

**EKSTRAK ETHANOL PEGAGAN (*Centella asiatica*) MENINGKATKAN OSIFIKASI TULANG DAN PANJANG BADAN LARVA ZEBRAFISH (*Danio rerio*) MODEL STUNTING USIA 9 HARI PASCA FERTILISASI (*Ethanol extract of Centella asiatica increase bone ossification and increase the body length and in zebrafish (Danio rerio) larvae Stunting Model at 9 day post fertilization*)**

Evi Zahara<sup>1\*</sup>, Een Nuraenah<sup>2</sup>, Tri Yuliyani<sup>3</sup>, Darwitri<sup>4</sup>, Husnul Khotimah<sup>5</sup>, Umi Kalsum<sup>5</sup>, I Wayan Arsana Wiyasa<sup>5</sup>, Nurlaili Ramli<sup>6</sup>, Agus Hendra Al-Rahmad<sup>7</sup>, Mohammad Muljohadi Ali<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Program Studi D-III Kebidanan Meulaboh, politeknik Kesehatan Kemenkes, Aceh, Indonesia. Email:

[zaharaevi@yahoo.com](mailto:zaharaevi@yahoo.com)

<sup>2</sup>Program Studi D-III Kebidanan politeknik Kesehatan Kemenkes, Jakarta III, Indonesia, [enadha.nuraenah@gmail.com](mailto:enadha.nuraenah@gmail.com).

<sup>3</sup>Dinas Kesehatan Banjar, Kalimantan Selatan, Indonesia, Email: [yuliyani1907@gmail.com](mailto:yuliyani1907@gmail.com)

<sup>4</sup>Program Studi D-III Kebidana politeknik Kesehatan Kemenkes, Tanjungpinang, Indonesia, [dwitri84@gmail.com](mailto:dwitri84@gmail.com)

<sup>5</sup>Department Farmakologi, Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia. Email:

[husnul\\_farmako.fk@ub.ac.id](mailto:husnul_farmako.fk@ub.ac.id)

<sup>5</sup>Departement of Obstetric and Gynecology, Saiful Anwar Hospital, Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia. Email ; [arsanawaiyasa@gmail.com](mailto:arsanawaiyasa@gmail.com).

<sup>6</sup>Program Studi D-IV Kebidanan politeknik Kesehatan Kemenkes, Aceh, Indonesia. Email:

[nurlaili.ramli@poltekkesaceh.ac.id](mailto:nurlaili.ramli@poltekkesaceh.ac.id)

<sup>7</sup>Jurusan Gizi Politeknik Kesehatan Kemenkes, Aceh, Indonesia. Email: [4605.ah@gmail.com](mailto:4605.ah@gmail.com)

Received: 29/6/2018

Accepted: 31/10/2018

Published online: 29/11/2018

#### ABSTRAK

*Centella asiatica* (Linn) Urban dikenal dengan nama pegagan. *Centella Asiatica* (CA) kaya akan mikro maupun makro nutrisi yang diperlukan bagi tubuh terutama masa pertumbuhan. Penelitian ini bertujuan mengetahui efek ekstrak etanol CA terhadap osifikasi tulang dan panjang badan larva zebrafish model stunting yang diinduksi rotenone pada 9 hari post fertilisasi. Penelitian ini menggunakan zebrafish mulai 2 hpf (hour post fertilisation) - 9 dpf (day post fertilisation), populasi larva sejumlah 300 yang dibagi 5 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol, kelompok rotenon (dipapar rotenone 12,5 ppb) dan 3 kelompok rotenone+CA yang diberikan pegagan selama 4, 5 dan 6 hari secara berurutan. Ekstrak CA diperoleh melalui metode maserasi dengan pelarut etanol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rotenone dapat menghambat pertumbuhan panjang larva >2SD dan menurunkan osifikasi tulang pada kelompok rotenon secara signifikan dibanding kontrol. Pemberian ekstrak CA dapat meningkatkan ekspresi tulang rawan kelompok rotenone+CA5 maupun rotenone+CA6 dan meningkatkan ekspresi tulang keras kelompok rotenone+CA5 serta meningkatkan panjang badan kelompok rotenone\_CA secara signifikan dibanding kelompok rotenone. Dapat disimpulkan bahwa lamanya pemberian ekstrak CA dapat meningkatkan osifikasi tulang dan meningkatkan panjang badan mencapai 99.6% pada 9 dpf

