



**ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica*) SEBAGAI
HEPATOPROTEKTOR TERHADAP IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) YANG
MENGALAMI STRES OKSIDATIF AKIBAT PEMAPARAN HERBISIDA
ISOPROPILAMINA GLIFOSAT**

TESIS



Oleh :

DIKLAWATI JATAYU

166080100111017

PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN

MINAT LINGKUNGAN

**PROGRAM PASCA SARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2018



**ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica*) SEBAGAI
HEPATOPROTEKTOR TERHADAP IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) YANG
MENGALAMI STRES OKSIDATIF AKIBAT PEMAPARAN HERBISIDA
BERBAHAN AKTIF ISOPROPILAMINA GLIFOSAT**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



Oleh:
DIKLAWATI JATAYU
166080100111017

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
MINAT LINGKUNGAN**

**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG
2018**

**ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica*) SEBAGAI
HEPATOPROTEKTOR TERHADAP IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) YANG
MENGALAMI STRES OKSIDATIF AKIBAT PEMAPARAN HERBISIDA
ISOPROPILAMINA GLIFOSAT**

Oleh :
DIKLAWATI JATAYU
166080100111017

Telah dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal 11 Desember 2018
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

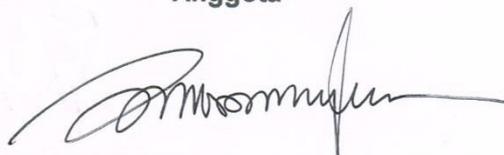
Ketua



Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
NIP. 19600322 198601 1 001
Tanggal :

18 DEC 2018

Anggota



Dr. Asus Maizar S. H., S.Pi, MP
NIP. 19720529 20032 1 001
Tanggal :

18 DEC 2018

Mengetahui,

Dekan
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan



Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
NIP. 19600322 198601 1 001
Tanggal :

18 DEC 2018

Ketua
Program Magister



Dr. Ir. Maftuch, M.Si
NIP. 19660825 199203 1 001
Tanggal :

18 DEC 2018

**JUDUL TESIS :**

**ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica*) SEBAGAI
HEPATOPROTEKTOR TERHADAP IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) YANG
MENGALAMI STRES OKSIDATIF AKIBAT PEMAPARAN HERBISIDA
ISOPROPILAMINA GLIFOSAT**

MAHASISWA

Nama : Diklawati Jatayu

NIM : 166080100111017

Program Studi : Budidaya Perairan

Minat Studi : Lingkungan

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS

Anggota : Dr. Asus Maizar S. H., S.Pi, MP

KOMISI PENGUJI

Penguji I : Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si

Penguji II : Andi Kurniawan, S.Pi, M.Eng., D.Sc

Ujian Kelayakan : 27 Februari 2018

Seminar Proposal : 12 Juli 2018

Seminar Hasil : 14 November 2018

Ujian Tesis : 3 Desember 2018

**PERNYATAAN ORISINALITAS**

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa tesis ini merupakan hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia diberi sanksi atas perbuatan tersebut, serta diproses sesuai peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, 11 Desember 2018

Mahasiswa



Diklawati Jatayu

166080100111017



DAFTAR RIWAYAT HIDUP



DIKLAWATI JATAYU, lahir di Blitar, Provinsi Jawa Timur

pada tanggal 14 Juni 1994, dari pasangan suami-istri Bapak

Dwi Witanto dan Ibu Ery Hartati. Adapun riwayat pendidikan

penulis yaitu, pada tahun 2000 lulus dari TKK Santa Maria

Kediri. Tahun 2006 lulus dari SDK Santa Maria Kediri. Tahun

2009 lulus dari SMPK Mardi Wiyata Kediri, dan pada tahun 2012 lulus dari SMAN

5 Kediri. Tahun 2016 lulus dari Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,

Universitas Brawijaya, Malang, dan pada tahun 2018 lulus dari Program Pasca

Sarjana (S2) Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,

Universitas Brawijaya, Malang. Saat menempuh program sarjana (S1) penulis

membuat tugas akhir (Skripsi) dengan judul "Kajian Histopatologi Ginjal Ikan Mas

(*Cyprinus carpio*), yang Dipapar Herbisida Roundup Berbahan Aktif

Isopropilamina Glifosat". Saat menempuh program magister (S2) penulis

membuat tugas akhir (Tesis) yang berjudul "Antioksidan dari Ekstrak Pegagan

(*Centella asiatica*) sebagai Hepatoprotektor pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)

yang Mengalami Stres Oksidatif Akibat Pemaparan Herbisida Isopropilamina

Glifosat".

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji Syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena berkat rahmat dan penyertaan-Nya, penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Antioksidan dari Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) sebagai Hepatoprotektor pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) yang Mengalami Stres Oksidatif Akibat Pemaparan Herbisida Isopropilamina Glifosat”. Penulis menyadari bahwa dalam penulisan laporan tesis ini banyak mendapatkan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Orang tua tercinta, Ibunda Ery Hartati, Kakek dan Nenek serta semua keluarga besar atas segala bantuan dalam segi materiil maupun non materiil dan senantiasa medoakan saya agar dapat menyelesaikan tesis ini.
2. Ibu Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS. dan Dr. Asus Maizar S.H. S.Pi, MP. Selaku dosen pembimbing yang telah membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan laporan tesis ini.
3. Ibu Dr. Uun Yanuhar, S.Pi., M.Si dan Bapak Andi Kurniawan S.Pi, M. Eng, D.Sc selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan yang bermanfaat dan membangun bagi penulis.
4. Teman-teman *private group*, Amira Masitha, Yovan Endik, Gede Angga Krishna, Hadi Prasetyo, Rusmawanto, Jefri Anjaini, Feri Setiawan, Nico R. Caesar, Muhamad Sumsanto, dan Cucun Herlina atas segala bantuan dan kerja samanya dalam menyelesaikan penelitian ini.
5. Teman-teman tercinta “7 ikan”, Duwi Widayati, Fathin Adilla, Putri Ramadani, Suci Purwati, Fiing Resti, Tsalitsatus Faiz atas segala doa dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis.
6. Seseorang tercinta yang selalu mendukung, dan memberikan semangat kepada penulis
8. Rekan-rekan Pasca Sarjana FPIK UB yang banyak memberikan bantuan serta ikut berperan dalam memperlancar dalam menyelesaikan laporan tesis ini.
9. Kepada berbagai pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan laporan tesis ini.

Malang, 11 Desember 2018

Diklawati Jatayu

RINGKASAN

DIKLAWATI JATAYU (166080100111017). Program Studi Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, 11 Desember 2018. Antioksidan dari Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) sebagai Hepatoprotektor pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) yang Mengalami Stres Oksidatif Akibat Pemaparan Herbisida Isopropilamina Glifosat. Komisi Pembimbing, Ketua: **Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS.**, Anggota: **Dr. Asus Maizar S.H. S.Pi, MP.**

Herbisida merupakan pestisida yang digunakan khusus untuk membasmi gulma. Pemakaian herbisida dalam bidang pertanian, industri, perkotaan, kehutanan dan perairan berpotensi menyebabkan pencemaran perairan. Organisme yang hidup dalam ekosistem perairan merupakan organisme non target yang juga terkena dampak kontaminasi herbisida. Beberapa penelitian telah mengungkapkan bahwa efek dari kontaminasi herbisida isopropilamina glifosat adalah terjadinya stres oksidatif pada ikan. Stres oksidatif menyebabkan kerusakan pada membran lipid sehingga menyebabkan tingginya kadar malondialdehida (MDA) pada darah maupun jaringan. Jika tubuh tidak mampu menetralkan radikal bebas yang berasal dari herbisida ini, maka akan menyebabkan kerusakan sel, jaringan, maupun organ.

Setiap organisme memiliki antioksidan endogen yang terdapat didalam tubuh, salah satunya adalah enzim SOD. Enzim SOD bertugas mengubah senyawa radikal (O_2^{\cdot}) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Kontaminasi herbisida yang berlebihan menyebabkan ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan enzim antioksidan endogen di dalam tubuh. Dibutuhkan antioksidan eksogen yang berasal dari luar tubuh seperti bahan aktif (flavonoid, terpenoid, tanin, saponin), vitamin C dan E sebagai pemutus reaksi radikal dari herbisida isopropilamina glifosat. Tanaman pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tanaman yang mengandung bahan aktif seperti, terpenoid, flavonoid dan fenolik.

Beberapa penelitian telah mengungkapkan bahwa ekstrak tanaman pegagan memiliki sifat antioksidan dengan cara meningkatkan aktivitas antioksidan endogen. Penelitian ini akan memanfaatkan ekstrak tanaman pegagan yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan untuk menetralkan radikal bebas yang disebabkan oleh paparan herbisida isopropilamina glifosat terhadap ikan mas (*Cyprinus carpio*). Pemberian ekstrak pegagan diharapkan dapat membantu meningkatkan enzim SOD sebagai enzim utama dalam menangkap radikal bebas sehingga tidak terjadi kerusakan oksidatif pada tubuh ikan mas.

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen. Metode analisis yang digunakan adalah uji fitokimia, uji antioksidan (DPPH), analisa menggunakan *Mass Spectrometry* (MS), uji kadar MDA, serta SOD. Penelitian ini menggunakan 10 perlakuan yang terdiri dari (K+), yaitu perlakuan tanpa pemaparan, ikan dengan pemberian herbisida 2 ppm (K-), ikan dengan pemberian ekstrak pegagan dosis 50, 100, 150, dan 300 mg/kg BB (P1, P2, P3, P4) serta ikan dengan pemaparan herbisida 2 ppm dan penambahan ekstrak pegagan dosis 50, 100, 150, dan 300 mg/kg BB (HP1, HP2, HP3, dan HP4). Pemberian ekstrak pegagan dilakukan setiap 3 hari sekali selama 14 hari. Pemaparan herbisida dilakukan selama 10 hari. Pengambilan organ hati dilakukan pada hari ke-14 untuk selanjutnya dilakukan analisis MDA dan SOD.



Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *C. asiatica* memiliki beberapa senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, tanin, saponin, serta memiliki kemampuan mengikat DPPH dengan nilai IC_{50} sebesar 125 $\mu\text{g/ml}$. Data hasil pengukuran kadar MDA menunjukkan bahwa rata-rata kadar MDA pada ikan kontrol sebesar 516,50 ng/ml. Perlakuan dengan penambahan ekstrak etanol pegagan sebesar 300 mg/kg memiliki kadar MDA terendah yakni sebesar 409,83 ng/ml, sedangkan dengan penambahan ekstrak 300mg/kg dan pemaparan herbisida 2 ppm memiliki kadar MDA terendah sebesar 450,67 ng/ml. Selanjutnya perlakuan dengan penambahan ekstrak etanol pegagan sebesar 300 mg/kg memiliki kadar SOD tertinggi yakni sebesar 1,726 ng/ml, sedangkan perlakuan dengan pemaparan herbisida 2 ppm ditambah pemberian ekstrak etanol pegagan sebesar 300 mg/kg memiliki kadar SOD tertinggi yakni sebesar 2,272 ng/ml. Setelah melakukan uji anova dua arah, dan terdapat perbedaan dengan signifikansi $< 0,05$ maka dilakukan uji lanjutan dengan metode Tukey HSD yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan nilai $P < 0,05$. Perlakuan ekstrak *C. asiatica* dosis 150 dan 300 mg/kg menunjukkan hasil yang paling signifikan. Berdasarkan data tersebut, ekstrak *C. asiatica* terbukti meningkatkan kadar SOD pada hati ikan mas yang diinduksi oleh herbisida berbahan aktif isopropilamina glifosat. Penelitian ini menunjukkan bahwa *C. asiatica* memiliki efek antioksidan dengan meningkatkan mekanisme antioksidan seperti SOD di dalam tubuh ikan dengan dosis terbaik sebesar 300 mg/kg BB.



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, atas segala berkat dan rahmat yang telah dilimpahkan kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan tesis dengan judul “Antioksidan dari Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) sebagai Hepatoprotektor pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) yang Mengalami Stres Oksidatif Akibat Pemaparan Herbisida Isopropilamina Glifosat”. Tesis ini dibuat untuk memenuhi salah satu syarat kelulusan dalam meraih gelar Magister di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari bahwa masih banyak terdapat kekurangan baik dari ketelitian pada penulisan, keakuratan ataupun kesalahan penyampaian kata, karena semua itu tidak lepas dari keterbatasan kemampuan yang dimiliki oleh penulis, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun agar usulan tesis ini lebih baik dan bermanfaat bagi para pembaca dan yang membutuhkan.

Malang, 11 Desember 2018

Penulis



DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.iii
PERNYATAAN ORISINALITAS	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN	vii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
GLOSARIUM	xvii
1. PENDAHULUAN	Error! Bookmark not defined.
1.1 Latar Belakang	Error! Bookmark not defined.
1.2 Rumusan Masalah	Error! Bookmark not defined.
1.3 Tujuan Penelitian	Error! Bookmark not defined.
1.4 Manfaat Penelitian	Error! Bookmark not defined.
1.4.1 Manfaat Teoritis	Error! Bookmark not defined.
1.4.2 Manfaat Praktis	Error! Bookmark not defined.
1.5 Waktu dan Tempat	Error! Bookmark not defined.
2. TINJAUAN PUSTAKA	Error! Bookmark not defined.
2.1 Ikan Mas (<i>Cyprinus carpio</i>)	Error! Bookmark not defined.
2.1.1 Morfologi dan Anatomi	Error! Bookmark not defined.
2.1.2 Distribusi dan Habitat	Error! Bookmark not defined.
2.1.3 Kebiasaan Makan	Error! Bookmark not defined.
2.2 Radikal Bebas	Error! Bookmark not defined.
2.3 Antioksidan	Error! Bookmark not defined.
2.4 Stres Oksidatif	Error! Bookmark not defined.
2.5 Herbisida <i>Roundup</i> dengan Bahan Aktif Isopropilamina Glifosat	Error!
Bookmark not defined.	
2.5.1 Degradasi Herbisida di Tanah dan Lingkungan Perairan	Error!
Bookmark not defined.	
2.5.2 Toksisitas Akut Glifosat dan <i>Roundup</i>	Error! Bookmark not defined.
2.5.3 <i>Roundup</i> sebagai Penyebab Stres Oksidatif dan Hepatotoksik	Error!
Bookmark not defined.	



2.6 Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	Error! Bookmark not defined.
2.6.1 <i>Centella asiatica</i> sebagai Natural Antioksidan.....	Error! Bookmark not defined.
2.6.2 <i>Centella asiatica</i> sebagai Hepatoprotektor.....	Error! Bookmark not defined.
2.7 Malondialdehida (MDA) sebagai Biomarker Stres Oksidatif.....	Error! Bookmark not defined.
2.8 Superoksida Dismutase (SOD) sebagai Enzim Antioksidan Endogen	Error! Bookmark not defined.
2.9 Kualitas Air	Error! Bookmark not defined.
2.9.1 Suhu.....	Error! Bookmark not defined.
2.9.2 pH.....	Error! Bookmark not defined.
2.9.3 DO (<i>Dissolved Oxygen</i>)	Error! Bookmark not defined.
3. KONSEP PENELITIAN	Error! Bookmark not defined.
3.1 Landasan Teori.....	Error! Bookmark not defined.
3.2 Kerangka Konsep Penelitian	Error! Bookmark not defined.
3.3 Hipotesis	Error! Bookmark not defined.
3.4 Kerangka Operasional Penelitian	Error! Bookmark not defined.
3.4.1 Penelitian Tahap I.....	Error! Bookmark not defined.
3.4.2 Penelitian Tahap II.....	Error! Bookmark not defined.
3.5 Penelitian Terdahulu	Error! Bookmark not defined.
3.6 Strategi Publikasi.....	Error! Bookmark not defined.
4. MATERI DAN METODE PENELITIAN	Error! Bookmark not defined.
4.1 Desain Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.2 Waktu dan Tempat.....	Error! Bookmark not defined.
4.3 Materi Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.4 Alat dan Bahan.....	Error! Bookmark not defined.
4.4.1 Alat.....	Error! Bookmark not defined.
4.4.2 Bahan.....	Error! Bookmark not defined.
4.5 Metode Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
4.6 Prosedur Penelitian Tahap I.....	Error! Bookmark not defined.
4.6.1 Ekstraksi <i>Centella asiatica</i> dengan Metode Maserasi	Error! Bookmark not defined.
4.6.2 Skrining Fitokimia	Error! Bookmark not defined.
4.6.3 Uji Kandungan Bioaktif Ekstrak Pegagan menggunakan <i>Mass Spectrometry</i>	Error! Bookmark not defined.
4.6.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH..	Error! Bookmark not defined.
4.7 Prosedur Penelitian Tahap II.....	Error! Bookmark not defined.
4.7.1 Aklimatisasi.....	Error! Bookmark not defined.
4.7.2 Pengenceran Herbisida Isopropilamina Glifosat..	Error! Bookmark not defined.
4.7.3 Uji <i>Lethal Concentration</i> 50 (LC ₅₀) Herbisida Isopropilamina Glifosat	Error! Bookmark not defined.



4.7.4 Dosis dan Pengenceran Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*)..... **Error! Bookmark not defined.**

4.7.5 Uji *Lethal Dose* 50 (LD₅₀) Ekstrak Pegagan terhadap Ikan Mas ... **Error! Bookmark not defined.**

4.7.6 Uji In-vivo Ekstrak *Centella asiatica* dan Herbisida Isopropilamina Glifosat pada Ikan Mas **Error! Bookmark not defined.**

4.7.7 Pengukuran Kualitas Air **Error! Bookmark not defined.**

4.7.8 Pembedahan Ikan Mas **Error! Bookmark not defined.**

4.7.9 Pengukuran Kadar MDA (Malondialdehid) **Error! Bookmark not defined.**

4.7.10 Pengukuran Aktivitas SOD (*Superoxide-Dismutase*) **Error! Bookmark not defined.**

4.7.11 Analisis Data..... **Error! Bookmark not defined.**

5. HASIL DAN PEMBAHASAN..... **Error! Bookmark not defined.**

5.1 Ekstraksi Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) **Error! Bookmark not defined.**

5.2 Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) **Error! Bookmark not defined.**

5.3 Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) menggunakan *Mass Spectrometry* **Error! Bookmark not defined.**

5.4 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) **Error! Bookmark not defined.**

5.5 LC₅₀ Herbisida Roundup dengan Bahan Aktif Isopropilamina Glifosat pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) **Error! Bookmark not defined.**

5.6 LD₅₀ Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) **Error! Bookmark not defined.**

5.7 Uji In-vivo pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) **Error! Bookmark not defined.**

5.8 Malondialdehid (MDA) pada Hati Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)..... **Error! Bookmark not defined.**

5.9 Superoksida Dismutase (SOD) pada Hati Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) **Error! Bookmark not defined.**

5.10 Analisa Data Hasil Penelitian..... **Error! Bookmark not defined.**

6. KESIMPULAN DAN SARAN **Error! Bookmark not defined.**

6.1 Kesimpulan **Error! Bookmark not defined.**

6.2 Saran **Error! Bookmark not defined.**

DAFTAR PUSTAKA..... **Error! Bookmark not defined.**

LAMPIRAN..... **Error! Bookmark not defined.**



DAFTAR GAMBAR

Gambar

Halaman

1. Morfologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)..... **Error! Bookmark not defined.**
2. Kisaran populasi ikan mas liar di Eurasia..... **Error! Bookmark not defined.**
3. Sumber utama radikal bebas dalam tubuh dan konsekuensi dari kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas..... **Error! Bookmark not defined.**
4. Proses terjadinya stres oksidatif..... **Error! Bookmark not defined.**
5. Rumus Bangun Glifosat dan Isopropilamina Glifosat **Error! Bookmark not defined.**
6. Skema yang menggambarkan stres oksidatif... **Error! Bookmark not defined.**
7. *Centella asiatica* (Chandrika dan Kumara, 2015) **Error! Bookmark not defined.**
8. Gambaran mekanisme metabolisme obat dan xenobiotik dan efek antioksidan herbal..... **Error! Bookmark not defined.**
9. Kerangka Konseptual Penelitian **Error! Bookmark not defined.**
10. Kerangka Operasional Penelitian..... **Error! Bookmark not defined.**
11. Kerangka Proses Maserasi..... **Error! Bookmark not defined.**
12. Kerangka Uji Aktivitas Antioksidan..... **Error! Bookmark not defined.**
13. Kerangka Skrining Fitokimia..... **Error! Bookmark not defined.**
14. Kerangka Uji Toksisitas (LD₅₀) **Error! Bookmark not defined.**
15. Kerangka Uji In-Vivo..... **Error! Bookmark not defined.**
16. (A) Proses Maserasi dan (B) Proses Evaporasi. **Error! Bookmark not defined.**
17. Analisa spektrofotometri massa ekstrak etanol pegagan (*C. asiatica*) pada berat molekul antara 400 - 1000 m/z yang mendeteksi asam madekasik. **Error! Bookmark not defined.**
18. Analisa spektrofotometri massa ekstrak etanol pegagan (*C. asiatica*) pada berat molekul antara 400 - 500 m/z yang mendeteksi asam asiatik. **Error! Bookmark not defined.**
19. Analisa spektrofotometri massa ekstrak etanol pegagan (*C. asiatica*) pada berat molekul antara 900 - 1000 m/z yang mendeteksi asiaticosida **Error! Bookmark not defined.**
20. Larutan DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) **Error! Bookmark not defined.**



21. Kurva Regresi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Pegagan **Error! Bookmark not defined.**

22. Uji LC₅₀ Herbisida Roundup pada Ikan Mas.... **Error! Bookmark not defined.**

23. Perlakuan LD50 Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)..... **Error! Bookmark not defined.**

24. Perlakuan uji in-vivo ikan mas..... **Error! Bookmark not defined.**

25. (A) Organ Hati Ikan Mas, dan (B) homogenat. **Error! Bookmark not defined.**

26. Hasil Pengukuran Kadar MDA pada Organ Hati Ikan Mas. **Error! Bookmark not defined.**

27. (A) Organ Hati Ikan Mas, (B) Homogenat..... **Error! Bookmark not defined.**

28. Hasil Pengukuran Kadar SOD pada Organ Hati Ikan Mas. **Error! Bookmark not defined.**



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
-------	---------

- | | |
|--|------------------------------|
| 1. Penelitian terdahulu yang menggunakan herbisida Isopropilamina glifosat dan ekstrak pegagan (<i>Centella asiatica</i>)..... | Error! Bookmark not defined. |
| 2. Desain Penelitian..... | Error! Bookmark not defined. |
| 3. Susunan RAL dengan Pola Faktorial..... | Error! Bookmark not defined. |
| 4. Analysis of Varian (ANOVA)..... | Error! Bookmark not defined. |
| 6. Perubahan Warna pada Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)..... | Error! Bookmark not defined. |
| 7. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)..... | Error! Bookmark not defined. |
| 8. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Pegagan | Error! Bookmark not defined. |
| 9. Data Mortalitas Ikan Mas pada Uji Pendahuluan | Error! Bookmark not defined. |
| 10. Data Mortalitas Ikan Mas pada Uji Toksisitas Akut Herbisida Roundup | Error! Bookmark not de |
| 11. Pengamatan Tingkah Laku Ikan Mas pada Uji LC ₅₀ Herbisida Roundup | Error! Bookmark not d |
| 12. Kisaran Pengukuran Kualitas Air pada Uji LC ₅₀ Herbisida Roundup | Error! Bookmark not defin |
| 13. Data Mortalitas Ikan Mas pada Uji LD ₅₀ Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)..... | Error! Bookmark not defined. |
| 14. Pengamatan Tingkah Laku Ikan Mas pada Uji LD ₅₀ Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)..... | Error! Bookmark not defined. |
| 15. Kisaran Pengukuran Kualitas Air pada Uji LD ₅₀ Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)..... | Error! Bookmark not defined. |
| 16. Data Mortalitas Ikan Mas pada Uji In-Vivo | Error! Bookmark not defined. |
| 17. Kisaran Pengukuran Kualitas Air pada Uji In-Vivo Ikan Mas | Error! Bookmark not defined. |
| 18. Data Hasil Pengukuran Kadar MDA pada Hati Ikan Mas | Error! Bookmark not defined. |
| 19. Data Hasil Pengukuran Kadar SOD pada Hati Ikan Mas | Error! Bookmark not defined. |
| 20. <i>Tests of Between-Subjects Effects</i> | Error! Bookmark not defined. |



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

Halaman

- 1. Uji Antioksidan..... **Error! Bookmark not defined.**
- 2. Perhitungan Pengenceran Herbisida *Roundup* pada Uji Pendahuluan..... **Error! Bookmark not defined.**
- 3. Tabel Skala Rand..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4. Tabel Transformasi Probit..... **Error! Bookmark not defined.**
- 5. Perhitungan $LC_{50-96jam}$ dengan Analisa Probit.... **Error! Bookmark not defined.**
- 6. Bagan Fix Dose Procedure (OECD 420)..... **Error! Bookmark not defined.**
- 7. Perhitungan dosis pada Uji LD_{50} **Error! Bookmark not defined.**
- 8. Perhitungan dosis pada Uji In-Vivo..... **Error! Bookmark not defined.**

GLOSARIUM

ISTILAH	KETERANGAN
Antioksidan	Suatu zat yang jika ada pada konsentrasi rendah dibandingkan dengan substrat yang dapat dioksidasi, dapat mencegah oksidasi substrat tersebut. Antioksidan dapat mengurangi dan bahkan mencegah kerusakan sel dengan menetralkan radikal bebas sebelum radikal tersebut menyerang sel sehingga mencegah kerusakan lemak, protein, enzim, karbohidrat, dan DNA.
Bahan aktif	Senyawa kimia atau bahan bioaktif lainnya (mikroorganisme, ekstrak tumbuhan, dsb.) yang mempunyai efek pestisida (<i>pesticidal effect</i>), yakni meracuni atau efek biologi (<i>biological effect</i>).
Biomarker	Semua zat, struktur, atau proses yang bisa diukur dalam tubuh atau produk-produk serta pengaruhnya atau memprediksikan kejadian dampak atau penyakit. Biomarker bisa dikelompokkan sebagai penanda keterpaparan, penanda efek, dan penanda kerentanan.
Degradasi	Kemunduran, kemerosotan, penurunan, dan sebagainya.
Dosis	Jumlah sediaan uji yang diberikan, ditulis sebagai berat (mg, g) sediaan uji per bobot badan hewan uji (misal: g/kg).
Gastrointestinal	Serangkaian organ muskular berongga yang dilapisi oleh membran mukosa (selaput lendir). Saluran gastrointestinal adalah jalur panjang yang total panjangnya mencapai 23 sampai 26 kaki, yang berjalan dari mulut melalui esofagus, lambung dan usus sampai anus.
Hepatoprotektor	Suatu senyawa atau zat yang berkhasiat melindungi sel sekaligus memperbaiki jaringan hati yang rusak akibat pengaruh zat toksik/
Hepatotoksikan	Suatu zat atau senyawa yang menyebabkan penyakit pada hati.
Herbisida	Suatu senyawa yang digunakan menghambat pertumbuhan gulma dan rumput yang tidak diinginkan pada lingkungan pertanian, industri, perkotaan, kehutanan dan perairan.



ISTILAH	KETERANGAN
In vivo	Suatu pengujian yang dilakukan didalam tubuh makhluk hidup, seperti hewan uji.
Makromolekul	Molekul yang sangat besar. Polimer baik itu alami maupun sintetik merupakan makromolekul, misalnya hemoglobin. Beberapa senyawa non-polimer juga ada yang termasuk ke dalam makromolekul, misalnya lipid.
MDA	Malondialdehid; senyawa organik dengan rumus $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$. MDA merupakan senyawa reaktif yang terbentuk secara alami dan merupakan penanda stres oksidatif.
Non Polar	Senyawa yang terbentuk akibat adanya suatu ikatan antar elektron pada unsur-unsur yang membentuknya. Hal ini terjadi karena unsur yang berkaitan mempunyai nilai elektronegatifitas yang sama/hampir sama.
Peroksidasi lipid	Makromolekul yang paling rentan terserang radikal bebas salah satunya adalah lipid. Kerusakan makromolekul ini terjadi ketika radikal bebas bereaksi dengan asam lemak tak jenuh (PUFA) yang pada akhirnya menyebabkan peroksidasi lipid.
Polar	Senyawa yang terbentuk akibat adanya suatu ikatan antar elektron pada unsur-unsurnya. Sebuah Molekul dikatakan polar jika memiliki muatan positif dan negatif.
polutan	Bahan/benda yang menyebabkan pencemaran, baik secara langsung maupun tidak langsung, seperti sampah.
Proliferasi sel	pertumbuhan yang disebabkan oleh pembelahan sel yang aktif dan bukan disebabkan karena penambahan ukuran sel.
Radikal bebas	Suatu atom atau molekul yang mempunyai satu elektron atau lebih yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya
SOD	Superoksida dismutase; antioksidan endogen yang dapat ditemukan pada berbagai jaringan tubuh. SOD berperan penting dalam melindungi sel terhadap gangguan oksidan (stres oksidatif), yang dapat menyebabkan terjadinya beberapa penyakit degenerasi.



ISTILAH	KETERANGAN
Surfaktan	Surfaktan bukanlah zat tunggal dan mungkin berisi campuran suatu bahan untuk memberikan sifat yang diinginkan.
Toksikologi	Ilmu yang mempelajari tentang efek merugikan berbagai bahan kimia dan fisik pada semua sistem kehidupan.
Toksitas akut	Uji toksitas akut (seperti uji LD50) dirancang untuk menentukan dosis mematikan dari bahan uji
Xenobiotik	Berasal dari bahasa Yunani: Xenos yang artinya asing dan biotik yang artinya makhluk hidup. Jadi Xenobiotik adalah zat asing yang masuk dalam tubuh manusia. Contohnya: obat, obatan, insektisida, zat kimia tambahan pada makanan (pemanis, pewarna, pengawet) dan zat karsinogen lainnya

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Herbisida dengan bahan aktif isopropilamina glifosat merupakan herbisida non-selektif yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan gulma dan rumput yang tidak diinginkan pada lingkungan pertanian, industri, perkotaan, kehutanan dan perairan (Çavas dan Könen, 2007). Telah diketahui bahwa beberapa daerah tersebut seperti daerah pertanian dan kehutanan letaknya sangat dekat dengan ekosistem perairan. Oleh karena itu ekosistem perairan sangat mungkin untuk terkontaminasi herbisida. Herbisida ini dapat masuk ke dalam ekosistem perairan melalui beberapa jalur. Jalur utama kontaminasi herbisida pada perairan adalah melalui air limpasan air hujan dan udara (Banaee *et al*, 2013). Organisme yang hidup di dalam ekosistem perairan merupakan organisme non target yang dapat dipengaruhi oleh kontaminasi herbisida. Di perairan, herbisida dapat diserap melalui insang, kulit dan sistem pencernaan kemudian didistribusikan ke berbagai jaringan melalui darah (Banaee *et al*, 2015).

