

Efek Paparan Subkronik Dekokta Daun Nimba (*Azadirachta indica*) terhadap Hiperplasia Lamela Insang dan Perubahan Kecepatan Berenang Ikan Zebra (*Danio rerio*) Juvenile

Ineke Romadina Evi N, Ariani Ratri Dewi, Noer Aini
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang
E-mail: inekerom@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Neem leaves (*Azadirachta indica*) has many benefits including antibacterial, antifungal and antimalarial. Toxicity tests need to be carried out to determine the effects and safety of using neem during growth and development. Exposure neem 60 mg / L in the early stages of *Cyprinus carpio* L life induces focal separation and gill lamellae edema. The aim of this study is to determine the effect of neem leaves subchronic exposure to gill lamellar hyperplasia and swimming speed of *D. rerio juvenilee*.

Method: Juvenile zebrafish of 1.5 months old were exposed to Neem leaf decoction (DDN). To observe gill lamella hyperplasia, *D. rerio juvenilee* was exposed for 15 days to DDN dose of 50 mg / L, 132 mg / L, and 410 mg / L. On the 16th day, gill tissue was taken and stained them using Hematoxylin Eosin (HE). Gill lamella cell was counted using binocular microscope with 1000x magnification. To observe swimming speed changes, *D. rerio juvenilee* was exposed to DDN for 30 minutes and analyzed using tracker software. Data were analyzed using One-way analysis of variance (ANOVA) continued with Least Significant Difference ($p < 0.05$).

Results: Subchronic exposure of *D. rerio juvenilee* to DDN doses 132 mg / L and 410 mg / L increase gill secondary lamella hyperplasia significantly compared to controls ($p < 0.05$) but insignificant in dose 50 mg / L. All three doses do not induce swimming speed change compared to the control group ($p > 0.05$).

Conclusion: Subchronic exposing of *D. rerio juvenilee* to DDN doses of 132 mg / L and 410 mg / L did not induce changes in the swimming speed of *D. rerio juvenilee*. The three doses were able to increase hyperplasia of gill lamellae.

Keywords: Neem (*Azadirachta indica*), subchronic, gill lamella, swimming speed, zebrafish (*Danio rerio*).

PENDAHULUAN

Salah satu tanaman yang diketahui memiliki banyak khasiat adalah Nimba (*Azadirachta indica*). Secara uji *in vitro* ekstrak daun Nimba dapat memiliki efek sebagai antibakteri pada *E. coli*, *Streptococcus*, *Salmonella* serta berpotensi sebagai anti jamur pada *Trichophyton* dan *Microsporum*.¹ Senyawa limonoid, nimbolide dan nimbin dari Nimba secara uji *in vitro* mampu menghambat *Plasmodium berghei*. Penelitian lain menunjukkan fraksi metanol dari Nimba memiliki efek sitotoksik sehingga mampu berperan sebagai antikanker, selain itu juga dapat bermanfaat dalam meningkatkan sistem kekebalan tubuh.^{2,3}

Nimba telah dilaporkan menimbulkan beberapa efek toksik. *Azadirachtin* dan *limonoid* yang terdapat pada Nimba dapat memberikan efek insektisida.⁴ Pemberian ekstrak metanol daun Nimba dengan dosis 1000 dan 2000 mg/kg per hari selama 28 hari pada tikus menyebabkan terjadinya apoptosis sel dan inflamasi periportal hepar. Pada penelitian lain, daun Nimba yang diberikan pada tikus meningkatkan jumlah sperma abnormal serta menurunkan jumlah dan motilitas sperma.⁵ Pemberian Nimba dosis 60 mg/l pada tahap awal kehidupan *Cyprinus carpio* L menunjukkan adanya pemisahan fokal permukaan lamela insang dan edema lamela insang.⁶

Dalam penggunaan Nimba perlu dilakukan uji toksisitas untuk memastikan keamanannya. Uji toksisitas terhadap suatu tanaman obat dapat dilakukan dengan melihat nilai *Lethal Concentration* 50 (LC₅₀) yang menyebabkan kematian 50% populasi hewan coba setelah diberikan paparan tanaman obat dalam jangka waktu tertentu.⁷ Salah satu hewan coba yang dapat digunakan untuk uji toksisitas adalah ikan zebra (*Danio rerio*) karena memiliki 70-85% kemiripan DNA dan kesamaan struktur organ dengan manusia, selain itu murah dan mudah didapat.⁸ Menurut OECD, 2011 usia juvenile ikan zebra dimulai dari 30 hari paska fertilisasi sampai usia 3 atau 4 bulan. Fase juvenile merupakan masa terjadinya pertumbuhan dan perkembangan. Pada fase ini ikan zebra lebih sensitif terhadap toksikan dibandingkan fase dewasa karena sistem kekebalan tubuh dan organ – organ yang berfungsi sebagai detoksifikasi racun belum terbentuk secara sempurna.⁹ Penelitian terdahulu menunjukkan *azadirachtin* mampu mengganggu regulasi titer hormon remaja dari serangga, sehingga menyebabkan terjadinya penghambatan pertumbuhan.¹⁰

