

**EFEK TERATOGENIK DEKOKTA DAUN NIMBA (*Azadirachta indica* A. Juss.)
TERHADAP DAYA TETAS DAN LUAS AREA YOLK SAC PADA EMBRIO IKAN
ZEBRA (*Danio rerio*)**

Anisa Armadani, Rizki Anisa, Noer Aini
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang
Email: armadani.anisa@yahoo.com

A B S T R A K

Pendahuluan: Daun Nimba memiliki banyak kegunaan, namun belum diketahui efek toksiknya terutama pada pertumbuhan dan perkembangan janin. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji teratogenik dekokta daun nimba (DDN) untuk menilai keamanan daun nimba pada kondisi kehamilan dengan mengamati daya tetas dan luas area *yolk sac* embrio ikan zebra.

Metode: Embrio ikan zebra dibagi dalam 5 kelompok yaitu kontrol (P0), DDN dosis terapi 20 µg/mL (P1), DDN dosis ½ MATC 61 µg/mL (P2), DDN dosis MATC 123 µg/mL (P3), dan DDN dosis LC₅₀ 260 µg/mL (P4). Dosis LC₅₀ didapatkan melalui *range-finding doses* yang nantinya ditentukan dari kematian 50% sampel, sedangkan dosis MATC didapatkan melalui rumus $\sqrt[2]{LOEC \times NOEC}$. Jumlah sampel tiap kelompok variabel daya tetas adalah 10 embrio dan variabel luas area *yolk sac* sebesar 5 embrio. Pemaparan dilakukan ketika embrio berusia 5.25 *hour post fertilization* (hpf) sampai 72 hpf dan dilanjutkan pengamatan dibawah mikroskop stereo perbesaran 4.5x yang terhubung dengan komputer. Untuk variabel daya tetas, perlakuan diulang sebanyak 3 kali, sedangkan perlakuan pada variabel luas area *yolk sac* dilakukan sebanyak 1 kali. Daya tetas dihitung menggunakan metode Hogendoorom, sedangkan pengukuran luas area *yolk sac* menggunakan *software Image J*. Nilai dianggap signifikan jika $p < 0.05$.

Hasil: Pemaparan DDN di semua kelompok tidak menyebabkan penurunan yang signifikan terhadap daya tetas embrio ikan zebra, meskipun terdapat kecenderungan penurunan daya tetas pada kelompok P4 sebesar 10% dibandingkan P0. Paparan DDN kelompok P1 tidak meningkatkan secara signifikan luas area *yolk sac* dibandingkan P0, sedangkan pemaparan DDN pada kelompok P2, P3, dan P4 dapat meningkatkan luas area *yolk sac* secara signifikan berturut-turut sebesar 12.5%, 17%, dan 25%.

Kesimpulan: Peningkatan dosis DDN tidak berpengaruh pada perubahan daya tetas namun terjadi peningkatan luas area *yolk sac* embrio ikan zebra.

Kata Kunci: dekokta daun nimba, uji toksisitas, daya tetas, luas area *yolk sac*

**TERATOGENIC EFFECT OF NEEM LEAVES DECOCTA (*Azadirachta indica* A. Juss.) ON HATCHABILITY AND YOLK SAC AREAS IN ZEBRAFISH EMBRYO
(*Danio rerio*)**

Anisa Armadani, Rizki Anisa, Noer Aini
Medical Faculty of Malang Islamic University
Email: armadani.anisa@yahoo.com

A B S T R A C T

Introduction: Neem leaf has many uses, but not yet known the toxic effects especially on fetal growth and development. Therefore, it is necessary to carry out the teratogenic test of neem leaves decocta (NLD) to assess the safety of neem leaves in pregnancy conditions by observing hatchability and yolk sac area of zebrafish embryos.

Methods: Zebrafish embryos were divided into 5 groups, control (P0), NLD therapeutic dose 20 µg/mL (P1), NLD ½ MATC dose 61 µg/mL (P2), NLD MATC dose 123 µg/mL (P3), and NLD LC₅₀ dose 260 µg/mL (P4). The LC₅₀ dose is obtained through a range-finding doses which will be determined from the death of 50% of the sample, while the MATC dose is obtained through the formula $\sqrt[2]{LOEC \times NOEC}$. The number of samples in each group for hatchability variables is 10 embryos and the yolk sac area variable is 5 samples. The exposure was done when the embryo was 5.25 hpf (hour post fertilization) up to 72 hpf and then observed under a stereo microscope with 4.5x magnification that has connected to a computer. For hatchability variables, the treatment was repeated 3 times, while for the yolk sac area variable was done once. Hatchability was calculated using the Hogendoorom method, while the measurement of the yolk sac area used Image J software. Value is considered significant if $p < 0.05$.

Results: NLD exposure in all groups did not cause a significant decrease in zebrafish embryo hatchability, although there was a trend of decreasing hatchability in the P4 group by 10% compared to P0. NLD exposure on group P1 did not significantly increase the yolk sac area compared to P0, while NLD exposure in group P2, P3 and P4 can significantly increase the yolk sac area by 12.5%, 17%, and 25% compared to P0.

Conclusion: The increase in dosage of NLD did not affect changes in hatchability but there was an increase in the yolk sac area of zebrafish embryos.

Keywords: neem leaves decocta, toxicity test, hatchability, yolk sac area

PENDAHULUAN

Indonesia kaya akan keanekaragaman hayati yang dapat digunakan untuk mengatasi masalah kesehatan^{1,2}. Bangsa Indonesia sudah lama mengenal dan memanfaatkan tanaman berkhasiat obat salah satunya Nimba (*Azadirachta indica* A. Juss.). Menurut data empirik, daun nimba dapat mengatasi demam, kencing manis, pegal linu, cacingan, dan ulkus lambung³. Zat aktif utama pada nimba yaitu *azadirachtin*, berfungsi sebagai antimalaria, hepatoprotektif, dan antioksidan. Selain itu, zat aktif dalam daun nimba seperti *quercetin* memiliki efek antioksidan, *antifungal*, dan antibakteri^{4,5}. Banyaknya manfaat daun nimba diduga menjadi salah satu alternatif pengobatan pada pasien dalam kondisi tertentu seperti kehamilan. Ibu hamil cenderung menghindari penggunaan obat-obatan sintesis karena beresiko memberikan efek samping lebih besar pada janin^{2,6}.

