

EFEK DEKOKTA DAUN PULUTAN (*Urena lobata*) TERHADAP FREKUENSI PERNAPASAN DAN GAMBARAN HISTOLOGI LAMELA INSANG IKAN ZEBRA (*Danio rerio*) DEWASA YANG DIPAPAR MALATHION SECARA KRONIK

Sumanjaya Pratama, Yoyon Arif Martino, Yudi Purnomo*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Malathion memiliki efek menghambat enzim asetilkolinesterase dan menghasilkan radikal bebas yang dapat mempengaruhi struktur dan fungsi organ respirasi. Daun *Urena lobata* memiliki efek antioksidan, anti-inflamasi, dan antikolinergik. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh dekokta daun *Urena lobata* (DUL) terhadap frekuensi pernapasan dan gambaran histologi lamela insang *Danio rerio* yang dipapar malathion kronik.

Metode: *Danio rerio* dewasa berusia lebih dari 4 bulan dibagi menjadi 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan (n=10). Malathion 5 mg/L diberikan selama 40 hari pada semua kelompok kecuali kelompok kontrol negatif. DUL diberikan pada kelompok perlakuan dengan dosis 125 mg/L, 250 mg/L, dan 500 mg/L. Frekuensi pernapasan dianalisis menggunakan *software GOM Player*. Lamela insang diwarnai menggunakan Hematoxylin-Eosin (HE) dan diamati di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000x. Data dianalisis menggunakan metode ANOVA dan dilanjutkan dengan LSD ($p < 0,05$).

Hasil: Paparan malathion dapat meningkatkan frekuensi pernapasan dan hiperplasia pada kelompok kontrol positif berturut-turut kurang lebih 2 kali dan 4 kali lipat dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$). Pemberian DUL dosis 125 mg/L dan 250 mg/L menghambat peningkatan frekuensi pernapasan masing-masing sekitar 20%, sedangkan dosis 125 mg/L, 250 mg/L, dan 500 mg/L menghambat hiperplasia lamela insang berturut-turut sekitar 30%, 50%, dan 20% dibandingkan dengan kontrol positif ($p < 0,05$).

Kesimpulan: DUL dosis 250 mg/L merupakan dosis yang paling efektif dalam menghambat peningkatan frekuensi pernapasan dan hiperplasia lamela sekunder insang *Danio rerio*.

Kata Kunci: *Urena lobata*, frekuensi pernapasan, lamela insang, *Danio rerio*, malathion, kronik.

EFFECT OF PULUTAN LEAVES DECOCTION (*Urena lobata*) ON RESPIRATORY FREQUENCY AND HISTOLOGICAL FEATURES OF GILLS OF ADULT ZEBRA FISH (*Danio rerio*) LAMELLAE EXPOSED BY MALATHION CHRONIC

Sumanjaya Pratama, Yoyon Arif Martino, Yudi Purnomo*
Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

ABSTRACT

Introduction: Malathion has inhibiting effect to the acetylcholinesterase enzyme. It is producing free radicals that can affect the structure and function of respiratory organs. *Urena lobata* leaves have antioxidant, anti-inflammatory, and anticholinergic effects. This study aims to prove the influence of *Urena lobata* (DUL) leaves decoction on respiratory frequency and histological features of *Danio rerio*'s gill lamellae, which chronically exposed to malathion.

Methods: Adult *Danio rerio* aged over four months were divided into two control groups and three treatment groups (n=10). Malathion 5 mg/L was given for 40 days in all groups except to the negative control group. DUL was given to the treatment group at dose of 125 mg/L, 250 mg/L, and 500 mg/L. Respiratory rate was analyzed using GOM Player software. Lamellae gills were stained using Hematoxylin-Eosin (HE) and observed under a binocular microscope at 1000x magnification. Data were analyzed using ANOVA test followed by LSD test ($p < 0,05$).

Results: Exposure to malathion can increase the frequency of breathing and hyperplasia in the positive control group approximately two times and four times compared to the negative control group ($p < 0.05$). The administration of DUL of 125 mg/L and 250 mg/L inhibits an increase in respiratory frequency of about 20%, while doses of 125 mg/L, 250 mg/L, and 500 mg/L inhibit the gill lamellae hyperplasia of 30%, 50%, and 20%, respectively, compared to the positive controls ($p < 0.05$).

Conclusion: DUL dose 250 mg/L is the most effective dose in inhibiting the increase in respiratory frequency and secondary lamellae hyperplasia to gills of *Danio rerio*.

Keywords: *Urena lobata*, respiratory frequency, gill lamellae, *Danio rerio*, malathion, chronic

*Correspondence to:

Yudi Purnomo

Faculty of Medicine, University of Islam Malang

Jl. MT Haryono 193 Malang City, East Java, Indonesia, 65145

E-mail: y_purnomo92@yahoo.com

PENDAHULUAN

Malathion merupakan salah satu pestisida yang penggunaannya banyak direkomendasikan di sektor pertanian. Malathion termasuk pestisida golongan organofosfat yang berupa cairan bening, berbau seperti bawang putih, bersifat korosif, memiliki rantai karbon pendek, dan sulit larut di dalam air.¹ Malathion memiliki nilai *Lethal Dose 50* (LD₅₀) 1375 mg/kg dan termasuk dalam kategori toksisitas sedang sehingga banyak direkomendasikan di bidang pertanian.² Selain itu, malathion mudah mengalami degradasi di alam tetapi bahaya residunya harus tetap diwaspadai.³ Malathion masuk ke dalam tubuh melalui jalur inhalasi, digesti, dan permukaan kulit yang tidak terlindungi.⁴ Mekanisme utama dari malathion adalah menghambat aktivitas enzim asetilkolinesterase, sehingga terjadi penumpukan kadar asetilkolin pada post sinaps yang dapat menimbulkan berbagai gejala seperti dispnea, bradikardi, kejang, kekakuan, dan kelemahan otot.⁵ Senyawa malathion dapat mempengaruhi struktur dan fungsi organ respirasi. Malathion mengalami metabolisme di hepar menjadi malaokson dan senyawa radikal bebas. Peningkatan radikal bebas akan menimbulkan kondisi dan kerusakan oksidatif pada sel tubuh. Radikal bebas yang berlebihan akan menginaktivasi asetilkolinesterase sehingga terjadi akumulasi dan overstimulasi dari asetilkolin.⁶ Jaringan dan organ respirasi merupakan target kerusakan oksidatif dari malathion yang masuk per inhalasi sehingga dapat mengganggu struktur dan fungsinya.⁷

Daun Pulutan (*Urena lobata*) merupakan salah satu herbal yang memiliki efek terapeutik. Masyarakat Indonesia sering menggunakan tanaman ini untuk berbagai pengobatan seperti rematik, diare, dan diabetes.⁸ Penelitian yang dilakukan oleh Lissy *et al.*, tahun 2006 melaporkan bahwa tanaman *Urena lobata* dapat menghambat peroksidasi lipid melalui aktivitasnya sebagai *scavenger Reactive Oxygen Species* (ROS).⁹ Pada uji preklinik lainnya menunjukkan bahwa pada daun *Urena lobata* memiliki potensi sebagai antiradang dan antikolinergik yang dikendalikan oleh senyawa flavonoid.^{10,11} Hingga saat ini belum ada riset mengenai potensi daun *Urena lobata* dalam menghambat kerusakan struktur dan fungsi organ respirasi akibat paparan pestisida malathion.