Uji toksisitas menggunakan ikan zebra bermanfaat untuk melihat dampak paparan zat toksik terhadap gangguan pertumbuhan dan perkembangan pada remaja, pemeriksaan pematangan organ, fungsi fisiologi serta perilaku. Gangguan fungsi organ salah

satunya dapat diamati pada lamela insang ikan zebra juvenile. Insang merupakan organ yang pertama kali terpapar zat toksik serta memiliki peran penting dalam keseimbangan asam-basa, osmoregulasi, dan ekskresi. Adanya perubahan pada struktur insang menandakan terjadinya mekanisme pertahanan terhadap masuknya zat toksik ke dalam tubuh ikan. Uji toksisitas juga dapat dilakukan dengan melihat aktivitas motorik yaitu kecepatan berenang pada ikan zebra juvenile setelah dipajan zat toksik dengan dosis dan durasi waktu tertentu.¹¹

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti ingin mengetahui efek paparan daun Nimba secara subkronik terhadap hiperplasia lamela sekunder insang dan perubahan kecepatan berenang pada ikan zebra juvenile.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan secara eksperimental laboratorium dengan desain penelitian menggunakan *group post test only design* dengan tujuan menguji efek paparan ekstrak daun Nimba subkronik (15 hari) terhadap hiperplasia lamela sekunder insang dan perubahan kecepatan berenang ikan zebra juvenile. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ikan Zebra dan Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang, pada bulan Januari - Juni 2018. Penelitian ini telah mendapatkan surat kelaikan etik dari komisi etik penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada tanggal dengan nomor 923-KEP-UB 2018.

Penentuan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah ikan zebra yang berusia 1,5 bulan yang didapatkan dari petani ikan di Kecamatan Campurdarat Kabupaten Tulungagung, Jawa Timur. Ikan zebra yang digunakan telah diidentifikasi dan mendapatkan sertifikasi dari Fakultas Kelautan dan Perikanan Universitas Muhammadiyah Malang. Ikan zebra juvenile dibagi dalam 4 kelompok yaitu kontrol (tanpa paparan ekstrak daun Nimba/ DDN), DDN dosis terapi (50 mg/L), DDN dosis MATC (132 mg/L), DDN dosis LC₅₀ (410 mg/L). Penentuan dosis didapatkan dari penelitian M arthayani (2018).¹² Jumlah sampel adalah 6 ikan zebra juvenile untuk setiap kelompok perlakuan, diperoleh dengan menggunakan rumus Federer.

Pembuatan Kombinasi Dekokta Nimba

Simplisia daun Nimba didapatkan dari Balai Materia Medika, Batu dan telah disertifikasi dengan nomor 074/40/102.7/2017. Simplisia diekstraksi menggunakan metode dekoktasi. Simplisia ditimbang berdasarkan dosis kemudian dilarutkan pada 1 liter aquadest dengan suhu 90°C selama 30 menit. Hasil dekoktasi didinginkan dan disaring menggunakan vakum kemudian dipaparkan ke ikan zebra juvenile.

Pengambilan Sampel dan Pembedahan Insang Ikan Zebra Juvenile

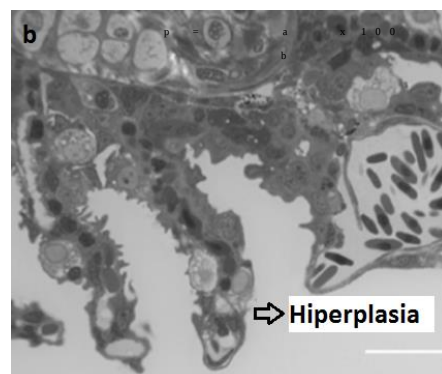
Pembedahan hewan coba diawali dengan mengeluarkan ikan zebra dari aquarium dan diletakkan di lingkungan terbuka hingga kesadarannya menurun, selanjutnya dilakukan pembedahan dan pengambilan insang ikan zebra juvenile.

Pembuatan Preparat Histologi

Pembuatan preparat lamela sekunder insang ikan zebra diawali dengan cara merendam lamela pada larutan formalin 10%, kemudian dilakukan proses dehidrasi, penjernihan, *embedding* dan pemotongan jaringan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 6 mikron. Hasil pemotongan diletakkan pada *object glass* untuk dilakukan pengecatan *haematoxylin* dan *eosin* (HE) kemudian diamati dibawah mikroskop.

