

Original Research

EFEKTIFITAS *Rosmarinus O.* DAN *Centella A.* TERHADAP KADAR TNF-A PADA HIGH GLUCOSE INDUCED LARVA ZEBRAFISH

Evaluation of the Effects of Rosmarinus officinalis and Centella asiatica on TNF- α Levels in High Glucose-Induced Zebrafish Larvae

Fajar Dwi Prastiwi¹ *, Husnul Khotimah¹, Sutini Lamadi², Rizky Amelia, DM Arista, I Wayan Arsana Wiyasa, Tri Yudani M. Raras

¹Jurusan Kebidanan, Poltekkes Kemenkes Kalimantan Timur, Samarinda, Indonesia, 75123

²Departemen Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

*E-mail: fajarprastiwi96@gmail.com

Diterima: 4 Maret 2026

Direvisi: 21 Maret 2026

Disetujui: 24 April 2026

Abstrak

Latar Belakang: Diabetes gestasional adalah jenis diabetes yang terjadi selama masa kehamilan. GDM ditegakkan dengan kondisi hiperglikemi dalam darah. Hiperglikemi memicu respon inflamasi yang ditandai dengan ekskresi sitokin pro inflamasi, salah satunya adalah TNF- α . *Centella asiatica* dan *Rosmarinus officinalis* dikenal sebagai anti-diabetes dan anti-inflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari efek kombinasi nanoemulsi *Centella asiatica* dan *Rosmarinus officinalis* terhadap ekspresi TNF- α di larva Zebrafish yang diinduksi glukosa 3%. Hiperglikemi ditandai dengan terjadinya peningkatan kadar Phosphoenolpyruvate carboxykinase di larva Zebrafish. **Metode:** Phosphoenolpyruvate carboxykinase dan TNF- α akan diukur menggunakan metode *Reverse Transcription PCR*. Kombinasi nanoemulsi *Rosmarinus officinalis* dan *Centella asiatica* diberikan dengan tiga dosis yang berbeda yaitu dengan konsentrasi 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ dan 10 $\mu\text{g/mL}$. Analisis statistik yang digunakan adalah One Way ANOVA untuk mengukur kadar ekspresi TNF- α . **Hasil:** Analisis statistik One Way ANOVA menyatakan nilai probabilitas 0,42 ($\alpha=0,05$). Penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi nanoemulsi *Rosmarinus officinalis* dan *Centella asiatica* tidak signifikan mempengaruhi kadar ekspresi TNF- α ($p>0,05$). **Kesimpulan:** Penelitian ini adalah mengkombinasikan nanoemulsi *Rosmarinus officinalis* dan *Centella asiatica* dengan dosis 2,5 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; dan 10 $\mu\text{g/mL}$ tidak signifikan mempengaruhi kadar TNF- α di larva Zebrafish yang diinduksi glukosa tinggi (3%).

Kata kunci: *Centella*; Hiperglikemi; TNF- α ; *Rosmarinus*

PENDAHULUAN

Diabetes Mellitus Gestasional (DMG) tercatat mengalami *peningkatan* prevalensi global, terutama di negara berkembang, di mana dari angka 3,8% menjadi 21% (1). Data dari WHO menyebutkan bahwa wilayah Asia Tenggara merupakan terbesar ke dua dalam angka prevalensi Diabetes Mellitus Gestasional (DMG) di dunia. Berdasarkan data prevalensi komplikasi DMG di

Indonesia menggambarkan 2 dari 5 perempuan diabetes berada pada usia reproduksi. Tahun 2015 terdapat 16,2% kelahiran yang menunjukkan tanda hiperglikemi selama kehamilan, dan 85,1% diantaranya karena DMG (2).

Berdasarkan data dari American Diabetic Association (ADA), DMG adalah kondisi di mana tubuh mengalami intoleransi terhadap glukosa karena retensi insulin yang menyebabkan perubahan metabolisme selama kehamilan dari trimester dua sampai trimester tiga (tidak terdeteksi sebelumnya). Resistensi insulin dapat terjadi karena peningkatan kebutuhan kadar glukosa darah untuk memenuhi kebutuhan tumbuh kembang janin (2). Factor predisposisi dari DMG diantaranya adalah kombinasi dari kondisi lingkungan, gaya hidup, dan factor genetic.

Wanita dengan DMG memiliki resiko komplikasi baik untuk Wanita itu sendiri maupun janin yang dikandungnya, dalam jangka pendek maupun jangka panjang (3). Angka kejadian ibu hamil dengan DMG juga berbanding dengan angka kejadian DM pada anak dan remaja (4). Peningkatan kadar glukosa dan insulin di sirkulasi darah ibu akan memberikan dampak ke metabolisme janin, yang akan mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan janin (5).

