

**EFEK PAPAN SUBKRONIK DEKOKTA DAUN NIMBA (*Azadirachta indica*)
TERHADAP KECEPATAN BERENANG DAN HIPERPLASIA LAMELA INSANG
PADA IKAN ZEBRA (*Danio rerio*) DEWASA**

Ulfa Auliyah, Ariani Ratri Dewi, Noer Aini
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

Email: ulfauliyah4@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Neem leaf (*Azadirachta indica*) are empirically used as antimalarials, but several studies show negative effects that are thought to be due to the toxicity of Neem leaf. In adult zebrafish toxic effects can be detected from the gill organs and motor systems which observed through swimming speed. This study aims to determine the effect of subchronic toxicity of neem leaf decoction (*DDN*) on swimming speed and hyperplasia of gill lamella in zebrafish (*Danio rerio*) adult.

Methods: Adult zebrafish are divided into four groups, namely the control group that is not exposed to *DDN*, therapeutic dose of *DDN* 50 mg/L, dose of MACTC 275 mg/L, and dose of LC₅₀ 1024 mg/L. Swimming speed is analyzed by *tracker software*. Gill was stained using *HE* and analyzed histologically for hyperplasia. Data were analyzed according to needs with p value <0.05.

Results: Subchronic *DDN* exposure in MACTC and LC₅₀ dosage decrease adult zebrafish's swimming speed by 36% and 45% compared to the control group. *DDN* in therapeutic dose, MACTC, and LC₅₀ significantly increase gill hyperplasia in adult zebrafish at 52%, 78%, and 86% compared to the control group. Gill hyperplasia in adult zebrafish increase at 70% in LC₅₀ dose compared to the therapy dose group and 35% compared to the MACTC dose group (p<0,05).

Conclusion: Subchronic administration of neem leaf (*Azadirachta indica*) decocta at therapeutic dose only increase gill hyperplasia, while at MACTC and LC₅₀ dosages to adult zebrafish decrease swimming speed and increase gill hyperplasia.

Keywords: neem leaf, swimming speed, hyperplasia of gill, adult zebrafish.

PENDAHULUAN

Salah satu tanaman yang digunakan sebagai herbal adalah Nimba (*Azadirachta indica*) khususnya bagian daunnya. Masyarakat meminum rebusan daun Nimba untuk mengatasi berbagai macam penyakit, diantaranya sebagai antimalaria¹. Pada penelitian sebelumnya secara *in vitro* menunjukkan bahwa daun Nimba memiliki efek penghambatan *Plasmodium falciparum* pada fase aseksual². Zat aktif pada daun Nimba seperti *azadirachtin*, *limunoid*, dan *gedunin* terbukti dapat menurunkan kadar derajat parasitemia dan *gedunin* dengan menghambat skizon dalam darah dan jaringan³.

Penggunaan daun Nimba sebagai pengobatan perlu dilakukan uji toksisitas. Efek samping paparan daun Nimba diduga dapat menyebabkan kerusakan struktur hepar dan ginjal⁶. Pada penelitian yang dilakukan oleh Deng, *et al* (2013), pemberian minyak Nimba pada tikus dengan dosis 1.600

mg/KgBB selama 28 hari menimbulkan perubahan histologis pada organ hepar dan ginjal. Salah satu parameter untuk menentukan derajat toksik pada tanaman yaitu dosis *Lethal Concentration 50* (LC₅₀). Dosis toksik tersebut apabila diberikan langsung pada hewan uji menyebabkan kematian 50% dari seluruh populasi⁷. Selain itu untuk melihat efek toksik yang ada dalam tubuh dengan melakukan pengamatan pada struktur organ.

Ikan zebra (*Danio rerio*) adalah hewan coba yang banyak digunakan sebagai uji toksisitas. Ikan zebra (*Danio rerio*) baik sebagai hewan coba karena memiliki kesamaan DNA 70-80% dengan manusia dan dapat digunakan sebagai bioindikator polutan⁸ karena memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap bahan toksik⁹.

Efek toksik suatu herbal dapat mengganggu fungsi organ, seperti pada sistem saraf dan sistem respirasi. Pada ikan yang terpapar bahan toksik pengamatan paling sensitif dapat dilihat pada sistem

saraf¹⁰. Gangguan sistem saraf dapat terlihat pada perubahan kecepatan berenang pada ikan yang diakibatkan gangguan sistem motorik. Perubahan kecepatan berenang pada ikan merupakan indikator yang mudah diamati pada ikan zebra dewasa¹¹. Insang pada ikan zebra dewasa berperan sebagai organ respirasi, osmoregulasi, dan ekskresi. Paparan zat toksik pada ikan zebra dewasa akan masuk melalui lamela primer kemudian didistribusikan ke lamela sekunder¹². Efek toksik suatu herbal dapat mengakibatkan perubahan struktur organ antara lain hiperplasia pada lamela insang¹³.

