**EKSTRAK ETHANOL *Centella asiatica* MENINGKATKAN PERTUMBUHAN PANJANG BADAN, OSIFIKASI TULANG DAN HOMEOSTASIS SITOKIN INFLAMASI PADA LARVA ZEBRAFISH (*Danio rerio*) MODEL STUNTING USIA 9 *DAY POST FERTILIZATION***

***(Ethanolic extract of Centella asiatica* *increased body length, bone ossification and homeostasis infammatory cytokines in zebrafish (Danio rario) larvae Stunting Model at 9 day post fertilization)***

Husnul Khotimah1, Evi Zahara2,3, Een Nuraenah2,4, Tri Yuliyani2,5, Darwitri2,6, I Wayan Arsana Wiyasa7, Nurlaili Ramli8, Umi Kalsum1dan Mohammad Muljohadi Ali1

*1Department Farmakologi, Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia. Email ; husnul\_farmako.fk@ub.ac.id.*

*2Program Studi Magister Kebidanan. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia.*

*3Program Studi D-III Kebidanan politeknik Kesehatan Kemenkes, Aceh, Indonesia.* [*zaharaevi@yahoo.com*](mailto:zaharaevi@yahoo.com)

*4 Program Studi D-III Kebidanan politeknik Kesehatan Kemenkes, Jakarta III,. Indonesia, ,* [*enadha.nuraenah@gmail.com*](mailto:enadha.nuraenah@gmail.com)*.*

*5Dinas Kesehatan Banjar, Kalimantan Selatan, Indonesia,* [*yuliyani1907@gmail.com*](mailto:yuliyani1907@gmail.com)*.*

*6 Program Studi D-III Kebidana politeknik Kesehatan Kemenkes, Tanjungpinang, Indonesia, dwitri84@gmail.com*

*7Departement of Obstetric and Gynecology, Saiful Anwar Hospital, Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia. Email ;* [*arsanawaiyasa@gmail.com*](mailto:arsanawaiyasa@gmail.com)*.*

*8Program Studi D-IV Kebidanan politeknik Kesehatan Kemenkes, Aceh, Indonesia. Email: nurlaili.ramli@poltekkesaceh.ac.id*

**ABSTRAK**

*Centella asiatica (Linn) Urban dikenal dengan nama pegagan Centella Asiatica memiliki kandungan Madecassoside dan Asiaticoside yang tinggi dan keduanya dapat berperan sebagai anti inflamasi. Penelitian ini bertujuan mengetahui efek ekstrak etanol Centella asiatica (CA) terhadap panjang badan, ossifikasi tulang dan homeostatis sitokin inflamasi pada model stunting larva zebrafish yang diinduksi rotenone. 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 negatif, kelompok kontrol positif (dipapar rotenone 12,5 ppb) dan 3 kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3) 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. Pemberian ekstrak CA mampu mengoreksi panjang larva mencapai 99,6% pada 9 dpf dan secara statistic ada perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan dengan kelompok K+ hal ini juga didukung oleh peningkatan osifikasi tulang baik tulang rawan maupun tulang terutama pada kelompok P2 dan P3. Lamanya pemberian ekstrak CA meningkatan homeostasis rasio kadar IL-6/IL-10 secara statistic berbeda signifikan kelompok P2 dan P3 dengan K+. Dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak CA dapat mengoreksi panjang badan, peningkatan osifikasi tulang dan mencegah inflamasi yang tergantung lama paparan.*

***Kata kunci:*** *Zebrafish, Centella asiatica, panjang badan, IL-6, IL-10, osifikasi tulang*

**ABSTRACT**

*Centella asiatica (Linn) Urban is known by the name Gotu Kola. Centella asiatica has a high content of Madecassoside and Asiaticoside and both of them can act as an anti-inflammatory agent. The aim of this study was to investigate the effect of ethanol extract of Centella asiatica (CA) on body length, bone ossification and homeostasis of inflammatory cytokine in Zebrafish larva stunting model. This study used zebrafish at 2 hpf (hour post-fertilization) - 9 dpf (day post fertilization), a population of 300 larvae divided into 5 groups consisting of negative control group, positive control (exposed by 12.5 ppb of rotenone) group and 3 treatment groups (P1, P2 and P3) 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. Administration of CA extract was able to correct the body length reaching 99.6% at 9 dpf and statistically there were significant differences between treatment group and K + group. This results also supported by the increased of bone ossification both cartilage and hard bone especially in P2 and P3 groups. The administration of CA extract increased homeostasis ratio of IL-6 / IL-10 levels and significantly different to P2 and P3 compared to rotenone group. It can be concluded that the length of CA extract can correct the length of the body, increase bone ossification and prevent inflammation in time dependent manner.*

