tirosin hidroksilase akan mengakibatkan penurunan terhadap dopamin dan lokomotor. Ekstrak etanol pegagan memiliki kandungan quercetin yang berfungsi sebagai chelator logam berat serta sebagai scavenger radikal bebas. Asiaticoside pada pegagan berfungsi untuk peningkatan enzim antioksidan endogen, sehingga memberikan efek neuroproteksi pada dopaminergik dan mampu meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase. Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian sebelumnya bahwa timbal dengan konsentrasi 50 mg/kg dapat menghambat dopaminergik dan lokomotor pada tikus.

Kesimpulan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan aktivitas lokomotor melalui peningkatan kadar dopamine pada larva zebrafish yang dipapar timbal



SUMMARY

Damai Noviasari

The Effect of Ethanol Extract from *Centella asiatica* Plants on the Expression of Tyrosine Hydroxylase, Dopamine Levels and Locomotor Activity on Zebrafish Larvae Exposed to Lead. Master Program of Midwifery Faculty of Medicine Brawijaya, Indonesia. Chair of Supervisory Commission: Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes; Member Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes.

Lead is a heavy metal that is poisonous to the nerves system, resulting in integrity, structural even nerve disorders which eventually lead to decreased intelligence, cognitive skill, enthusiasm, and also lead to changes in activities and gross motor disorders. The Ministry of Health reported 5-10% of toddlers experienced developmental delays, in which it was estimated that 1-3% suffered from motor, language, socio-emotional and cognitive developmental disorders. The level of lead content in the body increases the level of free radicals causing oxidative stress. This oxidative stress inhibits tyrosine hydroxylase enzyme functions and causes decreases in dopamine level, resulting in locomotor activity disorders. *Centella asiatica* is a plant that contains triterpenes which functions as an antioxidant and quercetin which functions as a heavy metal chelator. This research was conducted to confirm the potentials of *Centella asiatica* ethanol extract in preventing decreases in tyrosine hydroxylase expression, dopamine levels and locomotor activity in zebrafish larvae exposed to lead at 2 hpf - 72 hpf.

This true experimental research employed post test only control group design. Lead exposure at 2.5 ppm and 1.25 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 2.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ of ethanol extract from *Centella asiatica* were administered simultaneously to zebrafish larvae from the age of 2 hpf to 72 hpf (hour post fertilization). The expression of tyrosine hydroxylase zebrafish larvae was measured at 6 dpf using a Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The electrophoresis results were quantified using the Bio-Rad Gel Doc Imaging system, while dopamine levels were measured using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The obtained data were then analyzed using One Way Anova test. The zebrafish locomotor was calculated based on the results of larvae movement calculation through certain pattern to form a pattern using Image J.

The results of this research showed no significant differences in the tyrosine hydroxylase expression between groups ($p > 0.05$). However, the positive control group was found to have a tendency of having the lowest average compared to the negative control. The administration of *Centella asiatica* extract at concentrations proved that higher concentration increased tyrosine hydroxylase expression. Dopamine levels in zebrafish larvae were found to increase in groups which were given *Centella asiatica* extract at different concentrations compared to positive controls. The results of the data analysis indicated significant differences in dopamine levels at $p < 0.05$. Meanwhile, observations showed that the locomotor activity of 4 - 6 dpf zebrafish larvae showed a significant difference $p < 0.05$. At the age of 5 dpf and 6 dpf, the level of lead content significantly reduced locomotor activity and the administration of higher concentration of *Centella asiatica* extract improved the locomotor activity. A positive (direct) and perfect correlation were also found between dopamine levels and locomotor activity at (1,000), indicating that an increase in dopamine levels would be followed by an increase in locomotor activity.

Lead content could reduce tyrosine hydroxylase expression, dopamine levels and locomotor activity in zebrafish larvae. The use of *Centella asiatica* ethanol extract successfully increased tyrosine hydroxylase expression, dopamine levels and locomotor activity. Lead exposure which has been known to cause increases in intracellular Ca^{2+} would also cause mitochondrial dysfunction. Damages to the mitochondria trigger oxidative stress which inhibits tyrosine hydroxylase from functioning, even causes apoptosis. Tyrosine hydroxylase is an important enzyme in dopamine biosynthesis. Lower tyrosine hydroxylase expression will result in decreases in dopamine level and locomotor activity. The ethanol extract of *Centella asiatica* plant contains quercetin which functions as a heavy metal chelator as well as a free radical scavenger. Asiaticoside content found

in the plant increases endogenous antioxidant enzymes, providing a neuroprotective effects on dopaminergic and increasing the tyrosine hydroxylase expression. The findings of this research support the ones of previous research stating that lead content at a concentration of 50 mg / kg can inhibit dopaminergic and locomotor in mice

It is concluded from the results of this research that ethanol extract from *Centella asiatica* plant has been able to improve the locomotor activity through increases in dopamine levels in zebrafish larvae exposed to lead



KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah Subhanallahu Wata'ala atas segala limpahan rahmat, karunia serta hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tesis yang berjudul "Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan Terhadap Ekspresi Tirosin Hidroksilase, Kadar Dopamin dan Aktivitas Lokomotor Pada Larva Zebrafish Yang Dipapar Timbal".

Dengan terselesaikannya tesis ini, penulis mengucapkan terimakasih 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.
2. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med, SpA(K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan selaku penguji II yang telah memberikan arahan, masukan, izin, fasilitas dan berbagai kebijakan selama menempuh pembelajaran di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Dr. dr. Bambang Rahardjo, SpOG(K), selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
4. Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan ilmu, bimbingan, masukan dan motivasi selama penyusunan tesis ini.
5. Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes selaku pembimbing II yang telah memberikan ilmu, bimbingan, masukan dan motivasi selama penyusunan tesis ini.

6. Dr. rer.nat Tri Yudani Mardining Raras, M.App.Sc selaku penguji I yang telah memberikan arahan dan masukkan sehingga tesis ini menjadi lebih baik.

7. Suami, orang tua, anak-anakku serta saudaraku tercinta atas doa dan dukungan baik moril maupun materi hingga penulis bisa sampai pada tahap penyusunan proposal tesis ini.

8. Teman – teman satu kelompok penelitian, Nanda Norisa, Risnawati, Yuyun Diestika, Rizky Febriyanti Supriadi, Tesza Rezky Permata, Fitria Edni Wari dan Amrina Octaviana atas semangat, bantuan, saran, masukan dan kerjasamanya selama penelitian ini.

9. Seluruh staf dan tenaga laboran di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan bantuan selama proses penelitian dan penyusunan Tesis ini.

10. Rekan-rekan mahasiswa angkatan 2017 Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang atas dukungan, semangat dan kebersamaan selama perkuliahan.

Penulis menyadari bahwa Tesis ini masih terdapat kekurangan dan keterbatasan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun agar tulisan ini menjadi lebih baik dan dapat bermanfaat bagi yang membutuhkannya.

Malang, Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS.....	iv
HALAMAN PERUNTUKAN.....	v
RINGKASAN.....	vi
SUMMARY.....	viii
KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
DAFTAR SINGKATAN.....	xx
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.2.1 Umum.....	4
1.2.2 Khusus.....	4
1.3 Tujuan.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	5
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Akademik.....	5
1.4.1.1 Manfaat Praktis.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Timbal.....	7
2.1.1 Karakteristik Timbal.....	7
2.1.2 Timbal Asetat.....	7
2.1.3 Jenis dan Sumber Timbal.....	8
2.1.4 Jalur Masuk Timbal ke Dalam Tubuh Manusia.....	9
2.1.5 Toksikokinetik Timbal.....	10
2.1.6 Toksisitas Timbal pada Perkembangan Embrio.....	13



2.1.7	Toksikodinamik Timbal	16
2.2	Tirosin Hidroksilase.....	20
2.2.1	Pengertian.....	20
2.2.2	Sintesis Tirosin Hidroksilase.....	20
2.2.3	Penghambatan Fosforilasi dan Umpan Balik oleh Katekolamin.....	20
2.2.4	Pengikatan Katekolamin	21
2.2.5	Pembentukan Terhadap Kompleks α -Synuclein dan Protein Lain.....	21
2.3	Dopamin.....	22
2.3.1	Metabolisme Dopamin.....	22
2.3.2	Sintesis Dopamin.....	22
2.3.3	Fungsi dan Peran Dopamin.....	25
2.3.4	Dopaminergik dan Sistem Motorik.....	26
2.3.5	Ekspresi Tirosin Hidroksilase dalam Otak Zebrafish Selama Masa Perkembangan.....	28
2.4	Pegagan.....	29
2.4.1	Klasifikasi Pegagan.....	29
2.4.2	Morfologi Pegagan.....	30
2.4.3	Kandungan Pegagan.....	30
2.4.4	Manfaat Pegagan.....	31
2.5	Zebrafish.....	33
2.5.1	Karakteristik Zebrafish.....	33
2.5.2	Perkembangan Zebrafish.....	34
2.5.3	Perawatan Zebrafish.....	36
2.5.4	Taktil Motility.....	37
2.5.5	Zebrafish Sebagai Model Penelitian.....	38
2.5.6	Bioakumulasi Timbal Pada Biota Air.....	38
2.5.7	Perubahan Histopatologi Pada Kulit, Insang dan Usus.....	40
2.6	Perkembangan.....	41
2.6.1	Pengertian.....	41
2.6.2	Aspek Yang Mempengaruhi Perkembangan Anak.....	41
2.6.3	Pengertian Motilitas dan Lokomotor.....	42
2.6.4	Keterampilan Gerak Lokomotor.....	43
2.7	Ekstrak Etanol Dapat Memperbaiki Ekspresi Tirosin Hidroksilase, Kadar Dopamin dan Aktivitas Lokomotor Pada Zebrafish Yang Dipapar Timbal.....	47
BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP.....		50
3.1	Kerangka Teori.....	50
3.2	Penjelasan Kerangka Teori.....	51
3.3	Kerangka Konsep.....	53
3.4	Penjelasan Kerangka Konsep.....	54
3.1	Hipotesis.....	55



BAB 4 METODE PENELITIAN..... 56

4.1 Jenis dan Desain Penelitian..... 56

4.2 Populasi dan Sampel..... 56

4.2.1 Populasi..... 56

4.2.2 Sampel Penelitian..... 56

4.2.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi..... 58

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian..... 58

4.3.1 Tempat Penelitian..... 58

4.3.2 Waktu Penelitian..... 58

4.4 Variabel Penelitian..... 58

4.5 Bahan dan Alat..... 59

4.5.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Zebrafish..... 59

4.5.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Pegagan..... 59

4.5.3 Alat dan Bahan Pembuatan Medium Embrionik..... 59

4.5.4 Alat dan Bahan Pengukuran Aktivitas Lokomotor..... 59

4.5.5 Alat dan Bahan Pengukuran Ekspresi Kadar Dopamin..... 60

4.5.6 Alat dan Bahan Pengukuran Ekspresi Tirosin

Hidroksilase..... 60

4.6 Definisi Operasional..... 61

4.7 Prosedur Penelitian..... 61

4.7.1 Perawatan Zebrafish..... 61

4.7.2 Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio..... 62

4.7.3 Pembuatan Medium Embrionik..... 63

4.7.4 Pembuatan Larutan Timbal..... 63

4.7.5 Pembuatan Ekstrak Pegagan..... 64

4.7.6 Pembuatan Larutan Pegagan..... 65

4.7.7 Pemberian Larutan Timbal dan Ekstrak Pegagan..... 66

4.7.8 Pengukuran Taktil Motilitas..... 66

4.7.9 Pengukuran Aktivitas Lokomotor..... 67

4.7.10 Pengukuran Kadar Dopamin 67

4.7.11 Pengukuran Ekspresi Tirosin Hidroksilase..... 69

4.8 Pengolahan dan Analisis Data..... 73

4.9 Alur Penelitian..... 75

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA..... 76

5.1 Ekspresi Tirosin Hidroksilase Pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf pada Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal dan Diberi Ekstrak Pegagan..... 76

5.2 Kadar Dopamin Pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf yang Dipapar Timbal dan Diberi Ekstrak Pegagan..... 79

5.3 Aktivitas Lokomotor Pada Larva zebrafish Usia 4 – 5 dpf pada Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal dan Diberi Ekstrak Pegagan..... 81

5.5 Hasil Uji Korelasi Kadar Dopamin dan Aktivitas Lokomotor..... 84

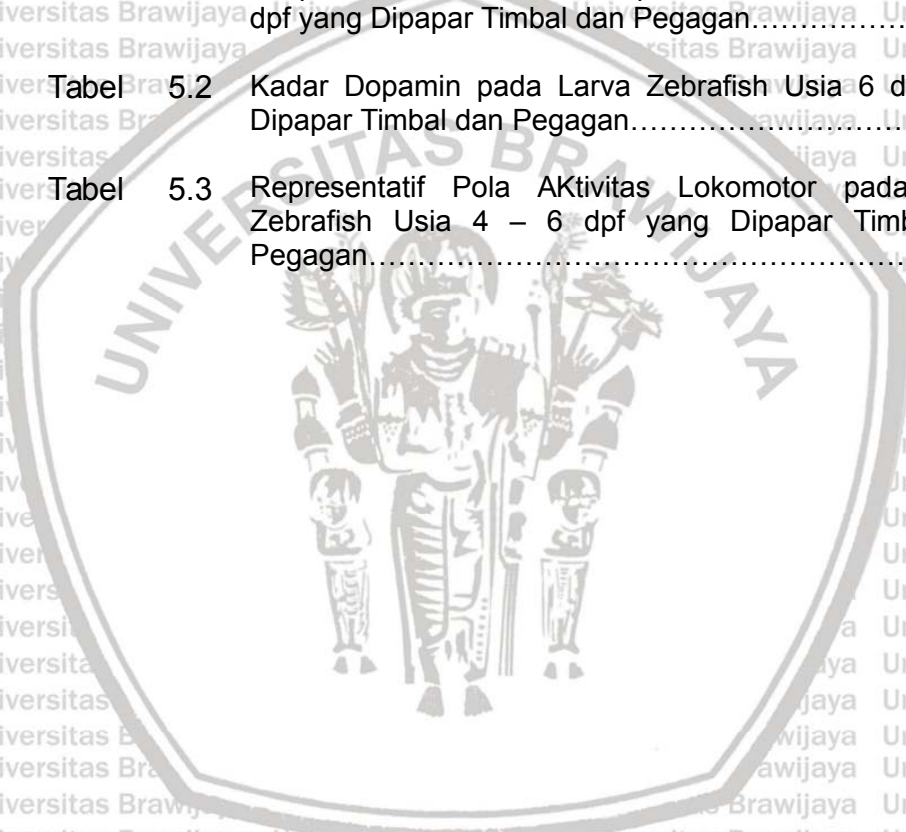


BAB 6 PEMBAHASAN.....	85
6.1 Ekspresi Tirosin Hidroksilase Pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf yang Dipapar Timbal dan Diberi Ekstrak Pegagan.....	85
6.2 Kadar Dopamin Pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf pada Lara Zebrafish yang Dipapar Timbal dan Diberi Ekstrak Pegagan.....	86
6.3 Aktivitas Lokomotor Pada Larva Zebrafish Usia 4 – 6 dpf pada Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal dan Diberi Ekstrak Pegagan.....	88
6.4 Hubungan Antara Kadar Dopamin serta Aktivitas Lokomotor pada Larva Zebrafish yang Dipapar Timbal dan Diberi Ekstrak Pegagan.....	89
6.5 Implikasi Hasil Penelitian Dalam Asuhan Kebidanan.....	89
6.6 Keterbatasan Penelitian.....	91
BAB 7 KESIMPULAN DAN PENUTUP.....	92
B7.1 Kesimpulan	92
B7.2 Penutup.....	92
DAFTAR PUSTAKA.....	93
LAMPIRAN.....	102
RIWAYAT HIDUP.....	128



DAFTAR TABEL

Tabel	2.1	Klasifikasi Pegagan.....	29
Tabel	2.2	Kandungan Kimia Pegagan.....	30
Tabel	2.3	Klasifikasi Zebrafish.....	34
Tabel	2.4	Perkembangan Zebrafish.....	35
Tabel	2.5	Karakteristik Air Pada Pemeliharaan Zebrafish.....	36
Tabel	4.1	Primer Ekspresi Tirosin Hidroksilase.....	61
Tabel	4.2	Definisi Operasional.....	61
Tabel	4.3	Konsentrasi Timbal dan Pegagan.....	66
Tabel	4.4	Kekuatan Korelasi dan Arah Korelasi.....	74
Tabel	5.1	Ekspresi Tirosin Hidroksilase pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf yang Dipapar Timbal dan Pegagan.....	78
Tabel	5.2	Kadar Dopamin pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf yang Dipapar Timbal dan Pegagan.....	80
Tabel	5.3	Representatif Pola AKtivitas Lokomotor pada Larva Zebrafish Usia 4 – 6 dpf yang Dipapar Timbal dan Pegagan.....	82



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Toksikokinetik Timbal dalam Tubuh Manusia.....	12
Gambar 2.2 Plasenta dan Kerawanan terhadap Teratogen.....	14
Gambar 2.3 Periode Embrio terhadap teratogen selama embryogenesis.....	15
Gambar 2.4 Mekanisme Stres Oksidatif pada Sel yang Terpapar Timbal.....	17
Gambar 2.5 Mekanisme Masuknya Timbal Ke Dalam sel.....	19
Gambar 2.6 Sintesis Dopamin Dalam Neuron Dopamin.....	23
Gambar 2.7 Jalur Sintesis L-DOPA.....	24
Gambar 2.8 Perintah Motor Dari Substantia Nigra Pars Compacta Untuk Mengontrol Gerakan.....	28
Gambar 2.9 Siklus Perkembangan Zebrafish.....	34
Gambar 3.1 Kerangka Teori.....	50
Gambar 3.1 Kerangka Konsep.....	53
Gambar 4.1 Kertas Pola Bergaris Untuk Mengukur Lokomotor.....	60
Gambar 4.2 Alur Penelitian.....	75
Gambar 5.1 β -actin dan Ekspresi Tirosin Hidroksilase pada Larva Zebrafish usia 6 dpf yang Dipapar Timbal dan Diberi Ekstrak Pegagan.....	76
Gambar 5.2 Kuantifikasi Gel Doc pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf yang Dipapar Timbal dan Diberi Ekstrak Pegagan.....	77
Gambar 5.3 Standar Deviasi Ekspresi Tirosin Hidroksilase Pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf yang Dipapar Timbal dan Diberi Ekstrak Pegagan.....	78
Gambar 5.4 Standar Deviasi Kadar Dopamin Pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf yang Dipapar Timbal dan Diberi Ekstrak Pegagan.....	80

Gambar 5.5 Rerata Aktivitas Lokomotor Pada Larva Zebrafish Usia 4 – 6 dpf yang Dipapar Timbal dan Diberi Ekstrak Pegagan.....:81



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Proceeding 102

Lampiran 2 Ekstraksi Pegagan..... 103

Lampiran 3 Surat Keterangan Kelaikan Etik 104

Lampiran 4 Determinasi Tanaman Pegagan 105

Lampiran 5 Laporan Hasil Analisa Zebrafish 106

Lampiran 6 Hasil Analisis Statistik Tirosin Hidroksilase 107

Lampiran 7 Hasil Analisis Statistik Dopamin 108

Lampiran 8 Hasil Analisis Statistik Lokomotor 4 dpf 110

Lampiran 9 Hasil Analisis Statistik Lokomotor 5 dpf 114

Lampiran 10 Hasil Analisis Statistik Lokomotor 6 dpf 116

Lampiran 11 Hasil Analisis Hubungan Dopamin dengan Lokomotor 121

Lampiran 12 Cara Pembuatan Lokomotor menggunakan Image J 122

Lampiran 13 Pembuatan Embrionik Medium dan Persiapan Trapping 124

Lampiran 14 Pemeriksaan ELISA 125

Lampiran 15 Pemeriksaan Isolasi RNA 126

Lampiran 16 Pemeriksaan PCR 127



DAFTAR SINGKATAN

ppm	: Part per Million
TH	: Tirosin Hidroksilase
ROS	: Reactive Oxygen Species
DNA	: Deoxyribonucleic acid
CA	: Centella asiatica
L-DOPA	: Levodopa
dpf	: Day Post Fertilization
Pb	: Timbal
NA	: Nomor Atom
BA	: Berat Atom
Ca ²⁺	: Kalsium
Zn ²⁺	: Zeng
GSH	: Gluthatione
GSSG	: Gluthatione Disulfide
GR	: Glutathione Reduktase
FPX	: Glutathione Peroxidase
ALAD	: Aminolevulinic Acid Dehidratase
SOD	: Superoksida Dismutase
CAT	: Catalase
RBC	: Red Blood Cell
CaM	: Calmodulin
VMAT	: Vesicular Monoamine Transporter
AAD	: Amino Aromatic Dekarboksilase
DAT	: Dopamine Transporter
MAO	: Monoamine Oksidase



DOPAC : Asam 3,4-Dihidroksifenilasetat

HVA : Homovanillic Acid

COMT : Katekol-O-Metil Transferase

3OMD : 3-O-Metildopa

EPN : Entopeduncular

COX2 : Cyclooxygenase-2

PGE2 : Prostaglandin E2

LPS : Lipopolysaccharide



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pencemaran lingkungan merupakan masalah penting yang terjadi saat ini.

Salah satu bahan pencemar lingkungan yang berbahaya dan bersifat toksik adalah logam berat. Contoh logam berat yang dapat mengakibatkan keterlambatan perkembangan antara lain adalah timbal (Ulfah, 2014).

Association of Occupational Environmental Clinics (AOEC) menyatakan bahwa paparan timbal yang berlebihan merupakan masalah penting di dunia (Wedeen *et al.*, 2007). Pencemaran timbal merupakan salah satu penyebab terjadinya berbagai permasalahan kesehatan masyarakat dunia, baik di negara maju maupun di negara berkembang salah satunya di Indonesia. Berdasarkan data penelitian yang ada tentang paparan timbal di perairan Indonesia berturut-turut yaitu di pantai Ancol Jakarta diperoleh kadar timbal sebesar 0,55 ppm, di pantai Dumai Riau sebesar 1,8 ppm, di sungai Rolak Gunungsari Surabaya sebesar 0,393 ppm dan sungai Kali Mas Surabaya sebesar 0,252 ppm (Lestari, 2004; Anggraini, 2007; Ulfah, 2014). Ambang batas kandungan timbal yang tercantum pada Peraturan Pemerintah No. 82 Tahun 2001 tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air untuk Mutu Air Kelas III adalah sebesar 0.03 ppm dan batas kadar timbal dalam air minum yaitu 0.01 ppm/hari (WHO, 2011). Selain masalah pencemaran timbal di perairan, emisi transportasi yang mengandung timbal terbukti sebagai penyumbang pencemaran udara tertinggi di Indonesia yakni sekitar 85 % (Dewi, 2015).

Paparan timbal yang ada mampu merangsang kerusakan pada otak, jantung, hati, ginjal dan organ reproduksi (Ahamed & Siddiqui, 2007). Prevalensi

kadar timbal dalam darah di Indonesia antara 5-10 µg/dL sebesar 21,8% antara 10-20 µg/dL sebesar 11,2 % dan kadar timbal lebih dari 20 µg/dL sebesar 6,5 %.

Kerusakan otak karena timbal akan mempengaruhi sistem saraf khususnya bagi bayi dan anak-anak yang masih dalam masa pertumbuhan dan perkembangan (Cope *et al.*, 2004). Paparan timbal menyebabkan keracunan pada saraf serta mempengaruhi perkembangan otak sehingga menyebabkan gangguan integritas struktural atau fungsional saraf sehingga menyebabkan penurunan kecerdasan (Huang *et al.*, 2012), penurunan fungsi kognitif (Boucher *et al.*, 2012), penurunan minat (Bellinger *et al.*, 1994) serta perubahan aktivitas dan gangguan motorik kasar (Dou, 2011). Data Profil Kesehatan Indonesia tahun 2014 mengemukakan bahwa balita usia 0-2 tahun berjumlah 14.228.917 jiwa, sementara balita dengan interval 1-4 tahun berjumlah 19.388.791 jiwa. Sekitar 16 % anak usia dibawah lima tahun mengalami gangguan perkembangan saraf dan otak mulai ringan hingga berat. Sekitar 5-10% balita mengalami keterlambatan perkembangan sedangkan 1-3% diperkirakan mengalami gangguan perkembangan motorik, bahasa, sosio-emosional dan kognitif (Kemenkes, 2016). Di Jakarta 35 % anak memiliki kadar timbal dalam darah lebih dari 10 µg/dL yang dapat menimbulkan efek pada tingkat intelegensi (Landrigan, 2012). Efek neurotoksik pada masa perkembangan anak dapat menyebabkan penurunan kecerdasan (Tang *et al.*, 2012), penurunan fungsi kognitif (Boucher *et al.*, 2011), penurunan minat (Bellinger *et al.*, 1994) serta perubahan aktivitas dan gangguan motorik kasar (Dou & Zhang, 2011).

Timbal yang masuk ke dalam tubuh menyebabkan terjadinya peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) sehingga mengakibatkan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat menyebabkan disfungsi seluler dan kerusakan pada lipid membrane, *deoxyribonucleic acid* (DNA), serta struktur dan fungsi protein (Gurer & Ercal, 2000; Ercal *et al.*, 2001). Ros yang meningkat akibat paparan timbal

akan menyebabkan perubahan pada ekspresi tirosin hidroksilase. Mekanisme kerja tirosin hidroksilase akan dihambat oleh ROS sehingga sintesis tirosin menjadi L-DOPA akan mengalami penurunan. Penurunan yang terjadi pada sintesis dopamin akan menyebabkan gangguan pada aktivitas lokomotor. Paparan timbal di dalam otak akan menghambat tirosin hidroksilase (TH) sehingga menghasilkan penurunan dopamine, serotonin dan metabolit lainnya di korteks serebral, hipokampus, hipotalamus basal dan medial (Jadhav & Ramesh, 1997) dan menyebabkan penurunan aktivitas lokomotor serta hipoaktivitas (Tamegart *et al.*, 2018). Gerak dasar lokomotor merupakan salah satu domain dari gerak dasar fundamental (*fundamental basic movement*) dan perkembangan koordinasi yang melibatkan fungsi saraf, otot-otot besar (*gross muscles*), pertumbuhan otot, daya tahan dan stamina (Gallahue *et al.*, 2006).

Antioksidan merupakan salah satu senyawa yang dapat menurunkan stres oksidatif. Pegagan (*Centella asiatica*) mempunyai efek sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Salah satu efek dari antioksidan yaitu mampu mencegah stres oksidatif (Chandrika & Kumara, 2015). Komponen utama dan terpenting dari kandungan pegagan adalah *triterpen*. Jenis triterpen terbanyak pada pegagan adalah *madecassiside* dan *asiaticoside* (Hashim *et al.*, 2011). Kandungan *triterpen* dapat ditemukan pada bagian daun dan batang pegagan yang merupakan komponen aktif sebagai antioksidan (James & Durbey, 2009).

Zebrafish merupakan salah satu hewan coba yang banyak digunakan dalam model penelitian. Hal ini disebabkan karena zebrafish memiliki kemiripan fisiologis dan 70 % homolog dengan gen manusia (Howe *et al.*, 2013). Menurut (Hallare *et al.*, 2004) banyak keuntungan yang didapatkan dengan menggunakan zebrafish sebagai hewan coba seperti proses fertilisasi yang terjadi secara eksternal, ukuran dari zebrafish yang kecil, proses adaptasi yang mudah serta zebrafish mampu menghasilkan jumlah telur yang banyak. Berdasarkan

ontogeny, usia zebrafish analog dengan manusia yaitu pada usia zebrafish 3 dpf (Day Post Fertilization) setara dengan bayi baru lahir, usia zebrafish 6 dpf setara dengan batita 2 tahun dan usia zebrafish 9 dpf setara dengan anak usia 8 tahun (Sorribes *et al.*, 2013).

Berdasarkan uraian tersebut maka peneliti ingin membuktikan pengaruh pemberian ekstrak etanol pegagan terhadap pencegahan penurunan ekspresi tirosin hidroksilase, kadar dopamin serta aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Umum

“Apakah ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase, kadar dopamin dan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal?”

1.2.2 Khusus

1. Apakah ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase pada larva zebrafish yang dipapar timbal ?
2. Apakah ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan kadar dopamin pada larva zebrafish yang dipapar timbal ?
3. Apakah ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal ?
4. Apakah terdapat hubungan antara ekspresi tirosin hidroksilase dengan kadar dopamin pada larva zebrafish yang dipapar timbal ?
5. Apakah terdapat hubungan antara kadar dopamin dengan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal ?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase, kadar dopamin serta aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase pada larva zebrafish yang dipapar timbal.
2. Membuktikan ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan kadar dopamin pada larva zebrafish yang dipapar timbal.
3. Membuktikan ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal.
4. Membuktikan hubungan antara ekspresi tirosin hidroksilase dengan kadar dopamin pada larva zebrafish yang dipapar timbal.
5. Membuktikan hubungan antara kadar dopamin dengan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan acuan untuk penelitian selanjutnya mengenai pencegahan yang dihasilkan oleh pegagan terhadap mekanisme dampak paparan timbal terhadap kesehatan ibu hamil terutama yang menyebabkan gangguan perkembangan pada bayi.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Pegagan merupakan salah satu tanaman herbal yang memiliki banyak manfaat dan dapat digunakan sebagai bahan pangan yang diajukan

sebagai saran pada ibu hamil untuk mencegah gangguan perkembangan anak.

2. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bagi masyarakat untuk lebih hati-hati dan waspada terhadap kandungan logam timbal yang ada dalam air, emisi bahan bakar serta makanan yang terkontaminasi oleh timbal.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Timbal/Plumbum (Pb)

2.1.1 Karakteristik Timbal

Timbal biasa disebut sebagai timah hitam atau plumbum dan disimbolkan dengan Pb. Pada tabel periodik unsur kimia, timbal termasuk dalam kelompok logam golongan IV-A. Timbal mempunyai nomor atom (NA) 82 dan berat atom (BA) 207,2 merupakan suatu logam berat berwarna kelabu kebiruan dengan titik leleh 327°C dan titik didih 1.725°C. pada suhu 550-600°C timbal menguap dan membentuk oksigen dalam udara lalu membentuk timbal oksida.

Berdasarkan tingkat oksidasinya timbal terbagi atas; Pb (0), logam; Pb (II); dan Pb (IV). Pb dalam lingkungan terutama terdapat dalam bentuk Pb (II).

Terdapat bermacam-macam jenis timbal berdasarkan sifat kimia antara lain; timbal (logam), timbal asetat, timbal *azide*, timbal *bromide*, timbal *chloride*, timbal *chromatic*, timbal *fluoroborate*, timbal *iodide*, timbal *molybdenum chromate*, timbal *nitrate*, timbal *oxide*, timbal *phosphate*, timbal *stypnate*, timbal *sulfate*, timbal *sulfide*, *tetraethyl* timbal dan timbal carbonate (Wedeen *et al.*, 2007).

2.1.2 Timbal Asetat

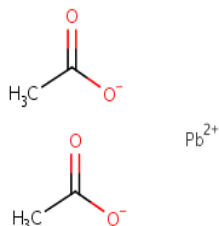
Salah satu bentuk dari timbal yaitu timbal asetat yang mempunyai karakteristik yaitu sebagai berikut: (Wedeen *et al.*, 2007),

Nama lain : Timbal (2+) asam asetat, Pb asetat

Nama dagang : *Salt of Saturn*, *Sugar of Lead*, Unichem PBA

Rumus kimia : $C_4H_6O_4Pb$

Struktur kimia :



Berat molekul : 379,33 g/mol

Bentuk dan warna : Padat dan berwarna putih

Titik lebur : 280° C

Titik didih : terurai diatas 200° C

Kelarutan : Larut di air pada suhu 520° C : 443 g/liter

Larut dalam glycerol dan alkohol

Kepadatan : 3,25 g/cm³

Salah satu penggunaan dari timbal asetat dalam kehidupan sehari-hari adalah sebagai pemanis buatan. Sebelum adanya industrialisasi gula, manusia telah menggunakan berbagai macam bahan di alam untuk membuat bahan pemanis, terutama dari buah-buahan dan madu. Namun pemanis sintetik pertama diperkirakan adalah timbal (II) asetat yang dibuat pertama kali oleh bangsa Romawi. Timbal asetat digunakan sebagai bahan baku pembuatan sirup, pemanis minuman atau makanan juga sebagai campuran minuman anggur (wine) (Eisinger, 1982).