Penelitian mengenai uji toksisitas daun Nimba pada ikan zebra belum pernah dilakukan. Oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian mengenai efek paparan dekokta daun Nimba (*Azadirachta indica*) terhadap kecepatan berenang dan hiperplasia lamela insang pada ikan zebra (*Danio rerio*) dewasa.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium secara *in vivo* dengan *control group post test only design* menggunakan ikan zebra dewasa. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian dimulai dari bulan Desember 2017 sampai dengan Juni 2018. Penelitian ini mendapatkan kelayakan etik dari Komisi Etik Penelitian Institusi Biosains Universitas Brawijaya dengan Nomor. 923-KEP-UB tahun 2018.

Penentuan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan zebra dewasa usia 4 bulan yang didapatkan dari petani ikan Kabupaten Tulungagung dan telah diidentifikasi dan disertifikasi oleh Fakultas Kelautan dan Perikanan Universitas Muhammadiyah Malang dengan Nomor : 02/Analisis/Lab.Perikanan/FPP-UM M /X II/2017.

Ikan zebra dewasa dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kontrol, dosis terapi (50 mg/L), dosis MATC (275 mg/L), dan dosis LC₅₀ (1024 mg/L). Penentuan dosis tersebut didapatkan dari hasil kelompok pohon penelitian. Setiap kelompok masing-masing terdiri dari 6 ekor ikan zebra dewasa. Perhitungan jumlah ikan yang digunakan setiap kelompok menggunakan rumus Federer.

Pembuatan Dekokta Daun Nimba

Simplisia daun Nimba (*Azadirachta indica*) didapatkan dari Balai Matera Medika, Batu dan telah dideterminasi dengan Nomor: 074/440/102.7/2017.

Simplisia ditimbang dalam satuan mg, dimasukkan ke dalam panci dekok berisi air 1 L. Selanjutnya dipanaskan diatas air yang suhunya 90°C selama 30 menit dan sesekali diaduk. Setelah 30 menit, simplisia diangkat, didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring dan kasa¹⁴

Pengamatan Kecepatan Berenang

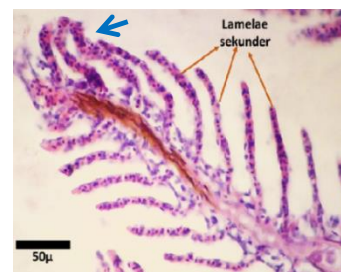
Pada pengamatan kecepatan berenang setiap kelompok dipapar dengan DDN sesuai dosis selama 30 menit kemudian kecepatan berenang di rekam menggunakan kamera. Hasil perekaman selanjutnya dimasukkan kedalam *software tracker* versi 4.9.8. Dipilih menu *autotrack* untuk mengikuti pergerakan ikan zebra dewasa. Data yang diperoleh dalam satuan sentimeter (cm), kemudian dibagi 60 detik. Hasil akhir kecepatan berenang dalam satuan (cm/s)¹⁵.

Pembedahan Hewan Coba dan Pengambilan Sampel

Pembedahan hewan coba dilakukan setelah 15 hari paparan DDN sesuai dosis. Setelah membiarkan ikan di lingkungan terbuka hingga tidak bergerak, kemudian bagian operkulum ikan zebra dipotong menggunakan gunting bedah. Pengambilan insang ikan zebra dewasa dilakukan dengan perlahan dan difiksasi dengan formalin 10%. Pembuatan preparat lamela insang dengan pewarnaan *Haematoxylin and eosin* (HE).

Pengamatan Histologis Lamela Insang Ikan Zebra Dewasa

Preparat yang telah terwarnai dengan HE diamati dibawah mikroskop *binokuler Olympus* dengan perbesaran 1000X. Hiperplasia lamela insang diidentifikasi dengan adanya penambahan jumlah sel pada lamela sekunder sehingga terlihat seperti pemukul bisbol atau *clubbing distal*¹⁶. Pengamatan histologis hiperplasia lamela insang dilakukan pada 6 sampel disetiap kelompok perlakuan dan diamati pada 5 lapang pandang oleh 3 orang pengamat.



Gambar 1 Hiperplasia Lamela Insang Ikan Zebra (*Danio rerio*) Dewasa¹⁷

Keterangan: Gambar 1 menunjukkan gambaran mikroskopis hiperplasia lamela insang yang ditunjukkan dengan anak panah berwarna biru.

