

Efek Teratogenik Dekokta Daun Pulutan (*Urena lobata* L.)
(Studi terhadap Kelengkungan Tulang Belakang dan Panjang Badan pada Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*))

Ainul yaqin*, Helmin Elyani**, Yudi Purnomo**

*Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

** Staff Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

Email: Ainulyaqinzein@yandex.com

ABSTRACT

Introduction: Caesarweed (*Urena lobata* L.) is one of the tropical plants that have potential as a drug but the toxicity of Caesar weed (*Urena lobata* L.) needs to be explored to know the safety limit, teratogenic test is one of the test can do. The teratogenic test is part of a special toxicity test to determine the presence of organ malformations due to exposure of xenobiotic compounds to the fetus. The aim of this research is to know the effect of teratogenic decoction of *Urena lobata* L leaves (*Urena lobata* L) especially the curvature of the spine and the body length of the embryo of zebra fish (*Danio rerio*).

Method: Laboratory experimental study with post test only control group design using zebrafish embryo (*Danio rerio*) which exposed to a decoction of *Urena lobata* leaf (DUL) at 5.25 hour post fertilization (hpf) - 72 hour post fertilization (hpf). Measurements of the curvature of spine and body length. performed in 5 treatment groups; control (Aquadest), therapeutic dose (500 µg/ml), ½ MATC dose (875 µg/ml), MATC dose (1750 µg/ml), and Lethal Concentration 50 dose (2500 µg/ml) group with repetition (n=3). The results were analyzed using One Way ANOVA followed by Post Hoc Test LSD with significant value (p<0,05).

Result: The treatment dose of ½ MATC, MATC and LC50 doses significantly decreased the embryonic length of zebrafish by 4% , 10% and 30% (p <0.05),, while DUL to spinal curvature at therapy dose, ½ MATC, MATC and LC50 significantly increased spine curvature of zebrafish embryos by 4% , 6% , 10% and 40% , respectively, compared with controls (p <0.05).

Conclusion: The administration of DUL doses of ½ MATC, MATC and LC50 significantly decreased the length of embryos of zebra fish. Administration of DUL therapeutic doses, ½ MATC, MATC and LC50 significantly decrease the curvature degree of the zebra embryonic spine.

Keywords: the curvature of spine, body length, *Urena lobata* L

PENDAHULUAN

Tanaman pulutan (*Urena lobata* L.) adalah salah satu tanaman tropik yang memiliki potensi sebagai obat. Berdasar data empiris tanaman pulutan digunakan untuk pengobatan influenza, bengkak, keputihan dan tonsilitis.² Pada uji praklinik tanaman pulutan diketahui memiliki aktivitas anti bakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.^{2,19} Tanaman pulutan (*Urena lobata* L.) berdasarkan studi juga menunjukkan efek hipoglikemi pada tikus diabetes melitus yang di induksi streptozotocin.¹

Penggunaan Tanaman pulutan (*Urena lobata* L.) untuk keperluan terapi perlu dipastikan keamanannya. Riset membuktikan pemberian ekstrak akar *Urena lobata* L. dengan dosis 200mg/kgbb selama 24 minggu pada kelinci menimbulkan obstruksi saluran empedu pada minggu pertama dan ketiga yang ditandai peningkatan kadar serum gamma-glutamyl transferase (GGT) dan Alkaline phosphatase (ALP) serta nekrosis pada hepatosit.¹ Penggunaan *Urena lobata* L. pada mencit yang dipapar selama 18 hari menimbulkan nekrosis sel tubulus kontortus proximal ginjal. Berdasarakan data tersebut penggunaan tanaman pulutan (*Urena lobata* L.).³ tidak sepenuhnya aman sehingga perlu dilakukan uji toksisitas lebih lanjut untuk mengetahui keamanannya.