Ikan zebra (*Danio rerio*) banyak digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian di bidang kedokteran.¹² *Danio rerio* memiliki kesamaan genetik sekitar 70% dengan manusia. Beberapa penelitian menggunakan *Danio rerio* sebagai organisme model untuk pengembangan genetik, toksikologi, dan gangguan metabolisme.¹³ Selain itu, *Danio rerio* memiliki beberapa keunggulan antara lain murah, mudah dalam perawatan, kemampuan reproduksi yang tinggi, dan sensitif terhadap senyawa xenobiotik.^{12,14} Insang pada *Danio rerio* merupakan organ vital yang berperan pada proses respirasi, osmoregulasi, dan ekskresi. Paparan malathion sebagai senyawa xenobiotik dapat mempengaruhi struktur dan fungsi lamela insang

sebagai organ respirasi.^{15,16} Berdasarkan uraian tersebut, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek DUL terhadap frekuensi pernapasan dan gambaran histologi lamela insang *Danio rerio* fase dewasa yang dipapar pestisida malathion secara kronik.

METODE

Penelitian dilaksanakan secara studi eksperimental laboratorium *in vivo* dengan desain penelitian *control group post test only*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Zebra Fish Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang dan Laboratorium Perikanan Divisi Reproduksi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya pada bulan Februari-April 2019. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor 1074-KEP-UB/2019.

Penentuan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah *Danio rerio* dewasa berusia lebih dari 4 bulan yang diperoleh dari biakan lokal di Kecamatan Campurdarat, Kabupaten Tulungagung, Jawa Timur. *Danio rerio* yang digunakan telah diidentifikasi dan mendapatkan sertifikasi dari Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga dengan nomor 005/ULMKILP/UA.FPK/03/2019. *Danio rerio* dibagi menjadi 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Jumlah *Danio rerio* untuk setiap kelompok berjumlah 10 ekor yang dihitung menggunakan rumus Federer. *Danio rerio* diberikan pencahayaan 14 jam terang dan 10 jam gelap dengan suhu air sekitar 26°C dan dipasang aerator. Pemberian pakan dilakukan sekali dalam sehari dengan dosis pakan 4%/gBB/hari.

Pemberian Malathion

Malathion 500 g/L diencerkan sehingga didapatkan konsentrasi 5 mg/L. Malathion diberikan selama 40 hari pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan. Penentuan dosis malathion didapatkan dari penelitian Cook *et. al.*, (2005) dengan modifikasi.¹⁷

Pemberian Dekokta Daun *Urena lobata*

Simplisia daun *Urena lobata* didapatkan dari UPT Balai Materia Medika, Kota Batu, Jawa Timur dan telah disertifikasi dengan nomor 074/096A/102.7/2019. Simplisia daun *Urena lobata* diekstraksi menggunakan metode dekoktasi. Simplisia daun *Urena lobata* ditimbang 5 g dan dilarutkan pada 500 mL air yang sudah dipanaskan hingga suhu 90°C selama 30 menit. Hasil dekoktasi didinginkan dan disaring menggunakan kasa kemudian dibuat dosis P1 (DUL-125 mg/L), P2 (DUL-250 mg/L), dan P3 (DUL-500 mg/L). Penentuan dosis *Urena lobata* didapatkan dari penelitian Purnomo *et al.*, (2015) dengan modifikasi.¹⁸

Pengukuran Frekuensi Pernapasan *Danio rerio*

Pengukuran frekuensi pernapasan dilakukan sehari sebelum proses pengorbanan *Danio rerio*. *Danio rerio* dipindahkan ke dalam wadah berukuran 100 mL dan direkam menggunakan kamera selama 1 menit. Kemudian frekuensi pernapasan dihitung berdasarkan jumlah gerakan buka tutup operkulum menggunakan *software GOM Player*.¹⁹

Pengorbanan dan Pengambilan Insang *Danio rerio*

Pengorbanan hewan coba dilakukan dengan metode *hypothermal shock* karena species *Danio rerio* mempunyai mekanisme fisiologi adaptasi yang minimal untuk menyesuaikan pada air dingin (4°C).²⁰ Langkah pertama dalam pengorbanan hewan coba, yaitu menyiapkan wadah yang berisi es. Kemudian *Danio rerio* diambil dan diletakkan pada wadah es sekitar 2 menit. Setelah *Danio rerio* tidak sadar, dilakukan pembedahan dan pengambilan insang *Danio rerio*.

Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histologi Lamela Insang *Danio rerio*

Preparat histologi insang dibuat dengan cara fiksasi menggunakan formalin 10%. Insang kemudian didehidrasi dengan etanol dan dibersihkan dengan larutan xylene. Selanjutnya dilakukan *embedding* menggunakan lilin/waxes dan resin untuk membentuk blok paraffin. Setelah itu, dilakukan pemotongan menggunakan mikrotom dan dilakukan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE).²¹

Pengamatan dan penghitungan jumlah sel lamela sekunder insang yang mengalami hiperplasia dilakukan menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000x. Sel lamela yang mengalami hiperplasia berbentuk seperti pemukul bisbol (*clubbing distal*) akibat penebalan jaringan epitel pada ujung lamela dan dasar lamela (basal hiperplasia).^{22,63} Penghitungan dilakukan pada 5 lapang pandang dan diambil rata-rata jumlah dalam 1 lapang pandang yang dilakukan oleh tiga orang pengamat untuk menghindari subjektivitas.²⁴ Kemudian data dihitung kembali dengan metode proporsi (%) dan dilakukan skoring.²⁶ Penghitungan persentase sel lamela sekunder insang yang mengalami hiperplasia menggunakan rumus sebagai berikut:²⁵

$$p = \frac{a}{b} \times 100$$

Keterangan:

p = Persentase hiperplasia (%)

a = Jumlah sel lamela hiperplasia

b = Total jumlah sel lamela

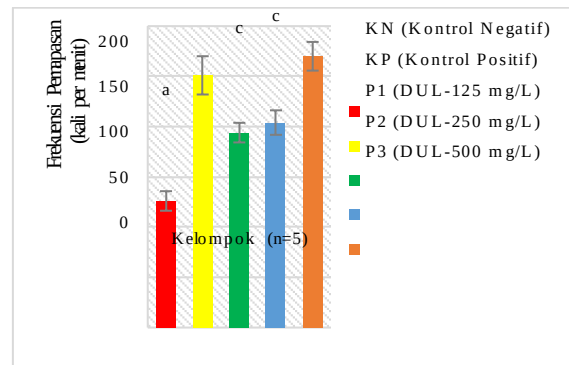
Teknik Analisa Data

Data yang dinyatakan normal dan homogen diuji menggunakan metode *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan *Post Hoc Test Least Significance Different* (LSD) untuk melihat perbedaan antara masing-masing kelompok perlakuan. Untuk melihat hubungan antar variabel data diuji menggunakan Korelasi Bivariate Pearson. Uji statistik tersebut dilakukan dengan program SPSS versi 16.0 dan hasil dikatakan bermakna apabila $p < 0,05$.