2.1.3 Jenis dan Sumber Timbal

Timbal terdapat dalam 2 bentuk yaitu anorganik dan organik yaitu : (Juberg, 2000; (Wedeen *et al.*, 2007)

1. Timbal anorganik

Timbal anorganik adalah senyawa yang mengandung timbal yang dikombinasikan dengan unsur-unsur selain karbon. Contohnya adalah timbal

oksida, timbal kromat, dan timbal nitrat. Senyawa ini telah digunakan dalam berbagai produk seperti insektisida, pigmen, cat, gelas, plastik dan senyawa karet. Selain itu timbal anorganik dapat ditemukan dalam tanah.

2. Timbal organik

Senyawa timbal organik mengandung atom timbal yang terikat karbon untuk membentuk sebuah molekul timbal organik. Contohnya yaitu *tetraethyl* dan *tetramethyl lead* (bentuk yang lebih beracun dari logam) dulu banyak digunakan sebagai zat aditif bensin untuk mencegah korosi mesin.

Logam timbal digunakan dalam pembuatan produk seperti baterai, solder timah, perisai radiasi, pipa dan pembungkus kabel listrik. Timbal di lingkungan terjadi secara alami, produk sampingan dari aktivitas manusia, konsentrasi serta bentuknya di lingkungan sangat bervariasi (Juberg, 2000). Timbal di udara masuk ke perairan dengan bantuan air hujan. Pb dapat mencemari udara, air, tanah, tumbuhan, hewan bahkan manusia.

2.1.4 Jalur Masuk Timbal ke Dalam Tubuh Manusia

Masuknya Pb ke tubuh manusia dapat melalui beberapa jalur sebagai berikut : (Wedeen *et al.*, 2007)

1. Melalui Udara

Timbal yang ada di udara akan masuk ke dalam tubuh melalui pernafasan dan penetrasi (perembesan) pada selaput kulit. Paparan timbal dapat terjadi pada manusia, hewan dan tanaman. Jika tanaman tercemar oleh timbal kemudian dikonsumsi oleh binatang, maka binatang juga ikut tercemar oleh timbal. Bila tanaman dan hewan telah terpapar oleh timbal kemudian dikonsumsi oleh manusia, maka timbal akan masuk dan terakumulasi di dalam tubuh manusia (Mukono, 2004).

2. Melalui Air

Tingginya kadar timbal dalam air disebabkan oleh pemakaian wadah penampungan air serta pipa air yang berlapiskan timbal (Mukono, 2004). Kimia timbal dalam air sangat kompleks karena elemen ini dapat ditemukan dalam berbagai bentuk. Air yang terpapar timbal disebabkan karena distribusi air melalui pipa yang sebagian besar terbuat atau dilapisi oleh timbal (Kinder, 2016).

Kandungan timbal dalam air di Indonesia telah ditetapkan sebesar 0,008 ppm.

3. Melalui Tanah

Permukaan tanah dapat mengandung timbal yang berasal dari alam maupun akibat aktifitas manusia. Kandungan timbal pada tanah basa lebih banyak dari tanah asam. Penelitian yang dilakukan oleh Charlena (2004) menemukan bahwa pupuk fosfat yang digunakan oleh petani di Indonesia mengandung timbal 5 –156 ppm.

2.1.5 Toksikokinetik Timbal

1. Absorpsi

Absorpsi timbal melalui dapat melalui pernafasan (inhalasi) serta melalui saluran pencernaan karena tertelan saat merokok, melalui makanan atau minuman, atau bahkan melalui tangan yang terkontaminasi timbal, begitupula apabila memakan makanan yang terkontaminasi dengan debu dijalanan (Juberg, 2000). Timbal yang berasal dari minuman lebih besar terserap daripada yang berasal dari makanan padat (Wedeen *et al.*, 2007). Pada orang dewasa timbal yang tertelan di absorpsi melalui mukosa saluran pencernaan sekitar 5-10 % sedangkan anak-anak dapat menyerap jauh lebih besar yaitu 30-40 % (Juberg, 2000).

Absorpsi melalui saluran cerna dipengaruhi oleh banyak faktor seperti usia, daya larut, bentuk, ukuran partikel, kehamilan, dosis, status gizi akibat rendahnya kalsium, zat besi dan protein dapat meningkatkan absorpsi timbal (Wedeen *et al.*,

2007). Kemampuan absorpsi larutan timbal peroral pada saluran pencernaan, tergantung pada jenis senyawa timbal itu sendiri (Mushak, 1991).

2. Distribusi

a. Distribusi dalam Darah

Timbal dalam darah dengan cepat diikat oleh sel darah merah. Mekanisme yang melibatkan membran sel belum sepenuhnya dijelaskan, namun hasil penelitian dalam sel darah merah menunjukkan bahwa ada dua jalur untuk transfer timbal melintasi membran sel darah merah. Jalur utama yang diajukan adalah penukar anion yang tergantung pada HCO_3^- dan diblokir oleh inhibitor pertukaran anion (Bannon *et al.*, 2003). Jalur kedua, yang tidak menunjukkan ketergantungan HCO_3^- dan tidak sensitive terhadap inhibitor pertukaran anion (Simons, 1986). Timbal dan kalsium juga dapat berbagi jalur permeabilitas, yang mungkin menjadi Ca^{2+} channel. Timbal diekstrusi dari erosit dengan jalur transportasi aktif, kemungkinan besar (Ca^{2+} , Mg^{2+})-ATPase. Di dalam darah, timbal sekitar 99 % ditemukan dalam erosit (Papanikolaou *et al.*, 2005).

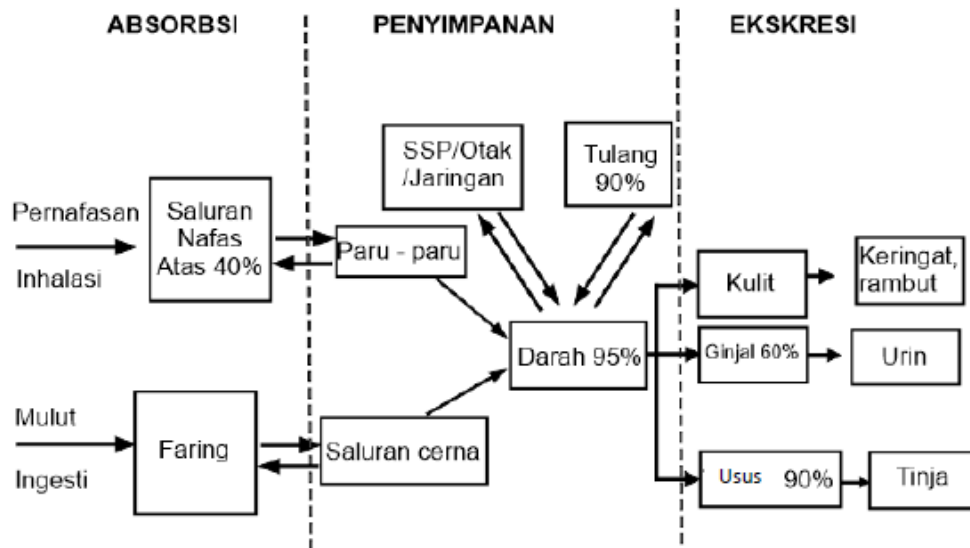
b. Distribusi dalam Plasma

Timbal mengikat beberapa konstituen dalam plasma yaitu timbal terikat dengan albumin serum atau protein lain dengan afinitas yang relatif lebih rendah, berikatan pada ligan dengan berat molekul rendah seperti asam amino dan asam karboksilat, dan erat terikat dengan metalloprotein yang beredar sebagai Pb^{2+} bebas. Timbal bebas yang terionisasi dalam plasma merupakan sebesar 1 % dari total timbal dalam plasma (Papanikolaou *et al.*, 2005).

c. Distribusi dalam Jaringan Lunak

Mekanisme timbal memasuki jaringan lunak belum sepenuhnya dijelaskan (Bressier *et al.*, 2005). Studi yang dilakukan dari usus kecil mamalia

menunjukkan bahwa timbal dapat berinteraksi dengan mekanisme transportasi untuk kalsium dan zat besi. Timbal bisa masuk sel melalui terbukanya kanal Ca^{2+} . Distribusi timbal dalam jaringan lunak, pada laki-laki dan perempuan, dinyatakan dalam konsentrasi yaitu hati 1,0 (sekitar 1 mg/g berat basah); korteks ginjal 0,8; medulla ginjal 0,5; pancreas 0,4; ovarium 0,4; limpa 0,3; prostat 0,2; kelenjar adrenal 0,2; otak 0,1; lemak 0,1; testis 0,08; jantung 0,07; dan otot rangka 0,05 (ATSDR, 2007). Distribusi timbal darah ke jaringan lunak membutuhkan waktu 4 – 6 minggu (Papanikolaou *et al.*, 2005).



Gambar 2.1 Toksikokinetik Timbal dalam Tubuh Manusia.

Keterangan Timbal dalam makanan, air, debu, tanah akan masuk ke dalam tubuh melalui saluran cerna menuju sistem peredaran darah. Selanjutnya terdistribusi ke berbagai organ seperti: tulang, eritrosit, ginjal, jaringan lunak, dan hati. Ekskresinya dalam bentuk urin, feces dan sebagian kecil melalui kulit, rambut dan kuku (Palar, 2005).

3. Metabolisme

Metabolisme timbal anorganik terdiri dari pembentukan kompleks berbagai protein dan ligan non-protein, sedangkan senyawa timbal organik secara aktif dimetabolisme oleh enzim P-450 di hati (Wedeen *et al.*, 2007).

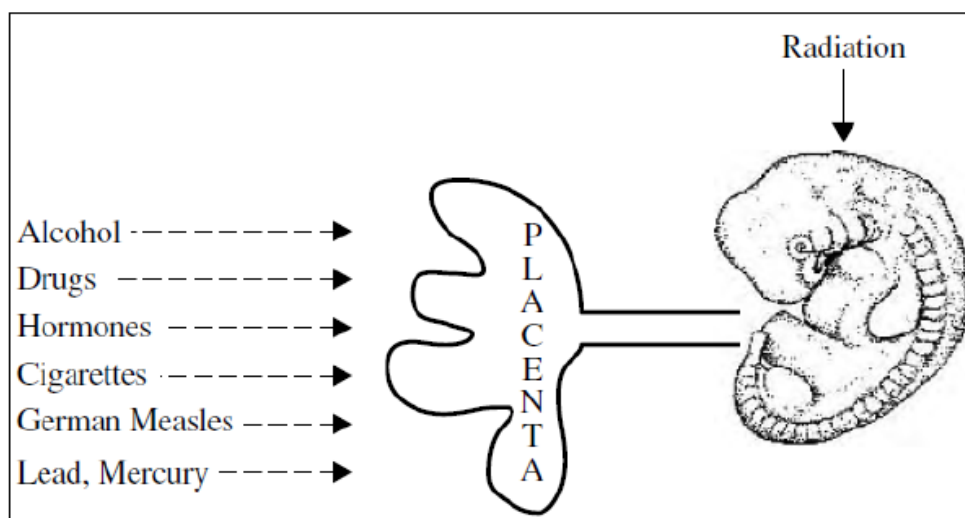
4. Ekskresi

Tubuh telah mengatur suatu keseimbangan antara absorpsi dan ekskresi, dimana jumlah timbal yang diekskresi dalam urin, feses, keringat, air liur, rambut, dan kuku. Proses pembersihan timbal oleh ginjal pada dasarnya adalah filtrasi glomerulus. Waktu paruh timbal dalam darah kurang lebih 30 hari sedangkan pada tulang lebih dari 20 tahun (Juberg, 2000; Wedeen *et al.*, 2007). Pada umumnya ekskresi timbal berjalan lambat, sehingga hal ini yang dapat menyebabkan timbal mudah terakumulasi dalam tubuh. (Nakade *et al.*, 2015) akumulasi maksimal timbal berada pada dosis 100 ppm, akan mempengaruhi sistem reproduksi wanita.

2.1.6 Toksisitas Timbal Pada Perkembangan Otak Embrio

Paparan timbal pada ibu hamil akan berpengaruh pada embrio atau janin yang sedang dikandungnya (Branch, 2004) mengatakan bahwa *developmental toxicity* yang disebabkan karena timbal menyebabkan perubahan morfologi dan fungsional sehingga mengganggu pertumbuhan normal, homeostasis, perkembangan, diferensiasi dan perilaku.

Sistem saraf terdiri atas otak, saraf tulang belakang, dan saraf *perifer* yang terbuat dari sel-sel saraf, disebut dengan *neuron*, dan sel-sel pendukung yang disebut dengan sel-sel *glial* (*British Neuroscience Association*, 2003). Sejak embrio, sejumlah instruksi genetik dapat membentuk beragam sel dan menghubungkannya dengan otak selama tahap pengembangan (*British Neuroscience Association*, 2003). Perkembangan otak sejak dini sangat penting untuk kesehatan anak pasca kelahiran (gambar 2.2).



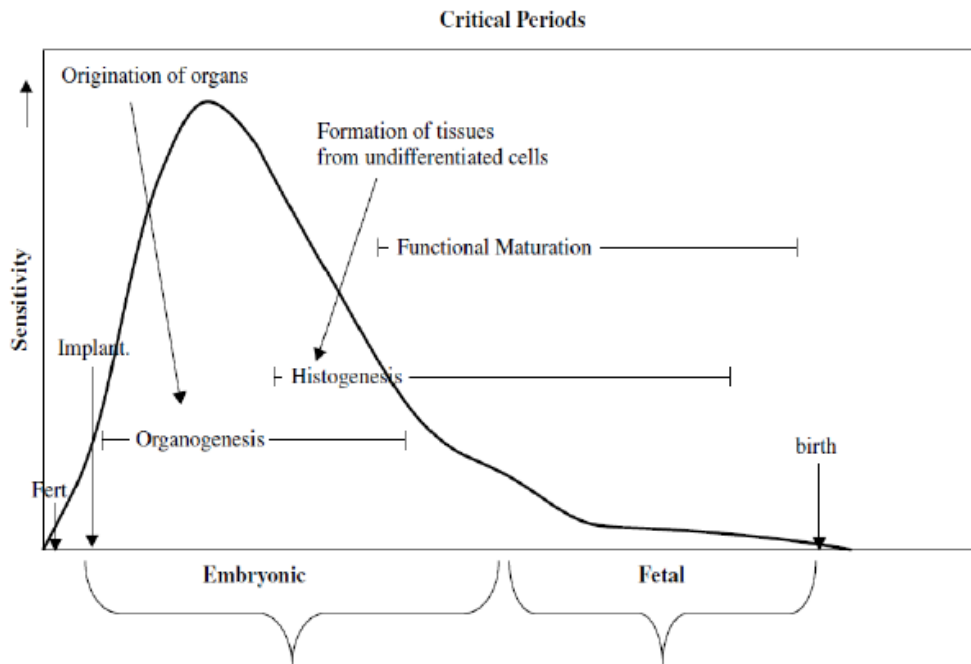
Gambar 2.2 Plasenta dan kerawanan terhadap Teratogen (Branch, 2004).

Keterangan Bahan-bahan berbahaya masuk kedalam tubuh ibu melalui aliran dan menembus plasenta sehingga menyebabkan cacat morfologi selama periode embryogenesis.

Blake (2004) menyebutkan bahwa *neurotoxicity* mengacu kepada kemampuan agen untuk mengganggu integritas struktural atau fungsional dari sistem saraf. Kerusakan struktural komponen dalam sistem saraf menyebabkan perubahan fungsi. Perubahan fungsi sistem saraf dapat terjadi melalui interaksi bahan beracun dengan mekanisme sinyal dari *neurotransmission* sehingga berpengaruh terhadap kerusakan struktural sistem saraf itu sendiri. Untuk memahami paparan timbal pada otak embrio dan janin, maka diperlukan studi penyebab pengembangan abnormal (studi cacat kelahiran) (Gambar 2.3).

Tahapan kehamilan merupakan periode kritis bagi embryogenesis. Embryogenesis merupakan proses yang kompleks dan melibatkan migrasi sel, pertumbuhan, diferensiasi dan organogenesis. Tahapan perkembangan tersebut dibagi menjadi 3 kategori yaitu pra-implantasi, implantasi sampai organogenesis dan janin sampai tahap kelahiran. Akibat utama yang terjadi pada saat paparan adalah sebagai berikut : (1) paparan saat pra-implantasi akan menyebabkan kematian embrio, (2) paparan saat implantasi sampai organogenesis dapat

menyebabkan cacat morfologi dan (3) paparan saat janin sampai tahap kelahiran dapat menyebabkan gangguan fungsional, keterlambatan pertumbuhan dan *carcinogenesis* (Branch, 2004) (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Periode Embrio dan Janin Yang Mendapat Teratogen Selama Embryogenesis (Branch, 2004).

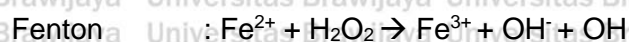
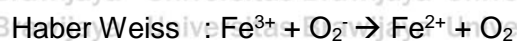
Sensitivitas embrio terhadap cacat morfologi akan meningkat selama periode organogenesis. Periode ini merupakan waktu yang penting dalam pengembangan organ. Secara konseptual, timbal yang tersimpan dalam tulang ibu sejak lama akan terlepas dan masuk dalam sirkulasi metabolisme pada saat kehamilan. Timbal masuk ke sirkulasi janin melalui sirkulasi darah ibu sehingga konsentrasi timbal pada darah bayi sangat identik dengan konsentrasi timbal pada darah ibu (WHO, 2010). Salah satu mekanisme *neurotoxicity* timbal adalah kemampuan timbal untuk mengganti kation polivalen lain khususnya kation divalent seperti kalsium (Ca^{2+}) dan seng (Zn^{2+}) dalam molekul hidup (WHO, 2010). Timbal memiliki afinitas lebih besar dari ion kalsium dan seng pada

protein. Interaksi ini memberikan pengaruh yang berbeda dalam setiap proses termasuk transportasi logam, metabolisme energy, *apoptosis*, konduksi ion, adhesi sel, gangguan pada intrasel dan intersel, berbagai proses enzim, pematangan protein dan regulasi genetis. Membran saluran ion dan molekul sinyal merupakan salah satu target molekul dalam *neurotoxicity* timbal, sehingga perkembangan sistem saraf pusat dapat terganggu (WHO, 2010).

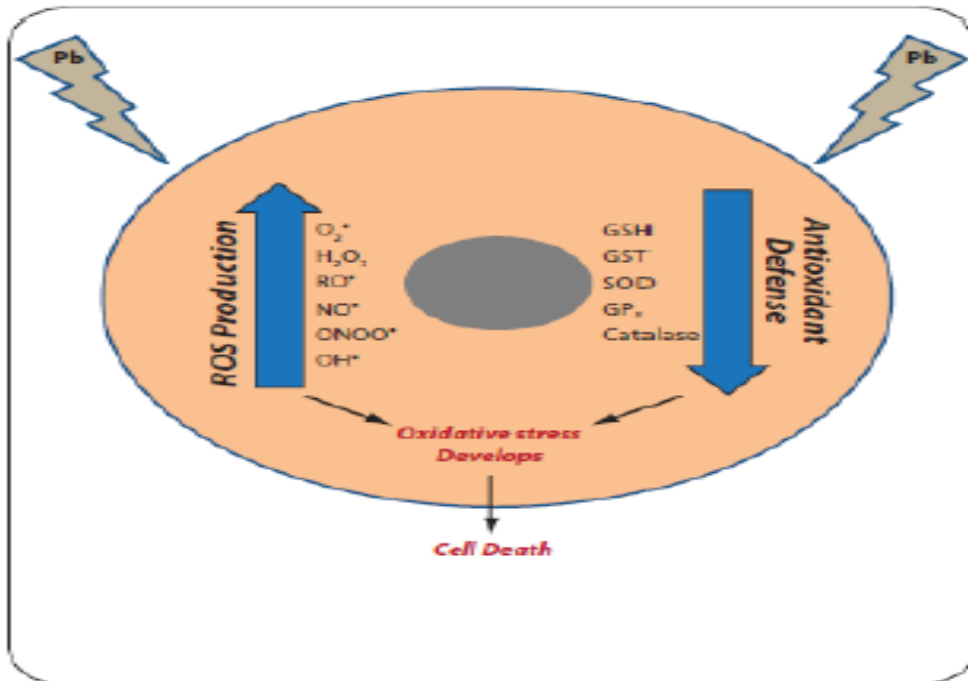
2.1.7 Toksikodinamik Timbal

1. Pengaruh timbal terhadap Stres Oksidatif

Stres oksidatif merupakan ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dan sistem biologis yang mempunyai kemampuan memperbaiki kerusakan yang dihasilkan (Flora *et al.*, 2012). Paparan timbal menyebabkan timbulnya stres oksidatif terjadi pada dua jalur yaitu pembentukan ROS serta penekanan langsung cadangan antioksidan sehingga menyebabkan antioksidan mengalami penurunan (Flora *et al.*, 2012). *Reactive Oxygen Species* merupakan senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif serta terdiri atas kelompok radikal bebas dan kelompok non radikal. Kelompok radikal bebas antara lain *superoxide anion* (O_2^-), *hydroxyl radicals* (OH^\cdot), dan *peroxyl radicals* (RO_2^\cdot). Kelompok nonradikal terdiri *hydrogen peroxide* (H_2O_2) dan *organic peroxides* (ROOH) (Halliwell & Whiteman, 2004). *Superoxide anion* memiliki reaktifitas selektif dan dibentuk oleh sejumlah sistem enzim melalui reaksi autoksidasi. Anion superoksida dibentuk dengan penambahan 1 elektron pada molekul oksigen. Superoksida dirubah menjadi hydrogen peroksida oleh enzim superoksida dismutase. Hydrogen peroksida dapat dirubah menjadi radikal hidroksil melalui reaksi fenton dan haber-Weiss dengan adanya logam Fe^{2+} atau Cu^{2+} melalui reaksi :



Anion superoksida dapat bereaksi dengan H_2O_2 dan menghasilkan $OH\cdot$ Radikal hidroksil merupakan ROS yang paling reaktif dan dapat merusak protein, lipid, karbohidrat dan DNA (Birben *et al.*, 2012).



Gambar 2.4 Mekanisme Stres Oksidatif pada Sel Karena Timbal

Keterangan Stres oksidatif merupakan ketidakseimbangan antara produksi ROS ($O_2\cdot^-$, H_2O_2 , $RO\cdot$, $NO\cdot$, $ONOO\cdot$, $OH\cdot$) dan sistem biologis yang mempunyai kemampuan memperbaiki kerusakan yang dihasilkan (GSH, GST, SOD, GOx, Catalase) (Flora *et al.*, 2012).

Pertahanan oksidan tubuh ikut berperan dalam mencegah ROS. Antioksidan yang paling penting ditemukan dalam sel adalah *glutathione*. Paparan timbal menyebabkan *glutathione* (GSH) berkurang dan teroksidasi dalam bentuk *glutathione* disulfide (GSSG) melalui enzim *glutathione* peroksidase (GPX). GSH dapat diregenerasi dari GSSG oleh reduktase enzim *glutathione* (GR).

Timbal menginaktivasi *glutathione* dengan mengikat sulfhidril. Hal ini menyebabkan sintesis GSH dari sistein melalui siklus glutamil, yang tidak efektif dalam pengisian GSH (Hultberg & Hultberg, 2004). Demikian pula timbal menginaktivasi enzim seperti δ -amino levulinic asam dehidratase (ALAD),

glutathione reduktase (GR), *glutathione* peroxidase (GPX) dan *glutathione*-S-transferase, yang menekan *glutathione* (Ahamed & Siddiqui, 2007).

Beberapa enzim antioksidan penting lainnya yang menjadi tidak aktif karena timbal yaitu superoksida dismutase (SOD) dan katalase (CAT). Penurunan konsentrasi SOD akan mengurangi pembersihan superoksida radikal, sedangkan pengurangan CAT akan meningkatkan superoksida radikal. Timbal juga menggantikan ion seng yang berfungsi sebagai kofaktor enzim antioksidan dan menginaktivasi enzim tersebut (Flora *et al.*, 2012). Biomarker lain dari stres oksidatif adalah peroksidasi lipid. Radikal bebas menangkap elektron dari lipid yang ada di dalam membran sel. Timbal juga menyebabkan RBC (*Red Blood Cell*) hemolysis, dimana hal ini terjadi karena penghambatan ALAD. ROS yang disebabkan oleh timbal mengakibatkan terganggunya keseimbangan antioksidan dan pro oksidan pada jaringan. Hal ini dapat berkontribusi pada cedera jaringan melalui kerusakan oksidatif.

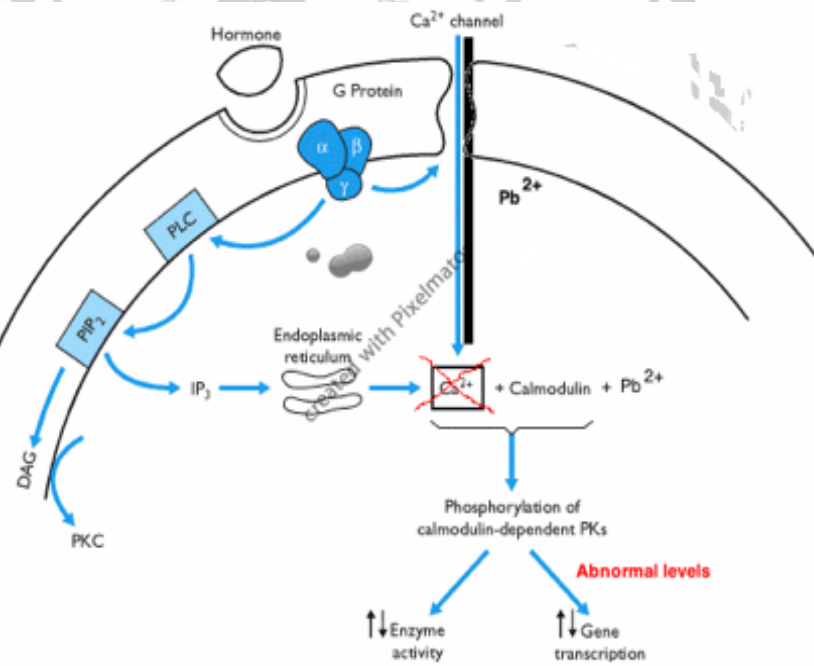
2. Timbal Mengubah *Second Messenger* Sistem

Kalsium merupakan *second messenger* yang paling banyak terdapat di dalam sel. Salah satu fungsinya adalah mengaktivasi membran sel protein. Konsentrasi Ca^{2+} intraseluler dapat meningkat melalui 2 cara yaitu pembukaan kanal Ca^{2+} pada membran sel atau pengeluaran cadangan Ca^{2+} pada retikulum endoplasma. Kedua cara tersebut distimulasi oleh G-protein. G-protein pada membran sel akan merangsang pembukaan kanal Ca^{2+} . Kemudian Ca^{2+} ekstraseluler akan masuk kedalam sel dan berikatan dengan calmodulin (CaM).

Timbal masuk ke dalam sel menggantikan kalsium dan mengubah fungsi sel.

Timbal memiliki afinitas yang tinggi daripada Ca^{2+} untuk berikatan dengan kalmodulin yang merupakan protein pembawa ion Ca^{2+} didalam tubuh (Kimberger *et al.*, 2013). Hal ini mengakibatkan Ca^{2+} digantikan oleh timbal dan merubah fungsi sel sehingga Ca^{2+} tidak dapat didistribusikan secara normal, akibatnya

terjadi peningkatan Ca^{2+} intraseluler (Flora *et al.*, 2012). Konsentrasi Ca^{2+} intraseluler yang tinggi menyebabkan terbukanya kanal Ca^{2+} pada membran sel atau pemasukan Ca^{2+} dari retikulum endoplasma. Selanjutnya Ca^{2+} ekstraseluler akan masuk ke dalam sel dan bersama calmodulin akan menyebabkan terjadinya fosforilasi dependen protein kinase sehingga berbagai proses mengalami perubahan seperti aktivasi enzim, stimulasi atau hambatan jalur metabolik, dan pengeluaran sekresi hormon tertentu. Hal ini akan merangsang terjadinya apoptosis, inflamasi, kontraksi otot, pergerakan intraseluler dan respon imun (Brochin *et al.*, 2008). Pada mitokondria terjadi peningkatan Ca^{2+} intraseluler sehingga akan mengubah permeabilitas membran yang dapat merangsang depolarisasi mitokondria sehingga pori-pori mitokondria terbuka (He *et al.*, 2000)



Gambar 2.5 Mekanisme Masuknya Timbal ke Dalam Sel

Keterangan Pb masuk ke dalam sel dengan membuka kanal Ca^{2+} (yang distimuli oleh G-Protein) sehingga mengikat Calmodulin lebih cepat daripada kalsium. Ini menyebabkan terjadinya fosforilasi dependen protein kinase sehingga terjadi aktivitas enzim dan transkripsi gen yang abnormal (Brochin *et al.*, 2008)

2.2 Tirosin Hidroksilase

2.2.1 Pengertian

Tirosin hidroksilase adalah anggota keluarga enzim yang mengandung hidroksilase asam amino aromatic, fenilalanin hidroksilase dan triptofan hidroksilase. Enzim tirosin hidroksilase merupakan pembatas laju sintesis katekolamin yang berfungsi untuk mengkatalisis hidroksilasi tirosin menjadi L-DOPA. Katekolamin dopamin, epinefrin dan norepinefrin merupakan produk dari katalisis tersebut. Katekolamin monoamina memiliki peran penting dalam fungsi otak seperti perhatian (Matthews *et al.*, 2010), memori (Arnstein, 1997), kognisi (Assadi *et al.*, 2009) dan emosi (David, 2006).

2.2.2 Sintesis Tirosin Hidroksilase

Enzim tirosin hidroksilase dapat dihambat dengan umpan balik dari neurotransmitter katekolamin. Aktivitas tirosin hidroksilase dimodulasi oleh interaksi protein dengan enzim di jalur yang sama atau jalur tetrahidrobiopterin. Ketika kebutuhan untuk neurotransmitter meningkat pada sinaps katekolaminergik, tirosin hidroksilase diaktifkan untuk membuat lebih banyak DOPA, kemudian di karboksilasi ke dopamin dan ditransfer ke vesikel sinaptik oleh transport monoamina vesikuler (VMAT). Sintesis katekolamin kemudian dilanjutkan di dalam vesikel melalui dopamine- β -hydroxylase dan phenylethanolamine-N-methyltransferase. Masuknya kalsium menyebabkan pengosongan vesikula ke celah sinaptik. Aktivitas tirosin hidroksilase harus dipertahankan sesuai dengan kebutuhan (Daubner *et al.*, 2011)

2.2.3 Penghambatan Fosforilasi dan Umpan Balik oleh Katekolamin

Tirosin hidroksilase memiliki empat residu serin yang terfosforilasi oleh protein kinase pada *in vivo* dan *in vitro*. Tirosin hidroksilase diaktifkan setelah difosforilasi oleh salah satu dari tiga residu serin dalam domain pengaturannya. Ser40 difosforilasi oleh PKA yang menghasilkan penurunan afinitas untuk

katekolamin. Ser31 terfosforilasi oleh beberapa kinase sehingga mengakibatkan penurunan K_M untuk *tetrahydrobiopterin*. Ser19 difosforilasi oleh enzim yang hanya memodifikasi Ser19 dan tidak menghasilkan aktivasi tanpa adanya faktor lain. Fosforilasi Ser19 oleh CaMKII akan mempercepat fosforilasi Ser40 oleh kinase yang sama (Daubner *et al.*, 2011).

2.2.4 Pengikatan Katekolamin

Dopamin, norepinefrin dan epinefrin merupakan inhibitor umpan balik dari tirosin hidroksilase. Afinitas dopamine akan berkurang ketika enzim tirosin hidroksilase terfosforilasi. Fosforilasi tirosin hidroksilase pada Ser40 menghasilkan afinitas yang lebih rendah untuk katekolamin. Dopamin berikatan dengan tirosin hidroksilase di situs aktif tetrahydrobiopterin. Pengikatan dopamin ke tirosin hidroksilase menghasilkan perubahan konformasi untuk domain R yang menghalangi masuknya substrat. Arg37 dan Arg38 digunakan untuk penghambatan oleh dopamin. Penghambatan oleh katekol tergantung pada adanya gugus amino (Daubner *et al.*, 2011).