Toksisitas tanaman pulutan (*Urena lobata* L.) perlu di eksplorasi untuk mengetahui batas keamanannya. Uji toksisitas secara garis besar terbagi menjadi dua macam, yaitu; uji toksisitas umum dan khusus.⁴ Uji teratogenik adalah bagian dari uji toksisitas khusus untuk mengetahui adanya malformasi organ akibat paparan senyawa xenobiotik pada janin.⁵ Pada masa kehamilan, janin mengalami proses tumbuh kembang yang pesat dan proses tersebut dapat terganggu oleh bahan xenobiotik seperti herbal sehingga keamanannya perlu dievaluasi. Peningkatan dosis dan lama paparan akan meningkatkan derajat toksisitas yang dapat diketahui dengan melakukan pengamatan terhadap struktur dan fungsi organ.⁶

Ikan zebra dapat digunakan sebagai salah satu model coba untuk pengujian toksisitas. Salah satu kelebihan Ikan zebra adalah ikan zebra sangat sensitif terhadap racun dari polutan lingkungan dan memiliki embrio yang transparan sehingga struktur organ mudah diamati. Hampir 82% sekuen DNA pada ikan zebra memiliki hubungan dengan gen manusia sehingga memungkinkan adanya hubungan dengan penyakit yang terjadi pada manusia.⁷ Potensi toksik suatu herbal dapat mengganggu struktur dan fungsi organ khususnya pada fase embrio. Tulang belakang (vertebrae) ikan zebra merupakan bagian dari sistem saraf pusat selain dari otak dan kerusakan pada organ ini akan menimbulkan

gangguan dalam pertumbuhan dan perkembangan ikan zebra.

Pada pertumbuhan normal ikan zebra, tulang belakang akan membentuk axis yang lurus dari kepala. Kelengkungan pada tulang belakang menandakan adanya kelainan struktur dan formasi tulang belakang yang menghasilkan kondisi, skoliosis, kifosis, dan lordosis. Berdasarkan latar belakang diatas peneliti ingin melakukan pengujian efek teratogenik dekokta daun pulutan (*Urena lobata* L.) dengan menentukan penilaian terhadap kelengkungan tulang belakang dan panjang badan pada embrio ikan zebra.

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan metode penelitian *control group post test only* secara *in vivo*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek dekokta daun Pulutan (*Urena lobata* L.) terhadap kelengkungan tulang belakang dan panjang badan pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*) yang diamati dengan metode *non invasif* menggunakan mikroskop stereo pada 72 hpf. Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang, pada bulan Juni 2017. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Universitas Brawijaya (*Etical Clearence*) nomor : 656-KEP-UB tanggal 13 Desember 2016.

Pemeliharaan dan Pemijahan Embrio Ikan Zebra

Ikan zebra dipelihara dan diberi makan Tetramine setiap hari. Pada saat pemijahan perbandingan ikan jantan dan betina sebesar 2:1 ditempatkan pada aquarium pemijahan suhu 27° C, dengan *setting* 10 jam gelap dan 14 jam terang menggunakan lampu otomatis dan di beri oksigenasi dengan *aerator*, dibawah aquarium diletakkan *spawning trap* untuk menghindari ikan zebra memakan kembali embrionya. Embrio dari *spawning trap* diambil menggunakan *disposable pipette*, kemudian dipindahkan ke cawan petri, pengamatan dilakukan dibawah mikroskop stereo untuk memilih embrio yang hidup dan sehat.

Sampel Penelitian

Pada penelitian ini sampel ditentukan berdasarkan FET (*Fish Embryo Acute Toxicity*) dari OECD *Guideline for The Testing of Chemical* dengan menggunakan 24-well plate. Setiap dosis terdiri 10 embrio dalam satu well plate diisi 1 embrio dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, hal ini juga dilakukan pada kelompok control dengan total keseluruhan embrio sebanyak 150 embrio.⁸ Embrio ikan zebra yang digunakan pada penelitian ini didapat dari biakan sendiri di Laboratorium terpadu FK UNISMA sedangkan, Ikan dewasa yang digunakan untuk dipijah berasal dari peternak lokal dengan rentan umur ikan 3-4 bulan di Dusun Bangkak RT 1/RW 2, Desa Pelem, Kecamatan Campur Darat, Kabupaten Tulungagung, Jawa Timur yang telah diidentifikasi dan disertifikasi

oleh Fakultas Pertanian dan Peternakan Universitas Muhammadiyah Malang No: 01/ Analisa/ Lab.Perikanan/ FPP-UMM /1/2017.

