

**UJI TOKSISITAS SUBKRONIK DEKOKTA DAUN NIMBA (*Azadirachta indica*
A. Juss) PADA DOSIS MATC DAN LC₅₀ TERHADAP JUMLAH HEPATOSIT
NEKROSIS IKAN ZEBRA (*Danio rerio*) FASE JUVENIL**

Baiq Marthayani Hilmi, Helmin Elyani**, Doti Wahyuningsih**, Noer Aini***

**Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang*

***Staff Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang*

Email : Martha.baiq@gmail.com

Abstract

Introduction : neem leaf has potential effect as an antidiabetic, antimalaria, and anticancer. However, some studies prove the negative effects of neem leaf, than still need to done a toxicity test for the LC₅₀ value and the effect of neem leaf on the liver as a detoxification organ. Toxicity tests were performed on juvenile zebra fish. The purpose of this study was to know the LC₅₀ dose, effect of the MATC and LC₅₀ dose of Neem Leaf Decoctation (DDN) on the number of hepatocyte necrosis of juvenile zebra fish.

Methods: In vivo experimental laboratory research with control group post test only design to determine subchronic LC₅₀ dose at 9 doses of DDN and calculation of hepatocyte necrosis in 4 groups (control, therapy, MATC, LC₅₀) after being explained 15 days of juvenile zebrafish. LC₅₀ data were analyzed using probit and number of hepatocyte necrosis were analyzed by *Kruskal Wallis* and *Mann-Whitney*, significant if $p < 0.05$. Correlation test using *spearman's rho*.

Result: Subchronic LC₅₀ value of DDN in juvenile zebrafish is 409,736 mg / L. Therapy doses reduce hepatocyte necrosis ($p > 0.05$) 19.53% compared to control. MATC and LC₅₀ doses increased hepatocyte necrosis ($p < 0.05$) 82.5% and 84.4% compared to the control group and 85.9% and 87.4% compared to the therapy dose group.

Conclusion: Subchronic LC₅₀ dose of the decoct of neem leaf is included in the category of almost toxic (409,736 mg/L). MATC and LC₅₀ doses increases the number of hepatocyte necrosis of juvenile zebrafish.

Keywords: neem leaf, juvenile zebrafish, LC₅₀ value, necrosis, hepatocytes

PENDAHULUAN

Nimba (*Azadirachta indica*) merupakan salah satu tanaman yang dimanfaatkan masyarakat sebagai obat herbal¹. Nimba (*Azadirachta indica*) merupakan salah satu tanaman yang dimanfaatkan masyarakat sebagai obat herbal, karena memiliki manfaat sebagai antimalaria, analgetik, antiinflamasi dan antioksidan⁴⁰. Namun, beberapa penelitian membuktikan daun nimba menyebabkan peningkatan kadar SGOT dan SGPT pada hepar dari ikan *rigala* (*Cirrhinus mrigala*) fase juvenile, peningkatan radikal bebas yang disebabkan penurunan aktivitas enzim katalase pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) (Winkler, 2006), dan penggunaan nimba secara empirik dilaporkan menyebabkan seorang anak mengalami keracunan (Boeke dkk, 2004).^{6,7}. Berdasarkan penelitian tersebut perlu dilakukan uji toksisitas pada ekstrak daun nimba.

Uji toksisitas dapat dilakukan dengan menentukan nilai *Lethal Concentration 50%* (LC₅₀) daun nimba dalam waktu sub kronik⁸. Uji toksisitas juga dilakukan untuk mengetahui efek daun nimba pada organ hewan coba⁹. Organ yang rentan terhadap zat toksik adalah hepar karena merupakan organ yang berfungsi sebagai detoksifikasi, Akumulasi toksik pada hepatosit dapat menyebabkan kerusakan hepar hewan coba¹⁰. Hewan

coba yang dapat digunakan dalam uji toksisitas adalah Ikan Zebra (*Danio rerio*)⁸.

Ikan zebra (*Danio rerio*) memiliki 70% DNA yang homolog dengan manusia dan mampu memperlihatkan efek paparan toksik yang sama pada manusia¹¹. Salah satu tahap kehidupan ikan zebra yang dapat diamati untuk melihat efek toksik adalah fase juvenile¹². Kelebihan fase juvenile sebagai hewan coba adalah zat toksik langsung memapar permukaan tubuh ikan zebra¹², ukuran tubuh ikan yang kecil meningkatkan kecepatan distribusi dan akumulasi dari zat toksik dan umur ikan dapat menjelaskan tingkat sensitivitas ikan terhadap suatu bahan toksik¹³. Fase juvenil merupakan fase yang mewakili masa anak-anak yang sering mengalami penyakit infeksi. Berdasarkan penelitian anak yang diinduksi oleh obat yang memiliki efek hepatotoksik dapat menyebabkan abnormalitas fungsi enzim hepar sehingga mengganggu proses pertumbuhan¹⁴.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui nilai toksik dari dekokta daun nimba yang dikonsumsi dalam waktu subkronik dan untuk mengetahui efek dekokta daun nimba terhadap hepatosit ikan zebra fase juvenile.