Selain memiliki efek positif bagi tubuh dan dianggap lebih aman dibandingkan obat sintesis, suatu herbal dapat memberikan efek toksik jika dikonsumsi secara berlebihan serta dalam jangka waktu lama⁷. Dari penelitian sebelumnya yang dilakukan pada mencit jantan, menunjukkan bahwa ekstrak air daun nimba dosis 200 mg/kgBB menyebabkan peningkatan abnormalitas morfologi spermatozoa, menurunkan motilitas serta jumlah sperma⁸. Penelitian lain menyebutkan bahwa ekstrak metanol daun nimba dosis 40-50 mg/kgBB menyebabkan toksisitas pada mencit dengan tanda adanya spasme gastrointestinal, hipotermia, *terminal convulsion*, bahkan kematian⁹.

Adanya kemungkinan efek toksik herbal terhadap tubuh, maka perlu dilakukan uji toksisitas. Selama ini, belum ada penelitian mengenai efek teratogenik daun nimba pada saat kehamilan. Uji teratogenik dapat dilakukan pada zat yang akan dikonsumsi saat masa kehamilan dengan tujuan untuk mengetahui efek yang ditimbulkan terhadap pertumbuhan dan perkembangan janin seperti abnormalitas morfologi, jaringan lunak, dan kerangka fetus¹⁰.

Embrio ikan zebra memiliki beberapa keunggulan untuk dijadikan hewan model uji toksikologi¹¹. Hal ini didasarkan pada kemiripan gen 70% homolog dengan gen manusia, sedangkan 84% gen ikan zebra homolog dengan penyakit pada manusia. Keunggulan lainnya adalah ukuran yang kecil, pertumbuhan dan perkembangan embrio yang cepat dan diluar tubuh induk, serta telur yang transparan sehingga mudah untuk diamati¹². Penelitian ini menggunakan embrio ikan zebra usia 5.25 hpf (fase gastrulasi) yang setara dengan manusia ketika usia kehamilan 3 minggu (fase gastrulasi)^{13,14}. Masa organogenesis embrio manusia terjadi saat usia kehamilan 3 sampai 8 minggu, sehingga konsumsi senyawa asing menyebabkan resiko yang besar untuk terjadi malformasi mayor pada janin¹⁵.

Efek toksik pada herbal dapat diamati dari daya tetas dan luas area *yolk sac* embrio ikan zebra.

Penetasan adalah proses penting pada perkembangan ikan. Proses tersebut menandakan bahwa embrio telah tumbuh dan berkembang secara sempurna¹⁶. Adanya abnormalitas daya tetas mengindikasikan terjadinya gangguan pada pertumbuhan dan perkembangan embrio¹⁷. Peningkatan luas area *yolk sac* (edema *yolk sac*) menandakan adanya gangguan osmotik maupun gangguan pertumbuhan dan perkembangan ginjal^{18,19}. Sedangkan menurut data klinis, edema *yolk sac* yang terjadi pada wanita hamil, mengakibatkan aborsi spontan²⁰.

Untuk mengetahui keamanan penggunaan herbal daun nimba, maka perlu dilakukan penelitian mengenai efek teratogenik dekoka daun nimba (*Azadirachta indica* A. Juss.) terhadap daya tetas dan luas area *yolk sac* embrio ikan zebra (*Danio rerio*).

METODE

Desain, Tempat, dan Waktu Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorik secara *in vivo* dengan menggunakan desain penelitian *control group post test only design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek toksik herbal daun Nimba (*Azadirachta indica* A. Juss.) terhadap daya tetas dan luas area *yolk sac* embrio ikan Zebra (*Danio rerio*) yang diamati dengan menggunakan mikroskop stereo pada usia 72 hpf. Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Islam Malang yang dimulai pada bulan Januari sampai bulan Juni 2018.

Kelengkapan Etik

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan kelengkapan etik dari Komisi Etik Penelitian (*Animal Care and Use Committee*) Universitas Brawijaya dengan Nomor: 923-KEP-UB Tahun 2018.

Sampel

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah embrio ikan zebra (*Danio rerio*) usia 5.25 hpf (*hour post fertilisation*) hasil pemijahan ikan zebra jantan dan betina dewasa yang berumur >4 bulan. Ikan zebra dewasa diperoleh dari Sentra Pembiakan Ikan Zebra Tulungagung, Jawa Timur yang telah didaftarkan dan disertifikasi di Fakultas Kelautan dan Perikanan Universitas Muhammadiyah Malang dengan Nomor: 02/Analisa/Lab.Perikanan/FPP-UMM/XII/2017.

Jumlah sampel ditentukan menurut rumus Federer, sehingga didapatkan 10 sampel untuk tiap kelompok pada variabel daya tetas dan 5 sampel untuk tiap kelompok pada variabel luas area *yolk sac*.

Pembuatan Dekoka Daun Nimba (DDN)

Penelitian ini menggunakan simplisia daun Nimba (*Azadirachta indica* A. Juss.) yang didapatkan dari UPT Materia Medica Batu dan telah disertifikasi dengan Nomor: 074/440/102.7/2017.

Dosis DDN yang dipaparkan pada embrio ikan zebra adalah dosis terapi, $\frac{1}{2}$ MATC, *Maximum Allowable Toxicant Concentration* (MATC), dan

Lethal Concentration (LC₅₀). Dosis terapi DDN ditentukan berdasarkan penelitian Osanaiye (2013) yang menggunakan DDN sebagai terapi antimalaria, yaitu sebesar 20 µg/mL.