HASIL DAN ANALISA DATA

Frekuensi Pernapasan *Danio rerio* yang Dipapar *Urea lobata*

Hasil pengamatan frekuensi pernapasan dapat dilihat pada gambar 1 dibawah ini.



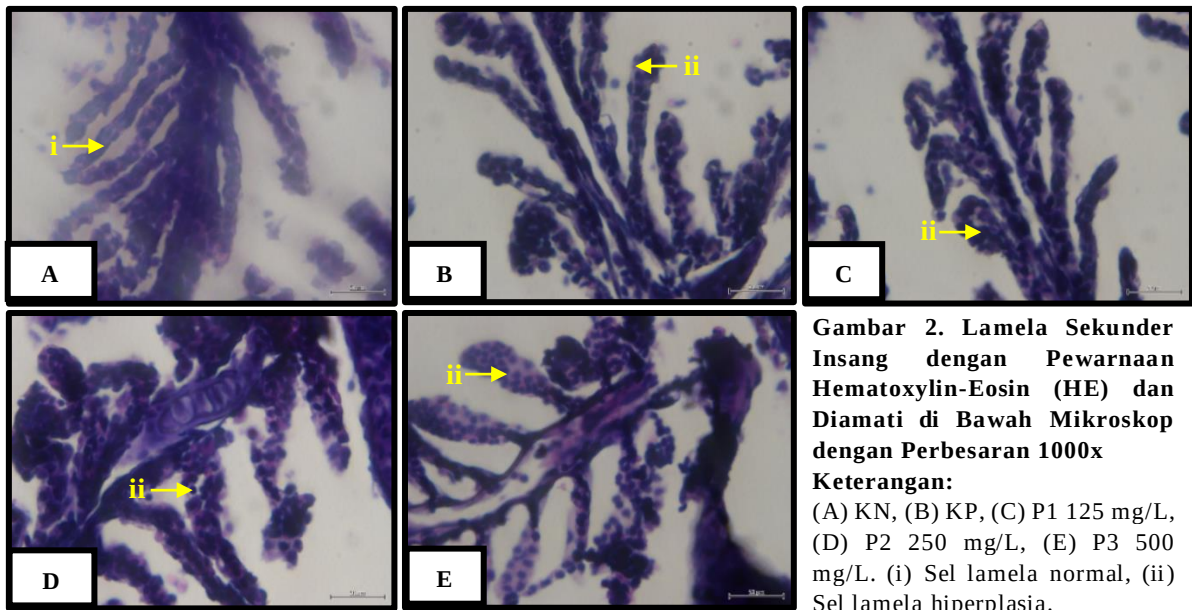
Gambar 1. Histogram Rerata Frekuensi Pernapasan

Keterangan: Histogram menunjukkan rerata $\pm$ SD frekuensi pernapasan pada kelompok KN ($126 \pm 9,73$), KP ($251 \pm 19,05$), P1 ($194 \pm 9,75$), P2 ($204 \pm 12,19$), dan P3 ($270 \pm 14,28$). Notasi berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$).

Gambar 1 menunjukkan pemberian DUL dosis 125 mg/L dan 250 mg/L menghambat peningkatan frekuensi pernapasan masing-masing sekitar 20% dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ($p < 0,05$). Pemberian DUL dosis 125 mg/L dan 250 mg/L tidak berbeda signifikan dalam menghambat peningkatan frekuensi pernapasan, sedangkan dosis 500 mg/L justru meningkatkan frekuensi pernapasan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ($p < 0,05$). Paparan malathion pada kelompok kontrol positif meningkatkan frekuensi pernapasan kurang lebih 2 kali lipat dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$).

Persentase Hiperplasia Lamela Insang *Danio rerio* yang Dipapar *Urea lobata*

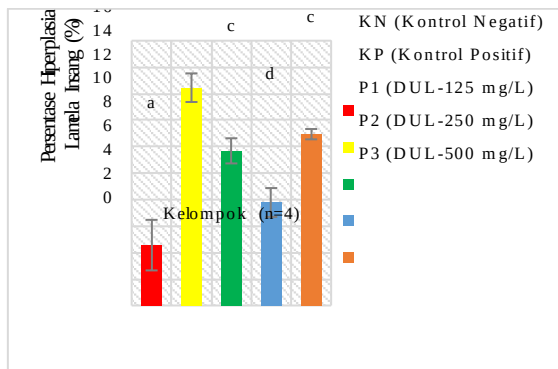
Hasil pengamatan persentase hiperplasia lamela sekunder insang *Danio rerio* dapat dilihat pada gambar 2 dan 3 dibawah ini.



Gambar 2. Lamela Sekunder Insang dengan Pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE) dan Diamati di Bawah Mikroskop dengan Perbesaran 1000x

Keterangan:

(A) KN, (B) KP, (C) P1 125 mg/L, (D) P2 250 mg/L, (E) P3 500 mg/L. (i) Sel lamela normal, (ii) Sel lamela hiperplasia.



Gambar 3. Histogram Rerata Persentase Hiperplasia Lamela Sekunder Insang *Danio rerio*

Keterangan: Histogram menunjukkan rerata $\pm$ SD persentase hiperplasia lamela sekunder insang *Danio rerio* dewasa pada kelompok KN ($4,56 \pm 1,91$), KP ($16,45 \pm 1,08$), P1 ($11,68 \pm 0,95$), P2 ($7,78 \pm 1,09$), dan P3 ($12,94 \pm 0,39$). Notasi berbeda menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$).

Tabel 1. Skoring Hiperplasia Lamela Sekunder Insang *Danio rerio* yang Dipapar *Urena lobata*

Kelompok	Persentase	Skor	Keterangan
KN	5%	1	Ringan
KP	16%	1	Ringan
P1	12%	1	Ringan
P2	8%	1	Ringan
P3	13%	1	Ringan

Keterangan:

Skor 0 : 0% (Normal)

Skor 1 : < 30% (Ringan)

Skor 2 : 30-70% (Sedang)

Skor 3 : >70% (Berat)

Pada kontrol positif (Gambar 2B) menunjukkan gambaran seperti pemukul bisbol (*clubbing distal*) dalam jumlah yang banyak, sedangkan pada kelompok kontrol negatif (Gambar 2A) tidak didapatkan gambaran *clubbing distal*. Pada kelompok perlakuan dosis 125 mg/L, 250

mg/L, dan 500 mg/L (Gambar 2C-E) menunjukkan gambaran *clubbing distal* lebih sedikit dibandingkan dengan kontrol positif (Gambar 2B).

