

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

Dluharrohimah Nur Imami, Ariani Ratri Dewi, Yudi Purnomo*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Malathion mempunyai efek asetilkolinesterase inhibitor dan meningkatkan radikal bebas yang dapat merusak struktur dan fungsi organ pernafasan. Dekokta daun *Urena lobata* (DUL) memiliki potensi antioksidan dan anti inflamasi yang dikendalikan oleh zat aktif quercetin dan mangiferin. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh dekokta daun *Urena lobata* terhadap frekuensi pernafasan dan gambaran lamela insang *Danio rerio* fase juvenil yang dipapar malathion kronik.

Metode: *Danio rerio* berusia 45 hari yang dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol (n=5). Malathion dosis 2,5 mg/L diberikan pada kelompok perlakuan kecuali kontrol negatif selama 40 hari. Dekokta daun *Urena lobata* diberikan pada kelompok perlakuan dengan dosis masing-masing 125 mg/L, 250 mg/L dan 500 mg/L. Frekuensi pernafasan diamati melalui rekaman video dan dianalisis menggunakan *software Windows Media Player*. Lamela insang diwarnai menggunakan Hematoxylin Eosin dan diamati menggunakan mikroskop binokuler perbesaran 1000x. Analisis data menggunakan metode *One Way Anova* dan *Post Hoc LSD* ($p < 0,05$).

Hasil: Pemberian malathion pada kelompok kontrol positif meningkatkan frekuensi pernafasan dan hiperplasia lamela insang berturut-turut kurang lebih 25% dan 90% dibandingkan dengan kontrol negatif ($p < 0,05$). Pemberian dekokta daun *Urena lobata* dosis 125 mg/L dan 250 mg/L dapat menghambat peningkatan frekuensi pernafasan berturut-turut sekitar 10% dan 20% dibandingkan kontrol positif ($p < 0,05$). *Urena lobata* dosis 125 mg/L, 250 mg/L dan 500 mg/L menghambat hiperplasia lamela sekunder insang berturut-turut sekitar 10%, 25% dan 5% dibandingkan kontrol positif ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Dekokta daun *Urena lobata* mampu menghambat peningkatan frekuensi pernafasan dan hiperplasia lamela insang *Danio rerio* yang dipapar malathion kronik.

Kata Kunci: Malathion, *Urena lobata*, *Danio rerio*, frekuensi pernafasan, lamela insang, kronik.

EFFECT OF PULUTAN (*Urena lobata*) LEAVES DECOCTION ON RESPIRATORY FREQUENCY AND HISTOLOGICAL FEATURES OF GILLS OF JUVENILE ZEBRAFISH (*Danio rerio*) CHRONICALLY EXPOSED BY MALATHION

Dluharrohimah Nur Imami, Ariani Ratri Dewi, Yudi Purnomo*
Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

ABSTRACT

Introduction: Malathion has an acetylcholinesterase inhibitor effect and increase free radicals resulting in damage to the structure and function of the respiratory organs. *Urena lobata* leaves decoction have antioxidant and anti-inflammatory potential controlled by the active substances quercetin and mangiferin. The study aims to prove the influence of *Urena lobata* leaves decoction to respiratory frequency and histological features of gills of juvenile *Danio rerio* chronically exposed by malathion.

Method: *Danio rerio* age 45 days divided into 3 treatment groups and 2 control groups (n = 5). Malathion dose 2.5 mg/L administered to all groups except negative control for 40 days. *Urena lobata* leaves decoction was given to the treatment group at each dose 125 mg/L, 250 mg/L dan 500 mg/L. Respiratory frequency observed by recording and analyses using *Windows Media Player software*. Gills were colored with Hematoxylin Eosin and observed using a binocular microscopy with 1000x magnification. Data was analyzed using *One Way ANOVA* and *Post Hoc LSD* methods ($p < 0.05$).

Findings: Chronic expose of malathion in positive control group can increase respiratory rate and gills hyperplasia consecutively 25% and 90% compared to negative control ($p < 0.05$). Administration of *Urena lobata* leaves decoction dose 125 mg/L and 250 mg/L inhibit increased respiratory rate about 10% and 20% consecutively compared to positive control ($p < 0.05$). *Urena lobata* leaves decoction dose 125 mg/L, 250 mg/L and 500 mg/L inhibit secondary gills hyperplasia about 10%, 25% and 5% consecutively compared to positive control ($p < 0.05$).

Conclusion: *Urena lobata* leaves decoction was able to inhibit increasing respiratory rate and gills hyperplasia of juvenile *Danio rerio* chronically exposed by malathion.

Keywords: Malathion, *Urena lobata*, *Danio rerio*, respiratory frequency, gills lamellae, 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

Indonesia merupakan negara agrikultural dengan angka penggunaan pestisida yang tinggi¹. Malathion adalah pestisida golongan organofosfat yang banyak digunakan oleh masyarakat di Indonesia². Pestisida golongan organofosfat seperti malathion kini lebih banyak digunakan karena memiliki efek toksik yang lebih rendah dibandingkan pestisida golongan organoklorin dengan nilai LD-50 sekitar 1500 mg/kg³. Mekanisme kerja utama dari malathion adalah menghambat aktifitas asetilkolinesterase (AChE). Malathion diabsorpsi oleh tubuh melalui rute topikal, oral dan inhalasi yang selanjutnya akan didistribusikan ke organ hepar melalui aliran darah. Dalam hepar malathion mengalami proses biotransformasi menjadi malaoxon oleh enzim sitokrom P450⁴. Proses biotransformasi malathion berubah menjadi malaoxon menghasilkan produk samping berupa senyawa radikal bebas. Jumlah radikal bebas yang terus meningkat menimbulkan keadaan stress oksidatif dan inaktivasi dari asetilkolinesterase (AChE)⁵. Inaktivasi asetilkolinesterase (AChE) dapat mengakumulasi asetilkolin (ACh) sehingga menimbulkan dispnea dan bronkospasme³. Selain itu, kondisi stress oksidatif pada sel dan jaringan akan menimbulkan kerusakan struktur dan fungsi dari organ pernafasan⁵.