Pembuatan Dekokta *Urena lobata* L. (DUL)

Simplisia daun pulutan (*Urena lobata* L.) didapatkan dari Balai Materia Medika, Batu, Jawa Timur dan telah dideterminasi dengan No.074/296/102.7/2017. 2 gram simplisia dimasukkan ke dalam panci dekok berisi 400 ml air (suhu 90°C) selama 30 menit dan diaduk setiap 10 menit. Setelah 30 menit, panci dekok diangkat, dibiarkan hingga dingin. Lakukan penyaringan dengan kertas saring.

Embrio Ikan zebra dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu K0 = kelompok kontrol (*Aquadest*), P1 = dosis terapi (DUL 500 µg/ml)¹³, P2 = dosis ½ MATC (DUL 875 µg/ml), P3 = dosis MATC (DUL 1750 µg/ml) dan P4 = dosis LC50 (DUL 2500 µg/ml).¹⁰

Pengamatan Kelengkungan Tulang Belakang dan Panjang Badan

Embrio Ikan zebra dibagi menjadi 5 kelompok K0 =kelompok kontrol (*Aquadest* 1 ml), P1 = Dosis Terapi (DUL 500 mg/L)¹², P2 =Dosis ½ MATC (DUL 875 mg/L), P3 =Dosis MATC (DUL 1750 mg/L) dan P4 =Dosis LC50 (DUL 2500 mg/L)¹¹. Tiap kelompok berisi 10 embrio ikan zebra yang telah dipapar dekokta daun pulutan sejak awal periode gastrulasi sampai akhir masa penetasan (5,25 hpf -72 hpf). Embrio yang telah di papar 72 hpf di foto menggunakan mikroskop stereo dengan perbesaran 4.5x yang telah terhubung dengan komputer dan dioperasikan menggunakan *software Honestech vhs to dvd 2.5 se*, selanjutnya hasil foto dianalisa menggunakan *software Image J* dengan satuan pixel yang kemudian dikonversi ke millimeter untuk panjang badan dan satuan derajat untuk kelengkungan tulang belakang.¹²

Analisis Data

Kelengkungan tulang belakang dan panjang badan dilakukan uji normalitas dan homogenitas, kemudian dianalisa menggunakan *One Way Analysis of Varian (ANOVA)* dan dilanjutkan *Post Hoc Test* menggunakan *IBM-SPSS versi 25.0*. Hasil dinyatakan berbeda signifikan bila $p < 0,05$.

HASIL PENELITIAN

Efek Dekokta Daun Pulutan (*Urena lobata*) terhadap Kelengkungan Tulang belakang Embrio Ikan Zebra

Efek dekokta daun pulutan terhadap kelengkungan tulang belakang ikan zebra dapat dilihat pada Table 1 dan Gambar 1 dan 2.

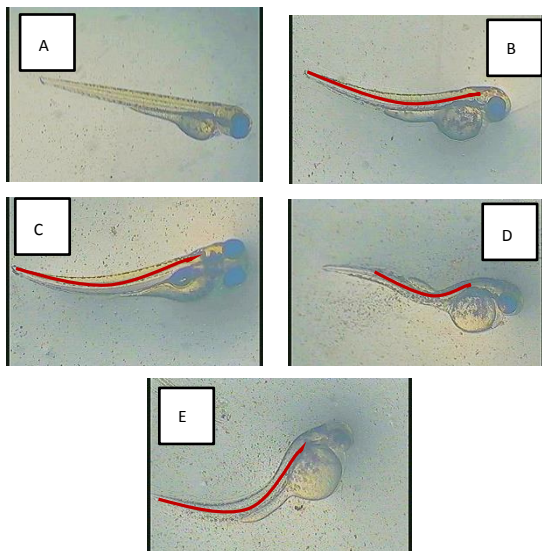
Tabel 1. Rerata Kelengkungan Tulang Belakang Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*) setelah pemberian dosis.