Selanjutnya dilakukan penghitungan presentasi hiperplasia lamela insang dengan rumus:¹⁸

$$\% \text{ Hiperplasia} = \frac{\text{Jumlah hiperplasia lamela sekunder}}{\text{Total lamela sekunder}} \times 100\%$$

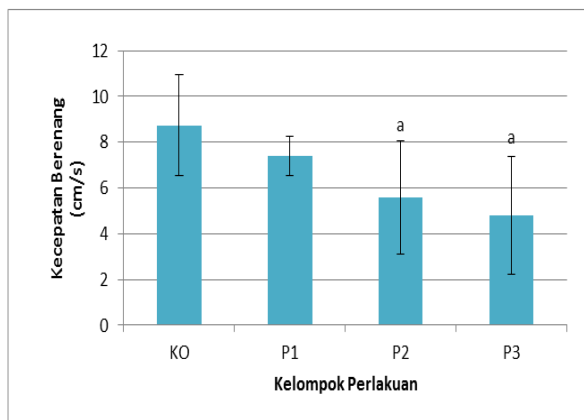
Analisis Data

Data kecepatan berenang dan hiperplasia lamela insang dianalisis dengan menggunakan *One Way ANOVA* untuk menguji hipotesis dilanjutkan *Post Hoc Test LSD* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan. Dinyatakan berbeda signifikan apabila ($p < 0.05$). Uji korelasi antara perubahan kecepatan berenang dengan hiperplasia lamela insang dilakukan menggunakan korelasi *Pearson*.

HASIL DAN ANALISIS DATA

Efek Dekokta Daun Nimba (*Azadirachta indica*) Terhadap Kecepatan Berenang Ikan Zebra (*Danio rerio*) Dewasa

Efek DDN terhadap kecepatan berenang pada ikan zebra dewasa dapat dilihat pada Gambar 2 di bawah ini:



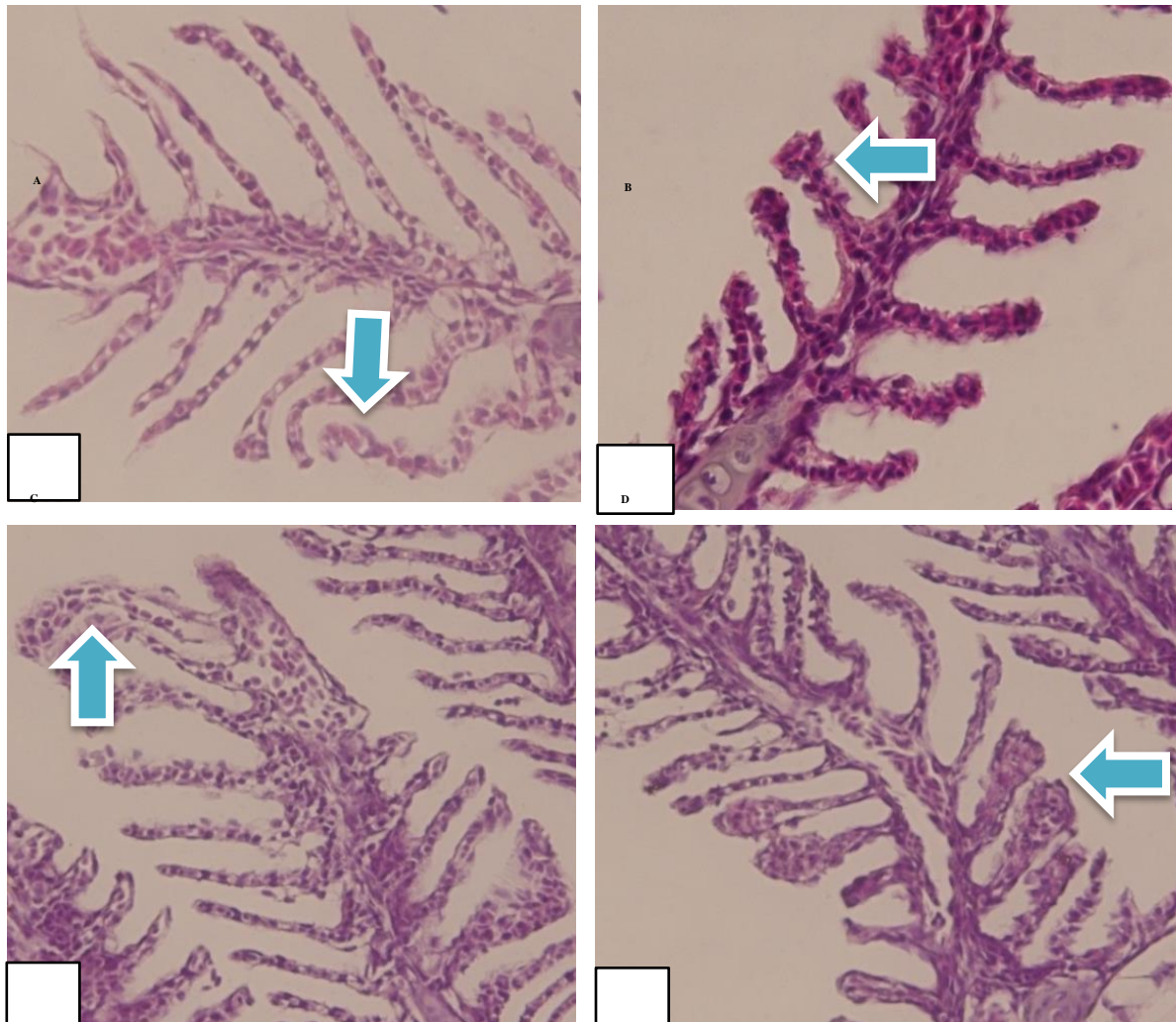
Gambar 2 Histogram Rerata Kecepatan Berenang pada Ikan zebra (*Danio rerio*) Dewasa