Kondisi hiperglikemik akan mempengaruhi proses gluconeogenesis, yang akan meningkatkan kadar glukosa di liver. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) salah satu enzim yang bertindak sebagai katalisator di organ liver dan ginjal, sehingga PEPCK bisa menjadi penanda (*marker*) kondisi hiperglikemik (6). Esensi dari patofisiologi DMG adalah terjadinya resistensi insulin (7). Pensinyalan insulin berkaitan dengan fosforilasi reseptor insulin atau insulin reseptor substrate (IRS-1), meskipun jumlah di permukaan sel stabil. Sitokin pro inflamasi diekskresikan oleh jaringan adiposa juga memiliki peran untuk meningkatkan mekanisme resistensi insulin. Sitokin pro inflamasi seperti TNF- α , IL-1- β , dan IL-6 berperan untuk menghambat pensinyalan insulin dengan menghambat IRS-1 melalui serin fosforilase (8). Kadar TNF- α yang tinggi selama kehamilan, khususnya di trimester II, menyebabkan resistensi insulin dengan cara menghambat beberapa jalur pensinyalan insulin (9). Penghambatan pensinyalan insulin dengan penghambatan IRS-1 karena peran dari TNF- α adalah factor utama dalam kedaruratan DMG karena menghambat pengambilan glukosa oleh sel dengan menghambat kerja *glucose transporter protein* (GLUT4) (10).

Ikan Zebra (*Danio rario*) usia 0-72 jam *hour of fertiization* (*hpf*) dianalogikan sebagai janin di dalam uterus. Ikan Zebra memiliki 70% gen homolog dengan vertebrata (manusia). Penelitian terbaru membuktikan bahwa ikan Zebra memenuhi standar untuk digunakan sebagai model DMG. Kelebihan lain yang dimiliki oleh ikan Zebra adalah mudah dikembangbiakkan untuk bereproduksi dalam jumlah yang besar dalam waktu yang relative singkat (6).

Manajemen pencegahan dan manajemen deteksi dini dari DMG sangat terbatas. Diketahui bahwa RO mengandung *Phenolic acid* dan CA mengandung *Pentacyclic triterpenoid saponins* (*asiaticoside, madecassoside, saponenin*) yang memiliki efek terapeutik kuat sehingga dikenal sebagai antihiperglikemik, antioksidan, dan antiinflamasi (11).

(12) dalam studi *in vivo* nya menyatakan bahwa RO dapat berfungsi sebagai antiinflamasi pada mencit dan tikus coba dengan menekan kadar TNF- α sebagai sitokin pro inflamasi. Studi tersebut menggunakan eksperimen hewan coba tikus dan mencit sebagai vertebrata mamalia,

sedangkan studi ini menggunakan hewan coba ikan Zebrafish sebagai vertebrata pisces. Penelitian yang dilakukan oleh (13) menyatakan bahwa CA meningkatkan penyerapan glukosa di Co-Culture 3T3-L1 jaringan adiposity dengan menghambat TNF- α . Teknik studi itu menggunakan in vitro, sedangkan penelitian ini menggunakan Teknik in vivo. Novelti yang dihadirkan dalam penelitian ini adalah aplikasi dari kombinasi 2 bahan alam yang disajikan dalam bentuk nanoemulsi. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan meneliti efek dari pemberian kombinasi nanoemulsi RO dan CA terhadap ekspresi TNF- α pada larva ikan Zebrafish yang diinduksi glukosa tinggi 3.

METODE

Sampel (Bahan) Penelitian

Penelitian ini mendapatkan persetujuan etik dari komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan nomerNo.50/EC/KEPK/03/2023. Embrio Zebrafish usia 0 dpf didapatkan dari hasil fertilisasi jantan dan betina Zebrafish dewasa yang dikembangkan dan dipelihara di akuarium di Laboratorium Reproduksi Fakultas Ilmu Perikanan dan Kelautan, Universitas Brawijaya. Sampel penelitian menggunakan embrio *Zebrafish* usia 2 hpf (*hour post fertilization*) sampai 72 hpf yang berjumlah 30 sampel tiap sumuran yang dilakukan 4 kali pengulangan. Sampel diambil secara acak alokasi. Kelompok perlakuan dalam penelitian ini terdiri atas 5 kelompok, sehingga jumlah sampel total adalah 600 embrio *Zebrafish*. Kriteria inklusi dalam pemilihan sampel penelitian ini adalah embrio Zebrafish usia 0-2 hpf yang bersih, korion transparan, berbentuk bulat, dan tidak ada serat putih/jamur putih saat dilihat dengan mikroskope optimal(6). Sebaliknya, kriteria eksklusi yang kami terapkan dalam penelitian ini adalah embrio dengan kondisi mati ditandai dengan adanya *bleaching* (chorion berwarna putih, tidak jernih), embrio yang tidak terbuahi, dan terdapat jamur (serabut putih). Sampel untuk pengukuran ekspresi TNF- α masing-masing berjumlah 40 sampel kelompok perlakuan pada usia 3 dpf. Komposisi dari medium embrionik yang digunakan adalah 0,25 gr bubuk CaCl, 0,15 gr KCl, 5 gr NaCl, 0.815 gr MgSO₄, dan 500 ml air suling (6).