No	Kelompok	N	Rerata derajat Kelengkungan Tulang Belakang (°)
1	Kelompok kontrol	10	177.865 ⁰ ± 1.570 ^a
2	Dosis terapi 500 µg/ml	10	171.566 ⁰ ± 2.972 ^b

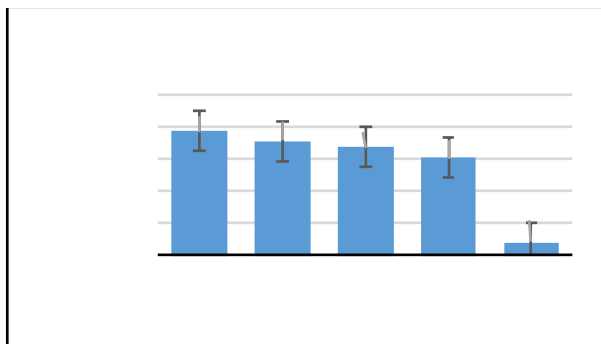
3	Dosis $\frac{1}{2}$ MATC 875 $\mu\text{g/ml}$	10	$167.934^0 \pm 2.372^b$
4	Dosis MATC 1750 $\mu\text{g/ml}$	10	$161.140^0 \pm 4.243^c$
5	Dosis LC ₅₀ 2500 $\mu\text{g/ml}$	10	$108.883^0 \pm 10.043^d$

Keterangan :

a, b, c : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan kelengkungan tulang belakang yang signifikan ($p < 0,05$)



Gambar 1. Kelengkungan tulang belakang embrio ikan zebra perbesaran 4.5x pengolahan dengan software *ImageJ* . A = Kelompok kontrol, B = dosis terapi menunjukkan hasil signifikan, C = dosis $\frac{1}{2}$ MATC menunjukkan hasil tidak signifikan, D = dosis MATC menunjukkan hasil signifikan, E = dosis LC₅₀ menunjukkan hasil paling signifikan, garis merah adalah kelengkungan tulang belakang



Gambar 2. Histogram Rerata Kelengkungan Tulang Belakang Embrio Ikan Zebra

Pemberian DUL dosis terapi, $\frac{1}{2}$ MATC, MATC dan LC₅₀ menurunkan secara signifikan derajat kelengkungan tulang belakang embrio ikan zebra berturut-turut sekitar 4 %, 6 %, 10 % dan 40 % dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$). DUL dosis terapi, $\frac{1}{2}$ MATC, MATC dan LC₅₀ berbeda signifikan

menurunkan derajat kelengkungan tulang belakang embrio ikan zebra ($p < 0,05$) dibandingkan kontrol.

Efek Dekokta Daun Pulutan (*Urena lobata*) terhadap Panjang Badan Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*)

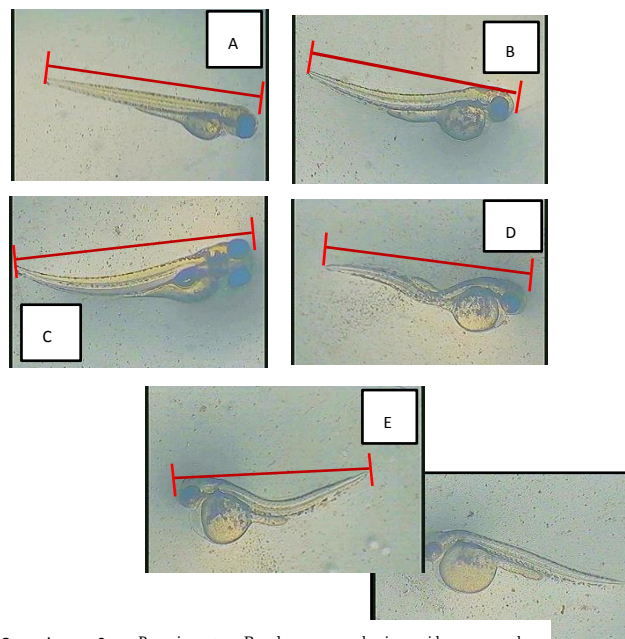
Efek dekokta daun pulutan terhadap Panjang Badan dapat dilihat pada Table 2 dan Gambar 3 dan 4

Tabel 2. Rerata Panjang Badan Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*) setelah pemberian dosis.