Keterangan:

Gambar 2 menunjukkan rerata kecepatan berenang pada ikan zebra (*Danio rerio*) dewasa pada KO ($8,74 \pm 2,20$), DDN dosis terapi 50 mg/L / P1 ($7,38 \pm 0,85$), DDN dosis MATC 275 mg/L / P2 ($5,59 \pm 2,48$), dan DDN dosis LC₅₀ 1024mg/L / P3 ($4,80 \pm 2,58$). Data dalam mean ± SD dan telah diuji statistik *One Way ANOVA* dengan nilai signifikan ($p < 0,05$). Notasi (a) signifikan terhadap KO.

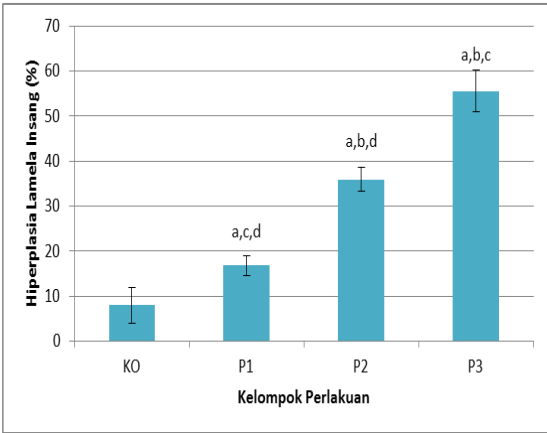
Gambar 2 menunjukkan bahwa pemberian DDN pada dosis terapi tidak signifikan menurunkan kecepatan berenang dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok dosis MATC dan LC₅₀ secara berturut-turut mampu menurunkan kecepatan berenang sebesar 36% dan 45% dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0,05$). Pada kelompok dosis LC₅₀ terjadi penurunan kecepatan berenang sebesar 14% dibandingkan dengan kelompok dosis MATC ($p > 0,05$).

Efek Dekokta Daun Nimba Terhadap Struktur Lamela Insang Ikan Zebra (*Danio rerio*) Dewasa



Gambar 3 Struktur Histologis Lamela Insang pada Ikan zebra (*Danio rerio*) Dewasa

Keterangan: Gambar 3 menunjukkan gambaran mikroskopis struktur histologis lamela insang pada ikan zebra dewasa pada kelompok kontrol (A), kelompok DDN dosis terapi 50 mg/L (B), kelompok DDN dosis MATC 275 mg/L (C), dan kelompok DDN dosis LC₅₀ 1024 mg/L (D) dengan perbesaran 1000x. Hiperplasia lamela insang pada ikan zebra (*Danio rerio*) dewasa ditunjukkan oleh anak panah yang ditandai dengan *clubbing distal* atau pemukul bisbol.



Gambar 4 Histogram Rerata Jumlah Hiperplasia Lamela Insang pada Ikan zebra (*Danio rerio*) Dewasa
Keterangan:

Gambar 4 menunjukkan rerata jumlah hiperplasia lamela insang pada ikan zebra (*Danio rerio*) dewasa pada KO ($8,03 \pm 3,96$), P1 ($16,77 \pm 2,21$), P2 ($35,93 \pm 2,62$), dan P3 ($55,53 \pm 4,63$). Data dalam mean \pm SD dan telah diuji statistik *One Way ANOVA* dengan nilai signifikan ($p < 0,05$). Notasi (a) signifikan terhadap KO, (b) signifikan terhadap P1, (c) signifikan terhadap P2, (d) signifikan terhadap P3.

Pemberian DDN pada kelompok dosis terapi, MATC, dan LC50 signifikan meningkatkan jumlah hiperplasia lamela insang ikan zebra dewasa sebesar 52%, 78%, dan 86% dibandingkan kelompok kontrol. Terdapat peningkatan jumlah hiperplasia lamela insang ikan zebra dewasa pada kelompok dosis LC50 sebesar 70% dibandingkan kelompok dosis terapi dan 35% dibandingkan dengan kelompok dosis MATC ($p < 0,05$).