Herbisida yang mengandung bahan aktif isopropilamina glifosat dapat menyebabkan akumulasi *Reactive Oxygen Species* (ROS), yang menyebabkan stres oksidatif pada organisme (Fan *et al*. 2013). Stres oksidatif terjadi akibat tidak seimbangnya radikal bebas dengan antioksidan di dalam tubuh, dimana jumlah radikal bebas lebih banyak bila dibandingkan dengan antioksidan. Jika produksi radikal bebas melebihi kemampuan antioksidan intrasel untuk menetralkannya maka kelebihan radikal bebas sangat potensial menyebabkan kerusakan sel (Halliwell, 2006). Peroksidasi lipid merupakan salah satu akibat dari tingginya radikal bebas di dalam membran sel. Membran sel akan mengalami gangguan fluiditas dan permeabilitas serta gangguan aktivitas enzim dan fungsi protein (Sharma *et al*, 2012). Salah satu hasil dari peroksidasi lipid



adalah malondialdehid (MDA) yang dapat disebabkan oleh latihan fisik maksimal atau latihan daya tahan dengan intensitas tinggi. Oleh karena itu, MDA diukur sebagai penanda umum yang digunakan untuk menentukan jumlah radikal bebas (Niedernhofer *et al*, 2003).

Tubuh organisme sebenarnya memiliki sistem pertahanan alami berupa enzim yang berfungsi untuk menetralkan dan mempercepat degradasi senyawa radikal bebas sehingga dapat mencegah kerusakan komponen makromolekul sel. Sistem ini dibagi dalam dua kelompok besar yaitu: sistem pertahanan preventif seperti enzim superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan glutation peroksidase (GPx) dan sistem pertahanan melalui pemutusan reaksi radikal seperti isoflavon, vitamin A, vitamin C, dan vitamin E (Valko *et al*, 2007). Keseimbangan antara enzim-enzim ini merupakan proses penting untuk menghilangkan stres oksidatif secara efektif pada organel intraselular (Andrew dan Mathew, 1989).

Menurut Chandrasekara dan Pathirantne (2005), aktivitas enzim dapat digunakan sebagai biomarker untuk penilaian kontaminasi pestisida di dalam air. Superoksida dismutase (SOD) merupakan enzim utama untuk menangkap ROS yang terbentuk serta mengurangi kerusakan sel akibat radikal bebas. SOD bertanggung jawab untuk mengkatalisis konversi anion superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) (Sumitra *et al*, 2001). Modesto dan Martinez (2010) yang menunjukkan bahwa paparan akut terhadap Roundup merangsang jalur biotransformasi, dengan meningkatkan aktivitas GST, dan mengganggu pertahanan antioksidan *Prochilodus lineatus*, dengan mengurangi aktivitas SOD dan GPx. Pertahanan antioksidan hewani tidak mampu menetralkan ROS yang diproduksi selama proses biotransformasi sehingga menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid. Dengan demikian, paparan herbisida glifosat terhadap *Prochilodus lineatus* menyebabkan situasi stres oksidatif. Selain itu, Costa *et al*.



(2008) mengamati bahwa aktivitas SOD meningkat pada hati kecebong yang terkena paparan Roundup, sedangkan ikan *Cyprinus carpio* mengalami peningkatan SOD setelah terpapar diazinon selama 5 hari (Oruc, 2010).

Saat ini telah banyak digunakan berbagai bahan alami untuk penelitian farmakologi dan toksikologi, oleh karena itu digunakan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) yang diharapkan dapat meningkatkan aktivitas enzim SOD di dalam tubuh serta dapat membantu pemutusan reaksi radikal di dalam tubuh ikan yang dipapar herbisida isopropilamina glifosat. Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tumbuhan herba yang termasuk dalam famili *Apiaceae*. Senyawa bioaktif utama yang terkandung dalam *Centella asiatica* adalah triterpenoid, termasuk asiaticoside, madecassoside, asam asiatic, dan asam madecassic (James dan Dubery, 2011). Flavonoid, glikosida, alkaloid, steroid, minyak atsiri dan lemak juga ditemukan di tanaman ini dan menunjukkan berbagai aktivitas biologis (Subban et al, 2008). Mengingat kurangnya penelitian tentang efek ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) terhadap potensi racun herbisida Isopropilamina glifosat pada ikan mas (*Cyprinus carpio*), maka tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui bagaimana aktivitas antioksidan dari ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang dipapar herbisida Isopropilamina glifosat.

Kregel dan Zhang (2006) menyatakan bahwa kerusakan oksidatif sebagai akibat dari radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan sel, jaringan, dan organ seperti hati, ginjal, dan jantung baik pada manusia maupun hewan. Kerusakan ini dapat menyebabkan kematian sel sehingga lebih cepat menimbulkan berbagai penyakit degeneratif. Menurut Mohamed (2009), hati merupakan organ vital dan memiliki banyak fungsi penting, termasuk metabolisme dan detoksifikasi hepatotoksik, serta menjadi sasaran peningkatan konsentrasi radikal bebas.

Parameter biokimia pada hati ikan sangat sensitif untuk mendeteksi efek



samping dari kerusakan yang diakibatkan oleh polutan. Hati dianggap sebagai organ sentral metabolisme xenobiotik pada ikan dan merupakan organ target yang terkena paparan racun. Oleh karena itu, organ hati digunakan sebagai biomarker atau penanda akibat adanya xenobiotik.

1.2 Rumusan Masalah

Herbisida digunakan dengan cara disemprotkan untuk membasmi gulma. Berbagai lahan pertanian mengandalkan herbisida glifosat, dan para petani sejauh ini merupakan pengguna terbesar dari herbisida. Akibat tingginya penggunaan herbisida glifosat serta penggunaan yang tidak mengikuti panduan, muncul beberapa efek negatif terhadap organisme yang bukan target seperti organisme pada ekosistem perairan. Penggunaan herbisida dengan menggunakan alat semprot, cara pencucian, penyimpanan, serta pembuangan yang tidak tepat dapat menyebabkan permukaan tanah dan air tanah terkontaminasi. Pada ekosistem perairan, meningkatnya konsentrasi herbisida dapat menyebabkan penurunan kepadatan dan hilangnya keanekaragaman hayati biota perairan. Salah satu mekanisme yang mungkin terjadi akibat dari toksisitas herbisida adalah stres oksidatif. Ketidakmampuan organisme dalam mengatasi stres oksidatif tersebut menimbulkan pemikiran bahwa dibutuhkan suplemen tambahan agar dapat meningkatkan sistem pertahanan tubuh ikan. Berdasarkan penelitian-penelitian sebelumnya, tanaman pegagan memiliki sifat antioksidan yang tinggi, oleh karena itu digunakan ekstrak dari tanaman pegagan agar dapat meningkatkan aktivitas enzim SOD sebagai enzim yang bertugas untuk menangkap radikal bebas. Berdasarkan permasalahan tersebut, maka didapatkan perumusan masalah sebagai berikut:

1. Apa saja bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) yang berfungsi sebagai antioksidan?



2. Bagaimana ekspresi MDA sebagai biomarker oksidatif stres dan SOD sebagai hepatoprotektor pada ikan mas yang terpapar herbisida glifosat dengan penambahan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*)?

3. Berapa dosis terbaik ekstrak (*Centella asiatica*) yang dapat meningkatkan enzim SOD sebagai hepatoprotektor pada ikan mas yang terpapar herbisida isopropilamina glifosat?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian mengenai Antioksidan dari Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) sebagai Hepatoprotektor pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) yang Mengalami Stres Oksidatif Akibat Pemaparan Herbisida Berbahan Aktif Isopropilamina Glifosat adalah:

1. Untuk mengidentifikasi bahan aktif yang berfungsi sebagai antioksidan pada ekstrak pegagan (*Centella asiatica*).

2. Untuk mengetahui ekspresi MDA sebagai biomarker oksidatif stres dan SOD sebagai hepatoprotektor pada ikan mas yang terpapar herbisida glifosat dengan penambahan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*)?

3. Untuk mengetahui dosis terbaik ekstrak (*Centella asiatica*) yang dapat meningkatkan enzim SOD sebagai hepatoprotektor pada ikan mas yang terpapar herbisida isopropilamina glifosat?

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Manfaat yang dapat diambil bagi peneliti atau lembaga ilmiah adalah sebagai sumber informasi keilmuan dan dasar untuk penulisan ataupun penelitian lebih lanjut tentang aktivitas antioksidan dari ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang terkontaminasi



Herbisida Glifosat, dilihat dari kadar MDA sebagai penanda stres oksidatif dan aktivitas enzim SOD sebagai enzim antioksidan pada organ hati.

1.4.2 Manfaat Praktis

Manfaat bagi pihak pemerintah adalah sebagai informasi dan bahan pertimbangan tentang kemampuan ekstrak tumbuhan pegagan (*Centella asiatica*) terhadap biota perairan yang terkena bahan pencemar, sehingga dapat dilakukan *treatment* pada biota perairan yang terkena kontaminasi secara berkala. Bagi masyarakat umum, khususnya para petani, sebagai informasi akan pentingnya menjaga lingkungan dengan cara mengikuti prosedur penggunaan herbisida secara tepat sehingga tidak mencemari biota perairan yang berguna bagi ekosistem.

1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi dan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Laboratorium Eksplorasi Sumberdaya Perikanan dan Kelautan, Laboratorium Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Sentral Biomedik serta Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Mei - Agustus 2018.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Ikan mas biasanya hidup di bagian tengah dan hilir sungai serta pada perairan yang dangkal. Suhu pertumbuhan optimal ikan mas diantara 25-30°C namun ikan ini juga dapat bertahan pada musim dingin. Salinitas yang dapat ditoleransi oleh ikan mas sekitar 5 ‰ dan pH optimal untuk kehidupannya antara 6,5 - 9,0. Ikan mas juga mampu bertahan dalam tingkat konsentrasi oksigen yang rendah, antara 0,3 - 0,5 mg/l (Svasand *et al*, 2007). Taksonomi ikan mas (*Cyprinus carpio*) menurut Strange dan Mayden (2009) termasuk ke dalam :

Kingdom : Animalia
 Phylum : Chordata
 Class : Teleostei
 Order : Cypriniformes
 Family : Cyprinidae
 Genus : *Cyprinus* Linnaeus, 1758
 Species : *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758

2.1.1 Morfologi dan Anatomi

Ikan mas memiliki bentuk tubuh yang agak memanjang dan memipih tegak (*compressed*). Mulutnya dapat disembulkan (*protaktil*) serta terletak di ujung tengah (*terminal*). Bagian anterior atau atas mulut terdapat dua pasang sungut. Bagian ujung dalam mulut terdapat gigi kerongkongan (*pharyngeal teeth*) yang tersusun atas tiga baris gigi geraham (Khairuman *et al*, 2008). Ikan yang bertipe sisik *cycloid* ini memiliki sisik yang relatif besar dan letaknya beraturan. *Linea lateralis* ikan mas terletak di tengah tubuh dengan posisi melintang dari



tutup insang sampai ke ujung belakang (Tim Lentera, 2002). Ciri-ciri morfologi

ikan mas tersebut juga sesuai dengan Pudjirahaju, *et al.* (2008) yaitu:

1. Warna sisik hijau kehitaman dengan bagian perut berwarna putih.
2. Mata agak menonjol.
3. Gerakan lamban dan jinak.
4. Badan relatif paling pendek dari ras strain yang lain dengan punggung tinggi.

Menurut Farag *et al.* (2014) yang menginvestigasi anatomi internal dari ikan mas, sistem pencernaan ikan mas terdiri dari mulut, rongga mulut, faring, esofagus, saluran usus, hati dan limpa. Sistem pencernaannya terdiri dari insang, operkulum, dan gelembung renang sedangkan sistem urogenitalnya terdiri dari ginjal (*head kidney* dan *trunk kidney*) serta gonad. Ikan mas memiliki panjang usus yang melebihi panjang tubuhnya. Melalui pengukuran yang telah dilakukan, diketahui bahwa tubuh ikan Mas memiliki panjang baku 19 cm sedangkan panjang ususnya mencapai 50 cm atau hampir tiga kali lipat dari panjang tubuhnya (Santoso, 1993). Gambaran morfologi ikan mas dapat dilihat pada **Gambar 1**.



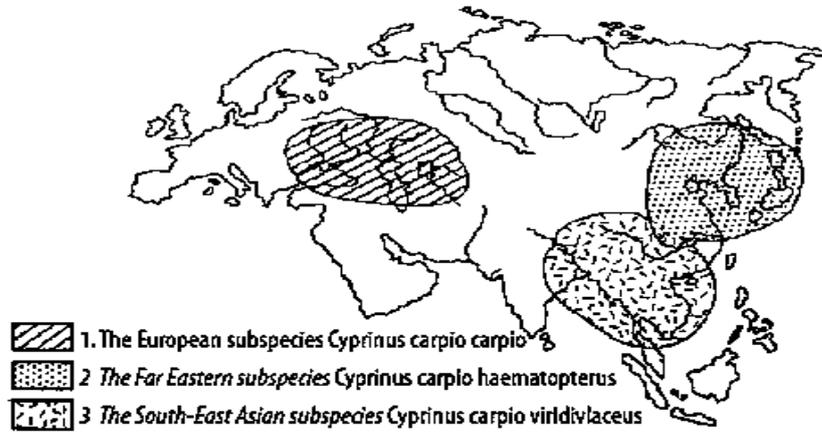
Gambar 1. Morfologi Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) (Farag *et al.*, 2014)

2.1.2 Distribusi dan Habitat

Svasand *et al.* (2007) menggolongkan ikan mas berdasarkan distribusi atau penyebarannya. Ikan mas secara garis besar dibagi atas 2 sub-spesies, yaitu *Cyprinus carpio* yang berasal dari Eropa dan *Cyprinus carpio*



haematopterus yang berasal dari Asia. Ikan mas yang berasal dari Asia sendiri dibagi menjadi 2 grup, yaitu kelompok Asia tengah dan Asia tenggara. Penyebaran ikan mas di Benua Eropa dan Asia dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Kisaran populasi ikan mas liar di Eurasia (Svasand *et al*, 2007)

Habitat ikan mas adalah perairan tawar seperti sungai atau danau. Ciri dari perairan tersebut adalah tidak terlalu dalam dan memiliki aliran yang tenang. Ikan mas tumbuh menyukai daerah dengan ketinggian 150-600 meter di atas permukaan laut (dpl). Pertumbuhan optimalnya pada suhu 25-30°C. Ikan omnivora ini terkadang juga dapat hidup pada muara sungai yang berair payau dengan salinitas antara 25-30 ‰ (Khairuman, 2013).

2.1.3 Kebiasaan Makan

Ikan mas termasuk hewan omnivora, dengan kecenderungan memakan organisme bentik, seperti serangga air, larva serangga, cacing, moluska, dan zooplankton. Selain itu, ikan mas tersebut mengkonsumsi tangkai, daun dan biji tanaman air dan terestrial, tanaman air yang membusuk (Svasand *et al*, 2007). Menurut Cahyono (2000), makanan utama ikan mas adalah hewan kecil yang hidup di dasar perairan (*bottom feeder*), seperti larva *Chironomidae*, *Oligochaeta*, *Tubificidae*, *Epememidae*, *Trichoptera*, dan *Mollusca*. Cara makan hewan-hewan kecil tersebut dilakukan dengan cara



mengambil lumpur, menyeleksi, dan mengisap bagian yang dapat dimakan dan jasad yang tidak dapat dimakan dikeluarkan lagi.

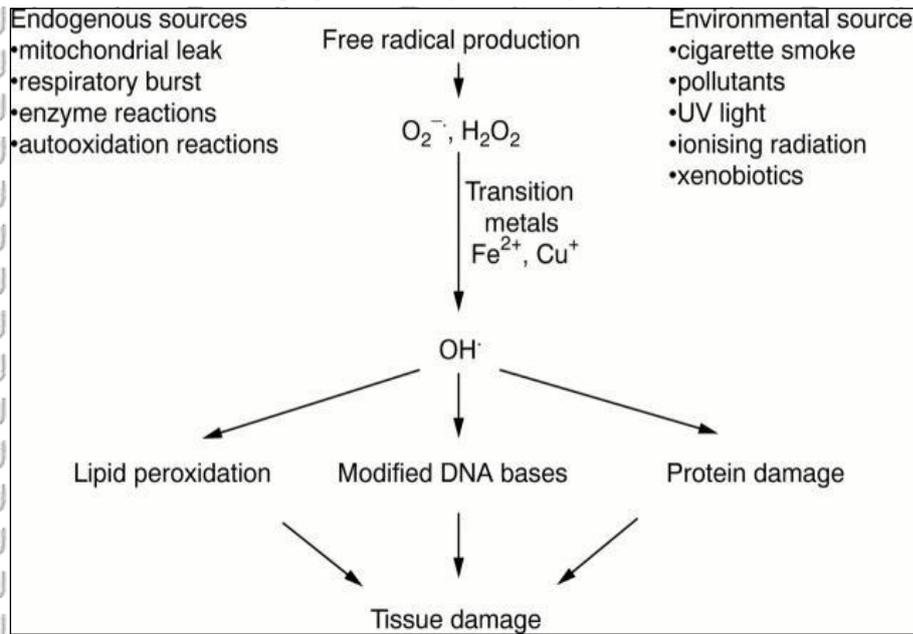
Ikan yang termasuk pemakan segala ini saat muda memakan zooplankton dan larva-larva yang hidup didasar perairan seperti larva chironomus, cacing oligochaeta, tubifex, serta berbagai jenis moluska. Pakan tambahan dibutuhkan setelah ikan mas tumbuh besar. Pakan tambahan ini dapat berasal dari pakan buatan yang memiliki kadar protein sekitar 25-30% (Tim Agriminakultura, 2014).

2.2 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan sekelompok zat kimia yang sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan (Halliwell, 2006). Hidrogen peroksida (H_2O_2), anion superoksida (O_2^-), dan radikal hidroksil (OH) merupakan radikal bebas atau spesies oksigen reaktif (ROS) (Ahmad *et al*, 2000; Harish dan Murugan, 2011). Clarkson dan Thompson (2000) menjelaskan bahwa radikal bebas merupakan suatu atom atau molekul yang mempunyai satu elektron atau lebih yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Atom ini bersifat sangat reaktif sehingga bereaksi secara cepat dengan atom lain untuk mengisi orbital yang tidak berpasangan. Jika radikal bebas tidak dapat dinetralisir, maka dapat merusak seluruh tipe makromolekul seluler, seperti karbohidrat, protein, lipid dan asam nukleat. Molekul yang terambil elektronnya akan menjadi radikal bebas yang baru.

Menurut Young dan Woodside (2001), pembentukan radikal dalam tubuh terjadi oleh beberapa mekanisme yang melibatkan faktor endogen dan lingkungan. Faktor endogen yang mempengaruhi terbentuknya radikal bebas di dalam tubuh adalah produk samping proses metabolisme maupun karena paparan yang masuk melalui pernafasan sehingga tersebar ke seluruh tubuh.

Selain faktor endogen tersebut, terdapat faktor lingkungan yang memicu timbulnya radikal bebas, yaitu asap rokok, polutan, sinar UV, radiasi dan xenobiotik. Radikal bebas menyebabkan kerusakan membran lipid, DNA, dan protein sehingga menyebabkan kerusakan jaringan (**Gambar 3**).



Gambar 3 Sumber utama radikal bebas dalam tubuh dan konsekuensi dari kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas. Radikal bebas dapat menyebabkan LPO, kerusakan DNA dan protein sehingga menyebabkan kerusakan jaringan (Young dan Woodside, 2001).

Kerusakan sel atau jaringan akibat adanya radikal bebas dapat menimbulkan penyakit degeneratif, seperti penyakit autoimun, hingga kanker (Salamah *et al*, 2015). Makromolekul yang paling rentan terserang radikal bebas salah satunya adalah lipid. Kerusakan makromolekul ini terjadi ketika radikal bebas bereaksi dengan asam lemak tak jenuh (PUFA) yang pada akhirnya menyebabkan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan reaksi berantai yang memberikan pasokan radikal bebas secara terus-menerus yang menginisiasi peroksidasi lebih lanjut (Shahidi dan Ambigaipalan, 2015).



2.3 Antioksidan

Antioksidan merupakan suatu zat yang jika ada pada konsentrasi rendah dibandingkan dengan substrat yang dapat dioksidasi, dapat mencegah oksidasi substrat tersebut (Flora *et al*, 2012). Antioksidan dapat mengurangi dan bahkan mencegah kerusakan sel dengan menetralkan radikal bebas sebelum radikal tersebut menyerang sel sehingga mencegah kerusakan lemak, protein, enzim, karbohidrat, dan DNA (Fang *et al*, 2002). Untuk menetralkan ROS, hewan memiliki mekanisme pertahanan antioksidan yang terdiri dari enzim superoxide dismutase (SOD), katalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), dan glutathione reductase (GR), serta antioksidan non-enzimatik yakni glutathione (GSH). Ketika pertahanan organisme tidak cukup untuk menetralkan ROS, kerusakan oksidatif dapat terjadi salah satu jenis yang paling serius adalah peroksidasi lipid (Scandalios, 2005). Aktivitas enzim antioksidan, serta terjadinya kerusakan oksidatif, telah diusulkan sebagai indikator stres oksidatif yang disebabkan oleh polutan (Ahmad *et al*, 2000; Li *et al*, 2003). Saat antioksidan yang berada di dalam tubuh tidak mampu menyeimbangkan konsentrasi radikal bebas maka antioksidan sekunder dibutuhkan tubuh untuk menjaga homeostasis antara radikal bebas dan antioksidan. Hal ini tentunya dapat mencegah berbagai efek buruk, seperti toksisitas logam berat, inflamasi, kanker, penuaan, gangguan kardiovaskular dan otak (Willcox *et al*, 2004).

Sekarang ini sumber alami yang memiliki sifat antioksidan dipercaya lebih aman untuk kesehatan dibandingkan dengan antioksidan sintesis. Beberapa tanaman telah dilaporkan memiliki potensi sebagai sumber antioksidan alami, seperti ekstrak bekatul (Arab *et al*, 2011), ekstrak etanol daun serai (Hasim *et al*, 2015) dan buah naga (Cho dan Yong, 2011). Senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan seperti vitamin C dan E, karotenoid (karoten dan xantofil), dan



polifenol (flavonoid, asam fenolik, lignan dan stilbenes) dapat memenuhi kebutuhan antioksidan di dalam tubuh (Oroian dan Escriche, 2015).

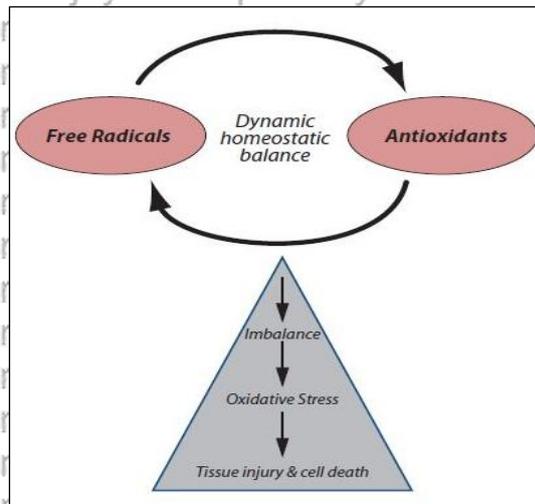
Secara umum, Flora *et al.* (2012) mengelompokkan antioksidan alami sesuai dengan mekanisme tindakannya, yaitu antioksidan utama atau pemutusan rantai radikal (*chain-breaking antioxidant*) dan antioksidan sekunder atau preventif. Antioksidan alami primer merupakan senyawa yang mampu mengikis radikal bebas melalui pemutusan reaksi berantai. Hal ini dilakukan dengan cara memberikan elektron bebas pada ROS dan radikal lipid sehingga sifatnya menjadi stabil. Proses ini menunda proses oksidasi dan mencegah peroksidasi lipid yang nantinya dapat menyebabkan kerusakan membran (Flora *et al.*, 2012). Antioksidan utama yang umum termasuk flavonoid, tokoferol dan asam askorbat (Vaya dan Aviram, 2000). Selain itu, terdapat antioksidan sekunder yang bertugas memperlambat laju reaksi oksidasi, seperti vitamin E, vitamin C, β -karoten, isoflavon, bilirubin dan albumin (Wanasundara dan Shahidi, 2005).

2.4 Stres Oksidatif

Stres oksidatif merupakan ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dan kemampuan sistem biologis tubuh untuk segera mendetoksifikasi atau memperbaiki kerusakan yang diakibatkannya (Flora, 2012). Hal ini dapat merusak lipid, protein, dan asam nukleat. Partikel atau membran lipoprotein yang mengalami proses peroksidasi lipid menghasilkan berbagai produk termasuk aldehida rantai pendek seperti malondialdehida, alkana dan alkena, diena terkonjugasi, dan berbagai hidroksida dan hidroperoksida. Produk-produk ini dapat digunakan sebagai penanda peroksidasi lipid (Young dan Woodside, 2001).



Peroksidasi lipid pada kebanyakan kasus merupakan fenomena sekunder, karena tidak secara langsung menunjukkan peran penting untuk stres oksidatif pada penyakit yang bersangkutan. Harus ada mekanisme dimana peningkatan produksi radikal bebas atau penurunan pertahanan antioksidan dapat terjadi. Selain itu, bukti stres oksidatif harus dapat dideteksi sebelum terjadi kerusakan jaringan. Penambahan status antioksidan pada tahap awal harus dilakukan untuk mencegah atau mengurangi kerusakan jaringan (Young dan Woodside, 2001). Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kerusakan jaringan, antara lain: target molekuler, tingkat stres yang terjadi, mekanisme yang terlibat, serta waktu dan sifat alami dari sistem yang diserang (Winarsi, 2007). Mekanisme terjadinya stres oksidatif dapat dilihat pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Proses terjadinya stres oksidatif. Dalam kondisi fisiologis normal, ada keseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan dan jika terjadi penyimpangan maka dapat menyebabkan stres oksidatif yang menyebabkan kerusakan jaringan dan kematian sel (Flora, *et al*, 2012).

2.5 Herbisida Roundup dengan Bahan Aktif Isopropilamina Glifosat

herbisida Roundup berbentuk cair namun pekat dan berwarna kuning kecoklatan yang mudah larut dalam air. Cara kerja herbisida Isopropilamina glifosat bersifat sistemik, yakni dapat mematikan seluruh bagian gulma



2.5.1 Degradasi Herbisida di Tanah dan Lingkungan Perairan

Herbisida dapat masuk ke badan air seperti aliran air alami (sungai, anak sungai, sungai), saluran drainase dan kolam drainase, lahan basah alami, kolam, laguna, waduk dan danau melalui penyemprotan langsung (EPA, 2017). Herbisida juga dapat mengkontaminasi perairan melalui aplikasi di darat yang kemudia terkena limpasan atau pencucian air permukaan, dan menuju ke lingkungan perairan terdekat. Hal ini telah dibuktikan oleh laporan yang menunjukkan adanya residu glifosat dalam air yang berasal dari penyemprotan yang berlebihan dalam operasi kehutanan, juga dari limpasan dan dari pembuangan saluran irigasi (WHO, 2005). Keberadaan pestisida dalam perairan laut umumnya terbawa oleh aliran sungai dan dari atmosfer yang jatuh bersamaan dengan hujan dan sebagian besar disumbangkan dari aktifitas pertanian (Clark, 2002).

Waktu degradasi herbisida merupakan waktu yang diperlukan bagi herbisida untuk mencapai setengah dari konsentrasi awal. Pada tanah, waktu paruh glifosat kurang lebih adalah 47 hari (Vencill, 2002). Glifosat memiliki potensi rendah untuk mencemari air tanah karena sifat adsorptif yang kuat. Namun, herbisida ini berpotensi untuk mengkontaminasi air permukaan dari penggunaan air dari glifosat dan erosi tanah. Penguapan glifosat diperkirakan tidak akan signifikan karena tekanan uap yang rendah (EPA, 1993). Tanah dan kondisi iklim mempengaruhi persistensi glifosat di tanah (EPA, 1993).

Kandungan herbisida, baik di dalam tanah maupun di dalam air akan mengalami degradasi seiring waktu. Saat badan air terkontaminasi herbisida glifosat, maka waktu degradasi glifosat terjadi mulai dari beberapa hari sampai 91 hari (bervariasi) (Tomlin, 2006). Degradasi terjadi lebih cepat pada kondisi aerobik dibandingkan dalam kondisi anaerob. Waktu paruh untuk biodegradasi



dalam tanah sangat bervariasi dan berkisar antara beberapa hari dan beberapa bulan; di dalam air antara 12 jam sampai 7 minggu (WHO, 2005).

2.5.2 Toksisitas Akut Glifosat dan Roundup

Selain bahan aktif, herbisida memiliki kandungan lain yang sebenarnya memiliki fungsi untuk membasmi. Bahan tersebut disebut *inert* (surfaktan).

Tujuannya adalah untuk memfasilitasi penggunaan produk atau untuk membuatnya lebih efisien. Biasanya senyawa *inert* tidak diidentifikasi dalam label pestisida (Ghisi, 2012). Herbisida *Roundup* adalah formulasi komersial yang mengandung glifosat [N-(fosfonometil) glisin] sebagai bahan aktif dan Polyoxyethyleneamine (POEA) sebagai surfaktan (Guilherme *et al*, 2010).

Surfaktan mengurangi tegangan permukaan dan meningkatkan penetrasi glifosat dalam jaringan tanaman. Surfaktan bukanlah zat tunggal dan mungkin berisi campuran suatu bahan untuk memberikan sifat yang diinginkan pada setiap formulasi komersial herbisida glifosat (Micah, 2015). Menurut Diamond dan Durkin (1997), surfaktan yang terdapat pada herbisida *Roundup* dengan bahan aktif glifosat sebesar 15% atau 150 g/l. Hal ini diasumsikan bahwa nilai 15% mengacu pada berat per satuan volume. Surfaktan *Roundup* merupakan turunan dari lemak, campuran kompleks lemak dari jaringan lemak sapi atau domba. Untuk organisme air, surfaktan jauh lebih beracun dari glifosat. Tidak seperti glifosat, POEA lebih beracun di dalam air alkali dari pada di dalam air asam. Dengan demikian, potensi relatif POEA terhadap glifosat tergantung pH

Toksisitas akut glifosat tidak menyerang organ target yang spesifik (Bayer, 2013). Beberapa penelitian telah menunjukkan bagaimana toksisitas glifosat maupun herbisida *Roundup* pada biota perairan. Folmar *et al*. (1979) menjelaskan bahwa LC₅₀ glifosat untuk *rainbow trout* (*Onchorynchus mykiss*) adalah 140 mg/l, untuk *fathead minnows* (*Pimephales promelas*) adalah 97



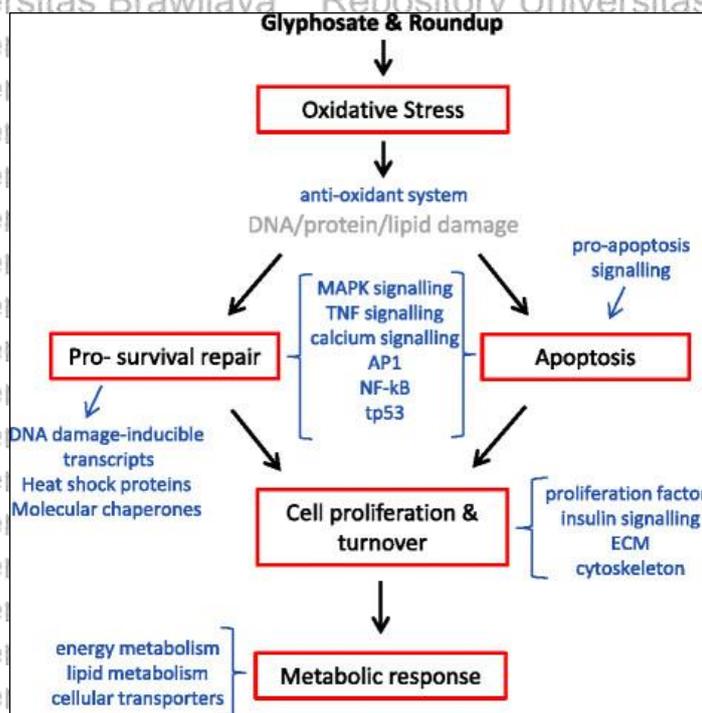
mg/l, untuk ikan lele (*Ictalurus punctatus*) adalah 130 mg/l dan untuk *bluegill sunfish* (*Lepomis macrochirus*) adalah 150 mg/l. Ketika mereka dipapar Roundup, LC₅₀ untuk ikan yang sama berturut-turut adalah 8,3 mg/l, 2,4 mg/l, 13,0 mg/l, dan 6,4 mg/l sedangkan Seyedkolaei *et al.* (2013) juga telah menemukan nilai LC_{50-96jam} Roundup pada *Cyprinus carpio* dengan panjang 10 cm dan berat 41 gram adalah sebesar 22,19 ppm. Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut, dapat disimpulkan bahwa formulasi *Roundup* lebih beracun untuk ikan dibandingkan dengan glifosat murni. Hal ini dapat disebabkan oleh senyawa *inert* (surfaktan) yang berada di dalam formulasi *Roundup*.