***Keywords:*** *Zebrafish, Centella asiatica, body length, IL-6, IL-10, bone ossification*

P**ENDAHULUAN**

Stunting merupakan suatu keadaan dimana panjang atau tinggi badan lebih dari -2 SD dari rata-rata anak pada usia dan jenis kelamin yang sama.1 Stunting diidentifikasikan sebagai prioritas utama kesehatan global karena kejadian stunting yang tinggi.2 Tingginya prevalensi anak stunting (37.2%) membuat Indonesia masuk dalam lima besar di dunia.3 Kematian anak secara global mencapai 14-17% akibat stunting.4 Dampak stunting jangka panjang meliputi keterbatasan kognitif dan performa pendidikan5 produktifitas ekonomi dewasa yang lebih rendah dan resiko mewarisi stunting pada generasi selanjutnya.6 Proses stunting sudah dimulai sejak masa pranatal dan diketahui pada usia 2 tahun.7 Stunting bisa disebabkan karena toksikan, inflamasi, malnutrisi, infeksi berkelanjutan dan faktor lingkungan.8

Penggunaan pestisida sebagai salah satu faktor lingkungan dapat memicu terjadinya stunting. Rotenone merupakan salah satu pestisida dengan konsentrasi 12,5 ppb mampu menyebabkan penurunan panjang badan yang dapat mengindikasi stunting.9 Rotenon bekerja dengan menghambat kompleks I mitokondria dan menghambat proses sintesis ATP sehingga jumlah ATP menurun dan memicu peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Peningkatan radikal bebas didalam sel dapat menginduksi terjadinya inflamasi.10

Mediator inflamasi seperti IL-611 dan Tumor Necrosis Factor alfa (TNF-α)12 mengalami peningkatan pada anak stunting. Peningkatan mediator inflamasi meregulasi hormon pertumbuhan yang mempengaruhi peran *Insulin Growth Factor-1* (IGF-1) dalam pertumbuhan tulang masa prenatal dan postnatal.11 Hal ini menyebabkan osifikasi epifisis tertunda akibat penurunan jaringan tulang rawan pada pembentukan plat pertumbuhan.13 Penurunan episode inflamasi akan memperbaiki hasil jangka panjang pada pertumbuhan linier.14 Sitokin pro-inflamasi IL-1, IL-6, IL-12 dan TNF-α dapat ditekan melalui peningkatan mediator anti-inflamasi Interleukin-10 (IL-10).15

*Centella asiatica* (CA) merupakan tumbuhan yang mengandung zat gizi makro seperti karbohidrat dan asam amino, selain zat gizi micro berupa magnesium, tembaga, kalsium, seng, betakaroten, fosfor, serta vitamin B1, B2, B3, dan C.16 Kandungan bahan aktif penting dari *Centella asiatica* adalah saponin dan triterpenoid yang meliputi: *asiaticosida, madekasosida, asiatic asid dan cetelloside*.17 Asiaticoside dan madekasoside dari triterpenoid berperan sebagai anti oksidan dan anti Inflamasi yang dapat meningkatkan mediator anti inflamasi IL-10 dan menurunkan IL-6.18 Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa dengan pemberian ekstrak CAkonsentrasi 5μg/mL pra hatching paling optimal meningkatkan panjang badan larva *zebrafish* dibanding konsentrasi 1,25μg/mL; 2,5μg/mL melalui peningkatan ekspresi IGF-1 dan IRS19 peningkatan osifikasi tulang dan penurunan ekspresi RANKL.9

Berdasarkan uraian diatas maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek ekstrak etanol *Centella asiatica* terhadap panjang badan, osifikasi tulang rawan, rasio IL-6/IL-10 pada larva zebrafish stunting yang diinduksi rotenone pada usia 9 dpf.

**DESAIN PENELITIAN**

Penelitian ini adalah *true experimental laboratoric* menggunakan desain *post test only control group* *design* dengan random alokasi.