Prosedur kerja

Pembuatan Kombinasi Nanoemulsi *Rosmarinus officinalis* (RO) dan *Centella asiatica* (CA)

Persiapan pembuatan kombinasi nanoemulsi RO dan CA adalah dengan menggunakan 5 gr ekstrak RO dan 5 gr ekstrak CA. Campur semua bahan minyak dan surfaktan (PEG 400 (40%), PEG 40 (32,07%), Span 80 (11,56%), minyak kedelai (16,37%)) sejumlah 100 ml menggunakan *overhead stirrer* di suhu 40⁰ C selama 15 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Setelah homogen tambahkan tambahkan 5 gr ekstrak RO dan 5 gr ekstrak CA lalu aduk dengan *overhead stirrer* di suhu 40⁰ C - 60⁰ C (di jaga jangan lebih dari 60⁰ C) selama 15 menit dengan kecepatan 1000 rpm sampai homogen. Setelah itu letakkan kombinasi nanoemulsi RO dan CA di botol tertutup dan simpan di *chiller* dengan suhu 4⁰ C

Prosedur Perlakuan Induksi Paparan Glukosa dan Kombinasi Nanoemulsi RO dan CA

Setiap sumuran di isi 30 embrio Zebrafish. Pembagian masing-masing kelompok perlakuan adalah sebagai berikut : 1) Kelompok kontrol negatif (KN) adalah embrio Zebrafish dipelihara hingga menjadi larva zebrafish usia 3 dpf yang hanya diberikan 5 ml medium embrionik (ME), 2)

Kelompok kontrol positif (KP) adalah embrio zebrafish yang dipelihara hingga menjadi larva zebrafish usia 3 dpf yang diberikan medium embrionik dan paparan glukosa 3%, 3) Kelompok perlakuan 1 (P1) adalah kelompok embrio zebrafish yang dipelihara hingga menjadi larva zebrafish usia 3 dpf yang diberikan medium embrionik dan paparan glukosa 3% serta terapi kombinasi nanoemulsi RO dan CA dosis 2,5 µg/mL, 4) Kelompok perlakuan 2 (P2) adalah kelompok embrio zebrafish yang dipelihara hingga menjadi larva zebrafish usia 3 dpf yang diberikan medium embrionik dan paparan glukosa 3% serta terapi kombinasi nanoemulsi RO dan CA dosis 5 µg/mL, serta 5) Kelompok perlakuan 3 (P3) adalah kelompok embrio zebrafish yang dipelihara hingga menjadi larva zebrafish usia 3 dpf yang diberikan medium embrionik dan paparan glukosa 3% serta terapi kombinasi nanoemulsi RO dan CA dosis 10 µg/mL. Pemberian perlakuan kombinasi nanoemulsi RO dan CA dimulai dari 2 hpf, 24 hpf, sampai 72 hpf di dalam media embrionik yang akan diganti setiap 24 jam.

Pengukuran ekspresi Beta Aktin, PEPCK, dan TNF- α

Ekspresi Beta aktin, PEPCK, dan TNF- α akan diukur di dalam penelitian ini. Kadar ekspresi Beta Aktin adalah sebagai control. PEPCK sebagai indikator hiperglikemi. TNF- α sebagai indikator terjadinya inflamasi. Hasil ekspresi yang terlihat adalah nilai *density*. Observasi ini dilakukan menggunakan metode *Reverse Transcription PCR*. *Reverse Transcription PCR* adalah sebuah teknik laboratorium yang bekerja dengan cara menggabungkan transkrip balik RNA menjadi DNA komplementer (cDNA) dengan reaksi polimerase berantai (PCR) untuk mengamplifikasi DNA spesifik. Metode ini menggunakan prinsip dengan mengubah RNA menjadi cDNA yang akan menjadi *template* untuk amplifikasi. Setelah larva Zebrafish dipanen di usia 3 dpf (*day post fertilization*), mereka dibekukan. Setelah dibekukan, kemudian larva Zebrafish diekstraksi menjadi ekstraksi RNA murni. RNA yang sudah murni kemudian di proses lagi untuk mendapatkan cDNA. cDNA Zebrafish 3 dpf ini yang akan dijadikan sampel. Setelah didapatkan sampel yang siap dipakai, kemudian diproses menggunakan *Reverse Transcription PCR* dengan tahapan mulai dari pre-denaturasi 95°C (3 menit), denaturasi 95°C (30 detik), Annealing 62,3°C (30 detik), Extension 72°C (1 menit) dan 72°C (5 menit) sejumlah 40 siklus. Setelah dilakukan *Reverse Transcription PCR* kurang lebih 3-3,5 jam, hasilnya diobservasi menggunakan 5% *agarose gel* metode elektroforesis.