Salah satu herbal yang memiliki aktifitas biologis adalah daun *Urena lobata*. Menurut data empirik, daun *Urena lobata* digunakan sebagai obat batuk, bronkitis, diare dan demam⁶. Penelitian preklinik menunjukkan bahwa daun *Urena lobata* mengandung senyawa flavonoid yang memiliki potensi antioksidan dengan cara berikatan dengan senyawa radikal bebas⁷. Daun *Urena lobata* tidak hanya berfungsi sebagai antioksidan tetapi juga berpotensi sebagai anti inflamasi dengan adanya senyawa mangiferin⁸. Senyawa mangiferin berfungsi sebagai anti inflamasi⁹. Hingga saat ini penelitian terkait efek daun *Urena lobata* dalam menghambat kerusakan oksidatif pada sistem organ respirasi akibat malathion masih belum pernah dilakukan.

Danio rerio merupakan jenis ikan tropis yang banyak digunakan sebagai hewan coba penelitian. *Danio rerio* memiliki kesamaan dengan manusia pada sistem saraf, endokrin, intestinal dan jaringan adiposa¹⁰. Beberapa penelitian telah menggunakan *Danio rerio* sebagai hewan coba untuk pengembangan dalam studi toksikologi¹¹. Fase juvenil merupakan suatu fase dimana makhluk hidup mengalami proses tumbuh kembang. Pada fase ini, organisme lebih rentan terhadap senyawa xenobiotik sehingga beresiko mengganggu proses tumbuh kembang¹². Lamela sekunder insang pada ikan merupakan organ yang pertama kali terpapar senyawa-senyawa yang ada di dalam air sehingga

memiliki resiko untuk mengalami kerusakan struktur dan fungsi¹³. Berdasarkan latar belakang diatas, maka perlu dilakukan penelitian mengenai efek pemberian dekokta daun pulutan (*Urena lobata*) terhadap frekuensi pernafasan dan gambaran histologi lamela insang ikan zebra (*Danio rerio*) fase juvenil yang dipapar malathion secara kronik.

METODE

Penelitian ini dilaksanakan menggunakan metode eksperimental laboratorium *in vivo* dengan desain penelitian *control group post test only*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Terpadu 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 dinyatakan laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor 1074-KEP-UB.

Penentuan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan *Danio rerio* juvenil berusia 1-2 bulan yang diperoleh dari biakan lokal di Kecamatan Campurdarat, Kabupaten Tulungagung, Jawa Timur. Hewan coba yang digunakan telah diidentifikasi dan sertifikasi oleh Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga dengan nomor 005/ULMKILP/UA.FPK/03/2019. *Danio rerio* dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol (n=10). *Danio rerio* diberikan pencahayaan 14 jam terang dan 10 jam gelap, suhu air sekitar 26°C, konsentrasi oksigen dalam air minimal 60%, dan pakan sehari sekali dengan dosis 4%BB/hari¹⁵.

Pemberian Malathion

Malathion 500 g/l diencerkan menggunakan aquades sehingga didapatkan konsentrasi 5 mg/L. Malathion diberikan selama 40 hari pada kelompok kontrol positif dan perlakuan. Pemberian dosis malathion didapatkan dari modifikasi penelitian Cook *et al* tahun 2005¹⁶.

Pemberian Dekokta Daun *Urena lobata*

Serbuk daun *Urena lobata* didapatkan dari UPT Balai Materia Medika, Batu, Malang, Jawa Timur dan telah disertifikasi dengan nomor 074/096A/102.7/2019. Serbuk daun *Urena lobata* diekstraksi menggunakan metode dekoktasi. Serbuk daun *Urena lobata* ditimbang 5g dan dilarutkan kedalam panci dekok yang berisi 500 ml air bersuhu 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). Pemberian dosis daun *Urena lobata* didapatkan dari modifikasi penelitian Purnomo *et al* tahun 2015¹⁷.

Pengukuran Frekuensi Pernafasan *Danio rerio*

Pengukuran frekuensi pernafasan dilakukan sehari sebelum proses pengorbanan *Danio rerio* dengan memindahkan ikan ke dalam wadah 100 ml dan didiamkan selama satu menit. Pergerakan *Danio rerio* direkam menggunakan kamera selama satu menit dan frekuensi pernafasan dihitung berdasarkan jumlah gerakan buka tutup operkulum menggunakan *software Windows Media Player* yang dihitung dalam satuan kali permenit¹⁸.

Pengorbanan dan Pengambilan Insang *Danio rerio*

Pengorbanan hewan coba dilakukan dengan metode *hypothermal shock*. Langkah pertama yang dilakukan yaitu menyiapkan wadah yang berisi es. *Danio rerio* diletakkan diatas wadah es yang telah disiapkan dan didiamkan sekitar dua menit. Pembidahan dan pengambilan lamela insang *Danio rerio* dapat dilakukan setelah ikan tidak sadar¹⁹.

Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histologi Lamela Insang *Danio rerio*

Preparat histologi dibuat dengan cara fiksasi organ lamela insang menggunakan formalin 10%. Jaringan insang yang telah difiksasi selanjutnya didehidrasi menggunakan etanol. Sampel kemudian dibersihkan dengan larutan xylene dan dilakukan *embedding* atau pengerasan sampel dengan lilin/waxes dan resin untuk membentuk blok paraffin²⁰. Proses pemotongan dilakukan dengan pengaturan ketebalan potongan, yaitu 6 mikron. Lamela insang diwarnai dengan menggunakan pewarna Hematoxylin Eosin (HE) dan diamati menggunakan mikroskop binokuler pada perbesaran 1000x²⁰.

Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel lamela yang mengalami hiperplasia berbentuk seperti pemukul bisbol (*clubbing distal*) pada lima lapangan pandang, kemudian diambil rata-rata jumlah dalam satu lapang pandang. Penghitungan dilakukan oleh tiga orang pengamat untuk menghindari subjektivitas²². Data selanjutnya dihitung kembali dengan metode proporsi (%) dan dilakukan skoring. Penghitungan persentase sel lamela insang yang mengalami hiperplasia menggunakan rumus sebagai berikut²³:

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

Keterangan:

p = Persentase hiperplasia (%)

a = Jumlah sel lamela hiperplasia

b = Total jumlah sel lamela

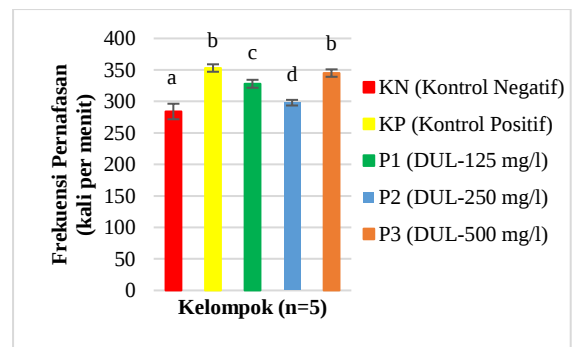
Teknik Analisa Data

Data yang telah dinyatakan normal dan homogen dapat dilanjutkan dengan analisis menggunakan uji parametrik menggunakan metode *One Way Analysis of Variance (ANOVA)* dan *Post Hoc Test Least Significance Different (LSD)* untuk melihat perbedaan antara masing-masing kelompok perlakuan. Selanjutnya, dilakukan uji menggunakan Korelasi Bivariate Pearson untuk melihat hubungan antar variabel ($p < 0,05$).

HASIL DAN ANALISA DATA

Frekuensi Pernafasan *Danio rerio* yang Dipapar *Urena lobata*

Hasil pengamatan frekuensi pernafasan *Danio rerio* yang dipapar malathion secara kronik dapat dilihat pada Gambar 1.



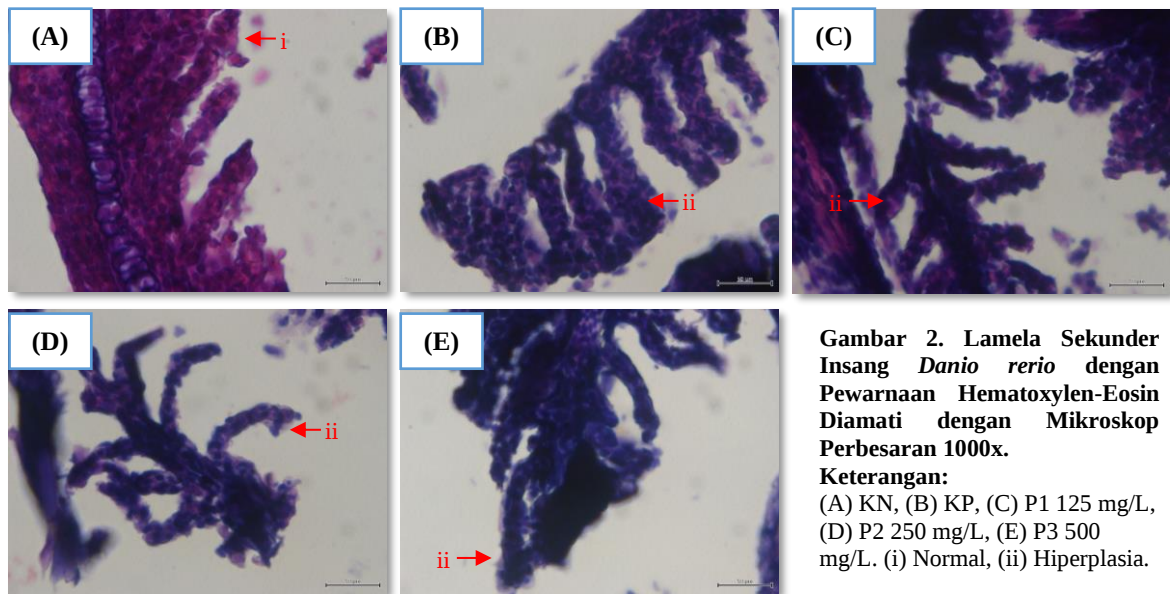
Gambar 1. Histogram Rerata Frekuensi Pernafasan *Danio rerio*

Keterangan: Histogram menunjukkan rerata ± SD frekuensi pernafasan pada kelompok KN (284 ± 12.32), KP (353 ± 5.91), P1 (328 ± 6.32), P2 (298 ± 4.47) dan P3 (345 ± 5.91). Notasi berbeda menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$).