2.5.3 *Roundup* sebagai Penyebab Stres Oksidatif dan Hapatotoksikan

Selama proses metabolisme, ROS yang diproduksi secara alami dapat bereaksi dengan makromolekul utama seperti lipid, protein, dan asam nukleat. Dalam kondisi normal, terdapat keseimbangan antara produksi dan pemindahan radikal bebas. Peroksidasi lipid membran sel merupakan faktor utama dalam kerusakan insang dan organ lainnya karena paparan bahan kimia tertentu (Mehrepek *et al.*, 2016). Produksi ROS yang terkait dengan adanya polutan dan pembentukan stres oksidatif merupakan mekanisme toksisitas yang mungkin terjadi pada organisme air yang terpapar herbisida (Oropesa *et al.*, 2008). Beberapa xenobiotik, seperti herbisida, dapat menghasilkan Reactive Oxygen Species (ROS) melalui beberapa mekanisme, seperti gangguan pada transpor elektron di membran mitokondria, inaktivasi enzim antioksidan, penipisan antioksidan non-enzimatik dan membran peroksidasi lipid (Winston dan Di Giulio, 1991).

Konsentrasi ROS yang rendah cenderung menginduksi sinyal pro-survival. Artinya organisme tersebut masih dalam keadaan mampu menetralkan

radikal bebas di dalam tubuhnya, sementara tingkat stres oksidatif dan kerusakan sel yang lebih tinggi dapat meningkatkan apoptosis sebagai mekanisme perlindungan (Martindale dan Holbrook, 2002). Webster dan Santos (2015) telah membuktikan bahwa herbisida Roundup maupun bahan aktifnya, yakni glifosat memiliki efek stres oksidatif pada ikan *brown trout*. Profil transkripsional menunjukkan bahwa paparan glifosat dan Roundup mempengaruhi jalur sinyal yang mengendalikan respons stres seluler. Jalur-jalur ini meliputi jalur MAPK, TNF, Kalsium, AP-1, NF-Kb dan tp53 yang terlibat dalam pengaturan apoptosis sel. Hal ini menunjukkan adanya respons seluler terhadap stres oksidatif. Selain itu, terdapat juga peningkatan proliferasi sel dan terjadi peningkatan proses metabolisme. Mekanisme glifosat dan Roundup dalam menginduksi stres oksidatif dapat dilihat pada **Gambar 6**.



Gambar 6. Skema yang menggambarkan stres oksidatif sebagai mekanisme utama toksisitas glifosat dan Roundup dan proses yang terpengaruh, yang sesuai dengan respons stres sel. Teks biru menunjukkan jalur pensinyalan kunci yang diatur dan kelompok gen fungsional yang terkait dengan setiap proses (Webster dan Santos, 2015).



Herbisida masuk dalam tubuh ikan dapat melalui saluran pencernaan, saluran pernafasan, dan kulit. Pada saluran pencernaan, herbisida yang ada dalam usus akan mengalami proses absorpsi dan distribusi, dengan adanya proses ini mengakibatkan kerusakan pada jaringan ikan. Proses distribusi terjadi dimana pestisida yang ada di usus dibawa oleh peredaran darah vena portal hepatis menuju ke hepar. Di hepar akan terjadi detoksikasi dan akumulasi racun (Rudiyanti dan Ekasari, 2009). Hati memiliki peran sentral yakni sebagai tempat biotransformasi xenobiotik. Oleh karena itu didalamnya terjadi beberapa reaksi oksidatif dan pembentukan radikal bebas. Penelitian yang dilakukan oleh Jasper *et al.* (2012) menunjukkan bahwa terjadi aktivitas antioksidan yang tinggi akibat dari pemaparan glifosat pada jaringan hati tikus. Aktivitas tersebut tampaknya tidak cukup untuk menghindari kerusakan yang dipicu oleh glifosat - Roundup® bahkan pada dosis rendah (50 mg / kg berat badan). Peningkatan lipoperoksidasi dan penurunan kadar tiol non-protein dalam jaringan hati, mendukung hipotesis bahwa efek toksik herbisida dikaitkan dengan kemampuannya untuk menghasilkan ROS.

Konsentrasi radikal bebas yang tidak seimbang dengan antioksidan dapat menimbulkan stres oksidatif pada tubuh. Stres oksidatif dapat menyebabkan peroksidasi lipid sehingga dapat menyebabkan kerusakan sel dan menimbulkan penyakit degeneratif, misalnya penyakit pada hati (Sen *et al.* 2010). Paparan glifosat dan metabolismenya yang terjadi di hati dapat menyebabkan produksi malondialdehid (MDA) berlebihan serta stres oksidatif melalui ROS yang tidak teregulasi (El-Shenawy, 2009). Oleh karena itu, sangat penting mempertahankan keseimbangan antara ROS dan antioksidan di dalam tubuh.



2.6 Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan (*Centella asiatica*) adalah tumbuhan rambat yang dikenal dengan nama *Indian Pennywort*. Tumbuhan ini adalah salah satu tumbuhan herba yang biasanya digunakan untuk menyembuhkan luka, mengobati permasalahan pada kulit serta untuk merevitalisasi syaraf dan sel otak. Berikut adalah klasifikasi Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban.) menurut Gupta (2013):

Kingdom : Plantae
 Division : Tracheophyta
 Class : Magnoliopsida
 Order : Apiales
 Family : Apiaceae
 Genus : *Centella*
 Spesies : *Centella asiatica* (L.) Urban

Pegagan tumbuh merambat hingga mencapai ketinggian 15 cm dan batangnya berwarna lurik. Pada setiap batang terdapat 2-3 daun dengan panjang 2-6 cm dan lebar 1,5-5 cm. Pegagan memiliki bunga berwarna putih keunguan atau merah muda. Buahnya berbentuk persegi panjang dan bulat. Bunga ini mekar selama bulan April sampai Juni. Tumbuhan ini berkembang di tempat teduh, lembab dan basah seperti sawah dan tepi sungai. (Singh *et al*, 2010).

Centella asiatica dapat ditemukan di seluruh daerah tropis dan sub tropis, seperti Asia Tenggara, India, Sri Lanka, bagian China, Kepulauan Laut Selatan Barat, Madagaskar, Afrika Selatan, Amerika Serikat Bagian Selatan, Meksiko, Venezuela, Columbia dan Amerika Selatan Bagian Selatan (Ravi *et al*, 2008).

Centella asiatica mengandung berbagai senyawa seperti alkaloid, saponin, glikosida, fenol, triterpenoid, dan flavonoid. Menurut Chippada dan Vangalapati (2011), senyawa fenol, triterpenoid dan flavonoid memiliki aktivitas



antioxidan yang luar biasa. Tanaman ini juga memiliki senyawa triterpen, seperti asiaticoside, madecassoside, asam asiatic, dan asam madecassic yang dapat menyebabkan efek hepatoprotektif (Zhao *et al.*, 2014). Beberapa penelitian telah menunjukkan beberapa manfaat bahan aktif yang terdapat pada pegagan, seperti kandungan asiaticoside yang dapat mempercepat penyembuhan luka (Srivastava *et al.*, 1997). Pemberian oral ekstrak pegagan juga telah dilaporkan sebagai anti tumor oleh Babu dan Paddikkala (1994). Menurut Upadhyay *et al.* (2002), *Centella asiatica* mengandung brahmicacid, asam isobrahmic, brahminoside dan brahmoside. Ini memiliki sifat psikotropika, obat penenang dan antikonvulsan. Hal ini juga berguna dalam demensia, gangguan mental dan kecemasan serta peningkatan memori, konsentrasi pada anak-anak disabilitas. Selanjutnya, Wang *et al.* (2003) mengisolasi pektin dari *Centella asiatica* yang menunjukkan aktivitas imunostimulan. Ekstrak metanol *Centella asiatica* juga menunjukkan efek imunomodulator (Jayathirtha dan Mirsha, 2004). Seluruh bagian dari tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat dilihat pada **Gambar 7**.



Gambar 7. *Centella asiatica* (Chandrika dan Kumara, 2015)

2.6.1 *Centella asiatica* sebagai Natural Antioksidan

Beberapa tahun terakhir, para ilmuwan telah melakukan upaya besar untuk meningkatkan sistem detoksifikasi dan meningkatkan sistem antioksidan seluler untuk melawan stres oksidatif yang disebabkan xenobiotik. Banaee *et al.*,

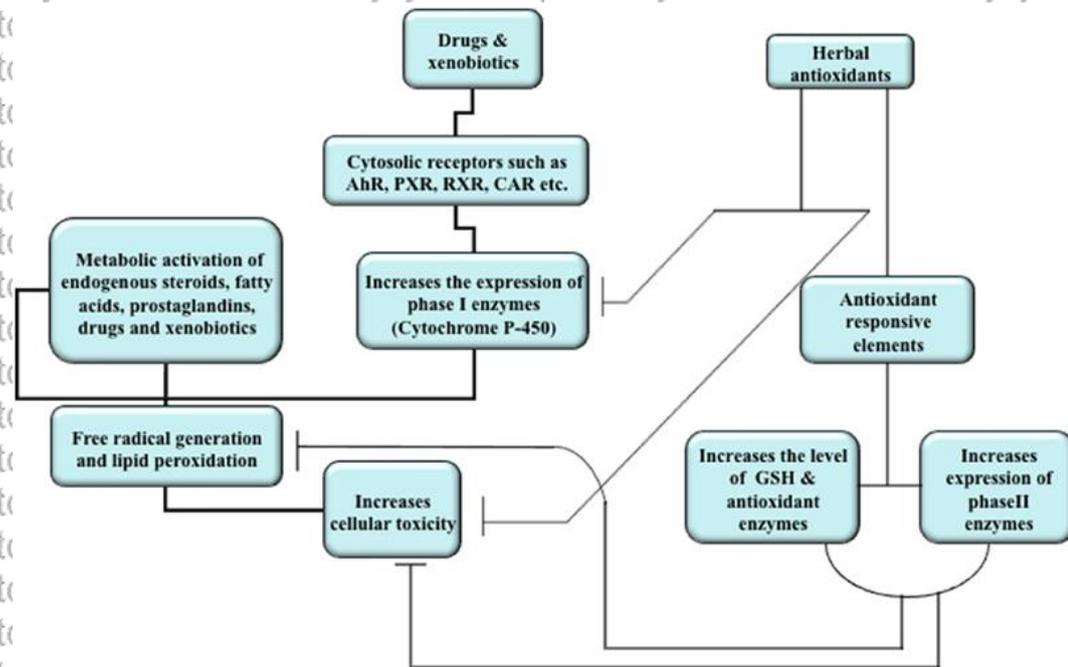


2015 dalam penelitiannya melihat bagaimana efektivitas ekstrak silymarin terhadap ikan zebra yang diinduksi malthion. Ibrahim dan Banaee (2014) juga melihat bagaimana efek dari *lycopene* dan vitamin e pada ikan nila yang dipapar oleh diazinon berdasarkan hematologi dan biokimianya. Selain itu, Zhou *et al*, 2015 melakukan percobaan untuk melihat efektivitas hepatoprotektif dari formulasi herbal China (*Yingchen decoction*) terhadap ikan mas yang di papar olaquinox. Beberapa penelitian ini menunjukkan pentingnya meningkatkan kapasitas antioksidan total pada sel. Samani *et al*, 2017 menyatakan bahwa peningkatan kapasitas antioksidan total pada sel sangat efektif dalam menjaga keseimbangan sel untuk menetralsir radikal bebas serta melindungi sel.

Nansy *et al*. (2014) memfraksinasi ekstrak etanol 70% *Centella asiatica* dengan pelarut kloroform. Penelitian ini menunjukkan kandungan flavonoid total yang setara dengan kuersetin $1,19 \pm 0,01$ g tiap 100 g berat kering ekstrak. Sampai saat ini, flavonoid dianggap sebagai kontributor utama aktivitas antioksidan yang ditunjukkan oleh tanaman (Mustafa *et al*, 2010). Ekstrak *Centella asiatica* adalah salah satu yang menunjukkan aktivitas penangkapan radikal bebas (Hashim *et al*, 2011). Setiap gram ekstrak etanol *Centella asiatica* memiliki aktivitas antioksidan sebesar $43,98 \pm 2,048$ mg kuersetin (Salamah dan Farahana, 2014). Selain itu, Pittella *et al*. (2009) melaporkan bahwa ekstrak air *Centella asiatica* mengandung flavonoid (0,361 g / 100 g) yang menunjukkan aktivitas penangkapan radikal bebas dengan nilai IC_{50} adalah $31,25 \mu\text{g} / \text{mL}$. Senyawa flavonoid dan fenolik dalam *Centella asiatica* memiliki kontribusi besar terhadap aktivitas antioksidan (Zainol *et al*., 2003) dan berpotensi untuk penyakit kardiovaskular (Pang *et al*., 2008).

Berdasarkan penelitian Katare dan Ganachari (2001) *Centella asiatica* dilaporkan memiliki aktivitas anti-lipid peroksidatif akibat toksisitas yang dimediasi oleh radikal bebas. Hasil penelitian Jayashree *et al*. (2003) juga menunjukkan

kegiatan penangkapan radikal bebas dari ekstrak *Centella asiatica*. Efek biologis *Centella asiatica* ini terkait dengan adanya bahan aktif seperti senyawa triterpen dan fenolik. Konstituen aktif yang ada dalam ekstrak *Centella asiatica* adalah triterpenes yaitu asam asiatic, asiaticoside (Inamdar *et al*, 1996). Aktivitas antioksidan dari senyawa asiaticoside telah diteliti Shukla *et al*. (1999) sebagai senyawa yang melawan kerusakan sel akibat radikal bebas. Mekanisme yang terjadi akibat xenobiotik dan efek dari antioksidan herbal dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Gambaran mekanisme metabolisme obat dan xenobiotik dan efek antioksidan herbal. Induksi reseptor nukleus oleh obat-obatan dan xenobiotik menyebabkan translokasi di nukleus dimana mereka meningkatkan ekspresi enzim sitokrom P450. Aktivitas enzim ini menghasilkan metabolit reaktif dan radikal bebas yang pada gilirannya mengikat makromolekul, menyebabkan peroksidasi lipid membran, dan meningkatkan toksisitas seluler. Produk alami meningkatkan ekspresi enzim fase II, tingkat antioksidan intraselular (GSH), dan enzim antioksidan. Produk alami juga dapat menghambat aktivitas enzim sitokrom P450 untuk mencapai homeostasis dinamis dan mengurangi toksisitas seluler (Singh *et al*, 2016).

Kemampuan antioksidan *Centella asiatica* juga telah dilaporkan oleh Kumar dan Gupta (2002). Hasil penelitian mereka menunjukkan bahwa ekstrak



air *Centella asiatica* pada dosis 200 dan 300 mg kg⁻¹ menunjukkan penurunan yang signifikan pada tingkat MDA di otak, yang merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid dan radikal bebas. Peningkatan serentak glutathione yang merupakan sebuah tripeptida yang ditemukan di semua sel secara simultan dan signifikan bereaksi dengan radikal bebas untuk melindungi sel dari radikal superoksida, radikal hidroksil dan oksigen singlet (Schulz *et al*, 2000). Zainol *et al*. (2003) juga melaporkan bahwa daun dan akar *Centella asiatica* memiliki aktivitas antioksidan tinggi, yang sama baiknya dengan α -tocopherol. Mereka menentukan kandungan fenolik 3,27-11,7 g dalam 100 g sampel kering, dan memiliki asosiasi kuat ($r^2 = 0,90$) dengan aktivitas antioksidan. Jadi senyawa fenolik dapat menjadi kontributor utama aktivitas antioksidan *Centella asiatica*.

2.6.2 *Centella asiatica* sebagai Hepatoprotektor

Hati adalah organ utama untuk detoksifikasi berbagai xenobiotik termasuk obat-obatan dan toksin; Akibatnya, obat-obatan lebih mempengaruhi hati daripada organ lainnya dan menempatkan hati pada peningkatan risiko kerusakan toksik (Cheng *et al*, 2012). Kerusakan hati ini diakibatkan oleh bahan kimia hepatotoksik dan peran stres oksidatif di dalamnya (Malhi dan Gores 2008). Jika dapat memblokir atau menghambat reaksi berantai dari proses oksidasi maka akan menjadi strategi terapeutik untuk pencegahan dan penanganan kerusakan hati (Kepekci *et al*, 2013). Oleh karena itu, beberapa terapi hepatoprotektif telah dikembangkan dengan menghambat peroksidasi lipid, meningkatkan mekanisme pertahanan antioksidan seluler atau memodulasi fungsi kekebalan tubuh (Shaker *et al*, 2011). Selanjutnya, peneliti menemukan bahwa beberapa ekstrak herbal dan komponennya memiliki efek antioksidan dan hepatoprotektif dan akan digunakan sebagai pengobatan pengganti antibiotik dan bahan kimia untuk pencegahan dan pengendalian penyakit ikan (Jia *et al* 2014).



Suatu senyawa atau zat yang berkhasiat melindungi sel sekaligus memperbaiki jaringan hati yang rusak akibat pengaruh zat toksik biasa disebut dengan hepatoprotektor (Panjaitan, 2008). Pemberian hepatoprotektor dapat dilakukan untuk pencegahan (preventif) atau penyembuhan (kuratif) (Kumarappan *et al.*, 2011). Antony *et al.* (2006) telah meneliti tentang efek hepatoprotektif *Centella asiatica* pada hati tikus yang diinfeksi karbon tetraklorida. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak *Centella asiatica* memiliki efek hepatoprotektif terhadap kerusakan hati pada tikus akibat CCl₄. Hal ini dibuktikan dengan penghambatan penurunan serum albumin dan peningkatan kadar protein pada enzim marker yaitu AST, ALT dan ALP. Pemberian ekstrak *Centella asiatica* secara efektif menghambat perubahan lemak dan infiltrasi *round cell* pada hepatosit dengan dosis berbeda. Tikus yang di *treatment* dengan 40 mg ekstrak memiliki tingkat perlindungan yang lebih tinggi daripada yang diobati dengan ekstrak 20 mg.

Penelitian yang dilakukan oleh Choi *et al* (2016) ingin menunjukkan apakah *Centella asiatica* mampu mencegah kerusakan hati akibat Dimethylnitrosamine (DMN). DMN merupakan bahan kimia yang biasanya terdapat dalam cairan batik atau rokok. Penelitian ini fokus pada perbaikan fungsional dan morfologi organ hati melalui peningkatan enzim antioksidan dan redaman mediator inflamasi, serta mengevaluasi kerusakan hati yang diinduksi DMN pada tikus dengan menggunakan ekstrak etanol (EtOH) yang diperoleh dari daun *Centella asiatica*. Hasil histologi hati menunjukkan bahwa *Centella asiatica* secara signifikan mengurangi nekrosis, degenerasi intralobular dan nekrosis fokal, dengan fibrosis jaringan hati. Selain itu, *Centella asiatica* secara signifikan menurunkan tingkat malondialdehid (MDA) dan secara signifikan meningkatkan kadar enzim antioksidan, termasuk superoksida dismutase, glutathione peroxidase dan katalase.



2.7 Malondialdehida (MDA) sebagai Biomarker Stres Oksidatif

Malondialdehida (MDA) merupakan biomarker stres oksidatif yang paling sering digunakan dalam banyak masalah kesehatan seperti kanker, psikiatri, penyakit paru obstruktif kronik, asma, atau penyakit kardiovaskular (Khoubnasabjafari *et al.*, 2015). Sifat alamiah dari radikal bebas adalah menyerang organel-organel sel yang menunjukkan reaksi seperti oksidan. Serangan radikal bebas pada membran lipid menyebabkan pembentukan hidroperoksida dan selanjutnya memproduksi malondialdehida (MDA). Serangan pada membran lipid ini disebut peroksidasi lipid, dan malondialdehida saat ini diukur sebagai produk kerusakan membran lipid akibat radikal bebas (Niedernhofer *et al.*, 2003).

Penelitian yang dilakukan oleh Banaee *et al.* (2015) menunjukkan peningkatan peroksidasi lipid akibat paparan malathion (pestisida) disertai dengan penipisan kapasitas antioksidan total di hati ikan yang terpapar. Oleh karena itu, peningkatan kadar MDA dapat dikaitkan dengan peningkatan kadar ROS di hati ikan yang terpapar xenobiotik seperti herbisida. Peningkatan kadar MDA juga terjadi di berbagai jaringan ikan yang terpapar pestisida lain seperti deltamethrin (Yonar dan Sakin, 2011), metil parathion dan chlorpyrifos (Sharbidre *et al.*, 2011), carbamazepine (Li *et al.*, 2010), dan trazine (Paulino *et al.*, 2012).

Menurut Domijan *et al.* (2014), supernatan dari 10% homogenat ikan mas (N = 20), memiliki tingkat MDA 1,54-2,70 $\mu\text{mol} / \text{L}$ ($2,16 \pm 0,37 \mu\text{mol} / \text{L}$) atau 0,015-0,027 $\mu\text{mol} / \text{g}$ jaringan ($0,02 \pm 0,004 \mu\text{mol} / \text{g}$ jaringan). Kadar MDA pada ikan tergantung pada jenis ikan. Sanz *et al.* (2013) melaporkan bahwa jenis ikan yang berbeda seperti cubus Iberia (*Squalius pyrenaicus*), ikan mas biasa, ikan mas (*Carassius auratus*), barbel Andalusia (*Luciobarbus sclateri*) dan trout pelangi (*Oncorhynchus mykiss*) memiliki tingkat MDA hati yang berbeda. Selain itu, suhu air dan aktivitas perilaku ikan dapat mempengaruhi tingkat MDA dengan



meningkatkan tingkat metabolisme. Selain suhu, suplementasi pakan juga akan mempengaruhi tingkat MDA pada organisme. Hal ini dibuktikan oleh penelitian Chien dan Hwang (2001) bahwa suhu dan suplementasi vitamin C berpengaruh pada kadar MDA hati ikan *thornfish* (*Terapon jarbua*) yang dibudidayakan pada suhu 28, 32 dan 36°C. Tingkat MDA terendah yaitu di bawah 0,3 $\mu\text{mol} / \text{g}$ jaringan, yang terdeteksi pada ikan yang dikultur pada suhu 28°C dan diberi makanan yang dilengkapi dengan vitamin C. Hal ini menunjukkan bahwa lingkungan serta faktor fisiologis spesifik dari masing-masing spesies mempengaruhi tingkat MDA pada ikan.

Stres oksidatif dapat diukur melalui kadar MDA, SOD, GPx dan CAT dalam homogenat jaringan hati, sebagai indikator aktivitas peroksidasi lipid dan aktivitas enzim antioksidan (Choi *et al.* 2016). Hasil penelitian Flora dan Gupta (2007) menunjukkan bahwa ekstrak air *Centella asiatica* pada konsentrasi 200 dan 500 mg / kg berat badan melindungi hewan secara signifikan dari kerusakan akibat arsenik. Penurunan aktivitas ALAD, aktivitas GSH / GSSG, SOD, katalase dan GPx, disertai dengan peningkatan tingkat MDA (produk akhir peroksidasi lipid) mendukung fakta bahwa stres oksidatif dihasilkan karena paparan xenobiotik (arsenik). Ekstrak air *Centella asiatica* memberikan perlindungan yang signifikan terhadap stres oksidatif yang disebabkan oleh arsenik dengan mengaktifkan enzim ALAD, menghambat peroksidasi lipid dan mengaktifkan enzim pertahanan antioksidan. Hal ini juga telah dibuktikan oleh Choi *et al.* (2016) melalui pemberian ekstrak *Centella asiatica* terhadap tikus yang diinfeksi DMN. Tingkat MDA meningkat secara nyata menjadi $0,5 \pm 0,1 \text{ nmol} / \text{mg}$ jaringan pada kelompok yang diinfeksi DMN. Namun *Centella asiatica* secara signifikan menurunkan tingkat MDA menjadi $0,3 \pm 0,03 \text{ nmol} / \text{mg}$ pada dosis masing-masing 100 mg / kg dan $0,2 \pm 0,01 \text{ nmol} / \text{mg}$ pada dosis 200 mg / kg.



Dwijayanti, *et al.* (2014) juga telah melakukan penelitian yang bertujuan untuk membuktikan efek hepatoprotektif dari kombinasi antara *Acalypha indica* and *Centella asiatica* terhadap hipoksia melalui penghambatan peroksidasi lipid dengan mengukur kadar malondialdehida (MDA) dalam plasma dan hati. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kadar MDA pada hati meningkat sedangkan kadar MDA pada plasma tidak mengalami peningkatan. Kelompok B dengan *Acalypha indica* 200 mg/kg berat badan ditambah dengan *Centella asiatica* 150 mg/kg berat badan memiliki efek perlindungan pada hati tikus terhadap hipoksia melalui mekanisme peroksidasi lipid. Efeknya menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan kelompok hipoksia. MDA sendiri merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid disebabkan oleh spesies oksigen reaktif, yang diinduksi oleh hipoksia (Jusman, 2009). Kumar dan Gupta (2002) melaporkan bahwa ekstrak air dari tanaman *Centella asiatica* memiliki aktivitas antioksidan dengan mengurangi peroksidasi lipid dan menambah enzim antioksidan endogen di otak.

2.8 Superoksida Dismutase (SOD) sebagai Enzim Antioksidan Endogen

Tubuh memiliki mekanisme sistem pertahanan alami berupa enzim antioksidan endogen yang berfungsi menetralkan dan mempercepat degradasi senyawa radikal bebas untuk mencegah kerusakan komponen makromolekul sel. Sistem ini dibagi dalam dua kelompok besar yaitu: sistem pertahanan preventif seperti enzim superoksida dismutase, katalase, dan glutathion peroksidase (Valko *et al.*, 2007) dan sistem pertahanan melalui pemutusan reaksi radikal seperti isoflavon, vitamin A, vitamin C, dan vitamin E. Superoksida dismutase (SOD), enzim pertama yang berada dalam garis pertahanan antioksidan, bertanggung jawab untuk mengkatalisis konversi anion superoksida menjadi hidrogen peroksida. SOD mempercepat perubahan superoksida (O_2^-) menjadi H_2O_2 yang



dapat dikatakan sebagai pertahanan primer karena mencegah radikal bebas.

Penurunan aktivitas SOD dapat dikaitkan dengan peningkatan produksi superoksida selama metabolisme xenobiotik (arsenik) (Flora *et al.*, 2006).

Penentuan aktivitas SOD dilakukan baik dengan teknik konvensional atau dengan menggunakan pereaksi kit. Teknik yang konvensional adalah metoda spektrofotometri dengan menginduksi radikal superoksida yang dihasilkan dari reaksi antara xantin dan xantin oksidase. Radikal superoksida nantinya akan bereaksi dengan sitokrom C atau dengan nitro biru tetrazolium (NBT) menghasilkan warna formazan ungu kebiruan. SOD yang terdapat dalam sampel akan berkompetisi dengan NBT untuk bereaksi dengan superoksida yang akan menghambat pembentukan warna biru. Warna yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer sinar tampak pada $\lambda=560$ nm (Rahman *et al.*, 2012).

Sistem pertahanan antioksidan seluler, baik enzimatik maupun non-enzimatik, dapat secara efektif menghilangkan ROS di berbagai jaringan dan mengurangi kerusakan yang disebabkan oleh stres oksidatif. Modesto dan Martinez (2010) melakukan uji toksisitas Roundup terhadap *Prochilodus lineatus*. Ikan yang terkena paparan selama 24 jam menunjukkan penurunan pada superoksida dismutase (SOD) dan aktivitas glutathione peroxidase (GPx), dan peningkatan kandungan glutathion (GSH). Langiano dan Martinez (2008) dalam penelitiannya menunjukkan peningkatan glukosa darah dan AchE hati yang terkena 10 mg L^{-1} herbisida glifosat. Dengan demikian, paparan akut Roundup merangsang jalur biotransformasi, dengan peningkatan GST, tapi mengganggu pertahanan antioksidan, dengan pengurangan SOD dan aktivitas GPx, yang mengarah ke terjadinya peroksidasi lipid. Perubahan konsentrasi atau tingkat biomarker dari stres oksidatif pada ikan dapat membantu dalam menilai risiko pencemaran lingkungan dan meningkatkan keamanan ikan konsumsi untuk nutrisi manusia.



Gupta dan Flora (2006) telah meneliti efek dari *Centella asiatica* pada tikus yang diberi arsenik sehingga menyebabkan stres oksidatif. Penelitian ini menjelaskan bahwa terjadi penurunan yang signifikan pada aktivitas SOD pada paparan arsenik. Pada pemberian *Centella asiatica* dosis terendah, SOD dilaporkan mengalami peningkatan secara signifikan. SOD adalah satu-satunya enzim yang menggunakan anion superoksida sebagai substrat dan menghasilkan hidrogen peroksida sebagai metabolit. Hidrogen peroksida ini lebih beracun dari pada radikal superoksida dan harus dihilangkan dengan katalase (Kumar dan Gupta, 2002). Hal ini didukung penelitian Choi *et al.* (2016) yang meneliti bagaimana efek pemberian ekstrak *Centella asiatica* terhadap tikus yang diinfeksi DMN. Tingkat SOD dalam hati pada kelompok yang diinfeksi DMN secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, sedangkan tingkat SOD pada kelompok perlakuan 200 mg / kg *Centella asiatica* 1,6 kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan pada kelompok yang diinfeksi MDN.

2.9 Kualitas Air

2.9.1 Suhu

Fluktuasi suhu mempengaruhi proses fisika, kimia, dan biologi pada perairan oleh karena itu suhu juga akan mempengaruhi ekosistem perairan. Meningkatnya suhu air dapat menyebabkan viskositas air meningkat. Selain itu juga akan terjadi proses peningkatan reaksi kimia, volatilisasi, serta evaporasi. Jika suhu menurun, juga akan terjadi penurunan kelarutan gas di badan air. Terdapat beberapa efek yang terjadi pada organisme jika terjadi fluktuasi suhu, antara lain dapat mengakibatkan meningkatnya proses metabolisme serta respirasi organisme. Aktivitas ini membuat kebutuhan akan oksigen menjadi tinggi. Kenaikan suhu sebesar 10°C akan menyebabkan peningkatan konsumsi oksigen



hingga 2-3 kali lipat. Hal ini akan sekaligus menurunkan kadar oksigen di dalam perairan. Akibatnya, organisme akuatik tidak mampu memenuhi kebutuhan melakukan proses metabolisme dan respirasi karena kurangnya oksigen di perairan (Effendi, 2003).

