



**PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR (*Moringa oleifera*)
TERHADAP PERTUMBUHAN PANJANG BADAN, KADAR IL-10, DAN
KADAR CASPASE-3 PADA ZEBRAFISH (*Danio rerio*) DIINDUKSI
ROTENONE: STUDI IN VIVO**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister Biomedik**



Oleh:
TOMSON KOSASIH
NIM: 156070122011007

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
MINAT IMUNOLOGI, MIKROBIOLOGI, DAN PARASITOLOGI**

**PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG
2018**

RINGKASAN

KOSASIH T, Program Magister Ilmu Biomedik Universitas Brawijaya, 20 Desember 2018. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Pertumbuhan Panjang Badan, Kadar IL-10, dan Kadar Caspase-3 pada Zebrafish (*Danio rerio*) Diinduksi Rotenone: Studi *in vivo*; Komisi Pembimbing, Ketua: Husnul Khotimah, Anggota: Umi Kalsum.

Linear Growth Retardation (LGR) masih menjadi masalah global. Kurang lebih pada 2010 terhitung terdapat 171 juta populasi anak mengalami LGR, dimana sebagian besar (167 juta populasi) tersebar di negara – negara berkembang. Indonesia yang memiliki prevalensi LGR 37,6% merupakan negara dengan proporsi anak LGR terbanyak di Asia dan terbanyak ke-6 di dunia. Definisi LGR menurut WHO (2018) adalah tinggi badan kurang dari 2 standar deviasi tinggi badan normal pada usia tertentu ($< 2 \text{ SD Height per Age } z\text{-score}$). Penyebab LGR adalah malnutrisi, infeksi berulang, higienitas yang buruk, dll. Seluruh hal tersebut dapat menimbulkan inflamasi, sehingga pertumbuhan menjadi terhambat karena energi yang seharusnya digunakan untuk tumbuh kembang, habis oleh proses inflamasi. Stress oksidatif baru – baru ini diketahui dapat juga menimbulkan LGR baik karena gangguan pertumbuhan tulang oleh aktivasi osteoklas berlebih maupun karena inflamasi yang ditimbulkan oleh stress oksidatif tersebut. Kondisi inflamasi diperankan oleh komunikasi yang kompleks dari sitokin pro-inflamasi dan anti-inflamasi. IL-10 merupakan salah satu sitokin yang bekerja sebagai sitokin anti-inflamasi dengan mekanisme supresi faktor transkripsi dalam persinyalan ekspresi sitokin pro-inflamasi, sehingga aktivitas inflamasi akan ditekan oleh ekspresi IL-10. Pertumbuhan tulang diperankan oleh keseimbangan osteoblas (formasi) dan osteoklas (resorpsi). Stress oksidatif yang tinggi diketahui dapat menyebabkan inflamasi kronis, sehingga memicu apoptosis osteoblas dan osteosit (sel – sel pengisi di dalam matriks tulang), yang dapat diketahui melalui peningkatan Caspase-3 (enzim eksekutor apoptosis). Hal ini dapat menghambat proses pertumbuhan tulang dan menyebabkan LGR. Penelitian ini menggunakan zebrafish, vertebrata yang memiliki homologi genetik sekitar 70% dan memiliki tulang dengan proses fisiologi tumbuh kembang tulang yang sama dengan manusia. Zebrafish dipapar dengan rotenone, suatu senyawa yang menghambat kompleks-1 mitokondria, sehingga meningkatkan ROS (stress oksidatif) yang telah diteliti dengan konsentrasi 12,5 ppb dapat menyebabkan LGR pada zebrafish. Daun kelor (*Moringa oleifera*) memiliki berbagai senyawa bioaktif yang dapat berperan sebagai antioksidan dan anti-inflamasi. *Moringa oleifera* adalah tanaman yang tumbuh secara liar di Indonesia dan merupakan potensi besar untuk dikembangkan dalam kaitannya dengan penanganan LGR. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa paparan ekstrak etanol daun kelor pada zebrafish diinduksi rotenone dapat memperbaiki panjang badan melalui peningkatan kadar IL-10 dan penurunan kadar Caspase-3.

Desain penelitian ini adalah *true experimental post test only controlled group design single blind*. Larva zebrafish diperoleh dari embrio yang terbuahi dan menetas pada 3 day post fertilization (dpf). Panjang badan larva zebrafish diukur pada 3, 6, dan 9 dpf menggunakan mikroskop berkamera digital (Optilab) yang terintegrasi dengan komputer melalui software Image Raster. Larva zebrafish dikorbkan pada usia 6 dpf untuk diukur kadar IL-10 dan kadar Caspase-3 larva tersebut dengan metode ELISA.



Pengolahan data dilakukan dengan analisis statistik, meliputi uji beda (*one-way Anova* untuk data normal dan homogen; *Kruskal-Wallis* jika data data tidak normal dan/ atau tidak homogen) dan uji korelasi (*Pearson Correlation* jika tipe data normal, *Spearman Correlation* jika data tidak normal).

Penelitian ini membuktikan bahwa paparan ekstrak etanol daun kelor memperbaiki panjang badan larva *zebrafish* saat mencapai usia 6 dpf dan 9 dpf dengan pola *dose-dependent* yang dibuktikan dengan korelasi kuat positif antara panjang badan larva *zebrafish* dan konsentrasi paparan ekstrak etanol daun kelor. Hasil pengukuran kadar IL-10 menunjukkan pola yang menarik, dimana kelompok yang hanya dipapar rotenone memiliki kadar IL-10 tertinggi dan kelompok yang dipapar rotenone disertai terapi ekstrak etanol daun kelor memiliki kadar IL-10 yang lebih rendah dari kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas anti-inflamasi IL-10 dalam penelitian ini bersifat kompensasional, yaitu untuk menyeimbangkan aktivitas berlebih dari sitokin-sitokin pro-inflamasi. Kadar Caspase-3 larva *zebrafish* pada penelitian ini membuktikan bahwa paparan rotenone dapat meningkatkan Caspase-3 hingga lebih dari 2 kali nilai normal (kadar Caspase-3 kelompok kontrol) dan paparan ekstrak etanol daun kelor terhadap larva *zebrafish* yang diinduksi rotenone menghasilkan kadar Caspase-3 setara kelompok kontrol. Korelasi antara IL-10 dan Caspase-3 adalah negatif dengan kekuatan hubungan yang sedang.

Studi ini menyimpulkan bahwa paparan ekstrak etanol daun kelor terhadap larva *zebrafish* diinduksi rotenone dapat memperbaiki panjang badan; menurunkan kadar IL-10 pada 6 dpf; dan menurunkan kadar Caspase-3 pada 6 dpf.



SUMMARY

KOSASIH T, Biomedical Science Master Program Universitas Brawijaya, December 20th 2018. The Effect of *Moringa oleifera* Leaves Ethanolic Extract Toward Linear Body Growth, IL-10 Level, and Caspase-3 Level of Rotenone Induced Zebrafish (*Danio rerio*): *in vivo* Study; Supervisors Committee, Chief: Husnul Khotimah, Member: Umi Kalsum.

Linear Growth Retardation (LGR) is a global burden occupying about 171 million children in 2010, where most of the LGR children live in developing countries. Indonesia who has the LGR prevalence of 37,6% is the country having the highest LGR children in Asia or ranked 5th worldwide. LGR is defined by body height below 2 standard deviation of normal stature in the specific age ($< 2 \text{ SD Height per Age } z\text{-score}$) according to WHO (2018). LGR is caused by malnutrition, recurrent infection, poor hygiene, etc. All of which can result in inflammation that consumes a lot of energy. Hence, growth and development becomes inhibited. To date, oxidative stress is noted to induce LGR because it can result in osteoblast-osteoclast imbalance favoring to bone resorption or inflammation as the consequence of oxidative stress. Inflammation is orchestrated by complex communication of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. IL-10 is one of anti-inflammatory cytokines through suppression of transcription factor who is responsible for pro-inflammatory cytokines expression. Bone growth is played by the balance of osteoblast (bone formation) and osteoclast (bone resorption). High oxidative stress is known to trigger inflammation resulting in apoptosis of osteoblast and osteocyte (parenchymal cell in bone matrix). Therefore, increased apoptosis of osteoblast and osteocyte (noted from increased Caspase-3, apoptosis executioner enzyme) can inhibit bone growth and result in LGR. This study used zebrafish, a vertebrate with around 70% gene homology with human who has the same physiological similarity of bone growth with human. Zebrafish was exposed with rotenone, a substance that inhibits mitochondrial complex-1 which will increase ROS (oxidative stress). Rotenone with the concentration of 12,5 ppb exposure on zebrafish larvae has been proven to induce LGR in zebrafish. Many published studies proved that kelor (*Moringa oleifera*) leaves contain abundant bioactive substances which can neutralize free radicals and it also can act as an anti-inflammatory agent. *Moringa oleifera* is a widely grown plant in Indonesia. It has big potency to be developed as a therapeutic candidate to handle LGR. This study is aimed to prove that ethanolic extract of *Moringa oleifera* leaves can ameliorate the body length of zebrafish larvae induced by rotenone with decreasing IL-10 and decreasing Caspase-3 concentration.

This study was designed as a true experimental post-test only controlled group design single blind. Zebrafish larvae was obtained from hatched embryo at 3 day post fertilization (dpf). Body length of zebrafish was measured at 3, 6, and 9 dpf by microscope equipped with digital camera (Optilab) connected with computer through software (Image Raster). Zebrafish larvae were sacrificed at 6 dpf. Thereafter, IL-10 and Caspase-3 concentration were measured from the zebrafish homogenate using ELISA. Data analysis was performed statistically utilizing comparison test (one-way Anova for normal and homogenous data, Kruskal-Wallis otherwise) and correlation test (Pearson Correlation for normal data, Spearman test if the data wasn't normal).



This study proves that ethanolic extract of *Moringa oleifera* leaves ameliorates body length of zebrafish larvae at 6 and 9 dpf dose-dependently, proven from strong positive correlation between zebrafish body length and extract concentration. IL-10 concentration result showed an interesting pattern, where rotenone exposed group had the highest concentration of IL-10 (higher than control group) while rotenone exposed and treated with *Moringa oleifera* extract exhibited lower IL-10 concentration with no statistical difference with control group. This result showed that IL-10 activity in this study was to compensate the excess inflammatory activity caused by pro-inflammatory cytokine activity induced by rotenone. Caspase-3 concentration of zebrafish larvae in this study increased up to 2,5 times normal concentration (control group) with the administration of rotenone. *Moringa oleifera* leaves extract exposure in zebrafish induced with rotenone was able to normalize Caspase-3 concentration (no statistical difference with control group). IL-10 and Caspase-3 was correlated negatively with moderate correlation.

This study concluded that ethanolic extract of *Moringa oleifera* leaves toward rotenone-induced zebrafish larvae was able to ameliorate body length; decreased IL-10 level; and decreased Caspase-3 concentration.



DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Halaman Pernyataan Orisinalitas	iii
Halaman Riwayat Hidup	v
Halaman Ucapan Terima Kasih	vi
Halaman Identitas Penguji	vii
Halaman Pernyataan Komunikasi dan Publikasi Ilmiah	viii
Ringkasan	ix
Kata Pengantar	xiii
Daftar Isi	xv
Daftar Tabel	xx
Daftar Gambar	xxi
Daftar Singkatan	xxii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.2.1 Rumusan Masalah Umum	6
1.2.2 Rumusan Masalah Khusus	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	7
1.4 Manfaat Penelitian	7
1.4.1 Manfaat Akademik	7



1.4.2 Manfaat Praktis 7

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA 8

2.1 *Linear Growth Retardation* 8

2.1.1 Definisi dan Epidemiologi 8

2.1.2 Teori Pertumbuhan Tulang 8

2.1.3 Stress Oksidatif pada LGR 11

2.2 Interleukin – 10 13

2.3 Caspase-3 15

2.4 *Zebrafish* 18

2.4.1 Taksonomi, Ekosistem, dan Daur Hidup 18

2.4.2 *Zebrafish* sebagai Model Tumbuh Kembang Tulang 24

2.5 Rotenone 26

2.5.1 Karakteristik Kimia dan Fisik 26

2.5.2 Rotenone sebagai Penyebab LGR 28

2.6 Daun Kelor (*Moringa oleifera*) 31

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN 35

3.1 Kerangka Konsep Penelitian 35

3.2 Hipotesis Penelitian 37

BAB 4 METODE PENELITIAN 38

4.1 Rancangan Penelitian dan Desain Penelitian 38

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian 39

4.2.1 Populasi Penelitian 39

4.2.2 Sampel Penelitian 39

4.2.3 Kriteria Sampel 39



4.2.3.1 Kriteria Inklusi.....	39
4.2.3.2 Kriteria Eksklusi.....	39
4.2.3.3 Kriteria <i>Dropout</i>	39
4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	40
4.3.1 Lokasi Penelitan.....	40
4.3.2 Waktu Penelitian.....	40
4.4 Variabel dan Definisi Operasional.....	40
4.4.1 Variabel Penelitian.....	40
4.4.2 Definisi Operasional.....	40
4.5 Alat dan Bahan.....	41
4.5.1 Pemeliharaan Induk <i>Zebrafish</i>	41
4.5.2 Penyiapan Fertilisasi.....	42
4.5.3 Pengambilan Embrio <i>Zebrafish</i>	42
4.5.4 Pembuatan <i>Zebrafish</i> Model LGR.....	42
4.5.5 Pemeliharaan dan Perlakuan Larva <i>Zebrafish</i>	42
4.5.6 Pengukuran Panjang Badan <i>Zebrafish</i>	42
4.5.7 Preparasi ELISA.....	43
4.5.8 Pengukuran Kadar IL-10 dengan ELISA.....	43
4.5.9 Pengukuran Kadar Caspase-3 dengan ELISA.....	43
4.6 Prosedur Penelitian.....	43
4.6.1 Pemeliharaan Indukan <i>Zebrafish</i>	43
4.6.2 Penyiapan Fertilisasi.....	44
4.6.3 Panen Telur <i>Zebrafish</i>	44
4.6.4 Pembuatan <i>Zebrafish</i> Model LGR.....	44
4.6.5 Pemeliharaan dan Perlakuan Larva <i>Zebrafish</i>	44



4.6.6 Pengukuran Panjang Badan <i>Zebrafish</i>	45
4.6.7 Preparasi ELISA.....	45
4.6.8 Pengukuran Kadar IL-10 dengan ELISA.....	45
4.6.9 Pengukuran Kadar Caspase-3 dengan ELISA.....	46
4.7 Analisis Statistik.....	46
4.8 Jadwal Kegiatan.....	47
4.9 Alur Penelitian.....	58

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Paparan Rotenone 12,5 ppb pada Larva <i>Zebrafish</i>	49
5.2 Paparan Ekstrak Etanol Daun Kelor pada Larva <i>Zebrafish</i>	50
5.3 Efek Ekstrak Etanol Daun Kelor terhadap Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> Diinduksi Rotenone 12,5 ppb.....	51
5.4 Efek Ekstrak Etanol Daun Kelor terhadap Kadar IL-10 <i>Zebrafish</i> 6 dpf Diinduksi Rotenone 12,5 ppb.....	52
5.5 Efek Ekstrak Etanol Daun Kelor terhadap Kadar Caspase-3 <i>Zebrafish</i> 6 DPF Diinduksi Rotenone 12,5 ppb.....	54
5.6 Korelasi Kadar IL-10 Terhadap Panjang Badan <i>Zebrafish</i>	56
5.7 Korelasi Antara Kadar Caspase-3 terhadap Panjang Badan <i>Zebrafish</i> ...	56
5.8 Korelasi Antara Kadar IL-10 dan Kadar Caspase-3.....	57

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Rotenone Menghambat Pertumbuhan Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> ..	59
6.2 Ekstrak Etanol Daun <i>Moringa oleifera</i> Tidak Menyebabkan LGR.....	61
6.3 Ekstrak Etanol Daun <i>Moringa oleifera</i> Memperbaiki Panjang Badan.....	61
6.4 Kadar IL-10 pada <i>Zebrafish</i> Diinduksi Rotenone yang Diberi Ekstrak Etanol Daun <i>Moringa oleifera</i>	63



6.5 Kadar Caspase-3 pada Zebrafish Diinduksi Rotenone yang Diberi Ekstrak

Etanol Daun *Moringa oleifera* 63

6.6 Penurunan Kadar IL-10 Diikuti juga oleh Penurunan Kadar Caspase-3

Larva *Zebrafish* 63

BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan 68

7.2 Saran 68

DAFTAR PUSTAKA 69

LAMPIRAN 74



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Parameter Kualitas Habitat <i>Zebrafish</i>	20
Tabel 2.2 Perkembangan Embrio <i>Zebrafish</i>	20
Tabel 2.3 Kandungan Fitokimia Ekstrak Etanol daun Kelor.....	33
Tabel 2.4 Mekanisme Anti-Inflamasi Flavonoid.....	33
Tabel 4.1 Jadwal Kegiatan.....	47
Tabel 5.1 Rerata Panjang Badan (\bar{x}) \pm SD <i>Zebrafish</i> K dan R pada 3, 6, dan 9 dpf.....	49
Tabel 5.2 Rerata Panjang Badan (\bar{x}) \pm SD larva <i>Zebrafish</i> pada 3, 6, 9 dpf..	50
Tabel 5.3 Rerata Panjang Badan (\bar{x}) \pm SD <i>Zebrafish</i> dengan Paparan Rotenone dan Ekstrak Daun Etanol Kelor pada 3, 6, dan 9 dpf....	51
Tabel 5.4 Kadar IL-10 (\bar{x}) \pm SD (ng/L) pada Larva <i>Zebrafish</i> usia 6 dpf.....	52
Tabel 5.5 Korelasi antara Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Kelor terhadap Kadar IL-10 Larva <i>Zebrafish</i> Usia 6 dpf.....	54
Tabel 5.6 Kadar Caspase-3 (\bar{x}) \pm SD (ng/L) Larva <i>Zebrafish</i> Usia 6 dpf.....	54
Tabel 5.7 Korelasi antara Kompensasi Ekstrak Etanol Daun Kelor dengan Kadar Caspase-3 Larva <i>Zebrafish</i> pada Usia 6 dpf.....	55
Tabel 5.8 Korelasi IL-10 terhadap Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> pada Usia 6 dpf.....	56
Tabel 5.9 Korelasi Caspase-3 terhadap Panjang Badan Larva <i>Zebrafish</i> pada Usia 6 dpf.....	57
Tabel 5.10 Korelasi Kadar IL-10 dan Caspase-3 Larva <i>Zebrafish</i> Usia 6 dpf.	57



DAFTAR GAMBAR

	xxi
	Halaman
Gambar 2.1	Pertumbuhan Tulang oleh Osifikasi Endokondral... 11
Gambar 2.2	Mekanisme ROS Dalam Menghambat Pertumbuhan Tulang... 12
Gambar 2.3	Jalur Persinyalan IL-10 14
Gambar 2.4	Jalur Aktivasi Apoptosis 16
Gambar 2.5	Induksi Apoptosis oleh Stress Seluler..... 17
Gambar 2.6	Struktur Fisik <i>Danio rerio</i> 18
Gambar 2.7	Perkembangan Embrio <i>Zebrafish</i> 0,2-2,25 hpf..... 21
Gambar 2.8	Perkembangan Embrio <i>Zebrafish</i> 2,5-8 hpf..... 22
Gambar 2.9	Perkembangan Embrio <i>Zebrafish</i> 8-35 hpf..... 23
Gambar 2.10	Rotenone Menghambat Interaksi Ubiquinon – N2 28
Gambar 2.11	Rotenone Menghambat Kompleks-1 Respirasi 29
Gambar 2.12	Peran Inflamasi dalam Pertumbuhan Tulang..... 30
Gambar 2.13	Pohon <i>Moringa oleifera</i> 31
Gambar 3.1	Kerangka Konsep 35
Gambar 4.1	Alur Penelitian 48
Gambar 5.1	Rerata Panjang Badan (\bar{x}) \pm SD <i>Zebrafish</i> pada 3, 6, dan 9 dpf 49
Gambar 5.2	Grafik Rerata Panjang Badan (\bar{x}) \pm SD <i>Zebrafish</i> dengan Paparan Ekstrak Etanol Daun <i>Moringa oleifera</i> 50
Gambar 5.3	Grafik Rerata Panjang Badan (\bar{x}) \pm SD <i>Zebrafish</i> dengan Paparan Rotenone dan Ekstrak Etanol Daun Kelor pada 3, 6, dan 9 dpf.. 51
Gambar 5.4	Rerata Kadar IL-10 (\bar{x}) \pm SD (ng/L) <i>Zebrafish</i> pada Usia 6 dpf.. 53
Gambar 5.5	Rerata Kadar Caspase-3 (\bar{x}) \pm SD (ng/L) <i>Zebrafish</i> pada Usia 6 dpf..... 55



Bab 1

Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Linear growth retardation (LGR) merupakan gangguan tumbuh kembang yang ditandai dengan capaian tinggi badan kurang dari 2 standar deviasi median tinggi badan normal (<2 SD *Height per Age Z-score* (HAZ)) (WHO, 2018). Penyebab LGR antara lain adalah pertumbuhan intra-uterin yang tidak optimal, tingkat pendidikan orang tua, nutrisi yang inadekuat, dan infeksi berulang (Svefors *et al.*, 2016).

Linear growth retardation merupakan masalah global, khususnya untuk negara berkembang. Pada tahun 2010, terhitung kurang lebih dari total 171 juta anak dengan LGR di dunia, 167 juta populasi tersebut berada di negara berkembang (de Onis *et al.*, 2011). Indonesia, dalam statusnya sebagai negara dengan pendapatan menengah, menempati urutan ke-5 untuk jumlah terbanyak populasi LGR setelah Etiopia, Kongo, Kenya, Uganda, dan Sudan (Hoddinott *et al.*, 2013; Ohyver *et al.*, 2017).

LGR merupakan masalah serius yang berkorelasi erat dengan produktivitas ekonomi, sehingga baik pemerintah Indonesia maupun organisasi global melakukan banyak usaha untuk mengatasinya. Salah satunya adalah gerakan *Scaling Up Nutrition* (SUN) pada 2011 untuk mengatasi kekurangan nutrisi (salah satu penyebab utama LGR) (Torlesse *et al.*, 2016). *Linear Growth Retardation* mengundang perhatian karena akibatnya yang berkaitan dengan produktivitas dan memiliki dampak ekonomis baik secara langsung maupun tidak langsung. Dilaporkan bahwa individu LGR cenderung apatis, tersisih dari lingkungan sosialnya, defisit kognitif, dan lambat belajar (Perkins *et al.*, 2017).