**Subjek Penelitian**

Penelitian ini menggunakan embrio *zebrafish* (*Danio rerio*) usia 0 dpf 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. 20

**Persiapan ekstrak etanol *Centella asiatica***

Simplicia *Centella asiatica* bersertifikat diperoleh dari UPT Materia Medica Batu, Malang, Jawa Timur, Indonesia. Salah satu zat aktif yang terkandung dalam CA adalah asiaticoside 0,29%. Pengukuran asiticoside menggunakan LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) (Thermo Scientific, Accela), Bagian dari tanaman CA yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun tanpa stolon dan akar.20 Secara singkat, metode ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi 100 gram simplicia CA dalam shaker selama 24 jam dan kemudian disaring. Dilakukan evaporasi filtrat sampai pelarut menguap sempurna sehingga didapatkan ekstrak CA konsentrasi 1mg / mL. Larutan CA yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 μg / mL yang dilarutkan dalam medium embrio.

**Pembuatan larutan rotenone**

Pembuatan rotenone mengacu pada penelitian sebelumnya, rotenon yang digunakan yaitu berasal dari sigma (R8875) kemurniannya > 95%. Serbuk Rotenone dilarutkan dalam DMSO sebagai stok dengan konsentrasi 2 x 107 μg/L, selanjutnya diencerkan sampai mencapai 12,5 ppb dalam embrionic medium.20

**Embrionic Medium**

Larutan stok embrionik medium disiapkan dalam 200 ml terkandung 0,08 g CaCl, KCl 0,06 g, NaCl 2 g, MgSO4 0,815 g (modifikasi penelitian sebelumnya).21

**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 berikut:

1. Kontrol negative (K-) larva yang tidak diberikan paparan rotenon dan *Centella asiatica.*
2. Kontrol positif (K+) yang hanya diberikan paparan rotenone konsentrasi 12,5 ppb usia 2 – 72 hpf.
3. Perlakuan 1 (P1) 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.
4. Perlakuan 2 (P2) 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.
5. Perlakuan 3 (P3) 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.

**Pengukuran panjang badan**

Pengukuran panjang badan dilakukan 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 mengunakan soft were optilab versi 2.2.1 dan mengukur standar Leght (SL) menggunakan skala pada software immage Raster ver3 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*.22 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).

**Identifikasi Osifikasi tulang**

Identifikasi tulang larva zebrafish diukur pada usia 9 dpf dengan metode whole-mount immunohistochemistry. Larva yang telah di-euthanasia ditempatkan dalam PFA 4% selama 2 jam.23 Jumlah sampel untuk pewarnaan ini adalah 5 *zebrafish* untuk masing-masing kelompok. 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 ditempankan ke 87% gliserol dan dilakukan pengambilan gambar

Pewarnaan tulang keras menggunakan *Alizarin red* (Art 6279 Alizarinrot S) 1mg/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% H2O2 + 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 ditempankan 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.

**Pengukuran IL-6 dan IL-10**

Kadar IL-6 dan IL-10 diukur menggunakan metode ELISA Bioassay Technology Laboratory dari China. Digunakan sampel larva secara keseluruhan dan hasilnya dibaca pada panjang gelombang 450 nm. Prosedur kerja sesuai lembar data kit no Cat E0026Fi (merek/vendor?) untuk IL-6 dan E0096F1 untuk IL-10.

***Ethical clearance***

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

**Analisis statistik**

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

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Ekstrak etanol *Centella asiatica* meningkatkan panjang badan larva *zebrafish.***

Rerata panjang badan larva *zebrafish* usia 3 dpf menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antar kelompok dan perbedaan panjang badan antar kelompok tidak mencapai 2 SD. Sedangkan pada 6 dan 9 dpf menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok (p <0,05) seperti yang ditunjukkan pada tabel 1. Rerata panjang badan kelompok kontrol positif usia 6 dan 9 dpf <-2 SD (6 dpf = 0.17 dan 9 dpf = 15) dibandingkan dengan kontrol negatif.