Gambar 3 menunjukkan pemberian DUL dosis 125 mg/L, 250 mg/L, dan 500 mg/L menghambat peningkatan hiperplasia lamela sekunder insang berturut-turut sekitar 30%, 50%, dan 20% dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ($p < 0,05$). Pemberian DUL dosis 250 mg/L menghambat hiperplasia lebih kuat dibandingkan dosis 125 mg/L ($p < 0,05$), sedangkan dosis 500 mg/L memiliki efek lebih rendah dibandingkan dengan dosis 250 mg/L ($p < 0,05$). Paparan malathion pada kelompok kontrol positif meningkatkan hiperplasia lamela sekunder insang kurang lebih 4 kali lipat dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$).

Tabel 1 menunjukkan skoring hiperplasia lamela sekunder insang pada semua kelompok termasuk dalam kategori ringan. Meskipun persentase kelompok kontrol positif lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok lain.

Korelasi Frekuensi Pernapasan dengan Hiperplasia Lamela Insang *Danio rerio* yang Dipapar *Urena lobata*

Terdapat korelasi yang positif dan signifikan antara frekuensi pernapasan dengan hiperplasia lamela sekunder insang seperti ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Korelasi Frekuensi Pernapasan dengan Hiperplasia Lamela Sekunder Insang *Danio rerio* yang Dipapar *Urena lobata*

		Frekuensi Pernapasan	Hiperplasia Lamela
Frekuensi Pernapasan	Pearson Correlation	1	.652**
	Sig. (2-tailed)		.002
	n	25	20
Hiperplasia Lamela	Pearson Correlation	.652**	1
	Sig. (2-tailed)	.002	
	n	20	25

Keterangan:

** Korelasi signifikan antar variabel ($p < 0,01$)

PEMBAHASAN

Efek Paparan Malathion secara Kronik terhadap Frekuensi Pernapasan dan Hiperplasia Lamela Insang *Danio rerio*

Paparan malathion secara kronik dapat meningkatkan frekuensi pernapasan dan hiperplasia lamela sekunder insang pada *Danio rerio* dewasa. Hal ini dikarenakan malathion memiliki efek menghambat aktivitas enzim asetilkolinesterase dan menghasilkan radikal bebas saat mengalami metabolisme.²⁷

Malathion didalam tubuh akan dimetabolisme di hepar oleh enzim sitokrom P-450 menjadi malaoxone. Malaoxone merupakan senyawa metabolit aktif yang memiliki efek lebih kuat dibandingkan dengan senyawa aslinya. Malaoxone akan menghambat berbagai enzim serine hidrolase salah satunya adalah asetilkolinesterase.³¹ Asetilkolinesterase merupakan enzim yang berperan untuk memecah asetilkolin menjadi kolin dan asetat. Ketika terjadi hambatan pada enzim asetilkolinesterase maka akan terjadi stimulasi terus-menerus asetilkolin pada reseptor muskarinik. Stimulasi asetilkolin yang berlebihan pada reseptor muskarinik otot polos pernapasan dapat menurunkan *input* oksigen (O_2) dan *output* karbondioksida (CO_2). Efek tersebut menimbulkan kompensasi berupa peningkatan frekuensi pernapasan.^{32,33} Selain itu, stimulasi yang berlebihan pada reseptor muskarinik dapat menimbulkan hipersekresi mukus pada lamela insang. Peningkatan sekresi mukus dalam jangka waktu yang lama menimbulkan hipertrofi sel mukus dan hiperplasia sel epitel lamela sekunder insang sehingga mengganggu fungsinya sebagai organ respirasi.³⁴

Peningkatan produksi radikal bebas dari proses metabolisme malathion dapat menimbulkan kondisi stres oksidatif sehingga terjadi kerusakan oksidatif pada jaringan saraf dan lamela sekunder insang.^{30,62,61} Kerusakan jaringan akan menimbulkan proses inflamasi sehingga makrofag teraktivasi. Makrofag merupakan salah satu sistem pertahanan tubuh yang melepaskan berbagai mediator inflamasi, seperti $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $IL-8$, dan $LTB-4$. Mediator

inflamasi tersebut dapat menimbulkan aksonopati, demielinasi, dan neuropati pada sistem saraf. Efek tersebut menimbulkan gangguan transmisi sinyal dan rusaknya sel saraf.³⁵ Selain itu, paparan malthion secara kronis dapat langsung mengiritasi insang yang akan direspon dengan peningkatan sekresi mukus sebagai respon pertahanan. Efek tersebut menyebabkan insang melakukan kompensasi berupa hipertrofi sel mukus dan hiperplasia sel epitel lamela sekunder insang sebagai mekanisme adaptasi fisik untuk membuat barrier perlindungan terhadap agen toksik.^{34,36}

Rerata frekuensi pernapasan pada kelompok kontrol negatif penelitian ini 126 kali per menit dan tergolong kategori hipoksia. Penentuan itu berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Vulesevic *et al.*, (2006) yang melaporkan bahwa frekuensi pernapasan *Danio rerio* normal dan hipoksia berturut-turut sekitar 191 dan 165 kali per menit.⁴¹ Salah satu faktor yang diduga menjadi penyebab kondisi hipoksia pada kelompok kontrol negatif, yaitu rendahnya kadar oksigen yang ada di lingkungan akibat banyaknya jumlah *Danio rerio* dalam satu bejana.^{42,43} Selain itu, pengukuran frekuensi pernapasan dengan waktu aklimatisasi yang terlalu singkat, yaitu sekitar 1 menit dapat pula mempengaruhi hasil frekuensi pernapasan ini. Pengukuran frekuensi pernapasan sebaiknya dilakukan dengan waktu aklimatisasi minimal 5 menit dan menggunakan wadah yang berisi air minimal 200 mL serta 1 ekor *Danio rerio* dalam setiap wadahnya agar mendapatkan hasil yang akurat.⁴³

Efek Dekokta Daun *Urena lobata* terhadap Frekuensi Pernapasan *Danio rerio*

Pemberian DUL dapat menghambat peningkatan frekuensi pernapasan akibat paparan malathion secara kronik. Hal ini dikarenakan adanya kandungan zat aktif pada daun *Urena lobata* yang berperan sebagai antioksidan dan antikolinergik.^{9,10,11}

Daun *Urena lobata* mengandung zat aktif *quercetin* dan *kaempferol* yang termasuk golongan senyawa flavonoid.⁸ Flavonoid berperan sebagai antioksidan melalui berbagai mekanisme. Pertama, menghambat kerja enzim yang terlibat dalam produksi anion superoksida, seperti xantin oksidase dan protein kinase. Kedua, mengikat logam kelumit yang akan memproduksi radikal bebas. Ketiga, mereduksi berbagai radikal bebas, seperti superoksida, peroksil, dan hidroksil melalui mekanisme donor atom H dengan tujuan menstabilkan senyawa tersebut.^{37,51} Efek tersebut membantu melindungi sel-sel saraf pada sistem respirasi dari kerusakan yang lebih parah sehingga peningkatan frekuensi pernapasan dapat dihambat.