Hubungan antara Perubahan Kecepatan Berenang dengan Hiperplasia Lamela Insang Ikan Zebra (*Danio rerio*) Dewasa

Hasil korelasi *Pearson* antara kecepatan berenang dengan hiperplasia lamela insang pada ikan zebra dewasa dapat dilihat pada Tabel 1

Tabel 1 Korelasi antara Perubahan Kecepatan Berenang dengan Hiperplasia Lamela Insang Ikan zebra (*Danio rerio*) Dewasa

		Kecepatan Berenang	Hiperplasia Lamela Insang
Kecepatan Berenang	Pearson	1	-.561**
	Correlation		
	Sig (2-tailed)		.004
Hiperplasia Lamela Insang	N	24	24
	Pearson	-.561**	1
	Correlation		
	Sig (2-tailed)	.004	
	N	24	24

Keterangan:

** = nilai koefisien korelasi dengan arah korelasi bertanda negatif

Analisis korelasi *Pearson* menunjukkan bahwa antara kecepatan berenang dengan hiperplasia lamela insang didapatkan korelasi yang signifikan dengan nilai koefisien korelasi sebesar -0,561.

PEMBAHASAN

Efek Dekokta Daun Nimba (*Azadirachta indica*) Terhadap Kecepatan Berenang Ikan Zebra (*Danio rerio*) Dewasa

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa pemberian secara subkronik dekokta daun Nimba dosis MATC dan LC50 menurunkan kecepatan berenang ikan zebra dewasa secara signifikan. Efek penurunan kecepatan berenang ikan zebra dewasa diduga berhubungan dengan dosis, zat aktif (*azadirachtin* dan *alkaloid*) dan interaksi antar zat aktif pada daun Nimba.

Azadirachtin yang termasuk golongan *terpenoid*¹⁹ bekerja pada sistem saraf pusat dengan cara menghambat aktivitas asetilkolinesterase yang merupakan enzim pengkatalis degradasi asetilkolin²⁰. Secara normal terjadinya transmisi neuromuskular dipengaruhi oleh ikatan asetilkolin pada reseptor nikotinik kolinergik di *motor end plate* yang terdapat pada otot skelet²¹. Jumlah asetilkolin yang berlebihan dapat menyebabkan depolarisasi yang terus menerus tanpa repolarisasi sehingga dapat terjadi paralisis otot yang dapat terlihat pada ikan zebra dewasa dengan ditandai penurunan kecepatan berenang²².

Senyawa *alkaloid* pada dekokta daun Nimba bekerja pada sistem saraf pusat sebagai agonis *gamma aminobutyric acid* (GABA) reseptor²³. GABA berfungsi sebagai penghambat neurotransmitter pada sistem saraf pusat. Apabila GABA teraktivasi maka akan terjadi pembukaan kanal ion klorida (Cl⁻) sehingga terjadi hiperpolarisasi pada membran post sinaps. Hiperpolarisasi akan menghambat penghantaran impuls dari pre sinaps menuju post sinaps sehingga asetilkolin di *motor end plate* jumlahnya menurun. Penurunan asetilkolin ini menyebabkan penghambatan pembukaan kanal ion natrium (Na⁺) akibatnya terjadi penurunan dari kontraksi otot²⁴.

Pada peningkatan dosis DDN diduga zat aktif didapatkan dalam jumlah yang besar sehingga dapat menyebabkan efek toksik dan menimbulkan interaksi yang sinergis. Interaksi sinergis beberapa zat aktif akan memberikan efek terapi lebih besar, namun jika berlebihan dapat menimbulkan efek toksik dan kerusakan pada organ dan jaringan²⁵. Interaksi sinergis yang terjadi antara zat aktif pada daun

Nimba yaitu *azadirachtin* dan *alkaloid*, mengakibatkan penurunan kontraksi otot sehingga kecepatan berenang pada ikan zebra dewasa menurun.

Pada penelitian sebelumnya diduga *azadirachtin* dapat menghambat aktivitas enzim asetilkolinesterase, sehingga menyebabkan asetilkolin terakumulasi di celah sinaps. Hal tersebut dapat mempengaruhi kontraksi otot yang ditandai dengan adanya abnormalitas gerak pada ikan zebra. Untuk memastikan adanya hambatan aktivitas enzim asetilkolinesterase maka diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas enzim asetilkolinesterase pada otot ikan zebra dewasa²⁶.

Efek Dekokta Daun Nimba terhadap Struktur Lamela Insang

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol didapatkan hiperplasia lamela insang ikan zebra dewasa. Secara teori insang berperan dalam proses respirasi, osmoregulasi, dan ekskresi. Insang merupakan organ respirasi utama yang berfungsi sebagai tempat difusi oksigen yang ada di air dan karbondioksida yang berada di darah. Oksigen yang terlarut dalam air akan berpindah menuju ke kapiler insang selanjutnya akan difiksasi oleh hemoglobin untuk dialirkan keseluruh tubuh. Karbondioksida akan dikeluarkan dari sel dan jaringan untuk dilepaskan ke air yang melewati insang. Oleh karena itu, perubahan yang terjadi pada lingkungan ikan zebra maka akan berdampak pada struktur dan fungsi dari insang³⁴.