LGR memiliki dampak negatif jangka panjang, seperti gangguan perkembangan kognitif, penurunan produktivitas ekonomi, dan peningkatan risiko terkena penyakit kronis (Svefors *et al.*, 2016). Defisit kognitif menyebabkan penurunan produktifitas, sehingga individu tidak dapat menghasilkan nilai ekonomis secara maksimal. Penyakit kronis juga menyebabkan penurunan produktifitas karena waktu non-produktif yang disebabkan perawatan penyakit dan penurunan fisik-kognitif akibat sakit ditambah dengan biaya pengobatan. Akibatnya, kerugian ekonomis suatu negara dengan akar masalah LGR merupakan konsekuensi yang tidak dapat dihindari (Hoddinott *et al.*, 2013).

LGR merupakan akibat dari sebab multifaktor. Sebelum bayi dilahirkan, kondisi nutrisi dan kesehatan dari ibu adalah aspek penentu. Setelah lahir, individu perlu untuk mendapatkan nutrisi (termasuk vitamin dan mineral) yang adekuat. Individu dalam masa pertumbuhan harus terjaga kesehatannya agar tidak mengalami infeksi berulang baik yang bersifat sub-klinis ataupun klinis karena infeksi menimbulkan respon peradangan yang memerlukan energi yang besar, sehingga energi yang tadinya disediakan untuk tumbuh kembang anak, habis oleh kondisi radang tersebut. Oleh karena itu, sanitasi dan higiene lingkungan anak menjadi titik kritis untuk menjaga kondisi optimal tumbuh kembang (WHO, 2013).

Tumbuh kembang anak juga ditentukan oleh kondisi stress oksidatif. Hal ini dapat berasal dari over-produksi *reactive oxygen species* (ROS), penurunan anti-oksidan, atau kombinasi keduanya. Radikal bebas dan spesies reaktif lainnya diproduksi di dalam tubuh sebagai hasil samping dari konsumsi oksigen. Antioksidan (glutathion, vitamin A, E, dan C, selenium, seng, dll.) dan enzim anti-oksidan (*superoxide dismutase* (SOD), *catalase* (CAT), dan *glutathione peroxidase* (GPX)) menghasilkan efek sinergis dalam mengeliminasi radikal bebas. Berbagai studi membuktikan bahwa malnutrisi (defisiensi diet protein,



selenium, seng, dll.) meningkatkan derajat stress oksidatif dan kerusakan sel. Ditemukan bahwa pada individu dengan LGR, terjadi penurunan konsentrasi antioksidan vitamin C dan enzim antioksidan CAT, SOD, dan GPX (Aly *et al.*, 2014).

Proses pertumbuhan tulang melibatkan *remodeling* terutama pada bagian *epiphyseal growth plate*. Hal ini diawali dari fase resorpsi yaitu aktivasi osteoklas untuk meresorpsi bagian tulang yang akan di-*remodelling*. Setelah fase ini selesai, prekursor osteoblast mulai menempati bagian tulang yang telah diresorpsi (fase *reversa*). Osteoblas matur kemudian menghasilkan osteoid pada tempatnya (fase pembentukan tulang). Selanjutnya osteoid akan mengalami mineralisasi, bersama dengan osteosit menghasilkan jaringan tulang yang baru (fase mineralisasi). Tujuan *remodeling* tulang adalah menghasilkan jaringan tulang baru yang performanya lebih baik atau untuk pertumbuhan tulang.

Kegagalan proses ini yang ditandai dengan aktivitas osteoklas (resorpsi) lebih tinggi dari osteoblast (pembentukan tulang) dalam konteks pertumbuhan tulang dapat menyebabkan LGR. *Reactive oxygen species* berperan besar dalam kegagalan ini karena meningkatkan aktivasi dan aktivitas osteoklas sekaligus mensupresi kerja osteoblast (Domazetovic *et al.*, 2017).

Rotenon merupakan senyawa pestisida yang menghambat kompleks 1 mitokondria. Akibat penghambatan ini, mitokondria gagal beroperasi normal sehingga diproduksi ROS dalam jumlah besar. Kondisi ini dapat menyebabkan peningkatan apoptosis serta peradangan dimana kedua aktivitas ini dapat menghambat perkembangan tulang (Milward, 2017; Mollazadeh *et al.*, 2015).

Rotenon dalam skala laboratorium digunakan untuk meneliti hal – hal yang berkaitan dengan deformitas organ, seperti *Parkinson's Disease*, penyakit jantung, dan hambatan tumbuh kembang (Emmrich *et al.*, 2013). Untuk

menginduksi LGR pada *zebrafish*, digunakan rotenon konsentrasi 12,5 ppb pada 2 – 72 hpf (Dianita, 2017).

Penelitian ini menggunakan *zebrafish* (*Danio rerio*) sebagai hewan model. *Zebrafish* merupakan ikan air tawar yang secara alami hidup di sungai dan danau. Nama *zebrafish* disebutkan karena corak ikan ini bergaris – garis pada kedua sisinya. *Zebrafish* memiliki homologi gen dengan manusia sebesar 70%.

Selain itu, *zebrafish* memiliki mulut, otak, tulang belakang, usus, pancreas, hati, empedu, ginjal, esogagus, jantung, telinga, hidung, otot, darah, tulang, kartilago, dan gigi dimana seluruh organ-organ tersebut diatur oleh gen *highly conserved* antara manusia dan *zebrafish* (Burke, 2016). Penelitian ini bertujuan untuk memeriksa kondisi tumbuh kembang badan hingga analog usia manusia 8 tahun.

Oleh karena itu, diperlukan populasi sampel yang berusia seragam dalam jumlah besar. Setiap *zebrafish* bertelur, dihasilkan 200 – 300 embrio. Jumlah ini jauh lebih besar daripada hewan coba lain, misalnya tikus yang hanya menghasilkan 5 – 10 keturunan setiap kali berkembang biak (NC3RS, 2014). Di samping itu, daur hidup yang relatif cepat (6 *day post fertilization* (dpf) analog dengan 2 tahun manusia, 9 dpf analog dengan 8 tahun manusia) membuat *zebrafish* praktis ideal untuk penelitian LGR (Zakiah, 2017).

Kondisi malnutrisi ataupun infeksi dapat menyebabkan peradangan, sehingga menimbulkan LGR. Salah satu sitokin regulator penting inflamasi adalah IL-10. Sitokin ini merupakan sitokin anti-inflamasi. Defisiensi IL-10 dapat menyebabkan inflamasi kronis yang bersifat patologis (Saraiva dan O'Garra, 2010). Interleukin-10 membatasi sekresi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-1, IL-6, dan IL-12. Interleukin-10 membuat berbagai sel imun seperti makrofag, sel T, dan sel B menjadi non-aktif. Dengan aktivitas IL-10, proteksi terhadap respon imun berlebih dan kerusakan jaringan dapat dipertahankan (Shachar dan Karin, 2013). Peradangan berlebih oleh aktivitas TNF- α , IL-1 β , IL-6, dll. menghambat

osifikasi endokondral (Milward, 2017) dimana kerja sitokin – sitokin ini dihambat oleh IL-10.

Caspase-3 merupakan enzim katalisator apoptosis. Enzim ini merupakan efektor final apoptosis jalur intrinsik maupun jalur ekstrinsik. Diketahui bahwa LGR dapat disebabkan oleh peradangan yang terjadi akibat malnutrisi, stress oksidatif. Peradangan ini meningkatkan stress seluler yang dapat memicu apoptosis. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Kim *et al.* (2000) dilaporkan bahwa pemberian antioksidan untuk menurunkan stress oksidatif post-iskemia serebral pada mencit dapat menurunkan Caspase 3 yang selanjutnya menurunkan derajat infark serebral. Peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) diketahui dapat meningkatkan ketidakseimbangan yang cenderung ke arah osteoklastogenesis sehingga meningkatkan resorpsi tulang. Selain itu, peningkatan ROS menyebabkan apoptosis osteoblast dan osteosit sehingga yang akhirnya menghambat pertumbuhan tulang (Domazetovic *et al.*, 2017).

Penelitian ini mempelajari efek ekstrak etanol daun kelor (*Moringa olifera*) terhadap kondisi LGR. Tanaman kelor secara empiris telah luas digunakan sebagai sumber obat. Dalam Ayurveda disebutkan bahwa tanaman kelor dapat mencegah hingga 300 penyakit, terutama bagian daunnya memiliki khasiat yang poten dalam upaya prevensi maupun pengobatan penyakit (Gangluy, 2013).

Daun Kelor mengandung protein, mineral, beta karoten, dan antioksidan yang poten untuk mengobati berbagai penyakit seperti malaria, demam tifoid, penyakit-penyakit infeksi parasit, artritis, penyakit kulit, penyakit genitourinari, hipertensi, dan diabetes. Selain itu, daun kelor juga dapat meningkatkan imunitas dan kualitas air susu (Popoola dan Obembe, 2013; Sivasankari *et al.*, 2014). Ekstrak etanol daun kelor diketahui memiliki potensi kuat sebagai antioksidan dan agen anti-inflamasi. Kandungan mineral dari ekstrak etanol daun kelor seperti tembaga, mangan merupakan kofaktor enzim antioksidan SOD. Kandungan

flavonoidnya (kaempferol, apigenin, dan quercetin) memiliki efek antioksidan dan anti-inflamasi (Karthivasan *et al.*, 2016). Berdasarkan potensinya sebagai antioksidan ekstrak etanol dapat menurunkan aktivasi caspase-3. Berdasarkan aktivitas anti-inflamasinya ekstrak etanol daun kelor diharapkan meningkatkan ekspresi IL-10. Penelitian ini akan mempelajari efek ekstrak etanol daun kelor untuk mencegah LGR dari kedua jalur tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Apakah pemberian ekstrak etanol daun kelor dapat meningkatkan kadar IL-10 dan menurunkan kadar Caspase-3, dan memperbaiki panjang badan Zebrafish model LGR.

1.2.2 Rumusan Masalah Khusus

1.2.2.1 Apakah pemberian ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* meningkatkan kadar IL-10 zebrafish diinduksi rotenone?

1.2.2.2 Apakah pemberian ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* menurunkan kadar Caspase 3 zebrafish diinduksi rotenone?

1.2.2.3 Apakah pemberian ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* mengoreksi panjang badan zebrafish diinduksi rotenone?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk membuktikan bahwa pemberian ekstrak etanol daun kelor dapat meningkatkan kadar IL-10, menurunkan kadar Caspase-3, dan memperbaiki panjang badan Zebrafish model LGR.

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Membuktikan bahwa pemberian ekstrak etanol daun kelor meningkatkan kadar IL-10 *zebrafish* diinduksi rotenon.

1.3.2.2 Membuktikan bahwa pemberian ekstrak etanol daun kelor menurunkan kadar Caspase-3 *zebrafish* diinduksi rotenon.

1.3.2.3 Membuktikan bahwa pemberian ekstrak etanol daun kelor mengoreksi panjang badan *zebrafish* diinduksi rotenon.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Menambah wawasan akademis mengenai potensi ekstrak etanol daun kelor dalam menghambat stress oksidatif dan inflamasi berkenaan dengan pencegahan LGR.

1.4.2 Manfaat Praktis

Memberdayakan daun kelor sebagai sumber anti-oksidan dan anti-inflamasi untuk pencegahan LGR.





BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Linear Growth Retardation*

2.1.1 Definisi dan Epidemiologi

Linear growth retardation (LGR) pada anak paling banyak disebabkan oleh kondisi kurang nutrisi. Diperkirakan kurang lebih 165 juta anak di bawah 5 tahun memiliki tinggi badan dengan nilai -2 SD dari *height for age Z (HAZ) score* (Prendergast dan Humphrey, 2014). Kondisi LGR menjadi penanda adanya gangguan tumbuh kembang anak yang dapat meningkatkan resiko mortalitas anak, hambatan perkembangan fungsi kognitif dan motoric, penurunan performa di sekolah, peningkatan resiko *non-communicable diseases*, dan penurunan produktivitas saat dewasa. Beban akumulatif negara-negara di Asia dan Afrika (pemilik populasi LGR yang utama) diperkirakan kurang lebih 11 % dari *Gross National Product* (Horton dan Steckel, 2013).

Indonesia merupakan negara dengan status pendapatan menengah. Namun, di dunia populasi LGR Indonesia menempati urutan ke-5 terbanyak. Prevalensi anak usia 5 tahun ke bawah yang mengalami LGR pada tahun 2013 di Indonesia adalah 37 % dengan proporsi di atas 40 % pada 15 dari 33 provinsi (Torlesse *et al.*, 2016).

2.1.2 Teori Pertumbuhan Tulang

Pembentukan rangka dihasilkan oleh berbagai jenis sel, berbagai struktur, dan factor metabolic serta regulator. Pada saat embryogenesis,

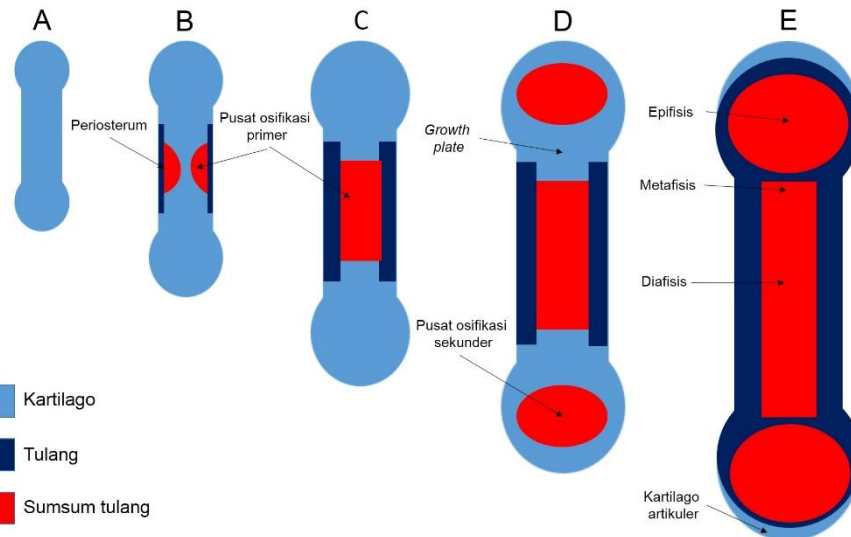
tulang terbentuk dari 3 pusat: *neural crest* yang menghasilkan tulang kepala dan wajah; *lateral plate mesoderm* yang menghasilkan tulang di sekitar pelvis, bagu, dan tulang panjang pada tungkai; dan *sclerotome* yang membentuk berbagai rangka aksial. Tanda awal dari perkembangan tulang mulai ditunjukkan pada akhir minggu keempat embriogenesis, ketika sel-sel *sclerotome* membentuk jaringan longgar yang disebut mesenkim.

Proses ini juga terjadi pada pusat pertumbuhan tulang alinnya. Sel – sel mesenkim bermigrasi dan berkondensasi membentuk elemen rangka di bawah pengaturan dari factor-faktor parakrin dan autokrin seperti *bone morphogenetic proteins* (BMP), *fibroblast growth factors* (FGF), dll. Sel-sel mesenkim dalam elemen rangka yang berkembang akan berdiferensiasi menjadi berbagai sjenis sel seperti fibroblast, kondrosit, atau osteoblast.

Pada pembentukan tulang pipih seperti pada tengkorak dan mandibular, sel-sel berdiferensiasi secara langsung menjadi tulang yang mendeposisi osteoblas. Proses ini disebut osifikasi intramembrane. Pada saat pertumbuhan longitudinal sangat penting, seperti pada tulang jari, tungkai, rusuk, dan tulang belakang, sel-sel mesenkim berdiferensiasi menjadi kondrosit yang mendeposisi model kartilago. Konversi model kartilago menjadi tulang yang disertai dengan pertumbuhan longitudinal ini disebut osifikasi endokondral (Mackie *et al.*, 2011).

Osifikasi endokondral dimulai sejak masa fetus dan terus berlangsung hingga masa pertumbuhan berhenti menjelang dewasa. Pada saat model kartilago telah terbentuk, kondrosit pada bagian tengah dari rongga ini (diafisis) mulai bertambah jumlah dan ukurannya. Hipertrofi kondrosit diasosiasikan dengan apoptosis, kalsifikasi matriks, dan

vaskularisasi. Pembuluh darah membawa stem sel dari asal yang berbeda sebagai asal usul osteoblas dan osteoklas. Sel-sel yang datang dari pembuluh darah ini menstimulasi penggantian kartilago terkalsifikasi dengan tulang trabekular dan sumsum tulang. Dengan ekspansi sumsum tulang hingga epifisis (ujung tulang), maka kondrosit pada epifisis berproliferasi dengan cepat membentuk kolom longitudinal dari kondrosit. Jadi, di antara epifisis kartilago dan tulang yang baru terbentuk, terdapat *growth plate*. Di dalam *growth plate*, proliferasi kondrosit diimbangi dengan apoptosis kondrosit dan penggantian kartilago terkalsifikasi dengan tulang yang mengatur ketebalan *growth plate* selama masa pertumbuhan. Pada masa pertumbuhan, pusat sekunder sferis osifikasi terbentuk di dalam epifisis. Pertumbuhan longitudinal tulang berlanjut hingga pubertas, ketika proliferasi kondrosit berhenti dan pusat osifikasi primer, sekunder bergabung. Lapisan tipis kartilago yang membungkus permukaan sendi tetap bertahan untuk melindungi tulang dengan menyediakan permukaan yang halus untuk artikulasi (Gambar 2.1) (White dan Wallis, 2001).



Gambar 2.1 Pertumbuhan Tulang oleh Osifikasi Endokondral. (A) Model kartilago dari calon tulang. (B) Periosteum pusat primer osifikasi mulai terbentuk. (C) Pusat primer osifikasi mulai berkembang ke ujung model kartilago. (D) Pusat osifikasi sekunder terbentuk pada ujung-ujung tulang, menghasilkan *growth plate* di antara pusat osifikasi primer dan sekunder. (E) Tulang matur terbentuk dengan *growth plate* yang diganti seluruhnya dengan jaringan tulang dewasa. Kartilago yang tersisa hanya kartilago articular di bagian ujung tulang.

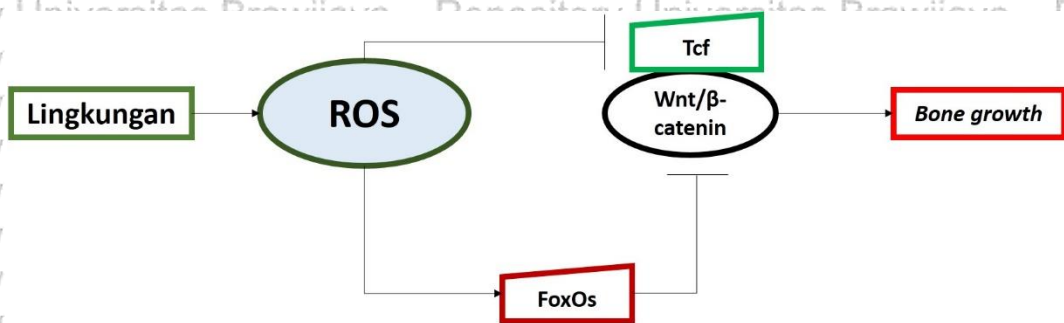
2.1.3 Stress Oksidatif pada LGR

Keseimbangan redoks dalam tubuh dikondisikan seimbang sedikit tinggi ke arah oksidan. *Reactive oxygen species* dihasilkan secara normal sebagai produk sampingan dari metabolisme aerobik, umumnya saat proses rantai transpor electron selama fosforilasi oksidatif di mitokondria.

Bentuk utama ROS adalah anion superoksid (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal bebas seperti radikal hidroksil (OH^\cdot). Pada konsentrasi rendah, ROS berfungsi sebagai molekul sinyal untuk aktivitas fisiologis spesifik. Namun, peningkatan kadar ROS dapat merusak protein, lipid, dan

DNA, yang memicu stres oksidatif dan berakhir dengan kematian sel. Perusakan oksidatif terhadap makromolekul biologik telah terbukti dalam etiologi berbagai penyakit akut dan kronik (deBoer *et al.*, 2002).

Peningkatan kadar ROS memiliki efek menimbulkan ketidakseimbangan osteoblas-osteoklas yang tendensius ke osteoklas. Peningkatan kadar ROS menghambat fungsi diferensiasi osteoblast dan menyebabkannya mengalami apoptosis. Faktor transkripsi *Forkhead box O* (FoxO) diaktifkan oleh ROS. FoxO memiliki aktivitas meningkatkan ekspresi enzim anti-oksidan seperti CAT, SOD, dan glutation peroksidase. Transkripsi FoxO memerlukan β -catenin yang juga penting sebagai koaktivator Tcf. Tanpa aktivitas Tcf, efek persinyalan Wnt/ β -catenin tidak dapat berjalan. Jadi, dengan mengikat β -catenin secara kompetitif, FoxO mengantagonis Wnt/Tcf setelah diaktifkan oleh ROS (Gambar 2.2). Wnt/ β -catenin penting dalam formasi tulang, hambatan pada jalur ini akan menghasilkan penurunan osteogenensis (Tian *et al.*, 2017)



Gambar 2.2 Mekanisme ROS Dalam Menghambat Pertumbuhan Tulang.

Peningkatan ROS menyebabkan aktivitas antagonis kinerja Wnt/ β -catenin/Tcf dengan kompetisi β -catenin dari Tcf ke FoxO. LRP: LDL receptor-related proteins.