Selain sebagai antioksidan, *quercetin* memiliki efek antikolinergik melalui mekanisme meningkatkan aktivitas enzim asetilkolinesterase dan menghambat pelepasan asetilkolin pada otot polos.^{11,39} Efek tersebut mencegah peningkatan frekuensi pernapasan akibat overstimulasi

asetilkolin pada reseptor muskarinik otot polos sistem respirasi.

Pemberian DUL pada dosis 125 mg/L dan 250 mg/L memiliki kemampuan yang sama dalam menghambat peningkatan frekuensi pernapasan. Hal ini diduga pada dosis 250 mg/L terjadi mekanisme *down regulation* dan desensitisasi. *Down regulation* merupakan kondisi menurunnya jumlah reseptor akibat peningkatan dosis zat aktif, sedangkan desensitisasi merupakan penurunan kepekaan reseptor akibat stimulasi zat aktif dosis tinggi dalam jangka waktu yang lama. Akibatnya, efek biologis zat aktif tersebut menurun. Selain itu, diduga zat aktif yang terkandung dalam *Urena lobata* bekerja lebih dari satu reseptor sehingga peningkatan dosis yang diberikan tidak selalu diiringi dengan aktivitas biologisnya.^{57,67}

Pemberian ekstrak *Urena lobata* pada dosis 500 mg/L justru meningkatkan frekuensi pernapasan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini diduga senyawa flavonoid yang terkandung dalam DUL yang berfungsi sebagai antioksidan berubah menjadi pro-oksidan melalui mekanisme auto-oksidasi yang menghasilkan radikal bebas, seperti radikal hidroksil (OH) dan peroksil.⁴⁵ Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Satria tahun 2019 (*Unpublished data*) pada *Danio rerio* dewasa yang dipapar malathion secara kronik bahwa pemberian DUL dosis 500 mg/L memiliki efek yang lebih rendah dalam menghambat peningkatan kadar malondialdehyde (MDA) otak dibandingkan dengan dosis 250 mg/L.⁶⁸ Penggunaan antioksidan dalam jumlah yang besar dapat menyebabkan efek toksik sehingga penggunaannya harus dibatasi.⁶³ Lama paparan ekstrak *Urena lobata* juga turut berperan dalam meningkatkan derajat toksisitasnya.⁴⁹ Selain itu, diduga zat aktif alkaloid *Urena lobata* memiliki efek agonis kolinergik yang berikatan langsung dengan reseptor asetilkolin muskarinik (mAChRs) sehingga meningkatkan frekuensi pernapasan.⁶⁶ Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Imami tahun 2019 (*Unpublished data*) pada *Danio rerio* juvenile yang dipapar malathion secara kronik bahwa pemberian DUL dosis 500 mg/L cenderung meningkatkan frekuensi pernapasan mendekati kelompok kontrol positif.⁴⁶

Efek terapi yang tidak sesuai dengan peningkatan dosis obat yang diberikan disebut sebagai *nonmonotonic dose-response relationship* (NMDR). Kurva yang terbentuk antara peningkatan dosis dan respon farmakologis ada beberapa macam, yaitu berbentuk huruf U bila respons pada dosis terendah dan tertinggi, huruf U terbalik bila respons pada dosis intermediet, dan bifasik.⁵⁰ Pada penelitian ini membuktikan bahwa hubungan antara dosis *Urena lobata* dan respons frekuensi pernapasan berbentuk seperti huruf U terbalik. Namun, pada penelitian ini belum bisa dijelaskan secara pasti mekanisme mana yang membuat hubungan antara dosis dan respons tidak linier.⁵⁰

Pertukaran gas pada *Danio rerio* berawal dari masuknya air melalui insang dan keluar melalui opercula. Proses ini biasanya disebut sebagai

ventilasi insang dan dapat dianalogikan sebagai fungsi organ pernapasan pada manusia.⁷⁰ Secara fungsional tidak terdapat perbedaan penting antara air dan udara karena keduanya merupakan media cair. Sebagai penelitian telah banyak menggunakan organ insang untuk mengembangkan teori terkait pertukaran gas.^{71,72} Perubahan pada fungsi pernapasan dapat berupa hiperventilasi, hipoventilasi, dan hipoksia. Hiperventilasi adalah upaya tubuh dalam meningkatkan kadar O₂ tubuh dengan meningkatkan frekuensi pernapasan dan biasanya disebabkan oleh beberapa faktor, seperti kecemasan, infeksi, keracunan obat-obatan, dan ketidakseimbangan asam basa. Hipoventilasi merupakan kondisi ketika tubuh tidak dapat memenuhi penggunaan O₂ atau mengeluarkan CO₂ dan biasanya disebabkan oleh kelainan pada kelainan pada struktur organ respirasi. Hipoksia merupakan kondisi tidak terpenuhinya kebutuhan O₂ tingkat seluler akibat berkurangnya kadar O₂ yang diinspirasi dan biasanya disebabkan oleh beberapa faktor, seperti rendahnya kadar hemoglobin, berkurangnya konsentrasi O₂ lingkungan, dan menurunnya perfusi jaringan pada kondisi syok.⁵⁷ Oleh sebab itu, frekuensi pernafasan menjadi salah satu komponen tanda vital yang bisa dijadikan indikator bagi kesehatan.^{55,66}

Efek Dekokta Daun Pulutan *Urena lobata* terhadap Hiperplasia Lamela Insang *Danio rerio*

Pemberian DUL dapat menghambat peningkatan hiperplasia lamela sekunder insang akibat paparan malathion secara kronik. Hal ini berhubungan dengan zat aktif yang terkandung dalam daun *Urena lobata* yang berfungsi sebagai antioksidan dan anti-inflamasi.^{9,10}

Quercetin dan *kaempferol* merupakan zat aktif yang memiliki efek antioksidan. Zat aktif tersebut dapat menghambat peningkatan radikal bebas yang ditimbulkan dari proses metabolisme malathion seperti pada penjelasan sebelumnya dengan tujuan menstabilkan senyawa radikal bebas di dalam tubuh.^{37,51} Efek tersebut membantu melindungi sel lamela insang dari kerusakan oksidatif yang dapat menimbulkan hiperplasia lamela sekunder insang.^{37,51}

Selain sebagai antioksidan, *quercetin* memiliki efek anti-inflamasi. Zat aktif tersebut bekerja melalui mekanisme menghambat akumulasi leukosit dan pelepasan mediator inflamasi.^{38,65} Efek tersebut melindungi sel lamela dari kerusakan akibat mediator inflamasi sehingga mencegah hiperplasia lamela sekunder insang.