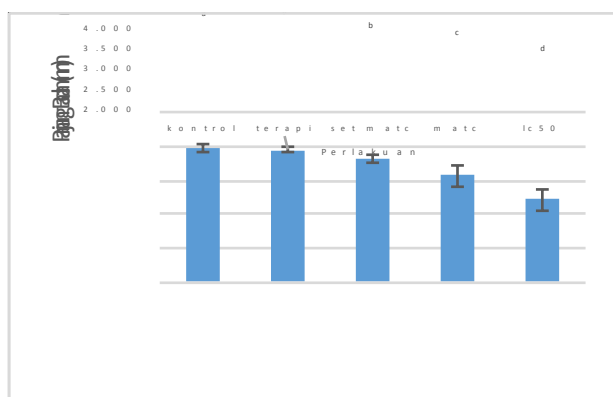
No	Kelompok	N	Rerata Panjang Badan (mm)
1	Kelompok kontrol	10	3.990 ± 0.041^a
2	Dosis terapi 500 $\mu\text{g/ml}$	10	3.955 ± 0.044^a
3	Dosis $\frac{1}{2}$ MATC 875 $\mu\text{g/ml}$	10	3.822 ± 0.044^b
4	Dosis MATC 1750 $\mu\text{g/ml}$	10	3.582 ± 0.073^c
5	Dosis LC ₅₀ 2500 $\mu\text{g/ml}$	10	3.218 ± 0.154^d

Keterangan :

a, b, c : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan panjang badan yang signifikan ($p < 0,05$)



Gambar 3. Panjang Badan embrio ikan zebra perbesaran 4.5x pengolahan dengan software *ImageJ* . A = Kelompok kontrol, B = dosis terapi menunjukkan hasil tidak signifikan, C = dosis $\frac{1}{2}$ MATC menunjukkan hasil signifikan, D = dosis MATC menunjukkan hasil signifikan, E = dosis LC₅₀ menunjukkan hasil paling signifikan, garis merah adalah panjang badan ikan zebra



Gambar 4. Histogram Rerata Panjang Badan Embrio Ikan Zebra

Pemberian DUL dosis $\frac{1}{2}$ MATC, MATC dan LC50 menurunkan secara signifikan panjang badan embrio ikan zebra berturut-turut sekitar 4 %, 10% dan 20% dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$) sedangkan dosis terapi tidak menurunkan signifikan panjang badan ($p > 0,05$). DUL pada dosis $\frac{1}{2}$ MATC, MATC dan LC50 berbeda signifikan menurunkan panjang badan ($p < 0,05$) sedangkan dosis terapi tidak berbeda signifikan menurunkan panjang badan embrio ikan zebra ($p > 0,05$) dibandingkan kontrol.

PEMBAHASAN

Efek Dekokta Daun Pulutan (*Urena lobata* L.) terhadap Kelengkungan Tulang belakang embrio ikan zebra (*Danio rerio*)

Pemberian DUL dosis terapi, $\frac{1}{2}$ MATC, MATC dan LC50 menurunkan derajat kelengkungan tulang belakang embrio ikan zebra. Efek tersebut diduga berhubungan dengan komposisi dan dosis senyawa aktif pada daun pulutan salah satunya flavanoid. Flavanoid adalah jenis antioksidan primer, yang melawan radikal bebas dengan cara mendonorkan atom hidrogennya sehingga menjadi senyawa yang lebih stabil. Namun proses tersebut menghasilkan produk sampingan yang bersifat reaktif, apabila produk sampingan tersebut jumlahnya berlebih dalam tubuh akan bersifat pro oksidan yang dapat menyerang sel normal dan dapat mengganggu perkembangan sel embrio terutama struktur sel tulang belakang.⁵ pro oksidan yang berlebih dapat menginduksi pengeluaran sitokin atau mediator inflamasi seperti *IL-1*, *IL-6* dan *TNF- α* yang selanjutnya dapat mengaktifkan *osteoclast function* dan *bone resorption* sehingga dapat menyebabkan penurunan densitas tulang yang kemudian berakibat pada penurunan derajat kelengkungan tulang belakang.^{5,17}