Gambar 1 menunjukkan pemberian dekokta daun *Urena lobata* dosis 125 mg/L dan 250 mg/L menghambat peningkatan frekuensi pernafasan masing-masing sekitar 10% dan 20% dibandingkan kelompok kontrol positif ($p < 0,05$). Pemberian dekokta daun *Urena lobata* dosis 250 mg/L menghambat lebih kuat dibandingkan dosis 125 mg/L ($p < 0,05$), sedangkan dosis 500 mg/L tidak menghambat peningkatan frekuensi pernafasan hingga tak berbeda dengan kelompok kontrol positif ($p > 0,05$). Paparan malathion pada kelompok kontrol positif meningkatkan frekuensi pernafasan sekitar 25% dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$).

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

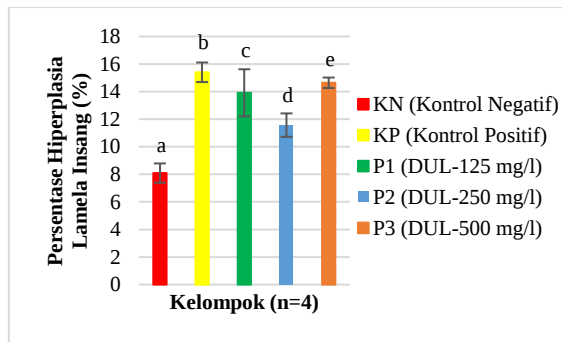
Hasil pengamatan persentase gambaran histologi lamela insang *Danio rerio* yang dipapar malathion secara kronik dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3.



Gambar 2. Lamela Sekunder Insang *Danio rerio* dengan Pewarnaan Hematoxylen-Eosin Diamati dengan Mikroskop Perbesaran 1000x.

Keterangan:

(A) KN, (B) KP, (C) P1 125 mg/L, (D) P2 250 mg/L, (E) P3 500 mg/L. (i) Normal, (ii) Hiperplasia.



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

Keterangan: Histogram menunjukkan rerata ± SD persentase hiperplasia lamela insang *Danio rerio* pada kelompok KN (8.09 ± 0.70), KP (15.40 ± 0.71), P1 (13.91 ± 1.71), P2 (11.57 ± 0.85) dan P3 (14.64 ± 0.38). Notasi berbeda menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0.05$).

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

Kelompok	Persentase	Skor	Keterangan
KN	8%	1	Ringan
KP	15%	1	Ringan
P1	14%	1	Ringan
P2	12%	1	Ringan
P3	15%	1	Ringan

Tabel 2. Skoring Hiperplasia Lamela Insang²⁴:

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

Pada kelompok kontrol positif (Gambar 2B) menunjukkan gambaran histologi lamela insang seperti pemukul bisbol (*clubbing distal*) dalam jumlah banyak, sedangkan pada kelompok kontrol negatif (Gambar 2A) didapatkan gambaran *clubbing distal* meskipun dalam jumlah sedikit. Kelompok perlakuan 125 mg/L, 250 mg/L dan 500 mg/L (Gambar 2C-E) menunjukkan gambaran *clubbing distal* dalam jumlah sedikit dibandingkan kelompok kontrol positif (Gambar 2B).

Gambar 3 menunjukkan pemberian ekstrak daun *Urena lobata* dosis 125 mg/L, 250 mg/L, dan 500 mg/L menghambat peningkatan hiperplasia lamela insang berturut-turut sekitar 10%, 25%, dan 5% dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ($p < 0.05$). Pemberian ekstrak daun *Urena lobata* dosis 250 mg/L menghambat hiperplasia lebih kuat dibandingkan dosis 125 mg/L ($p < 0.05$), sedangkan dosis 500 mg/L menghambat hiperplasia lebih rendah dibandingkan dengan kedua dosis tersebut ($p < 0.05$). Paparan malathion pada kelompok kontrol positif meningkatkan hiperplasia lamela insang sekitar 90% dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ($p < 0.05$).

Tabel 1 menunjukkan skoring hiperplasia lamela insang pada semua kelompok kurang dari 30% dan termasuk dalam kategori ringan, meskipun pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dosis 500 mg/L cenderung lebih tinggi dibandingkan kelompok yang lain.

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

Terdapat korelasi yang signifikan antara frekuensi pernafasan dan hiperplasia lamela sekunder insang ($p = 0.03$) dengan kekuatan korelasi sebesar $r = 0.484$ yang termasuk dalam kategori sedang seperti ditunjukkan pada tabel 3.

Tabel 3. Korelasi Frekuensi Pernafasan dengan Hiperplasia Lamela Sekunder Insang *Danio rerio* yang Dipapar *Urena lobata*

		Frekuensi Pernafasan	Hiperplasia Lamela
Frekuensi Pernafasan	Pearson	1	.484*
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)		.030
	n	25	20
Hiperplasia Lamela	Pearson	.484*	1
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	.030	
	n	20	20

Keterangan:

* Korelasi signifikan antar variabel ($p < 0,05$)

PEMBAHASAN

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

Pemberian malathion secara kronik pada *Danio rerio* meningkatkan frekuensi pernafasan dan hiperplasia lamela insang. Hal ini disebabkan malathion memiliki mekanisme sebagai penghambat enzim asetilkolinesterase (AChE) dan menghasilkan radikal bebas dari proses metabolismenya^{3,5}.