2.2.5 Pembentukan Terhadap Kompleks α -Synuclein dan Protein Lain

Tirosin hidroksilase membentuk kompleks dengan α -syn dan menghasilkan aktivasi tirosin hidroksilase lanjutan. Pengikatan tirosin hidroksilase dan α -syn dapat berperan dalam lokalisasi seluler kompleks yang terkait dengan produksi dopamin dan stres oksidatif dalam neuron. Produksi dopamin juga melibatkan protein kompleks, yang berfungsi untuk menstabilkan tetrahydrobiopterin, dopamin, protein terfosforilasi atau untuk melokalisasi protein yang terdapat di vesikel sekretori (Daubner *et al.*, 2011).

2.3 Dopamin

2.3.1 Metabolisme Dopamin

Dopamin merupakan ketokolamin neurotransmitter yang ada pada hewan baik itu vertebrata maupun invertebrata. Dopamin diproduksi di beberapa area otak termasuk substansia nigra dan daerah tegmental ventral. Dopamin juga merupakan neurohormon yang dikeluarkan oleh hipotalamus (Park *et al.*, 2007).

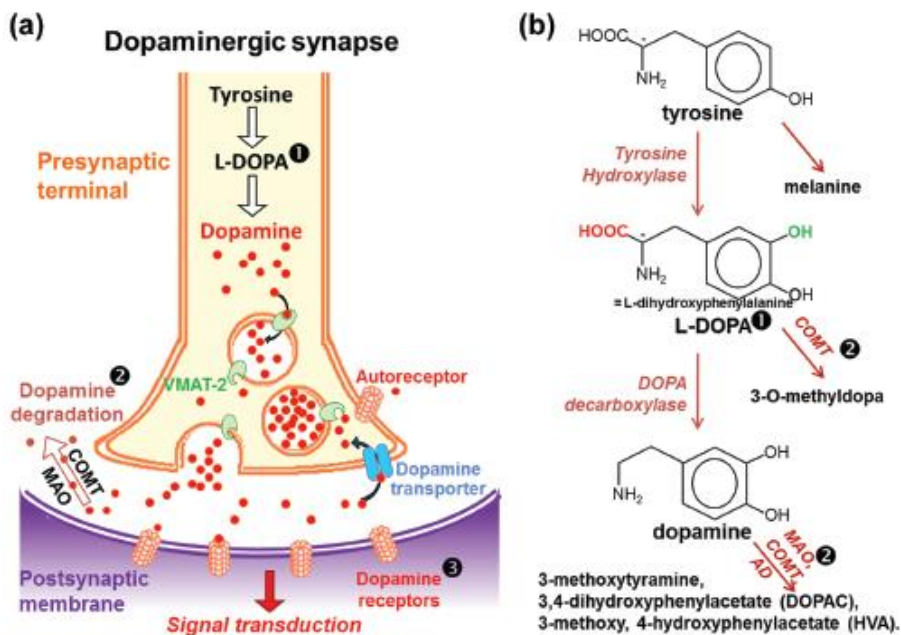
Jumlah total neuron dopaminergik di otak manusia diperkirakan antara 300.000 sampai 400.000. Neuron substansia nigra dan daerah segmental pusat akan menuju mesolimbic wilayah mesocortical dan daerah striatum (Pezze & Feldon, 2004).

Banyak penelitian tentang neurotransmitter termasuk penemuan peran dopamin pada penyakit Parkinson yang mendorong penemuan levodopa. Levodopa merupakan prekursor dopamin metabolisme untuk menyembuhkan penyakit Parkinson. Meskipun jumlah neuron dopamin sedikit berkurang tetapi tetap memiliki peran yang sangat penting dalam sistem saraf pusat. Beberapa peran penting dopamin adalah mengatur fungsi motorik dalam mengatur status emosional dan pengaturan hipotalamus hipofisis axis. Dopamin juga berperan penting terhadap perilaku proses belajar. Berbagai obat untuk mengatasi gangguan kejiwaan seperti psikosis, gangguan kognitif, dan hilang kesadaran melalui jalur dopamin ini. Beberapa kondisi penyakit seperti Parkinson, gangguan perilaku hiperaktif, skizofrenia dan kecanduan obat, yang semuanya memiliki mekanisme dasar proses neuronal yang berhubungan dengan dopamin (Jones *et al.*, 2010).

2.3.2 Sintesis Dopamin

Dopamin disintesis dari tirosin di terminal presinaptik kemudian dilepaskan ke celah sinaptik. Langkah pertama adalah sintesis dari proses dopamin serapan asam amino L-tirosin dari aliran darah. Tirosin diubah menjadi

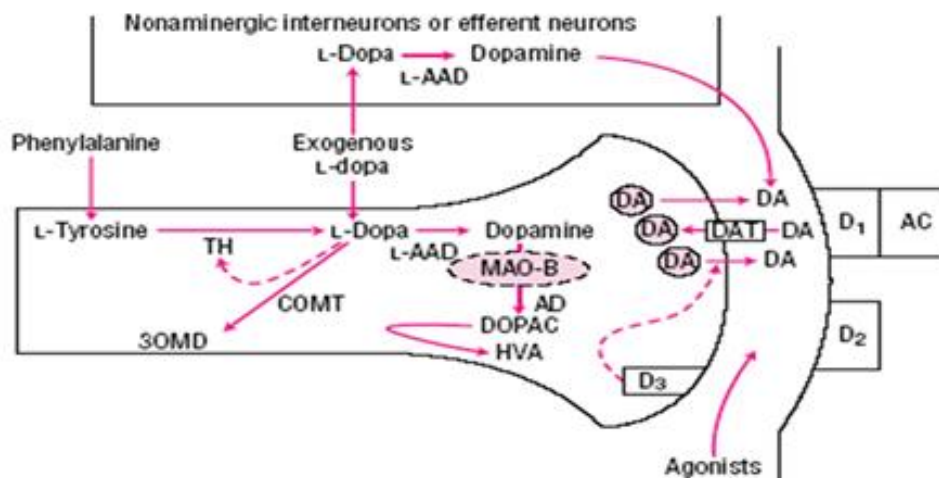
3-4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) oleh enzim tirosin hidroksilase (TH), kemudian L-DOPA diubah menjadi dopamin oleh enzim asam amino aromatik dekarboksilase (AAD) yang juga dikenal sebagai dopa-dekarboksilase. Dopamin disimpan dalam granul di akhir saraf presinaptik, dan akan dilepas ketika ada rangsangan. Pengaktifan lima jenis reseptor dopamin D1, D2, D3, D4, dan D5 dilakukan setelah ada aktivasi dari enzim terkait (Jones *et al.*, 2010).



Gambar 2.6 Sintesis Dopamin Dalam Neuron Dopaminergic Neuron (Jones *et al.*, 2010)

L-DOPA terbentuk ketika neuron presinaptik merubah senyawa fenilalanin yang masuk ke dalam ujung saraf pada L-Tirosin dan dikatalisi oleh Tirosin Hidroksilase. Berdasarkan gambar tersebut apabila terdapat kekurangan produksi dopamin, L-DOPA dapat diperoleh dari luar (secara eksogen menggunakan obat) untuk segera diubah menjadi dopamin dengan bantuan AAD. Sebagai salah satu neurotransmitter, dopamin dilepaskan dari ujung saraf dan akan berinteraksi dengan reseptor dopamin (D1, D2 dan D3). Dopamin yang dilepaskan dari ujung saraf dapat di *re-uptake* melalui dopamin reseptor (DAT).

Dopamin kemudian juga di metabolisme melalui MAO (*monoamine oksidase*) dengan *aldehida dehydrogenase* menjadi DOPAC (asam 3,4-dihidroksifenilasetat). DOPAC kemudian diubah lebih lanjut ke HVA (asam homovanilic). Bentuk L-DOPA dapat dimetabolisme dalam metabolis jalur COMT (*katekol-O-metil transferase*) melalui 3OMD (3-O-Metildopa) (Fabbrini *et al.*, 2007)



Gambar 2.7 Jalur Sintesis L-DOPA (Fabbrini *et al.*, 2007)

Ada empat jalur utama dopamin (Fabbrini *et al.*, 2007)

1. Jalur mesolimbik, jalur dopamin dari sel tubuh tegmental ventral dari batang otak akson daerah limbik terminal seperti *nucleus accumbens*. Jalur ini diasumsikan memberikan kontribusi yang signifikan untuk perilaku emosional, terutama halusinasi pendengaran dan delusi. Hiperaktivitas pada jalur ini memiliki peran penting terhadap timbulnya gejala positif psikosis.
2. Jalur dopamin mesokortikal, dari sel tubuh ke daerah tegmental ventral dari batang otak (yang berdekatan dengan sel tubuh mesolimbik) ke daerah korteks serebral. Gangguan jalur ini diasumsikan memberikan

kontribusi terhadap timbulnya gangguan kognitif dan gejala negatif dari gangguan psikosis onset.

3. Jalur nigrostriatal, jalur dopamin dari badan sel batang otak substantia nigra yang mengarah pada ganglia basalis atau striatum. Jalur ini merupakan bagian dari ekstrapiramidal yang mengontrol gerakan motorik. Hal ini menyebabkan gangguan gerakan seperti penyakit Parkinson.

4. Jalur tuberoinfundibular, menghubungkan inti neuron arkuatus prefrontal ke hipotalamus dan hipofisis posterior. Dopamin dilepaskan oleh neuron dan secara fisiologis menghambat sekresi prolaktin.

Dopamin yang dilepaskan tabung sinaps dapat mengalami keadaan-keadaan berikut (Schultz, 2007):

1. Kerusakan oleh enzim COMT/katekol-O-metil-transferase atau enzim MAO/monoamine oksidase
2. Difusi celah sinaptik
3. Terganggu pelepasan ion kalsium
4. Aktivasi reseptor Pre-sinaptik
5. Aktivasi reseptor Post-sinaptik
6. *Reuptake* ke terminal pra-sinapsis

2.3.3 Fungsi dan Peran Dopamin

Di otak (sistem saraf pusat), dopamin memiliki peran dalam mengatur gerakan, belajar, memori, emosi, kesenangan, tidur dan kognisi. Dopamin juga berperan dalam ginjal, pankreas, paru-paru dan pembuluh darah. Di ginjal, diketahui bahwa dopamin mengatur pengeluaran garam dan keseimbangan elektrolit. Sementara di paru-paru, dopamin menyebabkan penyerapan garam dan cairan. Fungsi dopamin di jantung dan pembuluh darah adalah membuat pembuluh darah berkontraksi sehingga meningkatkan tekanan darah dan denyut jantung. Dopamin juga menghambat pengeluaran asam lambung serta

meningkatkan insulin dan glucagon dalam darah. Insulin dan glucagon adalah hormon yang berfungsi untuk mengatur kadar gula darah (Jones *et al.*, 2010).

Dopamin dihasilkan sebanyak 0,3 % dari jutaan otak neuron. Meski demikian katekolamin jenis ini bertanggung jawab untuk beberapa fungsi tubuh yang vital, seperti berikut (Fabbrini *et al.*, 2007):

1. Ritme circadian, dopamin mengikat reseptor untuk memberi sinyal tubuh agar bangun dengan menekan melatonin
2. Memori, neurotransmitter yang muncul untuk mengontrol apa yang disimpan dalam memori berdasarkan respon informasi.
3. Fungsi motor, dopamin juga mengatur kontrol fungsi motorik melalui ganglia basal. Kurangnya dopamin di otak menyebabkan tidak terkoordinasikannya fungsi motorik. Di sisi lain, kelebihan dopamin di otak dapat menyebabkan tubuh melakukan gerakan-gerakan yang tidak perlu seperti gerakan berulang.
4. Sekresi prolaktin, dopamin diproduksi oleh neuron dalam nucleus arkuata hipotalamus dikeluarkan ke dalam pembuluh darah hipotalamus-*hypophyseal* dari eminensia median, yang memasok kelenjar pituitary yang menghasilkan prolaktin.

2.3.4 Dopaminergik dan Sistem Motorik

Salah satu peran utama neurotransmitter adalah mempengaruhi proses otak yang mengontrol gerakan, respon emosional dan kemampuan untuk merasakan kenikmatan dan rasa sakit. Dopamin memiliki fungsi yang penting untuk mengontrol pergerakan dan keseimbangan. Jika kekurangan dopamin akan menyebabkan berkurangnya kontrol pergerakan seperti dalam kasus penyakit Parkinson. Jika terdapat gangguan pada dopamin maka akan menyebabkan seseorang akan kehilangan kemampuan untuk berfikir rasional, yang ditunjukkan dengan skizofrenia. Kurangnya dopamin di mesocortical daerah

tegmental ventral ke neurokorteks, terutama di daerah prefrontal, mengurangi beberapa kesenangan (Fabbrini *et al.*, 2007).

Fungsi dopamin sebagai neurotransmitter disekresi oleh neuron dari substantia nigra striatal dan berakhir di ganglia basal. Ganglia basal terdiri dari putamen dan berekor inti, secara kolektif disebut striatum pada hewan pengerat.

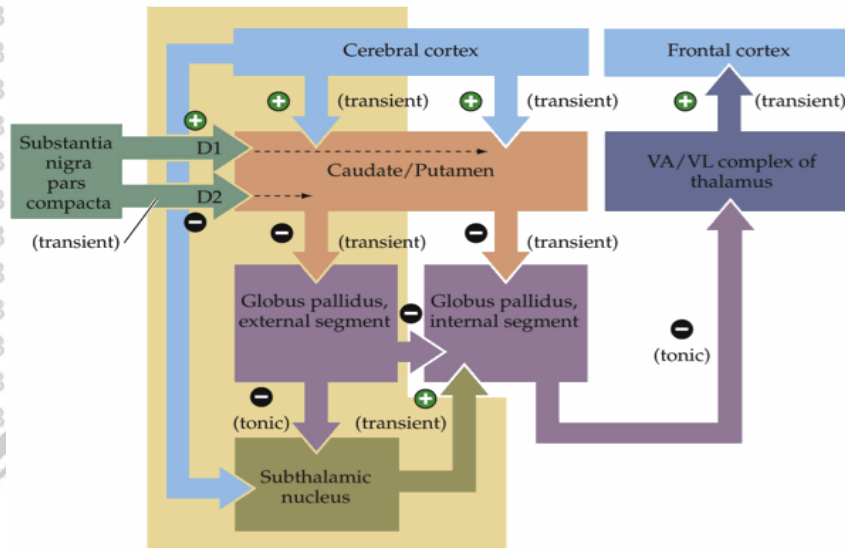
Striatum terdiri dari DA-D₁ dan DA-D₂R mengandung *medium spiny neurons* (MSNs) dari jalur proyeksi langsung dan tidak langsung, secara berurutan.

Koneksi sinaptik antara DA-D₁R dan DA-D₂R mengandung MSNs dan neuron glutamatergik kortikal, membuat sirkuit ini kortikal-striatal (Mignon dan Wolf, 2002). Dalam otak yang sehat, sirkuit ini bertanggung jawab untuk proses kognitif dan keadaan sadar (Ishibashi *et al.*, 2010).

Gerakan sadar difasilitasi dan dilaksanakan terutama melalui korteks motor melalui rangkaian dari ganglia basal. Stimulasi diterapkan pada korteks motorik di ganglia basal selama gerakan sadar. Stimulasi digunakan untuk menginduksi respon trifasik terdiri dari eksitasi awal, penghambatan, dan akhir eksitasi dalam neuron dari inti entopeduncular (EPN). Dopamin mengikat reseptor dopamin kemudian diekspresikan dalam neuron dari striatum dan mengontrol arus informasi melalui tiga jalur di ganglia basal (Tomiya *et al.*, 2005).

Dopamin (DA) memegang peran penting dalam modulasi motorik dan sirkuit kognitif. Adanya deplesi atas kekurangan DA di dorsal lateral striatum menyebabkan gangguan di sirkuit talamik kortikal-striatal yang berperan sebagai pengaturan gerakan tidak sadar sehingga mengakibatkan ketergantungan yang lebih besar pada frontal-striatal dimana sirkuit ini berperan dalam gerakan motorik sadar. Meskipun hanya terjadi sedikit penurunan kehilangan DA di sirkuit frontal-striatal namun tetap dapat berkontribusi untuk menyebabkan gangguan kognitif pada penyakit Parkinson. Pada penelitian yang menggunakan hewan

coba dengan *exercise-induced* mengungkapkan bukti neuroplastisitas motorik dan sirkuit berkaitan dengan kognitif pada penyakit Parkinson (Tomiyama *et al.*, 2005).



Gambar 2.8 Perintah Motor Dari Substantia Nigra Pars Compacta Untuk Mengontrol Gerakan (Purves *et al.*, 2001)

2.3.5 Ekspresi Tirosin Hidroksilase dalam Otak Zebrafish Selama Masa Perkembangan

Ekspresi mRNA tirosin hidroksilase (TH) sebelumnya telah dilaporkan selama 20-somite stage pada embrio Zebrafish oleh (Rink & Wullimann, 2002).

Penelitian lain menguji ekspresi TH dan dopamin transporter (DAT) di seluruh embryogenesis Zebrafish hingga 96 hpf. Di tahap embrionik awal, pada teleost tidak sepenuhnya dapat dibedakan ekspresi TH dan DAT, tetapi hanya terlihat pola ekspresi (McLean & Fetcho, 2004). Ekspresi tirosin hidroksilase tidak terdeteksi sebelum tahap 16-somite (18 hpf). Lokasi ekspresi tirosin hidroksilase ditunjukkan pada pemeriksaan immunohistochemistry TH. Pada umur 18-24 hpf TH belum dapat dibedakan di kepala embrio Zebrafish. Ekspresi yang muncul pada umur 24 hpf terlihat samar dan rendah. Pada umur 48 hpf, tirosin hidroksilase mulai dapat dibedakan dan membentuk pola yang cukup mudah

untuk dikenali, terutama pada bagian sela antar mata ketika embrio diposisi dorsal. Namun ketika memasuki umur 72 hpf, tirosin hidrosilase mulai menyebar ke bagian lain hingga mempersulit adanya pengukuran kuantitas, terlebih pada umur 96 hpf, dimana tirosin hidrosilase telah menyebar ke daerah mata (Joechen *et al.*, 2001).

2.4 Pegagan (*Centella asiatica*)

2.4.1 Klasifikasi Pegagan

Pegagan (*Centella asiatica*) atau Gotu Kola merupakan tanaman di daerah tropis dan subtropics yang digunakan dalam pengobatan tradisional. Pegagan tumbuh di Indonesia pada daerah tropis, di dataran rendah (ketinggian 2500 m diatas permukaan laut) serta tempat yang lembab seperti tepi parit, tegalan padang rumput dan bebatuan (BPOM RI, 2009).

Berdasarkan (Sarker *et al.*, 2011) pegagan (*Centella asiatica*) di klasifikasikan seperti terlihat pada tabel.

Tabel 2.1 Klasifikasi Pegagan

Klasifikasi	Keterangan
Kingdom	Plantal
Subkingdom	Embryophyta
Devisi	Spermatophyta
Subdevisi	Angiospermae
Kelas	Dicotyledoneae
Subkelas	Rosidae
Superorder	Aralianae
Order	Arariales (Umbelliflorae)
Family	Apiaceae or umbeliferae
Subfamily	Hydrocityle
Genus	Centella
Spesies	Centella Asiatica

(Sarker *et al.*, 2011)

2.4.2 Morfologi Pegagan

Pegagan merupakan tanaman dengan tinggi sekitar 5,39 cm – 13,3 cm dengan bentuk batang beruas dan lunak serta tumbuhan tersebut dapat menjalar hingga 1 meter. Setiap ruas tumbuh dengan daun dan panjang tangkai dapat mencapai 5 – 15 cm serta akar yang berwarna putih. Akar nya berbentuk rimpang dengan banyak stolon dan berkelompok serta dapat menutupi lahan.

Daun pegagan berwarna hijau dan bentuk daunnya bulat seperti ginjal pada manusia dengan garis tengah 1 – 7 cm dan tepi daunnya bergerigi (Sutardi, 2016)

2.4.3 Kandungan Pegagan

Pegagan mengandung berbagai bahan aktif yang meliputi : triterpenoid, saponin, triterpenoid ganin, minyak atsiri, flavonoid, fitosterol (Winarto & Surbakti, 2003). Kandungan mineral yang terdapat dalam pegagan terdiri dari magnesium, tembaga, kalsium, seng, betakaroten, kalium, natrium, fosfor, serta vitamin B1, B2, B3 dan C (Sutardi, 2016).

Tabel 2.2 Kandungan Kimia Pegagan

Triterpen	<i>Asiatikosida, madekasosida, asam asiatic, asam madekasat, asam indosentoat, bayogenin, asam 2α, 3β, 20, 23-tetrahidroksiurs-28-oat, asam euskapat, asam terminolat, asam 3β-6β-23-tri-hidroksiolean-12-en-28-oat, asam 3β-6β-23-trihidroksiurs-12-en-28-oat</i>
Saponins	<i>Sentelasapogenol A, sentelasaponin A, B dan B</i>
Poliasetilen	<i>Kadiyenol, sentelin, asiatisin dan sentelisin</i>
Flavonoid	<i>Kaempferol, kuersetin</i>

(Zheng & Qin, 2007)

Ekstrak pegagan mengandung *madekasosida* yang merupakan komponen tertinggi yaitu $3,10 \pm 4,58$ mg/mL diikuti oleh *asiaticoside* $1,97 \pm 2,65$ mg/mL. Asam Asiatic $0,55 \pm 2,29$ mg/mL dan *madecassic* dan $0,55 \pm 0,89$ mg/mL (Hashim *et al.*, 2011).

2.4.4 Manfaat Pegagan

Tanaman pegagan memiliki kandungan kimia dan nutrisi yang sangat bermanfaat bagi tubuh (Winarto & Surbakti, 2003).

Manfaat pegagan antara lain adalah sebagai berikut :

1. Anti Oksidan

Pegagan memiliki efek sebagai antioksidan. Kandungan antioksidan yang terdapat di dalam pegagan antara lain triterpen, polifenol, flavonoid, β -karoten, tannin dan vitamin C (Chandrika & Kumarab, 2015). Triterpen yang terkandung dalam pegagan merupakan antioksidan yang tinggi dan dapat menyembuhkan luka (Rahman *et al.*, 2013). Ekstrak pegagan menunjukkan aktivitas *scavenging* radikal sebesar 83 % pada konsentrasi 1 mg/ml (Hashim *et al.*, 2011).

2. Antiinflamasi

Kandungan *madecassoside* dalam *Centella asiatica* terbukti memberi efek antiinflamasi pada tikus dengan *kolagen-induced arthritis* (CIA) dengan menghambat mediator pro-inflamasi, termasuk ekspresi cyclooxygenase-2 (COX-2), produksi prostaglandin E2 (PGE2), TNF- α dan IL-6 dan meningkatkan molekul anti-inflamasi IL-10 (Li *et al.*, 2009). Kandungan bahan aktif lainnya seperti asiatikosida juga dapat meningkatkan IL-10 sebagai anti inflamasi dengan menghambat mediator proinflamasi TNF- α dan IL-6 pada tikus lipopolysaccharide (LPS)-induced fever (Wan *et al.*, 2013 ; Zahara, 2018).

3. Neuroprotektif

Pegagan memiliki efek protektif terhadap penurunan kognitif dan kerusakan oksidatif yang diinduksi kolsikin (Kumar *et al.*, 2009). Hasil studi yang dilakukan pada hewan coba Zebrafish yang terpapar pada 5g/L rotenone dan diberikan bersama dengan ekstrak *Centella asiatica* (CA) menunjukkan bahwa CA konsentrasi 10 μ g/mL secara signifikan meningkatkan motilitas dan tingkat dopamin, dapat melindungi neuron dopaminergik dari toksisitas rotenon

(Khotimah *et al.*, 2015). Di dalam pegagan terdapat kandungan asam asiatic yang berfungsi untuk peningkatan fungsi otak (Jahan *et al.*, 2004). Asiaticoside acid yang terkandung didalam pegagan mampu mempercepat regenerasi saraf serta memperbaiki neuron yang rusak (Soumyanath *et al.*, 2012).

4. Antihipertensi

Kandungan triterpenoid pada pegagan memiliki peran dalam sintesis elemen pembuluh darah vena, dimana senyawa ini aktif pada mikrosirkulasi pembuluh darah vena serta mikroangiopati diabetes (Incandela *et al.*, 2001).

5. Penyembuhan terhadap tukak lambung

Pemberian ekstrak air pegagan dan asiaticosida mampu menyembuhkan tukak lambung yang ditandai dengan pembentukan angiogenesis, proliferasi epitel, regenerasi sel mukosa dan penghambatan aktivitas meiloperoksidase penyebab tukak lambung (Cheng *et al.*, 2004).

6. Efek kardioprotektif

Asiaticosida dan asam arjunolat pada ekstrak air pegagan dapat menurunkan enzim laktat dehydrogenase, glutamate oksaloasetat transaminase, keratin posvokinase, dan glutamate piruvat transaminase yang berperan sebagai marker disfungsi jantung (Gnanapragasam *et al.*, 2004; Gnanapragasam *et al.*, 2007).

7. Chelating logam

Salah satu kandungan yang terdapat dalam pegagan adalah flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang alami. Senyawa ini terdapat di dalam buah-buahan, sayuran dan minuman tertentu (Youdim *et al.*, 2002).

Struktur umum flavonoid termasuk dalam gugus difenilpropana yang terdiri dari dua atau lebih cincin aromatic dan memiliki setidaknya satu gugus hidroksil melalui rantai karbon. Salah satu aglikon dari flavonoid adalah flavonol. Di dalam flavonol terdapat quarcetin yang berfungsi sebagai chelator ion logam berat

(Heim *et al.*, 2002). Quarcetin merupakan antioksidan yang terdapat dalam pegagan dan mampu menurunkan ROS (Kolanek, 2012).

8. Anticemas

Uji klinik pemberian serbuk pegagan dosis tunggal 12 g pada wanita dan pria sehat, menunjukkan efek ansiolitik (memperlambat fungsi otak normal) dibandingkan dengan placebo (Bradwejn *et al.*, 2000). Penelitian lainnya pada mencit menunjukkan pemberian simplisia dosis 50 mg/kgBB, 1,85 mg/kgBB asiaticosida murni dan 111 mg/kgBB fraksi etil asetat dari residu ekstraksi 128 g pegagan kering dengan 4 L etil asetat dapat memberikan efek ansiolitik (Wijeweera *et al.*, 2006).

2.4.5 Efek samping pegagan

Uji toksisitas akut penggunaan pegagan pada hewan coba dilakukan hingga dosis 2000mg/kg/BB menunjukkan tidak terjadi gejala klinis toksis (Sulastri, 2009). *Lethal Dose* tanaman pegagan sebesar 50 % pada 271,91 mg/20 g bb setara dengan 13,6/kg bb, maka toksisitas dari ekstrak pegagan cukup rendah yakni sebesar 5-15 g/kg. pada toksisitas akut dan sub kronis dari ekstrak pegagan memberikan efek berupa gangguan fungsi dan struktur pada jantung, ginjal dan hati bahkan untuk organ jantung dan hati menjadi lebih kecil dibandingkan dengan kelompok kontrol. terdapat kerusakan sel, jaringan otot, degenerasi protein dan nekrosis pada tubuli (Praptiwi, 2016).

2.5 Zebrafish (*Danio rerio*)

2.5.1 Karakteristik Zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) merupakan ikan air tawar yang berasal dari sungai pedalaman yang ada di India. Zebrafish juga ditemukan di Asia Tenggara, bahkan di Amerika (Mayden *et al.*, 2007; Spence *et al.*, 2008). Klasifikasi Zebrafish dapat dilihat pada tabel. Zebrafish mampu beradaptasi dengan berbagai

suhu mulai 6° C masa musim dingin hingga 38° C dimusim panas (Froese *et al.*, 2015).

Tabel 2.3 Klasifikasi Zebrafish

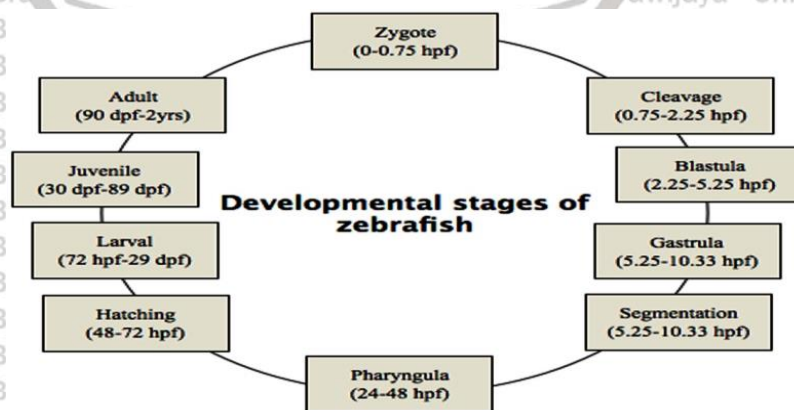
Tingkatan	Nama
Kingdom	Animalia
Fillum	Chordata
Kelas	Actynopteryqii
Ordo	Actiniformes
Family	Cyprinidae
Subfamily	Rasborone
Spesies	Danio Rerio
Genus	Danio
Nama Umum	Zebra Danio atau Zebrafish
Nama lain	Brachidanio rerio Danio rerio frankei

(Richards, 2011)

2.5.2 Perkembangan Zebrafish

Masa perkembangan Zebrafish dipengaruhi banyak faktor antara lain oleh kualitas air, kualitas dan kuantitas makanan; kepadatan populasi; suhu dan genetika. Zebrafish mengalami kematangan seksual pada usia 2–4 bulan (Wilson, 2012). Meskipun demikian, pengembangbiakan ikan harus dilakukan pada usia antara 7 dan 18 bulan untuk produksi embrio maksimum (Yilmaz *et al.*, 2017). Tahap perkembangan Zebrafish dapat dilihat pada gambar 2.9 dan tabel

2.4



Gambar 2.9 Siklus Perkembangan Zebrafish (Hosen *et al.*, 2013)

Tabel 2.4 Perkembangan Zebrafish

Periode Fase embrio	Usia	Deskripsi	Keterangan gambar
Zigot	0 – 0.75	Telur yang sudah dibuahi sampai terjadi pembelahan sel	
Cleavage	0.75 – 2.25	Siklus pembelahan sel yang terjadi sangat cepat hingga mencapai 64 sel	
Blastula	2.25 – 5.25	Embrio memasuki mid blastula transition, transisi dari 128 sel sampai 50 % epiboly	
Gastrula	5.25 – 10.33	Proses morfogenetik, internalisasi, pemanjangan konvergen dan akhir pembentukan epiboly	
Segmentasi	10.33 – 24	Berbagai variasi gerakan morfogenetik terjadi, dasar-dasar organ utama terlihat, kuncup ekor mulai lebih menonjol dan embrio memanjang, gerakan tubuh pertama muncul	
Pharingula	24 – 48	Tahap phylotipic embrio, sumbu tubuh mulai lurus dari lengkungan mengikuti yolk sac, sirkulasi, pembentukan pembuluh darah, pigmentasi dan perkembangan sirip	
Hatching	48 - 72	Penyelesaian morfogenesis cepat pada sistem organ utama, perkembangan tulang rawan di ekor dan kepala serta sirip selanjutnya terjadi penetasan	
Larva Early Larva	3 - 29	Pada usia 5 hari PB 3,9 mm, 6 gigi; 7 – 13 hari 4,5 mm, 8 gigi; 14 – 21 hari 6,2 mm, 10 gigi, 21 – 30 hari 7,8 mm, 10 gigi. Sudah mulai berenang dan menunjukkan gerakan aktif	
Mild Larva	30 - 60	Sudah mulai tumbuh, pertama hypural cartilage pada sirip ekor, saraf belum sempurna. Pada usia 3 minggu osifikasi skeleton faringeal, tunas dorsal dan sirip anal, radial pada sirip pectoral	
Jouvenile Jouvenile	60 - 89	Muncul sirip dewasa, pola pigmentasi, sebagian besar karakter dewasa telah terbentuk namun belum mengalami kematangan seksual, sisik lengkap dan memiliki 12 gigi	
Dewasa Adult	90 - 180	Telah terjadi maturasi seksual dan siap bereproduksi	

(Bittijn, 2009)

2.5.3 Perawatan Zebrafish

a. Karakteristik air

Pemeliharaan Zebrafish menggunakan sistem sirkulasi, aerasi dan penyaringan yang baik untuk menjaga kualitas air yang sehat. Karakteristik air yang dapat digunakan terlihat pada tabel 2.5 berikut.