Senyawa lain yang terdapat pada DUL adalah Alkaloid senyawa yang memiliki efek antimitosis. Alkaloid menghambat tubulin atau protein penyusun mikrotubulus sehingga terjadi penghancuran mikrotubulus dan gangguan enzim telomerase. Telomerase sendiri merupakan enzim yang berperan pada pembelahan sel, apabila enzim ini terganggu efeknya terhadap sel adalah sel akan mengalami apoptosis. Mikrotubulus sendiri memiliki peran mitosis, fagositosis dan transport makanan, jika mikrotubulus

mengalami kerusakan maka proses tersebut akan terganggu sehingga akan menyebabkan pembentukan vertebrae pada fase somitogenesis terganggu. Proses tersebut menyebabkan tulang belakang ikan mengalami kelengkungan yang abnormal.²¹

Pada penelitian ini dosis terapi menunjukkan efek yang tidak diharapkan pada tulang belakang yang ditandai dengan penurunan derajat kelengkungannya. Hal ini diduga pada fase embriogenesis tulang belakang lebih peka terhadap senyawa xenobiotik karena masih defisiensi dari enzim pemetabolisme dan maturasi organ belum sempurna sehingga menginduksi akumulasi obat sehingga berujung peningkatan efek toksik. Proses tersebut diduga karena zat aktif DUL merusak membran sitoplasma dan menurunkan permeabilitas membran sel sehingga transport ion Ca^{+} ke dalam sel dan ke luar sel menjadi tidak terkontrol.²⁶ Peningkatan ion Ca^{+} intrasel mengaktifkan beberapa enzim seperti Phospholipase, Protease, Adenosin Triphosphatase, dan Endonuklease. Enzim-enzim tersebut dapat menghambat sintesis ATP dalam mitokondria dan mempengaruhi permeabilitas membran mitokondria, sehingga akan mengoksidasi DNA inti dan DNA mitokondria yang mengakibatkan terjadinya pemutusan rantai DNA.²⁷ Putusnya rantai DNA inti dan DNA mitokondria sel tersebut menimbulkan kerusakan dan mutasi DNA pada gen Ektonukleotidase (*entpd5*) yang berperan dalam mineralisasi tulang.²³

Namun dosis yang sama tidak memberikan efek yang merugikan pada variabel panjang badan (Gambar 5.2). Peneliti menduga karena pada fase embriogenesis tepatnya pada fase somitogenesis, zat aktif dul lebih reaktif terhadap seclerotome, dimana seclerotome merupakan organ primordial sebagai penyusun tulang belakang dan rangka badan mamalia.²³

Efek Dekokta Daun Pulutan (*Urena lobata* L.) terhadap Panjang Badan embrio ikan zebra (*Danio rerio*)

Pemberian Dekokta *Urena lobata* pada kelompok dosis $\frac{1}{2}$ MATC, MATC dan LC50 menunjukkan efek yang signifikan dalam menghambat pertumbuhan panjang badan embrio ikan zebra. Efek tersebut diduga dikendalikan oleh senyawa aktif dalam DUL diantaranya flavonoid, saponin dan alkaloid.

Kandungan zat aktif flavonoid yang masuk ke dalam *chorion* mampu mengganggu proses metabolisme, sehingga nutrisi tidak terserap secara sempurna ke dalam embrio. Metabolisme yang tidak berjalan dengan semestinya pada akhirnya akan menyebabkan pertumbuhan embrio ikan zebra menjadi tidak sempurna.¹⁶

Flavanoid juga dapat berikatan dengan *NDUFA 4* (NADH:Ubiquinone Oxidoreductase sub unit 4) pada embrio ikan zebra sehingga mengaktifasi *NADH dehidrokinase*. *NADH dehidrokinase* adalah kompleks pembentukan ROS dalam metabolisme embrio ikan zebra.¹⁷ Peningkatan ROS menyebabkan peroksidasi lipid, denaturasi protein dan mutasi DNA.^{18,19} Hal ini dapat menyebabkan gangguan

perkembangan embrio, embrio tidak dapat menyerap nutrisi dari *yolk sac* sehingga nutrisi embrio tidak terpenuhi yang berakibat pada pertumbuhannya terganggu.