Sebaliknya, ROS dapat mengaktifasi fungsi dan diferensiasi osteoklas. Dengan meningkatkan produksi ligan reseptor NfKB (RANKL) dan aktivasi ERK/NfKB/TNF/IL-6, ROS menghambat apoptosis osteoklas dan meningkatkan osteoklastogenesis. Di samping itu, RANKL juga dapat

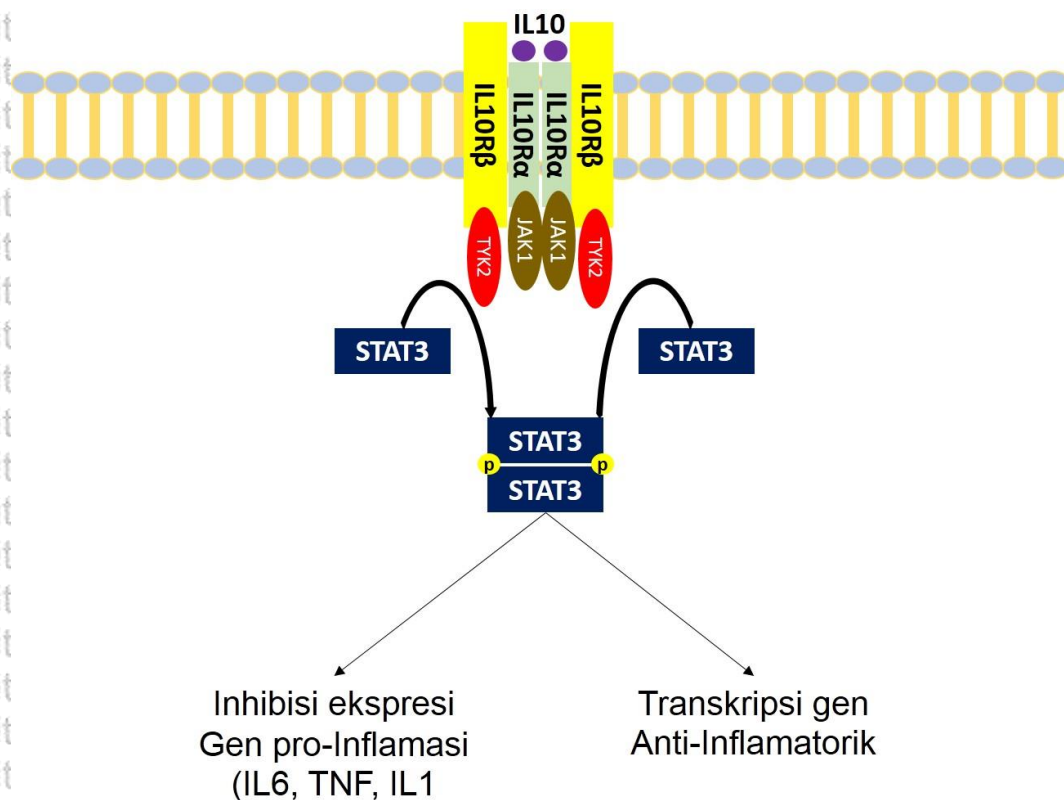
menekan aktivitas transkripsional FoxO₅. Hambatan ini meningkatkan diferensiasi dan *survival* osteoklas (Tian *et al.*, 2017).

2.2 Interleukin – 10

Interleukin – 10 (IL-10) merupakan sitokin anti – inflamasi utama yang diproduksi leukosit, monosit, makrofag, sel dendritik, dan beberapa sel epitel. Pada leukosit, IL-10 berfungsi pada sel imun inat maupun adaptif dan memiliki aktivitas imunomodulator yang luas, seperti supresi proliferasi, supresi sekresi sitokin, dan supresi ekspresi kostimulator pada sel imun pro-inflamasi. Efek anti-inflamasi dari IL-10 dibuktikan dengan fakta bahwa tikus yang defisien IL-10 maupun reseptor IL-10 akan mengalami kondisi inflamasi patologis enterokolitis pada usus secara spontan. Pada manusia, defisiensi IL-10 terkait erat dengan *Inflammatory bowel disease* (Shouval *et al.*, 2014).

IL-10 merupakan member dari famili sitokin tipe 2. IL-10 umumnya disekresi oleh sel Th2 yang menghambat performa sel Th1, pensekresi IFN- γ . *Antigen Presenting Cells* (APC) mensekresi IL-10 diinisiasi oleh kontak dengan *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMP) pada patogen terhadap reseptor permukaannya (*Pattern Recognition Receptors* (PRR)). Beberapa jenis PRR seperti TLR2, TLR3, TLR4, TLR9 yang teraktivasi akan mengaktifkan produksi IL-10 khususnya pada makrofag maupun sel dendritik. Selain aktivasi beberapa jenis PRR, ligasi NOD2 juga menginduksi ekspresi IL-10. Di samping itu, stimulasi lektin tipe C, DC-SIGN dan dectin 1 juga menyebabkan produksi IL-10. Beberapa sitokin seperti IL-21 dan IL-27 juga dapat meningkatkan ekspresi IL-10 melalui jalur dependen STAT1 dan STAT3 (Shouval *et al.*, 2014).

Persinyalan IL-10 melalui kompleks heterotetramerik reseptor IL-10 yang terdiri dari IL-10R1 dan IL-10R2. Interaksi ikatan IL-10 pada reseptornya memediasi fosforilasi STAT3 oleh JAK1 dan TYK2. Setelah fosforilasi ini, STAT3 membentuk homodimer dan melakukan translokasi nuklear dimana STAT3 selanjutnya berikatan dengan gen responsif IL-10 yang memicu blokade berbagai jalur inflamasi. Hasil ekspresi gen responsif IL-10 menghambat persinyalan TLR4 pada tahapan IRAK dan TRAF6 yang menghasilkan penurunan ekspresi IL-6, TNF, dan IL-1 yang dimediasi NF- κ B. Selain itu, gen responsif IL-10 juga menghambat persinyalan IL-6 (Gambar 2.3) (Shouval *et al.*, 2014).



Gambar 2.3 Jalur Persinyalan IL-10. Reseptor IL-10R diaktifkan oleh sitokin IL-10. Aktivasi reseptor ini akan mengaktifkan jalur JAK1-STAT3, dimana STAT3 adalah factor transkripsi gen anti-inflamasi. Protein anti-inflamasi yang dihasilkan oleh aktivasi factor transkripsi STAT3 memiliki kinerja menghambat TRAF6 yang merupakan *second messenger* kaskade sinyal ekspresi gen sitokin pro-inflamasi, sehingga kaskade persinyalan IL-10 memiliki efek anti-inflamasi.

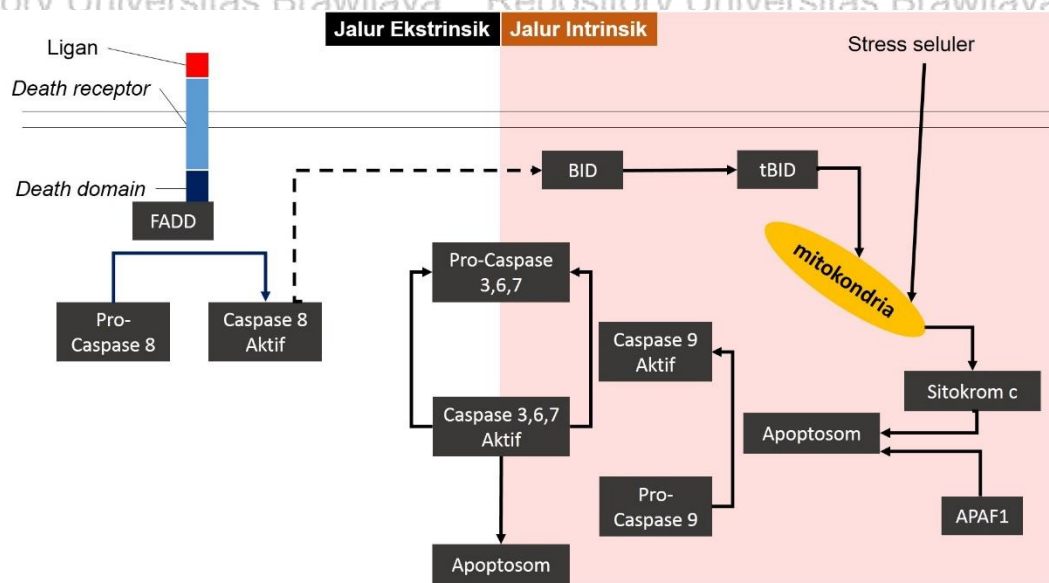
Inflamasi berperan dalam menyebabkan terjadinya LGR. Peningkatan sitokin pro inflamasi IL-6 berhubungan erat dengan kejadian LGR pada penelitian yang melibatkan anak-anak di Mesir (El-Maksoud *et al.*, 2017). Ekspresi IL-10 yang menekan kerja IL-6 esensial dalam mencegah LGR.

2.3 Caspase-3

Caspase-3 atau caspase eksekutor dikode oleh gen CASP3 (McIlwain *et al.*, 2013). Caspase 3 disebut sebagai caspase eksekutor karena protein ini merupakan ujung dari persinyalan apoptosis. Ketika Caspase-3 aktif, tidak ada lagi cara untuk menggagalkan apoptosis. Caspase-3 diatur oleh berbagai modifikasi post-translasi. Pertama, PKC δ dan p38 memfosforilasi Caspase-3. Sebaliknya, caspase 3 menyebabkan pemecahan PKC δ menjadi isoform kinase yang lebih pendek dan lebih aktif melakukan fungsi fosforilasi sehingga meningkatkan aktivitas Caspase-3 membentuk sebuah *loop* sinyal pro-apoptosis. p38 melakukan fosforilasi pada Ser150 pada Caspase-3 yang bersifat menghambat kerjanya. Mekanisme ini terlibat dalam penurunan apoptosis yang diinduksi Fas oleh neutrofil. Reaksi ubiquitilasi juga terlibat dalam modifikasi Caspase-3, menyebabkannya segera didegradasi oleh proteasome. Selain itu, inaktivasi Caspase-3 juga dimediasi oleh reaksi nitrosilasi (Parrish *et al.*, 2013).

Apoptosis dapat diakibatkan oleh aktivasi Caspase-3 yang dapat dipicu oleh jalur ekstrinsik maupun intrinsik. Jalur ekstrinsik diawali oleh aktivasi *death receptor* di bagian luar membran sel yang selanjutnya merekrut, mendimerisasi, dan mengaktifasi caspase 8 dengan bantuan protein adaptor *Fas-associated protein with death domain* (FADD). Caspase 8 aktif selanjutnya menginisiasi apoptosis baik secara langsung dengan memecah pro-Caspase-3, 6, atau 7,

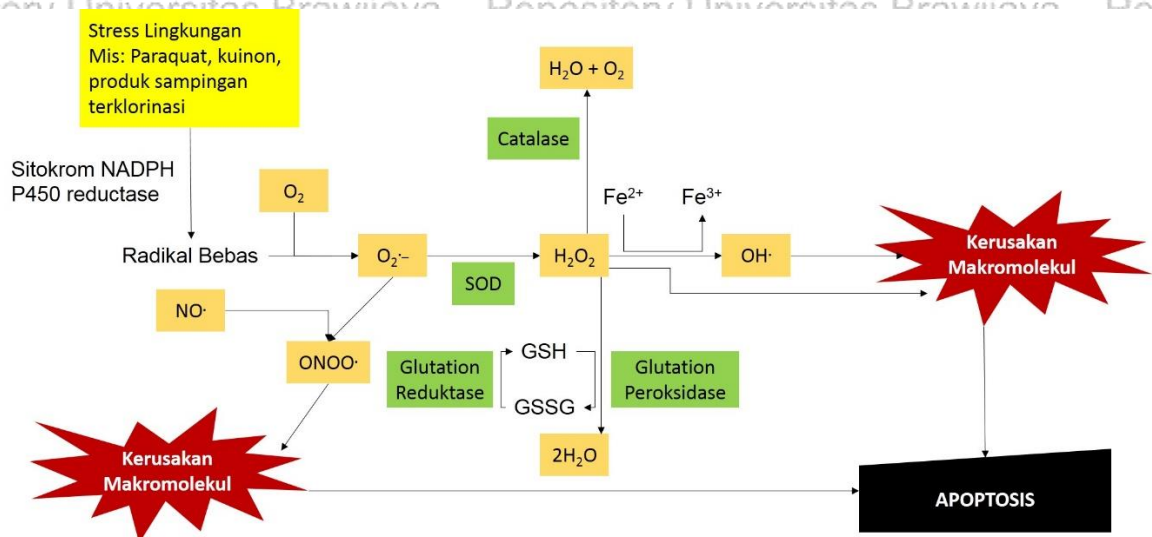
maupun via aktivasi *BH3 interacting-domain* (BID) (melalui jalur intrinsik). Apoptosis jalur intrinsik/ jalur mitokondria, dimulai oleh adanya berbagai stres seluler yang menyebabkan pelepasan sitokrom c dari mitokondria dan pembentukan apoptosom yang terdiri dari APAF1, sitokrom c, ATP, dan caspase 9, yang berujung pada aktivasi caspase 9. Kejadian ini kemudian menginisiasi apoptosis dengan pemecahan caspase eksekutor yang mengaktifkannya (Gambar 2.4) (McIlwain *et al.*, 2013).



Gambar 2.4 Jalur Aktivasi Apoptosis. Apoptosis dapat dijalankan melalui jalur ekstrinsik maupun intrinsik. Jalur ekstrinsik diawali oleh aktivasi *death receptor* yang akan mengaktifkan pemecahan pro-Caspase-8 menjadi Caspase-8. Di samping itu, jalur intrinsik yang dihasilkan oleh stress seluler mengawali kaskade apoptosis dengan pelepasan sitokrom c yang memfasilitasi pembentukan apoptosom untuk memecah pro-Caspase-9 menjadi Caspase-9. Caspase-8 dan Caspase-9 adalah enzim yang memiliki aktivitas memecah pro-caspase eksekutor (pro-Caspase-3, 6, dan 7) menjadi caspase eksekutor (Caspase 3, 6, dan 7) yang mengaktifkan apoptosis.

Salah satu penyebab esensial aktivasi jalur apoptosis adalah peningkatan ROS. Stress oksidatif dari lingkungan menyebabkan peningkatan produksi ROS yang menyebabkan kerusakan seluler. Senyawa – senyawa xenobiotic dari lingkungan secara otomatis dimetabolisme oleh sitokrom P450 reduktase,

sehingga mengalami reduksi 1 elektron dan menjadi radikal bebas. Senyawa radikal ini akan segera bereaksi dengan spesies – spesies oksigen misalnya, oksigen (menghasilkan O_2^-), oksida nitrit (menghasilkan $ONOO^-$). Namun, xenobiotic radikal tersebut juga dapat dinetralisir melalui reaksi dismutase dengan SOD membentuk H_2O_2 ataupun bereaksi dengan antioksidan Catalase atau Glutathion sehingga netral. Senyawa xenobiotic radikal tersebut juga dapat bereaksi dengan ion logam (reaksi fenton) dan menghasilkan radikal OH^* yang bersifat sangat radikal. Jika keadaan stress seluler rendah atau tinggi tetapi senyawa radikal masih dapat dinetralisir oleh enzim antioksidan, maka kerusakan makromolekul sel masih minimal untuk menginduksi apoptosis. Namun, jika kondisi stress oksidatif tinggi dan tidak dapat secara adekuat dinetralisir oleh enzim antioksidan, maka senyawa – senyawa radikal (OH^* , O_2^- , dan $ONOO^-$) akan merusak protein, lipid, dan asam nukleat sel, sehingga memicu apoptosis (lihat Gambar 2.5) (Dutudoir *et al.*, 2016).



Gambar 2.5 Induksi Apoptosis oleh Stress Seluler. Paparan xenobiotik dari lingkungan secara otomatis akan dimetabolisme dengan mereduksi 1 elektronnya oleh sitokrom P450 reduktase, sehingga xenobiotic menjadi radikal dan lebih lanjut mengambil electron dari spesies oksigen menghasilkan O_2^- , $ONOO^-$, dan OH^* , yaitu senyawa – senyawa ROS. Radikal oksidatif tersebut bereaksi secara otomatis dengan makromolekul dan merusaknya, sehingga menimbulkan kerusakan seluler yang berujung pada apoptosis.

Apoptosis erat kaitannya dengan tahap tumbuh kembang. Apoptosis berlebihan dapat menyebabkan LGR. Penelitian Unsain *et al.* (2013) melaporkan bahwa aktivasi berlebihan caspase (Caspase-3, 6, dan 9) menyebabkan degenerasi akson, sehingga penelitian ini menyimpulkan bahwa pada tahap morfogenesis sistem saraf, tingginya aktivitas Caspase-3 menjadi indikator gangguan perkembangannya. Korelasi positif ditunjukkan antara kinerja apoptosis yang tinggi dengan penyakit-penyakit terkait kelainan tulang, misalnya pada osteoblas menyebabkan osteoporosis. Peningkatan apoptosis juga mengakibatkan gangguan pembentukan tulang dan menghambat proses osifikasi tulang yang optimal (Mollazadeh *et al.*, 2015).

2.4 Zebrafish

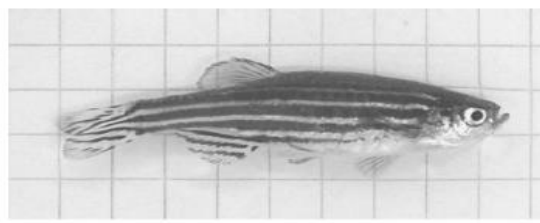
2.4.1 Taksonomi, Ekosistem, dan Daur Hidup

Zebrafish (*Danio rerio*) merupakan organisme famili Cyprinidae yang hidup di air tawar dengan komposisi tulang belakang yang besar. Terdapat kurang lebih 44 spesies dari family ini yang tersebar di Asia Tenggara. *Zebrafish* memiliki karakteristik khusus seperti berukuran kecil (panjang badan < 120 mm), *danionic notch* pada bagian ventromedial bawah rahang, dan warna unik berupa selang seling horizontal gelap dan terang seperti kulit zebra (Spence *et al.*, 2008).

Panjang badan *Zebrafish* jarang sekali melebihi 40 mm. Bentuk tubuhnya ialah fusiform dan terkompresi secara lateral dengan bagian obliq mulut menghadap ke atas. Bagian bawah rahangnya lebih menonjol daripada bagian atas, serta memiliki posisi mata di tengah yang tidak terlihat dari atas. *Zebrafish* dapat dikenali dari bentukan garis lateral tidak

komplrit yang memanjang ke bagian basal pelvis sirip, dua pasang barbel dan lima hingga tujuh garis biru tua longitudinal yang memanjang dari belakang operkulum hingga kaudal sirip. Bagian anal sirip juga bergaris, sedangkan bagian dorsalnya memiliki warna biru tua pada ujung atasnya dengan tepian warna putih. Pola warnanya tersusun atas tiga tipe sel pigmen, melanofor biru tua, xantofor emas, dan iridofor yang berwarna warni. Berdasarkan perkembangannya, dua garis terbentuk pertama kali dari tengah dengan garis – garis selanjutnya dari bagian atas dan bawah.

Sama halnya dengan berbagai teleost (kelompok dominan ikan yang terdiri dari seluruh *ray-finned fish*), melanofor dapat terkonsentrasi atau menyebar sebagai respon stimulus, misalnya saat stimulus persinyalan *Zebrafish* sedang lemah, melanofor akan terdispersi, tapi saat *Zebrafish* sedang agresif, maka warnanya berubah ke arah gelap. *Zebrafish* jantan dan betina memiliki warna yang relatif sama hanya saja *Zebrafish* jantan memiliki sirip anal yang lebih besar dengan warna kuning yang lebih banyak (Spence *et al.*, 2008).



Gambar 2.6 Struktur Fisik *Danio rerio* (Spence *et al.*, 2008).

Zebrafish adalah ikan berukuran relatif kecil dengan penanda khas yaitu pigmen warna yang berselang – seling seperti warna binatang zebra.

Untuk mendukung kelangsungan hidup *Zebrafish*, lingkungan tempat hidupnya harus dikontrol sedemikian rupa. Air tempat hidupnya

harus memiliki kualitas yang mendukung dari segi temperatur, pH, salinitas, *hardness*, kandungan oksigen, dll. Untuk menghasilkan lingkungan yang paling ideal, parameter tersebut di atas harus diatur kurang lebih sebagai berikut (Lawrence dan Mason, 2012):

Tabel 2.1 Parameter Kualitas Habitat *Zebrafish*. Lingkungan hidup ideal *zebrafish* meliputi spesifikasi temperatur, pH, salinitas, dan kandungan oksigen air tempat hidupnya harus sesuai dengan persyaratan yang disajikan pada table berikut dengan metode pengujian parameter-parameter terkait.

Parameter	Syarat	Metoda Uji
Temperatur	Stabil, rentang 24 – 30°C	Termometer, monitoring otomatis
pH	Stabil, rentang 6,8 – 8,5	Kolorimetri, monitoring otomatis
Salinitas	Stabil, antara 0-5 g/L	Refraktometer, monitoring otomatis
<i>Hardness</i>	Stabil, antara 75 – 200 mg/L	Kolorimetri
Kandungan oksigen	Tidak kurang dari 4 mg/L	Kolorimetri, monitoring otomatis

Dalam perkembangannya, *Zebrafish* melalui beberapa fase tumbuh kembang. Pada fase perkembangan awal, demikian deskripsi tumbuh kembang *zebrafish* (Lawrence dan Mason, 2012):

Tabel 2.2 Perkembangan Embrio *Zebrafish*. Fase hidup *zebrafish* sejak awal fertilisasi (0 hpf) terus mengalami mitosis hingga menetas dituliskan pada tabel ini.

Periode	HPF	Deskripsi
Zigot	0	Telur yang baru terfertilisasi.
<i>Cleavage</i>	$\frac{3}{4}$	Siklus sel 2 hingga 7 terjadi cepat dan sinkron.
Blastula	$2\frac{1}{4}$	Berlangsung cepat, siklus sel metasinkron (8,9) menghasilkan pemanjangan asinkron pada transisi midblastula, dilanjutkan dengan epiboli.

Gastrula 5¼

Segmentasi 10

Faringula 24

Embrio
menetas 48

Larva awal 72

Pertumbuhan epiblas, hipoblas, dan aksis embrionik melalui ujung epiboli.

Pertumbuhan somit, lengkung primordia faringeal, dan neuromere; organogenesis primer; terjadi pergerakan awal; mulai muncul ekor.

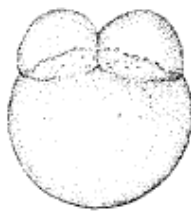
Aksis badan mulai lurus dari berbentuk lengkung, mulai berkembang system sirkulasi, pigmentasi, dan sirip.

Selesaiya morfogenesis system organ primer; perkembangankartilago kepala dan sirip pektoralis; penetasan terjadisecara asinkron.