METODE PENELITIAN

Metode penelitian eksperimental laboratorium secara *in vivo* menggunakan desain penelitian *control group post test only design*. Penelitian berlangsung di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang, bulan Desember 2017-Juni 2018. Mendapatkan kelayakan etik dari Komisi Etik Penelitian Institusi Biosains Universitas Brawijaya dengan No. 923-KEP-UB, 2018.

Tahap Penelitian

Aklimatisasi Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah ikan zebra fase juvenil usia 1-2 bulan, mendapatkan sertifikasi dari Fakultas Kelautan dan Perikanan Universitas Muhammadiyah Malang dengan Nomor : 02/Analisa/Lab.Perikanan/FPP-UM M /X II/2017. Hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari dalam aquarium berukuran 60cm x 30cm x 35cm yang dilengkapi dengan *aerator set*, termometer dan *heater* dengan suhu 28-29 °C

Pembuatan dan Penentuan Dosis Dekokta Daun Nimba

Simplisia daun nimba (*Azadirachta indica A.Juss*) diperoleh dari Balai Materia Medika, Batu. Simplisia ditimbang dalam satuan mg, dimasukkan ke pelarut air 1 L, satuannya menjadi mg/L (ppm), selanjutnya dipanaskan diatas air yang suhunya 90°C selama 30 menit. Hasil dekoktasi daun nimba (*Azadirachta indica A.Juss*) didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring dan kasa kemudian di vakum. Dosis yang digunakan untuk menentukan nilai LC₅₀ yaitu 75mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L, dan 600 mg/L, 700 mg/L, dan 800 mg/L berdasarkan *trial dose*. Dosis yang digunakan untuk menentukan MATC yaitu 50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L, 125 mg/L, 150 mg/L, dan 175 mg/L berdasarkan *trial dose* dari kelipatan 25mg/L¹⁵.

Penentuan Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah ikan zebra fase juvenile umur 1-2 bulan. Penentuan nilai LC₅₀ menggunakan minimal 10 ekor ikan zebra fase juvenil per kelompok perlakuan⁸. Terdapat 9 kelompok dosis dengan 3 kali pengulangan sehingga ikan yang dibutuhkan 270 ekor ikan zebra fase juvenile. Sampel yang digunakan pada pengamatan hepatosit nekrosis adalah 5 ekor ikan pada setiap kelompok perlakuan, penentuan sampel berdasarkan perhitungan menggunakan software "*power sampel size G power*"¹⁶. Terdapat 4 kelompok perlakuan sehingga total sampel yang digunakan adalah 20 ekor ikan zebra fase juvenil.

Penentuan Nilai LC₅₀ dan MATC

Penentuan nilai LC₅₀ menggunakan 9 dosis dan penentuan nilai MATC menggunakan 6 dosis dekokta daun nimba yang dipaparkan pada ikan zebra fase juvenil dalam aquarium kecil dilengkapi aerator selama 15 hari dan penggantian dekokta daun nimba setiap <24 jam. Nilai LC₅₀ didapatkan dari analisa probit dan nilai

MATC didapatkan dari rumus $MATC = \sqrt{LOEC \times NOEC}$.

Perlakuan Uji Hepatosit Nekrosis Ikan Zebra Fase Juvenile

Kelompok perlakuan dibagi menjadi 4 yaitu kontrol (*purified water*), dosis terapi (50 mg/L), dosis MATC (132 mg/L), dan dosis LC₅₀ (140 mg/L). Dipaparkan pada ikan zebra fase juvenile dalam aquarium kecil dilengkapi aerator selama 15 hari dan penggantian dekokta daun nimba setiap <24 jam. Setelah 15 hari ikan dibedah untuk mengambil organ hepar. Setelah pembedahan, organ dimasukkan dalam formalin 10%. Selanjutnya adalah pembuatan preparat dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin*.

Pembuatan Preparat Organ Hepar Ikan Zebra Fase Juvenil

Pemberian label sesuai kelompok perlakuan, dilakukan proses dehidrasi, tahap kedua dilakukan penjernihan, tahap ketiga yaitu impregnasi, tahap keempat adalah pengeblokan. Setelah blok parafin terbentuk dilakukan pemotongan dengan mikrotom. Selanjutnya dilakukan deparafinasi. Kemudian tahap pewarnaan jaringan dengan tahap hidrasi menggunakan alkohol, kemudian dimasukkan kedalam air selama 10 menit, selanjutnya pengecetan dengan cat utama yaitu harris hematoxilin selama 10 menit selanjutnya dicuci pada air mengalir kemudian dicelupkan pada alkohol asam 1% 3-5, kemudian dicelupkan pada aminia air 5-10 celup, selanjutnya dilakukan cat pembanding dengan eosin 1%, kemudian dilakukan dehidrasi lagi dengan alkohol, selanjutnya penjernihan dengan xylol, tahap akhir mounting dengan etelen dan deckglass. Selanjutnya dilakukan analisa preparat.