Malathion mengalami proses biotransformasi menjadi malaoxon oleh enzim sitokrom P450 di hepar. Malaoxon merupakan turunan dari senyawa malathion yang memiliki efek yang lebih toksik⁴. Malaoxon akan menghambat aktifitas enzim asetilkolinesterase pada sel saraf. Asetilkolinesterase merupakan enzim yang berperan mengkatalisis neurotransmitter asetilkolin menjadi kolin dan asam asetat. Ketika malaoxon menghambat aktifitas enzim asetilkolinesterase maka akan terjadi overstimulasi asetilkolin pada reseptor muskarinik²⁵. Akibatnya, otot polos insang mengalami kontraksi yang berlebihan sehingga pertukaran oksigen (O_2) dan karbondioksida (CO_2) terhambat. Kondisi tersebut akan dikompensasi oleh *Danio rerio* dengan meningkatkan frekuensi pernafasan³. Selain itu, overstimulasi asetilkolin pada reseptor muskarinik dapat meningkatkan sekresi mukus pada lamela insang. Paparan malathion kronik akan menimbulkan hipertrofi sel mukus dan hiperplasia lamela insang sehingga fungsi lamela untuk proses pertukaran gas terganggu³⁵.

Proses biotransformasi malathion menghasilkan produk samping berupa radikal bebas yang dapat menimbulkan kondisi stres oksidatif. Kondisi tersebut dapat mengakibatkan kerusakan oksidatif pada jaringan saraf dan lamela insang⁵. Kerusakan pada jaringan tersebut akan memicu reaksi inflamasi sehingga mengaktifasi produksi dari makrofag. Makrofag akan melepaskan berbagai

mediator inflamasi dan faktor kemotaktik, seperti interleukin-8 (IL-8) dan leukotriene B4 (LTB-4). Mediator inflamasi tersebut dapat merangsang pergerakan neutrofil dan meningkatkan sekresi mukus pada saluran pernafasan sehingga insang berproliferasi dengan menambah jumlah sel epitel lamela insang atau hiperplasia²⁶. Pelepasan mediator inflamasi dalam jangka waktu yang lama juga dapat menimbulkan neuropati, aksonopati dan demielinasi pada sistem saraf. Efek tersebut akan mengganggu transmisi sinyal dan menyebabkan kerusakan sel saraf^{26,27}.

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

Pemberian dekokta daun *Urena lobata* mampu menghambat peningkatan dari frekuensi pernafasan *Danio rerio* yang dipapar malathion secara kronik. Hal ini dikarenakan didalam daun *Urena lobata* terdapat kandungan zat aktif yang memiliki efek antioksidan dan antikolinergik^{7,37}.

Daun *Urena lobata* mengandung zat aktif seperti *quercetin* yang termasuk dalam golongan senyawa flavonoid⁶. Senyawa flavonoid memiliki efek antioksidan melalui mekanisme donor atom H, menghambat berbagai enzim yang berpotensi menghasilkan radikal bebas, mengaktifasi antioksidan enzimatik, dan berikatan dengan Fe sehingga dapat menstabilkan dan menurunkan jumlah senyawa radikal bebas di dalam tubuh^{7,28}. Efek tersebut akan membantu melindungi sel saraf pada sistem respirasi dari kerusakan yang lebih parah sehingga peningkatan frekuensi pernafasan dapat dihambat.

Selain berfungsi sebagai antioksidan, daun *Urena lobata* juga memiliki fungsi sebagai antikolinergik³⁷. Efek antikolinergik ini terjadi melalui mekanisme peningkatan produksi enzim asetilkolisesterase. Peningkatan produksi enzim asetilkolisesterase akan mencegah overstimulasi asetilkolin sehingga menghambat terjadinya peningkatan frekuensi pernafasan³⁶.

Pemberian dekokta daun *Urena lobata* pada dosis 250 mg/L mampu menghambat peningkatan frekuensi pernafasan lebih besar dibandingkan dengan dosis 125 mg/L. Hal ini sesuai dengan teori farmakologi bahwa semakin tinggi dosis yang diberikan maka akan meningkatkan efek biologisnya²⁹. Pemberian dosis 500 mg/L tidak menghambat penurunan dari frekuensi pernafasan hingga tidak berbeda dengan kelompok kontrol positif. Hal ini diduga karena pemberian dosis tinggi secara terus menerus menyebabkan penurunan kepekaan reseptor (desensitisasi) sehingga terjadi penurunan efek³⁸. Hal tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Pratama tahun 2019 (*unpublished data*) pada *Danio rerio* dewasa yang dipapar malathion secara kronik bahwa pemberian dekokta daun *Urena lobata* pada dosis 500 mg/L memiliki efek yang lebih rendah dibandingkan dengan dosis 250 mg/L dalam menghambat peningkatan frekuensi pernafasan³¹.