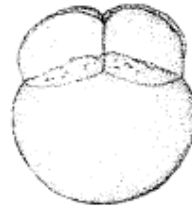
Aktif mencari makan dan bergerak.



1-cell
0.2 h



2-cell
0.75 h



4-cell
1 h



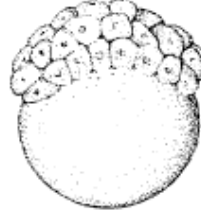
8-cell
1.25 h



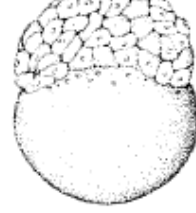
16-cell
1.5 h



32-cell
1.75 h

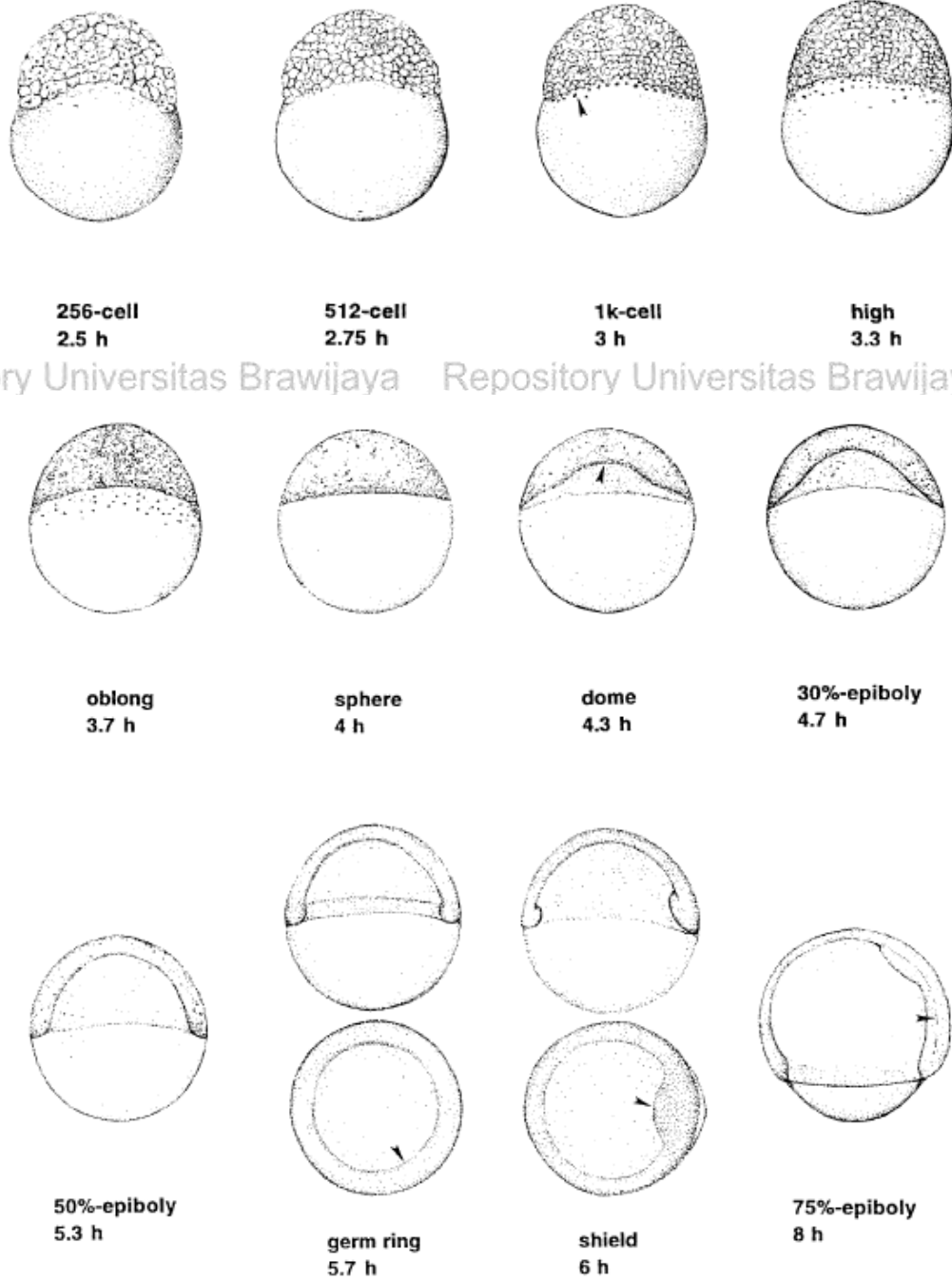


64-cell
2 h



128-cell
2.25 h

Gambar 2.7 Perkembangan Embrio Zebrafish 0,2 – 2,25 hpf (Spence et al., 2008).



Gambar 2.8 Perkembangan Embrio Zebrafish 2,5 – 8 hpt (Spence et al., 2008).

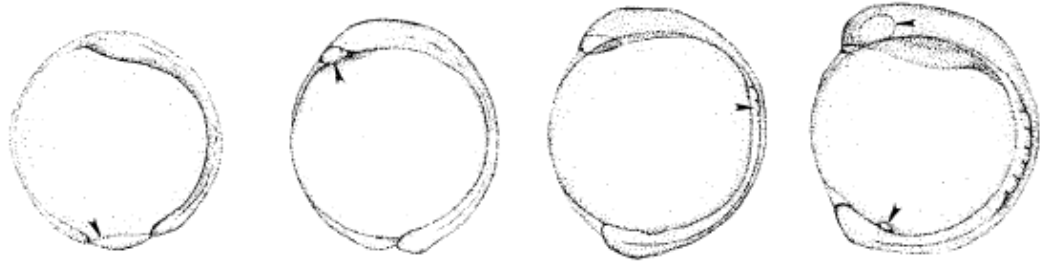


Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository
Repository
Repository
Repository

Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit



90%-epiboly
9 h

bud
10 h

3-somite
11 h

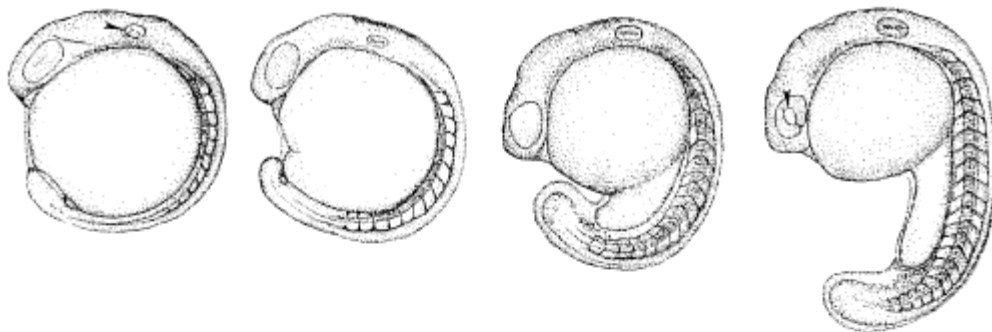
6-somite
12 h

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository

Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit



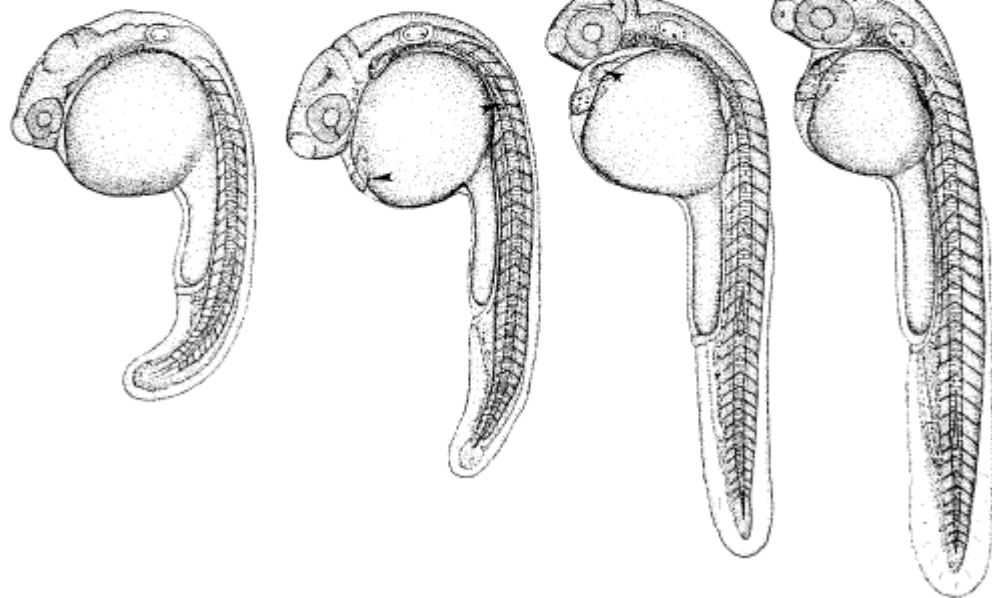
10-somite
14 h

14-somite
16 h

18-somite
18 h

21-somite
19.5 h

Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit



26-somite
22 h

prim-6
25 h

prim-16
31 h

prim-22
35 h

Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit
Reposit

Reposit
Reposit

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository

Gambar 2.9 Tahap Perkembangan *Zebrafish* 8 – 35 hpf (Spence *et al.*, 2008).

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository
Repository
Repository
Repository
Repository



Zebrafish termasuk organisme ovipar yang melakukan fertilisasi eksternal. Kesuburan *Zebrafish* sangat tinggi, seekor *Zebrafish* betina dapat mengeluarkan ratusan telur dalam satu sesi. Keberadaan *Zebrafish* jantan menstimulasi ovulasi ikan betina. Rangsang olfaktori memediasi reproduksi *Zebrafish* agar berlangsung secara sinkron. Ikan betina memerlukan beberapa jam untuk siap bertelur, dan umumnya berovulasi semalaman. Stimulasi ovulasi ikan betina diperantarai oleh feromon dari gonad jantan, dan sebaliknya setelah berovulasi, ikan betina mengeluarkan feromon gonad yang merupakan campuran glukoronid steroid yang diproduksi ovarium untuk merangsang ikan jantan membuahi telur. Proses pembuahan diawali dari ikan jantan dan betina yang saling tertarik. Pada awalnya, ikan jantan menyentuh bagian sisi badan ikan betina atau ekornya dengan menggunakan kepala/ hidung. Kemudian, ikan betina akan berenang di samping ikan jantan atau tetap diam. Akhirnya, ikan jantan dan betina berenang pada arah yang sama berdekatan agar pori genital ikan jantan dan betina dapat terpasang secara tepat dan ikan jantan melakukan osilasi ekor yang cepat, sehingga ikan betina terpicu untuk bertelur dan ikan jantan mengeluarkan sperma untuk membuahinya (Nasiadka dan Clark, 2012).

2.4.2 *Zebrafish* sebagai Model Tumbuh Kembang Tulang

Zebrafish telah banyak digunakan sebagai hewan model dalam biologi tumbuh kembang dalam beberapa dekade terakhir. Sebagai hewan model untuk mempelajari perkembangan tulang, *zebrafish* memiliki keunggulan dan keterbatasan. Di satu sisi, tidak terdapat synovium pada

sendi *zebrafish*, namun tulang *zebrafish* secara khusus memiliki sel-sel penyusun tulang tidak seperti beberapa ikan lainnya. Larva *zebrafish* juga berwarna transparan, sehingga dapat diamati kondrosit, osteoblas, dan osteoklasnya. Secara fisiologis, pertumbuhan tulang *zebrafish* mirip dengan manusia. Proses mineralisasi terjadi mulai dari 3 *days post fertilization* (dpf), dan tulang kraniofasial tumbuh dengan cara yang serupa dengan mamalia (Mackay *et al.*, 2013).

Sama halnya dengan manusia, tulang *zebrafish* juga mengalami osifikasi seperti mamalia baik endokondral (dari *scaffold* kartilago) maupun intramemran (langsung dari precursor stem sel mesenkim). Pada *zebrafish*, neurokranium (perikondral) dan lengkung faringeal (endokondral) berkembang dengan mengganti precursor kartilago.

Osifikasi tulang lengkung *zebrafish* terjadi relatif dini, yaitu saat menjelang 6 dpf. Di sisi lain, pertumbuhan tulang intramembran difasilitasi oleh agregasi dan diferensiasi stem sel mesenkim dari *neural crest* menjadi osteoblas pada matriks tulang termineralisasi. Operkulum terbentuk pada 3 dpf, parasfenoid pada 4 dpf, dan tulang brakiostegal pada 4 dpf. Kolom vertebral terbentuk melalui osifikasi intramembrane dan dimineralisasi progsif ke arah kranio-kaudal. Pada tingkat seluler, osteoblast dan osteoklas *zebrafish* mirip dengan milik mamalia. Faktor transkripsi RUNX2 dan OSX diekspresikan dalam regulasi osteoblast mamalia dan menstimulasi ekspresi protein matriks tulang. Pada osteoblastogenesis *zebrafish* RUNX2 juga diekspresikan sebelum OSX untuk mendorong ekspresi protein matriks tulang. Jadi, fungsi dan diferensiasi osteoblast *zebrafish* adalah serupa sama dengan manusia. Selain itu, *zebrafish*

memiliki osteoklas yang memiliki marker seperti MMP9, NFκB, cathepsinK, TRAcP yang menjelaskan kemiripan aktivitas osteoklas *zebrafish* dan manusia (Marlotti *et al.*, 2015)

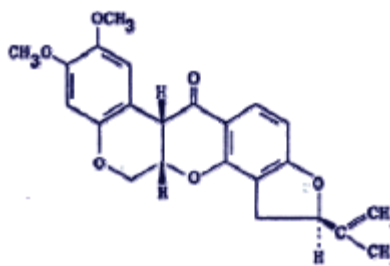
2.5 Rotenone

2.5.1 Karakteristik Kimia dan Fisik

Profil senyawa rotenone adalah sebagai berikut (EPA, 2007; Pubchem, 2018):

Nama : Roteononee.

Struktur Kimia :



Rumus Molekul : $C_{23}H_{22}O_6$.

Stabilitas : Terdekomposisi dengan paparan cahaya dan udara.

Nama IUPAC : 2R,6aS,12aS)-1,2,6,6a,12,12a-hexahydro-2-isopropenyl-8,9 dimethoxychromeno[3,4-b]furo[2,3-h]chromen-6-on9.

Berat Molekul : 394,423 g/mol.

Log P : 4,1

Titik Didih : 410 – 428° F

Titik Leleh : 329 – 331° F

Kelarutan : 0,17 mg/mL pada 25° C

Densitas : 1,27 g/cm³

Kelas Kimia : Rotenoid.

Tipe pestisida : Piscisida.

Penggunaan : Roteonone digunakan secara langsung pada air untuk mengatur populasi ikan pada perairan. Senyawa ini dapat digunakan untuk membunuh seluruh atau sebagian populasi air.

Aksi kerja : Roteonone bertindak dengan cara *uncoupling oxidative phosphorylation* di dalam mitokondria sel dengan menghambat transpor elektron kompleks 1.

Toleransi : Tidak ada toleransi untuk penggunaan piscisidal.

Formulasi : Likuid, serbuk terbasahkan

Roteonone merupakan insektisida yang menghambat Fe-S pada kompleks 1 sehingga memblokade rantai transpor elektron. Hal ini mencegah NADH dikonversi menjadi energi selular (ATP). Pada mamalia dan ikan, roteonone menghambat oksidasi NADH menjadi NAD, sehingga memblokade oksidasi NAD dan substrat seperti glutamate, alfa-ketoglutarat, dan piruvat. Roteonone menyebabkan inhibisi kompleks 1 rantai respirasi mitokondria yang dapat menghasilkan stress oksidatif.

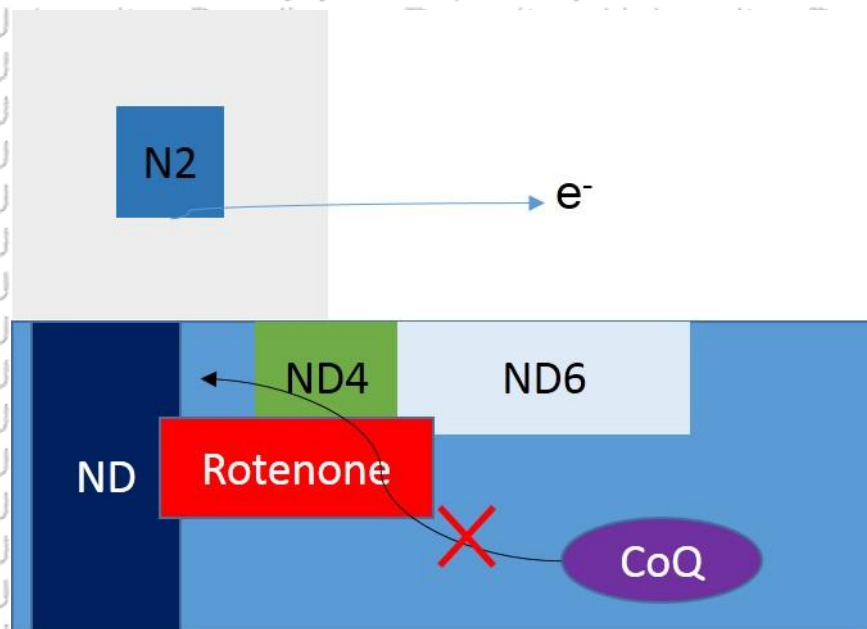
Selain itu, hambatan kompleks 1, stress nitrosatif, peningkatan NO dan malondialdehid, agregasi alfa-sinuklei dan poliubiquitin, aktivasi sel astrosit dan mikroglia, reaksi inflamatorik, eksitotoksisitas glutamat, dan apoptosis neuronal terlibat dalam parkinsonisme yang diinduksi roteonone.

Roteonone sangat toksik pada ikan karena cepat diabsorpsi di gastrointestinal (Gupta, 2014).



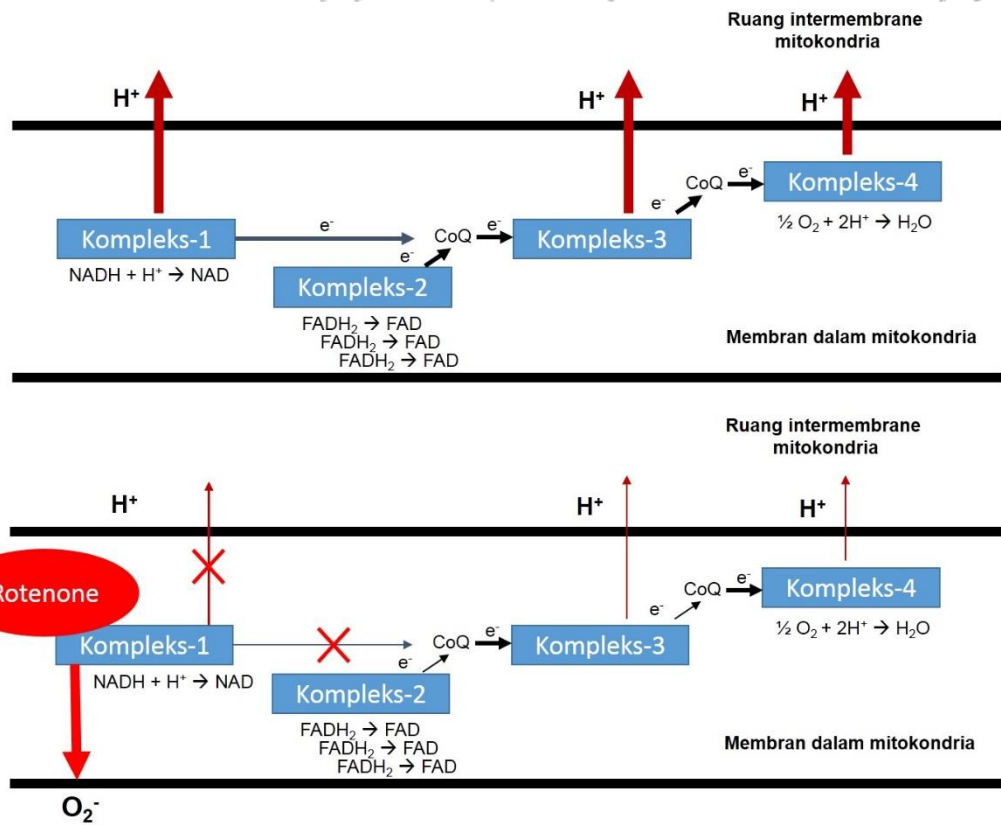
2.5.2 Rotenone sebagai Penyebab LGR

Rotenone merupakan senyawa lipofilik yang bekerja sebagai inhibitor kompleks 1 rantai respirasi mitokondria. Rotenone menghambat ikatan CoQ dengan kompleks besi-sulfur (N2) pada kompleks 1 mitokondria, sehingga reduksi pada proses transpor elektron terganggu dan mengakibatkan terbentuknya radikal oksidatif (Gambar 2.10).



Gambar 2.10 Rotenone Menghambat Interaksi Ubiquinon – N2. Rotenone menghambat ikatan CoQ dengan N2 sehingga mengganggu proses transfer electron pada respirasi di mitokondria.

Akibat dari disfungsi kompleks 1, sekuens transpor elektron pada proses respirasi mitokondria terganggu. Hal ini akan menyebabkan akumulasi radikal oksidatif (Rojas dan Lima, 2010).



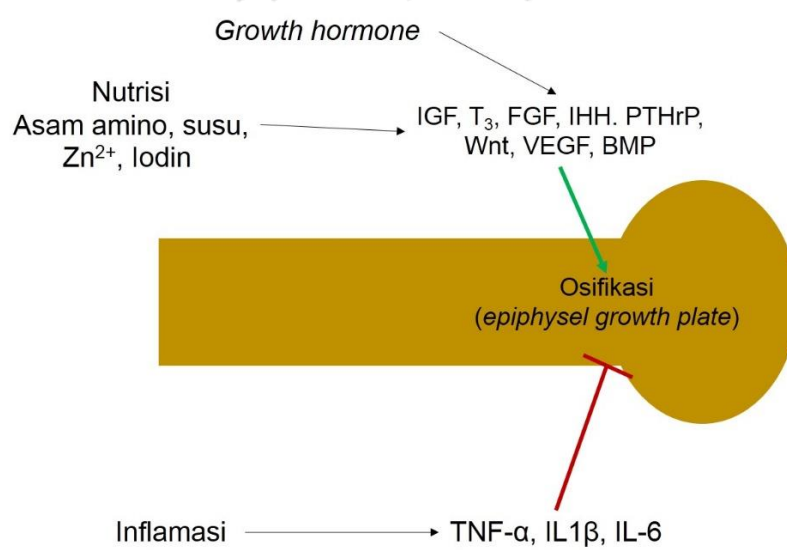
Gambar 2.11 Roteonone Menghambat Kompleks-1 Respirasi. Roteonone menghambat kompleks 1 mitokondria yang menyebabkan kegagalan transpor elektron, sehingga terjadi peningkatan ROS.