Dosis LC₅₀ diperoleh dari *range-finding doses* dan analisa probit²¹. *Range-finding doses* dilakukan dengan memaparkan beberapa konsentrasi DDN pada embrio ikan zebra usia 5.25 *hpf* sampai usia 72 *hpf*. Pada akhir pemaparan, kematian embrio di tiap konsentrasi DDN dihitung. Kematian sampel sebanyak 50% pada konsentrasi tertentu yang telah dianalisa probit, merupakan dosis LC₅₀.

Dosis M A T C dihitung melalui rumus $\sqrt[2]{LOEC \times NOEC}$ yang didapatkan dari *range-finding doses*²². *Lowest Observable Effect Concentration* (LOEC) adalah konsentrasi terendah dari senyawa yang memberikan efek negatif bagi hewan coba. *No Observable Effect Concentration* (NOEC) adalah konsentrasi tertinggi dari senyawa yang tidak memberikan efek negatif bagi hewan coba.

DDN dibuat dengan cara memasukkan 1000 mL *aquadest* ke dalam panci dekok dan dipanaskan hingga suhu air mencapai 90°C. Setelah itu dimasukkan simplisia daun Nimba dengan jumlah sesuai dosis yang akan digunakan yaitu dosis terapi 20 mg, ¹/₂ M A T C 61 mg, M A T C 123 mg, dan LC₅₀ 260 mg selanjutnya ditunggu selama 30 menit dan diaduk tiap 10 menit. Setelah 30 menit, DDN didinginkan, dan disaring dengan kertas saring²³. Kelompok perlakuan dan dosis DDN dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Kelompok Perlakuan dan Dosis DDN

Kelompok	Bentuk Perlakuan
P0	<i>Aquadest</i>
P1	DDN dosis terapi (20 µg/mL)
P2	DDN dosis ¹ / ₂ M A T C (61 µg/mL)
P3	DDN dosis M A T C (123 µg/mL)
P4	DDN dosis LC ₅₀ (260 µg/mL)

Pemijahan dan Pemeliharaan Embrio Ikan Zebra

Pemijahan menggunakan perbandingan jumlah ikan zebra jantan dan betina yaitu 2 : 1 dengan siklus pencahayaan 14 jam terang dan 10 jam gelap^{24,25,26}. Pemberian makanan dilakukan sebanyak 3-5 kali sehari dengan *dry flake Tetramin* dan makanan tambahan yaitu *Artemia*²⁶. *Spawning trap* diletakkan di dasar akuarium sebagai tempat meletakkan embrio ikan zebra yang nantinya akan dipanen 30-60 menit setelah periode terang dimulai.

Embrio yang diperoleh dari pemijahan, diambil dan dipindahkan ke dalam *petri disk* yang telah diberi *embryonic medium*. Embrio yang hidup, sehat, dan telah mengalami fertilisasi dipilih dengan cara mengamatnya dibawah mikroskop stereo, untuk dipindahkan ke 24-well plate dengan 1 well berisi 1 embrio²⁶.

Perlakuan dan Pengamatan Daya Tetas Embrio Ikan Zebra

Embrio dibagi menjadi 5 kelompok sesuai pada tabel 1 dengan masing-masing kelompok

menggunakan 10 embrio dan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Embrio usia 5.25 *hpf* (awal periode gastrula) dipapar dengan DDN sesuai dosis pada tiap kelompok sampai embrio berusia 72 *hpf* (akhir periode penetasan) dan DDN diganti setiap 24 jam. Pemaparan dilakukan dengan cara mengambil DDN menggunakan *disposable pipette* dan dimasukkan ke 24 well plate. Embrio diamati dengan mikroskop stereo diusia 24, 48 dan 72 *hpf*, kemudian daya tetas tiap kelompok dihitung pada jam ke 72 *hpf* berdasarkan metode Hogendoorom dan Vismans^{27,28,29}.

Perlakuan dan Pengukuran Luas Area Yolk sac Embrio Ikan Zebra

Embrio dibagi menjadi 5 kelompok sesuai pada tabel 1 dengan masing-masing kelompok menggunakan 5 embrio. DDN dipaparkan sesuai dosis pada tiap kelompok mulai usia embrio 5.25 *hpf* (awal periode gastrula) sampai usia 72 *hpf* (akhir periode penetasan) dan diganti setiap 24 jam. Pemaparan dilakukan dengan cara mengambil DDN menggunakan *disposable pipette* dan dimasukkan ke 24 well plate. Embrio diamati dengan mikroskop stereo diusia 24, 48 dan 72 *hpf*, kemudian pada usia 72 *hpf* disetiap kelompok difoto menggunakan mikroskop stereo perbesaran 4.5x yang terhubung dengan komputer dan dioperasikan menggunakan *software Honestech vhs to dvd 2.5 se*. Hasil foto yang didapatkan diukur menggunakan *software Image J* untuk mengetahui luas area *yolk sac*. Satuan dalam gambar adalah *pixels* yang merupakan representasi titik terkecil dalam suatu gambar. Untuk mendapatkan luas area yang sebenarnya, maka satuan *pixels* dikonversi menjadi mm³⁰.

Analisa Data

Data hasil penelitian diuji normalitas dan homogenitas kemudian dianalisa menggunakan *Kruskal-Wallis* yang dioperasikan melalui program SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) versi 23.0. Data luas area *yolk sac* selanjutnya dianalisa menggunakan *Mann-Whitney*. Nilai perbedaan dianggap bermakna apabila $p < 0.05$.

HASIL DAN ANALISA DATA

Karakteristik Sampel

Sampel yang digunakan adalah embrio ikan zebra usia 5.25 *hpf* hasil pemijahan dari ikan zebra dewasa jantan dan betina dengan perbandingan jumlah 2:1 selama 14 jam terang dan 10 jam gelap. Ringkasan karakteristik sampel dapat dilihat pada Tabel 2.