Salah satu faktor penting yang berpengaruh terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan adalah suhu. Pernapasan, tingkat nafsu makan ikan, serta reproduksi sangat dipengaruhi oleh suhu. Kelabora (2010) menyatakan bahwa banyaknya oksigen terlarut dan selera makan ikan sangat dipengaruhi oleh suhu yang tinggi. Cholik *et al* (1986) menyebutkan bahwa fluktuasi suhu hingga 5°C akan mengakibatkan stress pada organisme akuatik. Hal ini juga dapat menyebabkan kematian. Pertumbuhan dan kehidupan biota air sangat dipengaruhi suhu air. Ikan-ikan pada daerah tropis memiliki suhu optimal yang baik untuk kehidupan ikan yakni antara 28°C-32°C. Pada suhu 18°C-25°C, ikan masih bertahan hidup, tetapi nafsu makannya mulai menurun. Suhu air 12°C-18°C mulai berbahaya bagi ikan, sedangkan pada suhu di bawah 12°C ikan tropis mati kedinginan. Secara teoritis, ikan tropis masih hidup normal pada suhu 30°C-35°C jika konsentrasi oksigen terlarut cukup tinggi (Kordi dan Tancung, 2010).

2.9.2 pH

Derajat keasaman lebih dikenal dengan istilah pH. pH (singkatan dari *puissance negatif de H*), yaitu logaritma dari kepekatan ion-ion H (Hidrogen) yang terlepas dalam suatu cairan. Aktivitas ion H pada air menunjukkan derajat keasaman (pH) air yang dinyatakan sebagai konsentrasi ion H dalam mol/liter. Nilai pH yang rendah berkaitan dengan rendahnya kandungan mineral yang ada di perairan, dan sebaliknya. Hal ini disebabkan karena pH merupakan log negatif dari konsentrasi H^+ . Kegunaan mineral yang ada di perairan adalah sebagai



nutrien yang berperan dalam siklus produksi perairan. Perairan dengan kondisi alkali akan lebih produktif daripada perairan yang asam (Kordi dan Tancung, 2010).

Fluktuasi nilai pH dipengaruhi oleh adanya buangan limbah organik yang berasal dari aktivitas pertanian di sekitar sungai. Air normal yang memenuhi syarat suatu kehidupan mempunyai pH sekitar 6,5-7,5 (Wardhana, 2004). Selain itu, perubahan pH juga ditentukan oleh aktivitas fotosintesis dan respirasi dalam ekosistem. Fotosintesis memerlukan karbon dioksida, oleh karena itu ketersediaan karbon dioksida akan menurun. Penurunan ini akan menyebabkan kenaikan pH perairan. Sebaliknya, proses respirasi akan meningkatkan jumlah karbon dioksida, sehingga pH perairan menurun (Wetzel, 1983). Susana (2010) menyatakan bahwa senyawa kimia yang memiliki sifat racun maupun tidak, akan tetap mengakibatkan perubahan nilai pH. Biota akuatik sangat peka terhadap fluktuasi pH, nilai yang ideal berkisar antar 7-8,5. Jika nilai pH rendah, maka mengindikasikan rendahnya kualitas perairan. Hal ini akan berdampak pada kehidupan organisme akuatik yang hidup di dalamnya. Nilai pH sendiri tergantung dari letak atau lokasi perairan. Semakin ke laut, nilai pH semakin tinggi. Menurut Odum (1971), batas aman pH perairan untuk kehidupan biota di dalamnya antara 6,5-8.

2.9.3 DO (*Dissolved Oxygen*)

Terdapat beberapa hal yang memengaruhi jumlah oksigen terlarut di perairan, yakni salinitas, suhu, tekanan atmosfer, dan turbulensi air. Kadar oksigen terlarut akan semakin rendah jika lokasinya semakin tinggi dari permukaan air laut. Selain itu, oksigen terlarut juga berfluktuasi secara harian (*diurnal*) serta musiman. Hal ini bergantung pada pencampuran dan pergerakan



masa air, aktifitas fotosintesis di dalam perairan, respirasi, dan masuknya limbah ke badan perairan (Effendi, 2003).

Bila oksigen terlarut tidak seimbang, maka akan menyebabkan stress pada ikan. Otak ikan tidak mendapat suplai oksigen yang cukup. Selain itu, kematian akibat kekurangan oksigen (anoxia) yang disebabkan oleh jaringan tubuh tidak dapat mengikat oksigen terlarut dalam darah. Oksigen dihasilkan melalui fotosintesis pada siang hari. Sedangkan pada malam hari, saat tidak ada cahaya, oksigen akan digunakan oleh organisme untuk proses metabolisme. Kadar oksigen akan mencapai maksimum pada sore hari dan minimum menjelang pagi hari (Tatangindatu *et al*, 2013).

Sebagian besar organisme akuatik dapat hidup dengan baik pada kandungan oksigen terlarut sebesar 5 ppm. Namun ada beberapa ikan air tawar yang masih dapat bertahan hidup pada oksigen terlarut <5 ppm. Pada perairan dengan konsentrasi oksigen di bawah 4 ppm, beberapa jenis ikan masih mampu bertahan hidup, tetapi nafsu makannya mulai menurun. Konsentrasi yang baik dalam budidaya ikan adalah antara 4–7 ppm. (Kordi, 2004).



3. KONSEP PENELITIAN

3.1 Landasan Teori

Pemakaian bahan pembasmi gulma darat maupun gulma perairan yang biasa disebut herbisida dapat menyebabkan masuknya residu herbisida ke dalam tanah maupun ke perairan sekitar. Perairan alam seperti sungai sangat penting bagi manusia dalam bidang rumah tangga, pertanian, perikanan, irigasi, serta sebagai ekosistem atau tempat hidup bagi hewan air. Berdasarkan fungsi penting tersebut maka dilakukan penelitian menggunakan salah satu organisme perairan yang dapat digunakan sebagai bioindikator yakni ikan mas. Ikan mas merupakan ikan yang sangat sensitif terhadap perubahan lingkungan sehingga dapat digunakan sebagai biomarker keadaan lingkungan perairan yang tercemar herbisida.

Herbisida, khususnya yang mengandung bahan aktif isopropilamina glifosat berpotensi menyebabkan stres oksidatif pada ikan. Hal ini disebabkan karena bahan aktif dan bahan pelengkap dalam herbisida tersebut bersifat racun terhadap organisme yang tidak termasuk dalam sasaran penggunaan. Organisme perairan yang terkena herbisida ini akan mengalami peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) atau radikal bebas (oksidan) didalam tubuhnya.

Peningkatan produksi ROS ini akan menyebabkan oksidasi lipid sehingga dapat menyebabkan kadar Malondialdehida (MDA) meningkat. Oleh karena itu digunakan MDA sebagai penanda atau biomarker stres oksidatif pada jaringan organisme.

Oksidan yang berlebihan di dalam tubuh dapat dinetralsir oleh antioksidan yang berada didalam tubuh maupun dari antioksidan sekunder yang bersal dari dalam tubuh. Ikan memiliki antioksidan primer seperti Superoksida-dismutase (SOD) sebagai enzim pertahanan tubuh terhadap radikal bebas.

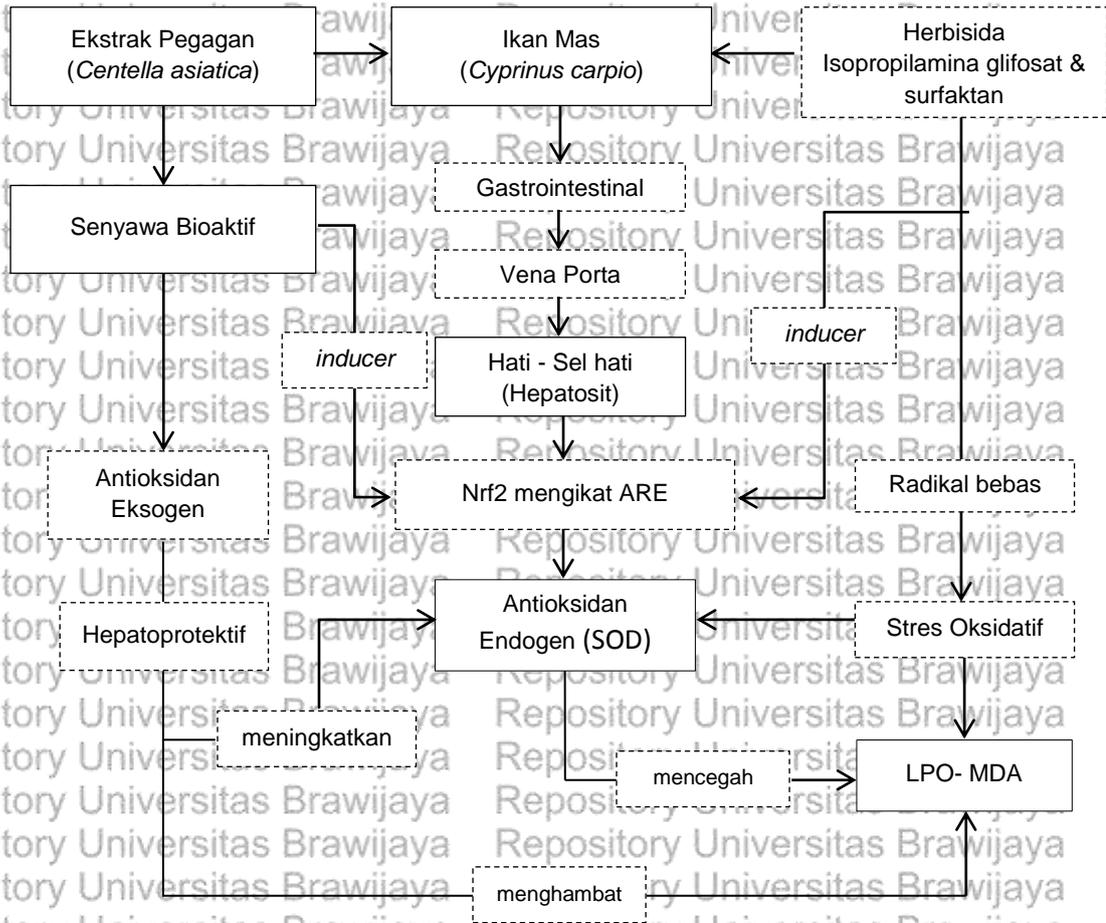


Enzim ini akan mengalami peningkatan aktivitas jika terdapat oksidan yang berlebihan di dalam tubuh guna menetralkan dan mengubah oksigen singlet (O_2^{\cdot}) yang bersifat toksik menjadi H_2O dan O_2 yang tidak bersifat toksik. Antioksidan sekunder seperti vitamin E, vitamin C, dan bahan aktif seperti flavonoid dan triterpenoid dapat diperoleh dari berbagai macam buah maupun tumbuhan-tumbuhan. Ekstrak pegagan dipilih karena memiliki bahan aktif seperti flavonoid, alkaloid, fenolik, dan triterpenoid yang bersifat sebagai antioksidan sehingga diharapkan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas serta dapat meningkatkan aktivitas enzim SOD sebagai antioksidan primer di dalam tubuh. Oleh karena itu enzim SOD digunakan sebagai indikator untuk melihat apakah ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) tersebut mampu bekerja sebagai antioksidan sekunder yang membantu dalam menetralkan radikal bebas.

Organ hati bertugas menetralkan bahan beracun yang masuk ke dalam tubuh sehingga organ ini merupakan salah satu bagian tubuh yang paling peka terhadap perubahan lingkungan. Paparan herbisida dengan konsentrasi tertentu dapat menyebabkan perubahan dan kerusakan pada jaringan hati oleh karena itu jaringan hati digunakan sebagai penanda bahwa organisme tersebut telah mengalami kontaminasi akibat bahan pencemar. Ekstrak pegagan yang bersifat sebagai antioksidan diharapkan dapat mencegah maupun mengobati kerusakan jaringan hati yang disebabkan oleh paparan herbisida glifosat.

3.2 Kerangka Konsep Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk melihat apakah ekstrak *Centella asiatica* berfungsi sebagai antioksidan serta mampu membantu meningkatkan enzim SOD sehingga dapat menurunkan kadar MDA di dalam jaringan hati. Kerangka konsep penelitian dapat dilihat pada **Gambar 10**.



Gambar 1. Kerangka Konseptual Penelitian



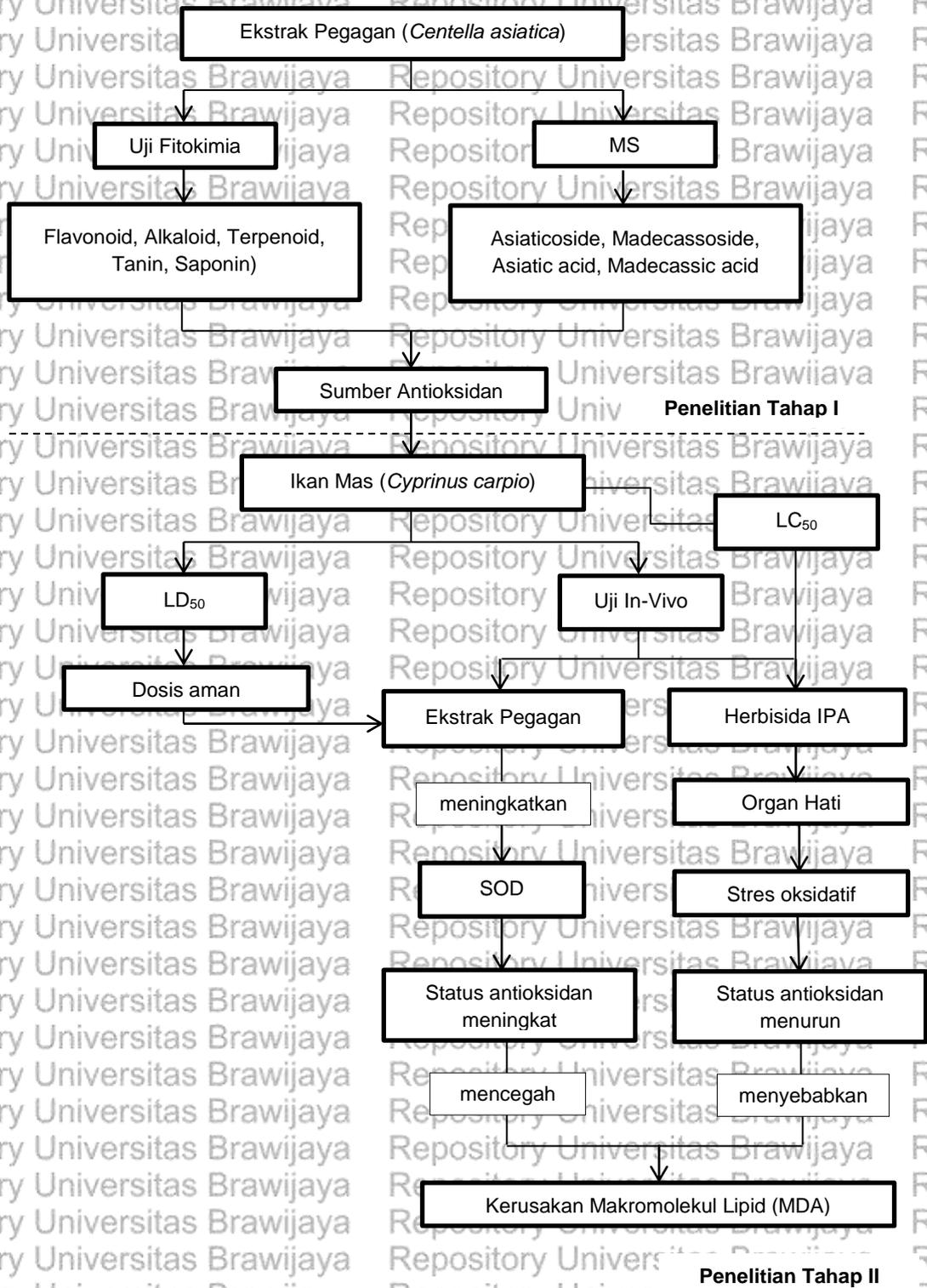
3.3 Hipotesis

H_0 : Pemberian ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) tidak meningkatkan enzim SOD pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang di papar herbisida berbahan aktif isopropilamina glifosat.

H_1 : Pemberian ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) meningkatkan enzim SOD pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang di papar herbisida berbahan aktif isopropilamina glifosat.



3.4 Kerangka Operasional Penelitian

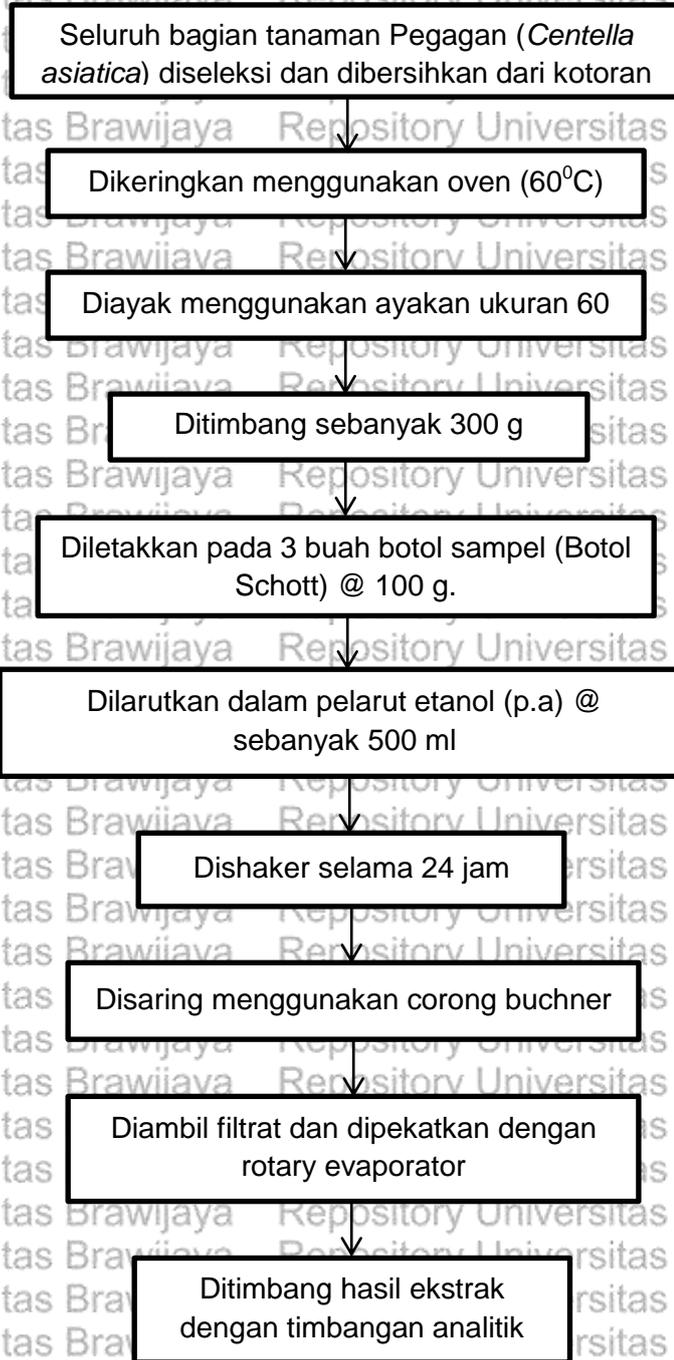


Gambar 2. Kerangka Operasional Penelitian



3.4.1 Penelitian Tahap I

3.4.1.1 Maserasi



Gambar 3. Kerangka Proses Maserasi

3.4.1.2 Uji Aktivitas Antioksidan (DPPH)

3,94 mg DPPH dilarutkan dalam metanol p.a sebanyak 100 ml (0,1 mM)

Melarutkan 6 mg ekstrak ditambah 10 ml metanol sebagai larutan induk (600 ppm)

Menambahkan 10 ml metanol pada tabung reaksi

Menambahkan 167, 833, 1667, 2500, 3333 μ l larutan induk pada tabung reaksi

Diperoleh larutan seri konsentrasi sebesar 10, 50, 100, 150, dan 200 μ g/mL

Menambahkan 3 mL larutan DPPH 0,1 mM dengan 1 mL larutan seri

Campuran diinkubasi selama 30 menit (37°C)

Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm menggunakan spektrofotometer

$$\text{Persentase peredaman} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%$$

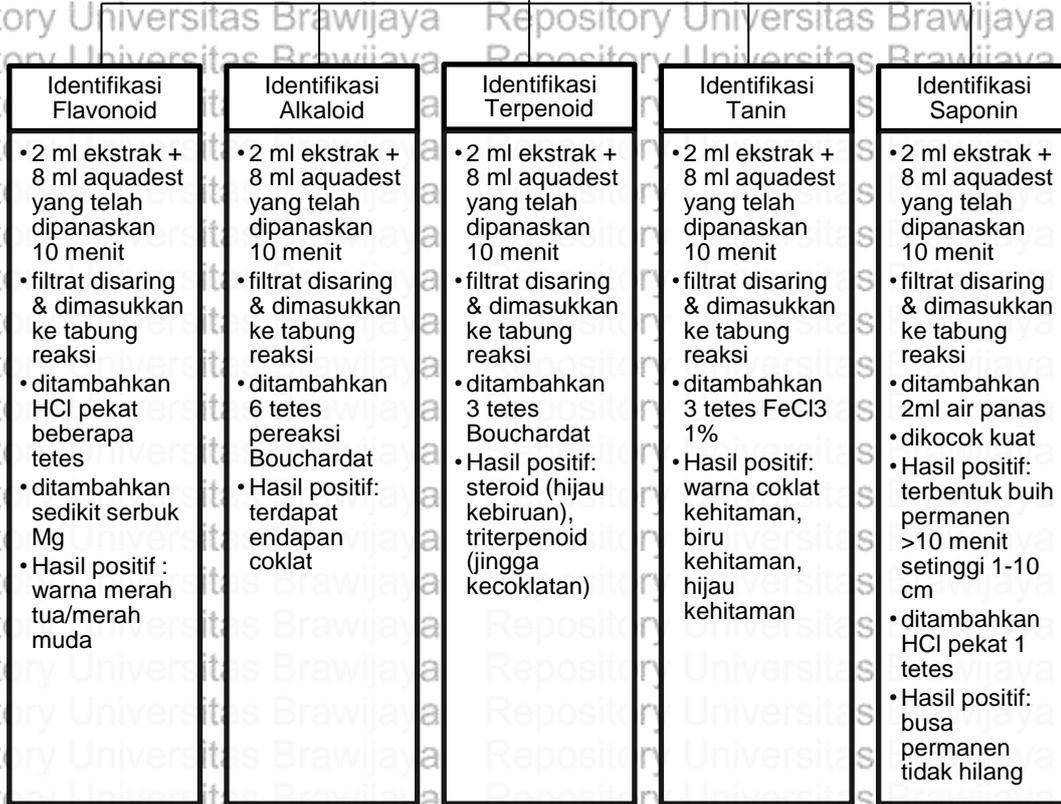
Nilai IC₅₀ = konsentrasi antioksidan (μ g/mL) yang mampu meredam radikal bebas sebanyak 50%

Gambar 4. Kerangka Uji Aktivitas Antioksidan



3.4.1.3 Skrining Fitokimia

Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*)
dengan menggunakan pelarut etanol

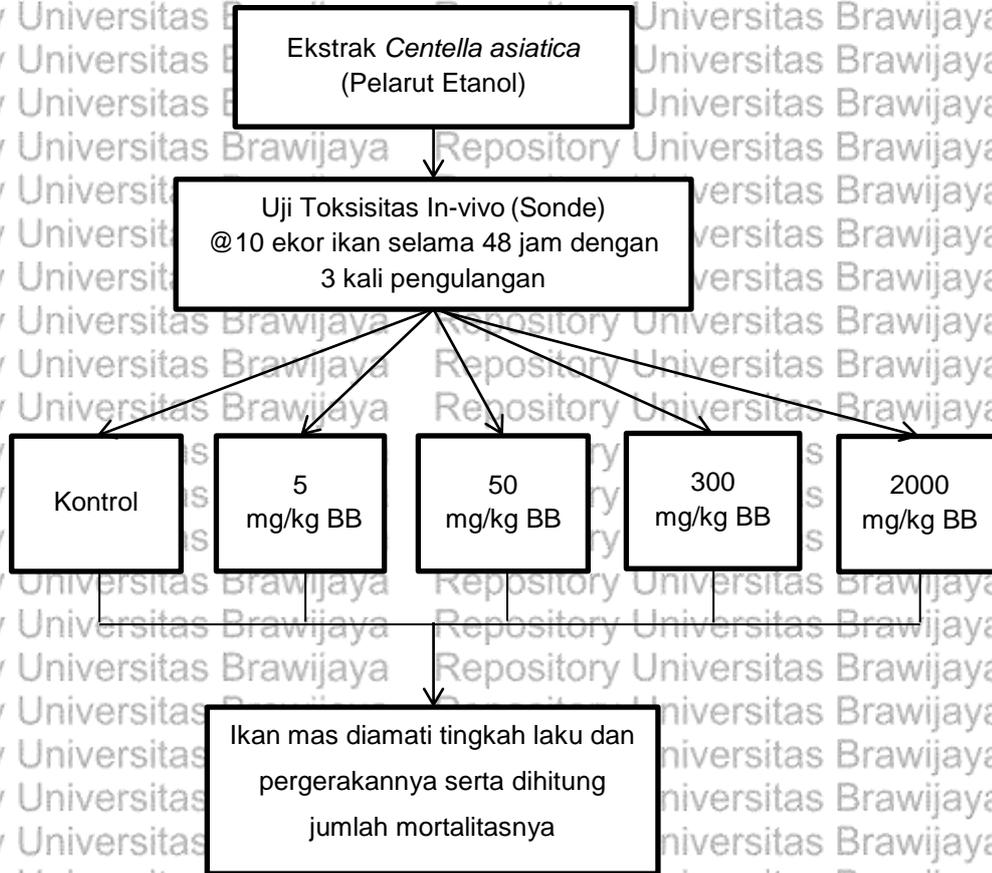


Gambar 5. Kerangka Skrining Fitokimia



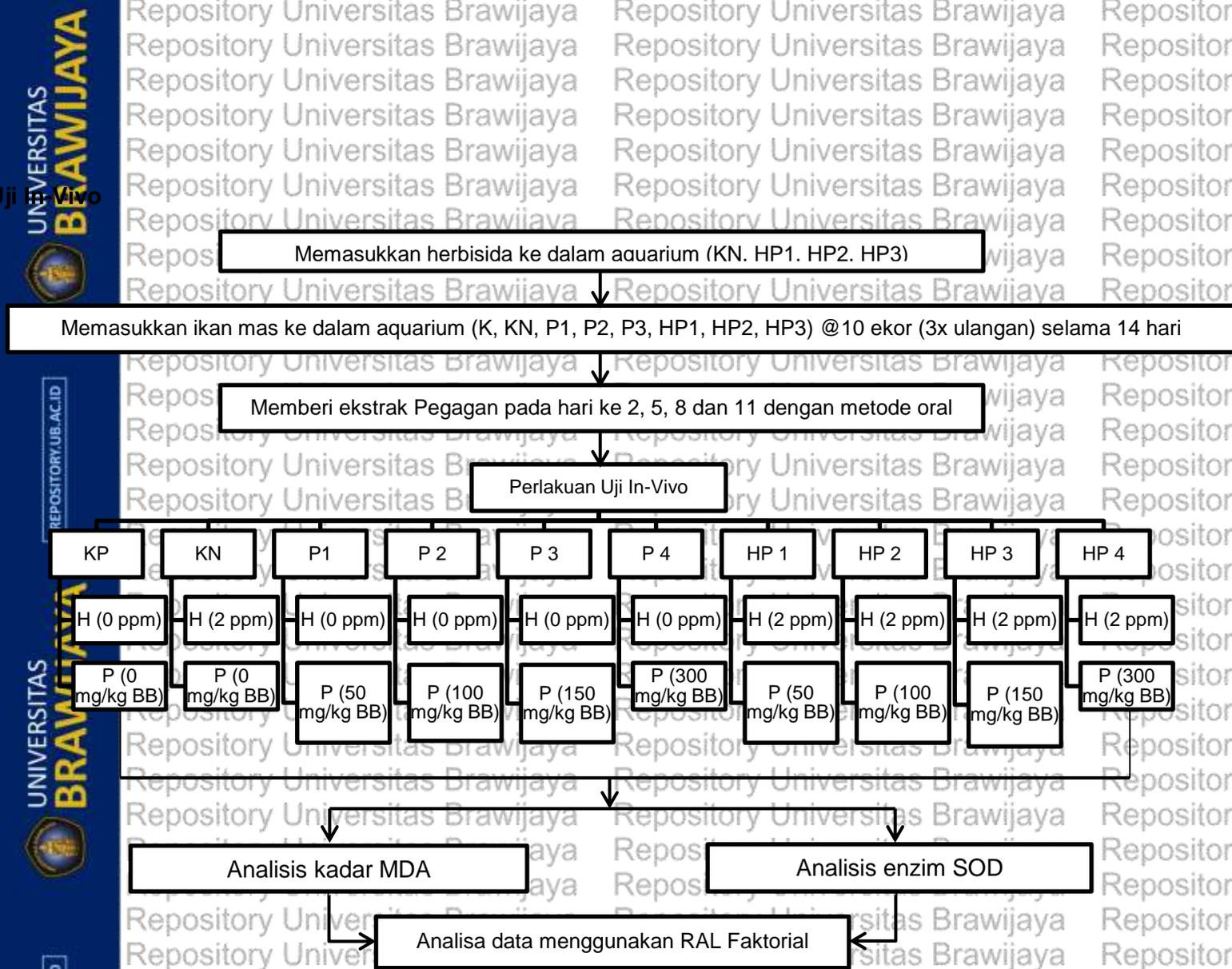
3.4.2 Penelitian Tahap II

3.4.2.1 Uji Toksisitas (LD_{50})



Gambar 6. Kerangka Uji Toksisitas (LD_{50})

3.4.2.2 Uji In-Vivo



Gambar 7. Kerangka Uji In-Vivo



3.5 Penelitian Terdahulu

Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya tentang herbisida isopropilamina dan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dapat dilihat pada Tabel 1 dibawah ini.