Tabel 2.5 Karakteristik Air pada Pemeliharaan Zebrafish

Parameter	Rentang Optimum
Alkalinitas	50 – 150 mg/L CaCO ₃
PH	6,8 – 7,5
Suhu	26 – 28,5 °C
Hardness	50 – 100 mg/L CaCO ₃
Amonia tidak terionisasi	< 0,02 mg/L
Nitrat (NO ³⁻)	< 50 mg/L
Nitrit (NO ²⁻)	< 0,1 mg/L
Oksigen terlarut	> 6 mg/L
Salinitas	0,5 – 1 g/L
Konduktivitas	300 – 1.500 μS

(Avdesh *et al.*, 2012)

b. Kebersihan

Kebersihan aquarium Zebrafish perlu dijaga agar kualitas telur yang dihasilkan juga baik. Aquarium dikuras seminggu sekali atau jika sewaktu-waktu aquarium sudah tampak keruh dan kotor. Spon penyaring air juga harus diganti setiap 3 hari atau jika sudah tampak kotor (Avdesh *et al.*, 2012).

c. Pencahayaan

Pencahayaan yang diberikan pada Zebrafish berdasarkan siklus gelap terang (10 jam gelap dan 14 jam terang). Hal tersebut dilakukan dengan menggunakan lampu yang diletakkan diatas aquarium. Siklus gelap terang menyebabkan ikan dewasa betina akan berespon untuk bertelur dan ikan jantan akan membuahi setelah cahaya dihidupkan (Nusslein & Dahm, 2002).

d. Makanan

Makanan yang diberikan kepada Zebrafish adalah makanan kering (ukuran 100 mikron untuk larva dan 300/400 mikron untuk dewasa) atau makanan hidup berupa artemia (Avdesh *et al.*, 2012)

2.5.4 Taktil Motility

Kontraksi otot yang menggerakkan tulang menimbulkan adanya suatu gerak. Aktivitas gerak diatur oleh saraf, otak, tulang, sendi dan otot yang saling bekerjasama dan saling menunjang untuk melakukan kegiatan atau pergerakan (Syaifuddin, 2009). Sebuah unit motorik terdiri dari satu neuron motorik dan semua serabut otot yang dipersarafinya. Gerakan otot dicapai dengan peningkatan jumlah unit motorik yang bekerja. Pada waktu yang bersamaan, menurunkan aktivitas unit motorik otot-otot yang melakukan gerakan oposisi atau antagonis. Jika dibutuhkan kerja maksimum, semua unit motorik sebuah otot akan bekerja (Snell, 2013). Pada sel rangka, asetilkolin merupakan neurotransmitter yang dilepaskan oleh sel-sel saraf untuk mengaktifkan sel-sel otot (Balaba & Bobick, 2014).

Motilitas merupakan perilaku sederhana yang dapat diamati selama tahap awal larva Zebrafish. Kontraksi otot spontan Zebrafish terjadi pada 18 hpf. Pada 24 hpf, rangsangan mekanis di sepanjang sumbu tubuh akan menginduksi pergerakan embrio Zebrafish. Pada 48 hpf, mulai tampak respon awal terhadap rangsangan taktil. Sentuhan pada ujung ekor dapat menginduksi gerakan cepat dan lurus menjauhi sumber stimulus. Embrio dapat berubah 180° secara cepat di sepanjang sumbu horizontal tubuh ketika diberikan rangsangan mekanis di dekat kepala embrio. Pada usia 96 hpf, larva bebas berenang, mengubah arah berenang, serta dapat mencari sasaran (Granato *et al.*, 1996). Satuan untuk aktivitas lokomotor ini dinyatakan dengan jarak yang ditempuh per satuan menit (de Esch *et al.*, 2012).

2.5.5 Zebrafish Sebagai Model Penelitian

Zebrafish merupakan salah satu model hewan yang digunakan untuk mempelajari proses kelainan dan perkembangan pada manusia. Kemiripan antara manusia dan Zebrafish mengenai struktur genetik mencapai sekitar 70 % demikian pula dengan penyakit manusia memiliki homolog fungsional dengan Zebrafish (Langheinrich, 2003; Howe *et al.*, 2013). Zebrafish banyak digunakan sebagai model penelitian untuk mempelajari osteogenesis, metabolisme tulang maupun remodeling tulang. Kerangka Zebrafish menunjukkan kemiripan dengan sel manusia begitu juga dengan matrik protein, jalur persinyalan (Rusanescu *et al.*, 2008). Kesamaan gen, sistem saluran pencernaan, jaringan adipose, sistem otot rangka, sistem kardiovaskuler dan sistem saraf antara Zebrafish dan manusia menjadi landasan untuk pengembangan berbagai macam model penyakit (Seth *et al.*, 2013).

Selain hal tersebut diatas, Zebrafish juga memiliki keunggulan seperti transparan sehingga mudah untuk diamati dan proses embriogenik yang cepat dimana keseluruhan rangka tersusun 24 pasca fertilisasi, dan organ internal seperti jantung, hati, dan usus berkembang sempurna pada 96 jam pasca fertilisasi (Eimon & Ashkenazi, 2010). Zebrafish memiliki ukuran yang kecil sehingga memudahkan dalam perawatan, selain itu ditandai dengan kemampuan reproduksi yang tinggi dimana Zebrafish mampu menghasilkan telur sebanyak 200 – 3000 telur perminggu (Eimon & Ashkenazi, 2010).

2.5.6 Bioakumulasi Timbal pada Biota Air

Masuknya bahan pencemar ke dalam air akan mengalami proses fisika, kimia dan biologi. Secara fisika dan kimia, bahan pencemar melalui absorbs dan pengendapan sedangkan secara biologi dengan cara penyerapan oleh ikan (Ningrum, 2006). Proses biologi yang terjadi akan berkaitan dengan proses metabolisme sehingga memungkinkan terjadinya proses akumulasi secara

biologis yang disebut dengan bioakumulasi (Khaisar, 2006). Neff (2002) menyebutkan bahwa bioakumulasi merupakan proses penyerapan dan retensi bahan kimia *bioavailable* dari sumber air, makanan, substrat serta udara yang diserap kemudian terdistribusi dalam tubuh organisme. Clark & Mc Farland (1991) menyatakan bahwa bioakumulasi juga mengacu pada proses penyerapan bahan kimia melalui paparan seperti konsumsi, inhalasi serta melalui kulit, sehingga dapat dikatakan bahwa bioakumulasi meliputi biokonsentrasi dan biomagnifikasi.

Terdapat dua faktor yang mempengaruhi tingkat akumulasi timbal pada tubuh yaitu faktor biotik yang meliputi ukuran tubuh, perbedaan fenotip, usia, masa pertumbuhan dan metabolisme, sedangkan faktor abiotic meliputi temperature, pH air, tipe habitat, interaksi logam serta salinitas (Jakimska *et al*, 2011). Erlangga (2007) menyebutkan bahwa salinitas akan mempengaruhi bioakumulasi dan daya toksik logam sedangkan kenaikan suhu akan mempengaruhi reaksi kimia, metabolisme serta meningkatkan bioakumulasi logam berat pada tubuh organisme (Odum, 1993). Perubahan pada pH air juga mempengaruhi kelarutan logam, pH yang meningkat akan menurunkan kelarutan logam berat dalam air sehingga merubah kestabilan karbonat menjadi hidroksida yang membentuk ikatan dengan partikel pada air sehingga akan mengendap dan membentuk lumpur (Palar, 2004).

Masuknya timbal pada tubuh ikan melalui tiga cara yaitu melalui makanan, insang serta melalui difusi pada permukaan kulit (Sahetapi, 2011) sehingga terserap ke dalam jaringan kemudian terjadi bioakumulasi dan pada konsentrasi tertentu akan merusak organ tubuh (Palar, 1994).

2.5.7 Perubahan Histopatologi pada Kulit, Insang dan Usus

1. Histopatologi pada Sistem Integumen (Kulit)

Susanto (2008) mengemukakan bahwa kulit pada ikan mengandung dua lapisan yaitu epidermis dan dermis yang mengandung reseptor, alat keseimbangan, kelenjar ekskresi, kelenjar pertahanan serta kelenjar minyak. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Poleksic *et al* (2009) ditemukan bahwa logam berpengaruh pada histopatologi kulit dimana terjadi perubahan pada lapisan epidermis, tanpa disertai perubahan pada lapisan dermis dan hypodermis. Picnotic nuclei ditemukan sekitar 25 % pada lapisan epidermis yang mengalami lesi, deskuamasi epitel, ruptur dan hiperplasia pada sel epidermis.

2. Histopatologi pada Sistem Respirasi (Insang)

Insang merupakan alat respirasi serta mengatur homeostasis pada ikan (Susanto, 2008). Lapisan epitel yang tipis pada insang ikan akan membuat peluang terinfeksi. Paparan timbal pada insang ikan akan mengakibatkan perubahan metabolisme dan fungsi enzim terganggu, dimana hal tersebut akan mengganggu kinerja insang secara keseluruhan. Kerusakan yang terjadi pada insang ditandai dengan banyaknya sel yang mengalami nekrosis, hipertropi dan edema (Norrgrén *et al*, 1995). Gambaran dari nekrosis berupa perubahan warna insang menjadi lebih pucat dan perubahan konsistensi menjadi lebih lunak. Sedangkan edema terjadi disebabkan penimbunan cairan diruang intra sel.

3. Histopatologi pada Sistem Pencernaan (Usus)

Saluran pencernaan pada ikan dimulai dari segmen mulut, rongga mulut, faring, esophagus, lambung, pylorus, usus, rectum dan anus (Fujaya, 2004). Usus merupakan bagian saluran pencernaan yang

berfungsi untuk menyerap sari-sari makanan. Lapisan mukosa usus tersusun oleh lapisan sel epitelium dengan bentuk sel enterosit dan mukosit. Timbal yang masuk ke dalam tubuh ikan akan menyebabkan perubahan pada usus antara lain proliferasi sel, goblet, hemoragi, atrofi vili usus dan metaplasia (Susanto, 2008).

2.6 Perkembangan

2.6.1 Pengertian

Perkembangan adalah bertambahnya kemampuan dalam struktur dan fungsi tubuh yang lebih kompleks dalam pola yang teratur dan dapat diramalkan sebagai hasil dari proses pematangan. Disini menyangkut adanya proses differensiasi dari sel tubuh, jaringan tubuh, organ dan sistem organ yang berkembang sedemikian rupa sehingga memenuhi tugasnya masing-masing. Termasuk perkembangan emosi, intelektual dan tingkah laku sebagai hasil interaksi dengan lingkungannya (Soetjiningsih, 1995).

2.6.2 Aspek yang Mempengaruhi Perkembangan Anak

Pencapaian suatu kemampuan pada setiap anak bisa berbeda, namun ada kriteria umur tentang kemampuan apa saja yang perlu dicapai seorang anak pada umur tertentu. Adanya kriteria tersebut dimaksudkan agar anak yang belum mencapai tahap kemampuan tertentu perlu dilatih untuk mencapai perkembangan yang optimal. Menurut Depkes (2007) terdapat 4 aspek perkembangan yang perlu di lihat pada anak yaitu perkembangan kemampuan gerak kasar, gerak halus, berbicara, bahasa dan kecerdasan serta kemampuan bergaul dan mandiri.

Setiap perkembangan kemampuan tersebut akan dijabarkan sebagai berikut:

1. Perkembangan kemampuan gerak kasar.

Gerakan dasar adalah gerakan yang dilakukan dengan melibatkan sebagian besar bagian tubuh dan biasanya memerlukan tenaga karena dilakukan oleh otot yang lebih besar. Contohnya adalah gerakan berjalan dan berlari.

2. Perkembangan kemampuan gerak halus.

Gerakan halus hanya melibatkan bagian tubuh tertentu saja dan dilakukan oleh otot kecil. Gerakan halus memerlukan koordinasi yang cermat. Contohnya adalah gerakan mengambil benda dengan menggunakan ibu jari dan telunjuk tangan, menggambar, menari dan lain-lain.

3. Perkembangan kemampuan berbicara, bahasa dan kecerdasan.

Anak memiliki kemampuan berkomunikasi aktif (berbicara, mengucapkan kalimat, menyanyi dan bentuk ungkapan lisan lainnya) dan komunikasi pasif (anak mampu mengerti orang lain).

4. Perkembangan kemampuan bergaul dan mandiri.

Kebutuhan anak berubah dalam jumlah maupun derajat kualitasnya sesuai dengan bertambahnya umur anak. Dengan memiliki kemampuan gerakan motorik (seperti berdiri, berjalan dan berbicara) anak akan terdorong untuk melakukan sendiri berbagai hal dan terdorong untuk bergaul dengan orang lain selain anggota keluarga.

2.6.3 Pengertian Motilitas dan Lokomotor

Motilitas atau respon taktil adalah respon terhadap stimulus yang mempengaruhi sensorik di kulit dan kinestetik yang merupakan rangsangan pada ekstremitas. Kedua stimulus ini berkontribusi terhadap perkembangan dan pertumbuhan perilaku (Symington & Pinelli, 2002).

Gerakan lokomotor adalah gerakan berpindah tempat, dimana bagian tubuh tertentu bergerak atau berpindah tempat. Gerak dasar lokomotor merupakan salah satu domain dari gerak dasar fundamental (*fundamental basic movement*) (Gallahue *et al.*, 2006). Keterampilan lokomotor didefinisikan sebagai keterampilan berpindahnya individu dari satu tempat ke tempat yang lain atau mengangkat tubuh seperti lompat dan loncat (Samsudin, 2008). Sebagian besar keterampilan lokomotor berkembang dari hasil tingkat kematangan tertentu serta merupakan latihan dan pengalaman juga penting untuk mencapai kecakapan yang matang.

Keterampilan lokomotor misalnya berlari cepat, meluncur dan melompat lebih sulit dilakukan karena merupakan kombinasi dari pola-pola gerak dasar yang lain. Keterampilan lokomotor membentuk dasar atau landasan koordinasi gerak kasar (*gross skill*) dan melibatkan gerak otot besar.

Gerakan-gerakan lokomotor adalah gerakan-gerakan yang menyebabkan tubuh berpindah tempat dalam berbagai ruang. Hal tersebut melibatkan kebalikan dari gerakan non lokomotor, yang tidak menyebabkan tubuh berpindah dari satu tempat ke tempat yang lain. Gerakan lokomotor merupakan dasar bagi perkembangan koordinasi dimana gerakan tersebut melibatkan otot-otot besar (*gross-muscles*), pertumbuhan otot, daya tahan dan stamina.

2.6.4 Keterampilan Gerak Locomotor

(Goodway *et al.*, 2013) menggambarkan bahwa rentang usia anak terhadap tahap perkembangan keterampilan gerak dasar terdiri dari 3 sampai 5 bentuk tahap perkembangan dan dimulai dari usia 1,5 tahun sampai dengan 10 tahun.

Tahap perkembangan gerak dasar tersebut terdiri dari :

1. Berjalan

Samsudin (2008) mengatakan bahwa berjalan merupakan perpindahan berat badan dari satu kaki ke kaki lainnya dengan salah satu kaki selalu berhubungan dengan lantai. Gerakan berjalan pada anak pada awalnya belum dapat dilakukan dengan baik, namun dengan berjalannya waktu maka seorang anak mampu melakukan gerak berjalan dengan lebih lancar dan mampu bergerak lebih cepat. Perkembangan keterampilan gerak berjalan berhubungan dengan peningkatan kekuatan kaki, keseimbangan dan koordinasi bagian tubuh yang mendukung keseimbangan.

Terdapat tiga bentuk tahap perkembangan gerakan berjalan yaitu :

a. Tahap 1 atau tahap *initial*

Tahap 1 merupakan gerakan berjalan dimana anak dalam berjalan posisi tubuhnya sedikit condong ke depan dan masih belum seimbang, jarak langkah yang pendek dan lutut masih ditekuk ketika berjalan serta ayunan bersamaan dengan langkah kaki dengan posisi berada di depan tubuh.

b. Tahap 2 atau tahap *elementary*

Tahap 2 yaitu gerakan berjalan dimana posisi tubuh tegak, jarak yang dicapai anak lebih lebar. Telapak kaki sudah melakukan kontak langsung dengan lantai, lengan berada disamping tubuh, namun ayunan lengan masih sedikit dan telah mampu menjaga keseimbangan tubuh saat berjalan.

c. Tahap 3 atau tahap *mature*

Tahap 3 merupakan tahap perkembangan gerakan berjalan dimana gerak yang dihasilkan lebih matang dibandingkan dengan tahapan gerakan berjalan sebelumnya.

2. Berlari

Sumantri (2005) mengatakan berlari merupakan perkembangan dari gerakan berjalan, dimana perbedaannya adalah terletak pada irama ayunan langkahnya. Pada gerakan berlari, irama lebih cepat (Goodway *et al.*, 2013). Berlari merupakan bentuk dari gerakan lokomotor yang melibatkan proyeksi tubuh untuk condong ke depan bersamaan dengan pergantian kaki. Gerakan berlari dilakukan oleh anak setelah mampu berjalan, dimana diperlukan peningkatan kekuatan kaki dan koordinasi yang lebih baik antara otot-otot penggerak (*agonist*) dengan otot-otot yang berlawanan (*antagonist*) pada saat kaki melangkah (sumantri, 2005).

Terdapat 4 bentuk tahapan perkembangan gerakan berlari pada anak yaitu :

a. Tahap 1

Keterampilan gerak berlari yang dicapai pada saat anak berusia 18 bulan dan gerakan berlari anak belum sempurna.

b. Tahap 2

Gerak berlari yang dicapai pada saat anak berusia 24 bulan atau 2 tahun lebih baik bila dibandingkan dengan tahap sebelumnya.

c. Tahap 3

Gerak berlari yang dicapai anak pada saat berusia 42 bulan atau 3,5 tahun. Keterampilan gerak berlari pada anak lebih berkembang.

d. Tahap 4

Keterampilan gerak berlari yang dicapai pada saat anak berusia 60 bulan atau 5 tahun. Gerak berlari anak telah berada pada tahap seperti orang dewasa.

3. Melompat

(Gallahue *et al.*, 2006) mengungkapkan bahwa melompat merupakan gerakan menolak dan menerap kekuatan dengan menggunakan satu kaki saat berpijak. Gerakan melompat membutuhkan kekuatan otot yang signifikan, koordinasi tubuh, dan keseimbangan dinamis. Sumantri (2005) mengatakan bahwa melompat merupakan gerakan yang terbentuk dari gerakan berjalan atau melangkah dari tempat yang agak tinggi ke tempat yang lebih rendah, misalnya menuruni tangga. Sumantri (2005) mengungkapkan bahwa penguasaan gerak melompat berkembang sejalan dengan peningkatan kekuatan kaki serta keseimbangan dan koordinasi tubuh.

Terdapat 4 bentuk tahapan perkembangan melompat pada anak yaitu :

a. Tahap 1

Perkembangan keterampilan melompat yang dicapai anak pada saat anak berusia 30 bulan atau 1,5 tahun.

b. Tahap 2

Keterampilan melompat yang dicapai anak pada saat berusia 42 – 48 bulan. Jarak yang dicapai saat melompat lebih lebar dibandingkan pada tahap 1.

c. Tahap 3

Tahap perkembangan keterampilan melompat yang dicapai anak pada saat berusia 60 bulan atau 5 tahun.

d. Tahap 4

Tahap perkembangan keterampilan melompat yang dicapai anak pada saat berusia 84 bulan atau 7 tahun. Dimana gerakan melompat anak lebih matang dan terkoordinasi lebih baik dalam tahap ini. Keterampilan gerak melompat yang distimulasi dengan baik akan memudahkan anak dalam mengembangkan keterampilan geraknya sesuai dengan usia dan

tahapan perkembangan gerakan melompatnya. Ketika gerakan melompat anak telah sesuai dengan usia anak maka akan meminimalkan cedera pada anak ketika melakukan gerakan melompat.

4. Meloncat

(Goodway *et al.*, 2013)) mengatakan bahwa meloncat adalah keterampilan memproyeksikan tubuh yang melibatkan gerakan menolak dan mendarat dengan menggunakan kedua kaki.

Terdapat 4 tahapan perkembangan meloncat pada anak yaitu :

a. Tahap 1

Tahap perkembangan gerakan meloncat yang dicapai anak pada usia 20 – 24 bulan

b. Tahap 2

Bentuk tahapan perkembangan meloncat yang dicapai oleh anak saat berusia 48 bulan.

c. Tahap 3

Tahapan perkembangan meloncat pada anak saat berusia 76 bulan.

d. Tahap 4

Tahap perkembangan keterampilan meloncat yang dicapai anak saat berusia 10 tahun.

2.7 Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) dapat Memperbaiki Ekspresi Tirosin Hidroksilase, Kadar Dopamin dan Aktivitas Lokomotor pada Zebrafish Yang Dipapar Timbal.

Timbal merupakan unsur logam yang dilepaskan ke atmosfer dan sumber utama pencemaran lingkungan. Akumulasi dan konsentrasi timbal dapat menyebabkan keracunan tubuh dan kerusakan sistem saraf. Didalam penelitian yang dikemukakan oleh (Tamegart *et al.*, 2018) dikatakan bahwa Parkinson

merupakan penyakit yang terkait dengan defisiensi dopaminergik yang dipicu oleh faktor genetik dan lingkungan salah satunya adalah keracunan timbal.

Akumulasi timbal dapat menyebabkan edema serebral dan serebral akut serta perdarahan (Smith *et al.*, 1960). Paparan timbal juga menghasilkan perubahan regional dengan penurunan dopamin, serotonin dan metabolit lainnya di korteks serebral, hipokampus, hipotalamus basal dan medial (Lestari, 2004). Timbal akan mempengaruhi neurotransmitter dopaminergik (Minnema, *et al.*, 1986). Paparan akut timbal pada sistem dopaminergik dievaluasi melalui ekspresi tirosin hidroksilase. Hasil penelitian membuktikan bahwa paparan timbal mengganggu sistem dopaminergik melalui aksinya pada tirosin hidroksilase (Leret, *et al.*, 2003).

Timbal yang berikatan dengan calmodulin akan menimbulkan gangguan pada tirosin hidroksilase. Sandhir & Gill (1994) menyebutkan bahwa timbal dapat menginduksi peningkatan aktivitas calmodulin pada otak. Devi (2015) menyebutkan bahwa tikus yang mengalami keracunan timbal akan mengalami penurunan ekspresi dan aktivitas tirosin hidroksilase sehingga mengakibatkan penurunan kadar dopamin. Dopamin memiliki banyak fungsi fisiologis yang penting seperti kontrol gerakan, kognisi serta sekresi neuroendokrin (Khotimah *et al.*, 2015). Penurunan signifikan terhadap dopamin pada hipotalamus dan hipokampus juga diamati oleh (Leret *et al.*, 2003). Meredith *et al.*, (1980) mengemukakan bahwa paparan timbal mengakibatkan penurunan aktivitas tirosin hidroksilase yang berkaitan dengan katekolamin. Molloy & Waddington, (1984) menyebutkan bahwa paparan timbal akan mempengaruhi transmisi sinaptik katekolaminergik dengan mengganggu sintesis dopamin serta pelepasannya sehingga merubah aktivitas pergerakan. Paparan timbal mengakibatkan pembentukan stres oksidatif pada otak tikus karena kandungan fosfolipid yang tinggi pada membran. Timbal memiliki kemampuan untuk menghasilkan ROS seperti hidroksil, superoksida dan hydrogen peroksida (Han

et al., 2005). Tamegart et al (2018) menyebutkan bahwa paparan timbal secara akut pada tikus mengakibatkan penurunan pada tirosin hidroksilase dan dopamin sehingga mengakibatkan penurunan aktivitas lokomotor dan hipoaktivitas.

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tanaman herbal yang digunakan sebagai pengobatan tradisional. Kandungan utama dari pegagan adalah saponin (triterpenoid) yang meliputi asiaticoside, madecassoside dan asam madasiatik

(Sutardi, 2016). Beberapa penelitian menunjukkan ekstrak dari tanaman pegagan memiliki fungsi *nootropic* yaitu melindungi otak dari kerusakan yang

diakibatkan peningkatan usia, menginduksi pertumbuhan sel-sel neuron dan mempunyai efek sebagai antioksidan dan anti inflamasi mampu mencegah stres oksidatif serta membersihkan radikal bebas (Khotimah et al., 2010). Ling (2003)

mengemukakan bahwa pegagan merupakan fitofarmaka yang memiliki efek neuroprotektan yang dapat mengurangi oksidatif stres serta melindungi neuron dopaminergik yang telah dipapar MPTP (Panov et al., 2005; Hanum et al 2016)

melakukan uji efektivitas ekstrak pegagan dalam memperbaiki aktivitas lokomotor dan meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase pada Zebrafish yang dipapar dengan rotenone. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, dikatakan bahwa

ekstrak pegagan dapat meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase. Semakin tinggi dosis ekstrak pegagan maka akan diikuti oleh peningkatan tirosin hidroksilase, semakin rendah dosis pegagan maka ekspresi tirosin hidroksilase

juga lebih rendah (Hanum et al, 2016). Khotimah et al., (2015) mengemukakan bahwa pegagan memiliki peran penting untuk melindungi sel-sel melalui peningkatan neurotropin sehingga apoptosis dapat ditekan. Ekstrak pegagan

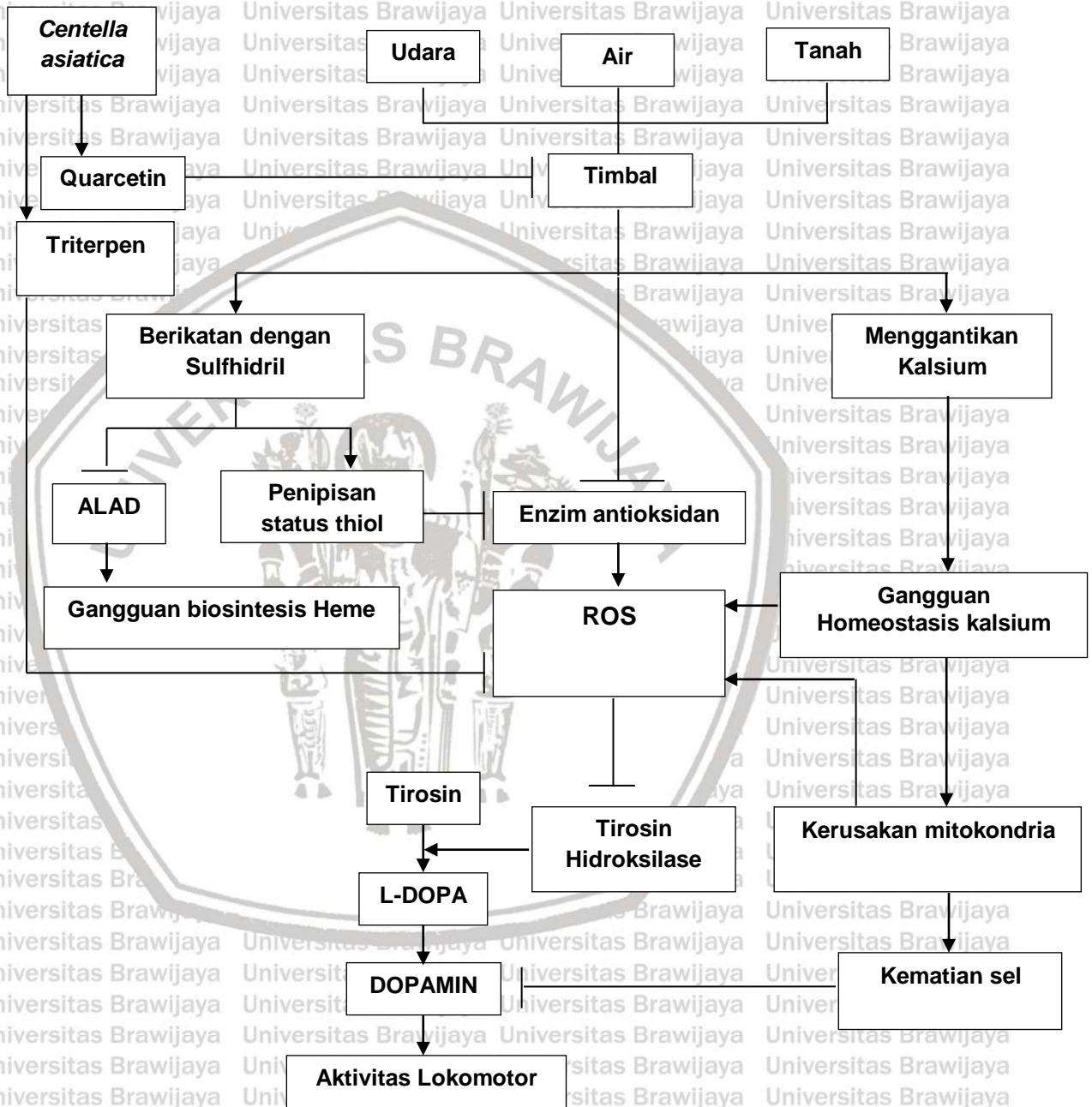
menunjukkan perlindungan saraf melalui peningkatan fosforilasi protein AMP elemen pengikat respon siklik (CREB) dalam sel neuroblastoma dalam protein β , dimana BDNF memiliki kontribusi lebih besar untuk melindungi neuron

dopaminergik.

BAB 3

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1 Kerangka Teori

3.2 Penjelasan Kerangka Teori

Salah satu bahan pencemar lingkungan yang berbahaya dan bersifat toksik adalah timbal (Ulfah, 2014). Timbal masuk ke dalam tubuh melalui udara, air dan tanah (Wedeen *et al.*, 2007). Di dalam tubuh, timbal akan berikatan dengan sulfhidril. Sulfhidril merupakan senyawa gugus fungsi yang terdiri dari atom sulfur dan atom hydrogen. *Amino Levulinic Acid Dehidratase* (ALAD) merupakan salah satu enzim yang memiliki kompleks sulfhidril serta berperan dalam pembentukan haemoglobin. Enzim ALAD berungsi untuk mengubah *delta aminolevulinic acid* (ALA) menjadi phorphobilinogen. Timbal yang ada di dalam tubuh akan mengikat gugus sulfhidril dari ALAD sehingga menghambat enzim δ ALAD dalam eritoblast dan eritrosit pada sintesis heme serta mengakibatkan penumpukan δ ALA pada sintesis haemoglobin. Selain menghambat ALAD timbal juga menghambat *gluthatione* yang merupakan molekul berbahan dasar asam amino sistein. Timbal menginaktivasi *gluthatione* dengan mengikat sulfhidril sehingga menyebabkan peningkatan radikal bebas di dalam tubuh (Ahamed & Siddiqui, 2007).