Pengamatan Histologi Hepatosit Ikan Zebra Fase Juvenil

Pengamatan histologi hepatosit ikan zebra fase juvenile dilakukan pada 5 sampel di setiap kelompok perlakuan, diamati pada 5 lapang pandang oleh 3 orang pengamat dengan mikroskop *binokuler Olympus* perbesaran 1000X. Setiap lapang pandang, yang diamati adalah hepatosit yang mengalami nekrosis dengan gambaran perubahan pada inti sel yaitu, kariolisis (warna benang-benang kromatin memudar), piknosis (inti sel mengeci dan DNA menggumpal) dan karioreksis (DNA terfragmentasi)¹⁷. Berdasarkan hasil hitung 3 orang pengamat dilakukan penghitungan persentase rerata hepatosit nekrosis untuk setiap sampel.

$$\% \text{ jumlah nekrosis} = \frac{\text{jumlah hepatosit nekrosis}}{\text{jumlah hepatosit total}} \times 100\%$$

Analisa Data

Nilai LC₅₀ didapatkan dari hasil rerata kematian ikan zebra fase juvenile dianalisa dengan uji *Probit*. Data persentase rata-rata hepatosit nekrosis ikan zebra fase juvenile, uji normalitas dan homogenitas menggunakan Kolmogorov-Smirnov dan *Levene*, Analisa data menggunakan *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan *Mann-Whitney* untuk menentukan

kelompok yang signifikan. Hasil dikatakan signifikan jika $p < 0,05$. Uji korelasi antara kelompok perlakuan dengan persentase rerata nekrosis menggunakan korelasi *spearman's rho*.

HASIL

Dosis *Lethal Concentration 50%* (LC₅₀) Sub Kronik Dekokta Daun Nimba (*Azadirachta indica* A. Juss) pada Ikan Zebra (*Danio rerio*) Fase Juvenil

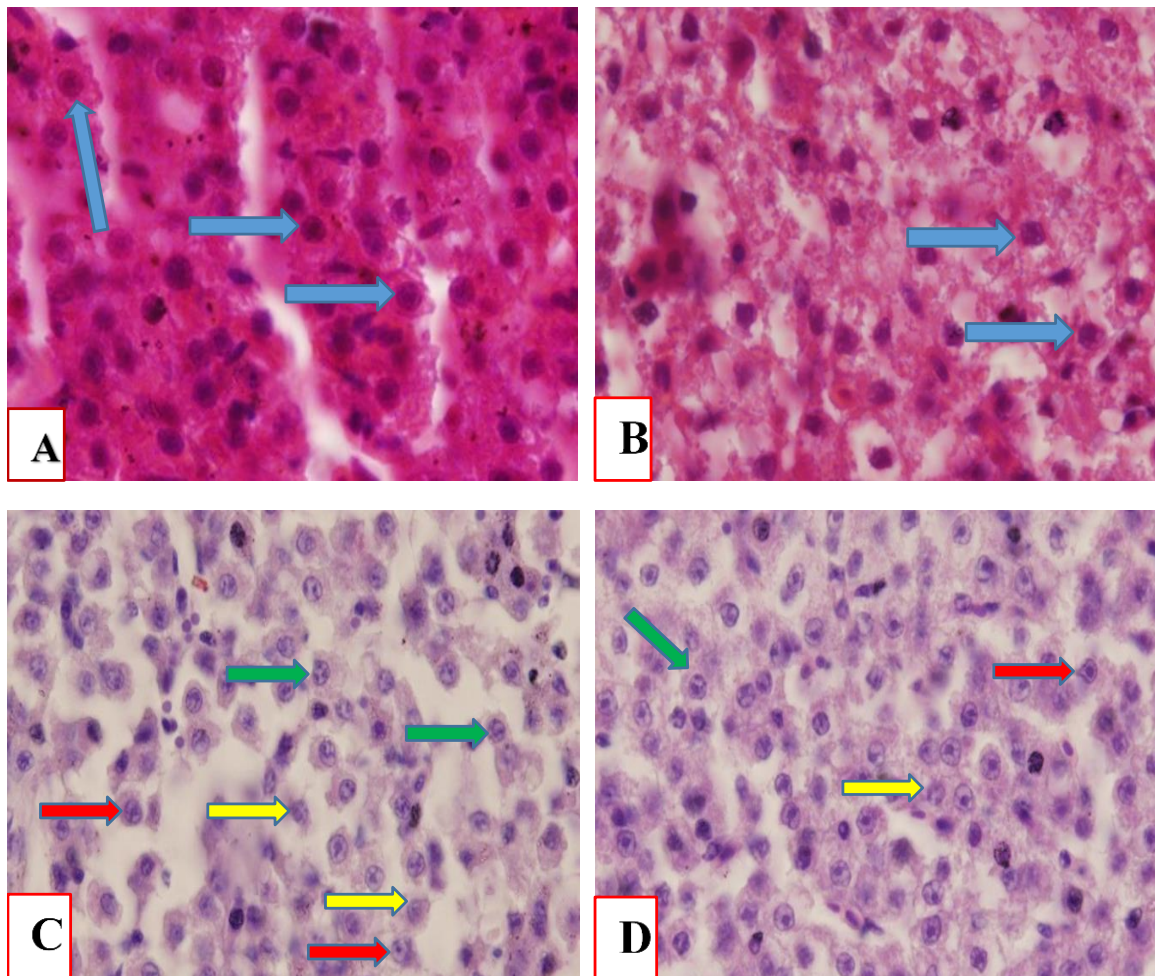
Tabel 1 Rerata Persentase Kematian Ikan Zebra Fase Juvenil Yang dipaparkan Dekokta Daun Nimba Secara Sub Kronik

Dosis (mg/L)	Rerata Kematian ± SD %
75	0% ± 0,00
100	10% ± 1,73
200	23% ± 1,53
300	40% ± 2,00
400	53% ± 0,58
500	53% ± 2,31
600	97% ± 0,58
700	87% ± 2,31
800	83% ± 2,89
0,9	870,121

Keterangan: analisa probit nilai LC₅₀ sub kronik dekokta daun nimba.