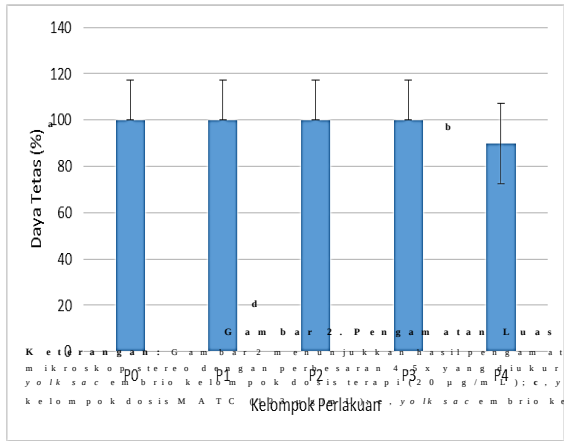
Tabel 2. Karakteristik Sampel

Karakteristik	P0	P1	P2	P3	P4
Lama pemijahan	14 jam terang, 10 jam gelap	14 jam terang, 10 jam gelap	14 jam terang, 10 jam gelap	14 jam terang, 10 jam gelap	14 jam terang, 10 jam gelap
Usia embrio	5.25 hpf	5.25 hpf	5.25 hpf	5.25 hpf	5.25 hpf
Jumlah embrio tiap kelompok	• 5 (luas area yolk sac) • 10 (daya tetas)	• 5 (luas area yolk sac) • 10 (daya tetas)	• 5 (luas area yolk sac) • 10 (daya tetas)	• 5 (luas area yolk sac) • 10 (daya tetas)	• 5 (luas area yolk sac) • 10 (daya tetas)
Suhu lingkungan	± 28°C	± 28°C	± 28°C	± 28°C	± 28°C
DDN (µg/mL)	-	20	61	123	260
Lama pemaparan	Sampai usia 72 hpf	Sampai usia 72 hpf	Sampai usia 72 hpf	Sampai usia 72 hpf	Sampai usia 72 hpf

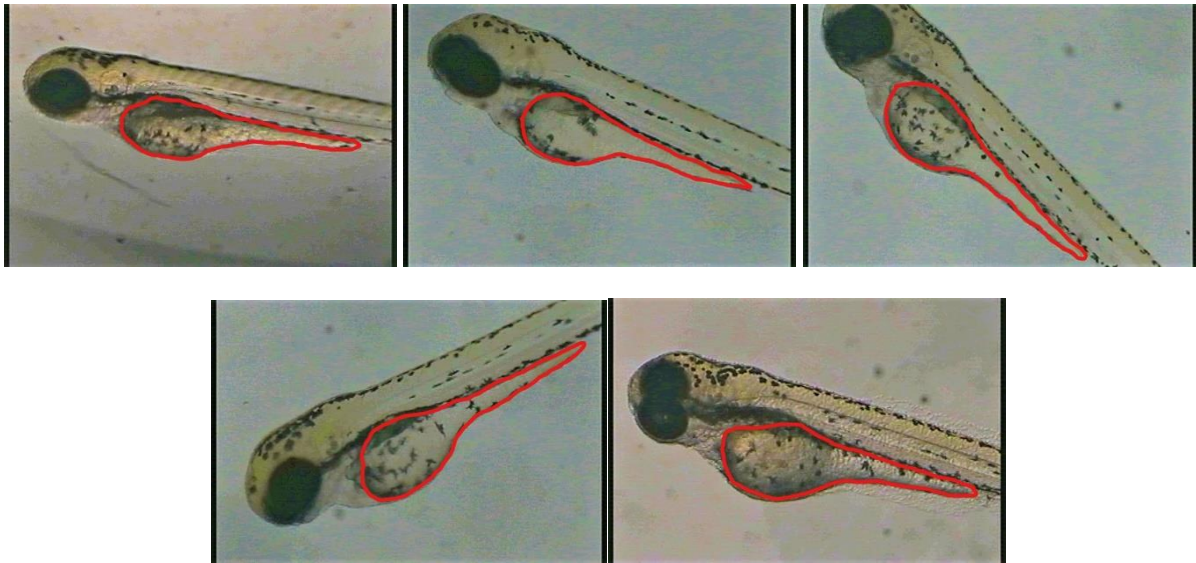
Keterangan:
P0, kelompok kontrol; P1, kelompok dosis terapi (20 µg/mL); P2, kelompok dosis ½ MATC (61 µg/mL); P3, kelompok dosis MATC (123 µg/mL); P4, kelompok dosis LC₅₀ (260 µg/mL); hpf, hour post fertilization; DDN, Dekokta Daun Nimba.

Efek Dekokta Daun Nimba terhadap Daya Tetas Embrio Ikan Zebra

Daya tetas embrio ikan zebra pasca pemaparan DDN dapat dilihat pada gambar 1 dibawah ini:



Gambar 1. Histogram Rerata Daya Tetas Embrio Ikan Zebra

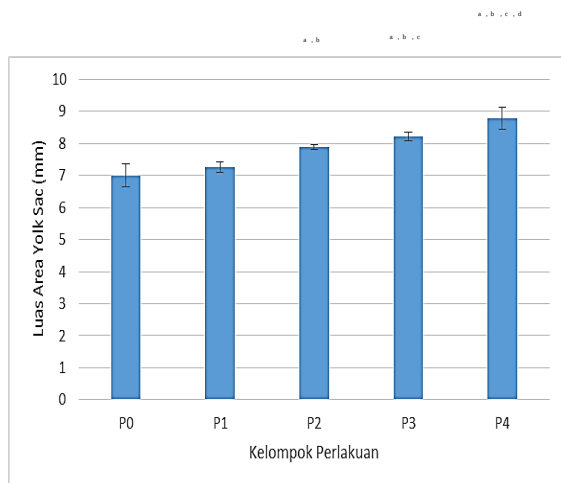


Keterangan: Gambar 1 menunjukkan rerata daya tetas embrio ikan zebra usia 72 hpf. Pada kelompok kontrol/P0 (100.00±0.00); DDN dosis terapi 20 µg/mL/P1 (100.00±0.00); DDN dosis ½ MATC 61 µg/mL/P2 (100.00±0.00); DDN dosis MATC 123 µg/mL/P3 (100.00±0.00); dan DDN dosis LC₅₀ 260 µg/mL/P4 (90.00±17.32). Data dalam mean±SD dan telah diuji statistik menggunakan Kruskal Wallis.