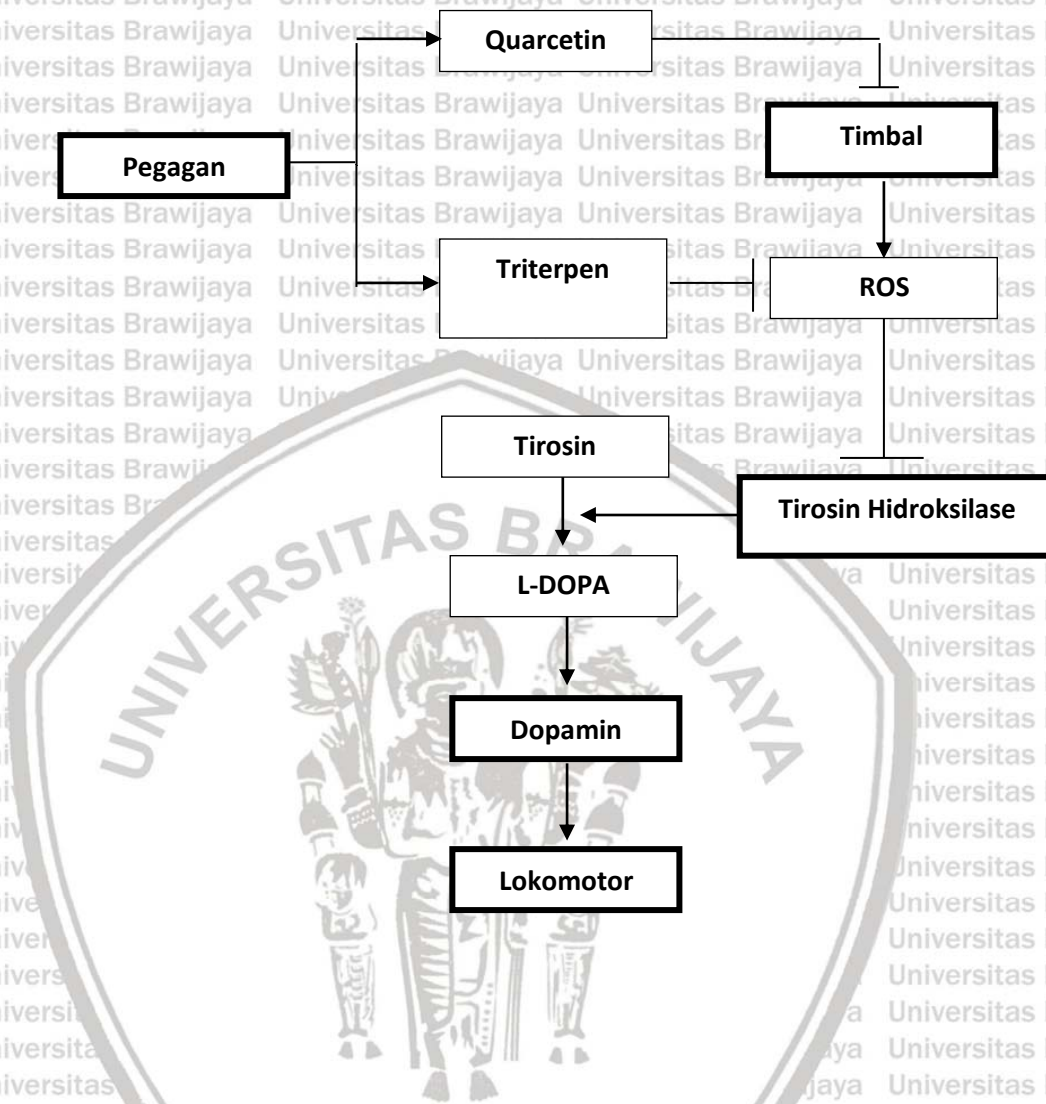
Masuknya timbal kedalam tubuh juga disebabkan karena timbal dapat menggantikan kalsium. Timbal masuk kedalam sel melalui kanal Ca^{2+} yang distimulasi oleh G-protein. Di dalam sel, timbal berikatan dengan calmodulin (caM) dan mengubah fungsi sel. Kemampuan timbal untuk berikatan dengan calmodulin lebih tinggi bila dibandingkan dengan kemampuan Ca^{2+} untuk berikatan dengan calmodulin. Hal tersebut mengakibatkan Ca^{2+} tidak dapat didistribusikan secara normal sehingga terjadi peningkatan Ca^{2+} intraseluler (Flora *et al.*, 2012). Konsentrasi Ca^{2+} yang tinggi menyebabkan terbukanya kanal pada membran sel sehingga Ca^{2+} masuk dari retikulum endoplasma. Pada mitokondria terjadi peningkatan Ca^{2+} intraseluler sehingga permeabilitas membran terjadi perubahan dan merangsang depolarisasi mitokondria (He *et al.*,

2000). Kerusakan pada mitokondria akan mengakibatkan peningkatan radikal bebas serta menyebabkan kematian sel.

Tirosin hidroksilase merupakan enzim yang berperan sebagai pembatasan laju sintesis tirosin menjadi L-DOPA (Daubner *et al.*, 2011). Enzim ini merupakan salah satu target kerusakan yang disebabkan oleh *reactive species oxygen* (ROS) (Haavik & Toska, 1998). Terhambatnya kerja enzim tirosin hidroksilase akan mengakibatkan sintesis tirosin menjadi L-DOPA akan menurun. Penurunan terhadap L-DOPA akan mengakibatkan penurunan terhadap dopamin (Daubner *et al.*, 2011). Sedangkan penurunan dopamin akan mengakibatkan penurunan terhadap aktivitas lokomotor (Widodo, 2016).

Centella asiatica atau pegagan merupakan salah satu tanaman yang memiliki kandungan triterpenoid, flavonoid, minyak atsiri dan fitosterol (Winarto & Surbakti, 2003). Triterpenoid yang merupakan kandungan tertinggi dari pegagan berfungsi sebagai antioksidan yang dapat menghambat radikal bebas (Hashim *et al.*, 2011), sedangkan flavonoid memiliki aglikon yang disebut flavanol. Di dalam flavanol terdapat kandungan quarcetin yang berfungsi sebagai chelator logam berat (Flora *et al.*, 2012).

3.3 Kerangka Konsep

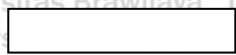


Gambar 3.2 Kerangka Konsep

Keterangan :



: Parameter yang diteliti



: Parameter yang tidak diteliti



: Menstimuli



: Menghambat

3.4 Penjelasan Kerangka Konsep

Timbal merupakan salah satu bahan pencemar lingkungan yang bersifat toksik serta menyebabkan kerusakan organ tubuh seperti otak. Timbal dapat melewati sawar darah otak dikarenakan kemampuan timbal menggantikan ion kalsium dimana timbal memiliki afinitas yang tinggi terhadap pengikatan kalsium bahkan dengan konsentrasi rendah. Pada tingkat molekuler, timbal mengganggu regulasi kalsium. Timbal masuk ke dalam sel melalui kanal kalsium yang distimulasi oleh G-protein. Timbal menggantikan kalsium intraseluler sehingga terjadi peningkatan timbal intraseluler. Peningkatan timbal intraseluler dimana timbal menggantikan kalsium akan memodulasi proses terbentuknya ROS.

Pembentukan oksidan memberikan efek pada jalur pensinyalan kalsium, lipid dan fosforilasi. Oksidan juga dapat menginduksi pembentukan peroksidasi lipid dalam membran sel. Peningkatan ROS akan menyebabkan penurunan aktivitas enzim tirosin hidroksilase.. Hal tersebut akan menyebabkan gangguan pada sintesis tirosin ke L-DOPA dan menyebabkan penurunan pada sintesis dopamin sehingga mengakibatkan penurunan aktivitas lokomotor dan hipoaktivitas.

Penggunaan pegagan (*Centella Asiatica*) sebagai salah satu tanaman obat dapat mencegah efek toksik dari timbal. Pegagan memiliki kandungan utama yaitu triterpenoid yang berperan sebagai antioksidan dalam menyeimbangkan oksidan dalam sel sehingga stres oksidatif dapat dicegah. Kandungan lain yang terdapat di pegagan adalah flavonoid, salah satu aglikon dari flavonoid adalah flavanol. Didalam flavanol terdapat kandungan quercetin yang berfungsi sebagai *chelating* logam berat.

3.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis umum dalam penelitian ini adalah “pengaruh ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase, kadar dopamin serta aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal”.

Secara khusus hipotesis penelitian ini dijabarkan dalam sub hipotesis berikut ini :

1. Ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase pada larva zebrafish yang dipapar timbal.
2. Ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan kadar dopamin pada larva zebrafish yang dipapar timbal.
3. Ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal.
4. Terdapat hubungan antara ekspresi tirosin hidroksilase dengan kadar dopamin pada larva zebrafish yang dipapar timbal.
5. Terdapat hubungan antara kadar dopamin dengan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental (*true experiment*) menggunakan desain *post test only control group design* dengan pengambilan sampel melalui random alokasi. Eksperimental adalah suatu penelitian yang menyelidiki hubungan sebab akibat untuk membandingkan kelompok kontrol dengan perlakuan. Sedangkan pendekatan *post test only control group design* adalah salah satu jenis *true experimental*, dimana pengujiannya hanya diamati setelah perlakuan/intervensi diberikan (Zainuddin, 2001).

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian**4.2.1 Populasi**

Populasi dari penelitian yang akan dilakukan adalah embrio zebrafish (*Danio rerio*) usia 0 dpf yang merupakan hasil fertilisasi zebrafish dewasa *wild type*. Zebrafish diperoleh dari laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB) Malang yang telah diuji dan tersertifikasi di laboratorium Hidrologi Fakultas Perikanan (Khotimah *et al.*, 2018). Semua prosedur yang akan dilakukan selama dalam penelitian terhadap hewan coba akan diajukan agar dapat lulus uji oleh Komite Etik Universitas Brawijaya Malang.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa embrio zebrafish yang berusia 2 hpf sampai 6 dpf dengan jumlah sampel 30 sampel/sumuran (Hill *et al.*, 2005). Pertimbangan survival rate setiap sumur maka dilakukan *triplicate* (pengulangan 3 kali) (Lucitt *et al.*, 2008).

Pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut :

Kelompok Perlakuan	
Kontrol negatif	Sampel tidak diberi timbal maupun ekstrak etanol pegagan
Kontrol positif	Sampel hanya diberikan timbal asetat trihidrat 2,5 ppm
Kelompok perlakuan 1	Sampel diberikan paparan timbal 2,5 ppm dan ekstrak etanol pegagan 1,25 µg/ml
Kelompok perlakuan 2	Sampel diberikan paparan timbal 2,5 ppm dan ekstrak etanol pegagan 2,5 µg/ml
Kelompok perlakuan 3	Sampel diberikan paparan timbal 2,5 ppm dan ekstrak etanol pegagan 5 µg/ml

Sampel yang digunakan dalam penelitian dibagi menjadi:

1. Sampel untuk pengukuran aktivitas lokomotor

Jumlah sampel yang digunakan menggunakan rumus Federer

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

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

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75 \text{ dibulatkan menjadi } 5$$

Keterangan :

n : replikasi ulangan

t : jumlah perlakuan

Total sampel yang digunakan untuk aktivitas lokomotor berjumlah 5 sampel. Pertimbangan *survival rate* maka jumlah sampel yang digunakan ditambah menjadi 10 larva persumuran sehingga untuk 5 kelompok perlakuan, maka total sampel yang digunakan adalah 50 sampel.

2. Sampel untuk pengukuran ekspresi tirosin hidroksilase

Sampel yang digunakan untuk ekspresi tirosin hidroksilase berjumlah 30 sampel persumuran untuk 1 kelompok perlakuan (Lan *et al.*, 2009).

Jumlah sampel tersebut dikalikan 5 karena terdapat 5 kelompok perlakuan.

3. Sampel untuk pengukuran kadar dopamin

Sampel yang digunakan untuk kadar dopamin berjumlah 25 sampel persumuran untuk 1 kelompok perlakuan (Lan *et al.*, 2009). Jumlah sampel tersebut dikalikan 5 karena terdapat 5 kelompok perlakuan.

4.2.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi : embrio zebrafish yang berusia 0-2 hpf, jernih dan transparan, tidak terdapat serabut putih atau jamur saat diamati dibawah mikroskop.
2. Kriteria eksklusi : tidak terbuahi, berjamur, lengket dengan telur lainnya dan berwarna putih.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di dua tempat yaitu :

1. Pemeliharaan zebrafish, pembuatan ekstrak pegagan dan timbal, penilaian aktivitas lokomotor akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Pemeriksaan ekspresi tirosin hidrosilase menggunakan *Reverse Transcription PCR* dan kadar dopamin menggunakan *ELISA*, dilakukan di LSIH Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium UIN Malang.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian direncanakan akan dilaksanakan pada bulan April – Juli 2019.

4.4 Variabel Penelitian

1. Variabel *Independent* : pemberian ekstrak etanol pegagan dan timbal.
2. Variabel *Dependent* : ekspresi tirosin hidrosilase, kadar dopamin dan aktivitas lokomotor.

4.5 Bahan dan Alat

4.5.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Zebrafish

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

4.5.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Pegagan

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

4.5.3 Alat dan Bahan Pembuatan Medium Embrionik

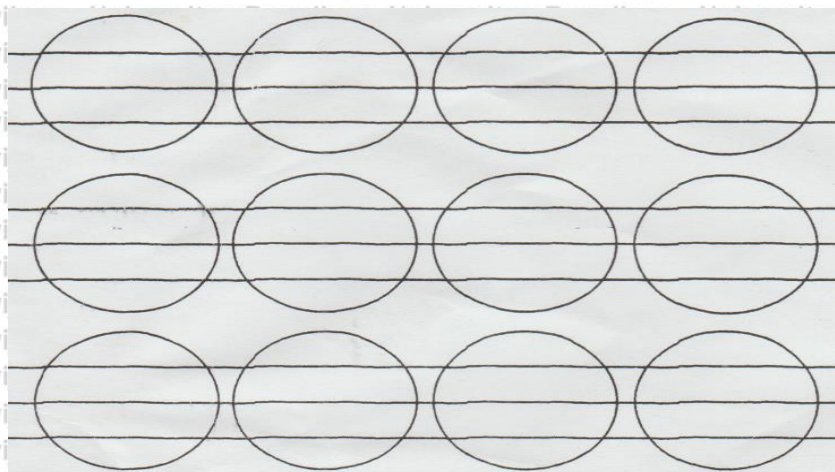
Pembuatan embrionik medium sebanyak 200 ml sebagai berikut :

(Avdesh *et al*, 2012)

1. Alat : tabung reaksi 500 mL, timbangan digital (Metter Toledo) dan alat pengaduk.
2. Bahan : CaCl, KCl, NaCl, MgSO₄, aquadest dan kertas saring.

4.5.4 Alat dan Bahan Aktivitas Lokomotor

1. Alat : kamera, *well plate* 12 sumuran, pipet plastik, jarum kecil, kertas yang telah dibuat pola berbentuk garis, software image J, lampu, timer, tripod.



Gambar 4.1 Kertas Pola Bergaris Untuk Mengukur Lokomotor

Keterangan: Pola dibuat berdasarkan jumlah dan besar *well plate* yang digunakan, dibuat pola garis-garis dengan ukuran yang sama. Pergerakan larva dihitung saat larva bergerak melewati garis.

4.5.5 Alat dan Bahan Pengukuran Kadar Dopamin

1. Alat : *centrifuge*, tabung reaksi, mikropipet, ELISA Reader, *vortex thermolyne*, *incubator*, eppendorf, mikroplate reader.
2. Bahan : serum, Elisa (Enzym Linked Immunosorbent Assay) Kit, antibody, *wash Buffer*, antibodi.

4.5.6 Alat dan Bahan Pengukuran Ekspresi Tirosin Hidroksilase

1. Alat; lemari pendingin (*Freezer*), Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG dengan ROX (Invitrogen), Bioanalis, Fluorometer, Qubit (Invitrogen Q32857), *micropipette* dan tip (*blue, yellow, white*).
2. Bahan: TRizol *reagent*, β -mercaptoethanol, kloroform, Diethyl pyrocarbonate (DEPC) *reagent*, campuran dNTP, Etanol, Glikogen, Isopropanol, tabung eluat 1,5 mL, tabung koleksi 2 mL dan kolom spin MinElute, SDS (*sodium dodecyl sulfate*), es batu, tabung *centrifuge*, tabung *microcentrifuge*, sarung tangan sekali pakai, Eppendorf, pipet plastik.

Tabel 4.1 Primer Ekspresi Tirosin Hidroksilase

No	Primer	Forward	Reverse	Referensi
1	Tyrosine Hydroxylase	GACGGAAGATGATCGGAG ACA	CCGCCATGTTCCGATT TC T	(Chen <i>et al.</i> , 2012)

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.2 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional
Ekstrak etanol pegagan	Pegagan diperoleh dari Materia Medica Batu – Malang yang telah tersertifikasi. Ekstraksi kasar pegagan diperoleh dengan menggunakan teknik maserasi (etanol) 98% yang dibagi menjadi 3 konsentrasi yaitu 1,25 µg/ml; 2,5 µg/ml dan 5 µg/ml
Aktivitas Lokomotor	Pergerakan larva zebrafish usia 4 – 6 dpf membentuk pola serta perhitungan banyaknya pergerakan melintasi garis yang direkam menggunakan kamera selama 1 menit (kali/menit)
Timbal	Serbuk putih timbal asetat merk Merck No Katalog 1073750250 dengan berat molekul 379.33 gr/mo yang dilarutkan dalam aquadest dengan konsentrasi 2,5 ppm diberikan mulai dari 2 hpf sampai 3 dpf.
Ekspresi Tirosin Hidroksilase	Jumlah mRNA tirosin hidroksilase pada larva zebrafish usia 6 hari setelah dilakukan euthanasia yang diukur dengan menggunakan RT-PCR (<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>) kit dengan merk Thermo Scientific 00642226
Kadar Dopamin	Kadar dopamin pada larva zebrafish usia 6 hari setelah dilakukan euthanasia yang diukur menggunakan <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) kit dengan merk Elabscience No.Cat E-El-0046

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Perawatan zebrafish

Penelitian ini menggunakan embrio yang berasal dari zebrafish *wild type* tipe dewasa yang diperoleh dari laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya

Malang dan telah diidentifikasi di Laboratorium Perikanan Universitas Brawijaya

Malang (FPIK). Zebrafish ditempatkan dalam aquarium menggunakan air tawar $\frac{3}{4}$ bagian dengan ukuran aquarium panjang 60 cm, lebar 40 cm dan tinggi 40 cm.

Suhu 28°C ± 1°C, PH 6,8 – 7,5, sirkulasi semi statik, (Avdesh *et al.*, 2012).

Aerator selalu dalam keadaan hidup untuk memastikan kebutuhan oksigen. Sisi

aquarium ditutup dan hanya bagian atas yang terlihat. Hal tersebut dimaksudkan untuk mencegah stres lingkungan yang dialami oleh zebrafish. Pakan diberikan sedikit demi sedikit sebanyak 2-3 kali sehari untuk mencegah air aquarium keruh (Avdesh *et al.*, 2012). Air aquarium diganti 1 kali dalam seminggu serta mengganti busa penyaring selama 3 hari sekali atau apabila busa penyaring sudah tampak kotor.

4.7.2 Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio

Zebrafish dipelihara di lingkungan air tawar dalam aquarium dengan kapasitas 60 liter. Air yang digunakan adalah air aqua pada suhu 26-28,5 ° C dan pH 6,8 – 7,5 (Avdesh *et al.*, 2012). Jenis pakan yang digunakan adalah tetramin dengan frekuensi 3 kali sehari. Pembiakan zebrafish disesuaikan dengan siklus gelap : terang (10 jam : 14 jam) (Avdesh *et al.*, 2012) pada lingkungan yang tenang dan terhindar dari stres lingkungan.

Siklus gelap : terang dapat diatur sesuai dengan keinginan peneliti.

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

4.7.3 Pembuatan Medium Embrionik

Pembuatan 200 ml larutan stok medium embrionik dengan kepekatan 10 kali menggunakan bahan CaCl 0,08 gr; KCl 0,06 gr; NaCl 2 gr; MgSO₄ 3,2 gr dan 200 ml *aquadest* yang dimasukkan dalam tabung reaksi (Advesh *et al.*, 2012). Larutan stok di simpan dalam lemari pendingin pada suhu 2 – 8 ° C. Saat akan digunakan, medium embrionik ditambahkan air aqua dengan perbandingan medium embrionik dan air aqua adalah 1:9.

4.7.4 Pembuatan Larutan Timbal

Berdasarkan eksplorasi yang dilakukan selama bulan September – Desember 2018 pada larva zebrafish, ditetapkan konsentrasi timbal sebesar 2,5 ppm. Timbal dalam bentuk serbuk dilarutkan dengan *aquadest*. Langkah awal pembuatan stok timbal asetat trihidrat dengan cara melarutkan serbuk timbal asetat trihidrat 11.38 mg ke dalam *aquadest* sebanyak 3 ml konsentrasi 2,5 ppm. Pembuatan stok 1 sebesar 50 ppm yaitu dengan melarutkan 130 µl stok timbal kemudian dicampurkan dengan *aquadest* hingga mencapai 10 ml. untuk pembuatan stok 2 sebesar 10 ppm yaitu dengan melarutkan 2 ml stok 1 kemudian dicampurkan dengan 10 ml *aquadest*.

Pembuatan konsentrasi timbal asetat trihidrat 2,5 ppm, maka dibuat dengan menggunakan rumus berikut ini :

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

$$\begin{aligned} V_1 \times 10^{-4} &= 5 \times 2500 \\ \frac{V_1}{10^{-4}} &= \frac{5 \times 2500}{10^{-4}} \\ V_1 &= 1,25 \text{ ml} \end{aligned}$$

Keterangan :
 V_1 : Volume awal
 M_1 : Konsentrasi stok
 V_2 : Volume yang diinginkan
 M_2 : Konsentrasi yang diinginkan

Setelah mendapatkan stok 1,25 ml, maka sediaan tersebut ditambahkan dengan medium embrionik sampai 5 ml, sehingga konsentrasi timbal yang didapatkan adalah 2,5 ppm.

4.7.5 Pembuatan Ekstrak Pegagan

Pegagan yang digunakan diperoleh dari UPT Material Medica Batu Jawa Timur yang telah bersertifikat. (Khotimah *et al.*, 2018) mengungkapkan bahwa terdapat zat aktif *asiatocosida* sebesar 0,29 % pada pengukuran kadar *asiatocosida Centella asiatica* menggunakan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) (*Thermo Scientific, Accela*). Bagian dari tanaman yang digunakan untuk pembuatan ekstrak adalah bagian atas tanpa stolon dan akar (Khotimah *et al.*, 2018).

Prosedur pembuatan ekstrak pegagan adalah sebagai berikut :

1. Pegagan dicuci bersih kemudin dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40 ° C.
2. Pegagan yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender.
3. 100 gram serbuk pegagan dimasukkan ke dalam tabung *Erlenmeyer* dan direndam dalam 900 mL larutan ethanol 98 %. Kemudian diaduk selama \pm 30 menit dan didiamkan sampai mengendap selama 24 jam.
4. Lapisan atas rendaman serbuk pegagan (campuran etanol dan zat aktif) diambil dan disaring menggunakan corong buncher.
5. Proses evaporasi dilakukan menggunakan *rotary evaporator* dengan cara memasukkan filtrate ke dalam labu evaporasi 1 L dan dipasang pada evaporator. *Water bath* diisi sampai penuh, dan dipanaskan hingga suhu 70 ° C. Proses evaporasi berlangsung \pm 1,5 – 2 jam.
6. Menimbang dan dimasukkan hasil ekstraksi ke dalam botol plastik kemudian disimpan pada lemari pendingin (*freezer*), berat ekstrak pegagan 1/5 bagian dari berat pegagan kering (Selvi *et al.*, 2012).

4.7.6 Pembuatan Larutan Pegagan

Untuk menentukan dosis pada 3 kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3) menggunakan deret ukur menurut Harmita & Maksum (2008). Konsentrasi larutan pegagan didapatkan dari penelitian sebelumnya oleh Primihastuti (Primihastuti, 2017). Pembuatan larutan pegagan dilakukan dengan menggunakan hasil ekstraksi pegagan dengan konsentrasi pegagan 5 µg/ml. teknik pembuatan larutan pegagan adalah sebagai berikut:

Konsentrasi awal didapatkan dari perhitungan :

$$10 \text{ mg pegagan} : 10 \text{ ml aquadest} = 1 \text{ mg/ml} = 1000 \text{ µg/ml}$$

Untuk membuat konsentrasi 5 µg/ml dengan volume 15 ml digunakan rumus sebagai berikut :

$V_1 \times N_1$	=	$V_2 \times N_2$
$V_1 \times 1000 \text{ µg/ml}$	=	$15 \text{ ml} \times 5 \text{ µg/ml}$
V_1	=	$\frac{15 \text{ ml} \times 5 \text{ µg/ml}}{1000}$
V_1	=	$0,075 \text{ ml} = 75 \text{ µl}$

Keterangan :

- V_1 = volume yang ditambahkan
- N_1 = konsentrasi awal/stok
- V_2 = volume akhir
- N_2 = Konsentrasi akhir

Pengenceran ekstrak etanol pegagan menjadi konsentrasi 5 µg/ml dengan volume 15 ml dapat diambil larutan ekstrak etanol pegagan sebanyak 75 µl dari stok dengan menggunakan mikropipet ditambahkan embrionik medium sampai 15 ml.

4.7.7 Pemberian Larutan Timbal dan Ekstrak Pegagan

Pemberian larutan timbal dan ekstrak pegagan diberikan dalam waktu yang sama :

1. Kontrol positif (KP)

Larutan timbal 2,5 ppm dibuat dengan mengambil timbal sebanyak 1,25 ml dari stok timbal 3,75 ml Kemudian ditambahkan dengan medium embrionik sampai dengan 5 ml. Larutan tersebut dimasukkan dalam 1 sumuran.

2. Kelompok Perlakuan

Larutan timbal dan ekstrak pegagan dibuat dengan menggunakan rumus

$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$ dan didapatkan hasil perhitungan sebagai berikut :

Tabel 4.3 Konsentrasi Timbal dan Pegagan

Nama	Konsentrasi yang diminta		Stok Timbal ml	Stok Pegagan μ L	Embrionik Medium ml	Jumlah well	Tiap well ml
	Timbal mg/L	Pegagan μ g/ml					
P1	2.5	1,25	3,75	18,75	15	3	5
P2	2.5	2,5	3,75	37,5	15	3	5
P3	2.5	5	3,75	75	15	3	5

4.7.8 Pengukuran Taktil Motilitas

Untuk setiap kelompok, 5 larva yang berbeda dipilih secara acak.

Pengukuran taktil motility pada usia 3 dpf berdasarkan modifikasi (Goody *et al.*, 2012) dengan prosedur sebagai berikut :

1. *Well Plate* 4 x 6 berisi medium embrionik
2. Larva zebrafish dimasukkan ke dalam well dengan menggunakan pipet plastik.
3. Ekor larva zebrafish disentuh menggunakan jarum kecil (poker).

4.7.9 Pengukuran Aktivitas Lokomotor

Kemampuan lokomotor larva zebrafish sudah dimulai pada usia 96 *hpf* (Granato *et al*, 1996) untuk menghitung pergerakannya digunakan perhitungan jarak tempuh per menit (De Esch *et al*, 2012).

Untuk setiap kelompok, 5 embrio yang berbeda dipilih secara acak.

Pengukuran aktivitas lokomotor pada usia 4,5 dan 6 dpf berdasarkan modifikasi

(Goody *et al.*, 2012) dengan prosedur sebagai berikut :

1. Kertas pola diletakkan di bawah well plate..
2. *Well Plate* 12 sumuran dipusatkan pada kertas pola.
3. *Well plate* diisi dengan medium embrionik sebanyak 5 ml.
4. Larva zebrafish dimasukkan ke dalam well plate dengan menggunakan pipet. Masing-masing sumuran diisi 1 larva zebrafish
5. Dalam 1 *well plate* diisi dengan larva zebrafish dengan kelompok perlakuan yang sama.
6. *Well plate* yang sudah terisi larva dan medium embrionik diletakkan ditempat yang terang.
7. Kamera diletakkan pada tripod diletakkan diatas well plate yang terisi larva zebrafish untuk merekam aktivitas lokomotor.
8. Perekaman video dilakukan selama 10 menit (Ingebretson & Marsino, 2013).
9. Video yang dihasilkan dianalisis dengan menghitung gerakan larva zebrafish melewati garis (x/menit) selain itu menganalisis pola pergerakan larva zebrafish dengan menggunakan software image J.

4.7.10 Pengukuran Kadar Dopamin

Saat larva zebrafish berusia 6 dpf kemudian dilakukan euthanasia dengan cara memasukkan 30 larva ke dalam ependorf setelah itu direndam di air es

dengan perbandingan air dan es (1:5) minimal 10 menit. Pemeriksaan ELISA menggunakan ELISA kit dengan merk Elabscience No.Cat E-EI-0046. Prosedur pemeriksaan sebagai berikut :

1. Persiapan reagen :
 - a. Semua reagen diletakkan pada suhu ruangan sebelum digunakan
 - b. Mengencerkan wash buffer 30 ml dengan 720 ml deionized water sehingga menjadi 750 ml wash buffer.
 - c. Standar disentrifugasi selama 1 menit 10.000 g kemudian tambahkan 1 ml reference standard dan sampel diluent, kemudian diamkan selama 10 menit setelah itu diaduk ringan dengan pipet.
 - d. Menghitung jumlah yang diperlukan (50 µl/well).
2. Melakukan homogenisasi sampel dengan menggunakan micropestle.
3. Menambahkan larutan standar ke dalam dua kolom pertama. Setiap konsentrasi larutan ditambahkan rangkap masing-masing satu sumur. Tambahkan sampel ke sumur lainnya masing-masing 50 µl. segera tambahkan 50 µl larutan Biotinylated Detection Ab ke dalam masing-masing well. Tutup dengan sealer yang terdapat dalam kit. Inkubasi selama 45 menit pada suhu 37 °C.
4. Menuangkan larutan dari masing-masing well, kemudian tambahkan 350 µl wash buffer. Rendam selama 1-2 menit kemudian menuangkan larutan yang ada di dalam well sambil di tepuk-tepuk diatas kertas penyerap yang bersih. Proses ini dilakukan sebanyak 3 kali.
5. Menambahkan 100 µl *HRP Conjugate* kemasing-masing well kemudian tutup dengan sealer dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C.
6. Melakukan aspirasi atau menuang larutan dari masing-masing sumur kemudian ulangi proses pencucian hingga 5 kali.

7. Menambahkan 90 μ l *substrat reagen* ke setiap well. Tutup dengan *sealer* baru kemudian inkubasi selama 15 menit pada suhu 37 °C. Hindari dari cahaya.
8. Menambahkan 50 μ l *stop solution* pada masing-masing well.
9. Menentukan kepadatan optic dari setiap well dengan *micro plate reader* pada gelombang 450 nm.

4.7.11 Pengukuran Ekspresi Tirosin Hidroksilase

Pengukuran ekspresi tirosin hidroksilase menggunakan metode *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* dengan tahapan sebagai berikut :

1. Mempersiapkan sampel untuk isolasi RNA :
Memasukkan larva zebrafish yang berusia 6 dpf kedalam tabung *centrifuge* 15 ml sesuai dengan kelompok perlakuan kemudian diberi label pada masing-masing tabung
2. Mempersiapkan bahan untuk isolasi RNA dengan RNA Mini Kit merk Geneaid No. Cat RT-100 :
 - a. Menambahkan ethanol 100 % (absolut) sebanyak 100 ml ke dalam *wash buffer* 25 ml
 - b. Membuat larutan ethanol 70 % dengan cara mencampurkan ethanol 100 % sebanyak 21 ml dengan aquadest sebanyak 9 ml
3. Melakukan ekstraksi RNA :
 - a. Memindahkan larva yang berada di dalam tabung *centrifuge* 15 ml ke dalam tabung *ependorf* 1.5 ml sesuai dengan masing-masing kelompok perlakuan.
 - b. Memberi label pada tabung *ependorf*.
 - c. Melakukan sentrifugasi pada kecepatan 14.000 selama 1 menit pada suhu ruang.
 - d. Membuang cairan yang terdapat dalam tabung *ependorf*.

4. Melakukan tahapan cell lysis :

- a. Menambahkan 400 μ l RB *buffer* pada masing-masing tabung eppendorf
- b. Melakukan homogenisasi larva zebrafish dengan menggunakan micropestle agar sampel menjadi homogeny.
- c. Menambahkan 4 μ l 2-mercaptoethanol pada tiap tabung eppendorf.
- d. Memvortex tabung eppendorf hingga 2-mercaptoethanol tercampur dengan sampel.
- e. Memindahkan cairan yang terdapat dalam tabung eppendorf ke dalam *column filter* 2 ml.
- f. Melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 100 x g selama 30 detik
- g. Memindahkan supernatan ke dalam tabung eppendorf baru kemudian menambahkan 400 μ l ethanol 70 % pada masing-masing tube.
- h. Memindahkan cairan ke dalam RB column lalu sentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 14 – 16.000 x g, kemudian membuang cairan yang ada dan mengambil peletnya.
- i. Menambahkan 400 μ l *wash buffer* pada tipa RB column.
- j. Melakukan sentrifugasi pada kecepatan 14 – 16.000 x g selama 1 menit.
- k. Membuang cairan yang terdapat dalam RB column, kemudian menambahkan 600 μ l *wash buffer* yang telah ditambah ethanol lalu sentrifugasi selama 30 detik pada kecepatan 14.000 x g.
- l. Menambahkan kembali 600 μ l *wash buffer* lalu sentrifugasi 30 detik pada kecepatan 14.000 x g lalu membuang cairan yang terdapat dalam RB column.