Gangguan pada fungsi pernafasan dapat menimbulkan beberapa gejala seperti hipoksia, hipoventilasi dan hiperventilasi. Hipoksia merupakan kondisi berkurangnya O_2 yang masuk kedalam tubuh yang disebabkan oleh beberapa faktor seperti kurangnya konsentrasi O_2 pada lingkungan, rendahnya kadar hemoglobin dalam darah dan adanya penurunan perfusi jaringan sehingga kebutuhan O_2 pada tingkat seluler tidak terpenuhi. Hipoventilasi merupakan berkurangnya kadar O_2 atau meningkatnya kadar CO_2 dalam tubuh yang disebabkan karena adanya kelainan struktur organ respirasi. Hiperventilasi merupakan upaya tubuh untuk meningkatkan kadar O_2 yaitu dengan cara meningkatkan frekuensi pernafasan. Hiperventilasi dapat terjadi karena beberapa faktor seperti keracunan obat-obatan, infeksi, kecemasan dan kadar asam basa yang tidak seimbang³². Berdasarkan penjelasan tersebut, frekuensi pernafasan dapat dijadikan sebagai salah satu komponen tanda vital indikator kesehatan³³.

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

Pemberian dekokta daun *Urena lobata* mampu menghambat peningkatan dari hiperplasia lamela insang *Danio rerio* yang dipapar malathion secara kronik. Hal ini dikarenakan adanya kandungan zat aktif didalam daun *Urena lobata* yang memiliki efek antioksidan dan anti inflamasi^{7,8}.

Daun *Urena lobata* mengandung senyawa flavonoid. Senyawa tersebut dapat menghambat peningkatan radikal bebas dari proses metabolisme malathion seperti pada penjelasan sebelumnya dengan tujuan menghambat peningkatan radikal bebas di dalam tubuh^{7,28}. Efek tersebut membantu melindungi sel lamela insang dari kerusakan oksidatif yang dapat meningkatkan hiperplasia pada lamela insang.

Daun *Urena lobata* tidak hanya berfungsi sebagai antioksidan tetapi juga berpotensi sebagai anti-inflamasi dengan adanya zat aktif mangiferin⁸. Mekanisme kerja zat aktif mangiferin sebagai anti inflamasi, yaitu dengan cara mengurangi volume massa eksudat, infiltrasi dari monosit dan netrofil, sitokin pro inflamasi (interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) dan interleukin-1 β (IL-1 β)) dan MPO (*myeloperoxidase*)⁹. Zat aktif mangiferin pada daun *Urena lobata* akan menurunkan mediator inflamasi dan faktor kemotaktik sebagai penyebab adanya inflamasi. Penurunan dari mediator inflamasi akan menyebabkan terjadinya penurunan sekresi mukus pada lamela insang²⁷. Efek tersebut dapat menghambat peningkatan frekuensi pernafasan akibat hiperplasia lamela insang.

Pemberian dekokta daun *Urena lobata* pada dosis 250 mg/L mampu menghambat peningkatan hiperplasia lamela insang lebih besar dibandingkan dengan dosis 125 mg/L. Hal ini sesuai dengan teori farmakologi bahwa semakin tinggi dosis yang diberikan maka akan meningkatkan efek

farmakologinya²⁹. Pemberian dekokta daun *Urena lobata* dosis 500 mg/L memiliki efek yang lebih rendah dalam menghambat peningkatan hiperplasia lamela insang dibandingkan dengan dosis 125 mg/L dan 250 mg/L. Hal ini diduga pemberian dekokta daun *Urena lobata* yang memiliki efek antioksidan pada dosis 500 mg/L berubah menjadi pro-oksidan melalui mekanisme auto-oksidasi seperti pada penjelasan sebelumnya³⁰. Perubahan oksidan menjadi pro-oksidan secara terus menerus dapat meningkatkan jumlah radikal bebas sebagai salah satu faktor terjadinya jejas sel²⁶. Hal ini didukung oleh penelitian Munawwaroh tahun 2019 (*unpublished data*) pada *Danio rerio* dewasa yang dipapar malathion secara kronik bahwa terjadi penurunan kadar *superoxide dismutase* (SOD) dan peningkatan kadar *malondialdehid* (MDA) hepar pada pemberian dekokta daun *Urena lobata* dosis 500 mg/L⁴¹. Hal ini juga didukung oleh penelitian Pratama tahun 2019 (*unpublished data*) pada *Danio rerio* dewasa yang dipapar malathion secara kronik bahwa pemberian dekokta daun *Urena lobata* pada dosis 500 mg/L memiliki efek yang lebih rendah dalam menghambat peningkatan hiperplasia lamela insang dibandingkan dengan 250 mg/L³¹.

Pada kelompok negatif terjadi peningkatan hiperplasia lamela sekunder insang. Hal ini dapat terjadi karena adanya faktor bias, yaitu jumlah sampel yang terlalu banyak dalam 1 bejana dan proses aklimatisasi yang terlalu singkat selama 1 menit sehingga menyebabkan kondisi hipoksia pada *Danio rerio* karena rendahnya kadar oksigen didalam air^{39,40}. Kondisi hipoksia dapat menyebabkan sel mengalami keadaan stress sehingga terjadi proses adaptasi sel. Proses adaptasi sel dapat berupa penambahan jumlah sel atau hiperplasia²⁶.