Berdasarkan persentase rerata kematian pada tabel 1, kematian 50% dari ikan zebra fase juvenil terdapat pada dosis 400mg/L dan 500mg/L. Berdasarkan Analisa probit pada table 2, didapatkan nilai LC₅₀ sub kronik dekokta daun nimba adalah 409,736 mg/L, yang termasuk dalam kategori hampir toksik (>100-≤1000mg/L) (Gesamp,2002). Dosis M A T C yang diperoleh dari hitungan persentase kematian ikan zebra fase juvenile memiliki nilai 132 mg/L.

Hasil Paparan Subkronik Dekokta Daun Nimba (*Azadirachta indica* A.Juss) Terhadap Jumlah Hepatosit Nekrosis Ikan Zebra (*Danio rerio*) Fase Juvenil

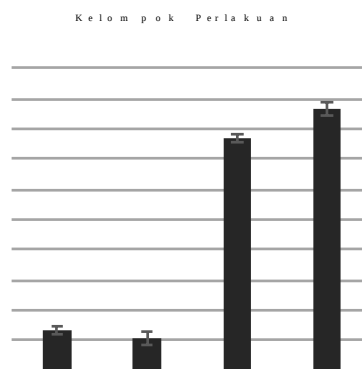


Gambar 1 Gambaran Hepatosit Ikan Zebra Yang Diberi Paparan Dekokta Daun Nimba

Keterangan : Gambar 5.2 merupakan gambaran hepatosit ikan zebra dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* yang diamati pada mikroskop binokuler perbesaran 1000x. gambar A. Kontrol, B. Dosis Terpai (50 ppm), C. Dosis MATC (132 ppm), D. Dosis LC_{50} (410 ppm). ↑ merupakan gambar hepatosit normal, ↑ hepatosit nekrosis (kariolisis), ↑ hepatosit nekrosis (piknosis), ↑ hepatosit nekrosis (karioreksis)

Tabel 3 Rerata Persentase Hepatosit Nekrosis Ikan Zebra

Kelompok Penelitian	Rerata $\pm$ SD (%)
Kontrol	13,46 $\pm$ 1,05 ^a
Terapi	10,83 $\pm$ 2,24 ^a
MATC	77,11 $\pm$ 1,37 ^b
LC50	86,32 $\pm$ 2,2 ^c



Gambar 2 Histogram Rerata Persentase Hepatosit Nekrosis Ikan Zebra Fase Juvenil

Keterangan: tabel 3 dan gambar 2 merupakan hasil hitungan persentase rerata hepatosit nekrosis ikan zebra yang dipaparkan dekokta daun nimba dalam waktu sub kronik (15 hari). Notasi ^a $p < 0,05$ terhadap kelompok dosis MATC dan LC50, notasi ^b $p < 0,05$ terhadap kelompok kontrol, dosis terapi, dan dosis LC50, notasi ^c $p < 0,05$ terhadap kelompok kontrol, dosis terapi dan dosis MATC.

Pada kelompok dosis terapi tidak terjadi peningkatan jumlah hepatosit nekrosis ikan zebra fase juvenile dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok dosis MATC dan LC50 terjadi peningkatan hepatosit nekrosis ikan zebra fase juvenile ($p < 0,05$) sebesar 82,5% dan 84,4% dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok dosis MATC dan LC50 terjadi peningkatan hepatosit nekrosis ikan zebra fase juvenile ($p < 0,05$) sebesar 85,9% dan 87,4% dibandingkan kelompok dosis terapi, sedangkan pada kelompok dosis LC50 terjadi peningkatan hepatosit nekrosis ikan zebra fase juvenil sebesar 10,7% ($p < 0,05$) dibandingkan kelompok dosis MATC.

Tabel 4 Hasil Korelasi Kelompok Perlakuan dengan Jumlah Hepatosit Nekrosis

Kelompok penelitian	Kelompok penelitian	Rerata Hepatosit nekrosis
Kelompok penelitian	Correlation Coefficient	1.000
	Sig. (2-tailed)	.816**
	N	20
Rerata Hepatosit nekrosis	Correlation Coefficient	.816**
	Sig. (2-tailed)	.000
	N	20

Keterangan: tabel 4 hasil uji korelasi antara kelompok kontrol, terapi, MATC dan LC50 dengan rerata persentase hepatosit nekrosis. Didapatkan koefisien korelasi 0,816** ($p < 0,05$) dan arah hubungan positif.

daun nimba pada ikan zebra fase juvenil adalah 409,736 mg/L yang termasuk dalam tingkat hampir toksik ($> 100 - \leq 1000$)¹⁸. Efek toksik dekokta daun nimba dipengaruhi oleh zat aktif pada nimba yang bersifat toksik¹⁹, tingkat dosis dan waktu paparan daun nimba²⁰, ukuran tubuh dan umur dari ikan zebra²¹. Ekstrak air daun nimba dengan metode dekoktasi menarik beberapa zat aktif seperti azadirachtin²², quercetin dan alkaloid²³.