- m. Melakukan sentrifugasi tabung selama 3 menit pada kecepatan 14 – 16.000 x g agar tabung RB column menjadi kering.
- n. Memindahkan filter RB column kedalam tabung eppendorf 1.5 ml lalu menambahkan RNase free water sebanyak 50 µl lalu diamkan selama 2 menit.
- o. Melakukan sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 14.000 x g
5. Melakukan pemeriksaan kemurnian RNA dengan menggunakan nanodrop spektrofotometer dengan merk Bio-Rad Nano Drop 200 :
- Memasukkan 2 µl cairan isolasi RNA pada nanodrop spektrofotometer, kemudian membaca kemurnian RNA yang terdapat pada layar.
 - Kemurnian yang digunakan pada isolasi RNA adalah 1.8 – 2.0
 - Untuk konsentrasi yang bagus untuk digunakan adalah 10 – 50 ng/µl.
6. Sintesis cDNA menggunakan kit merk Toyobo FSQ-301:
- Menghitung stok agar semua sampel dalam konsentrasi yang sama
 - Mereaksikan gDNA dengan cara mencampur 264 4x DNA master mix dengan 5,4 gDNA
 - Memasukkan stok yang kemudian ditambah diasetilasi water dengan total volume 10 µl
 - Melakukan denaturasi sampel selama 5 menit pada suhu 65° C lalu letakkan diatas es
 - Menambahkan 20 µl reaksi gDNA (pada lankah 2) dan 50 µl Nuclease free water
 - Melakukan inkubasi pada suhu 37° C selama 5 menit
 - Menambahkan 20 µl 5x RT Mix II lalu sentrifugasi
 - Melakukan inkubasi pada suhu 37° C selama 15 menit, pada suhu 50° C selama 5 menit dan suhu 98° C selama 5 menit.

i. Menyimpan sampel dalam suhu -20°C hingga 4°C .

7. Running PCR menggunakan kit dengan merk Thermo Scientific 00642226:

a. Meletakkan sampel di atas es

b. Mengambil nuclease free water

c. Mengencerkan primer menjadi 100 pmol dari sediaan 100 gr

d. Mencampur antara nuclease free water dan primer

e. Mengambil $1\ \mu\text{l}$ dari stok reverse dan forward, jadikan satu dalam PCR tube.

f. Menambahkan PCR mix $12,5\ \mu\text{l}$

g. Menambahkan sampel sebanyak $3\ \mu\text{l}$

h. Menambahkan $7.5\ \mu\text{l}$ nuclease free water sehingga total menjadi $25\ \mu\text{l}$

i. Menutup pCR tube

j. Memasukkan ke dalam mesin running PCR dengan suhu 62°C

8. Elektroforesis :

a. Membuat agarose $1,5\%$

b. Memindahkan gel beserta cetakannya ke dalam DNA elektroforesis chamber

c. Memasukkan sampel ke masing-masing well, total volume $6\ \mu\text{l}$ (dengan perbandingan sampel dan loading sye = $5\ \mu\text{l}$ sampel + $1\ \mu\text{l}$ loading dye)

d. Menggunakan marker 100 bp . Memasukkan DNA ladder ke dalam well dengan volume $3\ \mu\text{L}$ di tambah dengan loading dye dengan volume $1\ \mu\text{L}$.

e. Running elektroforesis pada tegangan 80 v selama 40 menit

- f. Visualisasi DNA dengan menggunakan program Geldoc melalui Bio-Rad Gel Doc Imaging System.

4.8 Pengolahan dan Analisis Data

Pengolahan data akan dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 23.0. tingkat kepercayaan yang digunakan adalah 95 % dengan nilai $p < 0,05$.

Data akan dianalisis dengan menggunakan uji statistika, yaitu :

1. Uji normalitas data dilakukan dengan uji Shapiro Wilk. Data dikatakan berdistribusi normal jika $p \text{ value} > 0,05$.
2. Uji homogenitas data dilakukan dengan *levene's test*. Jika $p \text{ value} > 0,05$ maka data memiliki varians yang sama (homogen).
3. Untuk menguji perbedaan pengaruh ekstrak etanol pegagan terhadap ekspresi tirosin hidroksilase, kadar dopamin dan aktivitas lokomotor antar masing-masing kelompok (KP, P1, P2 dan P3) dilakukan 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 LSD (Least Signifikan Difference)*. Tujuan uji *Post-Hoc LSD* adalah untuk mengetahui pada kelompok manakah terdapat perbedaan yang bermakna, sehingga dapat diketahui berapa lama waktu pemberian ekstrak pegagan berpengaruh pada masing-masing variabel dependen yang diuji.
4. Jika syarat uji *One Way Anova* tidak terpenuhi, maka analisis yang digunakan adalah *Kruskal-Wallis*.
5. Uji korelasi dilakukan menggunakan uji korelasi *Spearman*. Jika $p \text{ value} < 0,05$ maka dapat diinterpretasikan terdapat korelasi yang bermakna antara dua variabel yang diuji.

Interpretasi uji hipotesis berdasarkan kekuatan korelasi dan arah korelasi dapat dilihat pada tabel 4.9

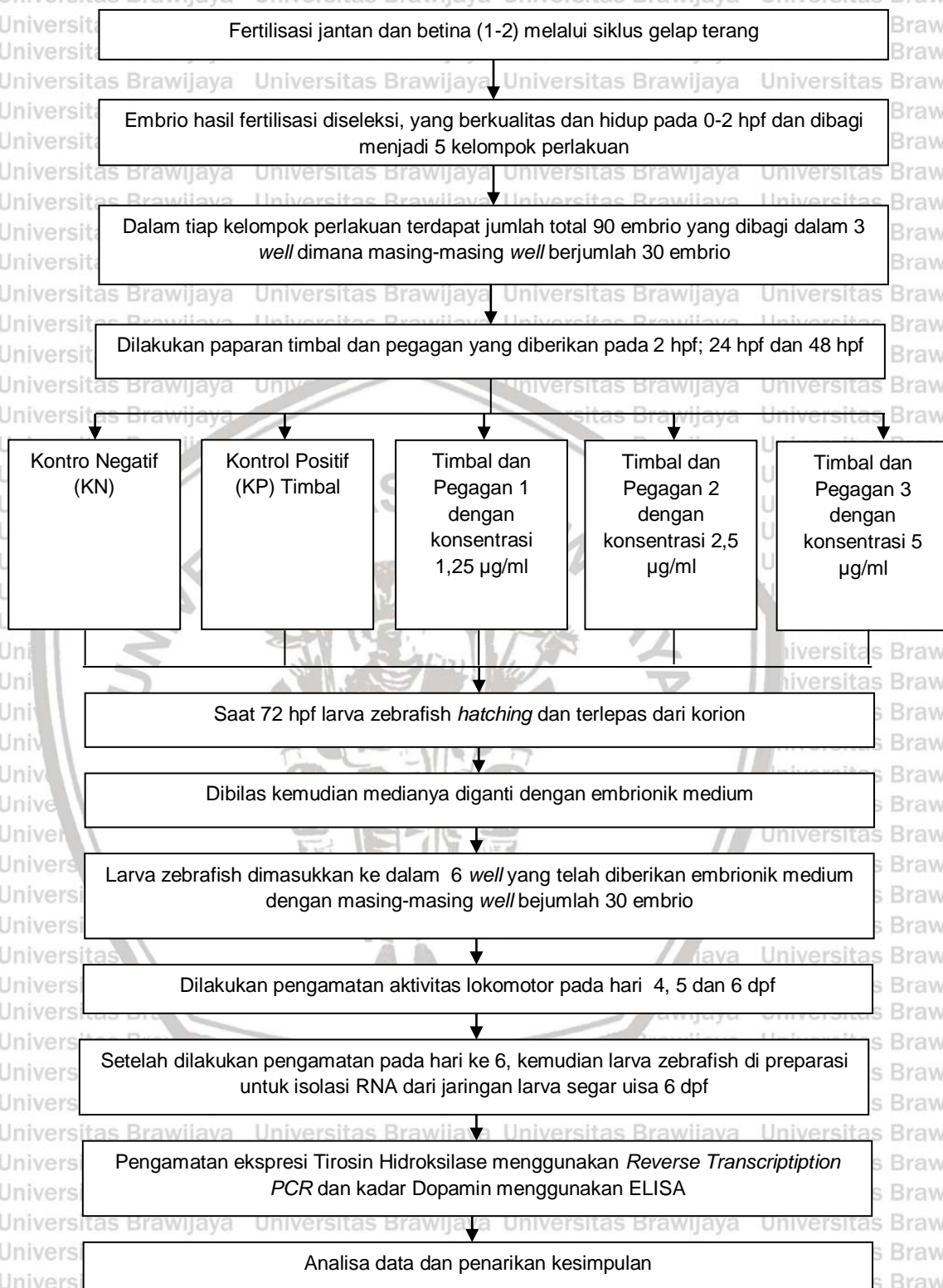
Tabel 4.10 Kekuatan Korelasi dan Arah Korelasi

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

(Dahlan, 2011)



4.9 Alur Penelitian



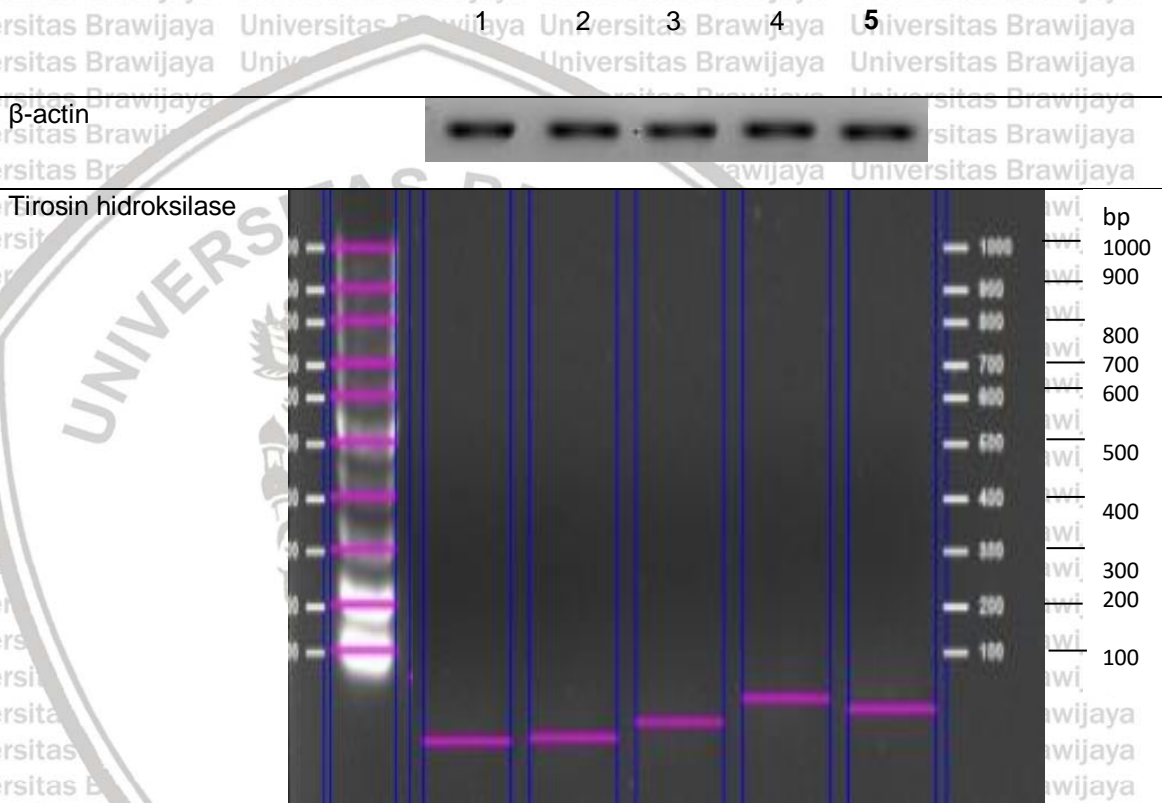
Gambar 4.1 Alur Penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Ekspresi Tirosin Hidroksilase pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf yang Dipapar Timbal dan diberi Ekstrak Pegagan

Pemeriksaan ekspresi tirosin hidroksilase pada larva zebrafish dilakukan saat usia 6 dpf dengan menggunakan metode *Reverse Transcription PCR*.



Gambar 5.1 β -actin dan Ekspresi Tirosin Hidroksilase Pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf yang Dipapar Timbal dan diberi Ekstrak Pegagan.

Keterangan: Band 1 merupakan kontrol negatif, (larva zebrafish tanpa diberi paparan), band 2 kontrol positif (timbal 2.5 ppm), band 3 kelompok P1 (timbal dan pegagan 1.25 μ g/ml), band 4 kelompok P2 (timbal dan pegagan 2.5 μ g/ml) dan band 5 kelompok P3 (timbal dan pegagan 5 μ g/ml).

Kelompok

Representasi

KN

KP (timbangan 2.5 ppm)

P1 (timbangan + pegangan 1.25 µg/ml)

P2 (timbangan + pegangan 2.5 µg/ml)

P3 (timbangan + pegangan 5 µg/ml)



Gambar 5.2 Kuantifikasi Gel Doc pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf yang Dipapar Timbal dan diberi Ekstrak Pegagan.

Keterangan:

Kurva 1 menunjukkan kelompok kontrol negatif (larva zebrafish tanpa diberi paparan), kurva 2 menunjukkan kontrol positif (timbangan 2.5 ppm), kurva 3 menunjukkan perlakuan 1 (timbangan dan pegangan 1.25 µg/ml), kurva 4 menunjukkan perlakuan 2 (timbangan dan pegangan 2.5 µg/ml) dan kurva 5 menunjukkan perlakuan 3 (timbangan dan pegangan 5 µg/ml)

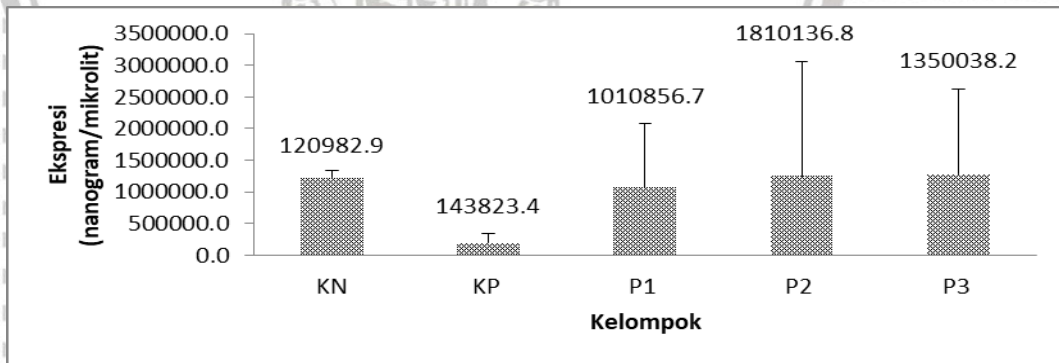
Uji normalitas *Shapiro Wilk* terhadap data ekspresi tirosin hidroksilase diperoleh *p-value* 0.090, hal tersebut menunjukkan bahwa data terdistribusi normal. Hasil uji homogenitas menggunakan *Lavene's Test* menghasilkan *p-value* 0.018 sehingga dikatakan data tidak homogen sehingga analisis statistik yang digunakan adalah *Kruskal Wallis*. Berdasarkan uji *Kruskal Wallis* diperoleh *p-value* 0.371, sehingga dikatakan tidak terdapat perbedaan signifikan antar kelompok. Hasil ekspresi tirosin hidroksilase dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.1 Ekspresi Tirosin Hidroksilase pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf Yang Dipapar Timbal dan diberi Ekstrak Pegagan

Kelompok Perlakuan	Rerata ± SD	p-value
Kontrol negatif	1224534.7 ± 120982.9	0.371 > α
Kontrol positif	191643.3 ± 143823.4	
P1	1068834.3 ± 1010856.7	
P2	1249855.0 ± 1810136.8	
P3	1278141.0 ± 1350038.2	

Keterangan : Rerata ± SD menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} > \alpha$). Rerata ± SD ekspresi tirosin hidroksilase pada larva zebrafish kelompok kontrol negatif (larva zebrafish tana diberi paparan) lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (larva zebrafish yang diberi timbal 2.5 ppm), sedangkan rerata ± SD kelompok kontrol positif lebih rendah bila dibandingkan dengan rerata ± SD kelompok P1 (timbal dan pegagan 1.25 µg/ml), kelompok P2 (timbal dan pegagan 2.5 µg/ml) dan kelompok P3 (timbal dan pegagan 5 µg/ml).

Berdasarkan tabel 5.1 terlihat perbedaan rerata antara kelompok kontrol positif dengan kelompok P1, P2 dan P3. Pada kontrol positif (larva zebrafish yang dipapar timbal 2.5 ppm) tampak rerata (191643.3), namun pada kelompok P1 terjadi peningkatan rerata menjadi (1068834.3), kelompok P2 (1249855.0) dan pada kelompok P3 (1278141.0). Hal ini berarti terjadi peningkatan ekspresi tirosin hidroksilase pada larva zebrafish yang dipapar timbal usia 6 dpf.



Gambar 5.3 Standar Deviasi Ekspresi Tirosin Hidroksilase pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf yang Dipapar Timbal dan diberi Ekstrak Pegagan.

Keterangan: Pada kelompok kontrol positif (larva zebrafish yang dipapar timbal 2.5 ppm) standar deviasi ekspresi tirosin hidroksilase sebesar (± 143823.4), namun terjadi peningkatan pada kelompok P1 (timbal dan pegagan 1.25 µg/ml) menjadi (± 1010856.7). Pada kelompok P2 (timbal dan pegagan 2.5 µg/ml) memiliki standar deviasi tertinggi (± 1810136.8) sedangkan pada kelompok P3 (timbal dan pegagan 5 µg/ml) memiliki standar deviasi (± 1350038.2).

Gambar 5.3 menunjukkan standar deviasi ekspresi tirosin hidroksilase pada kontrol negatif (larva zebrafish yang tidak diberi perlakuan), kontrol positif (larva zebrafish yang dipapar timbal 2.5 ppm), dan 3 kelompok perlakuan pada larva zebrafish yang diberi paparan timbal dan ekstrak pegagan dengan konsentrasi 1.25 µg/ml, 2.5 µg/ml dan 5 µg/ml. Standar deviasi ekspresi tirosin hidroksilase terendah terdapat pada kontrol positif (± 143823.4). Hal tersebut menunjukkan bahwa paparan timbal pada larva zebrafish menyebabkan penurunan pada ekspresi tirosin hidroksilase, sedangkan pada kelompok P1, P2 dan P3 terjadi peningkatan ekspresi tirosin hidroksilase seiring dengan peningkatan pemberian konsentrasi ekstrak etanol pegagan dengan konsentrasi yang berbeda.

5.2 Kadar Dopamin pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf yang Dipapar Timbal dan diberi Ekstrak Pegagan

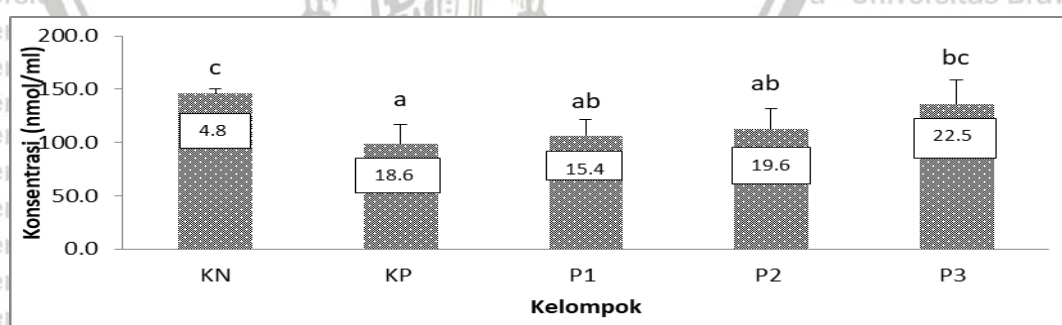
Hasil pengujian normalitas terhadap kadar dopamin menunjukkan nilai *p-value* sebesar 0.428 sehingga dikatakan data terdistribusi normal. Pengujian homogenitas terhadap kadar dopamin menunjukkan nilai *p-value* sebesar 0.448 sehingga dinyatakan memiliki ragam data yang homogen. Setelah data terdistribusi normal dan homogen kemudian dianalisis dengan menggunakan uji *one way Anova*. Berdasarkan uji *one way Anova* yang telah dilakukan nilai *p-value* sebesar 0.031 ($p < 0.05$). Hasil uji *one way Anova* dapat terlihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 5.2 Kadar Dopamin pada Larva Zebrafish usia 6 dpf yang Dipapar Timbal dan diberi Ekstrak Pegagan

Kelompok perlakuan	Rerata ± SD	p-value
Kontrol negatif	146.0 ± 4.8	0.031 > α
Kontrol positif	98.1 ± 18.6	
P1	106.3 ± 15.4	
P2	112.1 ± 19.6	
P3	135.9 ± 22.5	

Keterangan : Rerata ± SD menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} < \alpha$). Rerata ± SD kadar dopamin pada larva zebrafish kelompok kontrol negatif (larva zebrafish tanpa diberi paparan) lebih tinggi bila dibandingkan dengan rerata ± SD kelompok kontrol positif (larva zebrafish yang diberi timbal 2.5 ppm), sedangkan rerata ± SD kelompok kontrol positif lebih rendah bila dibandingkan dengan rerata ± sd kelompok P1 (timbal dan pegagan 1.25 µg/ml), kelompok P2 (timbal dan pegagan 2.5 µg/ml) dan kelompok P3 (timbal dan pegagan 5 µg/ml)

Berdasarkan tabel 5.2 menunjukkan standar deviasi kadar dopamin pada kontrol negatif (larva zebrafish yang tidak diberi perlakuan), kontrol positif (larva zebrafish yang dipapar timbal 2.5 ppm), dan 3 kelompok perlakuan pada larva zebrafish yang diberi paparan timbal dan ekstrak pegagan dengan konsentrasi 1.25 µg/ml, 2.5 µg/ml dan 5 µg/ml. Rerata ± SD pada kelompok kontrol positif sebesar (98.1 ± 18.6) sedangkan pada kelompok P1 (106.3 ± 15.4), kelompok P2 (112.1 ± 19.6) dan kelompok P3 (135.9 ± 22.5).



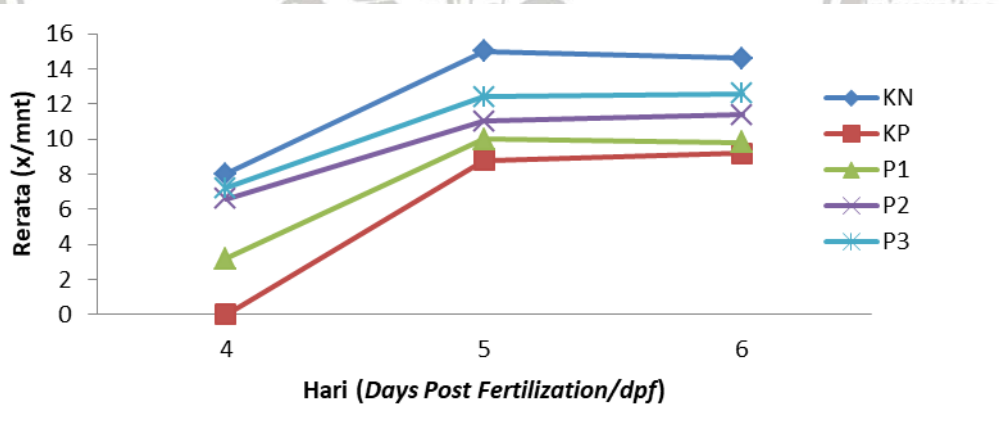
Gambar 5.4 Standar Deviasi Kadar Dopamin pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf yang Dipapar Timbal dan diberi Ekstrak Pegagan

Keterangan: Pada kelompok kontrol positif (larva zebrafish yang dipapar timbal 2.5 ppm) standar deviasi kadar dopamin sebesar (± 18.6), pada kelompok P1 (timbal dan pegagan 1.25 µg/ml) standar deviasi (± 15.4), kelompok P2 (timbal dan pegagan 2.5 µg/ml) memiliki standar deviasi sebesar (± 19.6) sedangkan pada kelompok P3 (timbal dan pegagan 5 µg/ml) memiliki standar deviasi (± 22.5).

Gambar 5.4 menunjukkan rerata kadar dopamin pada larva zebrafish yang tidak diberi perlakuan (kontrol negatif), larva zebrafish yang dipapar timbal 2.5 ppm serta 3 kelompok larva zebrafish yang dipapar timbal dan pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dengan konsentrasi 1,25 µg/ml, konsentrasi 2,5 µg/ml dan konsentrasi 5 µg/ml. Tampak rerata ± sd kadar dopamin terendah pada kelompok kontrol positif (98.11 ± 18.6). Perbandingan antar kelompok perlakuan menyebutkan bahwa P1 memiliki rata-rata kadar dopamin yang paling rendah (106.27 ± 15.4), kemudian kelompok P2 (112.07 ± 19.6) dan P3 memiliki rata-rata kadar dopamin yang paling tinggi (135.87 ± 22.5).

5.3 Aktivitas Lokomotor pada Larva Zebrafish Usia 4-6 dpf yang Dipapar Timbal dan diberi Ekstrak Pegagan

Pengamatan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish dilakukan mulai usia 4 dpf hingga 6 dpf. Dari hasil pengamatan yang dilakukan dapat dilihat pada gambar di bawah ini :


















Gambar 5.5 Rerata Aktivitas Lokomotor Pada Larva Zebrafish Usia 4-6 dpf yang Dipapar Timbal dan diberi Ekstrak Pegagan.

Keterangan : Kelompok kontrol positif (larva zebrafish yang papar timbal 2.5 ppm) menunjukkan rerata lokomotor yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (larva zebrafish tanpa diberi perlakuan) dan kelompok P1 (timbal dan pegagan 1.25 µg/ml) kelompok P2 (timbal dan pegagan 2.5 µg/ml) serta kelompok P3 (timbal dan pegagan 5 µg/ml).. Rerata lokomotor larva zebrafish mengalami peningkatan mulai usia 5 dpf dan 6 dpf.

Gambar 5.5 menunjukkan adanya perbedaan rerata aktivitas lokomotor pada kontrol negatif, kontrol positif serta kelompok perlakuan. Pada larva zebrafish usia 4 dpf kelompok kontrol positif (larva zebrafish tanpa diberi paparan) tidak terdapat pergerakan. Kelompok P1 (timbangan dan pegangan 1.25 µg/ml), P2 (timbangan dan pegangan µg/ml) dan P3 (timbangan dan pegangan 5 µg/ml) mengalami pergerakan. Pada larva zebrafish usia 5 dpf, terjadi peningkatan aktivitas lokomotor pada semua kelompok, sedangkan pada usia 6 dpf kelompok kontrol negatif dan kelompok P1 mengalami penurunan aktivitas lokomotor, sedangkan pada kelompok kontrol positif, kelompok P2 dan kelompok P3 mengalami peningkatan aktivitas lokomotor.

Tabel 5.3 Representatif Pola Aktivitas Locomotor pada Larva Zebrafish Usia 4-6 dpf yang Dipapar Timbal dan diberi Ekstrak Pegagan

Hari	Keterangan	Kontrol negatif	Kontrol positif (timbangan 2.5 ppm)	P1 (timbangan + pegagan 1.25 µg/ml)	P2 (timbangan + pegagan 2.5 µg/ml)	P3 (timbangan + pegagan 5 µg/ml)	P-Value
4 dpf	Pola pergerakan						
	Rerata ± SD	8 ± 2.4	0 ± 0.0	3.2 ± 2.9	6.6 ± 4.6	7.2 ± 4.3	0.007
5 dpf	Pola pergerakan						
	Rerata ± SD	15 ± 1.6	8.8 ± 0.8	10 ± 2.7	11 ± 2.0	12.4 ± 1.1	0.00
6 dpf	Pola pergerakan						
	Rerata ± SD	14.6 ± 2.1	9.2 ± 0.5	9.8 ± 1.3	11.4 ± 0.9	12.6 ± 2.4	0.02

Keterangan : Rerata ± SD menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} < \alpha$). Rerata ± SD aktivitas lokomotor pada larva zebrafish kelompok kontrol negatif (larva zebrafish tanpa diberi paparan) lebih tinggi bila dibandingkan dengan rerata ± SD kelompok kontrol positif (larva zebrafish yang diberi timbal 2.5 ppm). Rerata ± SD kelompok kontrol positif lebih rendah bila dibandingkan dengan rerata ± SD kelompok P1 (timbangan dan pegagan 1.25 µg/ml), kelompok P2 (timbangan dan pegagan 2.5 µg/ml) dan kelompok P3 (timbangan dan pegagan 5 µg/ml). Pola pergerakan aktivitas lokomotor merupakan representasi data dari hasil pengamatan.

Berdasarkan tabel 5.3 rerata lokomotor terendah terdapat pada kelompok kontrol positif usia 4 dpf sebesar (0 ± 0.0), sedangkan rerata lokomotor tertinggi terdapat pada kontrol negatif usia 6 dpf (14.6 ± 2.1). Pada usia 4 dpf rerata lokomotor kelompok P3 sebesar (7.2 ± 4.3) rerata tersebut mendekati kelompok kontrol negatif (8 ± 2.4). Berdasarkan uji normalitas *Shapiro Wilk* yang dilakukan terhadap aktivitas lokomotor pada larva zebrafish usia 4 dpf, didapatkan nilai *p-value* 0.337 sehingga dikatakan data berdistribusi normal. Pengujian homogenitas *Lavene's test* yang dilakukan menghasilkan nilai *p-value* 0.009, maka data dikatakan tidak homogen. Uji yang digunakan terhadap data lokomotor larva zebrafish usia 4 dpf adalah *Kruskal Wallis*, berdasarkan uji tersebut diperoleh nilai *p-value* sebesar 0.007 sehingga dinyatakan bahwa lokomotor larva zebrafish berbeda signifikan.

Pada larva zebrafish usia 5 dpf, diperoleh nilai *p-value* 0.972 pada uji *Shapiro Wilk* sehingga dinyatakan data berdistribusi normal. Uji homogenitas mendapatkan *p-value* sebesar 0.200 artinya memiliki ragam yang homogen. Berdasarkan uji normalitas dan homogenitas, maka analisis statistik yang dilakukan adalah *one way Anova*. Hasil dari uji tersebut diperoleh *p-value* sebesar 0.000 sehingga dinyatakan bahwa lokomotor larva zebrafish usia 5 dpf berbeda signifikan.

Data lokomotor pada larva zebrafish usia 6 dpf merupakan data yang terdistribusi normal. Hal tersebut didapatkan dari uji normalitas *Shapiro Wilk* dengan *p-value* sebesar 0.813. Hasil uji homogenitas menyebutkan bahwa data tidak homogen (*p-value* 0.011). Berdasarkan hasil uji normalitas serta homogenitas maka analisis statistik yang digunakan adalah *Kruskal Wallis*, dan didapatkan nilai *p-value* sebesar 0.813 sehingga dapat dikatakan bahwa terdapat perbedaan signifikan pada larva zebrafish usia 6 dpf.

Dari pengujian yang telah dilakukan terhadap aktivitas lokomotor pada larva zebrafish usia 4 hingga 6 dpf dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal usia 4 hingga 6 dpf.

5.5 Hasil Uji Korelasi Kadar Dopamin dan Aktivitas Locomotor

Berdasarkan hasil analisis data dari uji korelasi *Spearman* antara kadar dopamin dengan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal usia 6 dpf menunjukkan korelasi yang bermakna secara statistik ($p\text{-value} < 0.05$).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Ekspresi Tirosin Hidroksilase pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf yang Dipapar Timbal dan diberi Ekstrak Pegagan.

Tirosin hidroksilase merupakan enzim yang mengandung hidroksilase asam amino aromatik, fenilalanin hidroksilase dan triptofan hidroksilase. Enzim ini merupakan protein non-heme yang berfungsi untuk mengkatalisis hidroksilasi tirosin menjadi L-DOPA selain itu juga berfungsi sebagai pembatas laju sintesis katekolamin. Ketika kebutuhan neurotransmitter meningkat pada sinaps katekolaminergik, maka tirosin hidroksilase diaktifkan untuk membuat lebih banyak DOPA yang dikarboksilasi ke dopamin kemudian di transfer ke vesikel sinaptik oleh transport monomina vesikuler (VMAT). Aktivitas enzim tirosin hidroksilase harus dipertahankan sesuai dengan kebutuhan (Daubner *et al.*, 2011).