Produksi ROS yang meningkat karena hambatan kompleks 1 oleh rotenone dapat menyebabkan aktivasi apoptosis jalur intrinsik. ROS menstimulasi p53 yang menghambat protein pro-apoptosis Bcl-2. ROS juga menyebabkan oksidasi cardiolipin yang melepaskan sitokrom c ke sitosol. Lebih lanjut, ROS menyebabkan depolarisasi membran mitokondria dan/ atau membuka kanal Bax/Bak pada OMM yang menyebabkan pelepasan Apoptosis inducing factor (AIF), Endo G, sitokrom C, dan Smac/Diablo di sitosol. Sitokrom C kemudian membentuk kompleks apoptosom di sitosol bersama dengan Apaf-1 dan pro-caspase 9, menyebabkan aktivasi Caspase 9 yang akan berakhir pada pemecahan protein seluler dan kematian sel oleh apoptosis. ROS juga dapat

menyebabkan kerusakan DNA nukleus dan DNA mitokondria secara langsung

(Gambar 2.11) (Dutordoir dan Bates, 2016).

Penumpukan ROS yang mendegradasi protein dan substansi lainnya menyebabkan inflamasi. Kondisi ini merugikan dalam konteks tumbuh kembang, terutama pada proses pertumbuhan tulang. Tulang yang berkembang normal diawali oleh proliferasi kondrosit yang kemudian diosifikasi. Namun, pada kondisi inflamasi, mediator seperti kortisol, FGF21, TNF- α , IL-1 β , IL-6 menghambat osifikasi endokondral. Di samping itu, sinyal pro-inflamatorik menginduksi aktivasi osteoklas yang menyebabkan ketidakseimbangan osteoblast-osteoklas dengan aktivitas resorpsi lebih daripada normal. Hal ini menyebabkan tulang tidak dapat bertumbuh sempurna (Gambar 2.12) (Milward, 2017). Penelitian Dianita (2017) membuktikan bahwa paparan roteonone 12,5 ppb pada 2 – 72 hpf dapat menyebabkan LGR melalui jalur hambatan osifikasi dan aktivasi osteoklastogenesis (Dianita, 2017).



Gambar 2.12 Peran Inflamasi dalam Pertumbuhan Tulang. Inflamasi pada epifisial *growth plate* menyebabkan efek inhibitorik osifikasi tulang sehingga tulang tidak dapat bertumbuh secara optimal.

2.6 Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

Demikian adalah klasifikasi taksonomi *Moringa oleifera* (Tejas *et al.*, 2012):

- Kingdom : Plantae
- Sub-kingdom : Tracheobionta
- Super Divisi : Spermatophyta
- Divisi : Magnoliophyta
- Kelas : Magnoliopsida
- Sub-kelas : Dilleniidae
- Ordo : Capparales
- Famili : Moringaceae
- Genus : *Moringa*
- Spesies : *oleifera*



Gambar 2.13 Pohon *Moringa oleifera*. Morfologi tanaman *Moringa oleifera* merupakan pohon berbatang, berukuran relatif pendek dan berdaun hijau.

Moringa oleifera masuk dalam famili Moringaceae yang hanya memiliki 1 genus dengan 13 spesies. *Moringa oleifera* berasal dari daerah sub-Himalaya, bagian barat laut India dan telah tersebar ke banyak wilayah seperti Afrika, Arab, Asia Tenggara, Amerika Selatan, Kepulauan Karibia, dll. Selain digunakan sebagai bahan makanan, *Moringa oleifera* juga memiliki khasiat obat. Secara turun

temurun, *Moringa oleifera* dikenal sebagai “pohon ajaib” yang secara empiris digunakan sebagai etnomedisin untuk mengobati berbagai penyakit, mulai dari yang ringan hingga penyakit – penyakit kronis. Banyak studi yang dilakukan untuk mengeksplorasi dan mengisolasi senyawa berkhasiat dalam tanaman ini, sehingga menjadikannya sebagai calon fitofarmaka alternatif pengobatan yang relatif terjangkau (Razis *et al.*, 2014).

Beberapa khasiat *Moringa oleifera* yang telah terbukti antara lain sebagai anti-fibrosis/ulser, anti-inflamasi, antimikroba, antihiperlipidemi, antioksidan, dan anti-tumor (Razis *et al.*, 2014). Pada penelitian yang dikerjakan oleh Arulselvan dkk. 2016, dibuktikan bahwa fraksi etil asetat daun *Moringa oleifera* memiliki aktivitas antiinflamasi yang diperlihatkan dari hambatan siklooksigenase-2, iNOS, dan NFkB disertai dengan peningkatan ekspresi IkBa dan blokade translokasi nuklear NFkB (Arulselvan *et al.*, 2016). Demikian pula ditunjukkan efek antioksidan poten mengacu pada artikel penelitian Falowo dkk. 2017, dimana ekstrak daun *Moringa oleifera* sangat poten dalam menghambat radikal bebas.

Daun *Moringa oleifera* memiliki berbagai substansi berkhasiat antara lain:

- 1) vitamin, daun *Moringa oleifera* (kelor) kaya akan vitamin A yang baik untuk perbaikan fungsi visual dan vitamin E yang memiliki efek antioksidan, 2) polifenol seperti flavonoid dan asam fenolat. Kedua senyawa ini memiliki efek antimikroba yang poten. Selain itu, efek antioksidan, anti-inflamasi juga dihasilkan oleh kandungan asam fenolatnya, 3) alkaloid, glukosinolat dan isotiosianat yang penting untuk upaya menjaga kesehatan tubuh, 4) tanin yang memiliki aktivitas anti-kanker, antiaterosklerosis, anti-inflamasi, dan anti-hepatotoksik, 5) saponin yang berkhasiat sebagai anti-kanker (Jimenez *et al.*, 2017).

Nweze dan Nwafor pada 2014 membuktikan kandungan yang terdapat pada ekstrak etanol secara maserasi adalah seperti tertera pada Tabel 2.3 (Nweze dan Nwafor, 2014)

Tabel 2.3 Kandungan Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Kelor. Ekstrak etanol daun kelor memiliki kandungan yang beragam, salah satu yang paling besar proporsinya adalah flavonoid.

Phytochemical	Ethanolic extract
Flavonoid	3.83±0.02*
Anthraquinone	10.86±0.06
Alkaloids	2.26±0.04
Saponins	1.72±0.05*
Steroids	3.12±0.02
Terpenoids	4.26±0.06
Cardiac glycoside	0.19±0.02
Anthocyanin	0.05±0.00
Tannins	9.19±0.02
Carotenoids	0.08±0.02

Kandungan flavonoid yang melimpah pada ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* memiliki efek anti inflamasi, karena senyawa ini dapat menghambat enzim eikonanoid fosfolipase A₂, siklooksigenase dan lipoksigenase, sehingga menurunkan kadar prostanoid dan leukotrien. Di samping itu, flavonoid juga dapat menghambat pelepasan histamin, fosfodiesterase, protein kinase, dan aktivasi transkriptase yang berperan penting dalam inflamasi (Tabel 2.4) (Rathee *et al.*, 2009).

Tabel 2.4 Mekanisme Anti-Inflamsasi Flavonoid. Senyawa-senyawa golongan flavonoid secara keseluruhan memiliki efek anti-inflamasi dan anti-apoptosis dengan mekanisme yang beragam seperti dituliskan pada tabel ini.

No	Flavonoid	Mekanisme Aksi
1	Procyanidin	Menghambat transkripsi dan sekresi IL-1 β
2	EGCG	Menghambat ekspresi iNOS Mengurangi aktivitas NF-kB dan AP-1
3	ECG	Melemahkan adesi dan migrasi sel T CD8 ⁺ perifer



4 Resveratrol Menghambat stimulasi caspase-3 dan pemecahan PARP yang diinduksi oleh IL-1 β . Menekan ekspresi mRNA iNOS dan protein dengan menginhibisi aktivasi NF-kB yang menghambat pembentukan NO. Meningkatkan MAP kinase fosfatase – 5

5 Luteolin Inhibisi adhesi THP – 1 dan ekspresi VCAM – 1. Inhibisi aktiitas NF-kB

6 Quercetin Menghambat produksi NO dan ekspresi protein iNOS. Menghambat aktivitas siklooksigenase dan lipoksigenase

7 Antosianin dan asam hidroksinamik Mereduksi IL – 8, MCP – 1, dan ICAM – 1

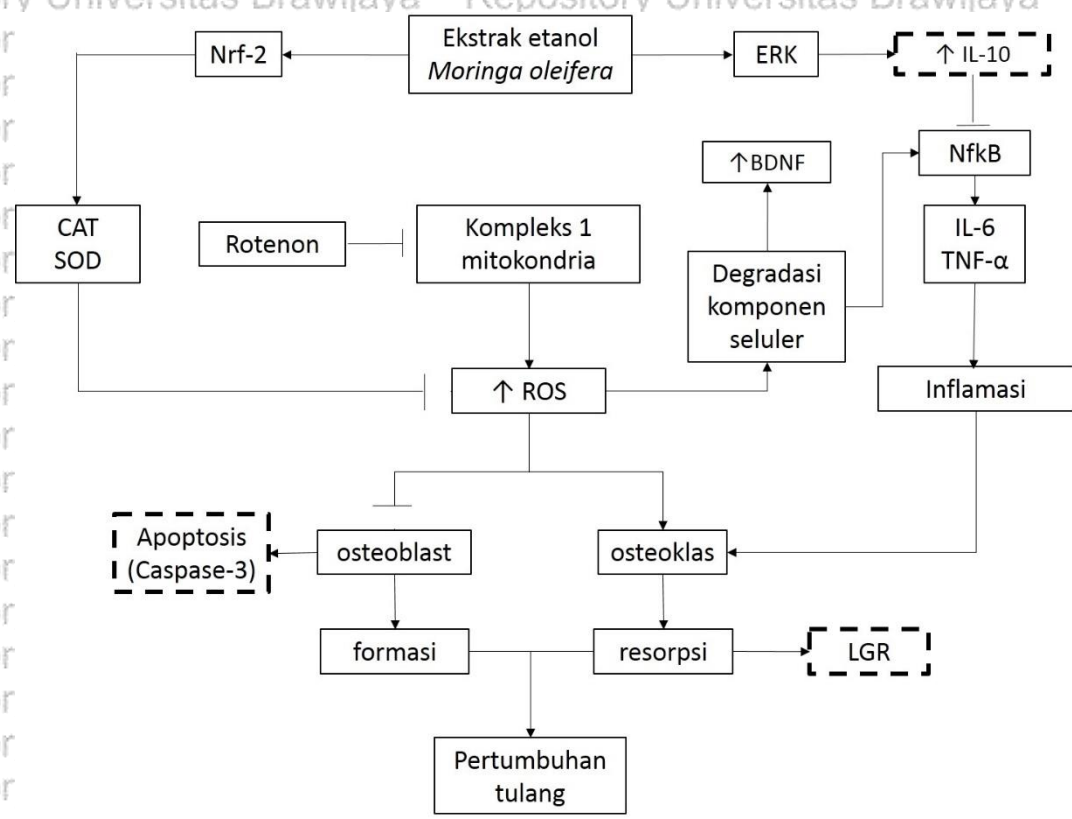
8 Kurkumin Menurunkan aktivitas MPO dan TNF – α

Ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* juga mengandung mineral seperti Cu, Mn yang meningkatkan aktivitas enzim antioksidan SOD, sehingga poten dalam menangani stress oksidatif (Karthivashan *et al.*, 2016).

BAB 3

HIPOTESIS DAN KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan:

- : Variabel diteliti
- : Variabel tidak diteliti
- : Menginduksi
- | : Menghambat

Pertumbuhan tulang merupakan hasil dari keseimbangan aktivitas osteoklas (resorpsi) dan osteoblast (formasi). Kinerja osteoklas berlebih dan/ atau osteoblast yang kurang akan menghasilkan pertumbuhan tulang tidak sempurna dan berakhir pada LGR. Penelitian ini menggunakan *zebrafish* yang dipapar dengan rotenone, penghambat kerja kompleks 1 mitokondria. Hambatan ini menyebabkan peningkatan produksi ROS (stress oksidatif). Kadar ROS yang tinggi menyebabkan LGR dengan mekanisme: 1) degradasi komponen seluler, penyebab inflamasi yang akan mengaktifkan osteoklas; 2) aktivasi osteoklas secara langsung; 3) induksi apoptosis osteoblast. Ketiga mekanisme ini menyebabkan ketidakseimbangan performa osteoblast – osteoklas yang menyebabkan LGR.

Penelitian ini mengeksplorasi efek ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* melalui mekanisme anti-oksidan dan anti-inflamasi. Ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* memiliki kerja sebagai aktivator Nrf-2 yaitu faktor transkripsi ekspresi enzim – enzim antioksidan seperti catalase (CAT) dan *superoxide dismutase* (SOD) yang mampu mengkatalisis pemecahan ROS menjadi senyawa yang tidak radikal. Di samping itu, ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* mampu mengaktifkan faktor transkripsi ERK, regulator IL-10. Peningkatan ekspresi IL-10 yang dimediasi ERK memiliki efek anti-inflamasi dengan jalur hambatan kerja NfκB, protein aktivator ekspresi sitokin pro-inflamasi. Kedua mekanisme ini (anti-inflamasi dan anti-oksidan) menyebabkan ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dapat mencegah terjadinya LGR pada *zebrafish* diinduksi rotenone.

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah:

3.3.1 Pemberian ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* meningkatkan kadar IL-10 zebrafish diinduksi rotenone.

3.3.2 Pemberian ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* menurunkan kadar Caspase-3 zebrafish diinduksi rotenone.

3.3.3 Ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* mengkoreksi panjang badan zebrafish diinduksi rotenone.





BAB 4

Metode Penelitian

4.1 Rancangan dan Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara *true experimental post test only controlled group design single blind*. Zebrafish digunakan sebagai model embrio hewan coba yang dikelompokkan secara random. Demikian perlakuan yang diberikan pada setiap kelompok:

- a. Kontrol negatif (K) : Medium embrionik
- b. Kontrol positif (R) : Medium embrionik + rotenone 12,5 ppb
- c. Perlakuan I (RMO1) : Medium embrionik + rotenone 12,5 ppb
+ ekstrak daun *Moringa oleifera* 0,56 ppm
- d. Perlakuan II (RMO2) : Medium embrionik + rotenone 12,5 ppb
+ ekstrak daun *Moringa oleifera* 1,12 ppm
- e. Perlakuan III (RMO3) : Medium embrionik + rotenone 12,5 ppb
+ ekstrak daun *Moringa oleifera* 2,24 ppm

Perlakuan tersebut di atas hanya dilakukan pada 0 – 3 day post fertilization (dpf). Selanjutnya, seluruh kelompok hanya dipapar dengan medium embrionik sampai 9 dpf.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah embrio *zebrafish* dengan usia 0 – 2 *hour post fertilization* (hpf) *wildtype*.

4.2.2 Sampel Penelitian

Jumlah sampel penelitian ini adalah 20 embrio *zebrafish* tiap kelompok dan dilakukan triplo sehingga setiap kelompok berjumlah total 60 individu. Untuk 5 kelompok, total sampel adalah 300 embrio. Besaran ini merujuk pada studi yang dilakukan Lucit dkk. 2008 dan Hallare dkk. 2016.

4.2.3 Kriteria Sampel

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi sampel penelitian ini adalah embrio *zebrafish* berusia 0-2 hpf. *yolk sac* berwarna putih bening, tidak ada serabut putih (jamur).

4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi penelitian ini adalah embrio *non-viable* yang ditandai dengan nukleus putih, tidak terbuahi, berjamur (serabut putih).

4.2.3.3 Kriteria Dropout

Embrio yang mati sebelum penelitian berakhir (9 dpf) atau menetas (72 hpf).



4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Oktober – Desember 2018.

4.4 Variabel dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun *Moringa oleifera*.

b. Variabel Tergantung

IL-10, caspase-3, dan panjang badan larva *zebrafish* adalah variabel tergantung penelitian ini.

4.4.2 Definisi Operasional

- Embrio *zebrafish* dalam penelitian ini sehat yang ditandai dari morfologi bulat, transparan, tidak berjamur, dan tidak ada bentukan nukleus putih. Embrio dipindahkan ke media pertumbuhan pada usia 0-2 hpf, menetas pada 72 hpf.
- Embrio *zebrafish* berasal dari induk *wild type* (sertifikat taksonomi no: 02/1.AB11P/HA/FPIK/2012).

- Rotenone (*Sigma*, R8875) memiliki kemurnian $\geq 95\%$ yang berbentuk serbuk mudah larut dalam 1% DMSO. Penelitian ini menggunakan rotenone konsentrasi 12,5 ppb.
- Ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* diproses dari simplisia daun kelor tersertifikasi (No: 074/19A/102.7/2018) yang diperoleh dari Materia Medika Batu.
- Panjang badan larva *zebrafish* diukur dari ujung mulut hingga ujung ekor. Panjang kepala *zebrafish* diukur dari ujung mulut hingga operkulum. Pengukuran panjang badan dan kepala dilakukan dengan mikroskop (Olympus SZ61) yang terintegrasi dengan software komputer Optilab. Pengukuran dilakukan dengan perbesaran 2,5x pada 3, 6, dan 9 dpf.
- IL-10 diukur dengan metode ELISA *sandwich* dari homogenat *zebrafish* usia 6 dpf menggunakan ELISA kit Bioassay Technology Laboratory (nomor katalog E0096FI).
- Caspase-3 diukur dengan metode ELISA *sandwich* menggunakan kit ELISA Bioassay Technology Laboratory (nomor katalog E0115FI) dari sampel homogenat larva *zebrafish* usia 6 dpf.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Pemeliharaan Induk *Zebrafish*

Alat yang digunakan antara lain: akuarium, *filter tank*, *foodtimer*, *temperature maintenance device*, dan lampu. Bahan yang digunakan adalah tetramin, garam mineral, air, dan cacing merah.

4.5.2 Penyiapan Fertilisasi

Alat yang diperlukan adalah *trap* telur, tumbuhan artifisial, dan batu-batu kecil.

4.5.3 Pengambilan Embrio *Zebrafish*

Alat yang digunakan adalah cawan petri, pipet, spuit. Bahan yang diperlukan adalah akuades.

4.5.4 Pembuatan *Zebrafish* Model LGR

Alat yang diperlukan adalah pipet tetes, spuit 5cc, gelas beker, dan cawan petri. Bahan yang digunakan adalah 6 *well plate*, rotenone, dan medium embrionik.

4.5.5 Pemeliharaan dan Perlakuan Larva *Zebrafish*

Alat untuk pemeliharaan dan perlakuan larva *zebrafish* adalah 6 *well plate*, pipet tetes, spuit 5cc, gelas beker, incubator 28 ± 1 °C, dan cawan petri. Bahan yang digunakan adalah medium embrionik yang terdiri atas larutan stok CaCl_2 0,25 gram, KCl 0,15 gram, NaCl 5 gram, dan MgSO_4 0,815 gram dalam 500 mL akuades. Larutan stok ini diencerkan 1:9 dengan akuades untuk digunakan sebagai medium hidup *zebrafish*.

4.5.6 Pengukuran Panjang Badan *Zebrafish*

Alat yang digunakan adalah mikroskop, pipet, cawan petri, gelas beker, gelas objek, *cover glass*, komputer, dan spuit 5cc. Bahan yang digunakan adalah medium embrionik.

4.5.7 Preparasi ELISA

Alat yang digunakan adalah cawan petri, *plunger*, *microtube 2cc*, mikropipet 1cc, dan *blue tip*. Bahan yang digunakan adalah akuades dingin, RIPA *buffer*.

4.5.8 Pengukuran Kadar IL-10 dengan ELISA

Alat yang digunakan adalah ELISA *reader*. Bahan yang digunakan adalah antibodi primer dan sekunder poliklonal anti-IL10, biotin, avidin, HCl, PBS, *96 well plate*, mikropipet, tip biru, tip kuning, dan tip putih yang diperoleh dari kit ELISA Bioassay Technology Laboratory (nomor katalog E0096FI).

4.5.9 Pengukuran Kadar Caspase-3 dengan ELISA

Alat yang digunakan adalah *96 well plate*, mikropipet, tip biru, tip kuning, dan tip putih. Bahan yang digunakan adalah antibodi primer dan sekunder poliklonal anti-Caspase3, biotin, avidin, HCl, dan PBS yang diperoleh dari kit ELISA Bioassay Technology Laboratory (nomor katalog E0115FI).

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Pemeliharaan Induk *Zebrafish*

Zebrafish dewasa dengan rasio jantan dan betina 2:1 dipelihara dalam akuarium. Pembersihan akuarium dilakukan setiap minggu. *Tank filter* diganti setiap 3 hari. Air dikondisikan salinitasnya dengan pemberian garam ikan. Siklus pemberian makan setiap 8 jam.



4.6.2 Penyiapan Fertilisasi

Trap telur ikan dipasang dibagian dasar akuarium sebelum ikan mengalami fertilisasi. Pada bagian atas *trap* dipasang tanaman artifisial dan batu-batu hiasan untuk memberikan lingkungan yang kondusif bagi ikan untuk bereproduksi. Siklus gelap adalah 10 jam (21.30-07.30) dan siklus terang pada (07.30-21.30). *Trap* diambil 30 menit setelah siklus terang (08.00) dan telur dipindahkan ke media dalam waktu kurang dari 2 hpf.

4.6.3 Panen Telur *Zebrafish*

Telur diambil dari *trap* menggunakan pipet. Dalam 6 *well plate*, tiap sumuran diisi 30 telur fertil. Telur yang infertil (ada bintik putih di bagian tengah telur dan/ atau morfologi tidak bulat) dipisahkan dari telur fertil.