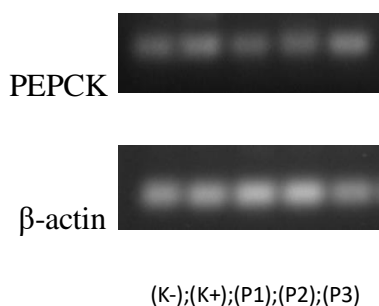
Analisis Statistik

Analisis statistic yang digunakan adalah menggunakan IBM *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* versi 26. Uji normalitas data menggunakan Shapiro Wilk, dengan kriteria apabila nilai probabilitas > level of significance (alpha = 5%) maka dinyatakan normal. Uji normalitas dari pengujian perbedaan pengaruh pemberian kombinasi nanoemulsi pegagan (*Centella asiatica*) dan rosemary (*Rosmarinus officinalis*) terhadap ekspresi TNF- α adalah 0.956 dengan probabilitas sebesar 0.724. Hal ini dapat diketahui bahwa probabilitas > level of significance (alpha = 0,05), sehingga dinyatakan berdistribusi normal. Perubahan ekspresi mRNA PEPCK dan TNF- α dianalisis menggunakan *one-way ANOVA*. Nilai signifikansi probabilitas nya adalah $P < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekspresi PEPCK

Berdasarkan hasil pengukuran, terlihat bahwa ekspresi PEPCK pada kelompok kontrol positif (induksi glukosa 3%) meningkat dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Ekspresi PEPCK akan mengalami penurunan dengan paparan kombinasi nanoemulsi RO dan CA pada kelompok P1, P2, dan P3. Hasil terlihat seperti gambar di bawah (Gambar.1).

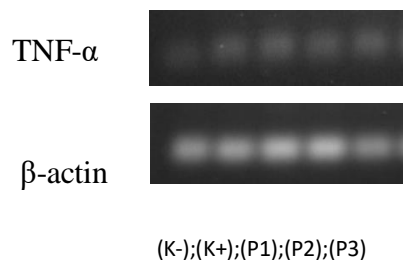


Gambar.1 Hasil Pengaruh Pemberian kombinasi Nanoemulsi RO CA terhadap ekspresi PEPCK pada larva zebrafish yang dipapar glukosa 3%

Ekspresi TNF- α

Berdasarkan hasil penelitian, dapat dilihat bahwa ekspresi TNF- α in kelompok kontrol positif (induksi glukosa 3%) meningkat dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Akan tetapi, ekspresi TNF- α menunjukkan penurunan dengan variasi yang cukup besar setelah diberikan perlakuan kombinasi nanoemulsi RO dan CA di P1 (2,5 μ g/mL), P2 (5 μ g/mL), dan P3 (10 μ g/mL). variasi yang cukup besar ini disebabkan oleh kondisi fisiologi dna tingkat stress sel dari hewan coba. Hal ini karena pembiakan dan pemeliharaan hewan coba dilakukan penuh di laboratorium sejak dalam bentuk telur. Kondisi ini menyebabkan respon biologi yang beraneka ragam dari masing-masing individu hewan coba.

Dari kelompok negatif (K-) ke kelompok positif (K+) mengindikasikan peningkatan kadar ekspresi TNF- α . Tes analisis statistic One Way ANOVA menyatakan bahwa nilai probabilitas 0,42 ($\alpha=0,05$). Karena nilai probabilitas lebih dari *P Value* maka dinyatakan *Ho* diterima. Ini dapat diartikan bahwa tidak ada pengaruh yang signifikan pada ekspresi TNF- α pada 5 kelompok perlakuan. Karena uji One Way ANOVA ini tidak signifikan, menyebabkan tidak ada uji lanjut *Post Hoc*. Disimpulkan bahwa pemberian perlakuan glukosa 3% dan kombinasi nanoemulsi RO CA tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap rerata ekspresi TNF- α pada larva Zebrafish model DMG