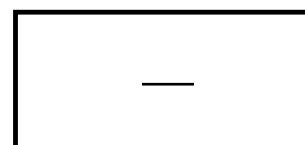
Teknik Penghitungan Hiperplasia Lamela Sekunder Insang Ikan Zebra Juvenile

Penghitungan jumlah hiperplasia lamela sekunder insang ikan zebra dilakukan secara manual menggunakan mikroskop dengan pembesaran 1000x. Hiperplasia lamela sekunder insang ditunjukkan dengan gambaran penebalan jaringan epitel di ujung filamen yang menggambarkan bentuk seperti pemukul bisbol (*clubbing distal*).¹³



Gambar 1. Gambaran struktur histologi lamela sekunder insang yang hiperplasia¹³

Penghitungan dilakukan oleh tiga orang dengan menggunakan 5 lapang pandang dan diambil rerata jumlah dalam 1 lapang pandang, kemudian di hitung kembali dengan proporsi (%) dan diskoring.¹⁴ Penghitungan presentase sel yang mengalami hiperplasia menggunakan rumus sebagai berikut :



Analisis struktur histologi hiperplasia lamela sekunder insang dilakukan melalui nilai skoring.

Nilai	Keterangan
Score 0 (Normal)	Tidak ada hiperplasia lamela sekunder insang ikan zebra
Score 1 (Ringan)	Hiperplasia lamela sekunder insang ikan zebra <30% pada satu luasan pandang
Score 2 (Sedang)	Hiperplasia lamela sekunder insang ikan zebra 30-70% pada satu luasan pandang
Score 3 (Berat)	Hiperplasia lamela sekunder insang ikan zebra >70% pada satu luasan pandang

Tabel 1. Skoring Kerusakan Lamela Insang¹⁵

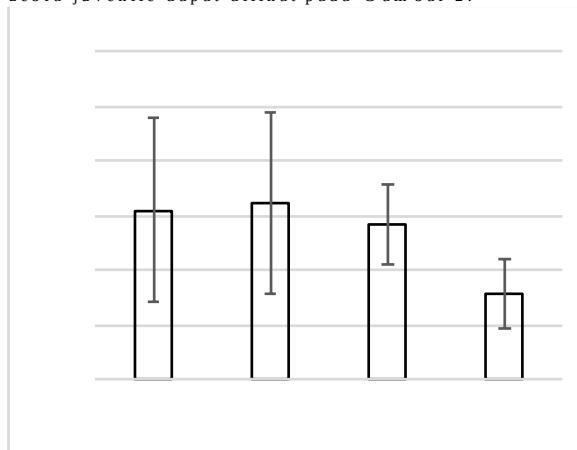
Perlakuan dan Pengamatan Kecepatan Berenang Ikan Zebra Juvenilee

Pengamatan perubahan kecepatan berenang dilakukan dengan mengamati perubahan motorik ikan zebra juvenile yang telah diberi paparan DDN dosis terapi 50 mg/L, MATC 132 mg/L, LC₅₀ 410 mg/L. Ikan zebra juvenile dipindahkan ke aquarium

HASIL PENELITIAN

Efek Paparan Dekokta Daun Nimba terhadap Perubahan Kecepatan Berenang Ikan Zebra Juvenilee

Hasil pengamatan kecepatan berenang ikan zebra juvenile dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Histogram Rerata Kecepatan Berenang Ikan Zebra Juvenilee.

yang berisikan aquadest setelah dipaparkan DDN selama 30 menit. Perekaman dilakukan menggunakan kamera selama 1 menit pada setiap hewan coba kelompok perlakuan. Satuan kecepatan berenang adalah cm/s. Penghitungan kecepatan berenang dianalisis menggunakan *software Tracker*.

Penggunaan *Software Tracker*

Untuk menghitung perubahan kecepatan berenang ikan zebra menggunakan *software tracker*, diawali dengan memasukkan video yang akan dianalisis ke *software* tersebut. Kedua, memilih menu *Track*, selanjutnya menentukan *pointmass* pada menu *new* dan menggunakan *autotrack* yang tersedia pada jendela *point mass*. Ketiga, memilih *Table* dan memilih *v (velocity)* pada kolom tabel. *Copy* Hasil *v* disalin ke aplikasi *Microsoft Excel* untuk menghitung rata - rata kecepatan berenang ikan zebra juvenilee.