**Kata kunci:** Zebrafish, *Centella asiatica*, osifikasi tulang, panjang badan.

#### ABSTRACT

*Centella asiatica* (Linn) Urban is known as Gotu Kola. *Centella asiatica* (CA) is rich of micro and macro nutrients. The aim of this study was to investigate the effect of ethanol extract of CA on bone ossification and body length in zebrafish larva stunting model at 9 dpf. This study used zebrafish at 2 hpf (hour post-fertilization) - 9 dpf (day post fertilization). The population of 300 larvae divided into 5 groups consisting of control group, rotenone group (exposed by 12.5 ppb of rotenone) and 3 rotenone+CA groups that exposed to CA extract for 4, 5 and 6 days, respectively. The CA extract was obtained by maceration method with ethanol solvent. The results showed that rotenone 12.5 ppb able to inhibit the growth of larvae >2SD of body length and decrease bone ossification in rotenone group, were significantly different from the control group. Administration of CA extract was increase expression of cartilage at rotenone+CA5 as well rotenone+CA6 group and increase expression of bone at rotenone+CA5 group and also increase body length rotenone+CA groups significantly different from rotenone group. It can be concluded that the period of CA extract exposed can correct the length of the body reaching 99.6% at 9 dpf and increased bone ossification in time dependent manner.

**Keywords:** Zebrafish, *Centella asiatica*, bone ossification, body length.

\* Penulis untuk korespondensi: [zaharaevi@yahoo.com](mailto:zaharaevi@yahoo.com)

## PENDAHULUAN

Stunting merupakan suatu keadaan dimana panjang atau tinggi badan melebihi  $-2$  SD dari rata-rata anak pada usia dan jenis kelamin yang sama.<sup>1</sup> Stunting diidentifikasi sebagai prioritas utama kesehatan global karena kejadian stunting yang tinggi.<sup>2</sup> Tingginya prevalensi anak stunting (37.2%) membuat Indonesia masuk dalam lima besar di dunia.<sup>3</sup> Kematian anak secara global mencapai 14-17% akibat stunting.<sup>4</sup> Dampak stunting jangka panjang meliputi keterbatasan kognitif dan performa pendidikan<sup>5</sup> produktifitas ekonomi dewasa yang lebih rendah dan resiko mewarisi stunting pada generasi selanjutnya.<sup>6</sup> Proses stunting sudah dimulai sejak masa pranatal dan diketahui pada usia 2 tahun.<sup>7</sup> Stunting bisa disebabkan karena toksikan, inflamasi, malnutrisi, infeksi berkelanjutan dan faktor lingkungan.<sup>8</sup>

Pertumbuhan panjang badan erat kaitannya dengan osifikasi tulang yang sedang berlangsung. Osifikasi merupakan merupakan proses pembentukan tulang. Dimana sel masenkim dan kartilago diubah menjadi tulang selama perkembangan. Pertumbuhan tulang rawan dibutuhkan untuk penambahan panjang tulang panjang, selanjutnya tulang rawan ini akan digantikan oleh sel- sel tulang pembentuk tulang (*osteoblast*).<sup>9</sup> Osteoblast selanjutnya menjadi osteosit (sel tulang matang pembentuk tulang) yang tertanam kuat pada matriks tulang.<sup>10</sup>

Penggunaan pestisida sebagai salah satu faktor lingkungan dapat memicu terjadinya stunting. Rotenone merupakan salah satu pestisida dengan konsentrasi 12,5 ppb mampu menginduksi stunting.<sup>11</sup> Rotenon bekerja menghambat kompleks I mitokondria dan menghambat proses sintesis ATP sehingga jumlah ATP menurun dan memicu peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat menyebabkan kematian sel dan bahaya oksidatif lainnya.<sup>12</sup> Stres oksidatif dapat meningkatkan osteoklastogenesis oleh RANKL yang selanjutnya menghambat diferensiasi osteoblast yang berdampak pada hambatan pertumbuhan tulang.<sup>13</sup>

*Centella asiatica* (CA) merupakan tumbuhan yang kaya akan nutrisi. Zat gizi makro yang terkandung dalam CA berupa karbohidrat

sebesar 6.7%, protein 2 % dan lemak 0.2%.<sup>14</sup> Adapun kandungan zat gizi mikro dari 100 g CA adalah Na 107.8mg, K 345 mg, Ca 174 mg Mg 87 mg, P 17 mg dan Fe 14.86 mg.<sup>14</sup> *Centella asiatica* juga kaya akan *fitonutrient* berupa vitamin A sebanyak 0.44 mg, B1 0.09 mg, B2 0.19 mg, B3 0.1 mg dan vitamin C 48.5 mg.<sup>15</sup> Selain nutrisi CA juga memiliki kandungan bahan aktif penting berupa saponin dan triterpenoid yang meliputi: *asiaticosida*, *makedasosida*, *asiatic acid* dan *cetelloside* yang dapat berperan sebagai anti oksidan.<sup>16</sup> Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa dengan pemberian ekstrak CA konsentrasi 5  $\mu\text{g/mL}$  *pre-hatching* paling optimal meningkatkan panjang badan larva *zebrafish* dibanding konsentrasi 1,25 $\mu\text{g/mL}$  maupun 2,5  $\mu\text{g/mL}$  melalui peningkatan ekspresi IGF-1 dan IRS,<sup>19</sup> peningkatan osifikasi tulang dan penurunan ekspresi RANKL.<sup>11</sup>

Berdasarkan uraian diatas maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek ekstrak etanol *Centella asiatica pre* sampai *post hatching* terhadap osifikasi tulang dan panjang badan larva *zebrafish* stunting usia 9 dpf yang diinduksi rotenon.