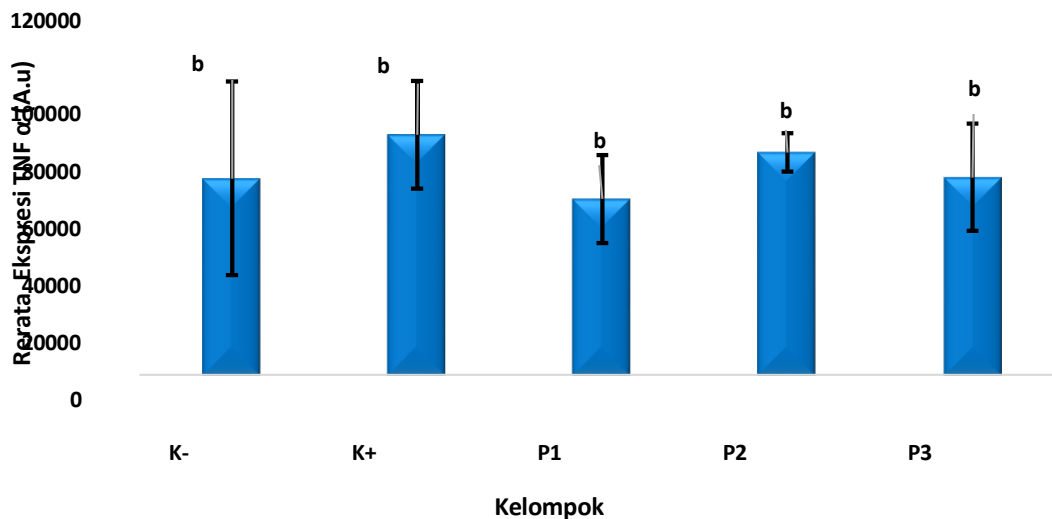


Gambar 3. Hasil Pengaruh Pemberian kombinasi Nanoemulsi RO CA terhadap ekspresi TNF- α pada larva zebrafish yang dipapar glukosa 3%

Tabel .2 Tabel rerata ekspresi TNF- α larva zebrafish yang dipapar glukosa 3%

| Kelompok Perlakuan | Rerata \pm SD | p-value |
|---|-------------------------|---------|
| K- (Negatif) | 71827 \pm 35335,54 | |
| K+ (Glukosa 3%) | 87730 \pm 19684,44 | |
| P1 (Glukosa 3% + Nanoemulsi RO CA 2,5 μ g/mL) | 64278,5 \pm 16111,43 | 0,42 |
| P2 (Glukosa 3% + Nanoemulsi RO CA 5 μ g/mL) | 81328,5 \pm 6992,58 | |
| P3 (Glukosa 3% + Nanoemulsi RO CA 10 μ g/mL) | 72214,5 \pm 19574,84 | |
| Total | 377378,5 \pm 97698,83 | |

Keterangan: Rerata ekspresi TNF- α didapatkan dari analisis dari hasil RT PCR dengan visualisasi menggunakan *agarose gel* 5%.



Gambar.4 Grafik rerata ekspresi TNF- α larva zebrafish yang dipapar glukosa 3%

Penurunan Ekspresi PEPCK karena Induksi Glukosa Tinggi (3%)

Ekspresi Phosphoenolpyruvate carboxikinase (PEPCK) pada model larva Zebrafishh kelompok kontrol negatif (tanpa paparan glukosa 3% dan kombinasi nanoemulsi RO CA) menunjukkan nilai rata-rata 206700 \pm 45000 a.u. serta meningkat pada kelompok kontrol positif (dengan paparan glukosa 3%) yaitu dengan nilai rata-rata 803190 \pm 574440 a.u. Hasil dari

penelitian ini sejalan dengan penelitian dari (Khotimah et al., 2021) karena memperlihatkan peningkatan ekspresi PEPCK pada kondisi hiperglikemi. Penggunaan PEPCK untuk analisis kondisi hiperglikemi karena pada larva Zebrafish usia 3 dpf belum memiliki cukup darah untuk dilakukan analisis, sehingga menggunakan kadar enzim yang berkaitan dengan aktivitas glukosa. PEPCK dapat meningkat pada kondisi hiperglikemi karena ROS akan diproduksi lebih banyak untuk meningkatkan pengaktifan jalur stress oksidatif yang berakibat insulin mengalami resisten. Resistensi insulin hepatik mengaktifasi p38 MAP kinase yang menyebabkan fosforilasi ATP 2. Fosforilasi ini mengaktifkan promotor PEPCK. Di jalur lain, dengan kondisi hiperglikemik jalur kaskade transduksi insulin PI3k/Akt/mTOR akan dihambat yang sehingga PEPCK dan glukosa 6-fosfatase (G6Pase) akan meningkat (6).

Phosphoenolpyruvate carboxikinase (PEPCK) adalah enzim katalisator untuk terjadinya glukoneogenesis di organ liver. Diketahui bahwa liver adalah organ yang bertanggungjawab dalam menjaga homeostatis kadar glukosa darah melalui mekanisme glukoneogenesis. Produksi glukosa endogen yang meningkat, khususnya di organ liver merupakan indikator utama terjadinya hiperglikemi puasa pada diabetes mellitus tipe 2 dan gestasional. Oleh karena itu pengurangan kadar glukosa hati menjadi salah satu indikator dalam terapi diabetes mellitus dan gestasional. Kondisi hiperglikemi meningkatkan glukoneogenesis hati. Diketahui, dalam kondisi normoglikemi, insulin menekan ekspresi PEPCK yang memicu resistensi insulin. Untuk kompensasi glukosa darah enzim PEPCK menjadi katalisator untuk mengubah oksaloasetat menjadi fosfor- piruvat sebagai permulaan gluconeogenesis (14). Peningkatan ekspresi PEPCK akan menginduksi glukoneogenesis dan menekan insulin melalui mekanisme phosphoinositide 3-kinase (PI3K/Akt) (15).