Dari analisa data, tidak didapatkan penurunan daya tetas embrio ikan zebra yang signifikan diantara kelompok penelitian. Tampak kecenderungan penurunan daya tetas pada P4 dibanding kelompok lainnya (P0, P1, P2, dan P3) sebesar 10% (p>0.05).

Efek Dekokta Daun Nimba terhadap Luas Area Yolk Sac Embrio Ikan Zebra

Gambar 2 menunjukkan luas area yolk sac embrio ikan zebra usia 72 hpf menggunakan mikroskop stereo dengan perbesaran 40x yang diukur menggunakan software ImageJ. Luas area yolk sac embrio ikan zebra pasca pemaparan DDN dapat dilihat pada gambar 2 dan c.



Gambar 3. Histogram Rerata Luas Area Yolk Sac Embrio Ikan Zebra

Keterangan: Gambar 3 menunjukkan rerata luas area yolk sac embrio ikan zebra usia 72 hpf. Pada kelompok kontrol/P0 (7.00 ± 0.35); DDN dosis terapi 20 µg/mL/P1 (7.25 ± 0.16); DDN dosis ½ MATC 61 µg/mL/P2 (7.88 ± 0.08); DDN dosis MATC 123 µg/mL/P3 (8.21 ± 0.12); dan DDN dosis LC₅₀ 260 µg/mL/P4 (8.78 ± 0.34). Data dalam $mean \pm SD$ dan telah diuji statistik menggunakan *Kruskal Wallis*. Notasi a, berbeda signifikan terhadap P0; notasi b, berbeda signifikan terhadap P1; notasi c, berbeda signifikan terhadap P2; notasi d, berbeda signifikan terhadap P3.

Hasil analisa data pada kelompok perlakuan (P2, P3, dan P4) menunjukkan peningkatan luas area yolk sac secara signifikan berturut-turut sebesar 12.5%, 17%, dan 25% dibandingkan P0 ($p < 0.05$).

PEMBAHASAN

Karakteristik Sampel

Untuk mendapatkan embrio sebagai sampel penelitian, dilakukan pemijahan ikan zebra dewasa betina dan jantan dengan pencahayaan 14 jam terang dan 10 jam gelap. Periode terang berguna dalam adaptasi ikan, sedangkan periode gelap digunakan ikan untuk beristirahat. Ikan zebra betina akan bertelur dan ikan zebra jantan akan melakukan fertilisasi setelah periode terang kembali selama 30 menit³¹. Ikan zebra memiliki kemiripan gen dengan manusia sebesar 70% sehingga sesuai digunakan sebagai model hewan coba¹². Selain itu, embrio ikan zebra yang transparan dan berkembang secara eksternal akan memudahkan dalam pengamatan³².

Berdasarkan ICH S5 (R2), uji teratogenik pada mamalia (tikus dan kelinci) dilakukan saat mulainya fase gastrulasi, yang pada embrio ikan zebra, fase gastrulasi berada pada usia 5.25 hpf^{33,34}. Usia tersebut menandakan terbentuknya *primary germ layer* pada embrio yang nantinya akan berkembang menjadi sistem penyusun tubuh, sehingga paparan toksikan di usia tersebut dapat menimbulkan efek teratogenik^{14,28,35,36,37}. Pada penelitian sebelumnya juga menyebutkan bahwa paparan obat anti epilepsi terhadap embrio *Danio rerio* usia 5.25 hpf, menyebabkan efek teratogenik berupa abnormalitas morfologi yang diamati pada usia 72 hpf²⁹.

Suhu penyimpanan embrio ikan zebra dalam inkubator diatur sebesar $\pm 28^\circ\text{C}$ ²⁵. Apabila suhu

berada di atas 31°C atau di bawah 25°C maka akan mengganggu perkembangan embrio³⁸. Embrio dibagi dalam 5 kelompok perlakuan yaitu P0 (kontrol), P1 (dosis terapi 20 µg/mL), P2 (dosis ½ MATC 61 µg/mL), P3 (dosis MATC 123 µg/mL), dan P4 (dosis LC₅₀ 260 µg/mL). Selanjutnya embrio dipapar dengan DDN sampai usia 72 hpf yang merupakan usia maksimum penetasan secara normal³⁹.

Efek Dekokta Daun Nimba terhadap Daya Tetas Embrio Ikan Zebra

Pada penelitian ini, tidak didapatkan penurunan daya tetas embrio ikan zebra yang dipapar oleh DDN pada kelompok dosis terapi (20 µg/mL), maupun pada kelompok ½ MATC (61 µg/mL), MATC (123 µg/mL), dan LC₅₀ (260 µg/mL) dibandingkan kontrol ($p > 0.05$). Namun terdapat kecenderungan penurunan daya tetas pada DDN kelompok dosis LC₅₀ (260 µg/mL) dibandingkan kontrol sebesar 10% ($p > 0.05$). Daya tetas menandakan bahwa perkembangan dan pertumbuhan embrio telah optimal¹⁶. Apabila terdapat beberapa abnormalitas morfologi seperti malformasi kepala, ekor dan *vertebrae*, *non-detachment tail*, ataupun *stunted tail*, maka dapat menurunkan daya tetas embrio ikan zebra¹⁷. Daya tetas juga dipengaruhi oleh faktor internal embrio seperti pergerakan embrio dan enzim protease yang disekresikan oleh *Hatching Gland Cells* (HGCs) embrio. Adanya penurunan pergerakan embrio atau penurunan sekresi enzim protease yang berperan dalam penetasan, akan menyebabkan gangguan proses penetasan^{40,41}.