Analisis Data

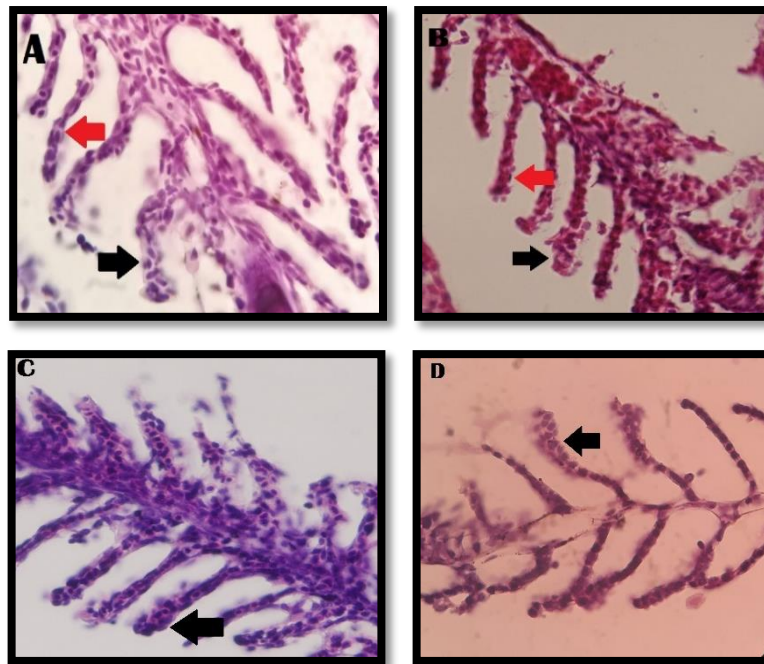
Analisis data histologi lamela sekunder insang dan kecepatan berenang diawali dengan melakukan uji normalitas serta homogenitas, selanjutnya menggunakan metode *One-way analysis of variance* (ANOVA) dan *Least Significant Difference* (LSD) untuk melihat perbedaan antara masing - masing kelompok perlakuan. Uji statistik tersebut dilakukan dengan program SPSS dan hasil dikatakan bermakna apabila $p < 0,05$.

Keterangan : Histogram menunjukkan rerata kecepatan berenang ikan zebra juvenilee pada kelompok kontrol (K0) (6.22 ± 3.41), DDN dosis terapi 50 mg/L (P1) (6.48 ± 3.35), DDN dosis MATC 132 mg/L (P3) (5.72 ± 1.48), DDN dosis LC₅₀ 410 mg/L (3.12 ± 1.25). Data dalam bentuk mean $\pm$ SD dan telah diuji statistik menggunakan ANOVA dengan nilai signifikansi $p > 0,05$.

Gambar 2 menunjukkan pemberian DDN pada dosis terapi 50 mg/L, MATC 132 mg/L dan LC₅₀ 410 mg/L tidak mengakibatkan perubahan kecepatan berenang ikan zebra juvenilee dibandingkan kelompok kontrol ($p > 0.05$). Tampak kecenderungan penurunan kecepatan berenang pada kelompok dosis MATC sebesar 8% dan LC₅₀ sebesar 49 % dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p > 0.05$).

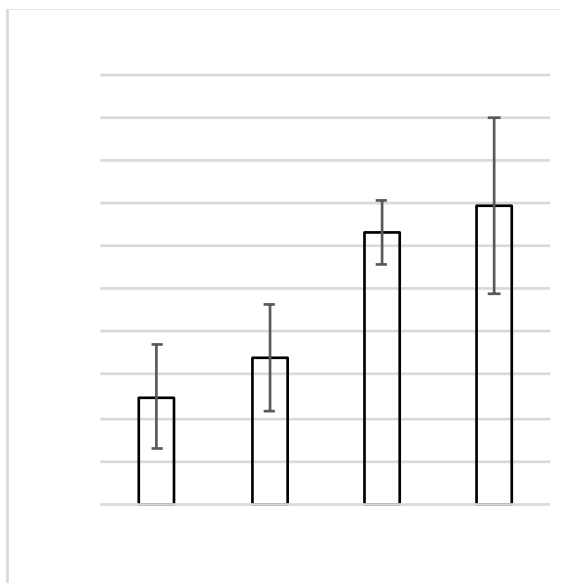
Efek Paparan Dekokta Daun Nimba terhadap Hiperplasia Lamela Sekunder Ikan Zebra Juvenilee

Hasil dari pengamatan histologi struktur lamela sekunder insang ikan zebra setelah dipaparkan DDN dapat dilihat pada Gambar 3 dan Gambar 4 dibawah ini.



Gambar 3. Gambaran Struktur Histologi Lamela Sekunder Insang Ikan Zebra Juvenilee

Keterangan : Gambaran struktur histologi lamela sekunder insang ikan zebra juvenilee pewarnaan HE dengan perbesaran 1000x. (A) Kelompok kontrol; (B) kelompok DDN dosis terapi 50 mg/L; (C) kelompok DDN dosis MATC 132 mg/L; (D) kelompok DDN dosis LC₅₀ 410 mg/L. Panah berwarna merah menunjukkan struktur lamela sekunder insang normal sedangkan panah berwarna hitam menunjukkan terjadinya hiperplasia ditandai dengan penebalan jaringan epitel diujung filamen yang menggambarkan gambaran pemukul bisbol (*clubbing distal*).