Akumulasi dan konsentrasi timbal dalam tubuh menyebabkan keracunan serta kerusakan sistem saraf. Timbal menggantikan kalsium dan masuk ke dalam tubuh melalui kanal kalsium yang distimulasi oleh G-Protein. Di dalam sel timbal akan berikatan dengan *calmodulin* sehingga terjadi peningkatan kalsium intraseluler (Flora *et al.*, 2012). Pada mitokondria timbal dapat menyebabkan terjadinya perubahan dan merangsang depolarisasi (He *et al.*, 2000). Kerusakan yang terjadi pada mitokondria akan mengakibatkan peningkatan radikal bebas serta menyebabkan kematian sel. Peningkatan radikal bebas serta kerusakan mitokondria akan menyebabkan peningkatan ROS seperti superoksida (O_2^-), hydrogen peroksida (H_2O_2) serta hidroksil (OH^-) (Ahamed & Siddiqui., 2007). ROS yang meningkat akan mempengaruhi sistem dopaminergik melalui aksinya pada tirosin hidroksilase (Leret, *et al.*, 2003). Peningkatan kalsium akan

menyebabkan aktivasi berbagai kinase sehingga akan memfosforilasi serin pada tirosin hidroksilase. Fosforilasi yang terjadi menyebabkan regulasi tirosin hidroksilase mengalami perubahan (Meiser *et al.*, 2013). Tikus yang mengalami keracunan timbal akan mengalami penurunan ekspresi dan aktivitas tirosin hidroksilase sehingga mengakibatkan penurunan dopamin (Devi, 2015).

Tamegart, *et al.* (2018) menyebutkan bahwa paparan timbal secara akut pada tikus akan mengakibatkan penurunan hidroksilase sehingga mengakibatkan penurunan aktivitas lokomotor dan hipoaktivitas.

Pegagan memiliki kandungan triterpen yang berfungsi sebagai antioksidan (Flora *et al.*, 2012). Triterpen pada pegagan memiliki kandungan aktif seperti *asiaticoside*, *madecassoside*, *asiatic acid* dan *madecassic acid* (Zeng & Kim., 2007). (Hanum, 2016) menyatakan bahwa pemberian ekstrak pegagan dengan konsentrasi berbeda dapat meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase di otak zebrafish yang diinduksi rotenon. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Xu *et al.*, (2012) menyatakan bahwa kandungan *madecassoside* pada pegagan terbukti dapat meningkatkan ekspresi BDNF sehingga tidak terjadi apoptosis.

Pegagan mampu menurunkan mediator inflamasi, malondialdehyde serta dapat meningkatkan kadar enzim antioksidan termasuk *superoksida dismutase*, *glutathione* serta *catalase* Choi *et al.* (2016). Pegagan berfungsi sebagai *scavenger* dari radikal bebas (Sugunabai *et al.*, 2015), selain itu kandungan *quarcetin* pada pegagan berfungsi sebagai *chelator* ion logam berat (Symonowicz, 2012).

6.2 Kadar Dopamin pada Larva Zebrafish Usia 6 dpf yang dipapar Timbal dan diberi Ekstrak Pegagan.

Dopamin merupakan katekolamin neurotransmitter yang terdapat pada hewan vertebrata dan invertebrata. Dopamin diproduksi di beberapa area otak termasuk substansia nigra dan daerah tegmental ventral, selain itu juga merupakan neurohormon yang dikeluarkan hipotalamus (Park *et al.*, 2007).

Tirosin diubah menjadi 3-4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) oleh enzim tirosin hidroksilase, kemudian L-DOPA diubah menjadi dopamin oleh enzim asam amino aromatik dekarboksilase (AAD). Dopamin yang telah terbentuk disimpan dalam granula di akhir saraf presinaptik dan akan dilepas ketika ada rangsangan. Pengaktifan lima jenis reseptor dopamin dilakukan setelah ada aktivasi dari enzim terkait. Dopamin memiliki fungsi dalam mengatur gerakan, belajar, memori, emosi, kesenangan, tidur dan kognisi (Jones *et al.*, 2010). Salah satu peran utama dopamin adalah mempengaruhi otak yang mengontrol gerakan dan keseimbangan. Jika kekurangan dopamin akan menyebabkan berkurangnya kontrol pergerakan.

Akumulasi timbal dapat menyebabkan edema serebral sehingga menghasilkan perubahan regional dan penurunan dopamin, serotonin serta metabolit lainnya di korteks, hipokampus, hipotalamus basal dan medial (Lestari, 2004). Timbal akan mempengaruhi neurotransmitter dopaminergik (Minnema *et al.*, 1986). Hasil penelitian membuktikan bahwa paparan timbal akan mengganggu sistem dopaminergik melalui aksinya pada tirosin hidroksilase (Leret *et al.*, 2003). Hal tersebut mengakibatkan penurunan produksi dopamin sehingga mengakibatkan gangguan terhadap pergerakan. Tamegart *et al.* (2018) menyebutkan bahwa paparan timbal secara akut pada tikus mengakibatkan penurunan pada tirosin hidroksilase, dopamin serta aktivitas lokomotor dan hipoaktivitas.

Pemberian ekstrak etanol pegagan dengan konsentrasi yang berbeda menunjukkan peningkatan kadar dopamin pada larva zebrafish yang dipapar timbal. Kandungan triterpen yang dimiliki pegagan berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi yang mampu mencegah stress oksidatif serta untuk membersihkan radikal bebas (Khotimah *et al.*, 2010). Kandungan asiaticoside pada pegagan terbukti dapat meningkatkan konsentrasi *glutathione* (GSH) sehingga berefek pada peningkatan dopamin (Xu *et al.*, 2012). Berdasarkan

penelitian yang dilakukan oleh Ling (2003) menyebutkan bahwa pegagan memiliki efek neuroprotektan yang dapat mengurangi stress oksidatif serta melindungi neuron dopaminergik.

6.3 Aktivitas Lokomotor pada Larva Zebrafish Usia 4 - 6 dpf yang Dipapar Timbal dan diberi Ekstrak Pegagan.

Gerak lokomotor merupakan salah satu domain dari gerak dasar yang bersifat fundamental (*fundamental basic movement*) (Gallahue *et al.*, 2006).

Lokomotor berkembang dari hasil respon terhadap stimulus yang mempengaruhi sensorik di kulit dan kinestetik dimana hal tersebut merupakan rangsangan pada ekstremitas. Gerakan lokomotor merupakan dasar bagi perkembangan koordinasi dimana gerakan tersebut melibatkan saraf, otak, tulang, sendi dan otot yang saling bekerjasama dan saling menunjang untuk melakukan kegiatan atau pergerakan (Syaifuddin, 2009).

Timbal merupakan salah satu logam berat yang bersifat toksik dan dapat mengakibatkan keterlambatan perkembangan (Ulfah, 2014). Devi (2015) menyebutkan bahwa tikus yang mengalami keracunan timbal akan mengalami penurunan ekspresi dan aktivitas tirosin hidroksilase sehingga mengakibatkan penurunan dopamin. Penurunan dopamin akan mengakibatkan penurunan aktivitas lokomotor dan hipoaktivitas (Tamegart *et al*, 2018). Dopamin memiliki banyak fungsi fisiologis yang penting seperti kontrol gerakan, kognisi serta sekresi neuroendokrin (Khotimah *et al.*, 2015).

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tanaman herbal yang biasa digunakan untuk pengobatan tradisional. Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan, pegagan memiliki fungsi *neutropic* yaitu melindungi otak dari kerusakan yang diakibatkan peningkatan usia, menginduksi pertumbuhan sel-sel neuron serta mempunyai efek sebagai antioksidan serta antiinflamasi yang mampu mencegah stress oksidatif serta membersihkan radikal bebas (Khotimah *et al.*, 2010). Kandungan utama yang terdapat pada pegagan adalah triterpenoid,

selain itu pegagan juga mengandung flavonoid. Flavonoid dalam pegagan memiliki aglikon flavanol, dan di dalam flavanol terdapat quarcetin yang berfungsi untuk mengikat logam (Sutardi, 2016).

6.4 Hubungan antara Kadar Dopamin serta Aktivitas Lokomotor pada Larva Zebrafish yang Dipapar timbal dan diberi Ekstrak Pegagan

Hasil penelitian membuktikan bahwa kadar dopamin serta aktivitas lokomotor memiliki hubungan kuat. Hal ini membuktikan apabila terjadi peningkatan kadar dopamin maka diikuti dengan peningkatan aktivitas lokomotor, demikian pula sebaliknya jika terjadi penurunan pada dopamin maka akan terjadi penurunan aktivitas lokomotor. Penelitian yang dikemukakan oleh Tamegart *et al.*, (2018) menyebutkan bahwa paparan timbal akan mengakibatkan penurunan tirosin hidroksilase dan dopamin sehingga mengakibatkan penurunan aktivitas lokomotor dan hipoaktivitas.

6.5 Implikasi Hasil Penelitian dalam Asuhan Kebidanan

Pertumbuhan dan perkembangan merupakan faktor penting dalam menentukan kualitas hidup bagi seorang anak. Pertumbuhan dan perkembangan pada anak dimulai sejak terjadinya konsepsi hingga anak berusia 2 tahun (Victoria *et al.*, 2008). Tahapan kehamilan merupakan periode kritis bagi embryogenesis dimana hal tersebut merupakan proses yang kompleks dan melibatkan migrasi sel, pertumbuhan, diferensiasi dan organogenesis. Sensitivitas embrio terhadap cacat morfologi akan meningkat selama periode organogenesis, dimana periode ini merupakan waktu yang penting dalam pengembangan organ. Gangguan yang terjadi saat masa kehamilan akan mengakibatkan keterlambatan pertumbuhan, gangguan fungsional serta *carcinogenesis* (Branch, 2004).

Timbal merupakan salah satu logam berat yang bersifat toksik dan dapat mengakibatkan keterlambatan perkembangan (Ulfah, 2014). Paparan timbal

pada ibu hamil akan berpengaruh pada embrio atau janin yang dikandungnya (Branch, 2004) serta mampu merangsang kerusakan pada otak, jantung, hati, ginjal dan organ reproduksi (Ahamed & Siddiqui, 2007). Di otak, paparan timbal dapat menyebabkan keracunan pada saraf serta mempengaruhi perkembangan yang mengakibatkan gangguan integritas struktural atau fungsional saraf. Akibat yang ditimbulkan oleh paparan timbal antara lain adalah perubahan aktivitas dan gangguan motorik kasar (Dou & Zhang, 2011).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pada embrio zebrafish menunjukkan hasil bahwa paparan timbal mampu menurunkan motorik kasar pada larva zebrafish. Hal ini membuktikan bahwa paparan timbal selama masa kehamilan menyebabkan gangguan fungsional saraf yang tampak pada penurunan lokomotor larva zebrafish yang diamati. Berdasarkan pemeriksaan laboratorium yang dilakukan, kadar dopamin pada larva zebrafish juga mengalami penurunan. Hal tersebut membuktikan adanya korelasi antara dopamin dengan lokomotor yang mengalami gangguan karena paparan timbal.

Sebagai praktisi kesehatan, bidan merupakan salah satu ujung tombak yang berperan dalam peningkatan derajat kesehatan ibu dan bayi. Selama proses kehamilan, persalinan dan nifas, bidan memegang peranan penting dalam memantau kesehatan ibu dan bayi. Program *continuity of care* yang dilakukan oleh bidan merupakan salah satu cara melakukan pemantauan kesehatan bagi ibu dan bayi. Pemantauan yang dilakukan mencakup berbagai hal antara lain seperti kondisi lingkungan, nutrisi yang dikonsumsi ibu serta pertumbuhan dan perkembangan janin selama masa kehamilan hingga anak berusia 2 tahun. Dengan pemantauan yang dilakukan oleh bidan diharapkan dapat meminimalisasi dampak kesehatan yang terjadi pada ibu dan bayi.

Seorang bidan dapat memberikan informasi kesehatan kepada ibu dan keluarga serta memberikan solusi yang baik untuk kesehatan ibu dan bayi.

6.6 Keterbatasan Penelitian

Dalam penelitian ini masih terdapat keterbatasan sehingga penelitian ini kurang sempurna sehingga diharapkan bagi peneliti selanjutnya dapat menyempurnakan sehingga menjadi lebih baik. Beberapa keterbatasan yang dialami oleh peneliti yaitu tidak diuji serapan atom logam berat. Tidak tersedianya alat ukur lokomotor larva zebrafish yang dapat menampilkan jarak tempuh juga merupakan keterbatasan lain yang dihadapi oleh peneliti.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Ekstrak etanol pegagan tidak dapat meningkatkan ekspresi tirosin hidrosilase pada larva zebrafish yang dipapar timbal dan diberi ekstrak pegagan.
2. Ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan kadar dopamin pada larva zebrafish yang dipapar timbal dan diberi ekstrak pegagan.

3. Ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal dan diberi ekstrak pegagan.
4. Tidak terdapat hubungan antara ekspresi tirosin hidroksilase dengan kadar dopamin pada larva zebrafish yang dipapar timbal dan diberi ekstrak pegagan.
5. Terdapat hubungan antara kadar dopamin dengan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal dan diberi ekstrak pegagan.

7.2 Saran

1. Perlu dipertimbangkan untuk penelitian selanjutnya agar dilakukan uji serapan atom logam berat (Atomic Absorption Spectrophotometry/AAS) pada larva zebrafish.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai gangguan lokomotor dengan menggunakan *danioscope*.
3. Perlu dipertimbangkan untuk penelitian selanjutnya agar paparan timbal serta pemberian ekstrak etanol pegagan dapat diberikan pada larva zebrafish hingga usia 6 dpf sebab pada usia tersebut merupakan homolog dengan usia anak 2 tahun.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A. et al., 2012. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive biology and endocrinology*, 10(1), hal.49.
- Ahamed, M. dan Siddiqui, M.K.J., 2007. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clinica chimica acta*, 383(1–2), hal.57–64.
- Anggraini, D., 2007. Analisis Kadar Logam Berat Pb, Cd, Cu dan Zn pda air Laut, Sedimen dan Lokan (*Geloina coxans*) di Perairan pesisir Dumai, Provinsi Riau. *Znanseawaters. pdf*. [Diakses, 14 Maret 2015].
- Arnstein, P.M., 1997. The neuroplastic phenomenon: a physiologic link between chronic pain and learning. *Journal of Neuroscience Nursing*, 29(3), hal.179–187.
- Assadi, S.M., Yücel, M. dan Pantelis, C., 2009. Dopamine modulates neural networks involved in effort-based decision-making. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33(3), hal.383–393.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2007. Toxicological Profile For Lead. Departement of Health And Human Services, U.S

Yilmaz, O. et al., 2017. Scrambled eggs: Proteomic portraits and novel biomarkers of egg quality in zebrafish (*Danio rerio*). *PloS one*, 12(11), hal.e0188084.

Youdim KA, Spencer JP, Schroeter H, Rice-Evans C. (2002). Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol Chem* 383 (3-4): 503-519

Zainuddin, M. 2011. *Metodelogi Penelitian : Pendekatan Praktis dan Aplikatif (Edisi Revisi)*. Bandung : Refika Aditama

Zheng, C.-J. dan Qin, L. (2007) "Chemical components of *Centella asiatica* and their bioactivities." *Journal of Natural Medicines*, 5(3), hal. 348–351

Lampiran 1





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, Fibril Edni Warl, Damal Novlasari, 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!

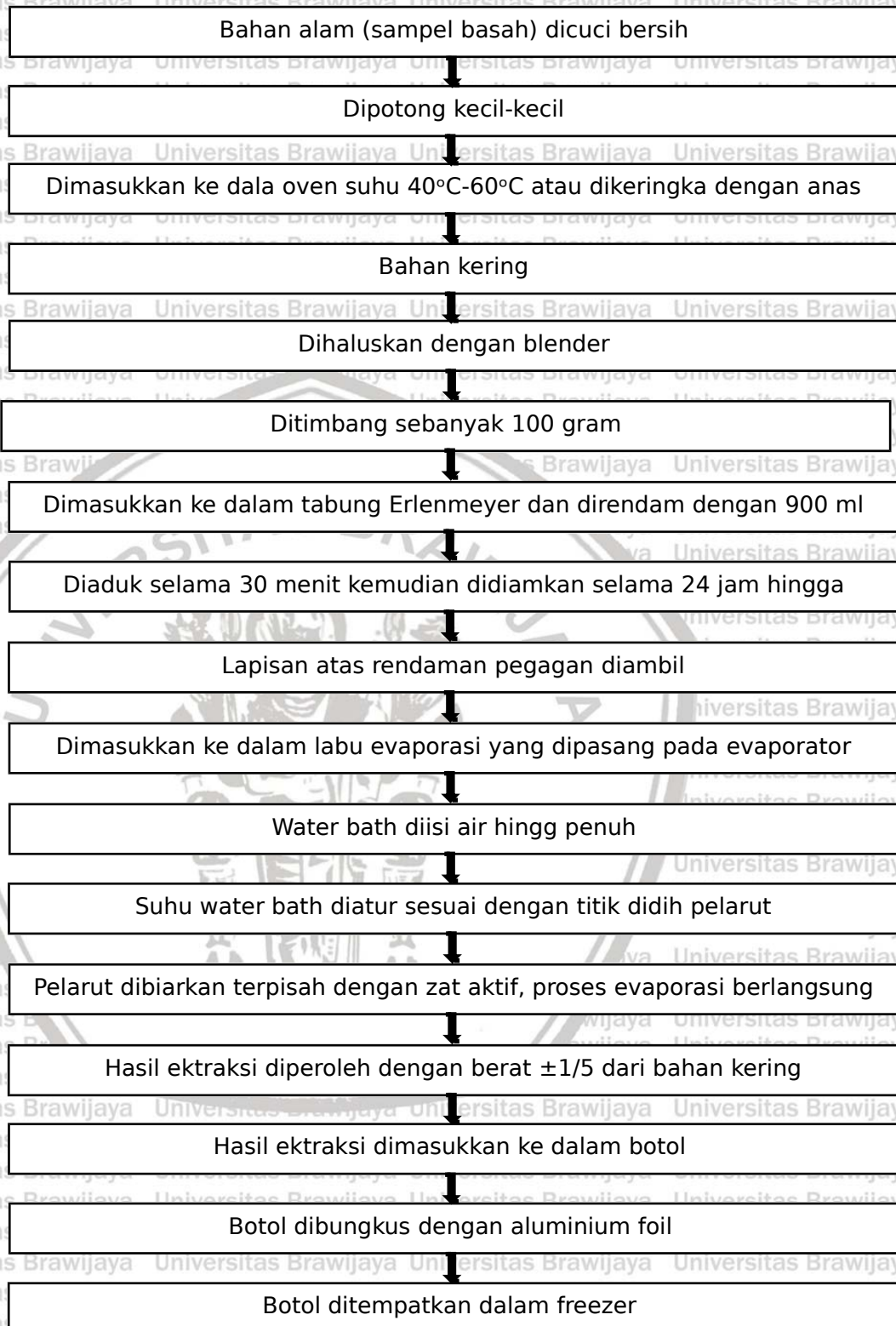
Enter Promotion Code **PDF30** at checkout

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

2108, 020033

© 2019 Author(s).

(Centella asiatica)



Lampiran 3 Surat Keterangan Kelaikan 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 / EC / 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. 20180246051611001

Catatan :

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



**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

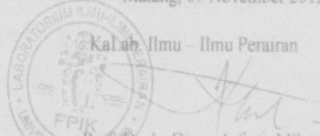
6. Tanggal Terima Sampel : 05 November 2012


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



1. Uji Normalitas Data

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for TH	.230	15	.032	.898	15	.090

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: TH

F	df1	df2	Sig.
5.009	4	10	.018

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + thr

3. Analisis Kruskal Wallis

Ranks

	thr	N	Mean Rank
TH	KN	3	11.00
	KP	3	3.67
	P1	3	8.67
	P2	3	8.33
	P3	3	8.33
	Total	15	

Test Statistics^{a,b}

	TH
Chi-Square	4.267
df	4
Asymp. Sig.	.371

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: thr

Lampiran 7 Hasil Analisis Statistik Dopamin



1. Uji Normalitas Data

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Y1	.135	15	.200 [*]	.943	15	.428

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

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: DPT

F	df1	df2	Sig.
1.007	4	10	.448

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Th

3. Analisis ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: DPT

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4976.725 ^a	4	1244.181	4.166	.031
Intercept	214822.664	1	214822.664	719.282	.000
Th	4976.725	4	1244.181	4.166	.031
Error	2986.627	10	298.663		
Total	222786.015	15			
Corrected Total	7963.351	14			

a. R Squared = .625 (Adjusted R Squared = .475)

4. Pengujian Multiple Comparison (Post-Hoc)- LSD (BNT)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DPT

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KN	KP	47.9092*	14.11058	.007	16.4689	79.3495
	P1	39.7446*	14.11058	.018	8.3043	71.1850
	P2	33.9427*	14.11058	.037	2.5024	65.3831
	P3	10.1413	14.11058	.489	-21.2990	41.5817
KP	KN	-47.9092*	14.11058	.007	-79.3495	-16.4689
	P1	-8.1646	14.11058	.576	-39.6049	23.2758
	P2	-13.9665	14.11058	.346	-45.4068	17.4739
	P3	-37.7679*	14.11058	.023	-69.2082	-6.3275
P1	KN	-39.7446*	14.11058	.018	-71.1850	-8.3043
	KP	8.1646	14.11058	.576	-23.2758	39.6049
	P2	-5.8019	14.11058	.690	-37.2422	25.6384
	P3	-29.6033	14.11058	.062	-61.0436	1.8370
P2	KN	-33.9427*	14.11058	.037	-65.3831	-2.5024
	KP	13.9665	14.11058	.346	-17.4739	45.4068
	P1	5.8019	14.11058	.690	-25.6384	37.2422
	P3	-23.8014	14.11058	.123	-55.2417	7.6389
P3	KN	-10.1413	14.11058	.489	-41.5817	21.2990
	KP	37.7679*	14.11058	.023	6.3275	69.2082
	P1	29.6033	14.11058	.062	-1.8370	61.0436
	P2	23.8014	14.11058	.123	-7.6389	55.2417

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 298.663.

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

Lampiran 8 Hasil Analisis Statistik Lokomotif 4 dpf

1. Uji Normalitas Data

Tests of Normality

Kolmogorov-Smirnov ^a	Shapiro-Wilk
---------------------------------	--------------

	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Y2	.180	25	.036	.956	25	.337

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: LK4

F	df1	df2	Sig.
4.573	4	20	.009

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Th

3. Analisis Kruskal Wallis

Ranks			
	Perlakuan	N	Mean Rank
LK4	KN	5	18.50
	KP	5	3.50
	P1	5	10.40
	P2	5	15.60
	P3	5	17.00
	Total		25

Test Statistics ^{a,b}	
	LK4
Chi-Square	14.097
df	4
Asymp. Sig.	.007

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Perlakuan

4. Pengujian Multiple Comparison (Post Hoc)-Mann Whitney

a. Perbandingan Kontrol Negatif dengan Kontrol Positif

Test Statistics ^a	
	LK4
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000

Z	-2.795
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

b. Perbandingan Kontrol Negatif dengan P1

Test Statistics ^a	
	LK4
Mann-Whitney U	2.500
Wilcoxon W	17.500
Z	-2.102
Asymp. Sig. (2-tailed)	.036
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

c. Perbandingan Kontrol Negatif dengan P2

Test Statistics ^a	
	LK4
Mann-Whitney U	9.500
Wilcoxon W	24.500
Z	-.631
Asymp. Sig. (2-tailed)	.528
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.548 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

d. Perbandingan Kontrol Negatif dengan P3

Test Statistics ^a	
	LK4
Mann-Whitney U	10.500
Wilcoxon W	25.500
Z	-.420

Asymp. Sig. (2-tailed)	.674
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

e. Perbandingan Kontrol Positif dengan P1

Test Statistics^a

	LK4
Mann-Whitney U	2.500
Wilcoxon W	17.500
Z	-2.353
Asymp. Sig. (2-tailed)	.019
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

f. Perbandingan Kontrol Positif dengan P2

Test Statistics^a

	LK4
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.785
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan
 b. Not corrected for ties.

g. Perbandingan Kontrol Positif dengan P3

Test Statistics^a

	LK4
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.785
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan



b. Not corrected for ties.

h. Perbandingan P1 dengan P2

Test Statistics ^a	
	LK4
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	22.000
Z	-1.156
Asymp. Sig. (2-tailed)	.248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.310 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
b. Not corrected for ties.

i. Perbandingan P1 dengan P3

Test Statistics ^a	
	LK4
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	20.000
Z	-1.576
Asymp. Sig. (2-tailed)	.115
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.151 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
b. Not corrected for ties.

j. Perbandingan P2 dengan P3

Test Statistics ^a	
	LK4
Mann-Whitney U	10.500
Wilcoxon W	25.500
Z	-.419
Asymp. Sig. (2-tailed)	.675
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
b. Not corrected for ties.

Lampiran 9 Hasil Analisis Statistik Lokomotif 5 dpt

1. Uji Normalitas Data

	Tests of Normality					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Y3	.110	25	.200 [*]	.972	25	.684

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

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: LK5

F	df1	df2	Sig.
1.653	4	20	.200

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Th

3. Analisis ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: LK5

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	114.160 ^a	4	28.540	8.919	.000
Intercept	3271.840	1	3271.840	1022.450	.000
Th	114.160	4	28.540	8.919	.000
Error	64.000	20	3.200		
Total	3450.000	25			
Corrected Total	178.160	24			

a. R Squared = .641 (Adjusted R Squared = .569)

4. Pengujian Multiple Comparison (Post-Hoc)-LSD (BNT)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: LK5

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KN	KP	6.2000*	1.13137	.000	3.8400	8.5600
	P1	5.0000*	1.13137	.000	2.6400	7.3600
	P2	4.0000*	1.13137	.002	1.6400	6.3600
	P3	2.6000*	1.13137	.032	.2400	4.9600

KP	KN	-6.2000*	1.13137	.000	-8.5600	-3.8400
	P1	-1.2000	1.13137	.301	-3.5600	1.1600
	P2	-2.2000	1.13137	.066	-4.5600	.1600
	P3	-3.6000*	1.13137	.005	-5.9600	-1.2400
P1	KN	-5.0000*	1.13137	.000	-7.3600	-2.6400
	KP	1.2000	1.13137	.301	-1.1600	3.5600
	P2	-1.0000	1.13137	.387	-3.3600	1.3600
	P3	-2.4000*	1.13137	.047	-4.7600	-.0400
P2	KN	-4.0000*	1.13137	.002	-6.3600	-1.6400
	KP	2.2000	1.13137	.066	-.1600	4.5600
	P1	1.0000	1.13137	.387	-1.3600	3.3600
	P3	-1.4000	1.13137	.230	-3.7600	.9600
P3	KN	-2.6000*	1.13137	.032	-4.9600	-.2400
	KP	3.6000*	1.13137	.005	1.2400	5.9600
	P1	2.4000*	1.13137	.047	.0400	4.7600
	P2	1.4000	1.13137	.230	-.9600	3.7600

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 3.200.

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

Lampiran 10 Hasil Analisis Statistik Lokomotor 6 dpf

1. Uji Normalitas Data

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Y4	.089	25	.200*	.977	25	.813

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

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: LK6

F	df1	df2	Sig.
4.334	4	20	.011

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Th

3. Analisis Kruskal Wallis

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
LK6	KN	5	21.50
	KP	5	4.90
	P1	5	7.70
	P2	5	14.40
	P3	5	16.50
Total		25	

Test Statistics^{a,b}

	LK6
Chi-Square	17.030
df	4
Asymp. Sig.	.002

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Perlakuan

4. Pengujian Multiple Comparison (Post Hoc) – Man Whitney

a. Perbandingan Kontrol Negatif dengan Kontrol Positif

Test Statistics^a

	LK6
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.694
Asymp. Sig. (2-tailed)	.007
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

b. Perbandingan Kontrol Negatif dengan P1

Test Statistics^a

	LK6
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.619
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

c. Perbandingan Kontrol Negatif dengan P2

Test Statistics^a

	LK6
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	16.500
Z	-2.371
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

d. Perbandingan Kontrol Negatif dengan P3

Test Statistics^a

	LK6
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-1.366
Asymp. Sig. (2-tailed)	.172
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.222 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

e. Perbandingan Kontrol Negatif dengan P1

Test Statistics^a

	LK6
Mann-Whitney U	8.500
Wilcoxon W	23.500
Z	-.898
Asymp. Sig. (2-tailed)	.369



Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.421 ^b
--------------------------------	-------------------

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

f. Perbandingan Kontrol Positif dengan P2

Test Statistics ^a	
	LK6
Mann-Whitney U	.500
Wilcoxon W	15.500
Z	-2.629
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

g. Perbandingan Kontrol Positif dengan P3

Test Statistics ^a	
	LK6
Mann-Whitney U	.500
Wilcoxon W	15.500
Z	-2.595
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

h. Perbandingan P1 dengan P2

Test Statistics ^a	
	LK6
Mann-Whitney U	3.500
Wilcoxon W	18.500
Z	-1.934
Asymp. Sig. (2-tailed)	.053
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.056 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

i. Perbandingan P1 dengan P3

Test Statistics^a

	LK6
Mann-Whitney U	3.500
Wilcoxon W	18.500
Z	-1.909
Asymp. Sig. (2-tailed)	.056
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.056 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

j. Perbandingan P2 dengan P3

Test Statistics^a

	LK6
Mann-Whitney U	9.500
Wilcoxon W	24.500
Z	-.651
Asymp. Sig. (2-tailed)	.515
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.548 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.



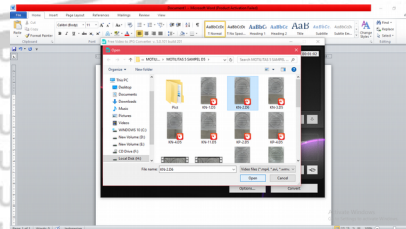
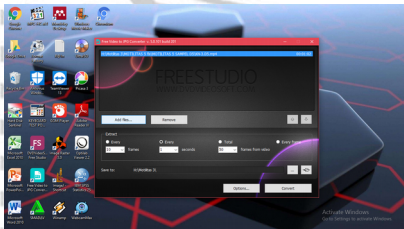
Correlations

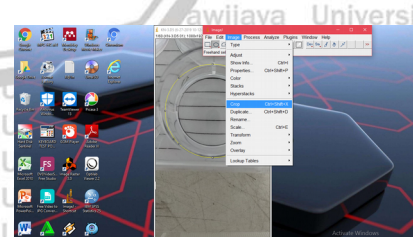
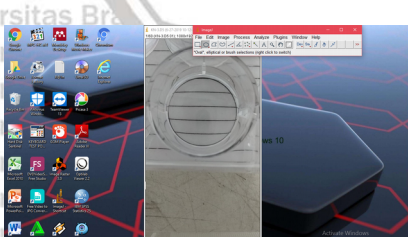
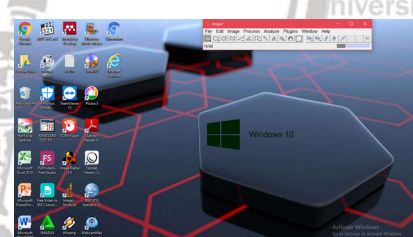
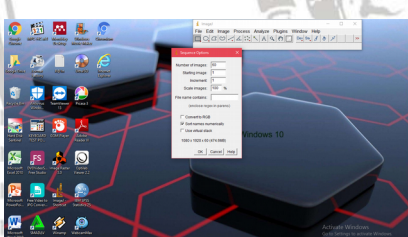
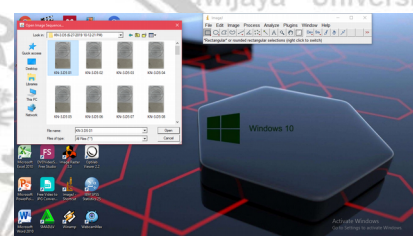
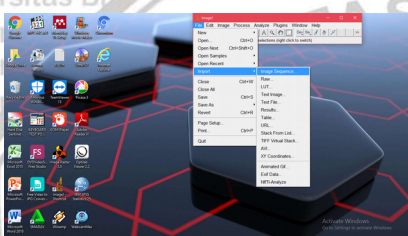
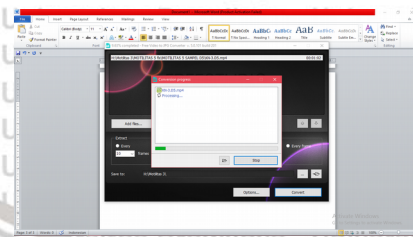
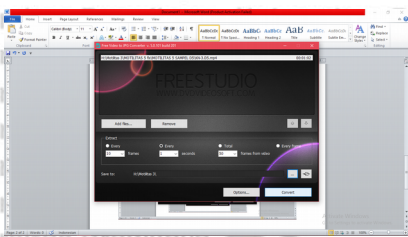
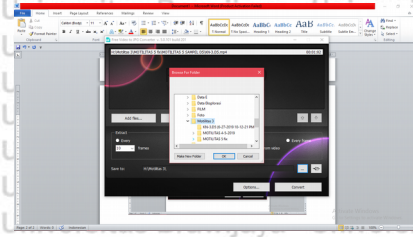
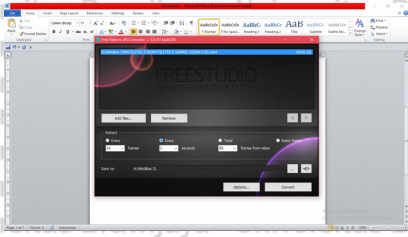
			Dopamin	Lokomotor
Spearman's rho	Dopamin	Correlation Coefficient	1.000	1.000**
		Sig. (2-tailed)	.	.
		N	5	5
	Lokomotor	Correlation Coefficient	1.000**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.	.
		N	5	5

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



Lampiran 12 Cara Pembuatan Pola Lokomotor Menggunakan Image J





Ekstraksi *Centella asiatica*



Persiapan Trapping



Lampiran 14 Pemeriksaan ELISA





Lampiran 16 Pemeriksaan PCR



RIWAYAT HIDUP

Damai Noviasari, lahir di Balikpapan, 02 November 1978, anak keempat dari empat bersaudara, putri bapak Kasdan dan ibu Festi Damai Koreani. Menikah



dengan Iman Irmawan, ST. Lulus SD Negeri 099
Balikpapan tahun 1991, lulus SMP Negeri 02 Balikpapan
tahun 1994 dan lulus SMU Negeri 1 Balikpapan tahun
1997. Melanjutkan pendidikan Diploma III Kebidanan di Akademi Kebidanan
Depkes Balikpapan lulus tahun 2001. Melanjutkan pendidikan Diploma IV Bidan
Pendidik di Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Kalimantan Timur lulus
tahun 2010. Pada tahun 2017 mengambil pendidikan Program Studi Magister
Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tahun 2002
sampai sekarang bekerja di Program Studi Diploma III Kebidanan Balikpapan,
Jurusan Kebidanan Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Kalimantan
Timur.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Ekstrak etanol pegagan tidak dapat meningkatkan ekspresi tirosin hidroksilase pada larva zebrafish yang dipapar timbal dan diberi ekstrak pegagan.
2. Ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan kadar dopamin pada larva zebrafish yang dipapar timbal dan diberi ekstrak pegagan.
3. Ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal dan diberi ekstrak pegagan.
4. Tidak terdapat hubungan antara ekspresi tirosin hidroksilase dengan kadar dopamin pada larva zebrafish yang dipapar timbal dan diberi ekstrak pegagan.
5. Terdapat hubungan antara kadar dopamin dengan aktivitas lokomotor pada larva zebrafish yang dipapar timbal dan diberi ekstrak pegagan.