Kriteria stunting pada anak dapat di tentukan 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.24 Pada penelitian ini analogi usia *zebrafish* mengacu pada terdahulu 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.25 Berdasarkan hal tersebut maka kelompok K+ yang mendapatkan paparan rotenone 12,5 ppb selama 3 hari memenuhi kriteria stunting. Rotenone memiliki berat molekul kurang 394.43 g/Mol sehingga dapat dengan mudah menembus chorion dan menimbulkan efek bagi embrio.26,27 Rotenone bersifat embrio toksik melalui mekanisme kerja mengganggu transportasi elektron mitokondria yang menghambat pemanfaatan oksigen pada pernapasan organisme selanjutnya menyebabkan kematian sel,28 selanjutnya mempengaruhi perkembangan embrio dan juga penundaan umum yang ditandai dengan kurangnya datasemen ekor selain pembentukan somit tertunda.29

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa lamanya pemberian ekstrak CA sejak masa pra *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 mengoreksi panjang badan larva sebesar 99.6% yang di ukur pada usia 9 dpf.

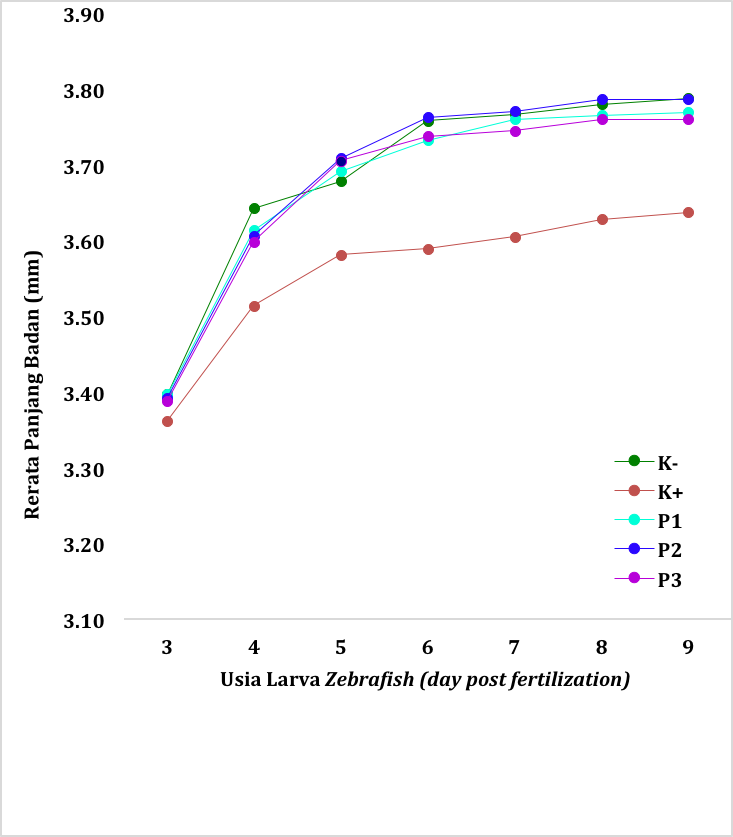
Sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa pemberian ekstrak *Centella asiatica* konsentrasi 5μg/mL pada masa *pre-hatching* (3 dpf) mampu mengkoreksi panjang badan larva *zebrafish* model stunting yang diinduksi rotenon sebesar 97.1%.19 Pemberian *Centella asiatica* pada penelitian ini dimulai *pre-hatching* dan dilanjutkan sampai *post-hatching* identic dengan masa 1000 hari pertama kehidupandapat meningkatkan koreksi panjang badan larva *zebrafish* lebih besar 2.5% dibanding hanya diberikan *pre-hatching* saja.

Peningkatan panjang badan pada kelompok yang dipapar ekstrak CA kemungkinan terjadi karena kandungan fitokimia pegagan yang mengandung antioksidan, antiinflamasi, kandungan mikro nutrien seperti vitamin B1, B2 dan B3 dan vitamin C16 serta nutrisi makro seperti karbohidrat dan asam amino,30  Nutrisi yang adekuat sangat diperlukan tubuh dalam mendukung proses pertumbuhan dan perkembangan, namun jika nutrisi yang di perlukan tidak terpenuhi maka dapat menimbulkan gangguan pertumbuhan maupun gangguan metabolisme tubuh lainnya.31

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Kelompok | 3 dpf | 6 dpf | 9 dpf |
| K- | 3.4 ± 0.08 | 3.76 ± 0.07b | 3.79 ± 0.08b |
| K+ | 3.36 ± 0.08 | 3.59 ± 0.09a | 3.64 ± 0.07a |
| P1 | 3.4 ± 0.06 | 3.73 ± 0.06b | 3.77 ± 0.09b |
| P2 | 3.39 ± 0.07 | 3.76 ± 0.07b | 3.79 ± 0.06b |
| P3 | 3.39 ± 0.06 | 3.74 ± 0.08b | 3.76 ± 0.08b |