Pemberian DUL pada dosis 250 mg/L menghambat hiperplasia lebih kuat dibandingkan dosis 125 mg/L. Hal ini sesuai dengan teori farmakologi bahwa peningkatan dosis dapat meningkatkan efek farmakologi.⁴⁴ Namun, pada dosis 500 mg/L memiliki efek lebih rendah dibandingkan dengan dosis 250 mg/L. Hal ini diduga pemberian ekstrak *Urena lobata* yang memiliki efek antioksidan berubah menjadi pro-oksidan karena peningkatan dosis seperti pada penjelasan

sebelumnya.^{45,63} Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Munawwaroh tahun 2019 (*Unpublished data*) pada *Danio rerio* dewasa yang dipapar malathion secara kronik bahwa pemberian DUL dosis 500 mg/L memiliki efek yang lebih rendah dalam menghambat peningkatan kadar MDA dan penurunan kadar superoksida dismutase (SOD) hepar dibandingkan dosis 250 mg/L.⁶⁹ Selain itu, kondisi tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan Imami tahun 2019 (*Unpublished data*) pada *Danio rerio* juvenile yang dipapar malathion secara kronik bahwa pemberian DUL pada dosis 500 mg/L memiliki efek yang lebih rendah dalam menghambat peningkatan hiperplasia lamela sekunder insang dibandingkan dengan dosis 250 mg/L.⁴⁶

Perubahan histologi pada lamela insang dapat dibagi menjadi dua tahapan. Pada tahap pertama, terjadi hipertrofi, hiperplasia, dan disorganisasi epitel lamela. Pada tahap kedua, terjadi aneurisma dan ruptur pada epitel lamela.⁴⁷ Pada penelitian ini menunjukkan bahwa pada semua kelompok terjadi perubahan histologi lamela insang tahap pertama yang termasuk perubahan ringan dan bersifat reversible.²⁶ Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Lupi *et al.*, tahun 2007 pada *Danio rerio* dewasa yang menunjukkan bahwa adanya perbaikan lesi struktur insang dalam jangka waktu 30 hari.⁴⁸

Insang *Danio rerio* merupakan organ vital yang berperan dalam proses respirasi, osmoregulasi, ekskresi produk sisa, dan menjaga keseimbangan asam basa. Insang memiliki respon inflamasi yang sama dengan paru-paru manusia.^{40,58} Insang terdiri atas filamen-filamen lamela yang terhubung langsung dengan air dan didesain agar air dapat terus masuk dan mengalirkan udara. Filamen lamela memiliki permukaan luas yang berfungsi untuk menyerap oksigen. Proses respirasi pada *Danio rerio* diawali dari masuknya air melalui buccal menuju insang dan keluar melalui opercula yang dikendalikan oleh sistem saraf kranial. Aliran darah yang kaya CO₂ akan mengalir melalui arteri aferen dari lamela primer menuju ke lamela sekunder untuk proses pertukaran O₂. Setelah itu, darah yang kaya akan O₂ akan dialirkan melalui arteri eferen menuju aorta dorsalis dan akan didistribusikan ke seluruh jaringan tubuh. Paparan senyawa xenobiotik di lingkungan dapat menyebabkan perubahan struktur lamela yang dapat mempengaruhi fungsinya sebagai organ respirasi.^{40,53}

Hubungan Frekuensi Pernapasan dengan Hiperplasia Lamela Insang *Danio rerio*

Hasil uji korelasi pearson menunjukkan adanya korelasi yang positif dan signifikan. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Scown tahun 2001 dan Wang tahun 2007 yang melaporkan bahwa peningkatan hiperplasia menyebabkan peningkatan jarak difusi pertukaran gas yang berakibat terjadinya insufisiensi oksigen sehingga tubuh melakukan kompensasi dengan meningkatkan frekuensi pernapasan.^{73,74}

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa DUL dosis 250 mg/L merupakan dosis yang paling efektif dalam menghambat peningkatan frekuensi pernapasan dan hiperplasia lamela sekunder insang *Danio rerio*.

SARAN

Dari pembahasan penelitian ini, peneliti menyarankan untuk:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut efek DUL terhadap gambaran histologi organ lainnya seperti otak, hati, dan ginjal *Danio rerio* yang dipapar malathion secara kronik.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut efek DUL terhadap kadar enzim asetilkolinesterase *Danio rerio* yang dipapar malathion secara kronik.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada hewan coba dengan tingkat yang lebih tinggi seperti tikus.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) yang telah memberikan dana penelitian dan kelompok ikan zebra yang telah membantu dalam berjalannya penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Safar, R. Parasitologi Kedokteran. Bandung: CV. Yrama Widya. 2010.
2. Darmono. Toksisitas Pestisida. Yogyakarta: Penerbit Kanisius. 2010.
3. Panut, D. Pestisida dan Aplikasinya. Jakarta: Agromedia Pustaka. 2008.
4. Chen, C., Yongzhong Q., Qiong C., Chuanjiang T., Chuanyong L., Yun L. Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Xiamen, China. *Food Control. Elsevier Ltd.* 2011; **22**(7): 1114–1120. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.01.007.
5. Blodgett, D.J. Organophosphate and carbamate insecticides. *Small Animal Toxicology*, 2nd ed.; Peterson, M. E.; Talcott, P. A. Eds.; Elsevier Saunders: Saint Louis, pp. 941-953. 2006.
6. Buratti, F.M., D'Aniello A., Volpe M.T, Meneguz A., Testai E. Malathion bioactivation in the human liver: The contribution of different cytochrome P450 isoforms. *Drug Metabolism and Disposition*. 2005; **33**(3): 295–302. doi: 10.1124/dmd.
7. Widyastuti, E. Beberapa Catatan Mengenai Parasit Krustasea. *Jurnal Oseana*. 2002; **27**: 29-35.
8. Babu, S.S., Madhuri D.B., and Ali S.L. A pharmacological review of urena lobata plant. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2016; **9**(2), pp. 20–22.
9. Lissy K.P., Simon T.K., Lathab M.S. Antioxidant potential of *Sida retusa*, *Urena*