Tabel 1. Penelitian terdahulu yang menggunakan herbisida Isopropilamina glifosat dan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*)

No.	Author dan Tahun	Judul	Hasil
1.	(Nwani <i>et al.</i> , 2013)	DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, <i>Channa punctatus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • pemaparan sub letal glifosat terhadap <i>C. punctatus</i> merangsang stres oksidatif yang menyebabkan peningkatan LPO, menekan enzim antioksidan dan menginduksi kerusakan genotoksik.
2.	(Menezes <i>et al.</i> , 2011)	Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish <i>Prochilodus lineatus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Roundup menginduksi stres oksidatif karena peningkatan LPO dan karbonilasi protein. • CAT dan SOD menurun, dan GST menunjukkan peningkatan aktivitas
3.	(Webster dan Santos, 2015)	Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory	<ul style="list-style-type: none"> • Roundup maupun bahan aktifnya (glifosat) memiliki efek stres oksidatif pada ikan brown trout. • Profil transkripsional menunjukkan bahwa paparan glifosat dan



		cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup	Roundup mempengaruhi jalur sinyal yang mengendalikan respons stres seluler, khususnya yang terlibat dalam pengaturan apoptosis sel.
4.	(Choi <i>et al.</i> , 2016)	Protective effects of <i>Centella asiatica</i> leaf extract on dimethylnitrosamine induced liver injury in rats	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Centella asiatica</i> menunjukkan efek hepatoprotektif melalui peningkatan kadar enzim antioksidan dan mengurangi tingkat mediator inflamasi pada tikus dengan kerusakan hati yang disebabkan oleh dimethylnitrosamine
5.	(Dwijayanti <i>et al.</i> , 2015)	Hepatoprotective Effects of <i>Acalypha indica</i> and <i>Centella asiatica</i> in Rat's Liver Against Hypoxia	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Acalypha indica</i> dan <i>Centella asiatica</i> memiliki efek perlindungan terhadap hati tikus yang terkena hipoksia

3.6 Strategi Publikasi

Hasil penelitian mengenai Efektivitas Hepatoprotektif Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) yang Dipapar Herbisida Berbahan Aktif Isopropilamina Glifosat rencananya akan dipublikasikan pada *Research Journal of Life Science* (RJLS). Publikasi jurnal ini sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi di program Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.



4. MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Tabel 1. Desain Penelitian

Pokok Pembahasan	Hasil
Masalah penelitian	Bagaimana ekspresi MDA dan SOD ikan mas yang terpapar herbisida glifosat dengan penambahan ekstrak pegagan (<i>Centella asiatica</i>) sebagai antioksidan.
Tujuan penelitian	Mengetahui perbedaan ekspresi MDA dan SOD jaringan hati Ikan Mas yang di papar herbisida isopropilamina glifosat dan dengan penambahan ekstrak pegagan (<i>Centella asiatica</i>).
Variabel Data dan Sumber Data	<ul style="list-style-type: none"> • Variabel bebas : kandungan bioaktif ekstrak <i>Centella asiatica</i> • Variabel terikat : MDA dan SOD organ hati ikan mas.
Metode Pengumpulan Data	Eksperimental
Metode Uji Analisis	Fitokimia, MS, Antioksidan (IC ₅₀), Toksisitas Akut Herbisida (LC ₅₀), Toksisitas Akut Pegagan (LD ₅₀), Uji MDA, Uji SOD
Metode Analisa Data	RAL Faktorial

4.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi dan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Laboratorium Eksplorasi

Sumberdaya Perikanan dan Kelautan, Laboratorium Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Sentral Biomedik serta Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Mei - Agustus 2018.

4.3 Materi Penelitian

Materi dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) yang di uji secara in-vivo pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). Proses



perendaman ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) dengan herbisida isopropilamina glifosat digunakan sebagai pemicu stres oksidatif pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) digunakan untuk meningkatkan enzim SOD sebagai enzim antioksidan yang berada di dalam tubuh.

4.4 Alat dan Bahan

4.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan untuk menunjang penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Maserasi pegagan (*Centella asiatica*): 3 buah erlenmeyer bertutup 1000 ml, timbangan digital, spatula, shaker, botol vial, corong buchner dan rotary evaporator.
- Identifikasi senyawa (fitokimia): beaker glass, gelas ukur 100 ml, pipet tetes, spatula, erlenmeyer, timbangan analitik.
- Uji aktivitas antioksidan: tabung reaksi, kuvet, mikropipet, spektrofotometer
- Uji In-vivo: akuarium 30x30x30, aerator, selang aerasi, batu aerasi, sectio set, seser, toples plastik dan nampan. Sedangkan peralatan untuk mengamati kualitas air digunakan pH meter, termometer dan DO meter
- Uji kadar MDA: Pipet 10 dan 200 μ l, pipet tip, stir bar, tabung mikrosentrifugasi poliprolena, semi-mikrokuvet, spektrofotometer, vortex, magnetic stirrer, water bath.
- Uji aktivitas enzim SOD: sentrifuge, vortex, UV-VIS.

4.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk menunjang penelitian ini adalah sebagai berikut:



- Maserasi pegagan (*Centella asiatica*): simplisia pegagan 1 kg, pelarut etanol p.a., kertas saring Whatman, kertas label, aluminium foil
- Identifikasi senyawa (fitokimia): ekstrak *Centella asiatica*, HCl, reagen Dragendroff, aquadest, natrium hidroksida, air, etanol, asam asetat anhidrat dan 1ml H₂SO₄
- Uji aktivitas antioksidan: ekstrak *Centella asiatica*, DPPH, etanol p.a.
- Uji In-vivo: ikan mas (*Cyprinus carpio*) ukuran 7-10 cm, herbisida isopropilamina glifosat, ekstrak *Centella asiatica*, pakan ikan.
- Uji kadar MDA: organ hati, PBS, TCA, TBA.
- Uji aktivitas enzim SOD: organ hati, reagen SOD, PBS, xanthine oxidase, klorida tembaga

4.5 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode ini menggunakan variabel-variabel yang terkontrol dari faktor luar sehingga data yang didapatkan pada penelitian dianggap valid (Borg dan Gall, 1983). Jaedun (2011) menyatakan bahwa penelitian eksperimen dilakukan melalui penambahan perlakuan tertentu terhadap subyek penelitian. Selanjutnya, akan dilihat perubahan, ataupun dampaknya terhadap subyek penelitian.

Terdapat dua karakteristik penting dalam metode eksperimen yaitu:

1. Variabel bebas, dalam hal ini adalah ekstrak pegagan dan herbisida, yang merupakan variabel yang dapat secara bebas ditentukan oleh peneliti dan dipertanggungjawabkan secara terbuka untuk memberikan dampak terhadap variabel terkait yaitu ekspresi MDA, dan SOD pada ikan.



2. Observasi atau pengamatan secara langsung akan hasil atau efek yang diinginkan yaitu respon ekspresi MDA dan SOD pada ikan setelah diberi perlakuan ekstrak pegagan dan herbisida.

Sumber data yang digunakan dalam penelitian ini mencakup 2 macam data, yaitu data primer dan data sekunder.

A. Data Primer

Data yang didapatkan dari sumber asli maupun didapatkan secara langsung termasuk ke dalam data primer. Peneliti mengumpulkan data tersebut untuk menjawab pertanyaan penelitian. Pendapat/opini seseorang secara individu maupun kelompok, hasil survei atau pengamatan terhadap benda/ kegiatan serta hasil pengujian merupakan beberapa contoh data primer (Indriantoro dan Supomo, 2002). Wandansari (2013) menyebutkan bahwa data primer merupakan data yang didapatkan langsung dari sumber pertama. Sumber pertama ini adalah individu yang menginginkan pengelolaan lebih lanjut. Contohnya adalah hasil wawancara, dan juga hasil pengisian kuisioner. Data primer dalam penelitian ini diperoleh dari Penelitian ini menggunakan data primer antara lain: pengamatan, pengukuran dan perhitungan secara langsung selama penelitian dilaksanakan, yaitu bahan aktif dari ekstrak pegagan, pengukuran MDA dan SOD, serta pengukuran kualitas air (suhu, pH, dan DO).

B. Data Sekunder

Data yang didapatkan dari seseorang yang telah melakukan penelitian sebelumnya disebut data sekunder. Terdapat beberapa sumber data sekunder, yakni perpustakaan atau laporan yang berasal peneliti terdahulu. Hasan (2002), menyebutkan bahwa data sekunder disebut juga data yang tersedia.

Pernyataan ini di dukung oleh Surakhmad (2004) yang menyatakan bahwa data yang diperoleh kemudian dilaporkan oleh orang lain yang bukan peneliti



sendiri. Namun data tersebut sebenarnya adalah data yang asli. Data sekunder dalam penelitian ini didapat dari keterangan yang ada pada jurnal, buku, skripsi terdahulu, internet, dan kepustakaan lain yang menunjang pelaksanaan penelitian ini.

4.6 Prosedur Penelitian Tahap I

Penelitian tahap satu meliputi ekstraksi pegagan (*Centella asiatica*) dengan menggunakan metode maserasi sehingga didapatkan ekstrak pegagan yang berbentuk pekatan atau pasta. Pekatan ini kemudian di uji fitokimia untuk mengetahui ada atau tidaknya senyawa aktif tertentu yang terkandung didalam ekstrak pegagan. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan sehingga dapat diketahui kemampuan pegagan dalam menangkap atau menetralsir radikal bebas (DPPH). Selain itu, dilakukan juga uji untuk mengetahui kandungan bioaktif dari ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dengan menggunakan *Mass Spectrometry* (MS).

4.6.1 Ekstraksi *Centella asiatica* dengan Metode Maserasi

Seluruh bagian dari tanaman pegagan (*Centella asiatica*) diseleksi dan dibersihkan dari kotoran-kotoran. Selanjutnya, tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dikeringkan dengan cara dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 60°C. Suhu tersebut merupakan suhu optimal sehingga senyawa-senyawa yang ada di dalamnya tidak rusak akibat proses pengeringan. Setelah kering, tanaman tersebut digiling hingga menjadi simplisia. Simplisia kemudian diayak dengan ayakan ukuran 60 hingga menjadi serbuk halus kemudian ditimbang dengan timbangan analitik. Setelah didapatkan serbuk dari tanaman pegagan (*Centella asiatica*), selanjutnya dilakukan proses ekstraksi. Zat pokok yang ada di dalam tanaman ditarik menggunakan pelarut sehingga zat-zat yang diinginkan dapat ikut terlarut dalam pelarut tersebut (Voight, 1994). Proses maserasi meliputi



proses perendaman sampel bersamaan pelarut organik (pada suhu ruang).

Proses ini perendaman sampel dengan pelarut mengakibatkan terjadinya pemecahan dinding serta membran sel. Hal ini terjadi akibat adanya tekanan osmosis, yakni adanya perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel. Berbagai metabolit sekunder pada sitoplasma akan larut dalam pelarut organik.

Digunakan pelarut yang sesuai agar ekstrak memiliki efektivitas tinggi dengan memperhatikan kelarutan pelarut tersebut (Darwis, 2000). Proses maserasi ini akan menggunakan pelarut polar yaitu etanol p.a. Metode ekstraksi yang digunakan merupakan modifikasi dari metode Mirza (2012) yang mengekstrak *Centella asiatica* dengan menggunakan perbandingan 1:5 antara sampel dengan pelarutnya. Tahapan-tahapan yang dilakukan antara lain:

1. Ditimbang simplisia *Centella asiatica* sebanyak 300 gram dan diletakkan pada 3 buah botol sampel (Botol Schott) masing-masing 100 g.
2. Dilarutkan masing-masing dalam pelarut pelarut etanol (p.a) @ 500 ml
3. Dishaker selama 24 jam
4. Dimaserasi ulang sebanyak 1 kali
5. Disaring dengan menggunakan corong buchner untuk memisahkan antara residu dan filtrat
6. Dibuang residu dan diambil filtrat
7. Dipekatkan filtrat yang diperoleh dengan *rotary evaporator vacum* (50°C)
8. Diperoleh ekstrak kental *Centella asiatica* dengan pelarut etanol
9. Ditimbang hasil ekstrak dengan timbangan analitik

4.6.2 Skrining Fitokimia

Identifikasi dengan fitokimia dilakukan pada masing-masing ekstrak etanol, etil asetat dan n-heksan dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan senyawa-senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak tersebut. Prosedur



pengujian fitokimia yang dilakukan pada ekstrak *Centella asiatica* adalah sebagai berikut:

Ekstrak pegagan diambil sebanyak 5 gram ke dalam *beaker glass* dan ditambah aquades sebanyak 10 ml, kemudian di panaskan hingga mendidih dan disaring menggunakan kertas saring dan corong. Hasil saringan dimasukkan ke dalam *beaker glass* untuk kemudian diujikan pada masing-masing senyawa metabolit sekunder

1. Identifikasi Alkaloid

Pada uji senyawa ini diperlukan 0,5 ml larutan sampel dalam masing-masing 3 tabung reaksi kemudian ditambahkan Pereaksi Bouchardat, Meyer, Dragendorf beberapa tetes. Hasil positif jika terdapat endapan coklat bouchardat, endapan putih meyer, endapan jingga Dragendorf.

2. Identifikasi Tanin

Pada uji senyawa ini diperlukan 0,5 ml larutan sampel ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan $FeCl_3$ 1%. Hasil dinyatakan positif jika warna hijau, biru, ungu, biru tua, hijau kehitaman.

3. Identifikasi Saponin

1 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 ml air panas dan dikocok kuat. Hasil positif jika terbentuk buih permanen selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Selanjutnya ditambahkan HCL pekat 1 tetes. Hasil positif jika busa permanen tidak hilang.

4. Identifikasi Flavonoid

Pada uji senyawa ini diperlukan 0,5 ml larutan sampel dimasukan ke dalam tabung reaksi kemudian dipanaskan selama 5 menit kemudian ditambah



HCL pekat beberapa tetes dan ditambah sedikit serbuk Mg. Hasil Positif jika warna merah tua / merah muda.

5. Identifikasi Terpenoid

0,5 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 0.25 ml etanol dan 0.25 ml asam asetat anhidrat. Selanjutnya ditambah 1 ml H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung. Warna hijau biru (Steroid), warna orange, jingga kecoklatan (triterpenoid).

4.6.3 Uji Kandungan Bioaktif Ekstrak Pegagan menggunakan *Mass Spectrometry*

Terdapat beberapa tipe *Mass Spectrometry* atau spektrometer massa, yakni *ion trap*, *orbitrap*, *Q trap*, *triple quadropole*, dan *TOF/QTOF*. Spektrofotometer massa yang paling banyak digunakan adalah jenis *Matrix assisted laser desorption ionization (MALDI)* atau *electrospray ionization (ESI)*. dapat dibagi menjadi tiga bagian dasar yaitu sumber ionisasi, alat analisa, dan detektor. Alat ini dapat digunakan untuk mendeteksi senyawa secara kualitatif maupun kuantitatif.

Sampel dimasukkan ke dalam sumber ionisasi instrumen. Begitu berada di dalam sumber ionisasi, molekul sampel terionisasi dan diekstraksi ke dalam wilayah penganalisa spektrometer massa di mana mereka dipisahkan menurut rasio massa-muatan (m/z). Ion yang terpisah dideteksi dan sinyal ini dikirim ke sistem data di mana rasio m/z disimpan bersama dengan kelimpahan relatifnya untuk ditampilkan dalam format spektrum m/z . Alat analisa, pendeteksi spektrometer massa, dan juga sumber ionisasi, dijaga di bawah vakum yang tinggi agar ion-ion dapat masuk dan berpindah dari ujung instrumen yang satu ke instrumen lainnya tanpa hambatan dari molekul udara (Tilvi et al, 2014).



4.6.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Metode Aizad *et al.* (2016) yang dimodifikasi dengan metode Killedar *et al.* (2013) digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan. Tahapan-tahapannya adalah sebagai berikut:

1) Pembuatan Larutan DPPH

Sebanyak 3,94 mg DPPH dilarutkan dalam metanol p.a sebanyak 100 ml sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 0,1 mM.

2) Pembuatan Larutan Uji

Larutan induk sebanyak 600 ppm dibuat untuk ekstrak pegagan dengan melarutkan 6 mg ekstrak ditambah 10 ml metanol. Dilakukan pengenceran dalam tabung reaksi dengan menambahkan 10 ml pelarut metanol pada masing-masing larutan seri dan ditambahkan 167, 833, 1667, 2500, 3333 µl larutan induk sampel sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 10, 50, 100, 150, dan 200 µg/mL.

3) Penentuan Aktivitas Antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara menambahkan 3 mL larutan DPPH 0,1 mM dengan masing-masing 1 mL larutan uji (larutan seri dari masing-masing ekstrak etanol, etil asetat, dan n-heksan) konsentrasi 10, 50, 100, 150, 200 µg/mL. Campuran diinkubasi selama 30 menit pada 37°C. Larutan ini kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm.

4) Penentuan Persentase Peredaman dan IC₅₀

$$\text{Persen peredaman} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%$$

Keterangan: A1 = absorbansi kontrol
A2 = absorbansi sampel

Persen peredaman yang diperoleh dari data absorbansi dilakukan perhitungan nilai IC₅₀ dengan menggunakan persamaan regresi yang menyatakan hubungan antara konsentrasi ekstrak (x) dengan persen peredaman (y). Sampel yang mempunyai nilai IC₅₀ terendah menunjukkan bahwa sampel



tersebut memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang tinggi. Nilai IC_{50} (*Inhibition Concentration* 50) adalah konsentrasi antioksidan ($\mu\text{g/mL}$) yang mampu meredam radikal bebas sebanyak 50%. Ekstrak dinyatakan aktif sebagai antioksidan bila nilai IC_{50} kurang dari $200 \mu\text{g/mL}$.

4.7 Prosedur Penelitian Tahap II

4.7.1 Aklimatisasi

Aklimatisasi ikan mas dilakukan dengan menyiapkan satu kolam kecil dengan ukuran $2 \times 1 \times 1$ meter, kemudian diisi air dengan ketinggian ± 30 cm.

Pada kolam diberikan sistem resirkulasi dengan menggunakan water pump.

Pemeliharaan ikan mas dilakukan di kolam pemeliharaan Laboratorium

Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya.

Aklimatisasi ini dilakukan selama 7 hari dengan pemberian pakan berupa pellet

dua kali sehari yaitu pagi pukul 07.00 WIB dan sore pukul 16.00 WIB. Pakan

diberikan sebanyak 3% dari berat tubuh ikan. Setelah dilakukan aklimatisasi

pada kolam selama 7 hari, kemudian ikan dipindahkan pada akuarium untuk

perlakuan selanjutnya.

4.7.2 Pengenceran Herbisida Isopropilamina Glifosat

Pada penelitian Seyedkolaei *et al*, (2013), nilai toksisitas akut $LC_{50-96jam}$

untuk ikan *Cyprinus carpio* (panjang 10 cm dan berat 41 gram) yang terpapar

herbisida Roundup diperoleh sebesar 22,19 ppm. Konsentrasi paparan

sebesar 11 ppm dipilih berdasarkan 50% dari nilai $LC_{50-96jam}$ sesuai dengan

pengujian toksikologi sebelumnya. Herbisida cair dengan merk dagang

Roundup ini memiliki kandungan bahan aktif Isopropilamina glifosat $486 \text{ g/L} =$

$486.000 \text{ mg/L} = 486.000 \text{ ppm}$. Rumus pengenceran herbisida adalah sebagai

berikut :

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$



Keterangan:

V1: volume atau jumlah herbisida yang dibutuhkan

N1: konsentrasi herbisida

V2: volume air yang digunakan

N2: dosis herbisida yang diinginkan

4.7.3 Uji **Lethal Concentration 50 (LC₅₀)** Herbisida Isopropilamina Glifosat

Tahapan uji LC₅₀ adalah sebagai berikut:

1. Menentukan variasi konsentrasi herbisida *Roundup* sesuai dengan skala Rand yang sudah ditentukan pada uji pendahuluan sebanyak 7 variasi dan 1 kontrol.
2. Mempersiapkan medianya dengan melarutkan herbisida *Roundup* sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan dan melakukan pengulangan sebanyak 3 kali.
3. Memberikan aerasi selama 5-10 menit sebelum ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) dimasukkan.
4. Memasukkan ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) pada masing-masing bak sebanyak 10 ekor sehingga jumlah ikan yang dibutuhkan beserta pengulangannya adalah 240 ekor.
5. Memberikan aerasi selama perlakuan (96 jam) tanpa pemberian pakan.
6. Mengukur parameter kualitas air selama 24 jam sekali selama 96 jam.
7. Mengamati dan mencatat gejala mortalitas ikan mas setiap saat pada masing-masing bak perlakuan. Bila gejala mortalitas sudah terlihat maka ikan mas segera diambil dan melakukan pembedahan untuk mengambil organ ginjal sehingga dapat melakukan pengamatan perubahan histologis yang terjadi akibat pemberian paparan.

4.7.4 Dosis dan Pengenceran Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*)

Dosis ekstrak pegagan ditentukan berdasarkan hasil uji IC₅₀ dan LD₅₀ yang telah dilakukan pada uji tahap I. Tahapannya adalah sebagai berikut:



1. Menentukan dosis ekstrak (mg/kg BB)
2. Menimbang berat (rata-rata) ikan (gram)
3. Menghitung dosis ekstrak per kg berat ikan dengan rumus:

$$\frac{\text{Berat Badan (g)}}{1000 \text{ g}} \times \text{Dosis ekstrak (mg)}$$

4. Menghitung kebutuhan ekstrak:

$$\text{Dosis ekstrak per kg berat ikan (mg)} \times \text{Kebutuhan pelarut (ml)}$$

5. Memberikan 1 ml ekstrak untuk setiap 1 ekor ikan.

4.7.5 Uji *Lethal Dose 50* (LD₅₀) Ekstrak Pegagan terhadap Ikan Mas

Beberapa uji toksisitas akut, seperti uji LD₅₀ dirancang untuk menentukan dosis mematikan dari bahan uji. Median dosis yang dapat mematikan (LD₅₀) didefinisikan sebagai dosis zat uji yang mematikan untuk 50% dari hewan dalam kelompok dosis. Dosis yang digunakan untuk uji toksisitas akut LD₅₀ adalah dosis yang tidak menyebabkan menyebabkan kematian sama sekali sampai dengan dosis yang menyebabkan kematian 100% (Abdullah *et al.*, 2010). Uji toksisitas akut bertujuan untuk menentukan sifat toksik dari zat uji yang terjadi ketika hewan terpapar dengan satu atau lebih dosis zat uji dalam satu periode 24 jam (WHO, 1993).

Langkah - langkah pengujian LD₅₀ adalah sebagai berikut.

1. Menyiapkan akuarium sebanyak 12 buah yang masing-masing berisi 10 liter air.
2. Memberi aerasi pada setiap akuarium dan diisi dengan ikan mas masing-masing sebanyak 10 ekor ukuran 7-10 cm.
3. Melakukan aklimatisasi ikan mas selama 24 tanpa diberi pakan.
4. Melarutkan ekstrak pegagan dengan cairan infus (*Aqua pro injection*). Dosis yang digunakan masing-masing adalah 5, 50, 300, dan 2000 mg/kg BB.



5. Memberikan ekstrak pegagan pada ikan mas dalam dosis tunggal menggunakan sonde oral. Dosis yang digunakan masing-masing adalah 5, 50, 300, dan 2000 mg/kg BB.

6. Memberi pakan setelah 4 jam dari pemberian ekstrak.

7. Mengamati tingkah laku dan pergerakan ikan mas pada 12, 24, 36 dan 48 jam

8. Menghitung jumlah mortalitas setelah 24 jam.

9. Batas aman dosis untuk LD50 dilihat berdasarkan Fix Dose Procedure (OECD 420):

- | | | |
|---|---|--|
| A | = | > 2 deaths |
| B | = | > 1 with evident toxicity and/or < 1 death |
| C | = | No toxicity |

4.7.6 Uji In-vivo Ekstrak *Centella asiatica* dan Herbisida Isopropilamina Glifosat pada Ikan Mas

Setelah proses aklimatisasi selesai, dilakukan pemaparan pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) menggunakan herbisida Roundup berbahan aktif isopropilamina glifosat serta ekstrak pegagan (*Centella asiatica*). Pemaparan ini dilakukan dengan maksud untuk melihat pengaruh ekstrak pegagan terhadap ikan yang terpapar herbisida berbahan aktif isopropilamina glifosat. Hal ini dapat dilihat melalui hasil peroksidasi lipid yakni kadar MDA dan enzim yang berperan dalam pengikisan radikal bebas yakni enzim SOD pada organ hati ikan mas.

Tahapan - tahapan yang akan dilakukan pada uji in vivo adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan akuarium dengan kapasitas 20 liter sebanyak 30 buah untuk 10 perlakuan (3 kali ulangan).
2. Menyiapkan media dengan melarutkan herbisida dengan dosis 2 ppm berdasarkan 25% dari nilai LC_{50-96jam}.
3. Menyiapkan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dengan konsentrasi sebesar 50, 100, 150, dan 300 mg/kg BB.
4. Membagi akuarium berdasarkan beberapa perlakuan:
 - a) Kontrol positif = Herbisida 0 ppm + ekstrak pegagan 0 mg/kg BB
 - b) Kontrol negatif = Herbisida 2 ppm + ekstrak pegagan 0 mg/kg BB



- Lalu dibiarkan kurang lebih tiga menit.
- Menunggu sampai nilai yang terbaca benar-benar konstan.
- Kemudian baru dilakukan pencatatan hasil pengukuran suhu dalam $^{\circ}\text{C}$.

4.7.7.2 pH

Menurut Sumardikan (2007), cara penggunaan pH meter yaitu:

- pH meter dikalibrasi dengan memasukkan elektroda pH meter dalam larutan buffer pH 7.
- Knop diatur dengan angka monitor yang tercantum pada pH meter menunjukkan pH 7.
- Kemudian elektroda dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan kertas tisu setelah itu dimasukkan ke sampel yang akan diuji.
- Angka yang terbaca pada layar pH meter dicatat sebagai pH sampel setelah keadaan konstan.

4.7.7.3 DO (Dissolved Oxygen)

Menurut Pratama *et al.* (2012), cara penggunaan DO meter yaitu:

- Alat DO meter dikalibrasi terlebih dahulu.
- Lalu tekan tombol "ON" tunggu sampai terlihat kata "ready".
- Kemudian ujung hitam DO meter dimasukkan kedalam media air percobaan.
- Lalu dibiarkan kurang lebih tiga menit.
- Menunggu sampai nilai yang terbaca benar-benar konstan.
- Kemudian baru dilakukan pencatatan hasil pengukuran DO dalam satuan mg/l.

4.7.8 Pembedahan Ikan Mas

Pembedahan dilakukan setelah 7 hari masa pemaparan dengan tahapan sebagai berikut:



1. Dilakukan pembedahan pada hewan uji dengan membuka daerah perut
2. Diambil dan dipisahkan organ hati
3. Diletakkan pada botol yang berisi PBS
4. Dilakukan pengukuran SOD, dan MDA

4.7.9 Pengukuran Kadar MDA (Malondialdehid)

Stres oksidatif menyebabkan peroksidasi lipid sehingga meningkatkan kadar malondialdehid (MDA). Pengukuran kadar MDA dilakukan setelah pemaparan pada ikan. Pengukuran kadar MDA dilakukan menurut Dwijayanti *et al.* (2015), yaitu:

1. Dibuat homogenat hati dengan mencampurkan 100 mg jaringan hati yang dihomogenisasi dalam 0,1 M buffer penyangga fosfat (PBS) pH 7,4
2. Diencerkan sepuluh kali homogenat sebanyak 200 μ L
3. Ditambahkan asam trikloroasetat (TCA) 10%.
4. Ditambahkan TBA 0,67%
5. Dipanaskan sampel pada suhu 100 °C selama 10 menit.
6. Didinginkan sampel sampai suhu kamar dan disentrifugasi pada 3.000 rpm selama 10 menit.
7. Diambil supernatan untuk mengukur absorbansi pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 530 nm dibandingkan dengan penyerapan standar MDA.
8. MDA diekspresikan dalam ng/ml jaringan hati.

4.7.10 Pengukuran Aktivitas SOD (Superoxide-Dismutase)

Stres oksidatif menyebabkan turunnya aktivitas superoksida dismutase (SOD). Uji aktivitas SOD dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri seperti yang dijelaskan oleh Durak *et al.* (1996). Tahapan yang dilakukan yaitu:



1. Dibuat reagen SOD 2,8 ml (xantine 0,3 mM, EDTA 0,67 mM, 150 μ M nitrotetrazolium blue chloride (NBT), natrium karbonat 0,4 M, albumin 30 mg 30 ml⁻¹).
2. Disiapkan PBS (Buffer Salin)
3. Digerus organ hati dengan menggunakan mortal hingga halus, kemudian ditambahkan PBS sesuai dengan berat hati (0,1 ml)
4. Divortex sampel dan dimasukkan ke dalam tube
5. Ditambahkan 50 μ l xanthine oxidase (10 μ l dalam 2 M amonium sulfat)
6. Divortex sampel sampai homogen
7. Diinkubasi sampel selama 20 menit dengan suhu 25°C
8. Dicampur dengan klorida tembaga 0,1 ml 8 M.
9. Diambil supernatan dari sampel
10. Diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada 560nm

4.7.11 Analisis Data

Analisa data pada penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap faktorial (RALF) dengan pola perlakuan faktorial 3x2 dengan 3 kali pengulangan.

Data di analisa dengan menggunakan teknik analisis statistik berdasarkan prosedur Steel dan Torrie (1995). Analisa ini digunakan untuk mengetahui:

1. Apakah penambahan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dengan tingkatan dosis yang berbeda berpengaruh terhadap nilai SOD?
2. Apakah penambahan dengan tingkatan dosis yang berbeda berpengaruh terhadap nilai SOD?
3. Apakah terdapat interaksi antara penambahan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dengan penambahan herbisida isopropilamina glifosat terhadap nilai SOD yang diperoleh?



Berdasarkan pertanyaan tersebut, maka dilakukan analisis variansi (ANOVA) berdasarkan uji-F. Apabila dari analisis variansi diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata atau sangat berbeda nyata, maka untuk membandingkan nilai dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), untuk mengetahui perlakuan yang mana yang berbeda. Model persamaan RALF secara matematis adalah sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{(ij)k}$$

Keterangan :

- Y_{ijk} = Nilai SOD ke-k yang memperoleh kombinasi perlakuan penambahan ekstrak pegagan ke-i dan penambahan herbisida ke-j
- μ = Nilai rata-rata SOD
- α_i = Pengaruh perlakuan tingkat penambahan ekstrak pegagan ke-i
- β_j = Pengaruh perlakuan tingkat penambahan herbisida ke-j
- $(\alpha\beta)_{ij}$ = Pengaruh interaksi perlakuan ke-i dan ke-j
- $\varepsilon_{(ij)k}$ = Pengaruh galat perlakuan ke-i dan ke-j pada satuan percobaan ke-k

Berdasarkan persamaan diatas, maka dilakukan desain eksperimen tersarang yang disajikan pada **Tabel 3**:

Tabel 2. Susunan RAL dengan Pola Faktorial

Faktor A Ekstrak Pegagan (mg/kg BB)	Faktor B Herbisida (ppm)	Perlakuan (t)	Ulangan (r)			Rata-rata	
			A	B	C		Total
0	0	K+	(K+)A	(K+)B	(K+)C	T(K+)	T(K+)/3
	2	K-	(K-)A	(K-)B	(K-)C	T(K-)	T(K-)/3
50	0	P1	P1A	P1B	P1C	TP1	TP1/3
	2	HP1	HP1A	HP1B	HP1C	THP1	THP1/3
100	0	P2	P2A	P2B	P2C	TP2	TP2/3
	2	HP2	HP2A	HP2B	HP2C	THP2	THP2/3
150	0	P3	P3A	P3B	P3C	TP3	TP3/3
	2	HP3	HP3A	HP3B	HP3C	THP3	THP3/3
300	0	P4	P4A	P4B	P4C	TP4	TP4/3
	2	HP4	HP4A	HP4B	HP4C	THP4	THP4/3

Keterangan =

- A, B, C adalah ulangan (r)
- K+, K-, P1, HP1, P2, HP2, P3, HP3, P4, HP4 adalah perlakuan (t)
- Kontrol positif = Herbisida 0 ppm + ekstrak pegagan 0 mg/kg BB
- Kontrol negatif = Herbisida 2 ppm + ekstrak pegagan 0 mg/kg BB
- Perlakuan P1 = Herbisida 0 ppm + ekstrak pegagan 50 mg/kg BB.
- Perlakuan P2 = Herbisida 0 ppm + ekstrak pegagan 100 mg/kg BB.