Insang merupakan organ utama yang berfungsi sebagai pertukaran udara, menjaga keseimbangan ion dan air serta memelihara keseimbangan asam basa. Proses oksigenasi dimulai dari masuknya air ke dalam insang melalui mulut dan keluar melalui operkulum. Darah dari jantung mengalir melalui arteri aferen dari lamela primer menuju lamela sekunder dan terjadi pertukaran CO_2 dengan O_2 . CO_2 akan dikeluarkan ke air sedangkan O_2 akan masuk³⁴. Insang juga merupakan organ yang pertama kali terpapar senyawa-senyawa yang ada di dalam air sehingga memiliki resiko untuk mengalami kerusakan organ¹³. Zat toksik yang berada di habitat ikan yaitu air, dapat memicu respon adaptasi dari organ lamela insang yang menyebabkan terjadinya perubahan struktur dan fungsi lamela sebagai organ pernafasan³⁵.

Hubungan Frekuensi Pernafasan dengan Hiperplasia Lamela Insang *Danio rerio*

Hasil uji korelasi pearson menunjukkan adanya korelasi yang signifikan antara frekuensi pernafasan dan hiperplasia lamela sekunder insang dengan kekuatan korelasi kategori sedang. Hal ini

dikarenakan terjadinya hiperplasia sel epitel lamela insang secara terus menerus dapat menyebabkan kerusakan fungsi organ pernafasan sehingga frekuensi pernafasan terganggu²⁷. Hal tersebut didukung oleh penelitian Pratama tahun 2019 (*unpublished data*) bahwa terdapat korelasi yang signifikan antara hiperplasia lamela sekunder insang dengan frekuensi pernafasan³¹.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian dekokta daun *Urena lobata* pada dosis 250 mg/L merupakan dosis yang paling kuat dalam menghambat peningkatan frekuensi pernafasan dan hiperplasia lamela insang akibat paparan malathion kronik.
2. Terdapat korelasi yang signifikan antara frekuensi pernafasan dan hiperplasia lamela sekunder insang.

SARAN

Perlu dilakukan adanya penelitian lebih lanjut mengenai efek dekokta daun *Urena lobata* terhadap organisme dengan tingkat lebih tinggi yang dipapar malathion secara kronik.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada Ikatan Organisasi Mahasiswa (IOM) yang telah mendanai penelitian, pembimbing, penguji dan kelompok ikan zebra yang membantu selama berjalannya penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 107/Permentan/SR.140/9/2014 Tentang Pengawasan Pestisida. 2014. Jakarta. Menteri Pertanian Republik Indonesia.
2. Slamet, J.S. **Kesehatan Lingkungan** Cetakan Keenam. Yogyakarta: Gadjah Mada University, 2004.
3. Gerberding, J.L., Wilson, J.D., Lladós, F.T., Singh, M., Sutton, C.A., Sutton, W.R., Nakatsugawa, T dan Benson, A. 2003. **Toxicological Profiles for Malathion**. USA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) Division of Toxicology Information Branch.
4. Buratti, F.M., D'Aniello, A., Volpe, M.T., Meneguz, A dan Testai, E. 2005. **Malathion Bioactivation in the Human Liver**. Rome: Drug Metabolism and Disposition.
5. Possamai, F.P., Fortunato, J.J., Feier, G., Agostinho, F.R., Quevedo, J., Filho, D.W dan DalPizzol, F. 2007. **Oxidative Stress After Acute and Sub-chronic Malathion Intoxication in Wistar Rats**. Criciuma: Environmental Toxicology and Pharmacology.
6. Babu, S.S., Madhuri, D.B., Ali, S.L. 2016. **A Pharmacological Review of Urena Lobata Plant**. Mangalagiri: Asian Journal of Pharmaceutical And Clinical Research.
7. Ali, M.S., Faruq, K.O., Rahman, M.A.A dan Hossain M.A. 2013. **Antioxidant and Cytotoxic Activities of Methanol Extract of Urena lobata (L) Leaves**. Bangladesh: The Pharma Innovation Journal.
8. Reddy, D.S., Madhuri, D.B., Babu, S.S. 2016. **Anxiolytic antidepressant and anti-inflammatory activity of ethanolic extract of Urena Lobata leaf**. Int J Pharma Res Health Sci 4(4): 1284-1290. doi:10.21276/ijprhs.2016.04.07.
9. Bulugonda, R.K., Kumar, K.A., Gangappa, D., Beeda, H., Philip, G.H., Rao, D.M dan Faisal, S.M. 2017. **Mangiferin from Pueraria tuberosa reduces inflammation via inactivation of NLRP3 inflammasome**. Anantapur: Scientific Reports.
10. Schlegel, A dan Stainier, D.Y.R. 2007. **Lessons from "Lower" Organisms-What Worms, Flies, and Zebrafish Can Teach Us about Human Energy Metabolism**. USA: PLoS Genetics.
11. Santos, I.V.F., Souza, G.C., Santana, G.R., Duarte, J.L., Fernandez, C.P., Keita, H., Moyado, J.A.V., Navarrete, A., Ferreira, I.M., Carvalho, H.O., dan Carvalho, J.C.T. **Histopathology in Zebrafish (Danio rerio) to Evaluate the Toxicity of Medicine: An Anti-Inflammatory Phytomedicine with Janaguba Milk (Himatanthus drasticus Plumel)**. Histopathology-An update Chapter 3. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76670>
12. Singleman, C dan Holtzman, N.G. 2014. **Growth and maturation in the zebrafish, Danio rerio a staging tool for teaching and research**. New York: Zebrafish Volume 11.
13. Cinar, K., Aksoy, A., Emre, Y dan Asti, R.N. 2008. **The histology and histochemical aspects of gills of the flower fish, Pseudophoxinus antalyae**. Turkey: Vet Res Commun.
14. Federer, W.T. 1963. **Experimental Design: Theory and Application**. New York: Macmillan.
15. OECD (2018) **Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures**. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
16. Cook, L.W., L. Barbara, P. Christopher. 2005. **The pesticide malathion reduces survival and growth in developing Zebrafish**. Environmental Toxicology and Chemistry 24(7):1745-50.
17. Purnomo, Y., Djoko Wahono S., Sutiman B.S., Mochamad Aris W. 2015. **Anti-diabetic potential of Urena lobata leaf extract through inhibition of dipeptidyl peptidase IV activity**. Asian Pac J Trop Biomed 5(8): 645-649.