PEPCK mengalami penurunan setelah diberikan perlakuan P1, P2, dan P3. Artinya ekspresi PEPCK menurun pada kondisi hiperglikemi yang dipapar dengan kombinasi nanoemulsi RO CA. Penurunan terbaik adalah pada kelompok P2 karena paling mendekati kelompok kontrol yaitu 173985 ± 36585 a.u dan penggunaan dosis medium. Hasil ini didukung oleh penelitian (16) bahwa Saponin yang terdapat di CA dengan dosis medium akan optimal bekerja menekan PEPCK dengan mekanisme peningkatan transduksi sinyal insulin melalui jalur IRS-1/PI3K/AKT. Diketahui RO mengandung senyawa asam Fenolik. Fenolik akan menghambat ekspresi nitric oxide (NO) dan aktivitas faktor transkripsi oleh NF-kB sehingga ekskresi insulin meningkat jalur PI3k/Akt. Ekskresi insulin yang meningkat akan menekan PEPCK (6).

Dampak Pemberian Kombinasi Nanoemulsi terhadap Kadar Ekspresi TNF- α di Larva Zebrafish Yang Diinduksi Glukosa Tinggi (3%)

Kontrol negatif adalah sampel tanpa perlakuan apapun kecuali pemberian medium embrionik. Sedangkan kontrol positif adalah sampel dengan perlakuan pemberian glukosa 3% mulai 2 hpf (*hour post fertilitation*) sampai 3 dpf (*day post fertilitation*). Hasil menunjukkan bahwa ekspresi TNF- α mengalami peningkatan akan tetapi tidak bermakna pada kelompok dengan perlakuan induksi glukosa 3% (K+). Artinya, TNF- α meningkat pada kondisi kadar glukosa yang tinggi dalam tubuh tetapi tidak dalam jumlah yang signifikan. Meningkatnya ekspresi TNF- α karena TNF- α akan menghambat pensinyalan insulin secara langsung dan tidak langsung.

Mekanisme langsung adalah dengan memicu disfungsi sel β -pankreas. Sedangkan mekanisme tidak langsung dengan menghambat translokasi glukosa ke dalam sel melalui membran sel oleh transporter glukosa 4 (GLUT4) dengan mengaktifkan protein kinase C (PKC) (17). Embrio yang terpapar glukosa tinggi (3%) mengalami mekanisme pertukaran zat saat masa kandungan/kehamilan. Embrio yang mengalami hiperglikemi, dalam kondisi hipoksia, akan mengaktifkan protein hypoxia inducible factor (HF-1) untuk meregulasi sel protein yang lain (18). Kemudian HF-1 akan mengikat promotor khusus Toll-Like Reseptor 4 (TLR-4) untuk mengekspreisikannya. Jika TLR-4 sudah diekspresikan di dalam sel maka akan diikuti dengan ekspresi Nuclear Factor-kappa Beta (NF-kB). NF-kB ini berperan mengekspresikan TNF- α sebagai sitokin pro inflamasi di dalam sel (19).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi TNF- α dari kontrol positif ke kelompok perlakuan (P1), (P2), dan (P3) mengalami penurunan walaupun tidak bermakna berdasarkan analisis statistik. Hasil ini serupa dengan hasil dari (20) yang menyatakan bahwa pemberian RO dan oleh (17) bahwa pemberian CA akan menurunkan kadar TNF- α . RO adalah tumbuhan yang terbukti mengandung senyawa aktif yang berfungsi sebagai antiinflamasi. RO terbukti mampu menekan terjadinya inflamasi melalui mekanisme penghambatan produksi sitokin pro inflamasi, diantaranya TNF- α (21). Menurut (22) dalam penelitiannya terhadap minyak esensial RO menyatakan bahwa dalam RO terdapat kandungan 1,8-Cineole dari golongan monoterpen dan kamper (23) yang dominan sebagai antiinflamasi. Sedangkan CA memiliki 3 senyawa aktif yang menonjol dalam dunia pengobatan. Diantaranya asiaticoside, madecassoside dan sapogenin yang tergabung dalam kelompok saponin triterpenoid pentasiklik (24). Menurut (17) antiinflamasi pegagan didapatkan dari kandungan asiaticoside Asiaticoside terbukti mengurangi kadar glukosa di dalam sirkulasi dengan menekan enzim kunci metabolisme karbohidrat. Dijelaskan oleh penelitian dari (25) bahwa triterpenoid pentasiklik terutama oleh asiaticoside berperan meningkatkan aktivitas enzim glikolitik dan peningkatan glikogenesis yang akan membantu mengurangi kadar glukosa dalam regulasi darah.