Dash (2017) menyatakan bahwa kandungan *terpenoid* pada DDN memiliki konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan zat aktif lainnya⁴². *Azadirachtin* yang merupakan golongan *terpenoid* diketahui dapat menghambat sekresi hormon peptida seperti prolaktin yang meregulasi penetasan embrio ikan zebra^{43,44,45,46}. *Azadirachtin* juga dapat mengganggu mikrofiliament, yaitu protein sitoskeletal yang berperan dalam pembelahan sel sehingga proses tersebut nantinya akan terganggu dan menyebabkan terhambatnya pertumbuhan embrio⁴⁷. Tidak terjadinya penurunan daya tetas pada kelompok DDN dosis terapi, ½ MATC, dan MATC diduga kadar *azadirachtin* yang terakumulasi dalam embrio tidak cukup menyebabkan ikatan antara ligan dengan reseptornya secara optimal⁴⁸.

Pada dosis LC₅₀ terjadi kecenderungan penurunan daya tetas namun tidak signifikan jika dibandingkan kontrol. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Ponrasu (2012) yang menyebutkan bahwa ekstrak etanol daun *Anona squamosa* dosis 200-800 µg yang mengandung *terpenoid*, menunjukkan kecenderungan penurunan daya tetas embrio ikan zebra ($p > 0.05$)⁴⁹. Hal tersebut kemungkinan dikarenakan kadar *azadirachtin* pada dosis LC₅₀ cukup bermakna sehingga mampu berikatan dengan reseptor penghambat sekresi prolaktin atau mengganggu ikatan protein sitoskeleton. Pada penelitian yang dilakukan oleh anggota kelompok pohon penelitian (Imam, 2018), didapatkan bahwa paparan DDN 260 µg/mL

menurunkan denyut jantung embrio secara signifikan pada usia 72 hpf⁵⁰. Adanya penurunan denyut jantung menyebabkan distribusi oksigen ke seluruh tubuh terganggu sehingga terjadi kondisi hipoksia. Embrio yang mengalami hipoksia diduga dapat menurunkan daya tetasnya, dikarenakan oksigen merupakan senyawa yang berperan penting dalam pembelahan dan diferensiasi sel, terutama saat fase pertumbuhan dan perkembangan embrio^{51,52}.

Efek Dekokta Daun Nimba terhadap Luas Area Yolk Sac Embrio Ikan Zebra

Pada penelitian ini, didapatkan peningkatan luas area yolk sac yang bergantung pada konsentrasi DDN. Semakin tinggi konsentrasi DDN, maka semakin meningkatkan luas area yolk sac. Pemberian DDN dosis ½ MATC, MATC, dan LC₅₀ meningkatkan luas area yolk sac embrio ikan zebra secara signifikan.

Adanya peningkatan luas area yolk sac diduga diakibatkan oleh senyawa *quercetin* dan *saponin* yang diberikan pada dosis berlebih. *Quercetin* kemungkinan dapat menyebabkan edema yolk sac oleh karena peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) melalui dua mekanisme^{53,54}. Pertama, *quercetin* dapat membentuk senyawa *Quercetin-O* yang bersifat *pro-oxidant* ketika menetralkan radikal peroksil (ROO[•])^{54,55}. Kedua, *quercetin* dapat mengganggu aktifitas sistem antioksidan *thioredoxin* (Trx) dan *glutathione* (GSH)⁵⁴. Dari kedua mekanisme tersebut, maka ROS yang merupakan senyawa reaktif karena memiliki elektron tak berpasangan, dapat menyebabkan peroksidasi lipid pada *phospholipid bilayer* apabila mengenai membran sel khususnya pada sel-sel *barrier yolk sac*. Kondisi tersebut akan menyebabkan kerusakan sehingga permeabilitas terganggu dan cairan yang masuk tidak terkontrol, selanjutnya, terjadi edema yolk sac yang merupakan jejas sel reversibel⁵⁶. Untuk mengetahui secara pasti kadar antioksidan (SOD, CAT, dan GPX) dan radikal bebas (MDA) embrio akibat paparan DDN, maka dapat dilakukan pengukuran pada supernatan larutan yang diperoleh dari sentrifugasi embrio ikan zebra⁵⁷.

Pada embrio ikan, lemak endogen seperti fosfolipid dan trigliserol disimpan dalam bentuk globul-globul pada sel yolk^{58,59}. Yolk sac memiliki fungsi dalam mendistribusikan nutrisi dari sel yolk dengan cara memecah zat dari sel yolk dan mengedarkannya menuju jaringan-jaringan embrio⁶⁰. Apabila terdapat gangguan sintesis dan metabolisme lemak, maka dapat menyebabkan gangguan pada yolk sac seperti edema yolk sac⁵⁹. Saponin yang terkandung pada DDN diduga dapat menyebabkan edema yolk sac dengan mekanisme hemolisis pada eritrosit. Akibatnya, kadar oksigen dalam darah akan menurun sehingga mengganggu proses metabolisme lemak dan menyebabkan edema yolk sac yang ditandai dengan peningkatan luas area yolk sac^{61,62}.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa pemberian DDN dosis ½ MATC, MATC, dan LC₅₀ tidak menyebabkan penurunan daya tetas meskipun terjadi peningkatan luas area yolk sac embrio ikan zebra (*Danio rerio*).

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka saran dari peneliti untuk pengembangan yang lebih lanjut adalah:

1. Melakukan penelitian lanjutan mengenai abnormalitas morfologi (malformasi kepala, mata, dan ekor; kelengkungan *vertebrae*; *non-detachment tail*; atau *stunted tail*), pergerakan embrio, serta kadar enzim protease pada embrio ikan zebra yang dipapar DDN
2. Melakukan penelitian lanjutan mengenai efek toksik DDN terhadap luas area yolk sac embrio ikan zebra dengan mengamati penanda yang lebih spesifik seperti pengukuran kadar antioksidan (SOD, CAT, GPX) dan radikal bebas (MDA)
3. Melakukan penelitian lanjutan untuk melihat *stunting* dan pergerakan larva yang dipapar DDN secara akut