Gambar 4. Histogram Rerata Hiperplasia Lamela Sekunder Insang Ikan Zebra Juvenilee

Keterangan : Gambar 4 menunjukkan rerata hiperplasia lamela sekunder insang ikan zebra juvenile. Kelompok kontrol (K0) (12.50 ± 5.98), DDN dosis terapi 50 mg/L (P1) (17.07 ± 6.28), DDN dosis MATC 132 mg/L (P2) (31.52 ± 3.71), DDN dosis LC₅₀ 410 mg/L (P3) (34.79 ± 10.20). Data dalam bentuk mean $\pm$ SD dan

telah diuji statistik menggunakan ANOVA dengan nilai signifikansi $p < 0.05$. Notasi a = signifikan terhadap K0, b = signifikan terhadap P1, c = signifikan terhadap P2, d = signifikan terhadap P3.

Gambar 3 dan Gambar 4 menunjukkan pemberian DDN dosis terapi 50 mg/L tidak mengakibatkan peningkatan hiperplasia lamela sekunder insang ikan zebra juvenile yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pemberian DDN dosis MATC dan LC₅₀ mengakibatkan peningkatan jumlah hiperplasia lamela sekunder insang ikan zebra juvenile berturut – turut sebesar 60% dan 64% dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0.05$).

PEMBAHASAN

Efek Paparan Dekokta Daun Nimba terhadap Kecepatan Berenang Ikan Zebra Juvenilee

Penelitian ini membuktikan bahwa paparan dekokta daun Nimba tidak berpengaruh terhadap kecepatan berenang ikan zebra juvenile. Kecepatan berenang merupakan aktivitas motorik yang dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu waktu gerak aktif, paparan zat toksik dalam dosis dan waktu

tertentu, dan kecukupan oksigen. Ikan zebra juvenile bergerak aktif pada siang hari dan beristirahat pada malam hari.¹¹ Perubahan lingkungan yang menimbulkan terjadinya kondisi hipoksia dapat menyebabkan penurunan kecepatan berenang pada ikan zebra juvenile.¹⁶

Aktifitas motorik berasal dari impuls talamus dilanjutkan ke korteks, medula spinalis kemudian keluar menuju neuron motorik. Saat impuls telah sampai di *neuromuscular junction* maka terjadi sekresi asetilkolin pada ujung saraf dan membuka kanal Na, sehingga ion Na masuk ke dalam serabut otot menyebabkan potensial aksi. Proses tersebut menyebabkan ion kalsium keluar dari retikulum sarkoplasma dan berikatan dengan Troponin C di filamen aktin. Ikatan kompleks Troponin C – Ca menimbulkan tropomiosin bergeser dan membuka bagian aktif dari aktin. Kepala miosin menempel pada aktin, menginisiasi tarikan silang antara aktin – miosin dan terjadilah kontraksi otot.¹⁷ Proses relaksasi terjadi ketika adanya rangsangan asetilkolinesterase yang memecah asetilkolin menjadi asetat dan kolin.¹⁸

Diketahui, salah satu zat aktif yang terkandung pada dekokta daun Nimba yaitu *Azadirachtin*, zat tersebut diketahui mampu menghambat aktifitas dari asetilkolinesterase.¹⁹ Apabila *azadirachtin* menghambat asetilkolinesterase maka asetilkolin tidak dipecah dalam bentuk asetat dan kolin. Terjadi penumpukan rangsangan asetilkolin pada *post synaps*. Hal ini menyebabkan kontraksi otot yang terus menerus dan menurunkan kekuatan otot akibat kelelahan, sehingga terjadi penurunan kecepatan berenang ikan zebra juvenile.

Hasil penelitian pemberian paparan dekokta daun Nimba dosis terapi 50 mg/L selama 15 hari tampak adanya kecenderungan peningkatan aktifitas motorik yang tidak signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Diduga zat *azadirachtin* yang terkandung pada dosis terapi masih dapat ditoleransi oleh ikan zebra juvenile sehingga belum efektif dalam menurunkan aktivitas motorik ikan zebra juvenile.

Hasil penelitian pemberian paparan dekokta daun Nimba pada dosis M A T C 132 mg/L dan LC 50 410 mg/L selama 15 hari menunjukkan kecenderungan penurunan aktifitas motorik dibandingkan dengan kelompok kontrol. Diduga kontraksi terus – menerus karena penghambatan asetilkolinesterase oleh *azadirachtin* mengakibatkan kelelahan hingga kelemahan otot sehingga pergerakan aktifitas motorik cenderung menurun dibandingkan dengan kontrol.