Azadirachtin merupakan golongan terpenoid, memiliki sifat toksik yang dapat menginduksi kematian hewan coba²¹. Berdasarkan teori azadirachtin dapat menghambat asetilkolinesterase pada *neuromuscular junction*²⁴. Asetilkolinesterase adalah enzim yang mendegradasi asetilkolin menjadi kolin dan asetat²⁴. Hambatan pada kerja asetilkolinesterase menyebabkan tubuh tidak akan mampu menerima suatu impuls baru²⁵, depolarisasi yang berlebihan²⁴ dan kerusakan sel neuron²⁵. Kerusakan pada sistem saraf pusat dan sistem saraf tepi pada ikan dapat dinilai dari perubahan perilaku umum²⁵ dan gerak ikan yang abnormal²⁶. Selain itu gangguan pada sistem *neuromuscular junction* mempengaruhi gerak dari insang, sehingga gagal melakukan kompensasi dalam pengambilan oksigen²⁴. Penghambatan pada Ache menyebabkan akumulasi dari Ach yang akan meningkatkan kerja saraf parasimpatis pada jantung sehingga menyebabkan penurunan frekuensi detak jantung, penurunan frekuensi detak jantung diduga menjadi salah satu faktor yang dapat menyebabkan terjadinya penurunan oksigen kejaringan karena kerja jantung yang menurun⁴⁵.

Kematian pada hewan coba juga dipengaruhi oleh tingkatan dosis dan lama paparan dari daun nimba²¹. Dosis nimba yang tinggi dan paparan yang lama akan mengubah efek terapi dari zat aktif quercetin dan alkaloid. Quercetin merupakan golongan polypenolic flavonoid dengan efek hipoglikemi yang dimanfaatkan sebagai obat antidiabetes²⁷. Namun, pada dosis yang lebih tinggi dari dosis terapi efek hipoglikemi menyebabkan fungsi kognitif terganggu dan

menyebabkan penurunan kesadaran²⁸. Hypoglikemi disebabkan oleh penghambatan enzim α amilase dan α glukosidase yang berfungsi memecah karbohidrat dan penghambatan SGLT1 sebagai Na/Glukosa transport pada sel epitel intestin²⁹. Alkaloid pada dosis yang tinggi menyebabkan peningkatan kerja dari neurotransmitter asetilkolin sehingga menyebabkan kejang hingga kelumpuhan atau gagal nafas³⁰.

Selain itu penggunaan hewan coba ikan zebra fase juvenil dengan ukuran tubuh ikan yang kecil diduga mempengaruhi kecepatan distribusi dan akumulasi dari zat toksik, perkembangan fungsi insang dari ikan belum sempurna sehingga menurunkan kemampuan penyerapan oksigen dalam mengatasi efek dari zat toksik dekokta daun nimba²⁰.

Efek Paparan Subkronik Kelompok Kontrol Dan Dosis Terapi Dekokta Daun Nimba (*Azadirachta Indica* A.Juss) Terhadap Jumlah Hepatosit Nekrosis Ikan Zebra (*Danio Rerio*) Fase Juvenil

Berdasarkan analisa data, dosis terapi tidak signifikan meningkatkan jumlah hepatosit nekrosis ikan zebra fase juvenil dibandingkan kelompok kontrol. Namun persentase rerata hepatosit nekrosis ikan zebra pada kelompok kontrol lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok dosis terapi. Berdasarkan teori jumlah nekrosis yang terjadi pada kelompok kontrol masuk dalam kategori ringan karena kurang dari 30%⁴⁰.

Nekrosis yang terjadi pada kelompok kontrol diduga kondisi fisiologis dari mekanisme detoksifikasi hepar terhadap semua benda yang masuk dalam tubuh dan proses kimia dalam pembentukan energi.

Fungsi fisiologis hepar akan menghasilkan suatu *Reaktif Oxygen Species* (ROS). Metabolisme zat asing pada hepar terjadi dalam 2 fase. fase I bahan asing berikatan dengan sitokrom p450 pada ikan zebra diekspresikan oleh gen CYP3A65 dan CYP3A4 yang homolog dengan manusia³². Ikatan tersebut diberikan elektron dari proses perubahan Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} oleh NADPH sitokrom p450 reduktase kemudian benda asing berikatan dengan molekul oksigen dan menghasilkan superoksida ($O_2^{\cdot-}$). Fase II merupakan tahap konjugasi senyawa asing dalam tubuh. Senyawa yang berpotensi toksik dikonjugasikan oleh glutathione yang dikatalisis oleh *glutathione S-transferase* (GST). Pada ikan zebra glutathione yang diekspresikan oleh gen GSTA1 dan GSTA2³².

Secara fisiologis tubuh akan tetap memproduksi radikal bebas dalam jumlah yang kecil dalam proses oksidasi-reduksi selama proses respirasi mitokondria dan pembentukan energi¹⁷.

Pada kelompok kontrol diduga antioksidan endogen tidak seimbang dengan ROS yang terbentuk. ROS yang tidak berikatan dengan antioksidan bereaksi menyebabkan peroksidase lipid sehingga terjadi kerusakan membran dan meningkatkan influx Ca^{2+} ke intrasel, hal ini menyebabkan aktivasi beberapa enzim seperti protease dan endonuklease yang dapat menginduksi kematian secara nekrosis¹⁷.