4.6.4 Pembuatan Model *LGR*

Model *LGR zebrafish* dibuat dengan memapar embrio *zebrafish* usia 0-72 hpf dengan rotenone 12,5 ppb (Zakiah, 2017).

4.6.5 Pemeliharaan dan Perlakuan Larva *Zebrafish*

Media yang ada dalam tiap *well* diganti setiap 24 jam sampai 72 hpf dengan rincian komposisi media seperti tertera pada sub-bab 4.1. Komposisi medium embrionnik yang digunakan adalah CaCl 0,25 gr; KCl 0,15 gr; NaCl 5 gr; dan MgSO₄ 0,815 gr dilarutkan dalam 500 mL akuades (Khotimah *et al.*, 2018). Medium embrionik yang diperoleh bersifat sebagai larutan stok, untuk aplikasi pada *zebrafish* larutan stok

diencerkan 1:9 dengan akuades (Avesh *et al.*, 2012). Sejak 72 hpf hingga 9 dpf, seluruh *well* hanya diisi dengan medium embrionik.

4.6.6 Pengukuran Panjang Badan *Zebrafish*

Panjang badan dan kepala larva *zebrafish* pada usia 3, 6, dan 9 dpf diukur dengan mikroskop perbesaran 2,5x yang terhubung pada software komputer Optilab ver. 2.0. Panjang badan diukur dari bagian operkulum hingga ujung ekor menggunakan software Image Raster ver. 3.0 (Khotimah *et al.*, 2018).

4.6.7 Preparasi ELISA

Larva *zebrafish* diterminasi dengan akuades dingin selama kurang lebih 15 menit. Larva dihomogenasi dalam cawan petri menggunakan plunger. 30 larva usia 6 dpf pada kelompok perlakuan yang sama digerus dalam 1cc RIPA *buffer* untuk melisiskan dinding sel. Homogenat dimasukkan ke dalam tube mikro 2cc, kemudian disentrifugasi 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan diambil sebagai analit ELISA.

4.6.8 Pengukuran Kadar IL-10 dengan ELISA

Pengukuran IL-10 dilakukan dengan ELISA *sandwich*. Awalnya, dilakukan pengukuran OD standar IL-10 konsentrasi bertingkat (40 ng/L, 80 ng/L, 160 ng/L, 320 ng/L, dan 640 ng/L). Setelah diperoleh data OD, dibuat kurva baku. ELISA IL-10 dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

1. 40 μ L sampel dituangkan pada *well*.

- 2 Ditambahkan 10 μL antibodi anti-IL-10.
- 3 Ditambahkan 50 μL streptavidin-HRP.
- 4 Dimogenasi dan *well* ditutup dengan *cover plate*.
- 5 Inkubasi 60 menit pada 37°C.
- 6 Dilakukan pencucian *well* dengan *wash buffer* 5 kali.
- 7 Ditambahkan 50 μL larutan substrat A, kemudian 50 μL larutan substrat B pada kondisi gelap.
- 8 *Plate* ditutup dengan dengan *cover plate* dan diinkubasi 10 menit pada 37°C pada tempat gelap.
- 9 Ditambahkan 50 μL *stop solution*.
- 10 Diukur OD dengan ELISA reader pada 450 nm 30 menit setelah penambahan *stop solution*.

Setelah OD sampel diperoleh, dilakukan konversi data OD menjadi konsentrasi dengan kurva baku standar yang telah didapat.

4.6.9 Pengukuran Kadar Caspase-3 dengan ELISA

Pengukuran caspase-3 menggunakan prosedur yang sama dengan pengukuran IL-10, hanya saja menggunakan antibodi anti-caspase-3. Pembuatan kurva baku standar juga menggunakan antigen caspase-3.

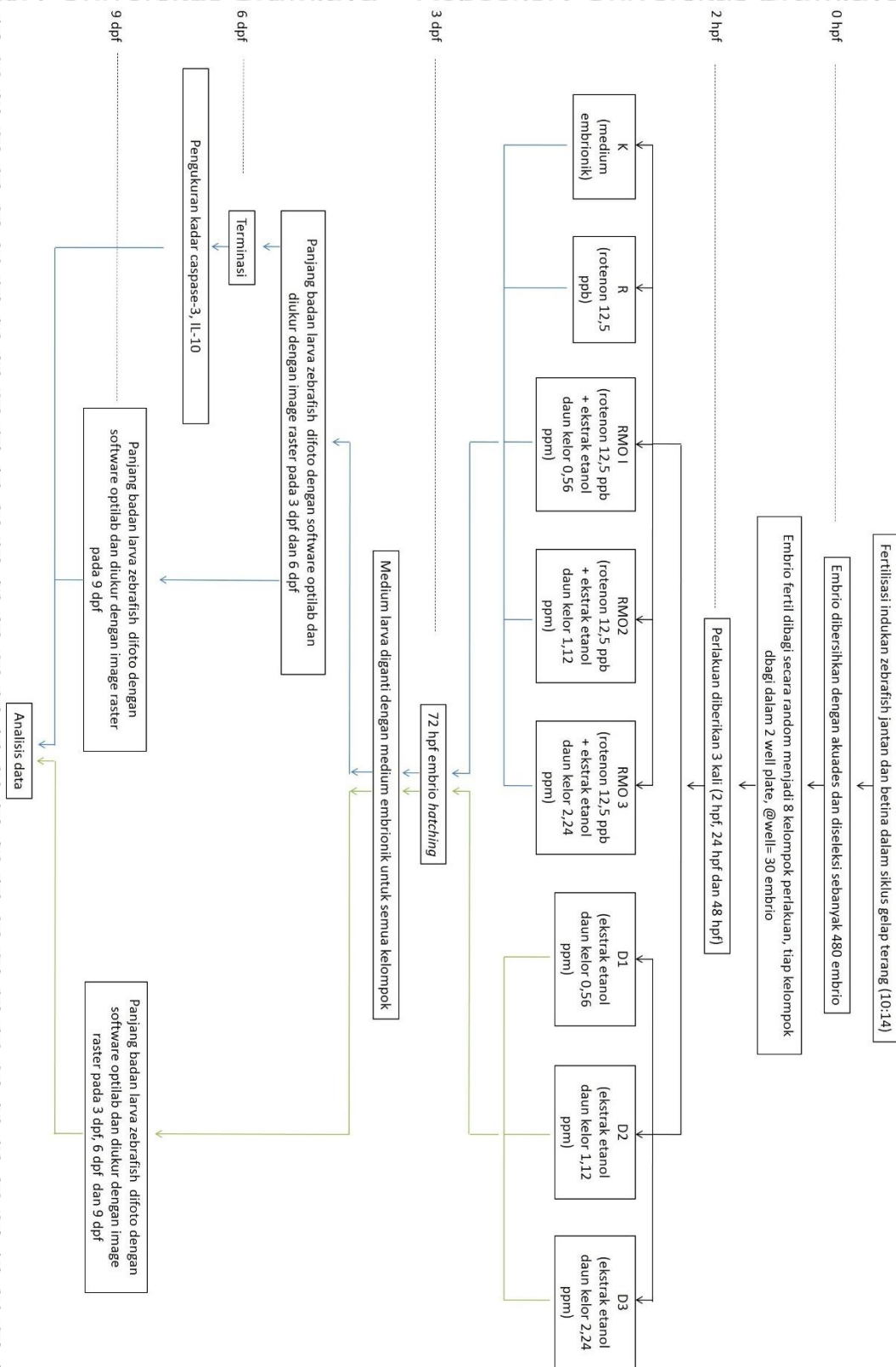
4.7 Analisis Statistik

Data yang diperoleh dari pengukuran panjang badan, IL-10, dan caspase-3 dianalisis dengan uji beda parametrik *one way ANOVA*. Sebelum analisis beda dilakukan, data dipastikan normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$). Apabila ternyata data tidak normal dan/ atau homogen, dilakukan transformasi terlebih dahulu agar data memenuhi syarat analisis parametrik.

Jika data tetap tidak memenuhi syarat, uji beda dilakukan secara non-



4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian

BAB 5

Hasil Penelitian dan Analisis Data

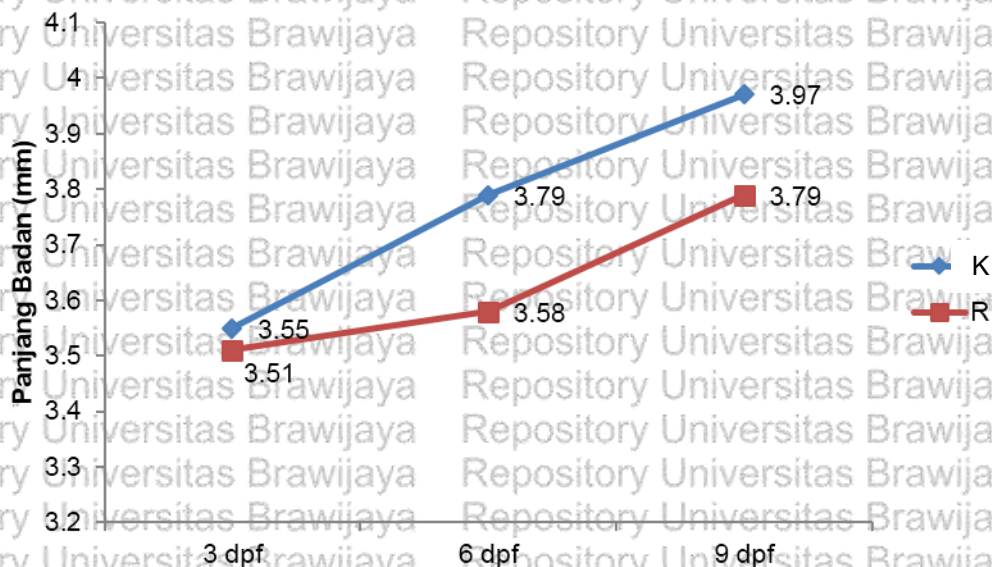
5.1 Paparan Rotenone 12,5 ppb pada Larva Zebrafish

Eksperimen ini dilakukan untuk membuktikan efek hambatan panjang badan oleh rotenone terhadap larva zebrafish (Tabel 5.1 dan Gambar 5.1).

Tabel 5.1 Rerata Panjang Badan (\bar{x}) \pm SD Zebrafish K dan R pada 3, 6, dan 9 dpf.

Kelompok	3 DPF (mm)	6 DPF (mm)	9 DPF (mm)
K	3,55 \pm 0,04	3,79 \pm 0,06	3,97 \pm 0,06
R	3,51 \pm 0,02	3,58 \pm 0,02	3,79 \pm 0,03
P	0,214	0,004	0,04

* = nilai signifikansi, jika $p < 0,05$ terdapat perbedaan bermakna. K (control), R (Rotenone).



Gambar 5.1 Rerata Panjang Badan (\bar{x}) \pm SD Zebrafish pada 3, 6, dan 9 DPF. Secara umum rotenone menghambat pertumbuhan linier larva zebrafish.

Embrio zebrafish pada 3 dpf (saat menetas) tidak memiliki perbedaan panjang badan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok rotenone ($p = 0,214$). Perbedaan panjang badan mulai terlihat pada 6 dpf dengan paparan

rotenone menyebabkan penurunan signifikan rerata panjang badan populasi larva *zebrafish* ($p = 0,004$) dibandingkan kelompok kontrol. Demikian pula pada 9 dpf, didapatkan selisih panjang badan kedua kelompok semakin melebar ($p = 0,04$) dengan rerata panjang badan kelompok R lebih pendek daripada kelompok K. Hal ini membuktikan bahwa paparan rotenone 12,5 ppb menyebabkan hambatan pertumbuhan panjang badan.

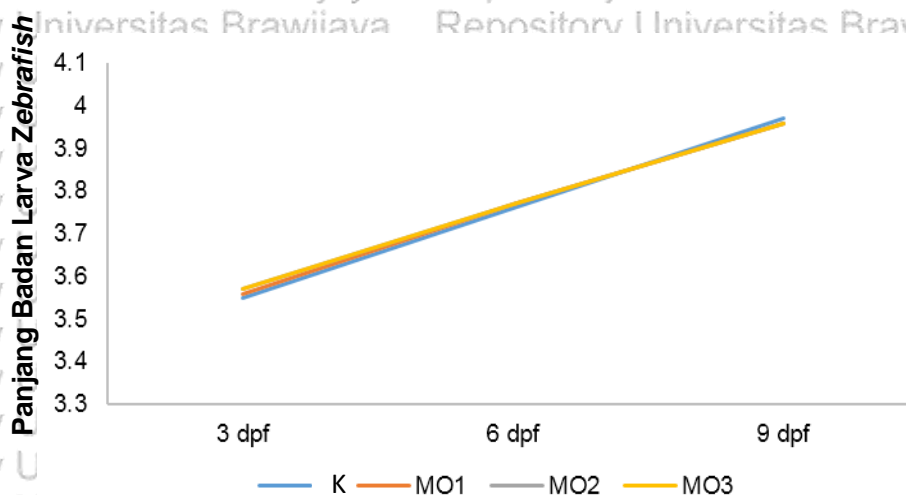
5.2 Paparan Ekstrak Etanol Daun Kelor pada Larva *Zebrafish*

Paparan ekstrak etanol daun kelor tidak menghambat pertumbuhan badan larva *zebrafish* (Tabel 5.2 dan Gambar 5.2).

Tabel 5.2 Rerata Panjang Badan (\bar{x}) \pm SD larva *Zebrafish* pada 3, 6, 9 DPF.

Kelompok	3 DPF (mm)	6 DPF (mm)	9 DPF (mm)
K	3.55 \pm 0.04	3.79 \pm 0.06	3.97 \pm 0.06
MO1	3.56 \pm 0.17	3.77 \pm 0.17	3.96 \pm 0.11
MO2	3.57 \pm 0.17	3.77 \pm 0.19	3.96 \pm 0.23
MO3	3.57 \pm 0.10	3.77 \pm 0.19	3.96 \pm 0.26
P	0,968	0,999	0,941

p = nilai signifikansi, jika $p < 0,05$ terdapat perbedaan bermakna. K (kontrol), MO1 (Rotenone + ekstrak etanol daun kelor 0,56 ppm), MO2 (Rotenone + ekstrak etanol daun kelor 1,12 ppm), dan MO3 (Rotenone + ekstrak etanol daun kelor 2,24 ppm).



Gambar 5.2 Grafik Rerata Panjang Badan (\bar{x}) \pm SD *Zebrafish* dengan Paparan Ekstrak Etanol Daun *Moringa oleifera*.

Untuk membuktikan bahwa paparan ekstrak daun kelor tidak memiliki efek hambatan panjang badan. Pada 3, 6, dan 9 dpf, ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* yang diberikan dengan konsentrasi 0,56; 1,12; dan 2,24 ppm terbukti tidak mempengaruhi rerata panjang badan larva *zebrafish*.

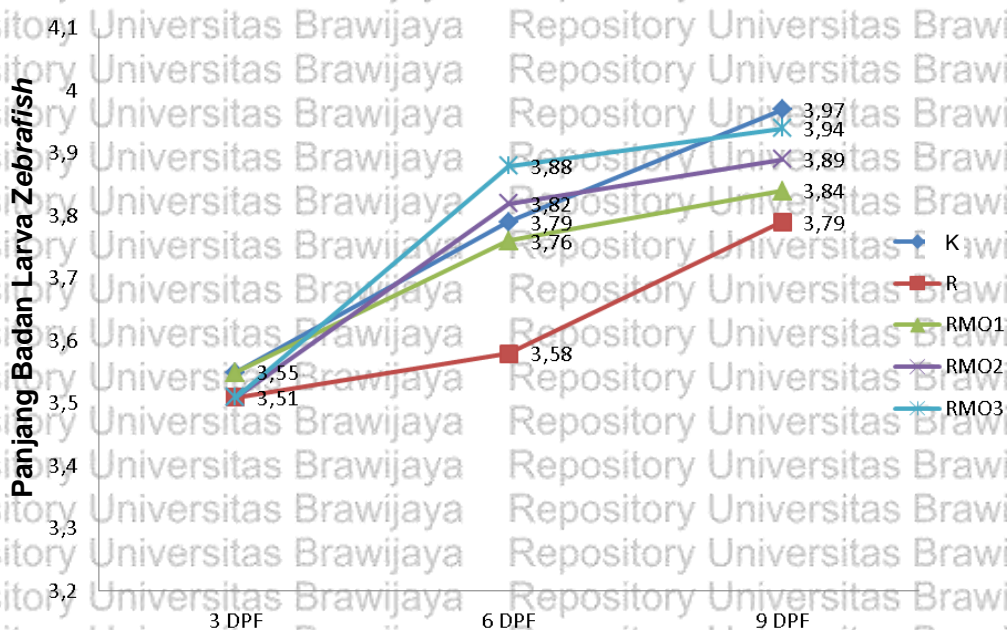
5.3 Efek Ekstrak Etanol Daun Kelor Terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish Diinduksi Rotenone 12,5 ppb

Efek ekstrak etanol daun kelor terhadap *zebrafish* diinduksi rotenone ditampilkan di Tabel 5.3 dan Gambar 5.3.

Tabel 5.3 Rerata Panjang Badan (\bar{x}) \pm SD *Zebrafish* dengan Paparan Rotenone dan Ekstrak Etanol Daun Kelor pada 3, 6, dan 9 dpf.

Kelompok	3 DPF (mm)	6 DPF (mm)	9 DPF (mm)
K	3,55 \pm 0,04	3,79 \pm 0,06	3,97 \pm 0,06
R	3,51 \pm 0,02	3,58 \pm 0,02	3,79 \pm 0,03
RMO1	3,55 \pm 0,05	3,76 \pm 0,03	3,84 \pm 0,04
RMO2	3,51 \pm 0,03	3,82 \pm 0,03	3,89 \pm 0,02
RMO3	3,51 \pm 0,05	3,88 \pm 0,02	3,94 \pm 0,02
P	0,90	0,000*	0,021*

*p = nilai signifikansi, jika p < 0,05 terdapat perbedaan bermakna. K (kontrol), R (Rotenone), RMO1 (Rotenone + ekstrak etanol daun kelor 0,56 ppm), RMO2 (Rotenone + ekstrak etanol daun kelor 1,12 ppm), RMO3 (Rotenone + ekstrak etanol daun kelor 2,24 ppm).



Gambar 5.3 Rerata Panjang Badan (\bar{x}) \pm SD *Zebrafish* Dengan Paparan Rotenone dan Ekstrak Daun Etanol Kelor pada 3, 6, dan 9 dpf.

Pada saat embrio menetas (3 dpf), tidak ada perbedaan panjang badan signifikan pada seluruh kelompok. Namun, pada 6 dpf, terdapat selisih panjang badan bermakna ($p < 0,001$). Hasil analisis *post-hoc* meunjukkan bahwa larva *zebrafish* pada kelompok R memiliki panjang badan lebih pendek dari kelompok K, RMO1, RMO2, RMO3 ($p = 0,022$; $p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$ berurutan), sedangkan rerata panjang badan kelompok K terhadap kelompok RMO1, RMO2, RMO3 tidak berbeda signifikan.

Pengamatan panjang badan *zebrafish* 9 dpf menunjukkan bahwa kelompok R memiliki rerata panjang badan *zebrafish* paling pendek dibandingkan kelompok lainnya. Hasil uji *post-hoc* Tukey membuktikan bahwa kelompok R berbeda secara signifikan terhadap kelompok K, RMO2, RMO3 ($p = 0,033$; $p = 0,031$; $p = 0,003$), namun tidak berbeda signifikan terhadap kelompok RMO1 ($p = 0,596$). Pemberian ekstrak daun kelor konsentrasi 1,12 ppm dan 2,24 ppm (RMO2, RMO3) pada larva *zebrafish* diinduksi rotenone dapat memperbaiki pertumbuhan panjang badan mendekati panjang badan kelompok K (tidak terdapat perbedaan signifikan dengan $p = 0,733$; $p = 1,000$).

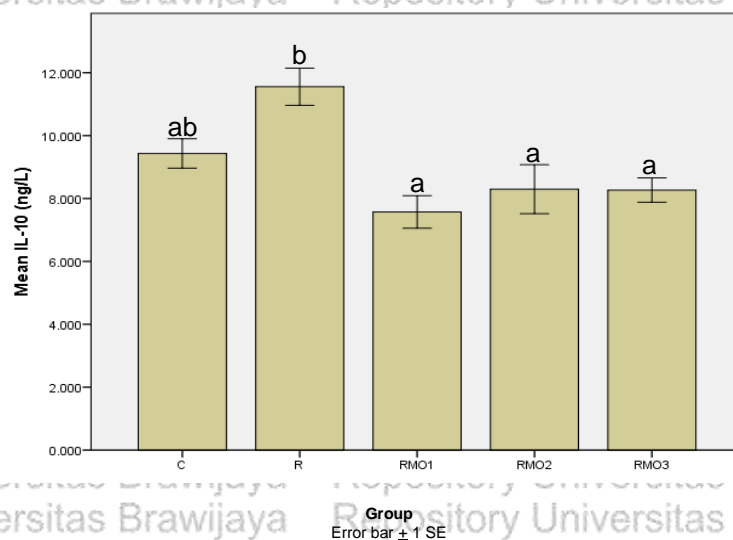
5.4 Efek Ekstrak Etanol Daun Kelor Terhadap Kadar IL-10 Zebrafish 6 DPF Diinduksi Rotenone 12,5 ppb

Kadar IL-10 ditunjukkan pada Tabel 5.4 dan Gambar 5.4.

Tabel 5.4 Kadar IL-10 (\bar{x}) \pm SD (ng/L) pada Larva *Zebrafish* usia 6 dpf.

Kelompok	IL-10 (ng/L)
K	9,43 \pm 0,47
R	11,55 \pm 0,59
RMO1	7,57 \pm 0,52
RMO2	8,30 \pm 0,78
RMO3	8,27 \pm 0,39
P	0,01*

K = kontrol, R = rotenone 12,5 ppb, RMO1 = rotenone 12,5 ppb + ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* 0,56 ppb, RMO2 = rotenone 12,5 ppb + ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* 1,12 ppb, dan RMO3 = rotenone 12,5 ppb + ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* 2,24 ppb



Gambar 5.4 Rerata Kadar IL-10 (\bar{x}) \pm SD (ng/L) Larva *Zebrafish* pada Usia 6 dpf.