Selain *azadirachtin*, zat aktif lain yang terkandung dalam dekokta daun Nimba adalah saponin. Saponin diketahui mampu menyebabkan hemolisis eritrosit. Hemolisis mengakibatkan suplai oksigen menjadi berkurang sebagai akibat dari transport oksigen oleh hemoglobin yang terganggu.¹⁶ Perfusi menuju ke otak akan menurun memicu terjadinya hipoksia jaringan dan kematian sel

mikroglia pada otak. Aktifitas motorik berasal dari impuls talamus dilanjutkan ke korteks, medula spinalis kemudian keluar menuju neuron motorik. Kematian sel mikroglia menyebabkan gangguan koordinasi motorik sehingga terjadi penurunan kecepatan berenang ikan zebra juvenile.²⁰ *Alkaloid* dalam dosis toksik dapat menjadi pro-oksidan yang memicu pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS).²¹ Adanya *Reactive Oxygen Species* (ROS) mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid, peningkatan permeabilitas membran mitokondria, serta kerusakan DNA dan protein. Efek yang ditimbulkan oleh radikal bebas tersebut dapat menyebabkan terjadinya autooksidasi dopamin dan apoptosis neuron dopaminergik, sehingga terjadi penurunan dopamin yang berfungsi mengatur aktifitas motorik.²² Dopamin merupakan neurotransmitter yang mengendalikan beberapa fungsi yaitu aktivitas motorik, neurotransmisi, emosi, asupan makanan dan regulasi endokrin.²³ Mekanisme dopamin dalam mengatur aktivitas motorik yaitu berawal dari neuron striatum yang diaktivasi oleh neuron di korteks, selanjutnya diteruskan ke ganglia basalis. Terjadi inisiasi dengan reseptor D1, mengurangi penghambatan tonik yang dikirim dari ganglia basalis ke *Mesencephalic Locomotor Region* (MLR). Rangsangan neuron diteruskan ke retikulospinal, sehingga mengaktifkan *Central Pattern Generator* (CPG) untuk pergerakan.²⁴

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian paparan dekokta daun Nimba dosis terapi 50 mg/l, dosis M A T C 132 mg/l dan LC 50 410 mg/l selama 15 hari tidak mengakibatkan penurunan aktifitas motorik yang signifikan dibandingkan kontrol. Kondisi ini diduga karena kandungan zat aktif yang terkandung pada dosis terapi masih dapat ditoleransi oleh ikan zebra juvenile sehingga belum efektif dalam meningkatkan aktivitas motorik ikan zebra juvenile. Rendahnya kandungan zat aktif tersebut antara lain terjadi karena penggunaan pelarut air dalam pembuatan dekokta dimana pelarut air lebih sedikit menarik zat aktif dibandingkan pelarut methanol.

Efek Paparan Dekokta Daun Nimba terhadap Struktur Lamela Insang Ikan Zebra Juvenile

Insang merupakan organ pertama yang berhubungan langsung dengan zat toksik dari lingkungan. Penelitian ini menunjukkan pada kelompok kontrol tampak adanya hiperplasia lamela sekunder insang ikan zebra juvenile. Salah satu faktor yang dapat menyebabkan terjadinya hiperplasia pada kelompok kontrol yaitu adanya kondisi stres yang dialami oleh ikan. Pada saat sel mengalami stres, sel akan melakukan suatu adaptasi untuk mempertahankan viabilitas dan fungsinya. Beberapa respon adaptasi dari sel yaitu dapat berbentuk hiperplasi, hipertrofi, atrofi serta metaplasia menurun.²⁵ Hal ini sesuai dengan hasil penelitian

Hayati, (2015) yang menunjukkan adanya hiperplasia pada kelompok kontrol.

Klasifikasi perubahan histologi insang terdiri atas 2 tahapan. Pada tahap I terjadi hipertrofi epitel respirasi, hiperplasia epitel lamela dan disorganisasi lamela sedangkan tahap II terjadi ruptur epitel lamela dan aneurisma. Perubahan struktur insang pada kelompok kontrol tergolong dalam tahap I yang termasuk dalam kategori ringan. Perubahan ini bersifat *reversible* dengan adanya perbaikan kondisi lingkungan, dibuktikan dalam penelitian sebelumnya adanya perbaikan struktur lesi insang dalam jangka waktu 30 hari.²⁶

Tubuh akan merespon suatu zat tergantung pada konsentrasi zat tersebut. Pemberian dosis terapi 50 mg/L pada ikan zebra juvenile meningkatkan hiperplasia lamela sekunder yang tidak signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Diduga konsentrasi senyawa zat aktif dekokta daun Nimba seperti *azadirachtin*, *saponin* pada dosis tersebut belum mampu menyebabkan efek toksik yang berlebih.²⁷