K- adalah kontrol negatif kelompok yang tidak di beri perlakuan, K+ merupakan kelompok kontrol positif yang diberikan rotenon 12.5 ppb, P1 adalah perlakuan 1 yang diberikan ekstrak etanol CA sampai 4 dpf, P2 adalah perlakuan 2 yang diberikan ekstrak etanol CA sampai 5 dpf, P3 adalah perlakuan 3 yang diberikan ekstrak etanol CA sampai 6 dpf. Notasi yang berbeda (a dan b) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok (α = 0.05).



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

**Ekstrak etanol *Centella asiatica* meningkatkan osifikasi tulang larva *zebrafish* usia 9 dpf*.***

Kelompok K+ yang terpapar rotenone 12,5 ppb menunjukkan ekspresi tulang rawan dan tulang keras yang menurun signifikan dibandingkan dengan kelompok K- yang di ukur pada usia 9 dpf seperti ditunjukkan pada tabel 2 dan gambar 3.

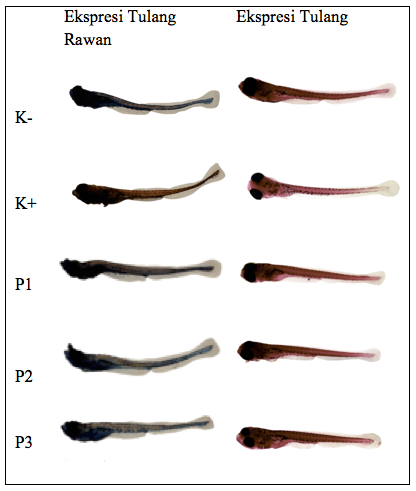
Rotenon dapat menyebabkan peningkatan apoptosis dan peningkatan ROS.32,33 *Apoptosis bone lining cells* yang tinggi berpengaruh terhadap proses pembentukan tulang baru.32 Rotenon 12,5 ppb telah terbukti menyebabkan stunting dengan menurunkan IGF-119 dan penurunan ekspresi osifikasi tulang.9

Pemberian ekstrak etanol CA 5µg/mL pada kelompok P2 dan P3 meningkatkan ekspresi tulang rawan dan tulang keras secara signifikan pada larva *zebrafish* usia 9 dpf dibanding K+ seperti yang ditunjukkan pada tabel 2. Dari pewarnaan tulang rawan dan tulang keras pada 9 dpf juga menunjukkan ekspresi kelompok CA yang lebih kuat dibanding K+ yang dapat dilihat dari ekspresi warna pada gambar 2.

*Centella asiatica* banyakmengandung mineral seperti Zn, Ca, P, K, Na, Fe, Cu, Cr dan Mg33 yang dibutuhkan oleh tubuh. Studi lainnya menyebutkan bahwa diet tinggi calcium memainkan peran dalam pembentukan tulang dengan merangsang proliferasi dan diferensiasi osteoblast.34 Mg dapat meningkatkan proliferasi dan rediferensiasi *chondrocyte* dan diferensiasi osteogenik osteoblas.35 Dengan demikian CA selain mengandung bahan aktif juga memiliki potensi tinggi sebagai nutrisi yang tepat digunakan untuk meningkatkan osifikasi tulang.

**Tabel 2. Efek lama pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* terhadap osifikasi tulang**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Kelompok** | Ekspresi Tulang Rawan | | Ekspresi Tulang Keras | |
| **Mean ± SD (x1087** | | **Mean ± SD (x107)** | |
| K- | 51.1 ± 0.29 | b | 3.35 ±0.38 | b |
| K+ | 45.9 ± 0.56 | a | 2.80 ±0.53 | a |  |
| P1 | 46.3 ± 0.27 | a | 3.17 ±0.28 | ab |
| P2 | 51.7 ± 0.55 | b | 3.43 ±0.50 | b |
| P3 | 50.4 ± 0.54 | b | 3 ±0.44 | ab |



**Gambar 2. Representasi Hasil Pengecatan Alcian Blue dan Alizarin red secara *wholemount* pada larva *Zebrafish*  usia 9 dpf**

**Lama pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* meningkatkan homeostasis rasio kadar sitokin IL-6/IL-10 pada larva *zebrafish* usia 9 dpf*.***

Paparan rotenon 12,5 ppb secara signifikan menurunkan keseimbangan rasio kadar IL-6/IL-10 (p <0,05) dibanding kelompok K- (tabel 4). Hal ini mengindikasikan terjadinya ketidakseimbangan respon imun tubuh. Jika ditinjau hasil lainnya pada penelitian ini menunjukkan panjang badan dan osifikasi tulang yang juga menurun pada kelompok K+.