Diberikan perlakuan kombinasi dengan CA karena mampu menjaga serebral mendekati kondisi normoglikemi pada diabetes dengan mekanisme cerebro-protektif melalui penekanan TNF- α di serebral (26), di mana tidak dilakukan oleh RO. Akan tetapi hasil analisis statistik penelitian tersebut menyatakan bahwa pemberian kombinasi nanoemulsi RO CA tidak memberikan pengaruh yang bermakna terhadap rerata ekspresi TNF- α pada larva Zebrafish dalam kondisi hiperglikemi. Kondisi ini dapat disebabkan oleh beberapa hal yang terjadi saat proses penelitian. Diantaranya yaitu pengaruh sitokin yang lain dan variasi individu model penelitian. Adanya sitokin proinflamasi lain yaitu IL-6 yang berasal dari jaringan otot akan menghambat pelepasan dari TNF- α . Penelitian dari (27) menyatakan bahwa IL-6 juga mengalami peningkatan pada kondisi tubuh ibu hamil yang hiperglikemi. Menurut penelitian (28) menyatakan bahwa ekspresi factor inflamasi dan RT PCR sangat dipengaruhi oleh kondisi factor host dan respon biologi individu. Selain itu perubahan komunitas dan habitat tempat hidup yang ekstrim akan mempengaruhi perilaku dan kondisi fisiologi suatu individu termasuk model hewan coba dalam sebuah penelitian (10). Perbedaan kondisi biologi dan fisiologi hewan coba akan menimbulkan nilai standar deviasi yang tinggi, sehingga *p value* akan rendah (29). Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini dirawat dan dikembangkan di luar habitat alami, yaitu di laboratorium dari

telur hingga menetas. Ditambah lagi, salah satu karakter gen inflamasi adalah mudah rentan dengan waktu uji coba yaitu naik di waktu yang singkat dilanjutkan turun juga dalam waktu yang singkat. Jika sampel tidak dibri perlakuan “Peak Time” maka dapat menyebabkan reaksi yang tidak terlihat. Oleh karena itu hasil dari RT PCR sangat dikendalikan oleh waktu(30). Hal ini mungkin saja terjadi karena perlakuan dari tim peneliti yang variatif dan berulang kali. Jika regulasi metabolisme fisiologi yang berubah maka akan merubah komponen-komponen besar atau kecil di dalamnya.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian perlakuan kombinasi nanoemulsi Rosmarinus o. dan Centella a. yang tidak signifikan menurunkan ekspresi TNF- α pada Zebrafish (*Danio rerio*) terinduksi glukosa tinggi dapat disebabkan karena factor biologi dan fisiologi dari hewan coba. Pemeriksaan tingkat DNA yang sangat membutuhkan ketelitian tinggi, menjadi alasan kondisi hewan coba harus dalam kondisyang terbaik. Saran yang dapat diberikan untuk penelitian yang selanjutnya adalah penelitian dilakukan dengan kondisi memaksimal habitat hewan coba yang meminimalisir perubahan biologi dan fisiologinya, serta dengan perhitungan waktu yang efisien dan teliti.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada segenap jajaran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang sudah mendukung penelitian ini dengan memberikan dukungan finansial, material, non material, fasilitas, sarana dan pra sarana, serta menyediakan tenaga SDM yang berkualitas mulai dari pembimbing penelitian hingga pembimbing tatalaksanaan laboratorium.

DAFTAR RUJUKAN

1. McIntyre HD, Catalano P, Zhang C, Desoye G, Mathiesen ER, Damm P. Gestational diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2019;5(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-019-0098-8>
2. Ketut Surya Negara D. Skrining Diabetes melitus gestasional. *Div Kedokt Fetomaternal, Obstet dan Ginekol FK UNUD*. 2015;(November):2429.
3. Kementerian Kesehatan RI. Infodatin tetap produktif, cegah, dan atasi Diabetes Melitus 2020. *Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI*. 2020. p. 1–10.
4. Blotsky AL, Rahme E, Dahhou M, Nakhla M, Dasgupta K. Gestational diabetes associated with incident diabetes in childhood and youth: A retrospective cohort study. *Cmaj*. 2019;191(15):E410–7.
5. Sweeting AN, Ross GP. An update on gestational diabetes mellitus. *Med Today*. 2020;21(11):33–42.
6. Khotimah H, Alita SNP, Aninditha D, Weningtyas A, Prima WE, Kalsum U, et al. Ethanolic extract of *Salacca zalacca* peel reduce IL-1 β and apoptosis in high glucose induced zebrafish embryo. *GSC Biol Pharm Sci*. 2021;16(3):024–33.
7. Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):1–21.
8. Filardi T, Catanzaro G, Mardente S, Zicari A, Santangelo C, Lenzi A, et al. Non-coding RNA: Role in gestational diabetes pathophysiology and complications. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11).
9. Amirian A, Mahani MB, Abdi F. Role of interleukin-6 (IL-6) in predicting gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol Sci*. 2020;63(4):407–16.