Pada kelompok dosis terapi jumlah hepatosit nekrosis mengalami penurunan diduga karena ROS yang terbentuk dapat dinetralkan oleh antioksidan dari daun nimba. Berdasarkan penelitian, jumlah antioksidan pada ikan yang terpapar daun nimba lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol³⁶. Daun nimba memiliki kandungan quercetin yang diketahui memiliki efek antioksidan. Sifat Antioksidan quercetin dibentuk oleh gugus hidroksil fenolik yang melekat pada cincin struktur. Mekanisme kerjanya sebagai pereduksi, mendonorkan hidrogen, menetralkan radikal superoksida dan mengendalikan logam. Flavonoid juga mengaktifkan enzim antioksidan³⁷ yang berdasarkan penelitian kandungan flavonoid pada nimba signifikan meningkatkan kadar glutathione peroksidase sebagai suatu antioksidan untuk mengubah H_2O_2 menjadi oksigen dan molekul air³⁸.

Ekstrak air daun nimba diketahui menurunkan aktivitas detoksifikasi pada fase I dan menginduksi peningkatan detoksifikasi fase II. Penelitian membuktikan terjadinya penurunan aktivitas dari kelompok enzim monooksigenase salah satunya *cytokrom P450* yang berperan besar dalam proses detoksifikasi fase I. Penelitian sebelumnya juga membuktikan peningkatan dari *glutathione S-transferase* dan *UDP-Glucuronosyltransferase* yang berkerja pada fase II proses detoksifikasi^{7, 41}.

Tingginya aktivitas antioksidan dan detoksifikasi fase II diduga menjadi penyebab, penurunan kematian sel secara nekrosis.

Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian priharsa (2017) yang menunjukkan adanya penurunan hepatosit nekrosis pada kelompok dosis terapi dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Efek Paparan Subkronik Dekokta Daun Nimba (*Azadirachta indica* A.Juss) Dosis M ATC dan LC 50 Terhadap Jumlah Hepatosit Nekrosis Ikan Zebra (*Danio rerio*) Fase Juvenil

Berdasarkan Analisa data dosis M ATC dan LC 50 signifikan meningkatkan jumlah hepatosit nekrosis ikan zebra fase juvenil dibandingkan dengan kelompok kontrol dan dosis terapi ($p < 0,05$). Hal ini didukung oleh teori bahwa daun nimba mengandung zat aktif azadirachtin dan nimbolide yang memiliki efek toksik pada sel^{19,24}. Pada Analisa data, jumlah nekrosis pada kelompok dosis M ATC tinggi karena sifat sitotoksik dari daun nimba yang diekstrak dengan air terdapat pada dosis 187 mg/L

Adanya paparan berulang dari nimba selama 15 hari menyebabkan mekanisme detoksifikasi dari hepatosit meningkat sehingga produksi dari radikal bebas nimbolide dan superoksida meningkat, hal ini didukung oleh teori penelitian bahwa nimba memiliki kandungan *nimbolide* yang signifikan meningkatkan radikal bebas²². Superoksida ($O_2^{\cdot-}$) yang terbentuk pada fase I metabolisme akan diubah oleh SOD menjadi H_2O_2 yang bersifat toksik, sehingga pada proses ini dibutuhkan peran katalase dan GST untuk mengubah H_2O_2 menjadi molekul air dan oksigen. Selain itu nimba memiliki kandungan *quercetin* yang memiliki aktivitas

prooksidan pada dosis yang tinggi seperti dosis MATC dan LC₅₀. Mekanisme terbentuknya prooksidan dari *quercetin* adalah metabolisme dari *quercetin* dapat memebentuk beberapa senyawa yang bersifat prooksidan seperti *o-semiquinon*, *o-quinon*, *aryloxyl* dan *DT-diaphorase* yang bersifat cytotoksik sehingga dapat merusak sel. Selain itu metabolisme *quercetin* menghasilkan beberapa radikal bebas seperti *superoksida*, *radikal hidroksil* dan H₂O₂. Radikal tersebut dapat menyerang sel sehingga menyebabkan kerusakan DNA, lipid dan organel lainnya.

Zat aktif azadirachtin yang terdapat pada nimba memiliki efek penghambatan sintesis protein sehingga menyebabkan penurunan produksi enzim katalase dan *glutathione S-transferase* (GST)¹⁹. Akumulasi ROS yang tidak sebanding dengan antioksidan dalam hepatosit menyebabkan permeabilitas membrane sel hepatosit rusak sehingga kalsium masuk ke intrasel. Peningkatan kalsium di intrasel akan menyebabkan peningkatan permeabilitas mitokondria sehingga terjadi pengeluaran enzim-enzim dari mitokondria. Salah satu enzim yang keluar ke sitosol adalah endonuklease yang akan menyebabkan kerusakan inti sel sehingga menginduksi kematian sel jalur nekrosis¹⁷.