**Tabel 3. Efek lama pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* terhadap rasio kadar sitokin IL-6/IL-10**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Perlakuan** | **Mean ± SD** | | **p-value** |
| K- | 0.99 ± 0.15 | bc | 0.000 |
| K+ | 0.81 ± 0.14 | a |
| P1 | 0.76 ± 0.09 | a |
| P2 | 0.88 ± 0.14 | ab |
| P3 | 1.04 ± 0.1 | c |

****

**Gambar 3. Efek lama pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* terhadap rasio kadar sitokin IL-6 / IL-10 pada larva Zebrafish model stunting pada usia 9 dpf.**

Interleukin-10 memiliki efek sebagai anti-inflamasi yang sangat kuat dan penting untuk pengaturan respon imun, namun sifat imunosupresif ini juga dapat dimanfaatkan oleh patogen untuk menfasilitasi kelangsungan hidupnya.36 Begitu halnya dengan IL-6 yang merupakan induser sintesis hepatosit protein pada inflamasi fase akut dan kronis, sehingga jika produksi sitokin IL-6 berlebihan dapat menyebabkan defek pertumbuhan.36,37 Oleh karenanya perlu untuk menilai keseimbangan dari kedua sitokin ini melalui pengukuran rasio kadar sitokin IL-6/IL-10. Adanya keseimbangan respon pro-inflamasi dan anti-inflamasi untuk dapat memberikan respon imun yang efektif dan membatasi terjadi kerusakan jaringan.38

Pemberian ekstrak etanol CA 5 µg/mL menunjukkan peningkatan signifikan rasio kadar IL-6/IL-10 (p <0,05) terutama pada kelompok P3 dibanding kelompok K+ dan tidak berbeda signifikan dengan kelompok K- dan P2 seperti yang terlihat pada tabel 3 dan Gambar 3. Hal ini mengindikasikan bahwa dengan lamanya pemberian ekstrak CA pada *zebrafish* 9 dpf dapat semakin meningkatkan keseimbangan rasio kadar sitokin IL-6/IL-10 sehingga menginisiasi respon imun yang efektif.

Ekstrak CA mengandung bahan aktif asiatikosida dan madecassic acid39 berperan sebagai anti-inflamasi yang dapat meningkatkan mediator anti-inflamasi IL-1018 dan menghambat sitokin proinflamasi termasuk IL-6 dan TNF-α.39,40

**KESIMPULAN**

Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* pada pre sampai dengan post hatching dapat mengkoreksi stunting, meningkatkan osifikasi tulang dan menurunkan rasio kadar IL-6/IL-10 larva *zebrafish* usia 9 dpf.