Paparan dosis M A T C 132 mg/l dan dosis LC 50 410 mg/l meningkatkan hiperplasia lamela sekunder insang secara signifikan dibandingkan kontrol. Faktor yang dapat menyebabkan terjadinya perubahan struktur insang seperti hiperplasia, dan fusi lamela yaitu terpaparnya insang dengan bahan - bahan kimia seperti contohnya logam, pestisida, maupun formalin dengan dosis yang terlalu tinggi.²⁸ Paparan zat yang berulang dengan dosis yang berlebih dapat mengganggu fungsi organ dan menyebabkan kerusakan pada suatu organ.²⁹ Adanya peningkatan dosis menyebabkan terjadinya peningkatan konsentrasi zat aktif yang terdapat pada Nimba. Hasil ini bersesuaian dengan hasil penelitian kelompok pohon yang menunjukkan paparan subkronik dosis M A T C 132 mg/L dan dosis LC 50 410 mg/L secara signifikan menimbulkan nekrosis hepar ikan zebra juvenile.

Beberapa zat aktif yang terkandung pada Nimba yaitu *alkaloid*, *triterpenoid*, *flavonoid*, *saponin*, *tanin*, dan *limonoid*. *Flavonoid* dalam dosis terapi dapat bermanfaat sebagai antioksidan namun dalam dosis toksik dapat menjadi pro-oksidan dan menyebabkan pembentukan radikal bebas *Reactive Oxygen Species* (ROS).³⁰ *Azadirachtin* memiliki efek toksik mengganggu proses bioenergetika dari mitokondria, fungsi mitokondria yang terganggu akan menurunkan produksi ATP dan menimbulkan pembentukan radikal bebas *Reactive Oxygen Species* (ROS). *Limonoid* dapat memicu terganggunya fosforilasi oksidatif yang menyebabkan terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS).³¹

Tingginya pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) mengakibatkan kerusakan sel meliputi kerusakan lipid, protein, dan DNA sel.²² Adaptasi merupakan bentuk kompensasi dari adanya kerusakan sel. Adaptasi sel dapat berbentuk atrofi sel, hipertrofi sel, hiperplasia sel maupun metaplasia sel.³¹ Dalam penelitian ini, adaptasi terhadap efek zat aktif

flavonoid, *azadirachtin*, dan *limonoid* menimbulkan hiperplasia lamela sekunder insang ikan zebra juvenile.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian DDN dosis M A T C, LC 50 tidak menurunkan kecepatan berenang ikan zebra juvenile, namun mampu meningkatkan hiperplasia lamela insang ikan zebra juvenile.

SARAN

1. Perlu dilakukan uji toksisitas akut, subkronik dan kronik DDN pada hewan coba mamalia seperti tikus.
2. Perlu dilakukan penelitian efek paparan kronik DDN terhadap nekrosis lamela insang dan organ lainnya (ginjal, otak) ikan zebra juvenile.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa yang telah memberikan dana penelitian, kelompok ikan zebra yang telah membantu dalam berjalannya penelitian serta drh. Zainul Fadli, M.Kes selaku reviewer jurnal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ramya S, Jepachanderamohan PJ, Alaguchamy N, Kalayanasundaram M and Jayakumararaj R. In Vitro Antibacterial Prospective of Crude Leaf Extracts of *Melia azedarach* Linn. against Selected Bacterial Strains. *Ethnobot. Leaf*. 2009. 13: 254-25
2. Jafari *et al.* Cytotoxic evaluation of *Melia azedarach* in comparison with, *Azadirachta indica* and its phytochemical investigation. *Daru Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013. 21:37
3. M bah A.U., Udeinya I.J., Shu E.N., Chijioke C.P., Nubila T., Udeinya F. et al. Fractionated neem leaf extract is safe and increases CD4+ cell levels in HIV/AIDS patients, *Am. J. Ther.* 2007. 14(4), 369-74
4. Sharma C., Vas A. J., Goala P., Gheewala T. M., Rizvi T. A., Hussain A. Ethanolic neem (*Azadirachta indica*) leaf extract prevents growth of MCF-7 and HeLa cells and potentiates the therapeutic index of cisplatin. *J. Oncol.* 2014. 2014:321754. 10.1155/2014/321754
5. Boeke S J, Boersma M G, Alink G M, Joop J.A, Loon V, Huis A V, et al. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004. 94 25-41.
6. Chromcova L, Blahova J, Zivna D, Plhalova L, Tocco F C, Divisova L, et al. Neem Azal T/S - toxicity to early-life stages of common carp