Paparan DDN pada ikan zebra dewasa masuk melalui lamela primer kemudian akan didistribusikan ke lamela sekunder¹². Jika suatu zat toksik masuk, maka lamela insang akan melakukan respon adaptif untuk mengeluarkan toksikan. Respon yang terjadi yaitu peningkatan produksi mukus pada lamela sekunder insang. Penumpukan mukus yang berlebihan menyebabkan kerja insang tidak optimal. Hal ini menyebabkan insang melakukan kompensasi dengan cara penambahan jumlah sel pada lamela sekunder²⁷.

Hiperplasia yang terjadi pada kelompok kontrol diduga merupakan kondisi respon adaptif fisiologis akibat adanya radikal bebas endogen pada saat proses metabolisme aerobik maupun eksogen yang berasal dari paparan polusi. Pada kelompok kontrol terjadi hiperplasia lamela insang diduga adanya radikal bebas yang berlebihan, namun kadar antioksidan dalam tubuh tidak mencukupi sehingga menyebabkan terjadinya stres oksidatif²⁸.

Pada kelompok terapi didapatkan peningkatan jumlah hiperplasia lamela insang dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$). Diduga pada dosis terapi jumlah metabolit sekunder yaitu *flavonoid* yang bersifat sebagai anti oksidan tidak mampu menurunkan jumlah radikal bebas dalam tubuh ikan zebra dewasa sehingga mengakibatkan terjadinya stres oksidatif. Hal tersebut akan berakibat menurunnya jumlah oksigen dan nutrisi dalam tubuh sehingga menimbulkan kondisi iskemik dan kerusakan mikrovaskular²⁹. Tubuh ikan zebra kemudian merespon kondisi iskemik tersebut dengan menambah jumlah sel pada lamela sekunder sehingga teramati sebagai hiperplasia lamela insang²⁷.

Pemberian DDN dosis M A T C dan LC 50 meningkatkan jumlah hiperplasia lamela insang secara signifikan dibandingkan kontrol. Efek tersebut diduga berhubungan kandungan *flavonoid* dan *saponin* pada daun Nimba. Kedua zat aktif ini berfungsi sebagai antioksidan^{30,31}, namun apabila diberikan dengan dosis berlebihan maka akan menjadi prooksidan. *Flavonoid* dan *saponin* akan meningkatkan produksi *reactive oxygen spesies* (ROS) dan stres oksidatif. Kondisi iskemik akibat stress oksidatif pada ikan zebra memunculkan mekanisme kompensasi berupa hiperplasia lamela insang yang dimaksudkan untuk meningkatkan oksigenasi jaringan.

Pembentukan ROS juga akan mengakibatkan peroksidasi lipid dan kerusakan DNA, yang jika terjadi terus menerus dapat mengakibatkan kerusakan pada sel³². Selain pada insang, efek toksik DDN dapat diamati pada hepar sebagai organ yang berfungsi untuk metabolisme dan detoksifikasi zat toksik yang masuk dalam tubuh. Akumulasi zat toksik pada hepar akan menyebabkan kerusakan yang pada pengamatan secara histologis tampak sebagai nekrosis hepar.³³

Hubungan antara Perubahan Kecepatan Berenang dengan Hiperplasia Lamela Insang Ikan Zebra (*Danio rerio*) Dewasa

Analisis korelasi pada penelitian ini mendapatkan korelasi negatif antara perubahan kecepatan berenang dengan hiperplasia lamela insang. Hal tersebut berarti peningkatan jumlah hiperplasia lamela insang akan menurunkan kecepatan berenang.

Hiperplasia pada lamela sekunder merupakan salah satu mekanisme pertahanan tubuh ikan zebra dewasa terhadap zat toksik. Hal ini menyebabkan peningkatan jarak difusi untuk pertukaran oksigen sehingga terjadi insufisiensi oksigen didalam darah

yang menyebabkan hipoksia dan kegagalan pernafasan pada ikan zebra (*Danio rerio*) dewasa³⁵.

Keadaan hipoksia akan menyebabkan ikan akan bergerak lebih sering ke permukaan air untuk mengambil oksigen, mempengaruhi osmoregulasi pada ikan, mengakibatkan gangguan koordinasi gerakan kecepatan berenang dan pada akhirnya menurunkan kecepatan berenang³⁶.