18. Prakoso, A.P., Chang, Y.J. 2017. **Laju respirasi induk ikan blackhead seabream *Acanthopagrus schlegelii* pada suhu pemeliharaan yang berbeda.** Jurnal Riset Akuakultur 12(2): 161-167.
19. Varga, Z.M., Matthews, M. 2012. **Anesthesia and euthanasia in Zebrafish.** ILAR Journal 53(2): 192–204. doi: 10.1093/ilar.53.2.192.
20. Kurniasih. 2008. **Histopatologi Ikan.** Apresiasi Balai Uji Standard Karantina Ikan. Pusat Karantina Ikan. Jakarta
21. Ronald, R.J. 2012. **Fish Pathology.** 4th Ed. Hoboken: Willey-Blackwell.
22. Putri, A.N., Yahya, A., Fadli, M.Z. 2015. **Uji toksisitas subkronik dekokta kombinasi *Imperata cylindrical*, *Gynura procumbens*, dan *Syzygium polyanthum* terhadap hiperplasia lamela insang *Danio rerio*.** Jurnal Kedokteran Komunitas 3(1): 4.
23. Maftuch., Marsoedi., Putri, V.D., Lulloh, M.H., Wibisono, F.K.. 2015. **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 2(2): 114-122.
24. Pantung., Nuntiya., Kerstin., Helander, G., Hebert, F.H., Voravit, C. 2008. **Histopathological alterations of hybrid walking catfish (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*) in acute and sub acute cadmium Exposure.** Environment Asia 1: 22-27.
25. Eyer, P. 2003. **The Role of Oximes in the Management of Organophosphorus Pesticide Poisoning.** Munich: Toxicological Reviews.
26. Kumar, V., Cotran, R.S dan Robbins, S.L. 2014. **Buku Ajar Patologi Edisi 9.** Jakarta: EGC.
27. Suryadinata, R.V. 2018. **Effect of Free Radicals on Inflammatory Process in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD).** Surabaya: Amerta Nutr.
28. Prochazkova, D., Bousova, I dan Wilhelmova, N. 2011. **Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids.** Czech Republic: Fitoterapia 82.
29. Wirasuta, G.A.M.I., Niruri, R. **Buku Ajar Toksikologi Umum.** Universitas Udayana. 2007.
30. Skibola, C.F., Smith, M.T. **Potential health impacts of excessive flavonoid intake.** *Free Radical Biologi and Medicine*, 29(3-4): 375-383. 2000
31. Pratama, S. **Efek Dekokta Daun Pulutan (*Urena lobata*) terhadap Frekuensi Pernapasan dan Hiperplasia Lamela Insang Ikan Zebra (*Danio rerio*) Dewasa yang Dipapar Pestisida Malathion Secara Kronik.** Unpublish. 2019.
32. Ganong, W.F. **Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 22.** Jakarta: EGC. 2009.
33. Smith, J., dan Roberts, R. **Vital signs for nurses an introduction to clinical observations.** London: Wiley-Blackwell. 2011.
34. Menke, A. L., Spitsbergen, J.M., Wolterbeek, A.P.M dan Woutersen, R.A. 2011. **Normal anatomy and histology of the adult zebrafish.** *Toxicologic Pathology*. 39(5): 759–775. doi: 10.1177/0192623311409597.
35. Moron, S.E., Cássio, A.A., Marisa, N.F. 2009. **Response of mucous cells of the gills of traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerthrinus unitaeniatus*) (Teleostei: Erythrinidae) to hypo- and hyper-osmotic ion stress.** *Neotropical Ichthyology* 7(3): 491-498.
36. Barnes PJ. 1999. Airway muscarinic receptors. In: Spector SL. **Anticholinergic agents in the upper and lower airways.** New York : Marcel Dekker.
37. Yadav, A.K., Tangpu, V. 2007. **Antidiarrheal activity of *Lithocarpus dealbata* and *Urena lobata* extracts: Therapeutic implications.** *Pharm Biol* 45(3):223-9.
38. Jung, Mankil, Park, Moonsoo. 2007. **Acetylcholinesterase Inhibition by Flavonoids from *Agrimonia pilosa*.** *Molecules* 12: 2130-2139.
39. 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.
40. Matthews, M., Trevarrow B., Matthews J. **A virtual tour of the Guide for zebrafish users.** *Lab Animal*. 2002; 31(3): 34-40.
41. Munawwaroh, R. **Efek Dekokta Daun Pulutan (*Urena lobata*) terhadap Kadar Superoxide Dismutase (SOD) dan Malondialdehid (MDA) Hepar Ikan Zebra (*Danio rerio*) yang Dipapar Pestisida Malathion Secara Kronik.** Unpublish. 2019.