## METODE

Penelitian ini adalah *true experimental laboratoric* menggunakan desain *post test only control group*.

### 1. Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan embrio *zebrafish* (*Danio rerio*) usia 2 hpf yang selanjutnya diikuti perkembangannya sampai usia 9 dpf yang diperoleh dari hasil fertilisasi *zebrafish* dewasa *wild type*. *Zebrafish* dewasa diperoleh dari laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB) Malang yang telah diuji dan tersertifikasi di laboratorium Hidrologi Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya.<sup>18</sup>

### 2. Persiapan ekstrak etanol *Centella asiatica*

Simplicia *Centella asiatica* tersertifikasi oleh UPT Materia Medica Batu, Malang, Jawa Timur, Indonesia. Salah satu zat aktif yang

terkandung dalam CA adalah *Asiaticoside* 0,29%. Pengukuran *Asiaticoside* menggunakan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) (Thermo Scientific, Accela). Bagian CA yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanpa stolon dan akar.<sup>18</sup> Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi 100 gram *simplicia* CA diperoleh ekstrak CA sebanyak 10.99 gram. Ekstrak CA dilarutkan dengan embrionik medium. Larutan ekstrak etanol CA yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 µg / mL.

### 3. Pembuatan larutan rotenone

Rotenon yang digunakan berasal dari sigma (R8875) kemurniannya  $\geq 95\%$ . Serbuk rotenon dilarutkan dalam DMSO sebagai stok dengan konsentrasi  $2 \times 10^7$  µg/L, selanjutnya diencerkan sampai mencapai 12,5 ppb dengan embrionic medium.<sup>18</sup>

### 4. Embrionic Medium

Larutan stok embrionik medium disiapkan dalam 200 ml terkandung 0,08 g CaCl<sub>2</sub>, KCl 0,06 g, NaCl 2 g, MgSO<sub>4</sub> 0,815 g (modifikasi penelitian terdahulu).<sup>19</sup>

### 5. Perlakuan Penelitian

Dalam penelitian ini, larva *zebrafish* dari 2 hpf dibagi menjadi 5 kelompok dengan masing-masing kelompok berisi 60 embrio yang ditempatkan di well plate, sehingga total sampel adalah 300 embrio.

Larva *zebrafish* di bagi dalam 5 kelompok yaitu:

- Kontrol (K) larva yang tidak diberikan paparan rotenon dan *Centella asiatica*.
- Rotenon (R) yang hanya diberikan paparan rotenone konsentrasi 12,5 ppb usia 2 – 72 hpf.
- Rotenon+CA4 adalah sampel yang diberikan paparan rotenone 12,5 ppb usia 2 – 72 hpf dan ditambah pemberian larutan ekstrak etanol *Centella asiatica* dosis 5µg/ml usia 2 hpf – 4 dpf.
- Rotenon+CA5 adalah sampel yang diberikan paparan rotenone pada usia 2 hpf – 72 hpf dan ditambah pemberian larutan ekstrak *Centella* dosis 5µg/ml pada usia 2 hpf – 5 dpf.
- Rotenon+CA6 adalah sampel yang diberikan paparan rotenone pada usia 2 hpf – 72 hpf dan

ditambah pemberian larutan ekstrak etanol *Centella* dosis 5µg/ml usia 2 hpf – 6 dpf.

### 6. Pengukuran Panjang Badan

Pengukuran panjang badan dilakukan setiap 24 jam pada usia 3 sampai 9 dpf, dengan cara menempatkan larva *zebrafish* pada objek glass dengan air minimal, posisi larva diatur sedemikian rupa dan diamati dengan mikroskop stereo (Olympus SZ61) selanjutnya difoto menggunakan *software* optilab versi 2.2.1 dan mengukur *Standar Leght* (SL) menggunakan skala pada *software* image Raster ver.3 yang sudah dikalibrasi sebelumnya. Pengukuran panjang badan larva mulai dari ujung hidung (*tip of the snout*) sampai pangkal sirip ekor (*caudal fin*) atau *snout-fin*.<sup>20</sup> Pengukuran rasio panjang kepala dan panjang badan larva *zebrafish* yaitu, dari *snout-operkulum* dan dibandingkan dengan hasil pengukuran keseluruhan panjang larva (ujung hidung ke pangkal sirip ekor) pengukuran menggunakan satuan mm (milimeter).<sup>19</sup>

### 7. Pengukuran Osifikasi Tulang

Pengukuran tulang larva *zebrafish* dilakukan pada usia 9 dpf dengan metode *whole-mount immunohistochemistry*. Larva yang telah di-euthanasia ditempatkan dalam PFA 4% selama 2 jam.<sup>21</sup> Jumlah sampel untuk pewarnaan ini adalah 5 *zebrafish* untuk masing-masing kelompok.