- Perlakuan P3 = Herbisida 0 ppm + ekstrak pegagan 150 mg/kg BB.
- Perlakuan P3 = Herbisida 0 ppm + ekstrak pegagan 300 mg/kg BB.
- Perlakuan HP1 = Herbisida 2 ppm + ekstrak pegagan 50 mg/kg BB.
- Perlakuan HP2 = Herbisida 2 ppm + ekstrak pegagan 100 mg/kg BB.
- Perlakuan HP3 = Herbisida 2 ppm + ekstrak pegagan 150 mg/kg BB.
- Perlakuan HP4 = Herbisida 2 ppm + ekstrak pegagan 300 mg/kg BB.

Dari perlakuan diatas, maka dapat dihitung nilai analisis ragam berdasarkan rumus :

- Derajat Bebas :
 - db total = $(a.b.r)-1$
 - db perlakuan = $(ab-1)$
 - db faktor a = $a-1$
 - db faktor b = $b-1$
 - db interaksi faktor a dan b = $(a-1)(b-1)$
 - db galat = $dbt - dbp$
- Faktor Koreksi
 - $FK = Y_{ij}^2/a.b.r$
- Jumlah Kuadrat
 - $JK \text{ Total} = \sum (Y_{ijk})^2 - FK$
 - $JK \text{ Perlakuan} = (\sum (\sum y_j)^2)/r - FK$
 - $JK \text{ Faktor A} = (\sum (\sum y_i)^2)/rb - FK$
 - $JK \text{ Faktor B} = (\sum (\sum y_j)^2)/ra - FK$
 - $JK \text{ Interaksi faktor A dan B} = JKP - JKA - JKB$
 - $JK \text{ Galat} = JKT - JKP$
- Kuadrat Tengah
 - $KT \text{ Perlakuan} = JKP/dbp$
 - $KT \text{ Faktor A} = JKB/dba$
 - $KT \text{ Faktor B} = JKB/dbb$
 - $KT \text{ Interaksi faktor A dan B} = JKA.JKB/dba.dbb$
 - $KT \text{ Galat} = JKG/dbg$

Berdasarkan rumus diatas, selanjutnya dapat dilakukan analisis variansi untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Tabel analisis tersebut dapat dilihat pada

Tabel 4.



Tabel 3. Analysis of Varian (ANOVA)

SK	Db	JK	KT	F Hit	F Tabel	
					5%	1%
Perlakuan	t-1	JKP	JKP/dbp	KTP/KTG		
Faktor A	a-1	JKA	JKA/dba	KTA/KTG		
Faktor B	b-1	JKB	JKB/dbb	KTB/KTG		
Faktor AB	dba*dbb	JKP-JKA-JKB	JKA*JKB/ dba*dbg	KTA*KTB/ KTG		
Galat	dbt - dbp	JKG	JKG/dbg			
Total	Σn-1	JKT				

- Jika F hit > F tabel 5% maka perlakuan berbeda nyata
- Jika F hit < F tabel 5% maka tidak berbeda nyata

Apabila dari hasil analisis tersebut diperoleh hasil berbeda nyata atau berbeda sangat nyata, maka harus dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dari masing-masing perlakuan. Rumus perhitungan uji BNT sebagai berikut :

$$SED = \sqrt{\frac{2KTG}{r}}$$

BNT 5% = t tabel 5% dbg x SED

Kesimpulan:

- Jika selisih ≤ BNT 5% maka non signifikan atau tidak berbeda nyata
- Jika BNT 5% < selisih < BNT 1% maka berbeda nyata

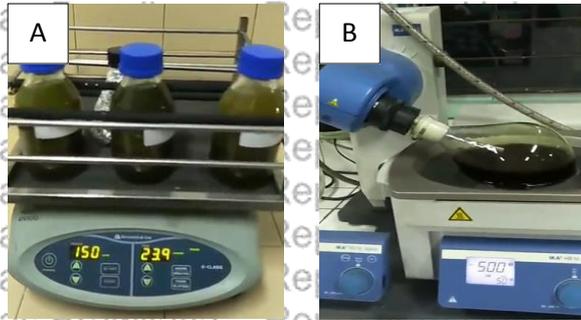
5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Ekstraksi Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)

Simplisia pegagan didapatkan dari Materia Medica, Kota Batu. Proses maserasi menggunakan pelarut etanol p.a dengan perbandingan 1:5. Pelarut etanol digunakan karena memiliki sifat polar. Senyawa aktif dari tanaman pegagan akan lebih mudah larut dalam pelarut yang bersifat polar. Ekstrak pegagan dengan menggunakan berbagai pelarut polar, seperti metanol juga telah dilakukan oleh Zainol *et al*, (2003) dan Jayathirtha dan Mirsha (2004). Selain itu, Abdul-Hamid *et al*, (2002) telah mengekstraksi akar tanaman pegagan dengan pelarut etanol. Proses evaporasi dilakukan setelah proses maserasi selesai. Evaporasi dilakukan untuk menguapkan pelarut dengan menggunakan rotary evaporator pada kecepatan 90 bar. Maserat pegagan dengan pelarut etanol menghasilkan ekstrak dalam bentuk pasta sebanyak 7 gram.

Ekstraksi pegagan menggunakan metode maserasi meliputi pemisahan senyawa bioaktif jaringan tanaman dari komponen inaktif / inert dengan menggunakan pelarut selektif. Pelarut terdifusi ke material tanaman yang padat selama ekstraksi. Proses ini membuat senyawa dengan polaritas serupa lebih mudah larut. Metode ini paling cocok untuk digunakan dalam kasus obat-obatan thermolabile (Ncube *et al*, 2008). Tujuan prosedur ekstraksi tanaman herbal adalah untuk menghilangkan bahan yang tidak diinginkan dan mendapatkan bagian yang penting dengan sifat terapeutik. Jenis ekstraksi, waktu, suhu, sifat pelarut, konsentrasi konsentrat dan polaritas dapat mempengaruhi kuantitas dan ekstrak metabolit sekunder (Tiwari *et al*, 2011). Toksisitas yang rendah, mudahnya penguapan pada suhu rendah, penyerapan fisiologis yang cepat dari ekstrak, tindakan pengawetan, ketidakmampuan untuk menyebabkan ekstrak menjadi kompleks atau berdisosiasi adalah beberapa sifat dari pelarut yang baik

dalam ekstraksi tanaman (Eloff, 1998). Berdasarkan literatur tersebut maka ekstrak pegagan dengan pelarut etanol merupakan ekstrak yang memenuhi syarat untuk diproduksi secara masal. Proses maserasi dan evaporasi dapat dilihat pada **Gambar 16**.



Gambar 1. (A) Proses Maserasi dan (B) Proses Evaporasi.
(Sumber: Dokumentasi pribadi)

5.2 Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak etanol tanaman pegagan. Berdasarkan penelitian sebelumnya, senyawa bioaktif pada *C. asiatica* yang utama adalah senyawa triterpen seperti asiaticoside, madecassoside, asiatic acid, dan madecassic acid (Shukla *et al*, 1999). Oleh karena itu, dilakukan skrining fitokimia pada senyawa aktif golongan flavonoid, alkaloid, terpenoid, tanin, dan saponin. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa ekstrak etanol pegagan positif mengandung alkaloid, tanin, saponin, flavonoid, dan terpenoid. Berdasarkan penelitian sebelumnya, senyawa bioaktif pada *C. asiatica* yang utama adalah senyawa triterpen seperti asiaticoside, madecassoside, asiatic acid, dan madecassic acid (Shukla *et al*, 1999).

Telah dilaporkan juga bahwa *Asiaticoside* (Mustafa *et al*, 2010) dan flavonoid (Korkina dan Afanasev, 1997) memiliki efek penyembuhan luka yang disebabkan oleh kandungan antioksidannya. Flavonoid adalah antioksidan alami dari tumbuhan. Telah dilaporkan bahwa flavonoid bertanggung jawab atas efek



pengikatan radikal karena kandungan hidroksilnya (Hanasaki *et al*, 1994). Beberapa flavonoid dapat mengikat superoksida, dan flavonoid lainnya dapat mengikat peroksinitrit. Peroksinitrit adalah radikal turunan oksigen yang sangat reaktif (DeGroot, 1994). Penelitian sebelumnya mengatakan bahwa flavones dan catechins adalah flavonoid yang paling kuat melawan ROS (Cui *et al*, 2006). Hasil identifikasi ekstrak etanol pegagan dapat dilihat pada **Tabel 5**.

Tabel 1. Perubahan Warna pada Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)

Nama Sampel	Flavonoid	Alkaloid		
		Pereaksi Meyer	Pereaksi Dragendrof	Pereaksi Bouchardat
Pegagan (<i>C. asiatica</i> , <i>Linn</i>)				
	Terpenoid	Tanin	Saponin	
				

Alkaloid juga menunjukkan kekuatan pengikatan radikal yang kuat. Aktivitas sitotoksik, antimikroba, dan antiretroviral mereka terkait dengan aktivitas pengikatan radikal (Gu *et al*, 2008). Lebih lanjut, tannin menunjukkan aktivitas antioksidan berdasarkan laju peroksidasi lipid (Hagerman *et al*, 1998). Tannin, atau polifenol polimerik adalah antioksidan yang lebih kuat daripada fenolat monomerik sederhana. Ini karena berat molekulnya yang tinggi dan kedekatan dari banyak cincin aromatik dan gugus hidroksil (Chan *et al*, 2014). Selanjutnya, penelitian sebelumnya mengklaim bahwa saponin berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan pada ekstrak biji kenaf yang dihilangkan lemaknya. Pemurnian saponin secara signifikan meningkatkan aktivitas antioksidan primer



(Atanassova *et al*, 2011). Oleh karena itu, senyawa bioaktif berpotensi digunakan sebagai bahan antioksidan. Hasil skrining fitokimia ekstrak pegagan dapat dilihat pada **Tabel 6**

Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)

Senyawa Aktif	Pereaksi	Hasil	Kesimpulan
Alkaloid	Bouchardat	Berwarna cokelat	+ (Positif)
Tanin	FeCl ₃ 1%	Berwarna hijau kehitaman	+ (Positif)
Saponin	Air + HCl Pekat	Terdapat busa permanen	+ (Positif)
Flavonoid	HCL Pekat + Mg	Berwarna merah muda	+ (Positif)
Terpenoid	Etanol + Asam anhidrat + HCl	Berwarna jingga kecoklatan	+ (Positif)

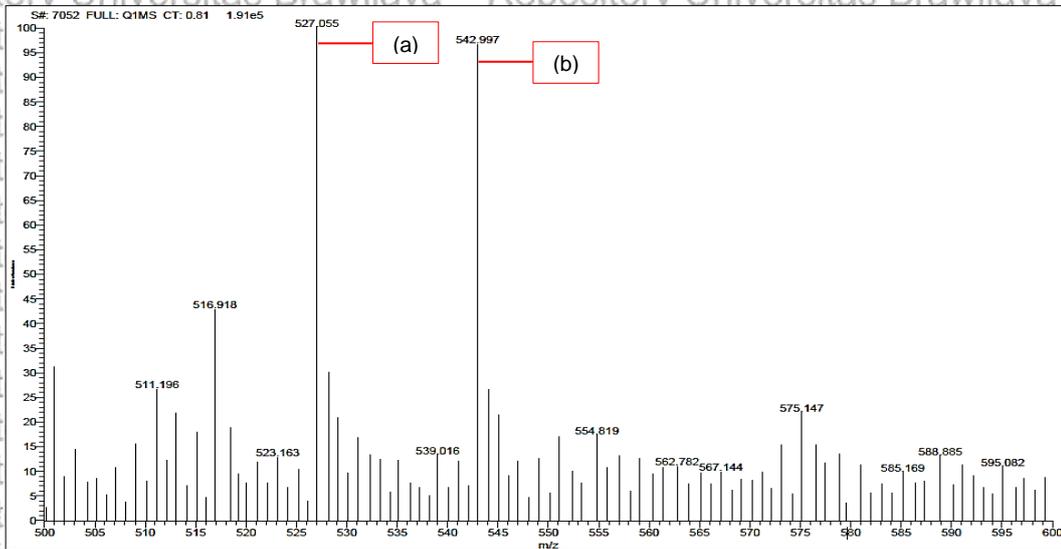
5.3 Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) menggunakan *Mass Spectrometry*

Mass spectrometry digunakan untuk mengidentifikasi senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak etanol pegagan. Berdasarkan penelitian sebelumnya, senyawa bioaktif pada *C. asiatica* yang utama adalah senyawa triterpen seperti asiaticoside, madecassoside, asiatic acid, dan madecassic acid (Shukla *et al*, 1999). Oleh karena itu, dilakukan uji menggunakan *Mass spectrometry* dengan merk TSQ Quantum Acces Max (*Triple Quadropole*) pada berat molekul antara 400 - 1000 dengan probe HESI dan mode positif serta laju alir 5 μ l/menit. Berdasarkan hasil analisa menggunakan spektrofotometri massa pada ekstrak etanol pegagan, dapat ditemukan beberapa senyawa utama yang biasa ditemukan di dalam tanaman pegagan, yakni *madecassic acid*, *asiatic acid*, *madecassoside* dan *asiaticoside*.

Berdasarkan **Gambar 17**, *Madecassic acid* atau asam madekasik memiliki *peak* (puncak) tertinggi (a) dengan berat molekul 527 m/z. Saat proses pendeteksian terjadi ionisasi dengan Natrium (Na), oleh karena itu berat molekul dari asam madekasik sebesar 504 m/z ditambah dengan berat molekul Na sebesar 23 m/z sehingga asam madekasik terdeteksi pada berat molekul 527



m/z. Hasil pendeteksian asam madekasik menggunakan *Mass spectrometry* dapat dilihat pada **Gambar 17**.



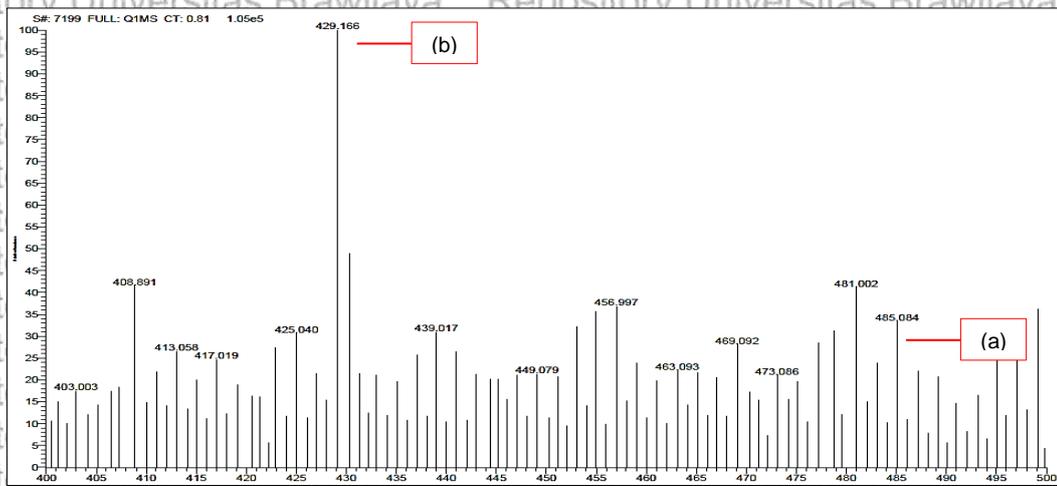
Gambar 2. Analisa spektrofotometri massa ekstrak etanol pegagan (*C. asiatica*) pada berat molekul antara 400 - 1000 m/z yang mendeteksi asam madekasik (a) M+Na dan (b) M+K.

Selain Na, asam madekasik juga terionisasi dengan Kalium (K) yang memiliki berat molekul sebesar 39 m/z sehingga terdeteksi pada berat molekul 543 m/z. Hal ini sesuai dengan penelitian Jian *et al.* (2007) yang mendeteksi adanya asam madekasik pada ekstrak pegagan dengan menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Hasil pengisolasian asam madekasik menunjukkan bahwa senyawa ini memiliki sifat anti-inflamasi yang disebabkan oleh iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , dan penghambatan IL-6 melalui penurunan regulasi aktivasi NF- κ B pada sel makrofag RAW 264,7 (Won *et al.*, 2009).

Selain asam madekasik, juga terdeteksi adanya senyawa asam asiatik pada ekstrak etanol pegagan yang dapat dilihat pada **Gambar 18**. Asam asiatik adalah konstituen yang paling menonjol dari saponin *Centella* dan merupakan triterpenoid pentasiklik alami. Senyawa ini memiliki spektrum aktivitas biologis yang luas, terutama antikanker, anti-inflamasi dan penyembuhan luka,



antidiabetes, antioksidan dan hepatoprotektif, virus anti-hepatitis C (HCV), dan neuroprotektif, di antaranya. Secara kimiawi, asam asiatic (2,3,23-trihidroksi-urs-12-ene-28-oic-acid) adalah bentuk aglikon dari asiaticosida dan mudah dibentuk dengan menghidrolisis bagian gula dari struktur asiaticosida dalam kondisi asam (Lv *et al*, 2017). Senyawa lain yang terdeteksi pada 429 m/z adalah senyawa *cycloartenol*. Senyawa ini merupakan salah satu senyawa dari golongan triterpenoid. Penelitian sebelumnya telah mengemukakan bahwa *cycloartenol* memiliki sifat sebagai antidiabetik (Tanaka *et al*, 2006), berperan dalam pencegahan hiperglikemia, mengurangi hiperlipidemia, memperbaiki stosis hati dan akumulasi lemak visceral pada tikus (Misawa *et al*, 2012). Hasil pendeteksian asam asiatic dan *Cycloartenol* menggunakan *Mass spectrometry* dapat dilihat pada **Gambar 18**.

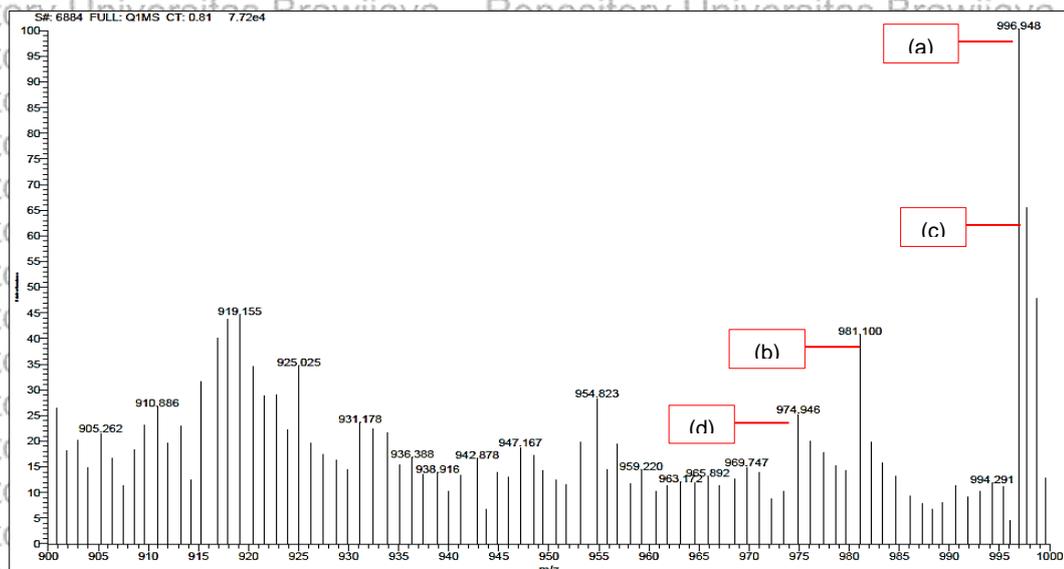


Gambar 3. Analisa spektrofotometri massa ekstrak etanol pegagan (*C. asiatica*) pada berat molekul antara 400 - 500 m/z yang mendeteksi (a) Asam asiatic M+H dan (b) *Cycloartenol*.

Senyawa asiaticosida dan madekosida merupakan senyawa utama lain yang terdapat di dalam pegagan. Menurut Das dan Mallick (1991) kandungan senyawa asiaticosida tergantung pada lokasi tumbuhnya. Tumbuhan yang tumbuh pada lokasi yang lebih tinggi mengandung lebih banyak asiaticosida dari pada tanaman yang tumbuh di lokasi yang lebih rendah. Asiaticosida yang



diisolasi dari *C. asiatica* menunjukkan sintesis kolagen tipe I pada sel fibroblast dermal manusia. Penuaan kulit menjadi terlihat karena penurunan kadar kolagen tipe I (Lee *et al.* 2006). Asiatikosida yang memiliki berat molekul 959 m/z terdeteksi pada *peak* tertinggi (a) yang menunjukkan angka 997. Hal ini disebabkan karena penambahan berat molekul kalium (K) sebesar 38 m/z. Dimungkinkan telah terjadi ionisasi antara asiatikosida dengan kalium. Asiatikosida juga terdeteksi pada *peak* b yang menunjukkan angka 981 m/z. Dimungkinkan juga telah terjadi ionisasi antara asiatikosida dengan natrium (Na) sehingga berat molekulnya bertambah sebanyak 22 m/z sebagai berat molekul Na. Madekosida yang memiliki berat molekul sebesar 975 m/z terdeteksi pada *peak* c. Selain itu, madekosida juga terdeteksi pada *peak* d dengan angka 998 m/z. Selisih angka sebanyak 23 disebabkan karena madekosida mengalami ionisasi dengan natrium (Na) yang memiliki berat molekul 23 m/z. Asiatikosida dan madekosida merupakan glikosida triterpen yang diakui sebagai komponen biomarker dan telah dibuktikan sebagai senyawa yang memiliki efek farmakologis (Hashim *et al.* 2011)



Gambar 4. Analisa spektrofotometri massa ekstrak etanol pegagan (*C. asiatica*) pada berat molekul antara 900 - 1000 m/z yang mendeteksi asiatikosida (a) M+K, dan (b) M+Na, serta (c) madekosida, dan (d) Madekosida M+Na



5.4 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*)

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan untuk membuktikan bahwa ekstrak etanol pegagan memiliki sifat antioksidan. Hal ini ditunjukkan dengan adanya nilai IC_{50} , yakni persentase penghambatan (inhibisi) sebesar 50% pada senyawa radikal bebas. DPPH adalah radikal bebas yang stabil dengan warna ungu tua. Cairan DPPH akan kehilangan warna violetnya jika dicampur dengan zat yang menyumbangkan atom hidrogen (Kedare dan Singh, 2011). Radikal bebas yang digunakan adalah 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) yang dapat dilihat pada **Gambar 20** dengan konsentrasi 0,1 mM. Konsentrasi sampel ekstrak etanol pegagan yang digunakan sebesar 10, 50, 100, 150, dan 200 $\mu\text{g/mL}$.



Gambar 5. Larutan DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

DPPH adalah metode yang mudah, cepat, dan murah untuk mengukur kapasitas antioksidan secara keseluruhan (Prakash 2001). Metode ini juga digunakan untuk mengukur antioksidan dalam sistem biologis yang kompleks, baik sampel padat atau cair (Sendra *et al*, 2006). Metode DPPH hanya digunakan dalam larutan dan pelarut organik nonpolar. Metode ini dapat memeriksa antioksidan hidrofilik dan lipofilik (Prior *et al*, 2005). Uji DPPH telah digunakan untuk memeriksa sifat antioksidan gandum dan dedak, sayuran, herbal, dan tepung dengan beberapa pelarut yang berbeda seperti etanol, acetone cair, metanol, alkohol cair dan benzena (Yu 2001, Parry *et al*, 2005). Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan, ekstrak etanol pegagan



dengan konsentrasi sebesar 10 ppm memiliki nilai persentase inhibisi terendah sebesar 31,9 %. Konsentrasi 50 ppm memiliki persentase inhibisi sebesar 40,62 %, dan pada konsentrasi 100 ppm sebesar 47,52 %, sedangkan pada 150 ppm terdeteksi sebesar 56,11 %. Konsentrasi tertinggi, yakni 200 ppm memiliki nilai persentase inhibisi tertinggi yakni sebesar 57,42 %. **Tabel 7** menunjukkan konsentrasi, absorbansi serta persentase inhibisi dari ekstrak etanol pegagan terhadap radikal bebas (DPPH). Perhitungan uji antioksidan dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

Tabel 3. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Pegagan

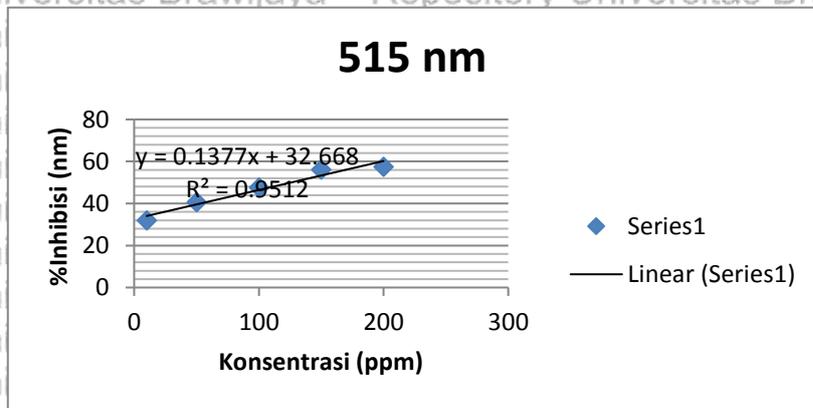
Konsentrasi ekstrak etanol pegagan (ppm)	Absorbansi	Inhibisi (%)
Kontrol	0,768	-
10	0,520	32,292
50	0,456	40,625
100	0,403	47,526
150	0,337	56,120
200	0,327	57,422

C. asiatica ekstrak sebagai antioksidan yang menyumbangkan proton ke DPPH. Warna campuran antara larutan DPPH dan ekstrak etanol dari *C. asiatica* menghasilkan warna kuning kehijauan. Warna larutan akan lebih kuning jika konsentrasi ekstrak lebih tinggi. Berdasarkan Tabel 8, ekstrak etanol *C. asiatica* dengan dosis 10, 50, 100, 150, dan 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ memiliki persentase penghambatan masing-masing sebesar 32,29, 40,62, 47,52, 56,12, dan 57,42%.

Semakin tinggi konsentrasi sampel, maka semakin tinggi pula persentase inhibisinya. Selanjutnya, kurva regresi dibuat antara konsentrasi (x) dan persentase penghambatan (y), sehingga persamaan regresi adalah $y = 0,1337x + 32,668$ dengan $\text{IC}_{50} = 125,87 \mu\text{g mL}^{-1}$. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol *C. asiatica* tergolong aktif sedang. Menurut Molyneux (2004), sifat antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} dapat dibagi menjadi beberapa golongan. Nilai



$IC_{50} < 50 \mu g mL^{-1}$ tergolong sangat kuat, $50 - 100 \mu g mL^{-1}$ tergolong kuat, $100 - 150 \mu g mL^{-1}$ tergolong sedang, dan $150 - 200 \mu g mL^{-1}$ tergolong lemah. Kurva regresi hasil uji aktivitas antioksidan dapat dilihat pada **Gambar 21**.



Gambar 6. Kurva Regresi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Pegagan

Penelitian ini menunjukkan hasil yang berbeda dari penelitian sebelumnya, yang mengklaim bahwa nilai IC_{50} dari ekstrak etanol *C. asiatica* adalah $35,6 \pm 1,3 \mu g mL^{-1}$ (Sugunabai *et al*, 2015). Penelitian lain memiliki hasil yang serupa untuk IC_{50} ekstrak air dari *C. asiatica* adalah $30 \mu g mL^{-1}$ (Kundu *et al*, 2015). Penelitian sebelumnya oleh Andarwulan *et al*, (2015) menyatakan bahwa ekstrak etanol *C. asiatica* dalam tipe ekosistem yang berbeda juga memiliki nilai IC_{50} yang berbeda. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa kandungan fenolik yang lebih tinggi dalam ekstrak bertepatan dengan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Beberapa faktor yang berkontribusi terhadap variasi antioksidan dan nutriennya adalah perbedaan iklim, geografis, tahunan, kondisi tanah, serta penggunaan pestisida.



5.5 LC₅₀ Herbisida Roundup dengan Bahan Aktif Isopropilamina Glifosat pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Menurut WHO (1994), glifosat merupakan senyawa yang cukup toksik bagi biota akuatik namun Roundup dianggap lebih beracun daripada glifosat karena mengandung surfaktan polyoxyethylene amine (POEA) (Amarante *et al*, 2002). Penelitian yang dilakukan Lushchak *et al*, (2009) menunjukkan bahwa Roundup memiliki efek yang merugikan pada ikan. Uji pendahuluan yang dilakukan sebelum uji toksisitas akut bertujuan untuk mengetahui konsentrasi ambang batas atas dan ambang batas bawah toksisitas herbisida Roundup dengan bahan aktif Isopropilamina Glifosat. Konsentrasi yang menyebabkan mortalitas hewan uji merupakan konsentrasi ambang batas atas. Konsentrasi ambang batas bawah didapatkan dari konsentrasi tertinggi yang dapat menyebabkan seluruh hewan uji hidup setelah pemaparan selama 48 jam (Agusnar, 2008). Data presentase mortalitas pada uji pendahuluan ditampilkan pada **Tabel 8**.

Tabel 4. Data Mortalitas Ikan Mas pada Uji Pendahuluan

Konsentrasi (ppm)	Σ Ikan Mas	Mortalitas Ikan pada Uji Pendahuluan (Ekor/Jam)				% Mortalitas
		24 jam	48 jam	72 jam	96 jam	
Kontrol	10	0	0	0	0	0
0,1	10	0	0	0	0	0
1*	10	0	0	0	0	0
10**	10	0	2	5	8	80
100	10	10	0	0	0	100

Keterangan : * = ambang batas bawah

** = ambang batas atas

Tabel 8 menunjukkan bahwa pada perlakuan kontrol hingga konsentrasi 1 ppm tidak terdapat mortalitas hewan uji. Konsentrasi 10 ppm menunjukkan mortalitas yang berjumlah 8 ekor (80%). Seluruh hewan uji (10 ekor) mengalami mortalitas pada konsentrasi 100 ppm. Mortalitas yang ditemukan pada konsentrasi 100 ppm terjadi selama paparan 24 jam. Pada paparan 48 jam



hanya 2 hewan uji yang mati yaitu pada konsentrasi 10 ppm. 24 jam kemudian, yakni paparan selama 72 jam terjadi mortalitas lagi pada konsentrasi 10 ppm sebanyak 3 ekor. Hari terakhir, yaitu setelah paparan selama 96 jam, terjadi mortalitas pada konsentrasi yang sama (10 ppm) sebanyak 3 ekor, sehingga jumlah seluruh hewan uji yang mati berjumlah 8 ekor, dengan persentase mortalitas sebesar 80%. Berdasarkan data tersebut, dapat ditentukan bahwa konsentrasi 1 ppm merupakan konsentrasi ambang batas bawah, sedangkan konsentrasi 10 ppm merupakan konsentrasi ambang batas atas untuk uji LC₅₀ herbisida Roundup. Pemaparan ikan mas dengan herbisida Roundup dapat dilihat pada **Gambar 22**.