- (*Cyprinus carpio* L.). 2015. *Veterinarni Medicina* (1): 23–30.
7. Plhalova, L et al. The Effects of Subchronic Exposure to Metribuzin on *Danio rerio*. *The Scientific World Journal*. 2012.
8. Aswin., et al. Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. Department of Toxicology and Applied Pharmacology TNO Quality of Life, Zeist, The Netherlands. 2011.
11. Ibacon. OECD 203, 204, 215: Fish, Acute Toxicity Test. Registration of Plant Protection Product, Chemical, Biocides, Veterinary Medical Plant and Medicinal Product for Human Use. 2009. 1107
12. Marthayani B. Efek Toksisitas Subkronik Kombinasi Dekokta *Centella asiatica*, *Imperata cylindrica*, dan *Orthosiphon stamineus* Dosis Terapi, MATC, dan LC₅₀ Terhadap Perubahan Kecepatan Berenang Ikan Zebra Dewasa (*Danio rerio*). Skripsi. Universitas Islam Malang. 2018.
13. Macirella R and Brunelli E. Morphofunctional Alterations in Zebrafish (*Danio rerio*) Gills after Exposure to Mercury Chloride. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017.
14. Maftuch, Marsoedi, Putri V D, Lulloh M H, Wibisono F K. Studi Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) Yang Dibudidayakan di Tambak Tercemar Limbah Kadmium (Cd) dan Timbal (Pb) di Kalananyar, Sidoarjo, Jawa Timur Terhadap Histopatologi Hati, Ginjal dan Insang. *Journal of Environmental Engineering & Sustainable Technology*. 2105. Vol. 02 No. 02 Hal. 114-122.
15. Pantung, Nuntiya, Kerstin, G. Helander, Herbert F. H, and Voravit C. Histopathological Alterations of Hybrid Walking Catfish (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*) in Acute and Subacute Cadmium Exposure. *Environment Asia*. 2008. 1 : page 22 -27.
16. Randall D and Brauner C. Effects of environmental factors on exercise in fish. *Jexp.Biol.* 1991. 160, 113-126.
17. Silverthorn, D U. Fisiologi Manusia : Sebuah Pendekatan Terintegrasi. Ed.6. Jakarta:EGC. 2013.
18. Guyton, A.C. Hall, J. E. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi 12. Jakarta:EGC, 1022. 2014
19. Sami J A, Bilal S, Khalid M, Nazir M T, and Shakoori A R. A Comparative Study of Inhibitory Properties of Saponins (derived from *Azadirachta indica*) for Acetylcholinesterase of *Tribolium castaneum* and *Apis mellifera*. *Pakistan J Zool*. 2018.
20. Perdani, F. Efek Kombinasi *Imperata cylindrica*, *Gynura procumbens* dan *Syzygium polyanthum* terhadap Perubahan Perilaku Kecepatan Berenang pada *Danio rerio*. Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang : Malang. 2014.
21. Pelletier, S W. Alkaloids : Chemical and Biological Perspective. Pergamon. Vol.11. 2005.
22. Binienda, Z. Sarkar, S. Mohammed-Saeed, L. Gough B. Beaudoin, M. Ali, S. Paule, M. Imam S. 2013. Chronic Exposure to Rotenone, a Dopaminergic Toxin, Result's in Peripheral Neuropathy Associated with Dopaminergic Damage. *Neuroscience Letters*. 541: 233– 237
23. Kumar T P, Antony S, Gireesh G, George N dan Paulose C S. Curcumin Modulates Dopaminergic Receptor, CREB and Phospholipase C Gene Expression in The Cerebral Cortex and Cerebellum of Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *J Biomed Sci*. 2010
24. Ryczko D and Dubuc R. Dopamine and the Brainstem Locomotor Networks: From Lamprey to Human. *Universite du Quebec a Montreal, Montreal, Q C. Kanada*. 2017.
25. Kumar, Cotran, Robbins. Buku Ajar Patologi. Jakarta: EGC. 2004.
26. Santos D M, et al. Histological Changes in Gills of Two Fish Species as Indicators of Water Quality in Jansen Lagoon. *Int. J. Environ. Public Health*. 2014.
27. Katzung, Bertra G. Farmakologi Dasar dan Klinik Ed.10. Jakarta:EGC. 2012.
28. Hayati A, Rose I U, Dwi W. Pengaruh Kadmium terhadap Struktur Histologis Insang Ikan Lele (*Claris Batrachus*). Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. 2015.
29. Putri A N. Uji Toksisitas Subkronik Dekokta Kombinasi *Imperata cylindrica*, *Gynura procumbens*, dan *Syzygium polyanthum* Terhadap Hiperplasia Lamela Insang *Danio rerio*. Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang. 2015.
30. Leksana C P. Efek Toksisitas Subkronik Kombinasi Dekokta *Centella asiatica*, *Imperata cylindrica*, dan *Orthosiphon stamineus* Dosis Terapi, MATC, dan LC₅₀ Terhadap Perubahan Kecepatan Berenang Ikan Zebra Dewasa (*Danio rerio*). Skripsi. Universitas Islam Malang. 2016.
31. Yadav D K, Bharitkar Y P, Chatterjee K, Ghosh M, Mondal N B and Swarnakar S. Importance of Neem Leaf: An insight into its role in combating diseases. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2016. Vol. 54, pp. 708-718.