- lobata*, and *Triumfetta rhomboidea*. *Sci. Life*. 2006; **25**: 10-15.
10. Babu, S., Bindu M., Subba R. Anxiolytic Antidepressant and Anti-Inflammatory Activity of Ethanolic Extract of *Urena Lobata* Leaf. *Int J Pharma Res Health Sci*. 2016; **4**(4): 1284-1290. DOI:10.21276/ijprhs.
 11. Lutterodt, G.D. Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by quercetin as possible mode of action of Psidium guajava leaf extracts in the treatment of acute diarrhoeal diseases. *J Ethnopharmacol*. 1989; **25**: 235-247.
 12. Yuniarto, A., Sukandar E.Y., Fidrianny I., Adnyana I.K. Aplikasi zebrafish (*Danio rerio*) pada beberapa model penyakit eksperimental. *Media Pharmaceutica Indonesiana (MPI)*. 2017; **1**(3): 116. doi: 10.24123/mpi.v1i3.215.
 13. Langheinrich, U. Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. *Bioessays*. 2003; **25**(9): 904-912.
 14. Velki, M., Meyer-Alert H., Seiler T.B., Hollert H. Enzymatic activity and gene expression changes in zebrafish embryos and larvae exposed to pesticides diazinon and diuron. *Aquat Toxicol*. 2017; **193**: 187-200.
 15. Rastogi, S.C. Essentials Of Animal Physiology 4th Ed. New Age Internasional (P) Ltd: New Delhi. 2007.
 16. Cinar, K., Aksoy A., Emre Y., Asti R.N. The histology and histochemical aspects of gills of the lower fish Pseudophoxinus analayae. *Vet. Res. Commun*. 2008; **33**(5): 453-60. doi: 10.1007/s1125.
 17. Cook, L.W., Barbara L., Christopher P. The pesticide malathion reduces survival and growth in developing Zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2005; **24**(7):1745-50.
 18. Purnomo, Y., Djoko Wahono S., Sutiman B.S., Mochamad Aris W. Anti-diabetic potential of *Urena lobata* leaf extract through inhibition of dipeptidyl peptidase IV activity. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2015; **5**(8): 645-649.
 19. Prakoso, A.P., Chang Y.J. Laju respirasi induk ikan blackhead seabream *Acanthopagrus schlegelii* pada suhu pemeliharaan yang berbeda. *Jurnal Riset Akuakultur*. 2017; **12**(2): 161-167.
 20. Varga, Z.M., Matthews M. Anesthesia and euthanasia in Zebrafish. *ILAR Journal*. 2012; **53**(2): 192-204. doi: 10.1093/ilar.53.2.192.
 21. Kurniasih. Histopatologi Ikan. Apresiasi Balai Uji Standard Karantina Ikan. Pusat Karantina Ikan. Jakarta. 2008.
 22. Ronald, J.R. Fish Pathology. 4th Ed. Hoboken: Willey-Blackwell, **72**. 2012.
 23. Romadina, I. Efek paparan subkronik dekokta daun nimba (*Azadirachta indica*) terhadap hiperplasia lamela insang dan perubahan kecepatan berenang ikan zebra (*Danio rerio*) juvenile. *Jurnal Kodokteran Komunitas*. 2018. **6**(3). 2018.
 24. Putri, A.N., Yahya, A., Fadli, M.Z. Uji toksisitas subkronik dekokta kombinasi *Imperata cylindrical*, *Gynura procumbens*, dan *Syzygium polyanthum* terhadap hiperplasia lamela insang *Danio rerio*. *Jurnal Kedokteran Komunitas*. 2015; **3**(1): 4.
 25. Maftuch, Marsoedi, V.D. Putri, M.H. Lulloh, F.K. Wibisono. 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*. 2015; **2**(2): 114-122.
 26. Pantung, Nuntiya, Kerstin, G. Helander, F.H. Hebert, C. Voravit. Histopathological alterations of hybrid walking catfish (*Clarias macrocephalus x Clarias gariepinus*) in acute and sub acute cadmium Exposure. *Environment Asia*. 2008; **1**: 22-27.
 27. Hudayya, A. dan Hadis Jayanti. Pengelompokan Pestisida Berdasarkan Cara Kerja (*Mode of Action*). Lembang: Yayasan Bina Tani Sejahtera. 2012.
 28. Buratti, F.M., D'Aniello A., Volpe M.T, Meneguz A., Testai E. Malathion bioactivation in the human liver: The contribution of different cytochrome P450 isoforms. *Drug Metabolism and Disposition*. 2005; **33**(3): 295-302. doi: 10.1124/dmd.104.001.
 29. Kumar, V., Cotran, R.S., dan Robbins S.L. Buku Ajar Patologi. Edisi 7; alih Bahasa, Brahm U, Pendt; editor Bahasa Indonesia, Huriawati Hartanto, Nurwany Darmaniah, Nanda Wulandari. Edisi ke-7. Jakarta: EGC. 2007.
 30. Baconi, DL., Barca M., Manda G., Ciobanu AM., Balalu C. Investigation of the toxicity of some organophosphorus pesticides in a repeated dose study in rats. *Rom J Morphol Embryol*. 2013; **54**: 349-56. PMID: 23771080.
 31. Casida, JE., Quistad GB. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chem Res Toxicol*. 2004; **17**(8): 983-98. doi:10.1021/tx0499259 PMID:15310231.
 32. Reigart, J.R. dan Roberts J.R. Organophosphate Insecticides. Recognition and Management of Pesticide Poisonings, 5th ed.; U.S Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office: Washington, DC. pp 34-47. 1999.
 33. Moron, S.E., A.A. Cássio, N.F. Marisa. Response of mucous cells of the gills of traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) (Teleostei: Erythrinidae) to hypo- and hyper-osmotic ion stress. *Neotropical Ichthyology*. 2009; **7**(3): 491-498.
 34. Sudaryatma, PE., Ni Nyoman E. Histopatologis Insang Ikan Hias Air Laut yang Terinfestasi *Dactylogyrus* sp. 2012; **30**(1).