10. Sharma AK, Singh S, Singh H, Mahajan D, Kolli P, Mandadapu G, et al. Deep Insight of the Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Cells*. 2022;11(17):1–19.
11. Garcia C, Ladeiras D, Reis CP. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. 2018;4.
12. Gonçalves C, Fernandes D, Silva I, Mateus V. Potential Anti-Inflammatory Effect of *Rosmarinus officinalis* in Preclinical In Vivo Models of Inflammation. *Molecules*. 2022;27(3).
13. Kusumastuti SA, Nugrahaningsih DAA, Wahyuningsih MSH. *Centella asiatica* (L.) extract attenuates inflammation and improve insulin sensitivity in a coculture of lipopolysaccharide (LPS)-induced 3T3-L1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages. *Drug Discov Ther*. 2019;13(5):261–7.
14. Althurwi HN, Soliman GA, Abdel-Rahman RF, Abd-Elsalam RM, Ogaly HA, Alqarni MH, et al. Vulgarin, a Sesquiterpene Lactone from *Artemisia judaica*, Improves the Antidiabetic Effectiveness of Glibenclamide in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats via Modulation of PEPCK and G6Pase Genes Expression. *Int J Mol Sci*. 2022;23(24):1–16.
15. Liu TY, Shi CX, Gao R, Sun HJ, Xiong XQ, Ding L, et al. Irisin inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis via the PI3K/Akt pathway in type 2 diabetic mice and hepatocytes. *Clin Sci*. 2015;129(10):839–50.
16. Feng M, Liu F, Xing J, Zhong Y, Zhou X. Anemarrhena saponins attenuate insulin resistance in rats with high-fat diet-induced obesity via the IRS-1/PI3K/AKT pathway. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2021;277:114251. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114251>
17. Masola B, Oguntibeju OO, Oyenih AB. *Centella asiatica* ameliorates diabetes-induced stress in rat tissues via influences on antioxidants and inflammatory cytokines. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2018;101(October 2017):447–57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.115>
18. Amalia L, Parwati I, Rizal A, Panigoro R, Gamayani U, Rasyid A, et al. Hypoxia Inducible Factor (HIF) 1-A dan Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pada Stroke Iskemik Fase Akut. *J Neuroanestesi Indones*. 2019;8(3):226–32.
19. Satoh T, Trudler D, Oh CK, Lipton SA. Potential Therapeutic Use of the Rosemary Diterpene Carnosic Acid for Alzheimer’s Disease, Parkinson’s Disease, and Long-COVID through NRF2 Activation to Counteract the NLRP3 Inflammasome. *Antioxidants*. 2022;11(1).
20. Rahbardar MG, Hosseinzadeh H. Therapeutic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its active constituents on nervous system disorders. *Iran J Basic Med Sci*. 2020;23(9):1100–12.
21. Benincá JP, Dalmarco JB, Pizzolatti MG, Fröde TS. Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. *Food Chem*. 2011;124(2):468–75.
22. Borges RS, Keita H, Ortiz BLS, dos Santos Sampaio TI, Ferreira IM, Lima ES, et al. Anti-inflammatory activity of nanoemulsions of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.: in vitro and in zebrafish studies. *Inflammopharmacology* [Internet]. 2018;26(4):1057–80. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0438-9>
23. Borges RS, Lima ES, Keita H, Ferreira IM, Fernandes CP, Cruz RAS, et al. Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. *Inflammopharmacology*. 2018;26(1):183–95.
24. Teh LK, Salleh MZ, Adenan MI. Inhibitory Effects of Raw-Extract *Centella asiatica*. *Molecules*. 2020;25(892):1–20.
25. Oyenih AB, Opperman M, Alabi TD, Mpahleni B, Masola B. *Centella asiatica* alleviates diabetes-induced changes in fatty acid profile and oxidative damage in rat testis. *Andrologia*. 2020;52(10):1–12.
26. Giribabu N, Karim K, Kilari EK, Nelli SR, Salleh N. Oral administration of *Centella asiatica* (L.) Urb leave aqueous extract ameliorates cerebral oxidative stress, inflammation, and apoptosis in male rats with type-2 diabetes. *Inflammopharmacology*. 2020;28(6):1599–622.
27. Siddiqui S, Waghdhare S, Goel C, Panda M, Soneja H, Sundar J, et al. Augmentation of IL-6 production contributes to development of gestational diabetes mellitus: An Indian study. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* [Internet]. 2019;13(2):895–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.12.023>

28. Bustin SA. RT-qPCR Testing and Performance Metrics in the COVID-19 Era. *Int J Mol Sci.* 2024;25(17).
29. Nasrullah M, Meenakshi Sundaram DN, Claerhout J, Ha K, Demirkaya E, Uludag H. Nanoparticles and cytokine response. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023;11(August):1–14.
30. Muñoz-Gallego I, Rubio A, Maseda M, Carnicero P, Folgueira L. Prolonged SARS-CoV-2 RNA detection by RT-PCR: variability in cycle threshold values over time. *Microbiol Spectr.* 2025;13(10):1–4.