7.2 Saran

1. Perlu dipertimbangkan untuk penelitian selanjutnya agar dilakukan uji serapan atom logam berat (Atomic Absorption Spectrophotometry/AAS) pada larva zebrafish.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai gangguan lokomotor dengan menggunakan *danioscope*.
3. Perlu dipertimbangkan untuk penelitian selanjutnya agar paparan timbal serta pemberian ekstrak etanol pegagan dapat diberikan pada larva zebrafish hingga usia 6 dpf sebab pada usia tersebut merupakan homolog dengan usia anak 2 tahun.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A. et al., 2012. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive biology and endocrinology*, 10(1), hal.49.
- Ahamed, M. dan Siddiqui, M.K.J., 2007. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clinica chimica acta*, 383(1–2), hal.57–64.
- Anggraini, D., 2007. Analisis Kadar Logam Berat Pb, Cd, Cu dan Zn pda air Laut, Sedimen dan Lokan (*Geloina coxans*) di Perairan pesisir Dumai, Provinsi Riau. *Znanseawaters. pdf.* [Diakses, 14 Maret 2015].
- Arnstein, P.M., 1997. The neuroplastic phenomenon: a physiologic link between chronic pain and learning. *Journal of Neuroscience Nursing*, 29(3), hal.179–187.
- Assadi, S.M., Yücel, M. dan Pantelis, C., 2009. Dopamine modulates neural networks involved in effort-based decision-making. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33(3), hal.383–393.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2007. Toxicological Profile For Lead. Department of Health And Human Services, U.S.
- Yilmaz, O. et al., 2017. Scrambled eggs: Proteomic portraits and novel biomarkers of egg quality in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS one*, 12(11), hal.e0188084.
- Youdim KA, Spencer JP, Schroeter H, Rice-Evans C. (2002). Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol Chem* 383 (3-4): 503-519
- Zainuddin, M. 2011. *Metodologi Penelitian : Pendekatan Praktis dan Aplikatif (Edisi Revisi)*. Bandung : Refika Aditama
- Zheng, C.-J. dan Qin, L. (2007) "Chemical components of *Centella asiatica* and their bioactivities," *Journal of Medicinal Food*, 5(3), hal. 348–351



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, Ftrila Edni Warl, Damal Novlasari, Husnul Khotimah, M. Muljohadi Aji, 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

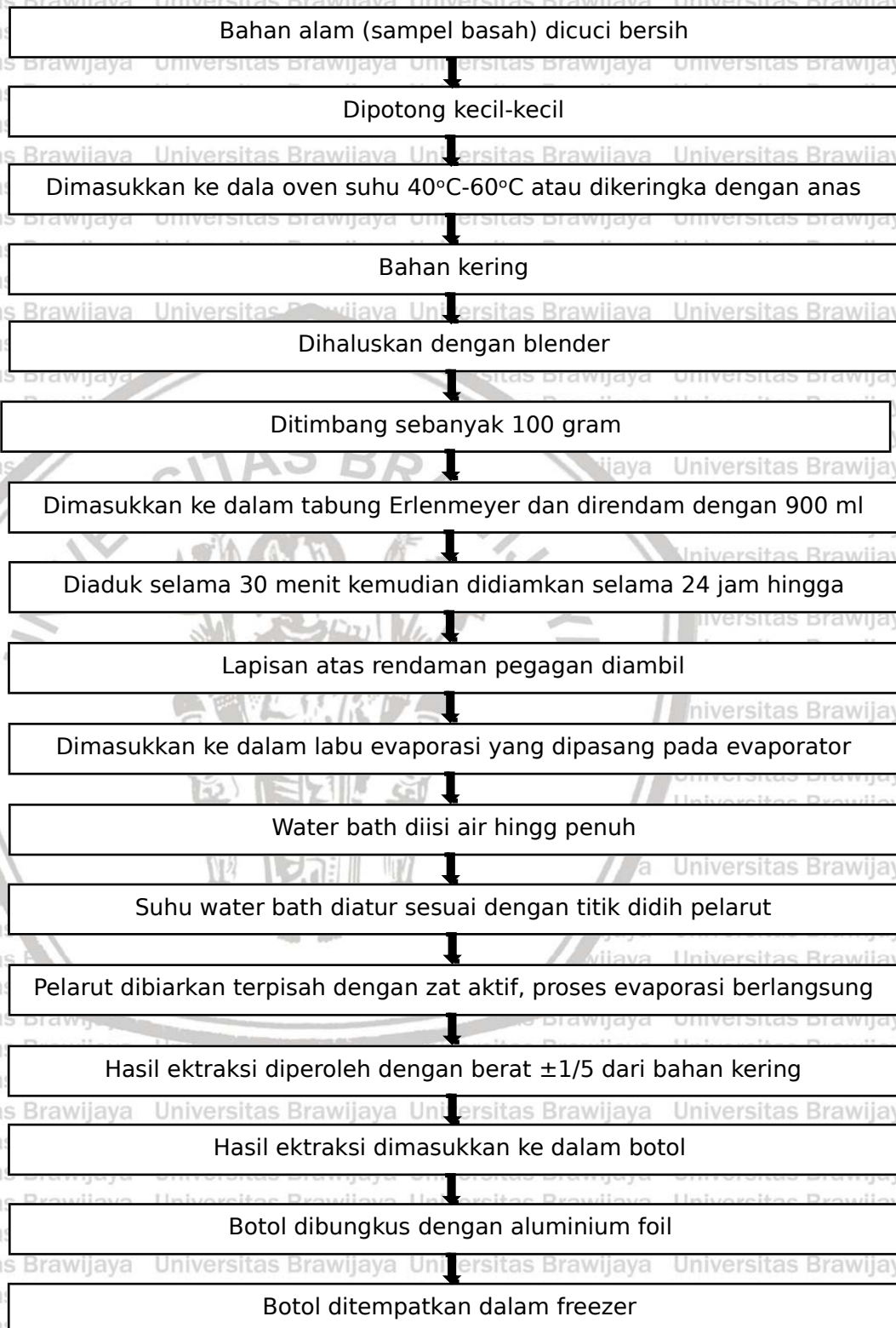
AIP Conference Proceedings 2108, 020033 (2019); <https://doi.org/10.1063/1.5110008>

2108, 020033

© 2019 Author(s).

Lampiran 2

**PROSEDUR EKSTRAKSI PEGAGAN
(*Centella asiatica*)**



Lampiran 3 Surat Keterangan Kelaikan 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 / EC / 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 Pegangan (*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. dr. Moeh Israhid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr(Hk)
NIPK. 20180246051611001

Catatan :

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

Lampiran 4 Determinasi Tanaman Pegagan

 **DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR**
UPT MATERIA MEDICA
Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313)
KOTA BATU

Nomor : 074 / 014 / B / 101.8 / 2013
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Pegagan**

Memenuhi permohonan saudara :
Nama : HUSNUL KHOTIMAH, S.Si., M.Kes.
N I P : 19751125 200501 2 001
Fakultas : Lab Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

1. Perihal determinasi tanaman Pegagan

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Umbellales
Suku	: Umbelliferae
Marga	: Centella
Jenis	: <i>Centella asiatica</i> (Linn.) Urban
Sinonim	: <i>Hydrocotyle asiatica</i> Linn. = <i>Pasequimus</i> , Rumph.

Pegagan, Gagan-gagan, Rendeng, Kerok batok (Jawa); Daun kaki kuda (Indonesia), Pegaga (Ujung Pandang); Antanan gedde, Antanan rambat (Sunda), Dau tungke (Bugis); Kos tekosan (Madura), Kori-kori (Halmahera)

Kunci determinasi : 1b -2b - 3b - 4b- 6b- 7b- 9b-10b- 11b - 12b - 13b-14b - 16a-239b- 243b- 244b-248b- 249b-250b-266b-267a- 268a -269a- 2b- 3

2. **Morfologi** : Pegagan merupakan terma merahun tanpa batang, tetapi dengan rimpang pendek dan stolon-stolon yang merayap dengan panjang 10 cm - 80 cm, akar keluar dari setiap bonggol, banyak bercabang yang membentuk tumbuhan baru. Helai daun tunggal, bertangkai panjang sekitar 5 cm - 15 cm berbentuk ginjal. Tepinya bergerigi atau beringgit, dengan penampang 1 cm - 7 cm tersusun dalam roset yang terdiri atas 2 - 10 helai daun, kadang-kadang agak berambut. Bunga berwarna putih atau merah muda, tersusun dalam karangan berupa payung, tunggal atau 3-5 bersama-sama keluar dari ketiak daun. Tangkai bunga 5 mm - 50 mm. Buah kecil bergantung yang bentuknya lonjong/pipih panjang 2 - 2,5 mm, baunya wangi dan rasanya pahit

3. **Nama Simplisia** : Centellae Folium/ daun pegagan

4. **Kandungan kimia** : Asiaticoside, thankuniside, isothankuniside, madecassoside, brahmioside, brahminoside, brahmic acid, madasiatic acid, meso-inositol, centellose, carotenoids, garam-garam mineral seperti garam kalium, natrium, magnesium, kalsium, besi, vellarine, zat samak. Senyawaan glikosida triterpenoida yang disebut asiaticoside dan senyawaan sejenis, mempunyai kasiat anti lepra (Morbus Hansen). Daun kaki kuda mengandung senyawa glikosida trigergepnoida, alkaloid hidrokotilin, steroid, tanin, minyak atsiri, gula pereduksi dan garam-garam mineral seperti garam-garam mineral seperti garam kalium, natrium, magnesium, kalsium dan besi

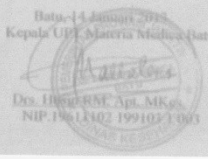
5. **Penggunaan** : Penelitian

6. **Daftar Pustaka**


- Anonim, *Materia Medica Indonesia " Jilid 1 "*, 1977. Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Anonim, *Serial Tanaman Obat " PEGAGAN "*, 2007. Badan POM Republik Indonesia
- Anonim, <http://www.ipeknet.co.id/pegagan>, diakses tanggal 29 oktober 2010
- Soenis, CGGJ Van Dr. *FLORA*, 2008, Pradnya Paramita, Jakarta
- Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johnny Ria, 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia 1*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.

Demikian determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 14 Januari 2013
Kepala UPT Materia Medica Batu


Des. HUSNUL KHOTIMAH, Apt., M.Kes.
NIP. 19751125 200501 2 001

Lampiran 5 Laporan Hasil Analisa 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.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	: <i>Danio rerio</i>
Warna	: Kuning strip hitam

4. Prosedur Analisa : Dari Lab. Ilmu – Ilmu Perairan FPIK UB

5. Penyampaian Laporan Hasil Analisis : Dikirim sendiri

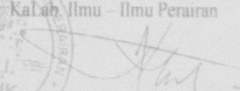
6. Tanggal Terima Sampel : 05 November 2012


7. Analis : Nuriyani

8. Data Hasil Analisa : terlampir pada buku kerja

Malang, 09 November 2012

Ka Lab. Ilmu – Ilmu Perairan


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



Lampiran 6 Hasil Analisis Statistik Tirosin Hidroksilase

1. Uji Normalitas Data

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for TH	.230	15	.032	.898	15	.090

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: TH

F	df1	df2	Sig.
5.009	4	10	.018

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + thr

3. Analisis Kruskal Wallis

Ranks

	thr	N	Mean Rank
TH	KN	3	11.00
	KP	3	3.67
	P1	3	8.67
	P2	3	8.33
	P3	3	8.33
	Total	15	

Test Statistics^{a,b}

	TH
Chi-Square	4.267
df	4
Asymp. Sig.	.371

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: thr

Lampiran 7 Hasil Analisis Statistik Dopamin

1. Uji Normalitas Data

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Y1	.135	15	.200 [*]	.943	15	.428

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

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: DPT

F	df1	df2	Sig.
1.007	4	10	.448

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Th

3. Analisis ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: DPT

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4976.725 ^a	4	1244.181	4.166	.031
Intercept	214822.664	1	214822.664	719.282	.000
Th	4976.725	4	1244.181	4.166	.031
Error	2986.627	10	298.663		
Total	222786.015	15			
Corrected Total	7963.351	14			

a. R Squared = .625 (Adjusted R Squared = .475)

4. Pengujian Multiple Comparison (Post Hoc)- LSD (BNT)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DPT

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KN	KP	47.9092*	14.11058	.007	16.4689	79.3495
	P1	39.7446*	14.11058	.018	8.3043	71.1850
	P2	33.9427*	14.11058	.037	2.5024	65.3831
	P3	10.1413	14.11058	.489	-21.2990	41.5817
KP	KN	-47.9092*	14.11058	.007	-79.3495	-16.4689
	P1	-8.1646	14.11058	.576	-39.6049	23.2758
	P2	-13.9665	14.11058	.346	-45.4068	17.4739
	P3	-37.7679*	14.11058	.023	-69.2082	-6.3275
P1	KN	-39.7446*	14.11058	.018	-71.1850	-8.3043
	KP	8.1646	14.11058	.576	-23.2758	39.6049
	P2	-5.8019	14.11058	.690	-37.2422	25.6384
	P3	-29.6033	14.11058	.062	-61.0436	1.8370
P2	KN	-33.9427*	14.11058	.037	-65.3831	-2.5024
	KP	13.9665	14.11058	.346	-17.4739	45.4068
	P1	5.8019	14.11058	.690	-25.6384	37.2422
	P3	-23.8014	14.11058	.123	-55.2417	7.6389
P3	KN	-10.1413	14.11058	.489	-41.5817	21.2990
	KP	37.7679*	14.11058	.023	6.3275	69.2082
	P1	29.6033	14.11058	.062	-1.8370	61.0436
	P2	23.8014	14.11058	.123	-7.6389	55.2417

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 298.663.

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

Lampiran 8 Hasil Analisis Statistik Lokomotif 4 dpf

1. Uji Normalitas Data



Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Y2	.180	25	.036	.956	25	.337

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: LK4

F	df1	df2	Sig.
4.573	4	20	.009

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Th

3. Analisis Kruskal Wallis

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
LK4	KN	5	18.50
	KP	5	3.50
	P1	5	10.40
	P2	5	15.60
	P3	5	17.00
	Total		25

Test Statistics^{a,b}

	LK4
Chi-Square	14.097
df	4
Asymp. Sig.	.007

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Perlakuan

4. Pengujian Multiple Comparison (Post Hoc)-Mann Whitney

a. Perbandingan Kontrol Negatif dengan Kontrol Positif

Test Statistics^a

	LK4

Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.795
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

b. Perbandingan Kontrol Negatif dengan P1

Test Statistics ^a	
	LK4
Mann-Whitney U	2.500
Wilcoxon W	17.500
Z	-2.102
Asymp. Sig. (2-tailed)	.036
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

c. Perbandingan Kontrol Negatif dengan P2

Test Statistics ^a	
	LK4
Mann-Whitney U	9.500
Wilcoxon W	24.500
Z	-.631
Asymp. Sig. (2-tailed)	.528
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.548 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

d. Perbandingan Kontrol Negatif dengan P3

Test Statistics ^a	
	LK4

Mann-Whitney U	10.500
Wilcoxon W	25.500
Z	-.420
Asymp. Sig. (2-tailed)	.674
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

e. Perbandingan Kontrol Positif dengan P1

Test Statistics ^a	
	LK4
Mann-Whitney U	2.500
Wilcoxon W	17.500
Z	-2.353
Asymp. Sig. (2-tailed)	.019
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

f. Perbandingan Kontrol Positif dengan P2

Test Statistics ^a	
	LK4
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.785
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

g. Perbandingan Kontrol Positif dengan P3

Test Statistics ^a	
	LK4
Mann-Whitney U	.000

Wilcoxon W	15.000
Z	-2.785
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
b. Not corrected for ties.

h. Perbandingan P1 dengan P2

Test Statistics^a

	LK4
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	22.000
Z	-1.156
Asymp. Sig. (2-tailed)	.248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.310 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
b. Not corrected for ties.

i. Perbandingan P1 dengan P3

Test Statistics^a

	LK4
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	20.000
Z	-1.576
Asymp. Sig. (2-tailed)	.115
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.151 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
b. Not corrected for ties.

j. Perbandingan P2 dengan P3

Test Statistics^a

	LK4
Mann-Whitney U	10.500
Wilcoxon W	25.500
Z	-.419
Asymp. Sig. (2-tailed)	.675
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan
b. Not corrected for ties.

Lampiran 9 Hasil Analisis Statistik Lokomotor 5 dpr

1. Uji Normalitas Data

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.

Standardized Residual for Y3	.110	25	.200*	.972	25	.684
------------------------------	------	----	-------	------	----	------

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

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: LK5

F	df1	df2	Sig.
1.653	4	20	.200

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Th

3. Analisis ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: LK5

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	114.160 ^a	4	28.540	8.919	.000
Intercept	3271.840	1	3271.840	1022.450	.000
Th	114.160	4	28.540	8.919	.000
Error	64.000	20	3.200		
Total	3450.000	25			
Corrected Total	178.160	24			

a. R Squared = .641 (Adjusted R Squared = .569)

4. Pengujian Multiple Comparison (Post-Hoc)-LSD (BNT)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: LK5

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KN	KP	6.2000*	1.13137	.000	3.8400	8.5600

	P1	5.0000*	1.13137	.000	2.6400	7.3600
	P2	4.0000*	1.13137	.002	1.6400	6.3600
	P3	2.6000*	1.13137	.032	.2400	4.9600
KP	KN	-6.2000*	1.13137	.000	-8.5600	-3.8400
	P1	-1.2000	1.13137	.301	-3.5600	1.1600
	P2	-2.2000	1.13137	.066	-4.5600	.1600
	P3	-3.6000*	1.13137	.005	-5.9600	-1.2400
P1	KN	-5.0000*	1.13137	.000	-7.3600	-2.6400
	KP	1.2000	1.13137	.301	-1.1600	3.5600
	P2	-1.0000	1.13137	.387	-3.3600	1.3600
	P3	-2.4000*	1.13137	.047	-4.7600	-.0400
P2	KN	-4.0000*	1.13137	.002	-6.3600	-1.6400
	KP	2.2000	1.13137	.066	-.1600	4.5600
	P1	1.0000	1.13137	.387	-1.3600	3.3600
	P3	-1.4000	1.13137	.230	-3.7600	.9600
P3	KN	-2.6000*	1.13137	.032	-4.9600	-.2400
	KP	3.6000*	1.13137	.005	1.2400	5.9600
	P1	2.4000*	1.13137	.047	.0400	4.7600
	P2	1.4000	1.13137	.230	-.9600	3.7600

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 3.200.

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



Lampiran 10 Hasil Analisis Statistik Lokomotif 6 dpf

1. Uji Normalitas Data

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Y4	.089	25	.200*	.977	25	.813

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

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: LK6

F	df1	df2	Sig.
4.334	4	20	.011

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Th

3. Analisis Kruskal Wallis

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
LK6	KN	5	21.50
	KP	5	4.90
	P1	5	7.70
	P2	5	14.40
	P3	5	16.50
	Total		25

Test Statistics^{a,b}

	LK6
Chi-Square	17.030
df	4
Asymp. Sig.	.002

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Perlakuan

4. Pengujian Multiple Comparison (Post Hoc) – Man Whitney

a. Perbandingan Kontrol Negatif dengan Kontrol Positif

Test Statistics^a

	LK6
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.694
Asymp. Sig. (2-tailed)	.007
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

b. Perbandingan Kontrol Negatif dengan P1

Test Statistics ^a	
	LK6
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.619
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

c. Perbandingan Kontrol Negatif dengan P2

Test Statistics ^a	
	LK6
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	16.500
Z	-2.371
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

d. Perbandingan Kontrol Negatif dengan P3

Test Statistics ^a	
	LK6
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-1.366
Asymp. Sig. (2-tailed)	.172
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.222 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

e. Perbandingan Kontrol Negatif dengan P1

Test Statistics ^a	
	LK6

Mann-Whitney U	8.500
Wilcoxon W	23.500
Z	-.898
Asymp. Sig. (2-tailed)	.369
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.421 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

f. Perbandingan Kontrol Positif dengan P2

Test Statistics^a

	LK6
Mann-Whitney U	.500
Wilcoxon W	15.500
Z	-2.629
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

g. Perbandingan Kontrol Positif dengan P3

Test Statistics^a

	LK6
Mann-Whitney U	.500
Wilcoxon W	15.500
Z	-2.595
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Perlakuan

b. Not corrected for ties.

h. Perbandingan P1 dengan P2

Test Statistics^a

	LK6
Mann-Whitney U	3.500
Wilcoxon W	18.500
Z	-1.934
Asymp. Sig. (2-tailed)	.053

Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.056 ^b
--------------------------------	-------------------

- a. Grouping Variable: Perlakuan
- b. Not corrected for ties.

i. Perbandingan P1 dengan P3

Test Statistics^a

	LK6
Mann-Whitney U	3.500
Wilcoxon W	18.500
Z	-1.909
Asymp. Sig. (2-tailed)	.056
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.056 ^b

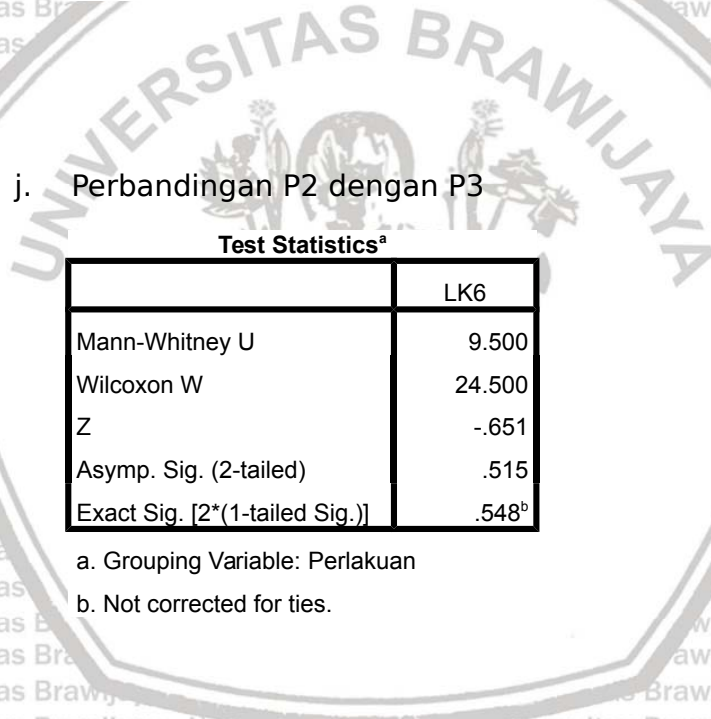
- a. Grouping Variable: Perlakuan
- b. Not corrected for ties.

j. Perbandingan P2 dengan P3

Test Statistics^a

	LK6
Mann-Whitney U	9.500
Wilcoxon W	24.500
Z	-.651
Asymp. Sig. (2-tailed)	.515
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.548 ^b

- a. Grouping Variable: Perlakuan
- b. Not corrected for ties.



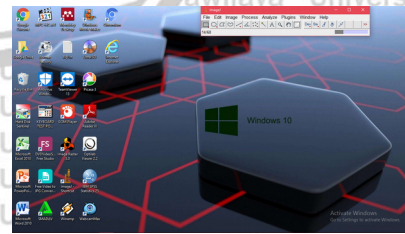
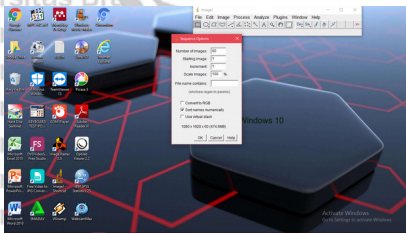
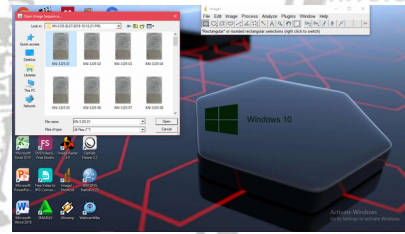
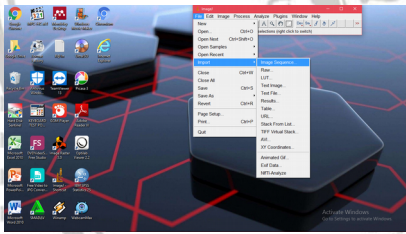
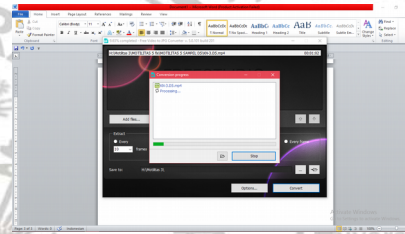
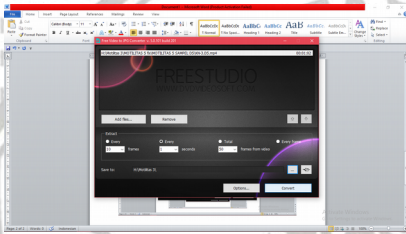
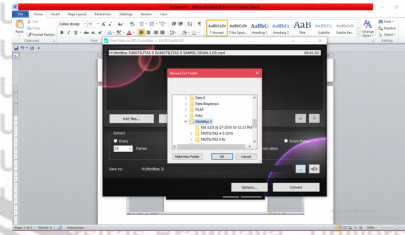
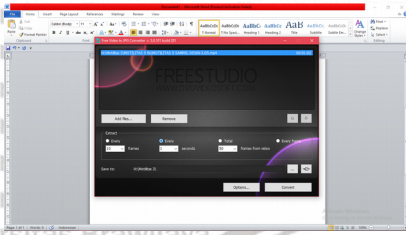
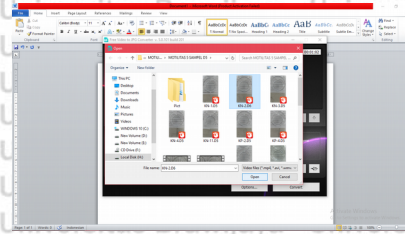
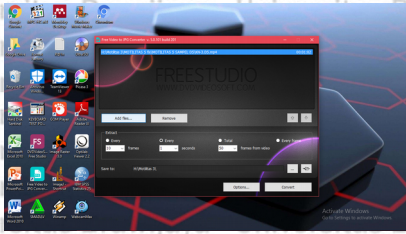
Lampiran 11 Hasil Analisis Hubungan Dopamin dengan Lokomotor 6 dpf

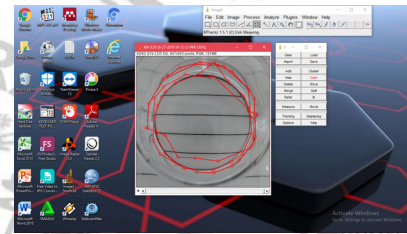
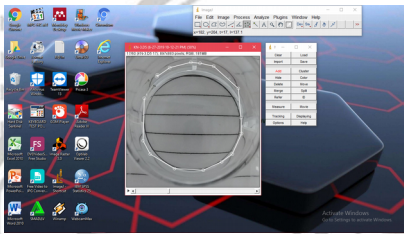
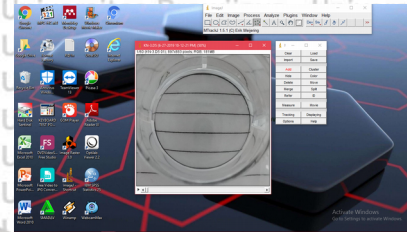
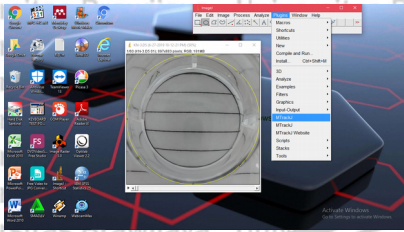
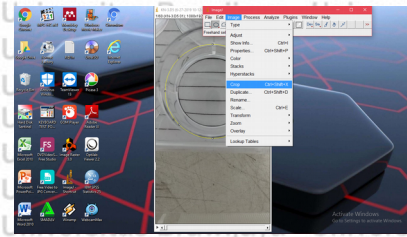
Correlations			Dopamin	Lokomotor
Spearman's rho	Dopamin	Correlation Coefficient	1.000	1.000**
		Sig. (2-tailed)	.	.
		N	5	5
	Lokomotor	Correlation Coefficient	1.000**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.	.
		N	5	5

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



Lampiran 12 Cara Pembuatan Pola Lokomotor Menggunakan Image J





Lampiran 13 Pembuatan Embrionik Medium dan Persiapan Trapping

Pembuatan embrionik medium



Ekstraksi *Centella asiatica*



Persiapan Trapping



Lampiran 14 Pemeriksaan ELISA



Lampiran 15 Pemeriksaan Isolasi RNA



Lampiran 16 Pemeriksaan PCR



RIWAYAT HIDUP

Damai Noviasari, lahir di Balikpapan, 02 November

1978, anak keempat dari empat bersaudara, putri



bapak Kasdan dan ibu Festi Damai Koreani. Menikah dengan Iman Irmawan, ST. Lulus SD Negeri 099 Balikpapan tahun 1991, lulus SMP Negeri 02 Balikpapan tahun 1994 dan lulus SMU Negeri 1 Balikpapan tahun 1997. Melanjutkan pendidikan Diploma III Kebidanan di Akademi Kebidanan Depkes Balikpapan lulus tahun 2001. Melanjutkan pendidikan Diploma IV Bidan Pendidik di Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Kalimantan Timur lulus tahun 2010. Pada tahun 2017 mengambil pendidikan Program Studi Magister Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tahun 2002 sampai sekarang bekerja di Program Studi Diploma III Kebidanan Balikpapan, Jurusan Kebidanan Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Kalimantan Timur.