35. Suryadinata, R.V. Effect of free radicals on inflammatory process in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Amerta Nutr.* 2018; 317-324. doi: 10.2473/amnt.v2i4.
36. Widodo, E. Pajanan asap rokok pada tikus sebagai model untuk manusia. *Disertasi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor. 2006.
37. Simamora, A. Flavonoid Dalam Apel Dan Aktifitas Antioksidannya. Jakarta: Ukrida. 2009.
38. Nijveldt, R.J., Harvey R., Hoorn D., Boelens P.G., Norren K.V., Leeuwen P. Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential application. *American Journal of Clinical and Nutrition.* 2001; **74**.
39. Yadav, A.K., Vareishang T. Antidiarrheal Activity of *Lithocarpus dealbata* and *Urena lobata* Extracts: Therapeutic Implications. *Pharmaceutical Biology.* 2007; **45**(3): 223-229.
40. Menke, A.L. Normal Anatomy and Histology of The Adult Zebra Fish. NCBI. 2011.
41. Vulesevic, B., McNeill, Perry S.F. Chemoreceptor Plasticity and Respiratory Acclimation in Zebra Fish *Danio rerio*. *The Journal of Experimental Biology.* 2006; **209**: 1261-1273.
42. Huo D., Lina S., Xiaoshang R., Libin Z., Chenggang Lin, Shilin Liu, et. al. Impact of hypoxia stress on the physiological responses of sea cucumber *Apostichopus japonicus*: respiration, digestion, immunity, and oxidative damage. *PeerJ.* 2018; **6**.
43. Matthews, M., Trevarrow B., Matthews J. A virtual tour of the *Guide for zebrafish users*. *Lab Animal.* 2002; **31**(3): 34-40.
44. Wirasuta, G.A.M.I., Niruri, R. Buku Ajar Toksikologi Umum. Universitas Udayana. 2007.
45. Skibola, C.F., Smith, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and Medicine.* 2000; **29**(3-4): 375-383.
46. Imami, DN. Efek Dekokta Daun Pulutan (*Urena lobata*) terhadap Frekuensi Pernapasan dan Hiperplasia Lamela Insang Ikan Zebra (*Danio rerio*) Juvenile yang Dipapar Pestisida Malathion Secara Kronik. *Unpublished.* 2019.
47. Santos, D.M., Mércia R.S., Melo, Denise C.S., Mendes, Iolanda K.B., et al. Histological Changes in Gills of Two Fish Species as Indicators of Water Quality in Jansen Lagoon. *Int. J. Environ. Public Health.* 2014.
48. Lupi, C.; Nhacarini, N.I.; Mazon, A.F.; Rigolinsá, O. Evaluation of environmental pollution through morphological changes in the gills of *Oreochromis niloticus* (Tilapia) in the Retiro consultation and Bebedouro streams, municipality of Bebedouro-sp. *Rev. Hispici & Lema.* 2007; **3**: 1-6.
49. Jam'annuri, A. Toksisitas Kronik Dekokta Daun *Urena lobata* Pada Fase Dewasa Ikan Zebra (*Danio rerio*) dan Efeknya terhadap Struktur Histologi Lamela Insang Ikan Zebra (*Danio rerio*) Dewasa. Skripsi. Universitas Islam Malang: Malang. 2016.
50. Mustika, A., Roostantia I., Gadis M.S. Efek Ekstrak Daun Singawalang (*Petiveria alliacea*) dalam Menurunkan Kadar Glukosa Darah melalui Peningkatan Ekspresi AMPK- α 1 pada Tikus Model Diabetes Melitus. *Jurnal Farmasi Klinik Indonesia.* 2017; **6**(1): 22-31.
51. Singh, D., Singh V.S. *Urena lobata*: A green source of anti-oxidant. *Journal of Plant Sciences.* 2014; **2**(6): 299-303.
52. Maisaroh, S., Nursasi H., Abdul G. Pengaruh Rebusan Simplisia Daun Pulutan (*Urena lobata* L.) terhadap Nekrosis Sel Tubulus Kontortus Proksimal Ginjal Mencit (*Mus musculus*) Galur Balb C. *Jurnal Biologi.* 2015.
53. Hayati, A., Ummah R.I., Winarni D. Pengaruh Kadmium terhadap Struktur Histologis Insang Ikan Lele (*Clarias Batrachus*). Skripsi. Universitas Airlangga. 2015.
54. Perry dan Potter. Fundamental keperawatan: konsep, proses, dan praktik. Jakarta: EGC. 2005.
55. Muttaqin, A. Pengantar asuhan keperawatan klien dengan gangguan sistem persyarafan. Jakarta: Salemba Medika. 2008.
56. Smith, J., dan Roberts, R. *Vital signs for nurses an introduction to clinical observations*. London: Wiley- Blackwell. 2011.
57. Ganong, W.F. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi 22. Jakarta: EGC. 2009.
58. Prokazky, F., Terence C., dan Margaret J.D. Mucosal inflammation at the respiratory interface: a zebrafish model. *Amj Physiological Lung Cell Mol Physiol.* 2016; **310**(6): 551-561.
59. Chabner, B.A., dan Bone. Phytochemical Glucosin Isolated from Soy Mediated Antihormonal Effect Through Estrogen Receptor Alpha and Beta. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2001; **86**: 1750-1758.
60. Karyono, S.S. Perubahan respon reseptor adrenergik- β dan muskarinik di otot polos saluran nafas tikus wistar pada proses penuaan. *Jurnal Kedokteran Brawijawa.* 2006; **22**(3).
61. Halliwell, B., and Gutteridge J.M. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press: Oxford. 1999.
62. Murray, R.K., Granner D.K., dan Rodwell, V.W. Biokimia Harper Edisi ke-27. Jakarta: EGC. 2001.
63. Gordon, M.H. The Mechanism of Antioxidant Activity in Vitro. Dalam B.J.F. Hudson (ed), *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science, London. 1990.
64. Ersu, I.V. Gambaran Histopatologi Insang, Usus, dan Otot Pada Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*) di Daerah Ciampea Bogor. Skripsi. Institut Pertanian Bogor: Bogor. 2008.
65. Kaidama, W.M., Gacche, R.N. Anti-Inflammatory Activity of Quercetin in Acute and Chronic Phases of Inflammation in Guinea Pigs.

- American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*. 2012. ISSN 2321-2748.
66. Ebert, T.J. *Pharmacology and Physiology for Anesthesia*. Elsevier. 2019.
 67. Jung, Mankil, Park, Moonsoo. Acetylcholinesterase Inhibition by Flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules*. 2007; 12: 2130-2139.
 68. Satria, ARA. Efek Dekokta Daun Pulutan (*Urena lobata*) terhadap Kadar Malondialdehyde (MDA) Otak dan Kecepatan Berenang Ikan Zebra (*Danio rerio*) Dewasa yang Dipapar Pestisida Malathion Kronik. *Unpublished*. 2019.
 69. Munawwaroh, R. Efek Dekokta Daun Pulutan (*Urena lobata*) terhadap Kadar Malondialdehyde (MDA) dan Superoksida Dismutase (SOD) Hepar Ikan Zebra (*Danio rerio*) Dewasa yang Dipapar Pestisida Malathion Kronik. *Unpublished*. 2019.
 70. Saunders, L. The irrigation of the gills in fishes: Studies of the mechanism of branchial irrigation. *Can J Zool*. 1961; **39**: 637-53.
 71. Hughes, M. dan Shelton. Respiratory mechanisms and their nervous control in fish. *Advances in Comparative Physiology and Biochemistry*. 1961; **1**: 274-364.
 72. Rahn, H. Aquatic gas exchange. *Respiration Physiol*. 1966; **1**: 1-12.
 73. Scown, TM., dan Santos. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicology Sciences*. 2001; **115**: 521-534.
 74. Wang, Y., dan Zang. Exploration of the correlation between the structure, haemolytic activity and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2007; **15**(7): 2528-2532.