Gambar 7. Uji LC₅₀ Herbisida Roundup pada Ikan Mas

Setelah didapatkan ambang batas atas dan bawah dari uji pendahuluan, maka dilakukan uji toksisitas akut (LC₅₀). Konsentrasi paparan yang digunakan yaitu 1,35 ppm, 1,8 ppm, 2,4 ppm, 3,2 ppm, 4,2 ppm, 6,5 ppm, dan 8,7 ppm. Perhitungan pengenceran herbisida dapat dilihat pada **Lampiran 2**, sedangkan penentuan konsentrasi paparan ini berdasarkan Tabel skala Rand yang dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

Tidak ditemukan kematian pada perlakuan kontrol, konsentrasi 1,35 ppm, 1,8 ppm, 2,4 ppm, dan pada 3,2 ppm. Ditemukan kematian ikan mas sebanyak 1 ekor pada konsentrasi 4,2 ppm, maka didapatkan persentase kematian sebesar 10%. Didapatkan juga kematian ikan mas berjumlah 2 ekor



pada konsentrasi 6,5 ppm, sehingga nilai persentase kematiannya adalah 20%.

Kematian ikan mas pada konsentrasi 8,7 ppm sebanyak 6 ekor, sehingga diperoleh nilai persentase kematiannya sebesar 60%. Hasil persentase mortalitas pada masing- masing konsentrasi pemaparan dapat dilihat pada **Tabel 9**.

Tabel 5. Data Mortalitas Ikan Mas pada Uji Toksisitas Akut Herbisida Roundup

Konsentrasi (ppm)	Σ Ikan Mas	Mortalitas Ikan pada Uji LC50 (Ekor/Jam)				% Mortalitas
		24 jam	48 jam	72 jam	96 jam	
0	10	0	0	0	0	0
1,35	10	0	0	0	0	0
1,8	10	0	0	0	0	0
2,4	10	0	0	0	0	0
3,2	10	0	0	0	0	0
4,2	10	0	0	0	1	10
6,5	10	0	0	1	2	20
8,7	10	10	1	3	6	60

Berdasarkan data tersebut, dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi tingkat konsentrasi paparan herbisida *Roundup* yang diberikan, maka semakin tinggi tingkat kematian ikan mas. Selain itu, pada konsentrasi yang tinggi, ikan mas mengalami mortalitas lebih cepat jika dibandingkan dengan konsentrasi yang lebih rendah. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa semakin lama waktu paparan herbisida *Roundup* dengan ikan mas, maka kematiannya juga akan semakin meningkat. Hasil pengamatan tingkah laku ikan mas pada saat uji LC₅₀ dapat dilihat pada **Tabel 10**.

Tabel 6. Pengamatan Tingkah Laku Ikan Mas pada Uji LC₅₀ Herbisida Roundup

Konsentrasi (ppm)	Tingkah Laku Ikan Mas
0	Pergerakan normal ke atas dan ke dasar bak, operculum membuka dan menutup dengan normal sampai hari terakhir.
1,35	Pergerakan normal ke atas dan ke dasar bak, operculum membuka dan menutup dengan normal sampai hari terakhir.
1,8	Pergerakan normal ke atas dan ke dasar bak, operculum membuka dan menutup dengan normal sampai hari terakhir.



Tabel 10. Lanjutan
Konsentrasi (ppm)

Tingkah Laku Ikan Mas

2,4

Pergerakan normal ke atas dan ke dasar bak, operculum membuka dan menutup dengan normal sampai hari terakhir.

3,2

Pergerakan normal ke atas dan ke dasar bak, operculum membuka dan menutup dengan normal sampai hari terakhir.

4,2

- Pergerakan normal sampai 72 jam
- Pada 96 jam, terdapat 1 ikan yang berenang dengan lambat, kemudian melayang-layang di kolom perairan dengan operculum yang membuka dan menutup dengan cepat. Beberapa waktu kemudian ikan tersebut mati.

6,5

- Pergerakan normal sampai 48 jam.
- Terdapat beberapa ikan yang berenang dengan cepat ke atas dan ke bawah, operculum membuka dan menutup dengan cepat, kemudian melayang di permukaan bak. Beberapa menit kemudian mati pada 72 jam.
- Pergerakan melambat, melayang di kolom perairan dan terdapat beberapa yang tergelatak di dasar bak kemudian mati beberapa saat kemudian pada 96 jam.

8,7

- Pergerakan normal pada 24 jam.
- Pergerakan mulai tidak stabil, operculum membuka dan menutup dengan cepat, serta terdapat 1 ikan yang melompat keluar dari bak kemudian mati pada 48 jam.
- Pergerakan mulai melambat, berenang ke permukaan bak dan terdapat beberapa ekor ikan yang lemas dan beberapa saat kemudian mati pada 72 jam.
- Hampir tidak bergerak, melayang pada permukaan, operculum masih membuka dan menutup dengan lambat namun lama kelamaan mati pada hari terakhir (96 jam).

Nilai LC_{50} diketahui berdasarkan total mortalitas ikan mas, kemudian dilakukan perhitungan menggunakan analisis probit. Rata-rata mortalitas yang berasal dari ulangan 1, 2, dan 3 kemudian dicari persentase kematian dan persentase koreksi kematiannya. Persentase koreksi kematian dikonversi ke probit (y) dari tabel transformasi probit yang dapat dilihat dari **Lampiran 4**. Sedangkan nilai x didapatkan dari Log konsentrasi paparan yang digunakan dalam uji toksisitas akut. Setelah didapatkan nilai x dan y, dilakukan analisis regresi. Berdasarkan hasil regresi, diperoleh rumus $Y = 0,64 + 4,73x$. Nilai Y



adalah 5. Angka 5 merupakan nilai konversi probit dari 50 yang merupakan 50% kematian ikan mas. Melalui rumus regresi tersebut, diketahui nilai X adalah sebesar 0,92. Nilai LC_{50} diperoleh dari antilog 0,92, yaitu 8,32 ppm. Perhitungan analisis probit ini dapat dilihat pada **Lampiran 5**. Jadi dapat disimpulkan bahwa toksisitas akut herbisida *Roundup* berbahan aktif Isopropilamina glifosat terhadap ikan mas adalah sebesar 8,32 ppm. Berdasarkan kriteria daya racun lethal pestisida menurut Rudiyantri dan Ekasari (2009), toksisitas herbisida *Roundup* berbahan aktif Isopropilamina glifosat ini termasuk dalam golongan pestisida yang memiliki daya racun tinggi, yaitu antara 1-10 mg/L.

Monitoring kualitas air juga dilakukan pada uji toksisitas akut. Hal ini dilakukan karena jika kualitas air media pemeliharaan tidak memenuhi syarat kelangsungan hidup ikan mas, maka faktor penyebab kematian ikan mas tersebut tidak murni disebabkan oleh paparan herbisida. Kegiatan pengukuran kualitas air yang meliputi suhu, pH dan DO ini dilakukan setiap hari selama 4 hari pada pukul 17.00 WIB. Pengukuran parameter tersebut dilakukan secara langsung pada bak-bak pemeliharaan. Kisaran hasil pengukuran kualitas air dapat dilihat pada **Tabel 11**.

Tabel 7. Kisaran Pengukuran Kualitas Air pada Uji LC_{50} Herbisida *Roundup*

Konsentrasi (ppm)	Parameter		
	Suhu (°C)	pH	DO (mg/l)
0	24,2-27,8	7,29-7,76	7,9-8,7
1,35	24,2-27,9	7,30-7,82	6,7-7,4
1,8	24,6-24,8	7,26-7,79	7,7-8,3
2,4	24,6-28,1	7,25-7,53	7,7-8,0
3,2	24,4-28,2	7,29-7,63	6,7-7,4
4,2	24,5-28,2	7,32-7,61	7,9-8,7
6,5	24,8-28,2	7,29-7,63	7,7-8,0
8,7	24,7-28,0	7,32-7,63	7,7-8,3



5.6 LD₅₀ Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Uji LD₅₀ merupakan dosis tunggal yang diperoleh dari suatu zat yang dapat kematian 50% hewan uji melalui metode oral. LD₅₀ dinyatakan dalam mg/kg. Tujuan dari pengujian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol pegagan yang aman untuk diaplikasikan pada ikan mas. Metode yang digunakan untuk uji LD₅₀ adalah metode *Fix Dose Procedure Acute Oral Toxicity* menurut OECD 420. Bagan *Fix dose procedure* dapat dilihat pada **Lampiran 6**.

Uji ini menggunakan 4 dosis, yakni 5, 50, 300, dan 2000 mg/kg, dengan dosis batasan yang paling tinggi adalah 5000 mg/kg (*limit dose*). Perhitungan untuk dosis LD₅₀ dapat dilihat pada **Lampiran 7**. Sebelum pemberian ekstrak secara oral, ikan dipuasakan selama satu hari, kemudian ikan diberi makan 4 jam setelah pemberian ekstrak. Pemberian ekstrak pada hewan uji tidak boleh melebihi 24 jam. Dosis yang diberikan juga tidak boleh melebihi 1 ml/ 100 g berat badan. Perlakuan uji toksisitas akut oral pada hewan uji dapat dilihat pada

Gambar 23.



Gambar 8. Perlakuan LD₅₀ Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Ekstrak etanol pegagan diberikan satu kali (*single dose*) pada pukul 9 pagi. Setelah pemberian ekstrak, dilakukan pengamatan tingkah laku dan mortalitas pada ikan selama 48 jam. Pengamatan ini meliputi, apakah terjadi mortalitas, timbul gejala keracunan pada ikan sehingga dapat dipastikan bahwa



ikan akan mengalami kematian pada dosis yang lebih tinggi (*Evident toxicity*), ataupun terjadi kematian sebelum waktu pengamatan yang direncanakan (*Impending death*). Data mortalitas pada uji LD₅₀ ekstrak etanol pegagan dapat dilihat pada **Tabel 12**.

Tabel 8. Data Mortalitas Ikan Mas pada Uji LD₅₀ Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)

Konsentrasi (mg/kg)	Σ Ikan Mas	Mortalitas Ikan pada Uji LD ₅₀ (Ekor)		% Mortalitas	Keterangan
		24 jam	48 jam		
Kontrol	10	0	0	0	
5	10	0	0	0	
50	10	0	0	0	
300	10	0	0	0	<i>Evident Toxicity</i>
2000	10	10	0	100	<i>Maribound status</i>

Berdasarkan data mortalitas pada **Tabel 12**, dapat diketahui bahwa tidak terjadi mortalitas hingga 48 jam pada perlakuan kontrol, konsentrasi 5, 20, dan 300 mg/kg. Namun pada konsentrasi 300 mg/kg timbul gejala keracunan (*evident toxicity*) pada pengamatan 24 jam. Seluruh ikan mas mati ± 3 jam setelah pemberian ekstrak pada dosis 2000 mg/kg. Kondisi ini disebut *maribound status*, yaitu suatu kondisi dimana ikan sebagai hewan uji mengalami mortalitas dan tidak mampu lagi bertahan hidup walaupun diberi obat.

Berdasarkan pengamatan tingkah laku dapat diketahui bahwa pada dosis 300 mg/kg telah terjadi gejala keracunan, sehingga dapat disimpulkan bahwa jika melebihi 300 mg/kg, ikan mas akan mengalami kematian. Hal tersebut yang mendasari pemilihan dosis untuk uji in-vivo (uji tantangan) selanjutnya. Dosis yang digunakan harus aman dan tidak menimbulkan kematian pada ikan mas. Praptiwi *et al.* (2010) melakukan uji toksisitas (LD₅₀) ekstrak pegagan pada mencit dengan nilai LD₅₀ sebesar 13,6 g/kg BB. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak pegagan termasuk dalam kategori toksisitas rendah (5-15 g/kg BB). Hasil pengamatan



tingkah laku ikan mas saat pengujian LD₅₀ ekstrak etanol pegagan dapat dilihat pada Tabel 13.

Tabel 9. Pengamatan Tingkah Laku Ikan Mas pada Uji LD₅₀ Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)

Konsentrasi (ppm)	Tingkah Laku Ikan Mas
Kontrol	Pergerakan normal ke atas dan ke dasar bak, operculum membuka dan menutup dengan normal sampai hari terakhir.
5	Pergerakan normal ke atas dan ke dasar bak, operculum membuka dan menutup dengan normal sampai hari terakhir.
50	Pergerakan normal ke atas dan ke dasar bak, operculum membuka dan menutup dengan normal sampai hari terakhir.
300	<ul style="list-style-type: none"> • Ikan tampak melayang dan berenang lambat setelah pemberian ekstrak • Setelah 24 jam ikan kembali berenang dengan normal
2000	<ul style="list-style-type: none"> • Pergerakan melambat, ikan melayang-layang setelah pemberian ekstrak. • Operculum membuka dan menutup dengan cepat, beberapa jam kemudian mati tergelatak di dasar akuarium.

Selain pengamatan tingkah laku, juga dilakukan pengukuran kualitas air pada uji LD₅₀ ekstrak etanol pegagan. Hal ini dilakukan untuk mengontrol media hidup hewan uji agar sesuai dengan kemampuan hidupnya. Kisaran pengukuran kualitas air dapat dilihat pada Tabel 14.

Tabel 10. Kisaran Pengukuran Kualitas Air pada Uji LD₅₀ Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)

Konsentrasi (ppm)	Parameter		
	Suhu (°C)	pH	DO (mg/l)
Kontrol	24,6-27,7	7,2-7,6	6,7-7,4
5	24,2-27,6	7,3-7,8	7,9-8,7
50	24,4-27,6	7,2-7,6	7,7-8,0
300	24,6-28,3	7,2-7,5	7,7-8,3
2000	24,4-28,0	7,2-7,6	7,5-8,0

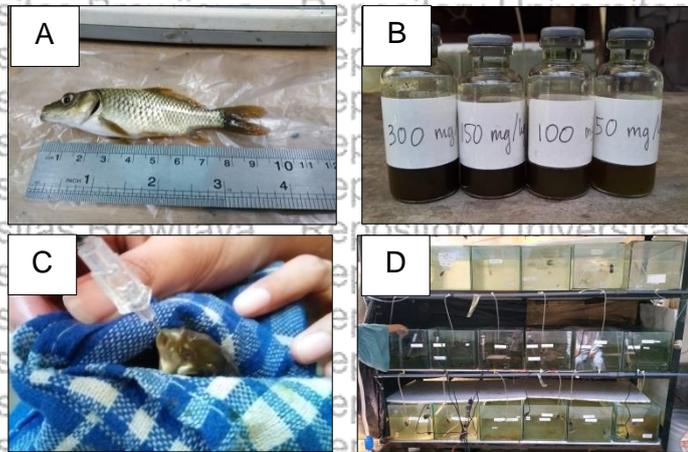


5.7 Uji In-vivo pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Uji in-vivo pada penelitian ini meliputi pemberian ekstrak etanol pegagan dan herbisida Roundup berbahan aktif Isopropilamina glifosat pada ikan mas.

Ikan mas yang digunakan berukuran 7-9 cm. Pemberian ekstrak etanol pegagan dengan metode oral menggunakan sonde mencit. Ekstrak langsung dimasukkan melalui mulut ikan. Uji ini menggunakan 4 dosis yang berbeda, yakni 50, 100, 150, dan 300 mg/kg. Perhitungan dosis untuk uji in-vivo dapat dilihat pada **Lampiran 8**. Dosis tertinggi merupakan dosis aman yang tidak mematikan ikan.

Dosis ini didapatkan dari hasil uji LD₅₀ ekstrak etanol pegagan. Ekstrak diberikan 3 hari sekali sebanyak 5 kali. Herbisida Roundup diberikan pada hari ke-4 hingga hari ke-14. Dosis untuk pemaparan herbisida Roundup adalah 25% dari nilai LC₅₀ yaitu 2 ppm. Kegiatan uji in-vivo pada ikan mas dapat dilihat pada **Gambar 24**.



Gambar 9 (A) Ikan mas ukuran 9 cm, (B) Dosis ekstrak etanol pegagan yang diberikan, (C) Pemberian ekstrak etanol pegagan pada ikan mas dengan metode oral dan (D) Perlakuan uji in-vivo ikan mas.

Uji tantangan ini dilakukan selama 14 hari. Selama perlakuan, terdapat beberapa ikan yang mengalami kematian pada masing-masing perlakuan. Pada perlakuan kontrol, yang hanya diberi pakan tidak terdapat mortalitas, namun pada perlakuan kontrol negatif, yang dipapar herbisida sebesar 2 ppm mengalami kematian sebanyak 9 ekor sampai hari terakhir paparan. Perlakuan



berikutnya, yakni P1, P2, P3, dan P4 yang diberi ekstrak dengan dosis 50, 100, 150, dan 300 mg/kg serta tidak di papar herbisida mengalami kematian secara berturut-turut sebanyak 4, 4, 3, dan 5 ekor sampai pada hari terakhir perlakuan.

Kemudian, ikan mas yang diberi ekstrak dengan dosis yang sama namun di papar herbisida sebanyak 2 ppm pada perlakuan HP 1, HP 2, HP 3, dan HP 4 mengalami kematian sebanyak 9, 8, 10, dan 13 ekor sampai pada hari terakhir perlakuan.

Berdasarkan data yang diperoleh, dapat dilihat bahwa paparan herbisida Roundup sebesar 2 ppm menyebabkan kematian sebesar 30% (Kontrol -). Perlakuan P1, P2, P3, dan P4 juga terlihat menyebabkan kematian pada ikan mas sebesar 10-16,7%. Hal ini mungkin dikarenakan faktor dari tubuh ikan mas yang kurang baik. Selanjutnya pada perlakuan ujiantang antara ekstrak etanol pegagan dan herbisida (HP1, HP 2, HP 3, dan HP 4) mengalami kematian sebesar 26,7 - 43,3 %. Hal ini mungkin disebabkan oleh paparan herbisida sebesar 2 ppm. Data mortalitas ikan mas pada uji in-vivo dapat dilihat pada

Tabel 15.

Tabel 11. Data Mortalitas Ikan Mas pada Uji In-Vivo

Perlakuan	Σ Ikan Mas	Σ Mortalitas Ikan pada Uji LD50 (Ekor)	% Mortalitas
K	30	4	13,3
K-	30	9	30
P1	30	4	13,3
P2	30	4	13,3
P3	30	3	10
P4	30	5	16,7
HP1	30	9	30
HP2	30	8	26,7
HP3	30	10	33,3
HP4	30	13	43,3

Berdasarkan data mortalitas, dapat dilihat bahwa persentase mortalitas ikan mas yang dipapar herbisida dan telah diberi ekstrak pegagan (HP1, HP 2, HP 3, dan HP 4) lebih rendah dari persentase mortalitas ikan mas yang hanya

diberi herbisida tanpa pemberian ekstrak etanol pegagan (K-). Selain pengamatan mortalitas, juga dilakukan pengukuran kualitas air pada media air tempat hidup ikan. Saat dilakukan uji in-vivo, suhu udara saat malam dan siang hari sangat fluktuatif, sehingga pada setiap akuarium di beri pengatur suhu (*heater*) untuk mencegah kematian ikan akibat perubahan suhu yang signifikan. Kisaran kualitas air pada uji in-vivo dapat dilihat pada **Tabel 16**.

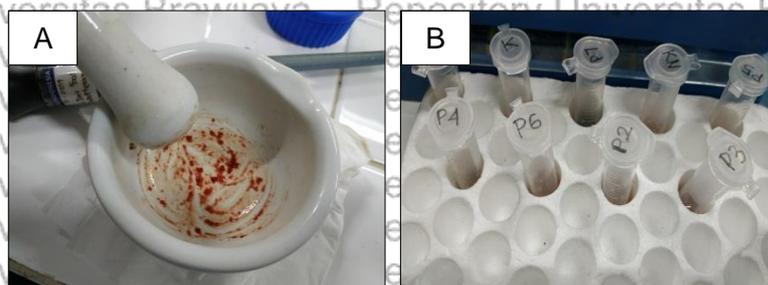
Tabel 12. Kisaran Pengukuran Kualitas Air pada Uji In-Vivo Ikan Mas

Konsentrasi (ppm)	Parameter		
	Suhu (°C)	pH	DO (mg/l)
Kontrol (-)	28°C	7,29-7,76	7,9-8,7
Kontrol (+)	28°C	7,30-7,82	6,7-7,4
P1	28°C	7,26-7,79	7,7-8,3
P2	28°C	7,25-7,53	7,7-8,0
P3	28°C	7,29-7,63	6,7-7,4
P4	28°C	7,32-7,61	7,9-8,7
HP1	28°C	7,29-7,63	7,7-8,0
HP2	28°C	7,32-7,63	7,7-8,3
HP3	28°C	7,26-7,79	7,7-8,0
HP4	28°C	7,25-7,53	6,7-7,4

5.8 Malondialdehid (MDA) pada Hati Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Malondialdehyde (MDA) merupakan indikator yang baik dari peroksidasi lipid dan juga stres oksidatif. Peroksidasi lipid adalah reaksi berantai yang dimulai oleh abstraksi atau penambahan hidrogen oleh radikal oksigen, menghasilkan kerusakan oksidatif dari asam lemak tak jenuh ganda (Cheng dan Li, 2007).

Stres oksidatif menunjukkan peran penting dalam patogenesis berbagai penyakit (Khanna *et al.*, 2002). Kegiatan pengujian MDA dapat dilihat pada **Gambar 25**.



Gambar 10. (A) Organ Hati Ikan Mas, dan (B) homogenat

Saat terjadi stres oksidatif, tubuh bereaksi dengan oksidan atau radikal bebas dan terbentuklah hidroperoksida yang menyebabkan rusaknya membran lipid sehingga memproduksi MDA. Tujuan dari pengukuran kadar MDA pada organ hati ikan mas adalah untuk mengetahui apakah terjadi penurunan kadar MDA setelah pemberian ekstrak etanol pegagan pada ikan mas. Pengukuran kadar MDA menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 530 nm. Uji MDA adalah metode yang paling sering digunakan dalam praktek klinis karena sensitivitas dan kesederhanaannya, meskipun beberapa zat dapat menjadi mengganggu pengujian ini (Sattler *et al*, 1998). Data hasil pengukuran kadar MDA dapat dilihat pada **Tabel 17**.

Tabel 13. Data Hasil Pengukuran Kadar MDA pada Hati Ikan Mas

Perlakuan	Abs			Kadar (ng/ml)			Rata-rata
	A	B	C	A	B	C	
Kontrol	0,121	0,147	0,125	519,00	519,00	511,50	516,50
Kontrol (-)	0,250	0,245	0,251	611,50	581,50	589,00	594,00
P1	0,143	0,170	0,148	554,00	484,00	506,50	514,83
P2	0,121	0,152	0,130	525,50	465,00	515,50	502,00
P3	0,137	0,114	0,142	451,50	409,00	479,00	446,50
P4	0,077	0,055	0,065	441,50	319,00	469,00	409,83
HP1	0,176	0,116	0,110	621,50	459,00	516,50	532,33
HP2	0,178	0,088	0,181	550,50	497,00	520,50	522,66
HP3	0,091	0,144	0,164	486,00	530,50	515,00	510,50
HP4	0,173	0,193	0,146	424,00	474,00	454,00	450,67

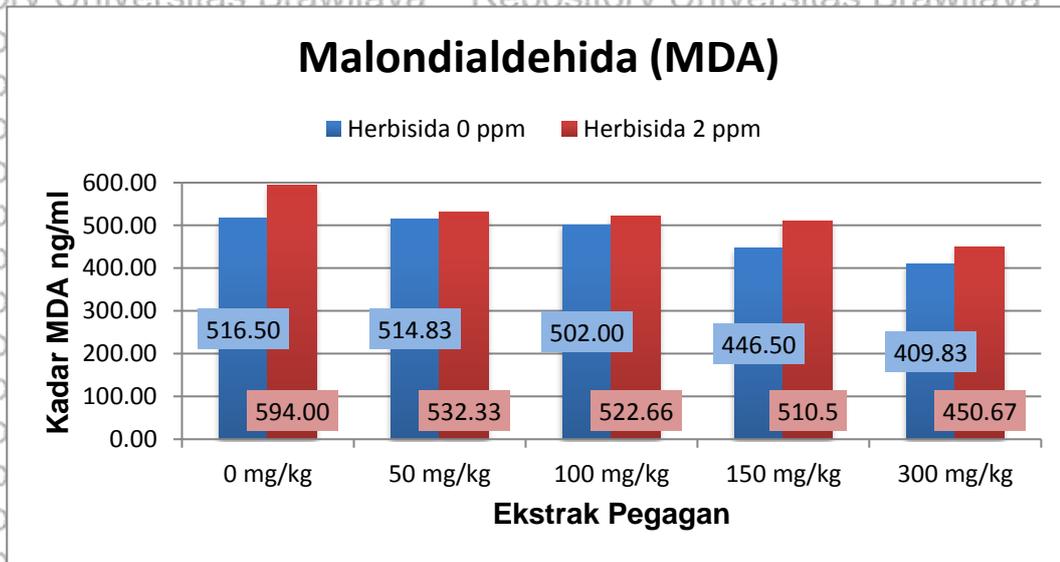
Keterangan = Kontrol (K): Herbisida 0 ppm+ekstrak 0 mg/kg, Kontrol negatif (K-): Herbisida 11 ppm+ekstrak 0 mg/kg, P1: Herbisida 0 ppm+ekstrak 50 mg/kg, P2: Herbisida 0 ppm+ekstrak 100 mg/kg, P3: Herbisida 0 ppm+ekstrak 150 mg/kg, P4: Herbisida 0 ppm+ekstrak 300 mg/kg, HP1: Herbisida 2 ppm + ekstrak 50 mg/kg, HP2: Herbisida 2 ppm+ ekstrak 100 mg/kg, HP3: Herbisida 2 ppm+ekstrak 150 mg/kg, dan HP4: Herbisida 2 ppm + ekstrak 300 mg/kg

Data hasil pengukuran kadar MDA pada **Tabel 18** menunjukkan bahwa rata-rata kadar MDA pada ikan kontrol sebesar 516,50 ng/ml. Ikan dengan perlakuan herbisida 2 ppm (kontrol negatif) memiliki kadar MDA rata-rata sebesar 594,00 ng/ml. Kemudian ikan dengan pemberian ekstrak etanol pegagan dengan



dosis 50 mg/kg (P1), 100 mg/kg (P2), 150 mg/kg (P3), dan 300 mg/kg (P4) memiliki kadar MDA rata-rata sebesar 514,83, 502,00, 446,50, dan 409,83 ng/ml. Selanjutnya ikan pada perlakuan HP1, HP2, HP3, dan HP4 dengan pemaparan herbisida 2 ppm ditambah pemberian ekstrak etanol pegagan dosis 50, 100, 150, dan 300 mg/kg memiliki kadar MDA rata-rata sebesar 532,33, 522,66, 510,50, dan 450,67 ng/ml. Diagram hasil pengukuran kadar MDA dapat dilihat pada

Gambar 26.



Gambar 11. Hasil Pengukuran Kadar MDA pada Organ Hati Ikan Mas. Kontrol (K): Herbisida 0 ppm+ekstrak 0 mg/kg, Kontrol negatif (K-): Herbisida 11 ppm+ekstrak 0 mg/kg, P1: Herbisida 0 ppm+ekstrak 50 mg/kg, P2: Herbisida 0 ppm+ekstrak 100 mg/kg, P3: Herbisida 0 ppm+ekstrak 150 mg/kg, P4: Herbisida 0 ppm+ekstrak 300 mg/kg, HP1: Herbisida 2 ppm + ekstrak 50 mg/kg, HP2: Herbisida 2 ppm+ ekstrak 100 mg/kg, HP3: Herbisida 2 ppm+ekstrak 150 mg/kg, dan HP4: Herbisida 2 ppm + ekstrak 300 mg/kg

Berdasarkan diagram pada **Gambar 26**, dapat disimpulkan bahwa ikan dengan pemberian ekstrak etanol pegagan (P1, P2, P3, dan P4) mengalami penurunan kadar MDA jika dibandingkan dengan ikan kontrol. Perlakuan kontrol memiliki kadar MDA sebesar 516,50 ng/ml sedangkan pada perlakuan P1, P2, P3, dan P4 memiliki kadar MDA berturut-turut sebesar 514,83, 502,00, 446,50, dan 409,83 ng/ml. Perlakuan dengan pemberian dosis tertinggi ekstrak etanol

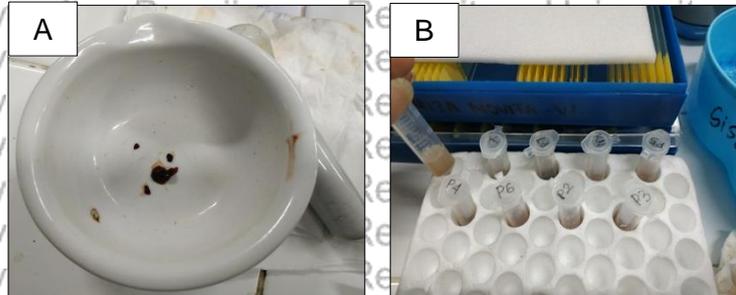


pegagan sebesar 300 mg/kg memiliki kadar MDA terendah yakni sebesar 1069,5 ng/ml. Kemudian ikan dengan pemberian ekstrak etanol pegagan dosis 50, 100, 150, dan 300 mg/kg ditambah dengan pemaparan herbisida 2 ppm (HP1, HP2, HP3, dan HP4) menunjukkan penurunan kadar MDA jika dibandingkan dengan ikan yang hanya dipapar herbisida 2 ppm (kontrol negatif). Perlakuan kontrol negatif memiliki kadar MDA sebesar 594,00 ng/ml sedangkan pada perlakuan HP1, HP2, HP3, dan HP4 memiliki kadar MDA berturut-turut sebesar 532,33, 522,66, 510,50, dan 450,67 ng/ml. Perlakuan dengan pemaparan herbisida 2 ppm ditambah pemberian ekstrak etanol pegagan sebesar 300 mg/kg memiliki kadar MDA terendah yakni sebesar 409,83 ng/ml. Data tersebut menunjukkan bahwa peningkatan dosis pemberian ekstrak etanol pegagan juga akan menurunkan kadar MDA pada hati ikan mas.

5.9 Superoksida Dismutase (SOD) pada Hati Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Enzim detoksifikasi pertama dan antioksidan paling kuat di dalam sel disebut superoksida dismutase (SOD). Enzim ini bertindak sebagai sistem pertahanan lini pertama dalam organisme melawan reactive oxygen species (ROS). Aktivitas SOD tergantung pada kofaktor logam seperti besi (Fe), seng (Zn), tembaga (Cu) dan mangan (Mn). Metaloenzim ini mengkatalisis anion superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen molekuler (O_2). Fe-SOD umumnya ditemukan di prokariot dan kloroplas dari beberapa tanaman, sementara Mn-SOD terdapat dalam prokariota dan mitokondria pada eukariota. Terakhir adalah Cu/Zn-SOD yang utamanya terdapat pada eukariota, biasanya terdapat pada sitosol tetapi dapat ditemukan juga dalam kloroplas dan peroksisom (Gill dan Tuteja, 2010). Telah disarankan bahwa suplementasi SOD akan melindungi sistem kekebalan tubuh dan secara signifikan mengurangi kemungkinan penyakit. Penelitian saat ini menunjukkan, bahwa tingkat SOD

pada kelompok kontrol lebih rendah daripada kelompok yang diberi perlakuan penambahan ekstrak *C. asiatica*. Kegiatan pengujian SOD dapat dilihat pada **Gambar 27**.