**KEPUSTAKAAN**

1. de Onis M., Dewey K. G., Borghi E., Onyango A. W., Blössner M., Daelmans B. et al. The World Health Organization’s Global target for reducing childhood stunting by 2015: rational and proporsed 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.
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 underutrition 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 cog- nition 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. 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.
10. Emmrich, J. V., Hornik, T. C., Neher, J. J., & Brown, G. C. Rotenone induces neuronal death by microglial phagocytosis of neurons. *FEBS Journal*. 2013; *280*(20), 5030–5038.
11. Prendergast AJ, Rukobo S, Chasekwa B, Mutasa K, Ntozini R, Mbuya MNN, *et al.* Stunting is characterized by chronic inflammation in Zimbabwean infants. *PLoS ONE*. 2014; 9. e86928.
12. El-Maksoud AMA, Khairy SA, Sharada HM, Abdalla MS, & Ahmed NF. Evaluation of pro-inflammatory cytokines in nutritionally stunted Egyptian children. *Egyptian Pediatric Association Gazette*. 2017; *65*(3), 80–84.
13. Chitnis MM, Yuen JSP, Protheroe AS, Pollak M & Macaulay VM. The Type 1 Insulin-Like Growth Factor Receptor Pathway. *Clinical Cancer Research*. 2008; *14*(20), 6364–6370.
14. Pfister K, Ramel S. Linear growth and neurodevelopmental outcomes. *Clin Perinatol.* 2014; 41:309– 321.
15. Mosser DM., & Zhang X. Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine. *Immunological Reviews*. 2008.
16. Sutardi, S. Kandungan Bahan Aktif Tanaman Pegagan dan Khasiatnya untuk Meningkatkan Sistem Imun Tubuh. *Jurnal Penelitian Dan Pengembangan Pertanian*. 2017; *35*(3), 121.
17. 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](http://www.sciencedirect.com/science/journal/0367326X). 2007**.**[78**(7)**](http://www.sciencedirect.com/science/journal/0367326X/78/7): 482-489.
18. Wan, J., Gong, X., Jiang, R., Zhang, Z. dan Zhang, L. Antipyretic and Anti-inflammatory Effects of Asiaticoside in Lipopolysaccharide-treated Rat through Up-regulation of Heme Oxygenase-1. Res Phytother.  2013; 27: 1136-1142.
19. 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 Sunting Dengan Indksi Rotenon*. Tidak diterbitkan , Universitas Brawijaya. Malang. 2017.
20. 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.
21. 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.
22. Spence R, Gerlach G, Lawrence C & Smith C. The Behaviour and Ecology of The Zebrafish Danio Rerio. *Biological Reviews*. 2008; 13-34.
23. 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
24. Kementrian Kesehatan RI. 2016. *Info*. *Situasi Balita Pendek*. 2442–7659.
25. Sorribes A, The Otogeny of sleep-wake cycles in zebrafish: a comparison to humans. *Frontiers in neural Circuits.* 2013. 178
26. Crofton KM. Thyroid Disrupting Chemicals: Mechanisms and Mixtures. *International Journal of Andrology*. 2008; 31(2): 209-223.
27. Zubairi SI, Sarmidi MR, Aziz RA. A Study of Rotenone from Derris Roots of Varies Location, Plant Parts and Types of Solvent Used. *Advances in Environmental Biology.* 2014; 8**(**2): 445-449
28. Ott KC. Rotenone. A brief breif riview of its chemistry, environmental fate and the toxicity of rotenone formulation. 2006.
29. 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.
30. Joshi K & Chaturvedi P. Green Leafy Vegetable: An Overview, 2013; 4 (1), 135-149.
31. Prentice A, Schoenmakers I, Laskey MA, de Bone S, Ginty F & Goldberg GR. Symposium on ‘Nutrition and health inchildren and adolencents’ session 1: Nutrition in growth and development nutrition and bond growth development. Proceedings of the Nutrition Society. 2006; 64(4): pp. 340-360
32. 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.
33. 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.
34. Winarto, W.R. dan M. Surbakti. *Khasiat dan Manfaat Pegagan.* Agromedia Pustaka, Jakarta. 2003.
35. Dou Y, Mujeeb A, Zheng Y, Ge Z. Optimalization of dual effects of Mg-1Ca alloys on the of chondrocytes and osteoblasts in vitro
36. H, Xu Y, Shu L, Zhang J, Miao D, Ren Y. Synergistic effects of high dietary calcium and exogenous parathyroid hormone in promoting osteoblastic bone formation in mice. *Br J Nutr.* 2015; 113(6):909-22.
37. Sederquist B, Fernandez-Vojvodich P, Zaman F, Sävendahl L. Impact of inflammatory cytokines on longitudinal bone growth Bettina. *J Mol Endocrinol*. 2014; 53:T35–T44. Feng Y, Zhou M, Zhang Q, Liu
38. Iyer SS & Cheng G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit Rev Immunol.* 2012; 32(1): 23–63.
39. Li HZ, Wan JY, Zhang L, Zhou QX, Luo FL, Zhang Z. Inhibitory action of asiaiticoside on collagen-induced artritis in mice. Yao Xue Xue Bao. 2007; 42(7):698-703.
40. Won JH, Shin JS, Park HJ, Koh DJ, Jo BG, Lee JY, Yun K And Lee KT. Anti-inflamatory effects of madecassic acid via the suppression of NF-kappaB pathway in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. *Planta Med.* 2010*;* 76: 251-7.