#### a. Tulang Rawan

Pewarnaan tulang rawan menggunakan larutan *Alcian blue* (ANC030 dari ScyTek Laboratories). Prosedur pewarnaan *Alcian Blue* mengikuti protokol kerja ScyTek Laboratories. Larva diinkubasi dalam larutan Asam Asetat selama 3 menit dan dalam larutan *Alcian Blue* (pH 2,5) selama 30 menit pada suhu kamar atau 15 menit pada 37° C. Larva dibilas selama 2 menit dengan aquadest sebanyak 2 kali. Dehidrasi dengan alkohol tergradasi kemudian ditempatkan ke 87% gliserol dan dilakukan pengambilan gambar.

#### b. Tulang Keras

Pewarnaan tulang keras menggunakan *Alizarin red* (Art 6279 Alizarinrot S) 1 mg/ml. Protokol pewarnaan *Alizarin red* adalah larva

*zebrafish* tetap dalam alkohol 96% selama 12 jam, direndam larva dalam aquadest selama 1 malam, kemudian dalam 1% KOH dengan 3% hidrogen peroksida (5 ml 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100 ml 1% KOH) untuk 15 menit. Larva dicuci selama 10 menit dalam air suling, kemudian direndam dalam larutan *Alizarin red* 1 mg / ml (0,005%) selama 3 hari, dan dibilas 5x dengan aquadest dan kemudian ditempatkan ke 87% gliserol selanjutnya dapat diamati kepadatan warna tulang.

Hasil pewarnaan *Alcian Blue* dan *Alizarin Red* diamati di bawah mikroskop stereo (Olympus SZ61). Pengambilan gambar menggunakan DSLR Panasonic DMC-G6 Lumix pembesaran 40x. Pengukuran kepadatan warna (Integrated Density) menggunakan perangkat lunak Image J v1.50.

## 8. Ethical clearance

Prosedur dalam penelitian ini telah memenuhi standar protokol Komite Etika Kedokteran Universitas Brawijaya Malang Indonesia nomor 403 / EC / KEPK / 12/2017.

## 9. Analisis statistik

Analisis statistik menggunakan software SPSS V.23. Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok digunakan uji One Way ANOVA. Data disajikan dalam mean  $\pm$  standar deviasi dan dianggap signifikan jika  $p < 0,05$ .

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Efek Ekstrak *Centella asiatica* terhadap Osifikasi Tulang

Hasil menunjukkan bahwa kelompok rotenon mengalami penurunan ekspresi tulang rawan dan tulang keras secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diukur pada usia 9 dpf seperti ditunjukkan pada tabel 1 dan gambar 1.

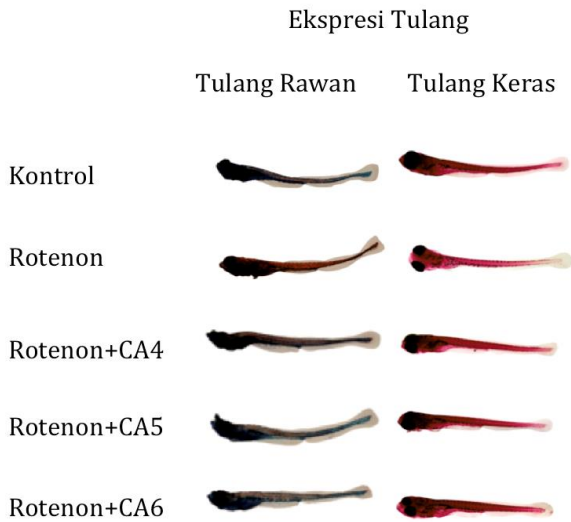
Hasil penelitian ini juga didukung oleh penelitian sebelumnya dimana rotenon 12,5 ppb telah terbukti menyebabkan stunting dengan menurunkan IGF-1,<sup>17</sup> penurunan osifikasi tulang.<sup>11</sup> Rotenon dapat menghambat kompleks I mitokondria dan menghambat NADH-ubiquinone reduktase. Proses ini menyebabkan