Pada penelitian ini, alkaloid diduga menghambat sekresi GHRH sehingga GHIH tersekresi lebih banyak. Kadar GHIH lebih tinggi akan menghambat pelepasan GH sehingga pertumbuhan embrio ikan zebra terhambat. Proses tersebut diduga terjadi pada somitogenesis, somit akan diferensiasi menjadi myotome dan sklerotome yang merupakan komponen utama pembentukan otot dan skeletal²³. Kondisi ini sangat ditentukan oleh kadar growth hormone yang disekresi oleh sel somatotrof. Pelepasan GH dipengaruhi oleh kadar GHRH yang dilepaskan oleh hipotalamus. Secara fisiologis GH akan berikatan dengan Growth Hormone Reseptor a (GHRa) dan Growth Hormone Reseptor b (GHRb) yang banyak terdapat pada sel somit²⁵. Proses ini yang kemudian akan menghambat pertumbuhan embrio ikan zebra.⁶ terjadi penurunan panjang badan embrio ikan zebra.

KESIMPULAN

1. Pemberian dekokta daun pulutan (*Urena lobata* L.) pada dosis $\frac{1}{2}$ MATC, MATC dan LC50 menurunkan panjang badan embrio ikan zebra.
2. Pemberian dekokta daun pulutan (*Urena lobata* L.) pada dosis terapi, $\frac{1}{2}$ MATC, MATC, dan LC50 menurunkan derajat kelengkungan tulang belakang embrio ikan zebra.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut efek zat aktif DUL pada somitogenesis

SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lanjut untuk mengetahui efek teratogenik dekokta daun *Urena lobata* L. pada hewan coba yang lebih tinggi tingkatannya dari ikan.
2. Perlu dilakukan uji teratogenik subkronik dan kronik dekokta daun *Urena lobata* L. pengamatan pada struktur organ embrio ikan zebra maupun embrio tikus untuk menilai kerusakan sel-sel organ yang lebih spesifik melalui pemeriksaan histologi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada IOM (Ikatan Orang Tua Mahasiswa) yang telah memberi bantuan dana dalam penelitian ini dan Tim Urena yang telah membantu jalannya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Omonkhu, Akhere A, Onoagbe Aliyere O. 'Evaluation of the long-term effects of *Urena lobata* root extracts on blood glucose and hepatic function of normal rabbits', *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences* Vol. 3, 2011
2. Wulandari, Roselina Utami., Pri Iswati, Hartanti Dwi. 'Penapisan Fitokimia dan Uji Aktivitas Anti Bakteri Ekstrak etanol Herba

Pulutan (*Urena lobata* Linn.)' *jurnal pharmacy* vol. 06 no. 1. 2019.

3. Maisaroh, Siti., Handayani, Nursasi dan Gofur, Abdul. Pengaruh Rebusan Simplisia Daun Pulutan (*Urena Lobata* L.) Terhadap Nekrosis Sel Tubulus Kontortus Proksimal Ginjal Mencit (*Mus Musculus*) Galur Balb C.. Malang: Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang. 2016
4. Nurrochman, D.P.. Efek Dekokta Daun Benalu Teh (*Scurrula atropurpurea* BL.Dans) Dosis Terapi, MATC, DAN LC50 Terhadap Luas Area Yolk Sac Serta Pericardium Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*). Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang. (Skripsi). 2016.
5. Ainia Hilda Nur. Uji Toksisitas Akut Dekokta *Orthosiphon stamineus*, Benth Terhadap Daya Tetas Dan Malformasi Organ Embrio *Danio rerio*. 2014. Skripsi. Universitas Islam Malang
6. Widyastuti, P.. *Bahaya Bahan Kimia pada Kesehatan Manusia dan Lingkungan / WHO*. Jakarta: EGC, 2005.
7. OECD. Guideline for the Testing of Chemicals. Draft Proposal for a New Guideline. 2013. Fish Embryo Acute Aquatic Toxicity (FET) Test. 236, 1-22. 2009.
8. Reed, B. and Jennings, M. Guidance on the housing and care of Zebrafish *Danio rerio*, *Research Animals Department, Science Group, RSPCA*, 2011 pp. 1-27 Ikan Zebra (*Danio Rerio*)
9. Kimmel, C.B, Ballar, W.W, Kimmel, S.R. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, 203(3), 253-310.
10. Goodman & Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics 10th ed. London. 2004
11. Masyitah, Sari. Toksisitas Akut Dekokta Pulutan (*Urena lobata* L.) pada Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*) (Studi pada Nilai Lethal Concentration 50 (LC50) dan Daya Tetas Telur). Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (Skripsi). 2017.
12. Ferreira, Tiago & Rasband, Wayne. *ImageJ User Guide IJ* 1.46r. 2012. <https://imagej.nih.gov/ij/docs/index.html>
13. Goodman & Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics 10th ed. London. 2004
14. Moriyama, S., Ayson, F.G., Kawachi, H., Growth regulation by insulin-like growth Factor-I in fish. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 64. 2000
15. Reinecke, M., Bjornsson, B.T., Dickhoff, W.W., McCormick, S.D., Navarro, I., Power, D.M., Guti_erez, J., Growth hormone and insulin like growth factors in fish: where we are