SIMPULAN

Dari penelitian diatas dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian dekokta daun Nimba (*Azadirachta indica*) pada dosis M A T C (275mg/L) dan LC₅₀ (1024mg/L) menurunkan kecepatan berenang pada ikan zebra (*Danio rerio*) dewasa.
2. Pemberian dekokta daun Nimba (*Azadirachta indica*) pada dosis M A T C (275mg/L) dan LC₅₀ (1024mg/L) meningkatkan hiperplasia lamela insang ikan zebra (*Danio rerio*) dewasa.
3. Peningkatan jumlah hiperplasia lamela insang akan menurunkan kecepatan berenang ikan zebra (*Danio rerio*) dewasa.

SARAN

Untuk pengembangan penelitian, peneliti menyarankan

1. Melakukan penelitian efek dekokta daun Nimba (*Azadirachta indica*) terhadap aktivitas enzim asetilkolinesterase pada otot ikan zebra dewasa.
2. Melakukan penelitian efek pemberian dekokta daun Nimba (*Azadirachta indica*) secara kronis terhadap organ hepar pada ikan zebra dewasa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada IOM FK UNISMA yang telah mendanai penelitian. Kepada dr. Rahma Triliana, S.Ked., M.Kes., Ph.D sebagai reviewer jurnal. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada tim zebrafish yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ganguli, S. Neem : A tharepeutic for All seasons.*Current Science*.2002;82 (11):73-85.
2. Farahna, M., et al. Anti-plasmodial effects of *Azadirachta indica* in experimental cerebral malaria: Apoptosis of cerebellar Purkinje cells of mice as a marker. *North Am J Med Sci*. 2010. 2: 518-525
3. Gomase, PV *et al*. Phytochemical Evaluation And Hepatoprotective Activity Of Fresh Juice of Young Stem (Tender) Bark Of *Azadirachta Indica* A. Juss. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2011, Vol 3, Suppl 2.
4. Yadav, D.K., Bharitkar, Y.P., Chatterje, K. Ghosh, M., Mondal, N.B., dan Swarnaka, S. Importance Of Neem Leaf: An Insight Into Its Role In Combating Diseases. *Indian Journal Of Experimental Biology*.2016.;54: 708-718.
5. Alzoairy, M.A. Therapeutics Role Of *Azadirachta Indica* (Neem) And Theiractive Constituents In Diseases Prevention And Treatment. Artikel review. *Department of Medical Laboratories, College of Applied Medical Sciences, Qassim University, Buraidah, Saudi Arabia*.2016.
6. Kupradinun, P., A. Tepsuwan, N. Tanthasri, N. Meesiripan, S. Tunsakul, W. Tompat, Y. Jarratwisautpom, W.R. Kusamran. Toxicity Testing of Flowers of Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss). *Thai J. Vet. Med*. 2012; 40(1): 47-55.
7. Ibrahim, M. Uji lethal dose 50% (LD₅₀) polih herbal (*Curcuma xanthorrhiza*, *Kleinhovia hospital*, *Nigella sativa*, *Arcangelisia flava* dan *Ophiocephalus striatus*) pada heparin terhadap mencit (*Mus musculus*). Research & development Pt Royal Medicalink pharmalah.2012.
8. Detrich, H.W., Westerfield, M., Zon, L.L. *Essential Zebrafish Method: Genetics and Genomics* :Elsevier 1st edition. UK;2009.
9. Dai, Y., Jia, YF, Chen, N, Bian, WP, Li, QK, Mo, YB, Chen, YL, Pei, DS. *Zebrafish As A Model System To Study Toxicology*. A vaiable from : Wiley Online Library.2014.
10. Dhara K., Surjyo J B, and Susanta R K. Study on the toxicity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extracts as phytotoxicicide on three life stages of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) with special reference to their ethological responses. *Maulana Azad College*. India.2016.
11. Gerlai, R., Lee, V. dan Blasé, R. Effect Of Acute And Chronic Ethanol Exposure On The Behavior Of Adult Zebrafish (*Danio rerio*).*Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2006;85(4): 752-761.
12. Rastogi, S.C. *Essentials Of Animal Physiology 4 Th Ed. New Age Internasional (P) Ltd*:New Delhi;2007.
13. Cinar, K. *The histology and histochemical aspects of gills of the lower fish Pseudophoxinus anlyae*. Vet.Re. Commun. Department of Biology. Faculty of Science and Art Suleyman Demire University:Isparta. Turkey;2008.
14. Badan POM RI.*Acuan Sediaan Herbal*.Vol 7.Edisi 1. Penerbit Badan POM RI:Jakarta;2012.