peningkatan ROS berlebih<sup>22</sup> mengganggu sintesa ATP tulang rawan,<sup>23</sup> menyebabkan peningkatan apoptosis.<sup>24,25</sup> ROS yang berlebihan di dalam tubuh menyebabkan ketidakseimbangan antar pro-oksidan dan antioksidan dengan skala yang mengarah ke kelebihan pro-oksidan sebagai ciri terjadinya stres oksidatif.<sup>26</sup> Beberapa penelitian lainnya melaporkan dampak stres oksidatif pada diferensiasi osteoklas serta pada fungsinya yang menghasilkan peningkatan resorpsi tulang.<sup>27</sup> Penelitian in vitro dan hewan telah menunjukkan bahwa stres oksidatif mengurangi tingkat pembentukan tulang dengan mengurangi diferensiasi dan kelangsungan hidup osteoblas.<sup>28</sup> *Apoptosis bone lining cells* yang tinggi berpengaruh terhadap proses pembentukan tulang baru.<sup>24</sup> Peningkatan status oksidatif menyebabkan up-regulasi RANKL dan down-regulasi osteoprotegerin (OPG) melalui aktivasi protein kinase (ERK1 /2, JNK dll) dan atau faktor lain yang mempengaruhi faktor transkripsi spesifik.<sup>29</sup> RANKL mengaktifkan diferensiasi dan aktifitas osteoclast yang berinteraksi dengan reseptor spesifik di *pre-osteoclast* dan memediasi osteoclastogenesis serta resorpsi tulang. Sedangkan OPG diproduksi oleh jalur pensinyalan WNT/  $\beta$ catenin merupakan soluble reseptor yang mampu mengikat dan memblokir RANKL yang dapat menghambat aktivitas *osteoclast*.<sup>30</sup>

Pemberian ekstrak etanol CA 5 $\mu$ g/mL pada kelompok rotenon+CA5 dan rotenon+CA6 meningkatkan ekspresi tulang rawan dan tulang keras secara signifikan pada larva *zebrafish* usia 9 dpf dibanding kelompok rotenon seperti yang ditunjukkan pada tabel 2. Dari pewarnaan tulang rawan dan tulang keras larva *zebrafish* 9 dpf menunjukkan ekspresi tulang rawan dan tulang keras lebih kuat pada kelompok rotenon+CA5 dan rotenon+CA6 dibanding kelompok rotenon seperti pada gambar 2.

*Centella asiatica* dengan kandungan bahan aktif *Asiaticoside* berperan sebagai anti oksidan. Anti oksidan dapat menangkal oksidan, berkontribusi mengaktifkan diferensiasi osteoblas, proses mineralisasi dan pengurangan aktifitas osteoklas.<sup>31</sup> Bukti epidemiologis mengindikasikan adanya hubungan asupan diet antioksidan dengan kesehatan tulang.<sup>31</sup> CA juga kaya zat mineral seperti Zn, Ca, P, K, Na, Fe, Cu,

Cr dan Mg.<sup>25</sup> Studi lainnya menyebutkan bahwa diet tinggi calcium memainkan peran dalam pembentukan tulang dengan merangsang proliferasi dan diferensiasi osteoblast.<sup>32</sup> Mg dapat meningkatkan proliferasi dan rediferensiasi *chondrocyte* dan diferensiasi osteogenik osteoblas.<sup>33</sup> Dengan demikian CA yang mengandung bahan aktif dan nutrisi yang tinggi dapat menjadi alternatif pilihan herba yang dimanfaatkan untuk mencegah stunting.



**Gambar 1. Representatif whole-mount staining tulang rawan dan tulang keras larva *Zebrafish* usia 9 dpf**

**Tabel 1. Efek lama pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* terhadap osifikasi tulang**

Kelompok	Ekspresi Tulang	
	Ekspresi Tulang Rawan Mean ± SD (x10 <sup>7</sup> )	Ekspresi Tulang Keras Mean ± SD (x10 <sup>7</sup> )
Kontrol	51,1 ± 0,29 <sup>b</sup>	3,35 ± 0,38 <sup>b</sup>
Rotenon	45,9 ± 0,56 <sup>a</sup>	2,80 ± 0,53 <sup>a</sup>
Rotenon+CA4	46,3 ± 0,27 <sup>a</sup>	3,17 ± 0,28 <sup>ab</sup>
Rotenon+CA5	51,7 ± 0,55 <sup>b</sup>	3,43 ± 0,50 <sup>b</sup>
Rotenon+CA5	50,4 ± 0,54 <sup>b</sup>	3 ± 0,44 <sup>ab</sup>

## 2. Efek Ekstrak *Centella asiatica* terhadap Panjang Badan

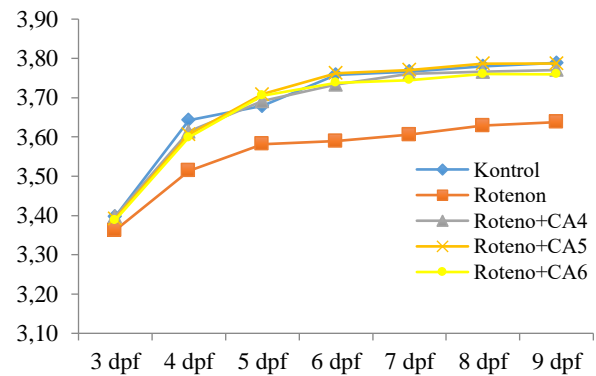
Rerata panjang badan larva *zebrafish* usia 3 dpf menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antar kelompok ( $p < 0,05$ ) dan

perbedaan panjang badan antar kelompok tidak mencapai 2 SD. Sedangkan pada 6 dpf menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok ( $p < 0,05$ ) seperti yang ditunjukkan pada tabel 1. Rerata panjang badan kelompok rotenon usia 6 dpf  $< -2$  SD (0,17) dibandingkan dengan kontrol (SD=0,08).