Hasil uji beda *one-way Anova* membuktikan bahwa kelompok R memiliki rerata IL-10 tertinggi yaitu $11,55 \pm 0,59$ ng/L ($p = 0,001$). Kemudian, dilakukan uji lanjutan *post-hoc Tukey* dan diketahui bahwa rerata IL-10 kelompok K lebih rendah dari kelompok R walaupun secara statistik tidak signifikan ($p = 0,096$). Selisih signifikan ditunjukkan antara kelompok R dengan kelompok RMO1 ($7,57 \pm 0,52$ ng/L), RMO2 ($8,30 \pm 0,78$ ng/L), dan RMO3 ($8,27 \pm 0,39$ ng/L) ($p = 0,001$; $p = 0,005$; dan $p = 0,004$ berurutan). Tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok K dengan kelompok RMO1 ($p = 0,175$), RMO2 ($p = 0,620$), dan RMO3 ($p = 0,599$). Kadar IL-10 kelompok RMO1, RMO2, dan RMO3 juga tidak berbeda signifikan satu sama lain.

Tabel 5.5 Korelasi antara Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Kelor terhadap Kadar IL-10 Larva *Zebrafish* Usia 6 dpf.

		Konsentrasi Daun Kelor (ppm)	IL-10 (ng/L)
Konsentrasi Daun Kelor (ppm)	Pearson Correlation	1	-.455
	Sig.		.044
	N	20	20
IL-10 (ng/L)	Pearson Correlation	-.455	1
	Sig.	.044	
	N	20	20

Hasil uji korelasi konsentrasi ekstrak etanol daun kelor dengan kadar IL-10 menggunakan *Pearson Correlation* menunjukkan adanya korelasi dengan nilai signifikansi $p = 0,044$, tipe korelasi negatif berkekuatan sedang ($r = -0,455$) (Gambar 5.5). Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi paparan etanol ekstrak daun kelor berhubungan dengan penurunan kadar IL-10.

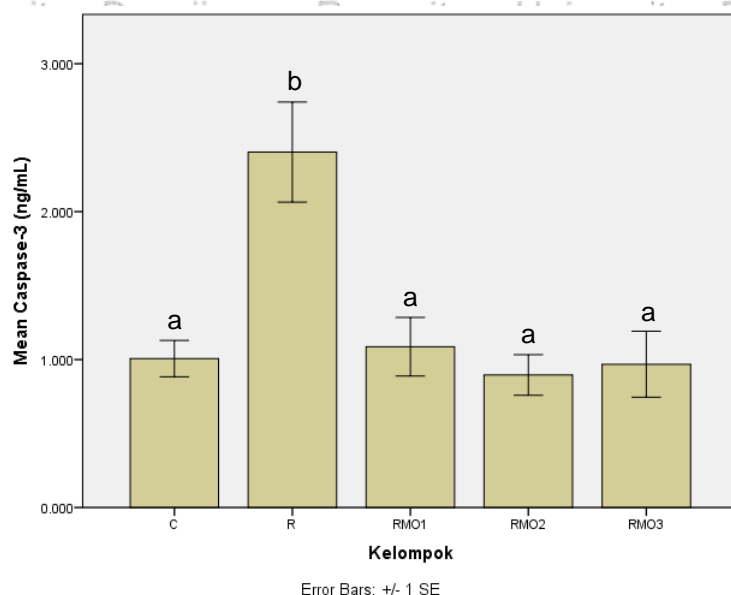
5.5 Efek Ekstrak Etanol Daun Kelor Terhadap Kadar Caspase-3 *Zebrafish* 6 DPF Diinduksi Rotenone 12,5 ppb

Kadar Caspase-3 diukur dengan metode ELISA indirek, hasil pengukuran ditampilkan pada Tabel 5.5 dan Gambar 5.6.

Tabel 5.6 Kadar Caspase-3 (\bar{x}) \pm SD (ng/L) Larva *Zebrafish* Usia 6 dpf.

Kelompok	Caspase-3 (ng/mL)
K	1,01 \pm 0,12
R	2,40 \pm 0,34
RMO1	1,09 \pm 0,19
RMO2	0,89 \pm 0,14
RMO3	0,97 \pm 0,22
p	0,000*

K = kontrol, R = rotenone 12,5 ppb, RMO1 = rotenone 12,5 ppb + ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* 0,56 ppb, RMO2 = rotenone 12,5 ppb + ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* 1,12 ppb, dan RMO3 = rotenone 12,5 ppb + ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* 2,24 ppb



Gambar 5.5 Rerata Kadar Caspase-3 (\bar{x} \pm SD (ng/mL) Larva *Zebrafish* pada Usia 6 dpf.

Data caspase-3 yang diperoleh adalah normal dan homogen, sehingga dilakukan analisis statistik *one-way Anova*. Kadar caspase-3 *zebrafish* pada kelompok R adalah yang tertinggi ($2,40 \pm 0,34$ ng/L), lebih dari 2x kadar caspase-3 kelompok K ($1,01 \pm 0,12$ ng/L) ($p = 0,002$). Jika kadar caspase-3 kelompok R dibandingkan kelompok RMO1 ($1,09 \pm 0,19$ ng/L), kelompok RMO2 ($0,89 \pm 0,14$ ng/L), dan kelompok RMO3 ($0,97 \pm 0,22$ ng/L), kadar caspase-3 kelompok R lebih tinggi secara signifikan ($p = 0,003$; $p = 0,001$; $p = 0,001$ berurutan).

Tabel 5.7 Korelasi antara Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Kelor dengan Kadar Caspase-3 Larva *zebrafish* pada Usia 6 dpf.

		Konsentrasi Daun Kelor (ppm)	Caspase-3 (ng/L)
Konsentrasi Daun Kelor (ppm)	Pearson Correlation	1	-.569
	Sig		.009
	N	20	20
Caspase-3 (ng/mL)	Pearson Correlation	-.569	1
	Sig	.009	
	N	20	20

Korelasi antara konsentrasi ekstrak etanol daun kelor terhadap kadar Caspase-3 larva *zebrafish* yang dianalisis dengan *Pearson Correlation*

menunjukkan hasil signifikan ($p = 0,009$) dengan tipe korelasi negatif berkekuatan sedang ($r = -0,569$). Hasil korelasi ini menunjukkan bahwa semakin meningkat konsentrasi ekstrak etanol daun kelor pada *zebrafish* diinduksi rotenone menyebabkan kadar Caspase-3 semakin rendah.

5.6 Korelasi Kadar IL-10 Terhadap Panjang Badan *Zebrafish*

Untuk mengetahui hubungan antara kadar IL-10 terhadap panjang badan *zebrafish*, dilakukan uji korelasi. Tipe data adalah numerik-numerik. Berdasarkan uji normalitas dengan *Lavene-Statistics* diketahui bahwa data IL-10 dan panjang badan *zebrafish* normal ($p > 0,05$), sehingga uji korelasi *Pearson Correlation* dilakukan.

Tabel 5.8 Korelasi IL-10 terhadap Panjang Badan Larva *Zebrafish* pada Usia 6 dpf.

		Panjang Badan (mm)	IL-10 (ng/L)
Panjang Badan (mm)	Pearson Correlation	1	-.636
	Sig.		.001
	N	25	25
IL-10 (ng/L)	Pearson Correlation	-.636	1
	Sig.	.001	
	N	25	25

Hasil uji *Pearson* menunjukkan adanya korelasi yang signifikan ($p = 0,001$) antara panjang badan *zebrafish* dengan kadar IL-10 dengan kekuatan korelasi $r = -0,636$ (korelasi negatif kuat). Nilai r negatif menjelaskan adanya hubungan terbalik, yaitu semakin rendah panjang badan *zebrafish*, semakin tinggi kadar IL-10, demikian sebaliknya.

5.7 Korelasi antara Kadar Caspase-3 Terhadap Panjang Badan *Zebrafish*

Sebaran data rerata Caspase-3 dan panjang badan *zebrafish* adalah normal setelah diuji dengan *Lavene Statistics*. Oleh karena itu, dilakukan uji *Pearson*

Correlation untuk mengetahui kekuatan hubungan antara kedua parameter tersebut.

Tabel 5.9 Korelasi Caspase-3 Terhadap Panjang Badan Larva Zebrafish Usia 6 dpf.

		Panjang Badan (mm)	Caspase-3 (ng/mL)
Panjang Badan (mm)	Pearson Correlation	1	-.747
	Sig		.000
	N	25	25
Caspase-3 (ng/mL)	Pearson Correlation	-.747	1
	Sig	.000	
	N	25	25

Hasil uji korelasi rerata Caspase-3 dan panjang badan *zebrafish* ditampilkan pada Gambar 5.9. Terdapat korelasi signifikan antara kedua parameter tersebut ($p = 0,000$) dengan korelasi negatif kuat ($r = -0,747$). Hasil ini menunjukkan bahwa panjang badan *zebrafish* semakin pendek dengan peningkatan kadar Caspase-3, demikian juga sebaliknya.

5.8 Korelasi Kadar IL-10 dan Kadar Caspase-3 Zebrafish

Uji korelasi bivariat *Pearson Correlation* digunakan untuk menganalisis hubungan antara kadar IL-10 dengan Caspase-3 karena diketahui sebaran data kedua parameter adalah normal setelah diuji normalitas dengan *Lavene Statistics*.

Tabel 5.10 Korelasi Kadar IL-10 dan Caspase-3 Larva Zebrafish Usia 6 dpf.

		IL-10 (ng/L)	Caspase-3 (ng/mL)
IL-10 (ng/L)	Pearson Correlation	1	-.405
	Sig		.045
	N	25	25
Caspase-3 (ng/mL)	Pearson Correlation	-.405	1
	Sig	.045	
	N	25	25

Hasil uji korelasi kadar IL-10 dengan kadar Caspase-3 menunjukkan adanya korelasi signifikan antara kedua parameter tersebut ($p = 0,045$) dengan kekuatan

korelasi sedang ($r = 0,405$, Gambar 5.10). Korelasi bersifat positif yang berarti semakin tinggi kadar IL-10, semakin tinggi juga kadar Caspase-3 pada *zebrafish*.





BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Rotenone Menghambat Pertumbuhan Panjang Badan Larva Zebrafish

Embrio *zebrafish hatching* pada 3 dpf. Pada saat ini, kelompok C memiliki rerata panjang badan $3,55 \pm 0,04$ mm. Rerata panjang badan kelompok R adalah $3,51 \text{ mm} \pm 0,02$. Menurut definisi LGR (*Linear Growth Retardation*) sebagai -2 SD rerata panjang badan populasi normal (kelompok C), pada 3 dpf kriteria ini tidak terpenuhi, sebagaimana secara matematis dalam notasi angka adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{LGR} &= \text{Tinggi badan populasi normal} - (2 \times \text{SD}) \\ &= 3,55 \text{ mm} - (2 \times 0,04 \text{ mm}) \\ &= 3,55 \text{ mm} - 0,08 \text{ mm} \\ &= 3,43 \text{ mm (minimal panjang badan LGR)} \end{aligned}$$

Namun, sebuah studi melaporkan bahwa LGR tidak dapat didasarkan pada -2 SD panjang badan populasi normal sebelum 48 bulan sejak individu lahir. Studi tersebut dilakukan berdasarkan data dari 52 negara di regio Eropa, Amerika Latin, Timur Tengah, Afrika, dan Asia. Ditemukan bahwa rerata panjang badan populasi yang berusia 1 bulan sejak lahir di satu negara dapat berubah drastis saat populasi tersebut berusia 48 bulan. Salah satu contohnya adalah panjang badan populasi bayi berusia 1 bulan di Eritrea adalah $-0,12$ SD panjang badan populasi normal (tidak masuk kriteria LGR). Nilai ini berubah saat populasi bayi tersebut berusia 48 bulan, menjadi $-2,01$ SD panjang badan populasi normal (masuk kriteria LGR).

Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa LGR tidak dapat ditegakkan sebelum individu mencapai usia 48 bulan (Victoria *et al.*, 2010). Hasil penelitian tersebut

memberi bukti bahwa waktu yang tepat untuk mengategorikan LGR bukan pada saat kelahiran (*hatching zebrafish*) tetapi usia 48 bulan manusia (6 dpf *zebrafish*).

Usia 6 dpf pada *zebrafish* analog dengan usia 2 tahun pada manusia (Sorribes *et al.*, 2013). Pada usia ini LGR dapat didefinisikan sebagai -2 SD (Victoria *et al.*, 2010). Kelompok C memiliki panjang badan $3,79 \pm 0,06$ mm, sehingga kategori panjang badan LGR adalah $< 3,67$ mm. Pemberian rotenone menyebabkan *zebrafish* pada kelompok R ($3,58 \pm 0,02$ mm) mengalami LGR. Setelah diobservasi lebih lanjut hingga 9 dpf, panjang badan kelompok C adalah $3,97 \pm 0,06$ mm (LGR adalah $< 3,85$ mm), sedangkan rerata panjang badan kelompok R adalah $3,79 \pm 0,03$ mm. Oleh karena itu, disimpulkan bahwa populasi *zebrafish* pada kelompok R memiliki rerata panjang badan LGR dibandingkan kelompok C. Hal ini membuktikan bahwa paparan rotenone selama *zebrafish* dalam masa embrio (2 hpf – 3 dpf) dapat menyebabkan LGR.

Tahap konsepsi adalah fase krusial dalam proses tumbuh kembang. Xie *et al.* (2018) melaporkan bahwa janin SGA (*small gestational age*) yang lahir dari ibu dengan *Gestational Weight Gain* (GWG) inadekuat karena kurang nutrisi selama kehamilan menghasilkan bayi berpotensi LGR lebih besar daripada ibu dengan berat badan rendah sebelum kehamilan tapi memiliki GWG normal. Hal ini terjadi karena GWG inadekuat menyebabkan defek pada *hypothalamic-pituitary-adrenal* (HPA) axis. Akibatnya, *growth hormone* (GH) yang dihasilkan jumlahnya menjadi tidak adekuat dan pertumbuhan tidak optimal. Sama halnya dengan manusia, produksi GH *zebrafish* juga dihasilkan oleh HPA axis (He *et al.*, 2014). Pada studi ini, rotenone dipaparkan sejak fase embrionik hingga embrio *hatching*. Paparan rotenone diketahui menghasilkan inflamasi yang menghabiskan energi lebih banyak daripada kondisi tubuh tidak radang (WHO, 2013), sehingga energi dari nutrisi yang seharusnya digunakan untuk tumbuh kembang menjadi tidak adekuat (Lacourt *et al.*, 2018). Akibatnya, produksi GH oleh HPA axis mungkin tidak optimal

untuk menghasilkan pertumbuhan normal, sehingga terjadi LGR pada *zebrafish* yang dipapar rotenone. Paparan rotenone 12,5 ppb mulai 2 hpf sampai 3 dpt menyebabkan penurunan IGF-1, IRS-1, dan penurunan VEGF (Cory'ah, 2018; Kartiko, 2018). Selain itu, paparan rotenone dengan kosentrasi yang sama menyebabkan gangguan pertumbuhan tulang yang dibuktikan dengan menurunnya osifikasi dan osteoprotegerin serta meningkatnya RANKL (Dianita, 2018; Primihastuti, 2018).

6.2 Ekstrak Etanol Daun *Moringa oleifera* Tidak Menyebabkan LGR

Sebagai studi pendahuluan, ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* diperoleh dengan melakukan maserasi simplisia dengan etanol 96% selama semalam, kemudian pelarut etanol dipisahkan dari ekstrak menggunakan rotari evaporator. Selanjutnya, ekstrak etanol daun kelor dilarutkan dengan medium embrionik konsentrasi 0,56; 1,12; dan 2,24 ppm. Tidak ditemukan adanya perbedaan panjang badan signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok MO1, MO2, dan MO3. Disimpulkan bahwa seluruh konsentrasi ekstrak daun kelor yang digunakan dalam penelitian ini tidak menghambat pertumbuhan panjang badan *zebrafish*.

6.3 Ekstrak Etanol Daun *Moringa oleifera* Memperbaiki Panjang Badan

Zebrafish hatching pada 3 dpf (*zebrafish hatching*), sehingga belum dapat ditentukan potensi ekstrak etanol daun kelor dalam memperbaiki pertumbuhan panjang badan *zebrafish* karena LGR baru dapat ditegakkan setelah *zebrafish* mencapai usia 6 dpf, seperti penjelasan pada poin 6.1. Berdasarkan data yang diperoleh pada studi ini, tidak ada perbedaan signifikan rerata panjang badan tiap kelompok saat 3 dpf.

Pada usia 6 dpf, pemberian ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* konsentrasi 0,56; 1,12; dan 2,24 ppm selama masa embrio *zebrafish* (2 hpf – 3 dpf)

mengkoreksi panjang badan populasi larva *zebrafish* kelompok tersebut sehingga tidak masuk kriteria LGR, bahkan kelompok RMO2 dan RMO3 memiliki rerata panjang badan lebih dari kelompok C. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh karena ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* memiliki senyawa – senyawa antioksidan seperti vitamin A, vitamin E, dan berbagai polifenol yang bukan saja bersifat antioksidan tetapi juga anti-inflamasi (Jimenez *et al.*, 2017). Mekanisme kerja rotenone dalam menginduksi LGR adalah melalui jalur stress oksidatif yang dapat juga menyebabkan inflamasi (Aly *et al.*, 2014; Domazetovic *et al.*, 2017; Milward, 2017). Kedua jalur tersebut pada akhirnya menyebabkan hambatan pertumbuhan, sehingga menyebabkan LGR. Melalui efek antioksidan maupun antiinflamasi ekstrak etanol daun *Moringa oleifera*, stress oksidatif dan respon inflamasi yang disebabkan rotenone dapat diturunkan, sehingga tumbuh kembang *zebrafish* menjadi normal.

Efek ameliorasi panjang badan oleh ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* juga dikonfirmasi oleh data panjang badan *zebrafish* 9 dpf. Rerata panjang badan populasi *zebrafish* pada kelompok K adalah yang terpanjang, sedangkan kelompok R memiliki rerata panjang badan terpendek. Dengan pemberian ekstrak etanol daun kelor, LGR tidak terjadi pada *zebrafish* walaupun dipapar dengan rotenone konsentrasi sama seperti kelompok R. Efek koreksi panjang badan dengan terapi ekstrak etanol daun kelor bersifat *dose-dependent*. Larva *zebrafish* pada kelompok RMO3 yang dipapar dosis ekstrak etanol daun kelor tertinggi (2,24 ppm) memiliki rerata panjang paling mendekati kelompok C, sebaliknya kelompok RMO1 yang dipapar ekstrak etanol daun kelor 0,56 ppm memiliki populasi *zebrafish* dengan rerata panjang badan paling mendekati kelompok R. Kelompok RMO2 (paparan ekstrak etanol daun kelor 1,12 ppm) memiliki rerata panjang badan di antara kelompok RMO3 dan RMO1.

6.4 Kadar IL-10 pada Zebrafish Diinduksi Rotenone yang Diberi Ekstrak Etanol Daun *Moringa oleifera*

IL-10 merupakan sitokin anti-inflamasi penting yang berperan untuk menyeimbangkan aktivitas pro-inflamasi berlebihan yang dapat menimbulkan kondisi patologis, misalnya pada kasus autoimun (Lobo-Silva *et al.*, 2016).

Penelitian ini menunjukkan bahwa IL-10 meningkat signifikan pada kelompok R dibandingkan dengan kelompok C. Pemberian ekstrak etanol daun kelor pada zebrafish yang dipapar rotenone (kelompok RMO1, RMO2, dan RMO3) menurunkan kadar IL-10 masing-masing kelompok tersebut. Hasil ini mengindikasikan bahwa peningkatan IL-10 terjadi pada kondisi LGR seperti pada kelompok R. IL-10 merupakan sitokin yang secara umum diketahui memiliki aktivitas anti-inflamasi. Regulasi dari IL-10 salah satunya dipengaruhi oleh kinerja sitokin pro-inflamasi. Penelitian yang dilakukan oleh Kovacs (2010) melaporkan bahwa pemberian IL-6 pada sel myeloma secara *in vitro* menyebabkan peningkatan ekspresi IL-10 dari sel tersebut (Kovacs, 2010). Penelitian lain membuktikan bahwa IL-6 ternyata memiliki aktivitas *counter*-inflamasi melalui peningkatan produksi IL-10 yang dibuktikan dari perbandingan antara tikus model gagal ginjal akut *wild type* (WT) dengan tikus IL-6^{-/-}. Pada tikus WT peningkatan IL-6 terjadi disertai dengan peningkatan IL-10. Namun, pada tikus IL-6^{-/-} tidak terjadi peningkatan IL-6 dan IL-10, sehingga studi ini menyimpulkan bahwa respon *counter-inflammation* IL-10 terjadi secara langsung oleh IL-6 (Andres-Hernando *et al.*, 2017). Penelitian lain membuktikan bahwa IL-6 dapat memicu aksi anti-inflamasi dengan menginduksi diferensiasi sel Treg1 dari sel T CD4⁺. IL-6 bersama dengan TGF- β menginduksi produksi IL-10 pada sel Th17 (Jin *et al.*, 2013).

Penelitian-penelitian terkini melaporkan temuan menarik mengenai aktivitas IL-10. Sitokin ini secara luas telah diakui memiliki aktivitas anti-inflamasi. Namun, beberapa studi melaporkan bahwa IL-10 ternyata memiliki aktivitas ganda, sitokin

ini dapat bersifat anti-inflamasi maupun pro-inflamasi. Salah satu penelitian yang dilakukan Shomyseh *et al.* (2009) melaporkan bahwa IL-10 dapat berefek pro-inflamasi karena IL-10 mengaktifkan reseptor IL-10R yang memfosforilasi jalur Jak1-Stat3. Aktivasi jalur ini menginduksi ekspresi Socs3, dimana protein ini akan meningkatkan ekspresi IL-6 (sitokin pro-inflamasi). Namun, Stat3 ternyata juga memiliki aktifitas hambatan NfκB (faktor transkripsi sitokin pro-inflamasi), sehingga aktivasi Stat3 juga dapat menghasilkan efek anti-inflamasi. Regulasi Stat3 dalam menghasilkan efek pro-inflamasi atau anti-inflamasi masih belum diketahui (Sanjabi *et al.*, 2009). Salah satu studi yang mempelajari kerja IL-10 terhadap sel T CD8⁺ intratumor secara *in vivo* pada tikus menemukan bahwa pemberian IL-10 menyebabkan potensiasi kinerja sel T CD8⁺ sehingga tumor, karena injeksi IL-10 meningkatkan ekspresi sitokin pro-inflamasi IFN-γ intratumor maupun pada limpa (Mumm *et al.*, 2011).