Berdasarkan hasil analisa didapatkan adanya korelasi positif antara peningkatan dosis dari daun nimba dengan jumlah hepatosit nekrosis. Penelitian sebelumnya membuktikan senyawa nimbolide menyebabkan induksi kematian secara apoptosis pada dosis yang lebih rendah, sedangkan pada dosis yang lebih tinggi menyebabkan kematian sel secara nekrosis³⁵. Penelitian sebelumnya juga membuktikan paparan dekokta daun nimba pada dosis yang lebih tinggi dari LC₅₀ secara signifikan menurunkan aktivitas katalase sedangkan GST mengalami peningkatan pada dosis LC₅₀ namun mengalami penurunan pada dosis yang lebih tinggi dari LC₅₀, sehingga diduga sintesis GST yang menurun karena tingginya kadar toksikan dalam daun nimba menginduksi kematian secara nekrosis⁷.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan maka dapat disimpulkan

1. Dosis *Lethal Concentration 50%* (LC₅₀) subkronik dekokta daun nimba pada ikan zebra fase juvenil adalah 409.736 mg/L dab termasuk dalam tingkat hampir toksik.
2. Pemberian dekokta daun nimba dosis MATC dan LC₅₀ Subkronis signifikan meningkatkan jumlah hepatosit nekrosis pada ikan zebra fase juvenil.
3. Peningkatan dosis dekokta daun nimba subkronis signifikan berkorelasi dengan peningkatan jumlah hepatosit nekrosis pada ikan zebra fase juvenil.

SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian kadar *radikal superoxide* (O₂^{*}) dan *Superoxida Dismutase* (SOD) hepar ikan zebra fase juvenil pada semua kelompok penelitian.

2. Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek dekokta daun nimba terhadap proses detoksifikasi dengan mengukur kadar enzim *cytokrom p450* dan *glutathione S-Transferase* pada jaringan hepar ikan zebra fase juvenil.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada IOM (Ikatan Orang Tua Mahasiswa) yang telah memberikan dana penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dzakiya N., Dkk. Pemanfaatan Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) sebagai Pestisida Alami yang Aman Bagi Makhluk Hidup dan Ramah Lingkungan. Fakultas Mipa, Universitas Negeri Malang, Malang. 2010.
2. Maithani A., Versha P., Geeta P., Ishan D., and Deepak K. *Azadirachta indica* (NEEM) LEAF: A REVIEW. *Journal of Pharmacy Research*. India. 2011. 4(6):1824-1827.
3. Akinola O.B., Ezekiel A., Caxton-M., and Luciana D. Chronic Treatment with Ethanolic Extract of the Leaves of *Azadirachta indica* Ameliorates Lesions of Pancreatic Islets in Streptozotocin Diabetes. *Int. J. Morphol.* 2010. 28(1): 291-302.
4. Bhawar S.B and Bhanudas S.K. Evaluation Of Neem-Artemether Combination For Antimalarial Activity In *Plasmodium Berghei* Infected Mice. *European Journal Of Pharmaceutical and Medical Research*. 2016. 3(3): 213-216.
5. Roma A, dkk. Selective Induction of Apoptosis by *Azadirachta indica* Leaf Extract by Targeting Oxidative Vulnerabilities in Human Cancer Cells. *J Pharm Pharm Sci*. 2015. 18(4): 729-746.
6. Saravana M., M. Ramesh, A. Malarvizhi and R. Petkam. Toxicity of Neem Leaf Extracts (*Azadirachta indica* A. Juss) on Some Haematological, Ionoregulatory, Biochemical and Enzymological Parameters of Indian Major Carp, *Cirrhinus mrigala*. *Journal of Tropical Forestry and Environment*. 2011. 1(01): 14-26.
7. Winkaler E.U, Thiago R.M. S, Joaquim G M and Cláudia B.R. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2006. 236-244.
8. OECD. Guidelines For The Testing Of Chemicals. 2012. 1-20.
9. Soemirat J. Toksikologi Lingkungan. Yogyakarta: Gajahmada University Press. 2005.
10. Rajini A., Revathy and G. Selvam. Histopathological Changes in Tissues of *Danio rerio* Exposed to Sub Lethal Concentration of Combination Pesticide. *Indian Journal of Science and Technology*. 2015. Vol 8(18).
11. Hollert H. and Steffen H. K. *Danio rerio* as a model in aquatic toxicology and sediment research. *Environ Sci Pollut Res*. 2015. 22: 16243-16246.
12. Phhalová L., Stanislava M., Petra D., Petr M., Zdeňka S., Vladimíra P., Iveta B., Eva V. and Helena M. Comparison of Terbutryn Acute Toxicity to *Danio*