**Tabel 1. Rerata Panjang Badan Larva *Zebrafish***

Kelompok	3 dpf	6 dpf	9 dpf
Kontrol	3,4 ± 0,08	3,76 ± 0,07 <sup>b</sup>	3,79 ± 0,08 <sup>b</sup>
Rotenon	3,36 ± 0,08	3,59 ± 0,09 <sup>a</sup>	3,64 ± 0,07 <sup>a</sup>
Rotenon+CA4	3,4 ± 0,06	3,73 ± 0,06 <sup>b</sup>	3,77 ± 0,09 <sup>b</sup>
Rotenon+CA5	3,39 ± 0,07	3,76 ± 0,07 <sup>b</sup>	3,79 ± 0,06 <sup>b</sup>
Rotenon+CA6	3,39 ± 0,06	3,74 ± 0,08 <sup>b</sup>	3,76 ± 0,08 <sup>b</sup>

Paparan rotenon konsentrasi 12,5 ppb dan CA 5µg/ml. CA4 paparan CA selama 4 hari, CA 5 selama 5 hari dan CA6 selama 6 hari. Notasi yang berbeda (<sup>a</sup> dan <sup>b</sup>) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok ( $\alpha = 0,05$ ).



**Gambar 1. Grafik pertumbuhan panjang tubuh larva *zebrafish***

Kriteria stunting pada anak dapat ditentukan apa bila z-score  $< -2$  SD pada kelompok umur dan jenis kelamin yang sama. Standar antropometri anak di Indonesia didasarkan pada indeks panjang badan menurut umur.<sup>34</sup> Pada penelitian ini analogi usia *zebrafish* mengacu pada penelitian Soribes, (2013) dimana 3 dpf pada *zebrafish* setara dengan bayi baru lahir, 6 dpf setara dengan usia 2 tahun dan 9 dpf *zebrafish* setara dengan usia 8 tahun pada manusia.<sup>35</sup> Berdasarkan hal tersebut maka kelompok rotenon memenuhi kriteria stunting.

Rotenone memiliki berat molekul kurang 394.43 g/Mol sehingga dapat dengan mudah menembus chorion dan menimbulkan efek bagi embrio.<sup>36,37</sup> Rotenone bersifat toksik bagi embrio dengan mekanisme kerja mengganggu transportasi elektron mitokondria yang menghambat pemanfaatan oksigen dalam tubuh pada akhirnya menyebabkan kematian sel,<sup>38</sup> mempengaruhi perkembangan embrio dan penundaan umum yang ditandai dengan kurangnya datasekmen ekor selain pembentukan somit tertunda.<sup>39</sup>

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa lamanya pemberian ekstrak CA sejak masa *pre hatching* (embrio) sampai dengan *post hatching* yang identik dengan post natal secara signifikan meningkatkan panjang badan di semua kelompok perlakuan ( $p < 0,05$ ). Kelompok P2 (paparan CA sampai hari ke 5) menunjukkan panjang tubuh paling optimal dibandingkan dengan P1 (paparan CA sampai hari ke 4) dan P3 (paparan CA sampai hari ke 6) yang dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 1. Pemberian ekstrak CA dapat meningkatkan pertumbuhan panjang badan larva sebesar 99.6% yang di ukur pada usia 9 dpf.

Sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa pemberian ekstrak CA konsentrasi 5 $\mu$ g/mL pada masa *pre-hatching* (3 dpf) mampu mengkoreksi panjang badan larva *zebrafish* model stunting yang diinduksi rotenon sebesar 97,1% melalui peningkatan IGF-1 dan peningkatan IRS,<sup>17</sup> peningkatan ekspresi VEGF dan VEGFR-2.<sup>40</sup> Dengan demikian pemberian *Centella asiatica* pada *pre-hatching* sampai dengan *post-hatching* pada *zebrafish* dapat meningkatkan koreksi panjang badan larva *zebrafish* lebih besar 2.5% dibanding hanya diberikan *pre-hatching* saja.