Studi-studi di atas memberikan informasi bahwa ekspresi IL-10 dipengaruhi oleh aktivitas IL-6 dan adanya efek ganda IL-10 sebagai sitokin anti-inflamasi dan pro-inflamasi. Hasil penelitian satu tim yang memeriksa kadar IL-6 dari spesimen yang sama menunjukkan bahwa pola kadar IL-6 sama dengan pola kadar IL-10, yaitu kadar tertinggi pada kelompok R, diikuti kelompok C, RMO3, RMO2, dan RMO1 (Chandra, 2018). Oleh karena itu, pola kadar IL-10 pada studi ini kemungkinan dihasilkan oleh respon *counter-balance* kondisi inflamasi, dimana kondisi peradangan akan diseimbangkan dengan peningkatan ekspresi sitokin – sitokin anti-inflamasi sebagai kompensasi untuk mempertahankan homeostasis.

6.5 Kadar Caspase-3 pada Larva Zebrafish yang Diinduksi Rotenone dan Diberi Ekstrak Etanol Daun *Moringa oleifera*

Caspase-3 merupakan caspase eksekutor apoptosis yang sangat berperan dalam tumbuh kembang tulang. Keseimbangan aktivitas osteoblast dan osteoklas merupakan determinan pertumbuhan tulang. Osteoklas menyebabkan resorpsi tulang, osteoblast memiliki aktivitas pembentukan tulang, dan osteosit adalah sel pengisi yang berada di dalam tulang. Aktivitas Caspase-3 yang tinggi mencerminkan terjadinya apoptosis osteoblast dan osteosit yang menyebabkan pertumbuhan tulang menjadi tidak optimal. Strategi untuk meningkatkan pertumbuhan tulang melalui jalur anti-apoptosis telah dikembangkan. Salah satunya adalah produk Caspase-3 *Inhibitor*, Z-DEVD-FMK yang menghambat aktivitas Caspase-3 sehingga meningkatkan osteoblast yang penting dalam pertumbuhan tulang (Mollazadeh *et al.*, 2015). Dalam penelitian ini, kadar Caspase-3 pada kelompok R adalah yang paling tinggi, mencapai lebih dari dua kali kadar Caspase-3 kelompok kontrol. Wijayanti (2017) membuktikan bahwa rotenone 10 ppb menyebabkan peningkatan ekspresi Bax (pro apoptosis). Pemberian ekstrak etanol daun kelor pada *zebrafish* yang diinduksi rotenone menghasilkan kadar Caspase-3 yang relatif sama dengan kelompok C. Jika ditinjau dari mekanisme aktivasi Caspase-3 dari Pro Caspase-3, stres seluler yang menyebabkan pelepasan sitokrom c dalam kaskade apoptosis adalah penyebab aktivasi Caspase-3 (McIlwain *et al.*, 2013). Pada penelitian yang dilakukan oleh Chandra (2018), catalase yang merupakan enzim anti-radikal hidroksil kadarnya meningkat pada *zebrafish* diinduksi rotenone dan diterapi dengan ekstrak etanol daun kelor. Selain itu, enzim SOD yang bertanggung jawab dalam konversi radikal O_2^* menjadi H_2O_2 juga meningkat kadarnya dengan pemberian ekstrak etanol daun kelor pada *zebrafish* diinduksi rotenone (Wangta, 2018). Telah dibuktikan dalam studi yang dilakukan oleh Khotimah *et al.* (2018) bahwa larva *zebrafish* yang



dipapar rotenone 12,5 ppb dan diterapi dengan ekstrak etanol *Centella asiatica* memiliki peningkatan ekspresi enzim antioksidan SOD dan penurunan marker stress oksidatif MDA. Berdasarkan penelitian – penelitian tersebut, peningkatan enzim – enzim antioksidan yang terjadi dapat mengurangi stress oksidatif, sehingga stress seluler tereduksi dan menyebabkan penurunan kadar caspase-3 pada *zebrafish* diinduksi rotenone yang diterapi ekstrak etanol daun kelor.

6.6 Penurunan Kadar IL-10 Diikuti juga oleh Penurunan Kadar Caspase-3 Larva Zebrafish

Hasil uji korelasi kadar IL-10 dan Caspase-3 pada poin 5.8 menunjukkan adanya korelasi positif sedang antara kedua parameter tersebut. Peningkatan kadar IL-10 pada penelitian ini tidak merepresentasikan dominasi kinerja anti-inflamasi, tetapi cenderung karena respon kompensasi aktivitas sitokin pro-inflamasi seperti telah dielaborasi pada poin 6.4. Caspase-3 dapat diaktivasi baik melalui jalur apoptosis ekstrinsik maupun intrinsik (McIlwain *et al.*, 2013).

Persinyalan apoptosis jalur ekstrinsik dimediasi oleh aktivasi Fas dapat memicu produksi sitokin-sitokin TNF- α , IL-6, dan IL-1 β (Nelson *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 2009). Penelitian tesis ini menggunakan *zebrafish* yang dipapar rotenone, sehingga meningkatkan stress oksidatif melalui peningkatan ROS. Kadar ROS yang meningkat dapat menginduksi aktivasi apoptosis jalur ekstrinsik dimediasi Fas dengan mekanisme peningkatan FasL, translokasi FADD, dan aktivasi caspase-8 yang pada ujungnya memfasilitasi peningkatan kadar Caspase-3 untuk apoptosis (Dutordoir *et al.*, 2016). Peningkatan kadar Caspase-3 oleh aktivasi apoptosis jalur ekstrinsik dimediasi persinyalan Fas mungkin menjadi salah satu penyebab korelasi positif kadar Caspase-3 dan kadar IL-10 dalam studi ini, karena aktivasi jalur Fas akan meningkatkan ekspresi sitokin pro-inflamasi, salah satunya

adalah IL-6 yang akan diseimbangkan dengan peningkatan produksi sitokin anti-inflamasi, salah satunya IL-10.

Peningkatan Caspase-3 oleh aktivitas ROS tidak selalu melalui jalur apoptosis ekstrinsik. Jalur intrinsik juga diaktivasi oleh ROS, misalnya melalui jalur aktivasi sitokrom C oleh stress retikulum endoplasma. Jalur ini menghasilkan gangguan homeostasis Ca^{2+} karena retikulum endoplasma diaktivasi untuk mensekresi Ca^{2+} yang akan menginisiasi pelepasan sitokrom c dari mitokondria. Caspase-9 aktif oleh sitokrom c bebas di sitoplasma dimana pro-Caspase-3 akan diubah menjadi Caspase-3 aktif oleh Caspase-9, dan terjadilah apoptosis jalur intrinsik melalui ROS (Dutordoir *et al.*, 2016). Kekuatan korelasi antara kadar Caspase-3 dan IL-10 adalah sedang, kemungkinan karena korelasi kedua parameter ini sifatnya tidak langsung, yaitu Caspase-3 meningkat kadarnya melalui peningkatan kadar IL-6, sehingga meningkatkan aktivasi Fas, dan IL-10 meningkat sebagai respon terhadap IL-6. Selain itu, jalur aktivasi Caspase-3 oleh peningkatan ROS yang diasumsikan terjadi dalam studi ini mungkin juga terjadi melalui jalur intrinsik oleh stress retikulum endoplasma. Beberapa kemungkinan inilah yang dapat menjadi penyebab kekuatan korelasi sedang antara kadar IL-10 dan kadar Caspase-3 *zebrafish*.



Bab 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Pemberian ekstrak daun kelor 0,56; 1,12; dan 2,24 ppm pada embrio *zebrafish* usia (0-3 dpf) diinduksi rotenone memberi efek sebagai berikut:

1. Menurunkan kadar IL-10 pada larva usia 6 dpf.
2. Menurunkan kadar Caspase-3 pada larva usia 6 dpf.
3. Mengoreksi panjang badan larva *zebrafish* diinduksi rotenone.

7.2 Saran

1. Dilakukan penelitian lanjutan mengenai efek ekstrak etanol daun kelor terhadap perkembangan kognitif dan organ – organ lainnya.
2. Perlu dilakukan pemeriksaan selular dan molekular seperti osteoblas, osteoklas, dll. untuk konfirmasi efek preventif LGR ekstrak etanol daun kelor.
3. Pemeriksaan kadar sitokrom C dapat dilakukan untuk memastikan bahwa apoptosis yang terjadi diinduksi oleh rotenone melalui jalur intrinsik oleh stres seluler.
4. Dilakukan penelitian pemaparan ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* yang dilanjutkan sampai pada usia 6 dpf (setara dengan usia 2 tahun pada anak).



DAFTAR PUSTAKA

Aly GS, Shaalan AH, Mattar MK, Ahmed HH, Zaki ME, Abdallah HR, Oxidative stress status in nutritionally stunted children. *Egyptian Pediatric Association Gazette*, 2014, 62; 1: 28-33.

Andres-Hernando, Okamura K, Bhargava R, Kiekhaefer CM, Soranno D, Kirkbride-Romeo LA, Gil H, Altmann C, Faubel S. Circulating IL-6 upregulates IL-10 production in splenic CD4⁺ T cells and limits acute kidney injury-induced lung inflammation. *Kidney International*, 2017; 91: 1057-1069.

Arulselvan P, Tan WS, Gothai S, Muniandy K, Fakurazi S, Esa NM, Alarfaj AA, Kumar SS, Anti-Inflammatory Potentia Iof Ethyl Acetate Fraction of *Moringa oleifera* in Downregulating the NFκB Signaling Pathway in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages. *Molecules*, 2016; 21, (11)

Bloom D, Cafiero-Fonseca ET, McGovern ME, *et al.* The Macroeconomic Impact of Non-Communicable Diseases in China and India: Estimates, Projections, and Comparisons, *J Econ ageing*. 2014; 4: 100 – 11.

Burke E, Why Use Zebrafish to Study Human Disease?, *Intramural Research Program NIH*, 2016, <https://irp.nih.gov/blog/post/2016/08/why-use-zebrafish-to-study-human-diseases>, diakses pada 20 Oktober 2018 pukul 17.15 WIB.

Chandra K, 2018, *Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kelor Terhadap Kadar Interleukin-6 dan Catalase pada Zebrafish (Danio rerio) yang Diinduksi Stunting yang Diinduksi Dengan Rotenon*, Tesis, Universitas Brawijaya.

de Boer J, Andressoo JO, de Wit J, Huijmans J, Beems RB, van Steeg H, Weeda G, van der Horst GT, van Leeuwen W, Themmen AP, *et al.*, Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. *Science*, 2002; 296: 1276 – 1279.

de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Garza C, Yang H; WHO Multicentre Growth Reference Study Group. Comparison of the World Health Organization (WHO) child growth standards and the national center for health statistics/WHO international growth reference: implications for child health programmes. *Public Health Nutr*. 2006; 9, (7): 942 – 947.

Dianita P, 2017, *Pengaruh ekstrak etanol pegagan (Centella asiatica) pada osifikasi tulang dan osteoklastogenesis pada model stunting larva zebrafish (Danio rerio) yang diinduksi rotenon*, Tesis, Universitas Brawijaya.

Domazetovic V, Marcucci G, Iantomasi T, Brandi ML, Vincenzini MT, Oxidative stress in bone remodelin: role of antioxidants. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 2017; 14, (2): 209 - 216

Dutordoir MR, Bates DAA, Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016: 2977 – 2992.

EPA, Rotenone. <https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/index-240.html>, diakses pada 8 Mei 2018 pukul 19.12 WIB.

Falowo AB, Muchenje V, Hugo A, Aiyegoro OA, Fayemi PO, Antioxidant activities of *Moringa oleifera* L. And *Bidens polosa* L. Leaf extracts and their effects on oxidative stability of ground raw beef during refrigeration storage, *Journal of Food*, 2017; 15, (2): 249 – 256.

Ganguly, S. Indian ayurvedic and traditional medicinal implications of indigenously available plants, herbs and fruits: A review. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.* 2013, 4: 623–625.

Gupta RC, 2014, Biomarkers in Toxicology, Elsevier, India, 402 – 405.

Hawkes CP, Grimberg A, Insulin-Like Growth Factor-I is a Marker for the Nutritional State, *Pediatr Endocrinol Rev.* 2015; 13, (2): 499-511.

He W, Dai X, Chen X, He J, Yin Z, Zebrafish pituitary gene expression before and after sexual maturation. *Transcriptome analysis of zebrafish*, 2014; 221, (3): 429-440.

Horton S, Steckel RH, Malnutrition: Global economic losses attributable to malnutrition 1900-2000 and projections to 2050. *Cambridge University Press*, 2013.

Jimenez MV, Almatrafi MM, Fernandez ML, Bioactive components in *Moringa oleifera* leaves protect against chronic disease, *Antioxidants*, 2017; 6, (91).

Jin J, Han X, Yu Q. Interleukin-6 Induces the Generation of IL-10-Producing Tr1 Cells and Suppresses Autoimmune Tissue Inflammation, *J Autoimmun*, 2013; 40: 28-44.

Karthivashan G, Kura AU, Arulselvan P, Isa NM, Fakurazi S, The modulatory effect of *Moringa oleifera* leaf extract on endogenous antioxidant systems and inflammatory markers in an acetaminophen-induced nephrotoxic mice model. *Peer J*, 2016; e2127.

Khotimah H, Darwitri D, Yuliani T, Nuraenah E, Zahara E, Kalsum U, Nurdiana N, Ali MM. Centella asiatica increased the body length through the modulation of antioxidant in rotenone-induced zebrafish larvae. *Biomed Pharmacol J*, 2018; 11, (2).

Kondo M, Murakawa Y, Harashima N, Kobayashi S, Yamaguchi S, Harada M, Roles of proinflammatory cytokines and the Fas/Fas ligand interaction in the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Immunology*, 2009; 128, (1 pt 2): e589-e599.

Kovacs E. Interleukin-6 leads to interleukin-10 production in several human multiple myeloma cell lines. Does interleukin-10 enhance the proliferation of these cells?, *Leukemia Research*, 2010; 34: 912-916.

Lacourt TE, Vichaya EG, Chiu GS, Dantzer R, Heijnen CJ. The High Costs of Low-Grade Inflammation: Persistent Fatigue as a Consequence of Reduced Cellular-Energy Availability and Non-adaptive Energy Expenditure. *Front. Behav. Neurosci*, 2018; 12, (78): 1 – 20.



Lawrence C, Mason T, Zebafish housing systems: a review of basic operating principles and considerations for design and functionality. *ILAR J*, 2012; 53, (2): 179 – 191.

Lobo-Silva D, Carriche GM, Castro AG, Roque S, Saraiva M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *Journal of Neuroinflammation*, 2016; 13: 297-307.

Mackie EJ, Tatarczuch L, Mirams M, The skeleton a multi-functional complex organ. The growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *Journal of Endocrinology*. 2011; 211: 109-121.

Martinez-Gonzales CL, Martinez L, Martinez Ortiz E, Gonzales-Trujano ME, Deciga-Campos M, Ventura-Martinez R, Diaz-Reval I, *Moringa oleifera*, a species with potential analgesic and anti-inflammatory activities, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 87: 482-488.

McGovern ME, Krishna A, Aguayo VM, Subramanian SV, A review of the evidence linking child stunting to economic outcomes, *International Journal of Epidemiology*. 2017; 46, (4), 1171 – 1191.

McIlwain DR, Berger T, Mak TW, Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013; 5: a008656.

Milward DJ, Nutrition, infection and stunting: the roles of deficiencies of individual nutrients and foods and of inflammation, as determinants of reduced linear growth of children. *Nutrition Research Reviews*, 2017; 30: 50 – 72.

Mumm JB, Emmerich J, Zhang X, *et al.*, IL-10 Elicits IFN- γ Dependent Tumor Immune Surveillance. *Cancer Cell*, 2011; 20: 781 – 796.

Nasiadka A, Clark MD, Zebrafish breeding in the laboratory environment. *ILAR Journal*, 2012; 53, (2): 161 – 168.

Mackay EW, Apschner A, Schulte-Merker S, A bone to pick with zebrafish, *BoneK Ey Reports*. 2013; 2, (445).

Marlotti M, Carnovali M, Banfi G, *Danio rerio*: The Janus of the bone from embryo to scale. *Clinical Cases and Bone Metabolism*, 2015; 12, (2): 188-194.

Mollazadeh S, Bazzaz BSF, Kerachian MA, Role of apoptosis in pathogenesis and treatment of bone-related disease. *J Orthop Surg Res*, 2015; 10, (15).

NC3RS, Five Reasons Why Zebrafish Make Excellent Research Models, *National Centre for The Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research*, 2014. <https://www.nc3rs.org.uk/news/five-reasons-why-zebrafish-make-excellent-research-models>, diakses pada 20 Oktober 2018 pukul 18.10 WIB.

Nelson DP, Setser E, Hall DG, Schwartz SM, Hewitt T, Klevitsky R, Osinska H, Bellgrau D, Duke RC, Robbins J, Proinflammatory consequences of transgenic fas ligand expression in the heart. *J Clin Invest*, 2000; 105, (9): 1199-208.



Nweze NO, Nwafor FI, Phytochemical, proximate and mineral composition of leaf extracts of *Moringa oleifera* Lam. from nsukka, south – eastern nigeria. *IOSR – JPBS*, 2014; 9, (1): 99 – 103.

Parrish AB, Freil CD, Kornbluth S, Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5: 1008672.

Popoola, J.O.; Obembe, O.O. Local knowledge, use pattern and geographical distribution of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) in Nigeria. *J. Ethnopharmacol*. **2013**, 150: 682–691.

Pubchem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/rotenone#section=Top>, Rotenone. diakses pada 8 Mei 2018, pukul 18.22 WIB.

Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, Kohli K, Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflammation & Allergy – Drug Targets*, 2009; 8: 229 – 235.

Razis AFA, Ibrahim MD, Kntayya SB, Health Benefits of *Moringa oleifera*. *Asian Pac J Cancer Prev*; 15, (20): 8571-8576.

Rojas JC, Lima FG, Mitochondrial optic neuropathy: In vivo model of neurodegeneration and neuroprotective strategies. *Eye and Brain*, 2010; 2: 21 – 37.

Shachar I, Karin N, The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune disease and their clinical implications. *Journal of Leukocyte Biology*, 2013; 93: 51 – 61.

Shomyseh S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti- and Pro-inflammatory Toles of TGF- β , IL-10, and IL-22 In Immunity and Autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol*, 2009; 9, (4): 447 – 453.

Shouval DS, Ouahed J, Biswas A, Goettel JA, Horwits BH, Klein C, Muisé AM, Snapper SB, Mucosal Homeostasis in Mice and Humans, *Advances in Immunology*, 2014; 122: 177-210.

Sivasankari, B.; Anandharaj, M.; Gunasekaran, P. An ethnobotanical study of indigenous knowledge on medicinal plants used by the village peoples of Thoppampatti, Dindigul district, Tamilnadu, India. *J. Ethnopharmacol*. **2014**, 153: 408–423.

Sorribes A, Porsteinsson H, Arnardottir H, Johannesdottir IP, Sigurgeirsson B, de Polavieja GG, Karlsson K, The ontogeny of sleep-wake cycles in zebrafish: a comparison to humans. *Frontiers in Neura Circuits*, 2013; 7, (179).

Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C, The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev*, 2008; 83: 13-34.



Svefors P, Rahman A, Ekstrom EC, Khan AI, Lindstrom E, Persson LA, Selling KE, Stunted at 10 years. Linear Growth Trajectories and Stunting from Birth to Pre-Adolescence in a Rural Bangladeshi Cohort. *PLoS ONE*, 2016, 11; (3): e0149700.

Tejas GH, Umang JH, Payal BN, Tusharbindu DR, Pravin TR, A Panoramic View on Pharmacognostic, Pharmacological, Nutritional, Therapeutic and Prophylactic Values of *Moringa oleifera* LAM. *IRJP*, 2012; 3, (6).

Tian Y, Ma X, Yang C, Su P, Yin C, Qian AR, The impact of oxidative stress on the bone system in response to the space special environment. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017; 18, 2132: 1-9.

Torlesse H, Cronin AA, Sebayang SK, Nandy R, Determinants of stunting in Indonesian children: evidence from a cross-sectional survey indicate a prominent role for the water, sanitation and hygiene sector in stunting reduction. *BMC Public Health*

UNICEF, WHO, World Bank. Levels and Trends in Child Malnutrition: Joint Child Malnutrition Estimates. New York, NY: United Nations International Children's Fund; Geneva: WHO; Washington, DC: World Bank, 2012. Available from: <http://www.who.int/nutgrowthdb/estimates/en/>

Unsain N, Higgins J, Parker K, Johnstone AD, Barker PA, XIAP regulates caspase activity in degenerating axons. *Cell Reports*, 2013; 4, (4): 751 – 763.

Victora CG, deOnis M, Hallal PC, Blossner M, Shrimpton R, Worldwide timing of growth faltering: revisiting implications for interventions. *Pediatrics*, 2010, 125; (3).

Vonaesch P, Randremanana R, Gody J *et al.*, Identifying the etiology and pathophysiology underlying stunting and environmental enteropathy: study protocol of the AFRIBIOTA project, *BMC Pediatrics* 2018, 18; 236: 1-18.

White A, Wallis G, Endochondral ossification: A delicate balance between growth and mineralization. *Current Biology*, 2001; 11, (15): PR589-R91.

World Health Organization. Physical Status: the Use and Interpretation of Anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series No. 854. Geneva: WHO, 1995. Available from: http://www.who.int/childgrowth/publications/physical_status/en/

Wright RJ, Lee KS, Hyacinth HI, Hibbert JM, Reid ME, Wheatley AO, Asemota HN, An Investigation of the Antioxidant Capacity in Extracts from *Moringa oleifera* Plants Grown in Jamaica, *Plants (Basel)*. 2017; 6, (4): 48.

Xie C, Epstein LH, Elden RD, Shenassa ED, Li X, Wen X, Stunting at 5 years among sga newborns. *Pediatrics*, 2016; 137, (2): e20152636.

Zakiah, 2017, *Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (Centella asiatica) Terhadap Ekspresi Extracellular Signal Regulated Kinase 1/2 dan Protein Ki-67 pada Larva Zebrafish (Danio rerio) Model Stunting dengan Induksi Rotenon*, Tesis, Universitas Brawijaya.