15. Kalueff, Allan V. *The rights and wrongs of zebrafish: Behavioral phenotyping of zebrafish*. Diakses dari: Springer. 2017. [9 Juni 2018]
16. Ronald, JP. *Fish Pathology*. 4th Ed. Hoboken: Willey-Blackwell; 2012.
17. Sukiya dan Rizka, Apriani Putri. Perbandingan Struktur Insang dan Kulit Ikan Tipe Remainer (*Bathygobius fuscus*) dan Skipper (*Blenniella cynostigma*) Zona Intertidal Pantai Gunung Kidul. *Journal Sains Dasar*. 2016; 5(2): 107-115.
18. Pantung, N., Kerstin, GH., Herbert, FH., Voravit, C. Histopatological Alteration of Hybrid Walking Catfish (*Clarias macrocephalus x Clarias gariepinus*) in Acute and Sub acute Cadmium Exposure. *Environment Asia I*. 2008; 2: 22-27.
19. Palupi, D., Endang, Kusdiyati., Rully, Rahadian., dan A, Heru.P. Identifikasi Kandung Senyawa Fitokimia Minyak Biji Nimba (*Azadirachta indica, juss*). *Jurnal Biologi*. 2016; 5(2): 23-28.
20. Saputra, D.A., Rahman, A., dan Kusumawati, I. Aktivitas penghambatan asetilkolinesterase ekstrak etanol 96% Daun *Syzygium cumin*, *Syzygium aromaticum*, *Syzygium polyanthum*, dan *Syzygium aquaeum*. *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2015; 2(1): 23-26.
21. Erwin, I dan Donni, I.K. Inhibitor Asetilkolinesterase untuk Menghilangkan Efek Relaksan Otot Non-depolarisasi. *CDK-193*. 2012; 39 (5): 333-339.
22. Huang, Y., Zhang, J., Han, X & Huang, T. The Use of Zebrafish (*Danio rerio*) Behavioral Responses in Identifying Sublethal Exposures to Deltamethrin. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2014; 11(4): 3650-3660.
23. Fedurco, M.J., Gregorova, K., Sebrlova, J., Kantorova, O., Pes, R., Baur, E., Sigel & Eva, T.. Modulatory Effects of *Eschscholzia californica* Alkaloids on Recombinant GABA_A Receptors. *Biochemistry Research International, article ID 617620*, 9; 2015.
24. Guyton, A.C., & Hall, J.E. *Fisiologi Kedokteran*. EGC: Jakarta; 2008.
25. Wirasuta, I.M.G.A dan Rasmaya, N. *Buku Ajar Toksikologi Umum*. Universitas Udayana; 2007.
26. Nathan, S.S., Man, Y.C., Hong, Y., Seo, C., Chae, H.P., Kandaswamy, K., Jae, D.K. Effect of Azadirachtin On Acetylcholinesterase (AChE) Activity And Histology Of The Brown Planthopper *Nilaparvata lugens* (Stal). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 2007 : 244-250.
27. Fiest, S., Thain, J., dan Forlin, C. *Molecular Or Cellular Process And The Health Of The Individual*. P.147-152. In A.J Lawrence and K.L hemingway (Eds). Effect of pollution on fish. Blackwell publishing: UK; 2003.
28. Dharma, H.S. Peranan Antioksidan Endogen dan Eksogen Terhadap Kesehatan. *CKD-198*. 2012; 39(10): 793-794.
29. Parwata, I.M.O.A. *Buku Ajar Uji Bioaktivitas Antioksidan*. Program Sarjana Universitas Udayana; 2015.
30. Gupta, N.K. The Antioxidant Potential of *Azadirachta indica* Ameliorates cardioprotection Following Diabetic mellitus-induced microangiopathy. *Pharmacogn Mag*. 2016; 12(3): 371-378.
31. Marks, D.B., Marks, A.D., Smith, C.M. *Biokimia Kedokteran Dasar*. EGC: Jakarta; 2000
32. Mustamu, H.L., Endang, E., dan Laela, K.L. Efek berbagai dosis ekstrak etanol daun nimba (*azadirachta indica a juss*) terhadap penyembuhan luka insisi pada mencit swiss Webster jantan. *Journal of medicine and health*. 2016; 1(3): 242-251.
33. Sibarani, N.M.H., Berata, I. Ketut., dan Arjana, A.A.G. Studi Histopatologi Hepar Tikus Putih yang Diinduksi Aspirin Pasca Pemberian Madu Per Oral. *Indonesia Medicus Veterinus*, 2013. 2(5): 488-495.
34. Saputra, H.M., Netti, M., dan Putra, S. Struktur Histologis Insang dan Kadar Hemoglobin Ikan Asang (*Oateochilus hasseltii C.V*) di Danau Singkarak dan Maninjau, Sumatera Barat. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. 2013; 2(2): 138-144.
35. Hadi dan Alwan. 2012. Histopathological Changes in Gills, Liver, and Kidney of Fresh Water Fish, *Tilapia zillii*, Exposed to Aluminium. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*. 2013; 3(11): 2071-2081.
36. Lefevre, Sjannie. Hypoxia Tolerance And Partitioning Of Bimodal Respiration In The Striped Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Comparative Biochemistry And Physiology*. 2011; 158(2): 207214, doi: 10.1016/j.cbpa.2010.10.029, PMID 21056112.