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Ikatan Orangtua Mahasiswa (IOM) yang telah memberikan dana penelitian, kelompok ikan zebra yang selalu membantu dalam berjalannya penelitian, serta dr. Rahma Triliana, M.Kes, Ph.D selaku *reviewer*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Triyono K. Keanekaragaman Hayati dalam Menunjang Ketahanan Pangan. INNOFARM: Jurnal Inovasi Pertanian. 2013; 11(1).
2. Bustanussalam. Pemanfaatan Obat Tradisional (Herbal) sebagai Obat Alternatif. *BioTrends*. 2016; 7(1).
3. Mallaleng HR, Unik P, Risa H, Naning S, Farid ZNS. Tanaman Obat untuk Penyakit Sindrom Metabolisme. Malang. Universitas Negeri Malang (UM Press). 2015.
4. Alzohairy MA. Therapeutic Role of *Azadirachta indica* (neem) and Their Active Constituents in Disease Prevention and Treatment. Hindawi Publishing Corporation. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine. 2016; 2016: 11 pages.
5. Pankaj S, Lokeshwar T, Mukesh B, Vishnu B. Review on Neem (*Azadirachta indica*): Thousand Problem One Solution. International Research Journal of Pharmacy. 2011; 2(12): 97-102.

6. Romm A. Pregnancy and Botanical Medicine Use and Safety. *Botanical Medicine for Women's Health*. 2010; 321-333.
7. Muslimin L, Wicaksana B, Setiyawan, Ari N, Sukesi H, Surachman H. *Kajian Potensi Pengembangan Pasar Jamu*. Badan Penelitian dan Pengembangan Perdagangan Dalam Negeri. 2012.
8. Mishra RK, Singh SK. Effect of Aqueous leaf Extract of *Azadirachta indica* on The Reproductive Organs in Male Mice. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2005; 43: 1093-1103.
9. Kanungo D. In *Neem* (Eds Randhawa and Parmar, B. S.). 2nd ed. 1996; pp. 77-110.
10. Christianty FM, Winarti L. Uji Teratogenik Campuran Serbuk Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa* L.), Biji Kelabet (*Trigonella foenum-graecum* L.), dan Ginseng (*Panax ginseng* C. A. Mey) pada Tikus Putih Galur Wistar. *Stomatognatic (j. K. G Unej)*. 2012; 9(3): 155-161.
11. Lantz-McPeak S, Guo X, Cuevas E, Dumas M, Newport GD, Ali SF, et al. Developmental Toxicity Assay using High Content Screening of Zebrafish Embryos. *Journal of Applied Toxicology*. 2014.
12. Basnet RM, Guarienti M, Mano M. Zebrafish Embryo as an *In Vivo* model for Behavioral and Pharmacological Characterization of Methylxanthine Drugs. *International Journal of Molecular Science*. 2017; 18, 596.
13. Hill MA. Embryology Zebrafish Development. 2017. Available from: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Zebrafish_Development.
14. Hill MA. Embryonic Development. 2018. Available from: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Embryonic_Development.
15. Basel D. Dysmorphology. *Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis*. 2018; 393-410.
16. Tolentino JJV, Undan JR. Embryo-Toxicity and Teratogenicity of *Derris elliptica* Leaf Extract on Zebra Fish (*Danio rerio*) Embryos. *Int. J. Pure App. Biosci*. 2016; 4(3): 16-20.
17. Romagosa CMR, Dacid ES, Dulay RMR. Embryo-toxic and Teratogenic Effects of *Tinospora cordifolia* Leaves and Bark Extracts in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 2016; 6(2): 37-41.
18. Hanke N, Staggs L, Schröder P, Litteral J, Fleig S, Kaufeld J, et al. "Zebrafishing" for Novel genes Relevant to The Glomerular Filtration Barrier. *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation; 2013; Vol.2013. 12 pp.
19. Hill AJ, Bello SM, Prasch AL, Peterson RE, Heideman W. Water Permeability and TCDD-Induced Edema in Zebrafish Early-Life Stages. *Toxicological Science*. 2004; 78(1): 78-87.
20. Sant KE, Timme-Laragy AR. Zebrafish as a Model for Toxicological Perturbation of Yolk and Nutrition in The Early Embryo. *Current Environmental Health Reports*. 2018.
21. Loomis TA, Hayes AW. *Toxicology Testing Methods*. Loomis's Essentials of Toxicology. 4th ed. 1996; 205-248.
22. WPSB. Derivation of Water Quality Guidelines to Protect Aquatic Life in British Columbia. Victoria, British Columbia, Canada. Water Protection and Sustainability Branch, Environmental Sustainability and Strategic Policy Division, Ministry of Environment. 2012.
23. Utomo SB. Uji Efek Antiinflamasi Dekokta Daun Songgolangit (*Tridax procumbens* L.) pada Mencit Betina Galur Swiss Terinduksi Karagenin. Skripsi. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma. 2016.
24. Duan J, Yu Y, Shi H, Tian L, Guo C, Huang P, et al. Toxic Effects of Silica Nanoparticles on Zebrafish Embryos and Larvae. *PLoS ONE*. 2013; 8(9).
25. Matthews M, Trevarrow B, Matthews J. A Virtual Tour of The Guide for Zebrafish Users Lab Animal. 2002; 31(3): 34-40.
26. OECD. OECD Guidelines for The Testing of Chemicals. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. 2013; 236, 1-22.
27. Hogendoorn H, Vismans MM. Controlled Propagation of The African Catfish, *Clarias lazera*. Artificial Reproduction. *Aquaculture*. 1990.
28. Kimmel CB, William WB, Seth RK, Bonnie U, Thomas FS. Stages of Embryonic Development of The Zebrafish. *Developmental Dynamics*. 1995; 203: 253-310.
29. Lee SH, Kang JW, Lin T, Lee JE, Jin DI. Teratogenic Potential of Antiepileptic Drugs in the Zebrafish Model. *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation; 2013; 2013: 6 pages.
30. Ferreira, Tiago, Rasband, Wayne. ImageJ User Guide IJ 1.46r. 2012. Available from: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/index.html>.
31. Reed B, Jennings M. Guidance on Housing and Care of Zebrafish *Danio rerio*. RSCPA: Research Animals Department. Science Group. 2011; pp.1-27.
32. Clarke JDW, Jayasinghe SN. Bio-electrosprayed Multicellular Zebrafish Embryos are Viable and Develop Normally. *Biomed. Mater*. 2008; Vol.3. 4 pp.
33. ICH. Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility S5 (R2). 2005.
34. ICH. Final Concept Paper S5 (R3): Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility. 2015.
35. LifeMap Discovery. Yolk Sac-Development and Stem Cells. LifeMap ap Science Inc; 2018. Available from: <https://discovery.lifemapsc.com/in-vivo-development/yolk-sac>.
36. Nishimura Y, Inoue A, Sasagawa S, Koiwa J, Kawaguchi K, Kawase R, et al. Using Zebrafish in Systems Toxicology for Developmental