*Centella asiatica* kaya akan mikro nutrisi seperti vitamin B1, B2 dan B3 dan vitamin C<sup>41</sup> serta nutrisi makro seperti karbohidrat dan asam amino.<sup>14</sup> Konsumsi makro dan mikro nutrient secara adekuat dapat mendukung proses pertumbuhan tubuh, namun jika nutrisi yang di perlukan tidak terpenuhi maka dapat menimbulkan gangguan pertumbuhan maupun gangguan metabolisme tubuh lainnya.<sup>42</sup> Selain itu CA juga mengandung bahan aktif *Asiaticoside* yang dapat berperan sebagai anti oksidan sehingga mampu menetralkan efek ROS

berlebih di dalam tubuh.<sup>43</sup> Peningkatan ROS memicu terjadinya stres oksidatif dan jika berlangsung dalam jangka waktu lama dapat menyebabkan downregulation signal sehingga menurunkan respon insulin selanjutnya mengganggu proses diferensiasi, proliferasi dan jalur siklus sel. Hal ini berdampak terhadap hambatan pertumbuhan pada otot rangka dan tulang.<sup>44</sup>

## KESIMPULAN

Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* pada *pre* sampai dengan *post hatching* dapat meningkatkan osifikasi tulang sehingga dapat mencegah stunting pada *zebrafish* sejak *pre* sampai dengan *post hatching*.

## KEPUSTAKAAN

1. de Onis M., Dewey K. G., Borghi E., Onyango A. W., Blossner M., Daelmans B. et al. The World Health Organization's Global target for reducing childhood stunting by 2015: rational and proposed action. *Maternal & Child Nutrition* 2013; 9 (2): 6-26.
2. UNICEF. Tracking Progress on Child and Maternal Nutrition: A survival and development priority. UNICEF. 2009; Available from: [http://www.unicef.org/publications/index\\_51656.html](http://www.unicef.org/publications/index_51656.html).
3. Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan RI. 2013. *Riskesdas 2013*. Jakarta; 209
4. Black RE, Victora CG, Walker SP, Bhutta ZA, Christian P, de Onis M, Ezzati M, Grantham-McGregor S, Katz J, Martorell R, et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet*. 2013; 382:427-51.
5. Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet*.

- 2002;359(9306):564–71.
6. Victora CG., Adair L, Fall C, Hallal PC, Martorell R, *et al.* Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet*. 2008; 371:340–357.
  7. MCA Indonesia. 2013. *Stunting dan Masa Depan Indonesia*. pp.2-5
  8. Bourke CD, Berkley JA & Prendergast AJ. Immune Dysfunction as a Cause and Consequence of Malnutrition. *Trends in Immunology*, 2016; 37(6), 386–398.
  9. Tsang KY, Chan D and Cheah KSE. Fate of growth plate hypertrophic chondrocytes: Death or lineage extension? *Develop Growth Differ*. 2015; 57(2): 179-192.
  10. Helmi, Z. *Buku Ajar Gangguan Muskuloskeletal. Anatomi dan Fisiologi Tulang*. Cetakan kedua. Jakarta.: Salemba Medika; 2013.
  11. Primihastuti D, Ali MM & Kalsum U. Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ossifikasi Tulang dan Osteoklastogenesis pada Model Stunting Larva Zebrafish Model Stunting. Tidak diterbitkan. Universitas Brawijaya. Malang. 2017.
  12. Wauquier, F., Leotoing, L., Coxam, V., Guicheux, J., Wittrant, T. 2009. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med*. 15(1):468-77 .
  13. Shen CL, Cao JJ, Dagda RY, Tenner T E.Jr, Chyu MC, & Yeh JK. Supplementation with green tea polyphenols improves bone microstructure and quality in aged, orchidectomized rats. *Calcified Tissue International*. 2011; 88(6), 455-463.
  14. Joshi K & Chaturvedi P. Green Leafy Vegetable: An Overview, 2013; 4 (1), 135-149.
  15. Hashim P. *Cetella asiatica* in food and beverage application and its potential antioxidant and neuroprotective effect. *International Food Research Journal*. 2011; 18(4):pp. 1215-1222.
  16. Randriamampionona D, Diallo B, Rakotoniriana F, Rabemanantsoa C, Cheuk K, Corbisier AM, *et al.* Comparative analysis of active constituents in *Centella asiatica* samples from Madagascar: Application for ex situ conservation and clonal propagation. *Fitoterapia*. 2007.78(7): 482-489.
  17. Cory'ah, F.A., Khotimah, H., Nurdiana. 2017. *Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (Centella Asiatica) terhadap Panjang Badan Ekspresi Insulin Like Growth Faktor 1 (IGF-1) dan Insulin Reseptor Substrat (IRS) pada Larva Zebrafish (Danio Rario) Model Stunting Dengan Indksi Rotenon*. Tidak diterbitkan, Universitas Brawijaya. Malang. 2017.
  18. Khotimah H, Sumitro SB, & Widodo MA. Zebrafish Parkinson's Model: Rotenone decrease motility , Apoptosis of Zebrafish Brain. *International Journal of PharmTech Research*. 2015b; 8(4), 614–621.
  19. Avdesh A, Chen M, Marin-lverson MT, Mondal A, Ong D, Rainey-Smith S, Martins RN. Regular care and maintenance of zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *Jornal of Visualized Experiments*. 2012; 18(69):e4196.
  20. [Spence R, Gerlach G, Lawrence C & Smith C. The Behaviour and Ecology of The Zebrafish Danio Rerio. Biological Reviews. 2008; 13-34.](#)
  21. Shi-ying L, Jing-Feng C, Zhi-guo Z, Xio-hua LV, Ya-jun Y, Jing-jing Z. Salvianolic acid B stimulates osteogenesis in dexamethasone-treated zebrafish larvae. *Acta Pharmacological Sinica*. 2016; 37: 1370-1380
  22. Saravanan KS, Sindhu KM, Senthikumar KS, Mohanakumar KP. L-De-phenyl protects against rotenone-induced, oxidative stress-mediated dopaminergic neurodegeneration in rats. *Neurochem Int*. 2006; 49: 28–40.
  23. Martin JA, Martin A, Molinari A, Morgan W, Ramalingam W, Buckwalter JA and McKinley TO. Mitochondria electron transport and couplet in articular cartilage. Osteoarthritis and cartilage / OARS, *Osteoarthritis Research Society*. 2013; 20(4): 323-329.
  24. Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D. Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J Bone Miner Res*. 2001; 16:975–984.

25. Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM, Nagao K, Trackman PC, Graves DT. Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem.* 2005; 280:12087–12095.
26. Juranek I and Bezek S. Controversy of free radical hypothesis: Reactive oxygen species-cause or consequence of tissue injury? *General Physiology and Biophysics.* (2005; 24(3): 263-278.
27. Lean JM, Davies JT, Fuller K, Jagger CJ, Kirstein B, Partington GA *et al.* A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *J Clin Invest.* 2003; 112(6), 915-923.
28. Baek KH, Oh KW, Lee WY, Lee SS, Kim, MK, Kwon HS *et al.* Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures. *Calcified Tissue International.* 2010; 87(3), 226-235.
29. Fontani F, Marcucci G, Iantomasi T, Brandi ML, Vincenzini MT. Glutathione, N-acetylcysteine and lipoic acid down-regulate starvation-induced apoptosis, RANKL/OPG ratio and sclerostin in osteocytes: involvement of JNK and ERK1/2 signalling. *Calcif Tissue Int.* 2015; 96:335–346
30. Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int.* 2014;94:25–34.
31. Domazetovic V, Marcucci G, Iantomasi T, Brandi ML and Vincenzini MT. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. *Clinica Case In Mineral Bone Metabolism.* 2017; 14(2):209-216.
32. Winarto, W.R. dan M. Surbakti. *Khasiat dan Manfaat Pegagan.* Agromedia Pustaka, Jakarta. 2003.
33. Dou Y, Mujeeb A, Zheng Y, Ge Z. Optimization of dual effects of Mg-1Ca alloys on the of chondrocytes and osteoblasts in vitro. *Progres in Natural Science Material International.* 24: 433-440.
34. Kementrian Kesehatan RI. 2016. *Info. Situasi Balita Pendek.* 2442–7659.
35. Sorribes A. The Otogeny of sleep-wake cycles in zebrafish: a comparison to humans. *Frontiers in neural Circuits.* 2013. 178
36. Crofton KM. Thyroid Disrupting Chemicals: Mechanisms and Mixtures. *International Journal of Andrology.* 2008; 31(2): 209-223.
37. Zubairi SI, Sarmidi MR, Aziz RA. A Study of Rotenone from Derris Roots of Various Location, Plant Parts and Types of Solvent Used. *Advances in Environmental Biology.* 2014; 8(2): 445-449
38. Ott KC. Rotenone. A brief review of its chemistry, environmental fate and the toxicity of rotenone formulation. 2006.
39. Melo KM, Oliveira R, Grisolia CK, Domingues I, Pieczarka JC, Filho JdS, Nagamachi CY. Short-term exposure to low dose of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological change in fish. *Environmental Science and Pollution Research.* 2015; 22(18): pp 13926-13938.
40. Wardani, DW. *Pengaruh Ekstrak Etanol Pegagan (Centella asiatica) Terhadap Ekspresi Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 pada Model Stunting Larva Zebrafish Model Stunting.* [Tesis]. Universitas Brawijaya. Malang. 2017.
41. Sutardi, S. Kandungan Bahan Aktif Tanaman Pegagan dan Khasiatnya untuk Meningkatkan Sistem Imun Tubuh. *Jurnal Penelitian Dan Pengembangan Pertanian.* 2017; 35(3), 121.
42. Prentice A, Schoenmakers I, Laskey MA, de Bone S, Ginty F & Goldberg GR. Symposium on ‘Nutrition and health in children and adolescents’ session 1: Nutrition in growth and development nutrition and bone growth development. *Proceedings of the Nutrition Society.* 2006; 64(4): pp. 340-360
- Bender DA. *Free Radicals an Antioxidant Nutrients.* In: Murray K, Bender DA, Botham KM, et al. Eds. Harper’s Illustrated Biochemistry, Ed 28<sup>th</sup> Mc Graw Hill Lange 2009;482-86.