- and where to go. *Gen. Comp. Endocr.* 142, 20e24. 2005
16. Pramono, T. B., Marhani, S.. Pola Penyerapan Kuning Telur dan Perkembangan Organogenesis pada Stadium Awal Larva Ikan Senggarigan. 2009
 17. Gordon, M.H. *The Mechanism Of Antioxidants Action In Vitro*. Di dalam: B.J.F. Hudson, editor. *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science, London. 2009
 18. Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and therapeutics; Copyright by The McGraw-Hill Companies Inc. 2008
 19. Berghmans, S., Jette, C., Langenau, D., Hsu, K., Stewart, R., Look, T., Kanki, J. P.. Making waves in cancer research: new model in the zebrafish. *Biotechniques*. Vol 39(2): 227-237. 2005
 20. Islam, H., Hasanur, R.K.M., Rahman, S., Rahmatullah, M. 2015. Preliminary antihyperglycemic, antinociceptive activity, phytochemical analysis and toxicity studies on leaves of *Urena lobata* L. *J Chem Pharm Res*, 7(4) : 559-63
 21. Meles, D.K., Wurlina, I.D.P.A. Adnyana., S. Zakaria., D.M.S. Putra., N. Suasanti. Efek Antimitogenik Fraksi Alkaloid *Achyranthes aspera* Linn. terhadap Induksi Apoptosis pada Mencit yang Terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Veterinaria Indonesiana* ISSN 2337-3202, E-ISSN 2337-4373. 2015. Vol.3, No.1: 8-15.
 22. Ordahl, C.P.. *Somitogenesis Part 2*. A.A.Moscona and Alberto Monroy (Editor). Academic Press. Canada. p: 1. 2000
 23. Heatherl. Stickney, Michalel.jf. stephen h.devoto. *Somite Development in Zebrafish* Biology Department, Wesleyan University, Middletown, Connecticut. 219:287-303. 2000
 24. Masimo Mariotti, Marta Carnovali, Giuseppe Banfi,. *Danio rerio: The Janus of the Bone From embryo to Scale*. Departemen of Biomedical, surgical and dental science, university of Milan. Italy. 12(2) 188-194. 2015
 25. Cecilia M. Di Prinzio , Pablo E. Botta , Elías H. Barriga , Eduardo A. Ríos , Ariel E. Reyes, Silvia E. Arranz. *Growth hormone receptors in zebrafish (Danio rerio): Adult and embryonic expression patterns*. Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET/UNR), Area Biología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, Suipacha 531, S2002LRK Rosario, Argentina. 10 214-255. 2010
 26. Retnowati, Y., Bialangi, N., Posangi, N. W. *Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus pada Media yang Diekspos dengan Infus Daun Sambiloto (Andrographis paniculata)*. *Saintek*;6(2). 2011.
 27. Mitchell, R.N. & Cotran, R.S. Jejas, Adaptasi, dan Kematian Sel. Dalam Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L. (eds). *Buku Ajar Patologi Robbins Volume 1*. Edisi VII. Jakarta: EGC.3:7-26. 2007.