- Toxicity Testing. Congenital Anomalies. 2016; 56: 18-27.
37. Ruedy J. Teratogenic Risk of Drugs Used in Early Pregnancy. *Can.Fam.Physician*. 1984; 30.
 38. Westerfield M. The Zebrafish Book: A Guide for The Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed. Eugene: University of Oregon Press. 2000.
 39. Choi JS, Kim RO, Yoon S, Kim WK. Developmental Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles to Zebrafish (*Danio rerio*): A Transcriptomic Analysis. *PLoS ONE*. 2016; 11(8).
 40. Ong KJ, Xinxin Z, Maria ET, Tyson JMC, Rhett JC, Guibin M, et al. Mechanistic Insights into The Effect of Nanoparticles on Zebrafish Hatch. *Nanotoxicology*. Informa UK Ltd; 2013; 1-10.
 41. Cao F, Liu X, Wang C, Zheng M, Li X, Qiu L. Acute and Short-term Developmental Toxicity of Cyhalofop-butyl to Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Pollut Res*. 2016.
 42. Dash SP, Dixit S, Sahoo S. Phytochemical and Biochemical Characterizations from Leaf Extracts from *Azadirachta indica*: An Important Medical Plant. *Biochem Anal Biochem*. 2017; 6: 2.
 43. Aerts RJ, Jennifer A. Feeding Deterrence and Toxicity of Neem Triterpenoids. *Journal of Chemical Ecology*. 1997; 23(9).
 44. Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee RK, Bandyopadhyay U. Biological Activities and Medicinal Properties of Neem (*Azadirachta indica*). *Current Science*. 2002; 82(11).
 45. Matsuzaki T, Irahara M, Aono T. Physiology and Action of Prolactin. Abstracts. *Nihon Rinsho*. 1997; 55(11): 2871-5.
 46. Sidhu OP, Kumar HMB. Variability in Triterpenoids (Nimbin and Salanin) Composition of Neem Among Different Provenances of India. *Industrial Crops and Products*. 2003; 19: 69-75.
 47. Lin T, Liu Q, Chen J. Identification of Differentially Expressed Genes in *Monochamus alternatus* Digested With *Azadirachtin*. *Sci. Rep*. 2016. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27629396>
 48. Perdani F. Efek Kombinasi *Imperata cylindrical*, *Gynura procumbens*, dan *Syzigium polyanthum* terhadap Perubahan Perilaku Kecepatan Berenang pada *Danio rerio*. Skripsi. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang. 2014.
 49. Ponrasu T, Ganeshkumar M, Suguna L. Developmental Toxicity of Ethanolic Extract of *Annona squamosa* in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo. *Journal of Pharmacy Research*. 2012; 5(1): 277-279.
 50. Imam RWN. Efek Dekokta Daun Nimba (*Azadirachta indica*) terhadap Frekuensi Denyut Jantung dan Luas Area Perikardium pada Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*). Skripsi. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang. 2018.
 51. Cheng J, Flahaut E, Cheng SH. Effect of Carbon Nanotubes on Developing Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2007; 26(4): 708-716.
 52. Booth DT. Oxygen Availability and Embryonic Development in Sand Snail (*Polinices sordidus*) Egg Masses. *The Journal of Experimental Biology*. The Company of Biologists Ltd; 1994; 198: 241-247.
 53. Somsak V, Chachiyo S, Jaihan U, Nakinchat S. Protective Effect of Aqueous Crude Extract of Neem (*Azadirachta indica*) Leaves on *Plasmodium berghei*-Induced Renal Damage in Mice. *Journal of Tropical Medicine*. Hindawi Publishing Corporation; 2015; Vol.2015. 5 pages
 54. Tripathi A, Shrivastay TG, Chaube SK. Aqueous Extract of *Azadirachta indica* (Neem) Leaf Induces Generation of Reactive Oxygen Species and Mitochondria-Mediated Apoptosis in Rat Oocytes. *J Assist Reprod Genet*. 2011; 29: 15-23.
 55. Jeong JH, Jee YA, Yong TK, Juong GR, Yong JL. Effects of Low dose Quercetin: Cancer Cell-Specific Inhibition of Cell Cycle Progression. *J Cell Biochem*. 2009; 106(1): 73-82.
 56. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology. 9th ed. Canada: Elsevier Saunders. 2013.
 57. Xia Q, Luo J, Mei X, Wang Y, Zhang W, Xu K, et al. Developmental Toxicity of *Polygonum cuspidatum* on Zebrafish Embryos-Larvae. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*. 2017.
 58. Laale HW. The Biology and Use of Zebrafish, *Brachiodanio rerio* in Fisheries Research. *J.Fish Biol*. 1997; 10: 121-173.
 59. Sreedevi B, Suvarchala G, Philip GH. Morphological and Physiological Abnormalities during Development in Zebrafish due to Chlorpyrifos. *Indian J.Sci.Res*. 2014; 5(2): 1-18.
 60. Carvalho L, Heisenberg CP. The Yolk Syncytial Layer in Early Zebrafish Development. *Trends in Cell Biology*. 2010; 20(10).
 61. Marrelli M, Conforti F, Araniti F, Statti GA. Effects of Saponins on Lipid Metabolism: A Review of Potential Health Benefits in The Treatment of Obesity. *Molecule*. 2016; 21, 1404.
 62. Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. *Biokimia* Harper. Ed.27. Jakarta: Buku Kedokteran EGC. 2012.