- rerio* and *Poecilia reticulata*. *ACTA VET. BRNO*. 2010. 79: 593-598.
13. Diedrich D.J. The Effects of Chronological Age and Size on Toxicity of Zinc to Juvenile Brown Trout. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2015.
 14. Karaman, et al. Liver function tests in children and adolescents receiving risperidone treatment for a year: A longitudinal, observational study. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice*. 2011. 15: 204-208.
 15. Osanaiye B.C.A.,dkk. Antimalarial Effect Of Neem Leaf And Neem Stem Bark Extracts On Plasmodium Berghei Infected In The Pathology And Treatment Of Malaria. *International Journal of Research in Biochemistry and Biophysics*. 2013; 3(1): 7-14
 16. Charan J.,Kantharia N.D. How to calculate sample size in animal studies?. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 2013. 4(4):303-306
 17. Kumar V., Abul K. A., and Jon C. Basic pathology. Singapore: Elsevier. 2013. 8-16 p.
 18. GESAMP. The revised GESAMP hazard evaluation procedure for chemical substances carried by ships. Reports and Studies, Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection (GESAMP). 2002. No. 64.
 19. Mordue A.J and Alasdair J. N. Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its Action Against Insects. *An. Soc. Entomol. Brasil*. 2000. 29(4): 615-632.
 20. Kumar A,et al. Acute toxicity of azadirachtin to a teleost, *Heteropneustes fossilis*. *Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá*. 2012. 34 (2); p. 213-216
 21. Dhara K. Surjyo J B and Susanta R K. Study on the toxicity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extracts as phytopiscicide on three life stages of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) with special reference to their ethological responses. *International Journal of Experimental Research and Review (IJERR)*. 2016. Vol. 3: 7-13.
 22. Priyadarsini R.V., Senthil M., Sripriya, Karunakaran and Nagini. The neem limonoids azadirachtin and nimbolide induce cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells. *Free Radical Research*. 2010. 44(6): 624-634.
 23. Al-Hashemi Z.S.S., Mohammad A H. Biological activities of different neem leaf crude extracts used locally in Ayurvedic medicine. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering*. 2016.
 24. Nathan S.S.Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. *Vertebrate Physiology*. 2013. (4):1-17.
 25. Srivastava P and Ajay S. Study on Some Neural and Behavioral Changes Induced by Carbamate (Mancozeb) Fungicide on Freshwater Fish *Clarias batrachus*. *World Journal of Zoology*. 2013. 8(4):376-380.
 26. Bernadi M.M, Dias S.G, Barbosa V.E. Neurotoxicity Of Neem Commercial Formulation (*Azadirachta indica* A.Juss) in adult Zebra Fish (*Danio rerio*). Elsevier: *environmental toxicology and pharmacology*. 2013. 36: 1276-1282.
 27. Satyanarayana K. et al. Molecular approach to identify antidiabetic potential of *Azadirachta indica*. *J Ayurveda Integr Med*. 2015. 6(3): 165-174.
 28. Scheen A. J. Central nervous system: a conductor orchestrating metabolic regulations harmed by both hyperglycaemia and hypoglycaemia. *Diabetes & Metabolism*. 2010; p.S31-S38
 29. Hanhineva K et al. Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010.(11):1365-1402
 30. M Wink. Alkaloids: Toxicology and Health Effects. Heidelberg University. Germany. 2016
 31. Goldstone J.V et al. Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. 2010
 32. Muray R.K.,dkk. Biokimia Harper. Jakarta: EGC. 2014.
 33. Glisic, B., Mihaljevic, I., Popovic, M., Zaja, R., Loncar, J., Fent, K., Kovacevic, R., Smital, T., Characterization of Glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*. 2014
 34. Justino G C and Abel J. S. C. Antioxidant mechanisms of Quercetin and Myricetin in the gas phase and in solution – a comparison and validation of semi-empirical methods. *J Mol Model*. 2010. 16:863-876
 35. Roy K.M.,dkk. Antiproliferative Effect on Human Cancer Cell Lines after Treatment with Nimbolide Extracted from an Edible Part of the Neem Tree (*Azadirachta indica*). *Phytotherapy Research*. 2007. (21): 245-250.
 36. Phthalova L.,et al. The effects of subchronic exposure to Neem Azal T/S on zebrafish (*Danio rerio*). *Journal chemistry and ecology*. 2017.
 37. Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N. 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82. 2011. P:513-523.
 38. Gupta N.K. The Antioxidant Potential of *Azadirachta indica* Ameliorates Cardioprotection Following Diabetic Mellitus-Induced Microangiopathy. *Pharmacogn Mag*. 2016. 12(3): 371-S378.
 39. Lubis U.F.,Netty M. dan Indra J. Z. Analisis Histologis Hati Ikan Asang (*Osteochilus hasseltii* C.V.) di Danau Maninjau dan Danau Singkarak, Sumatera Barat. 2014. 3(2).162-167.
 40. Alzohairy M.A. Therapeutics Role of *Azadirachta indica* (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : assessing drug-induced toxicity. 2016.
 41. Subapriya R., R. Kumaraguruparan, K. V. P. Chandramohan, S. Nagini. 2002. Chemoprotective effects of ethanolic extract of neem leaf against MNNNG induced oxidative stress. *Pharmazie*. 58: 512-517
 42. F Prihapsara, Mufidah, A N Artanti1, M Harini. Acute and Subchronic Toxicity of Self Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS)

from Chloroform Bay Leaf Extract (*Eugenia Polyantha* W.) with Palm Kernel Oil as A Carrier. Materials Science and Engineering. 2018.

43. Tripathi A et al. Aqueous extract of *Azadirachta indica* (neem) leaf induces generation of reactive oxygen species and mitochondria-mediated apoptosis in rat oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 2012. (29). 15–23.

44. Galati, G., O'Brien, P.J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.* 2004.P;287-303.

45. Sukohar. 2014. Buku Ajar Farmakologi: Neurofarmakologi Asetilkolin dan Norepinefrin. Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Bandar Lampung