Gambar 12. (A) Organ Hati Ikan Mas, (B) Homogenat

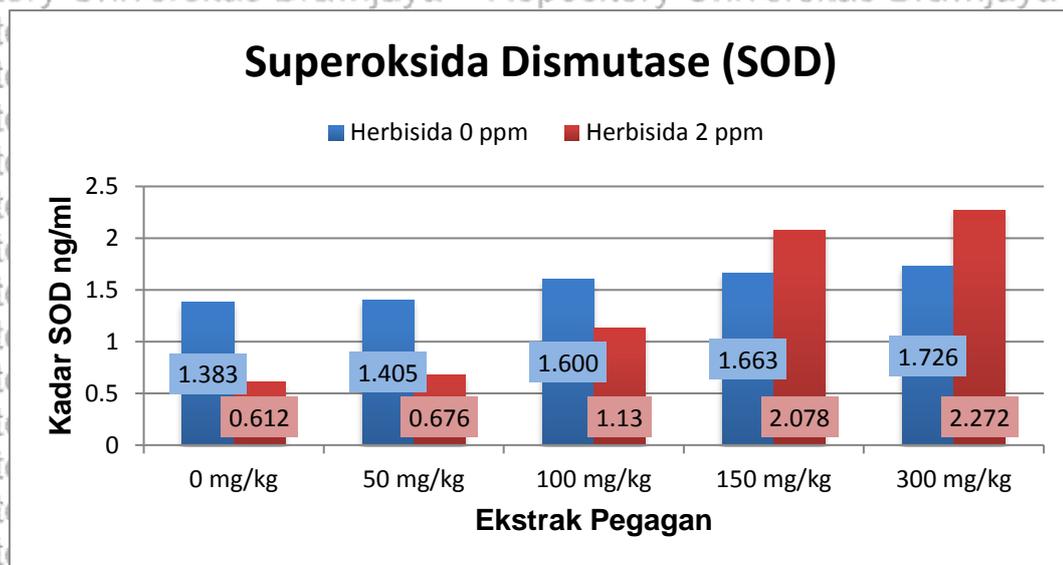
Pengukuran kadar SOD menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 560 nm. SOD diperlukan untuk kesehatan sel, melindungi sel-sel tubuh dari oksigen radikal yang berlebihan dan radikal bebas, juga agen berbahaya lainnya yang mendorong kematian sel. Data hasil pengukuran kadar SOD dapat dilihat pada **Tabel 18**.

Tabel 14. Data Hasil Pengukuran Kadar SOD pada Hati Ikan Mas

Perlakuan	Abs			Kadar (ng/ml)			Rata-rata
	A	B	C	A	B	C	
K	0,531	0,508	0,517	1,360	1,485	1,306	1,383
K-	0,270	0,263	0,232	0,650	0,573	0,615	0,612
P1	0,462	0,479	0,526	1,360	1,472	1,385	1,405
P2	0,531	0,534	0,517	1,616	1,602	1,582	1,600
P3	0,558	0,488	0,462	1,716	1,685	1,589	1,663
P4	0,566	0,567	0,620	1,761	1,683	1,734	1,726
HP1	0,288	0,301	0,286	0,727	0,588	0,715	0,676
HP2	0,366	0,396	0,343	1,005	1,165	1,222	1,130
HP3	0,693	0,689	0,677	2,215	2,186	1,883	2,078
HP4	0,699	0,694	0,674	2,535	2,006	2,276	2,272

Keterangan = Kontrol (K): Herbisida 0 ppm+ekstrak 0 mg/kg, Kontrol negatif (K-): Herbisida 11 ppm+ekstrak 0 mg/kg, P1: Herbisida 0 ppm+ekstrak 50 mg/kg, P2: Herbisida 0 ppm+ekstrak 100 mg/kg, P3: Herbisida 0 ppm+ekstrak 150 mg/kg, P4: Herbisida 0 ppm+ekstrak 300 mg/kg, HP1: Herbisida 2 ppm + ekstrak 50 mg/kg, HP2: Herbisida 2 ppm+ ekstrak 100 mg/kg, HP3: Herbisida 2 ppm+ekstrak 150 mg/kg, dan HP4: Herbisida 2 ppm + ekstrak 300 mg/kg

Data hasil pengukuran kadar SOD pada **Tabel 19** menunjukkan bahwa rata-rata kadar SOD pada ikan kontrol sebesar 1,383 ng/ml. Ikan dengan perlakuan herbisida 2 ppm (kontrol negatif) memiliki kadar SOD rata-rata sebesar 0,612 ng/ml. Kemudian ikan dengan pemberian ekstrak etanol pegagan dengan dosis 50 mg/kg (P1), 100 mg/kg (P2), 150 mg/kg (P3), dan 300 mg/kg (P4) memiliki kadar SOD rata-rata sebesar 1,405, 1,600, 1,663, dan 1,726 ng/ml. Selanjutnya ikan pada perlakuan HP1, HP2, HP3, dan HP4 dengan pemaparan herbisida 2 ppm ditambah pemberian ekstrak etanol pegagan dosis 50, 100, 150, dan 300 mg/kg memiliki kadar SOD rata-rata sebesar 0,676, 1,130, 2,078, dan 2,272 ng/ml. Diagram hasil pengukuran kadar SOD dapat dilihat pada **Gambar 28**.



Gambar 13. Hasil Pengukuran Kadar SOD pada Organ Hati Ikan Mas. Kontrol (K): Herbisida 0 ppm+ekstrak 0 mg/kg, Kontrol negatif (K-): Herbisida 11 ppm+ekstrak 0 mg/kg, P1: Herbisida 0 ppm+ekstrak 50 mg/kg, P2: Herbisida 0 ppm+ekstrak 100 mg/kg, P3: Herbisida 0 ppm+ekstrak 150 mg/kg, P4: Herbisida 0 ppm+ekstrak 300 mg/kg, HP1: Herbisida x ppm + ekstrak 50 mg/kg, HP2: Herbisida x ppm+ ekstrak 100 mg/kg, HP3: Herbisida 2 ppm+ekstrak 150 mg/kg, dan HP4: Herbisida x ppm + ekstrak 300 mg/kg

Berdasarkan diagram pada **Gambar 28**, dapat disimpulkan bahwa ikan dengan pemberian ekstrak etanol pegagan (P1, P2, P3, dan P4) mengalami peningkatan kadar SOD jika dibandingkan dengan ikan kontrol. Perlakuan kontrol



memiliki kadar SOD sebesar 1,383 ng/ml sedangkan pada perlakuan P1, P2, P3, dan P4 memiliki kadar SOD berturut-turut sebesar 1,405, 1,600, 1,663, dan 1,726 ng/ml. Perlakuan dengan pemberian dosis tertinggi ekstrak etanol pegagan sebesar 300 mg/kg memiliki kadar SOD tertinggi yakni sebesar 1,726 ng/ml. Kemudian ikan dengan pemberian ekstrak etanol pegagan dosis 50, 100, 150, dan 300 mg/kg ditambah dengan pemaparan herbisida 2 ppm (HP1, HP2, HP3, dan HP4) menunjukkan peningkatan kadar SOD jika dibandingkan dengan ikan yang hanya dipapar herbisida 2 ppm (kontrol negatif). Perlakuan kontrol negatif memiliki kadar SOD sebesar 0,612 ng/ml sedangkan pada perlakuan HP1, HP2, HP3, dan HP4 memiliki kadar SOD berturut-turut sebesar 0,720, 1,0004, 2,228, dan 2,2320,676, 1,130, 2,078, dan 2,272 ng/ml. Perlakuan dengan pemaparan herbisida 2 ppm ditambah pemberian ekstrak etanol pegagan sebesar 300 mg/kg memiliki kadar SOD tertinggi yakni sebesar 2,272 ng/ml. Data tersebut menunjukkan bahwa peningkatan dosis pemberian ekstrak etanol pegagan juga akan meningkatkan kadar SOD pada hati ikan mas.

Proses induksi enzim SOD berlangsung melalui jalur Nrf2. Senyawa bioaktif yang menjadi sumber antioksidan eksogen masuk melalui saluran pencernaan dan menyebar ke seluruh tubuh melalui aliran darah dan dibawa oleh vena porta menuju ke hati. Di dalam sel hati (hepatosit) terjadi transkripsi oleh gen Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). Nrf2 adalah protein leusin zipper dan merupakan faktor transkripsi penting untuk pemeliharaan homeostasis selama paparan stres oksidatif ataupun paparan kimia. Nrf2 diekspresikan pada tingkat rendah di semua jaringan, namun terdeteksi dengan tingkat yang lebih tinggi pada organ ginjal, otot, paru-paru, jantung dan hati (Moi *et al.*, 1994). Saat terjadi stres oksidatif, Nrf2 akan meningkat atau mengalami *upregulation* (Lau *et al.*, 2013).



Nrf2 terdapat pada sitosol dan ketika masuk ke dalam nukleus, Nrf2 mengikat gen yang mengandung *Antioxidant Response Element* (ARE) pada promotor, kemudian membentuk heterodimer dengan protein seperti Maf atau Jun (Itoh *et al.*, 1999). ARE terdapat pada promotor gen yang mengkode beberapa enzim penting selama detoksifikasi. Beberapa target dari Nrf2 adalah SOD, katalase, glutathione peroxidase dan glutathione-S-transferase (Giuliani dan Regoli, 2014). Transkripsi gen target yang telah diaktifkan oleh Nrf2 dan protein yang dihasilkan akan membantu sel kembali ke dalam keadaan basal dengan menghilangkan sumber dari stres oksidatif (Lau *et al.*, 2013). Beberapa contoh lain dari target Nrf2 selain enzim antioksidan adalah protein anti-apoptosis, transporter obat-obatan, dan enzim biotransformasi. Selanjutnya, Nrf2 terlibat dalam proses seluler lainnya seperti apoptosis, proliferasi, diferensiasi dan pertumbuhan (Bryan *et al.*, 2013). Penelitian yang dilakukan oleh Gwarzo (2009) menunjukkan bahwa Nrf2 telah terbukti mengatur ekspresi basal SOD. SOD juga dapat diinduksi oleh berbagai rangsangan, seperti Tumour Necrosis Factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), *lipopolysaccharides* (LPS) and interferon- γ and NF- κ B (Visner *et al.*, 1990; Hirose *et al.*, 1993; Akashi *et al.*, 1995; Maehara *et al.*, 1999).

Kumar dan Gupta (2002) menunjukkan bahwa Ekstrak *C. asiatica* dengan pelarut air memiliki dua efek pada otak tikus, khususnya dalam meningkatkan pembelajaran dan memori, juga memiliki kemampuan antioksidan dengan menurunkan peroksidasi lipid dan meningkatkan enzim antioksidan endogen. Studi lain oleh Choi *et al.* (2016) menunjukkan bahwa ekstrak *Centella asiatica* meningkatkan kadar SOD dalam jaringan hati. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa ekstrak *C. asiatica* memiliki efek kardioprotektif pada tikus. Efek ini mungkin melibatkan mekanisme pencegahan dari peroksidasi lipid dan pemeliharaan enzim antioksidan, seperti SOD serta pengikatan radikal bebas



(Kumar *et al.*, 2015). Hussin *et al.*, (2007) juga menunjukkan bahwa terdapat peningkatan kadar SOD secara signifikan setelah pemberian *C. asiatica*. Komponen antioksidan dalam *C. asiatica* seperti senyawa fenolik mungkin memiliki peran sebagai inhibitor dan aktivitas pemutusan rantai radikal bebas. Juga, perlakuan dengan dosis 100, dan 200 mg kg⁻¹ *C. asiatica* oleh Sivakumar *et al.*, (2018) menunjukkan peningkatan yang signifikan pada kadar SOD karena kemampuan senyawa bioaktif untuk mengikat ROS. Penelitian-penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemberian *C. asiatica* akan meningkatkan enzim antioksidan seperti superoxide dismutase (SOD). Dengan demikian, dapat mengikat dan menetralsir radikal bebas.

5.10 Analisa Data Hasil Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan untuk menganalisa data hasil penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF) dengan pola perlakuan faktorial 3x2, dengan 3 kali pengulangan. Data yang dianalisa berasal dari hasil pengukuran kadar SOD 10 perlakuan pada hati ikan mas yakni perlakuan dengan herbisida 0 ppm dan ekstrak pegagan 0 mg/kg (Kontrol), perlakuan dengan herbisida 2 ppm dan ekstrak pegagan 0 mg/kg (Kontrol negatif), perlakuan herbisida 0 ppm dan ekstrak 50 mg/kg (P1), perlakuan herbisida 0 ppm dan ekstrak pegagan 100 mg/kg (P2), perlakuan herbisida 0 ppm dan ekstrak pegagan 150 mg/kg (P3), perlakuan herbisida 0 ppm dan ekstrak pegagan 300 mg/kg (P4), perlakuan herbisida 2 ppm dan ekstrak pegagan 50 mg/kg (HP1), perlakuan herbisida 2 ppm dan ekstrak pegagan 100 mg/kg (HP2), perlakuan herbisida 2 ppm dan ekstrak pegagan 150 mg/kg (HP3), serta perlakuan herbisida 2 ppm dan ekstrak pegagan 300 mg/kg (HP4).

Data yang diperoleh dianalisa menggunakan metode analisis statistik ANOVA (*Analysis of Varians*) menggunakan aplikasi SPSS. Desain penelitian

yang digunakan adalah anova faktorial karena penelitian ini menggunakan 2 faktor, faktor pertama adalah pemberian ekstrak pegagan dengan dosis 50, 100, 150, 300 mg/kg dan faktor kedua adalah pemaparan herbisida dengan dosis 0 ppm dan 2 ppm. Tujuan dari analisa ini adalah untuk mengetahui apakah penambahan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) serta pemaparan herbisida dengan dosis yang berbeda dapat berpengaruh terhadap kadar SOD hati ikan mas. Uji anova dilakukan secara dua arah (two way anova) yang dapat dilihat pada **Tabel 19**.

Tabel 15. Tests of Between-Subjects Effects

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: SOD

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7.952 ^a	11	.723	49.770	.000
Intercept	63.648	1	63.648	4.382E3	.000
Ekstrak	5.183	4	1.296	89.215	.000
Herbisida	.295	1	.295	20.312	.000
Ulangan	.023	2	.011	.776	.475
Ekstrak * Herbisida	2.451	4	.613	42.187	.000
Error	.261	18	.015		
Total	71.861	30			
Corrected Total	8.213	29			

a. R Squared = .968 (Adjusted R Squared = .949)

Berdasarkan **Tabel 20**, dapat dilihat bahwa pada perlakuan pemberian ekstrak didapatkan F hitung sebesar 89,215 dengan signifikansi 0,000. Hipotesa H0 adalah bahwa rata-rata kadar SOD untuk tiap perlakuan dengan penambahan ekstrak pegagan adalah sama. Sedangkan H1 adalah bahwa rata-rata kadar SOD untuk tiap perlakuan dengan penambahan ekstrak pegagan minimal ada satu yang tidak sama. Jika nilai signifikansi >0,05 maka H0 diterima



dan jika $< 0,05$ maka H_0 ditolak dan menerima H_1 . Berdasarkan hasil yang diperoleh, yaitu F hitung sebesar 89,215 dengan signifikansi 0,000 adalah $< 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa untuk tiap perlakuan dengan penambahan ekstrak pegagan memiliki rata-rata kadar SOD yang tidak sama (H_0 ditolak).

Faktor kedua pada uji ANOVA adalah pemaparan herbisida dengan dosis berbeda. Berdasarkan **Tabel 20**, dapat dilihat bahwa pada perlakuan pemaparan herbisida didapatkan F hitung sebesar 20.312 dengan signifikansi sebesar 0,000. Hipotesa H_0 adalah bahwa rata-rata kadar SOD untuk tiap perlakuan dengan pemaparan herbisida adalah sama. Sedangkan H_1 adalah bahwa rata-rata kadar SOD untuk tiap perlakuan dengan pemaparan herbisida minimal ada satu yang tidak sama. Jika nilai signifikansi $> 0,05$ maka H_0 diterima dan jika $< 0,05$ maka H_0 ditolak dan menerima H_1 . Berdasarkan hasil yang diperoleh, yaitu F hitung sebesar 20.312 dengan signifikansi 0,000 adalah $< 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa untuk tiap perlakuan dengan pemaparan herbisida memiliki rata-rata kadar SOD yang tidak sama (H_0 ditolak).

Interaksi antara pemberian ekstrak dan pemaparan herbisida memiliki nilai F hitung sebesar 42.187 dengan signifikansi sebesar 0,000. Hipotesa H_0 adalah bahwa rata-rata kadar SOD untuk tiap interaksi antara pemberian ekstrak pegagan dan pemaparan herbisida adalah sama. Sedangkan H_1 adalah bahwa rata-rata kadar SOD untuk tiap interaksi antara pemberian ekstrak pegagan dan pemaparan herbisida minimal ada satu yang tidak sama. Jika nilai signifikansi $> 0,05$ maka H_0 diterima dan jika $< 0,05$ maka H_0 ditolak dan menerima H_1 . Berdasarkan hasil yang diperoleh, yaitu F hitung sebesar 42.187 dengan signifikansi 0,000 adalah $< 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa untuk tiap interaksi antara pemberian ekstrak pegagan dan pemaparan herbisida memiliki rata-rata kadar SOD yang berbeda atau tidak sama (H_0 ditolak). Setelah melakukan uji anova dua arah, jika terdapat perbedaan (signifikansi $< 0,05$) maka



harus dilakukan uji lanjutan dengan metode Tukey HSD yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan nilai $P < 0,05$. Perlakuan ekstrak *C. asiatica* dosis 300 mg/kg bb menunjukkan hasil yang paling signifikan.



6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian yang telah dilakukan adalah:

- Ekstrak *Centella asiatica* mengandung beberapa senyawa bioaktif seperti, flavonoid, alkaloid, terpenoid, tanin, dan saponin.
- Perlakuan dengan ekstrak *C. asiatica* dosis 300 mg/kg bb menunjukkan hasil yang paling signifikan. Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok yang diberi ekstrak *C. asiatica* jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan nilai $P < 0,05$.
- Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak *C. asiatica* terbukti memiliki sifat sebagai hepatoprotektor karena kandungan antioksidannya yang menginduksi gen *Tnfr2*. *Tnfr2* bertugas untuk mengatur ekspresi SOD pada hati ikan mas.

6.2 Saran

Ekstrak pegagan (*C. asiatica*) dengan menggunakan pelarut etanol mengandung berbagai senyawa yang bersifat antioksidan dilihat dari uji fitokimia dan MS. Oleh karena itu, ekstrak pegagan dapat digunakan dan diaplikasikan pada ikan dengan dosis efektif sebesar 300 mg/kg.



DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, W.Z., S.K. Moufak, Z. Yusof, M.S. Mohamad and I.M. Kamarul. 2010. Shortened activated partial thromboplastin time, a hemostatic marker for hypercoagulable state during acute coronary event. *Transl. Res.* 155: 315-319.
- Abdul-Hamid, A., Md. Shah, Z., Muse, R., & Mohamed, S. 2002. Characterization of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. *Food chemistry* 77, 465–469.
- Agusnar, H. 2008. *Analisa Pencemaran dan Pengendalian Lingkungan*. Medan: USU Press
- Ahmad, I., T. Hamid, M. Fatima, H. S. Chand, S. K. Jain, M. Athar, S. Raisudin. 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1523: 37–48.
- Aizad, S., N. M. Khairiri, B. H. Yahaya, S. I. Zubairi. 2017. A Novel Anti-Proliferative Activity (Ec50) Of Pegaga (*Centella Asiatica*) Extract Through In Vitro 3-D Culture Microenvironment. *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)* 79(2):1–10
- Akashi, M., M. Hachiya, R. L. Paquette, Y. Osawa, S. Shimizu, G. Suzuki. 1995. Irradiation Increases Manganese Superoxide Dismutase mRNA Levels in Human Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 270: 15864-15869.
- Amarante Jr., O.P., Santos, T.C.R., Brito, N.M., Ribeiro, M.L., 2002. Glifosato: propriedades, toxicidade, uso e legislação. *Quim. Nova* 25:589–593.
- Andarwulan, N., R. Batari, D. A. Sandrasari, B. Bolling, H. Wijaya. 2010. Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chemistry* 121:1231–1235.
- Andrew, P., dan J .M. Mathew. 1989. Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. *American Journal of Pathology* 68:70–76.
- Antony, B., G. Santhakumari, B. Merina, V. Sheeba, dan J. Mukkadan. 2006. Hepatoprotective effect of *Centella asiatica* (L) in carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 68(6):772-776
- Arab, F., I. Alamzadeh, V. Maghsoudi. 2011. Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract. *Scientia Iranica C.* 18(6):1402-1406.
- Afanassova, M., S. Georgieva, K. Ivancheva. 2011. Total Phenolic and Total Flavonoid Contents, Antioxidant Capacity and Biological Contaminants in Medicinal Herbs. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy.* 46(1):81-88.



Babu, T. D. dan J. Paddikkala. 1994. DNA fragmentation in Ehrlich Ascites tumour cells by extract of herbal plant *Centella asiatica* (L.), *Amala Res Bull.* 14:52-56

Banaee, M., A. Sureda, A. R. Mirvaghefi, K. Ahmadi. 2013. Biochemical and histological changes in the liver tissue of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sub-lethal concentrations of diazinon. *Fish physiology and biochemistry* 39(3):489-501.

Banaee, M., A. Sureda, S. Shahaf, N. Fazilat. 2015. Protective Effects of Silymarin Extract on Malthion-Induced Zebra Cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*) Hepatotoxicity. *Iranian Journal of Toxicology* 9(28): 1239-1246

Bayer. 2013. *Safety Data Sheet Bayer Glyphosate 450 Herbicide*. Bayer Crop Science: East Hawthorn, Victoria, Australia. <http://www.cooma.nsw.gov.au/DocumentCenter/Home/View/1353>.

Borg, W.R., dan M.D. Gall. 1983. *Educational research: An introduction*. Fourth Edition. Longman: New York.

Bryan, H. K., A. Olayanju, C. E. Goldring, B. K. Park. 2013. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and-independent mechanisms of regulation. *Biochemical pharmacology*, 85(6): 705-717.

Cahyono, B. 2000. *Budi Daya Ikan Air Tawar-Ikan Gurami, Ikan Nilam Ikan Mas*. Kanisius: Yogyakarta.

Çavas, T., dan S. Könen. 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22:263-268.

Chan, K. W. S. Iqbal, N. M. H. Khong, D. J. Ooi, M. Ismail. 2014. Antioxidant activity of phenolics saponins rich fraction prepared from defatted kenaf seed meal. *LWT - Food Science and Technology* 56:181-186.

Chandrasekara, H. U., dan A. Pathirantne. 2005. Influence of low concentrations of trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture Res.* 36:144-149.

Chandrika, U.G., dan P. A. A. S. P. Kumara. 2015. Chapter Four - Gotu Kola (*Centella asiatica*): Nutritional Properties and Plausible Health Benefits. *Advances in Food and Nutrition Research* 76: 125-157.

Cheng Z, dan Y. Li. 2007. What is responsible for the initiating chemistry of iron-mediated lipid peroxidation: an update. *Chem Rev.* 107: 748-766.

Cheng, N., N. Ren, H. Gao, X. Lei, J. Zheng, W. Cao. 2012. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl₄-induced acute liver damage in mice. *Food Chem Toxicol.* 23:1235-1241

Chien, L. T., dan D. F. Hwang. Effects of thermal stress and vitamin C on lipid peroxidation and fatty acid composition in the liver of thornfish *Terapon jarbua*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 128: 91-97.



Chippada, S. C., dan M. Vangalapati. 2011. Antioxidant, an anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Centella asiatica* extracts. *J Chem. Bio. Phy. Sci.* 1:260-269.

Cho, W. S., dan W. K. Yong. 2011. Antioxidant properties of two species of *Hylocereus* fruits. *Adv in Appl Sci Res.* 2(3):418-425

Choi, M., H. Zhengg, J. M. Kim, K. W. Lee, Y. H. Park, dan D. H. Lee. 2016. Protective effects of *Centella asiatica* leaf extract on dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats. *Molecular Medicine Reports* 14:4521-4528

Cholik F., Artati dan R. Arifudin., 1986. *Pengelolaan kualitas air kolam*. INFIS Manual seri nomor 26. Dirjen Perikanan. Jakarta. 52 hal.

Clark, R. B. 2002. *Marine Pollution*. Oxford University Press: United Kingdom

Clarkson, P. M., dan H. S. Thompson. 2000. Antioxidants: What role do they play in physical activity and health? *The American journal of clinical nutrition* 72:637S-646S.

Costa, M. J., D. A. Monteiro, A. L. Oliveira-Neto, F. T. Rantin, A. L. Kalinin. 2008. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. *Ecotoxicology* 17(3), 153-163.

Cui, W. H., K. Iwasa, H. Tokuda, A. Kashihara, Y. Mitani, T. Hasegawa, Y. Nishiyama, M. Moriyasu, H. Nishino, M. Hanaoka, C. Mukai and K. Takeda. 2006. Potential cancer chemopreventive activity of simple isoquinolines, l-benzylisoquinolinjes, and protoberberines. *Phytochemistry.* 67(1): 70-79.

Darwis, D. 2000. *Teknik Dasar Laboratorium Dalam Penelitian Senyawa Bahan Alam Hayati, Workshop Pengembangan Sumber Daya Manusia Dalam Bidang Kimia Organik Bahan Alam Hayati FMIP A Universitas Andalas: Padang*

Das, A. B., dan R. Mallick. 1991. Correlation between genomic diversity and asiaticoside content in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 32:1-8

DeGroot, H. 1994. Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepatology* 41: 328-332

Diamond, G. L., dan P. R. Durkin. 1997. *Effects of Surfactants on the Toxicity of Glyphosate, with Specific Reference to Rodeo*. United States Department of Agriculture: Riverdale, New York. pp.1-28.
www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/pdfs/Surfactants.pdf

Domijan, A. M., J. Ralić, S. R. Brkanac, L. Rumora, dan T. Z. Grubišić. 2014. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL- application to various biological samples. *Biochemical Chromatography* 29: 41-46

Durak, I., O. Canbolat, M. Kavutcu, H.S. Ozturk, Z. Yurtarslani. 1996. Activities of total, cytoplasmic and mitochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 10: 17-20.



Dwijayanti, A., A. Frethernety, N. S. Hardiany, E. H. Purwaningsih. 2014. Hepatoprotective Effects of *Acalypha indica* and *Centella asiatica* in Rat's Liver Against Hypoxia. *Procedia Chemistry* 14:11 – 14

Effendi, H. 2003. *Telaah Kualitas Air*. Kanisius: Yogyakarta.

Eloff, J. N. 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 60: 1–8.

El-Shenawy, N. S. 2009. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28:379–385

EPA. 1993. *Reregistration Eligibility Decision (RED): Glyphosate*. Environmental Protection Agency: Washington.

EPA. 2017. *Safe and effective herbicide use: a handbook for near-water applications*. Environmental Protection Agency: South Australia.

Fan, J. Y., J. J. Geng, H. Q. Ren, X. R. Wang, C. Han. 2013. Herbicide Roundup and its main constituents cause oxidative stress and inhibit acetylcholinesterase in liver of *Carassius auratus*. *Journal of Environmental Science and Health* 48(10): 844-850

Fang, Y., Yang, S., Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*. 18(10), 872-879.

Farag, F.M.M., Y. R. Wally, S. M. Daghash, dan A. M. Ibrahim. 2014. Some gross morphological studies on the internal anatomy of the scaled common carp fish (*Cyprinus carpio*) in Egypt. *J. Vet. Anat.* 7(1):15 - 29

Flora, S. J. S. 2012. Arsenic induced oxidative stress and its reversibility. *Free Rad Biol Med.* 51: 257–281.

Flora, S. J. S., dan R. Gupta. 2007. Beneficial Effects of *Centella asiatica* Aqueous Extract against Arsenic-induced Oxidative Stress and Essential Metal Status in Rats. *Phytother. Res.* 21:980–988

Flora, S. J. S., G. Flora, G. Saxena. 2006. Environmental occurrence, health effects and management of lead poisoning. *Lead Chemistry, Analytical Aspects, Environmental Impact and Health Effects* 4:158–228.

Folmar, L. C., H. O. Sanders, A. M. Julin. 1979. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch Environ Contam Toxicol.* 8; 269-278.

Ghisi, N. D. C. 2012. Relationship Between Biomarkers and Pesticide Exposure in Fishes: A Review. *InTech.* p.357-382.
http://cdn.intechopen.com/pdfs/37966/InTech_Relationship_between_biomarkers_and_pesticide_exposure_in_fishes_a_review.pdf.

Giesy, J. P., S. Dobson, K. R. Solomon. 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 167:35–120



Gill, S. S., and N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem.* 48:909–930.

Girsang, W. 2005. Pengaruh Tingkat Dosis Herbisida Isopropilamina Glifosat dan Selang Waktu Terjadinya Pencucian Setelah Aplikasi Terhadap Efektivitas Pengendalian Gulma pada Perkebunan Karet (*Hevea brasiliensis*) TBM. *Jurnal penelitian bidang ilmu pertanian* 3(2):31-36.

Giuliani, M. E., F. Regoli. 2014. Identification of the Nrf2–Keap1 pathway in the European eel *Anguilla anguilla*: Role for a transcriptional regulation of antioxidant genes in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 150:117-123.

Gu, H. F., C. M. Li, Y. J. Xu, W. F. Hu, M. H. Chen, Q. H. Wan. 2008. Structural features and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp. *Food Research International* 41:208–217.

Guilherme, S., Gaivãoob I., M.A. Santosa, dan M. Pacheco. 2012. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide – Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutation Research.* 743:1–9

Gupta, A. K. 2013. *Centella asiatica*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T168725A19645149. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T168725A19645149.en>.

Gupta, R., dan S. J. S. Flora. 2006. Effect of *Centella asiatica* on arsenic induced oxidative stress and metal distribution in rats. *Journal of Applied Toxicology* 26:213–222

Gwarzo, M. Y. 2009. Nrf2 transcription factor gene regulates basal transcription of mitochondrial superoxide dismutase enzyme in mouse brain. *African Journal of Biotechnology* 8(20):5169-5172

Halliwell, B. 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology* 141:312–322

Hagerman, A. E., K. M. Riedl, G. A. Jones, K. N. Sovik, N. T. Ritchard, P. W. Hartzfeld, dan T. L. Riechel. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:1887–1892

Hanasaki, Y., S. Ogawa, S. Fukui. 1994. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 16:845–850

Harish, R. S., dan K. Murugan. 2011. Oxidative stress indices in natural populations of *Avicennia alba* Blume as biomarker of environmental pollution. *Environ. Res.* 11(8): 1070–1073.

Hasan, I. 2002. *Pokok-pokok Materi Metodologi Penelitian dan Aplikasinya*. Ghalia Indonesia: Jakarta.



Hashim, P., H. Sidek, M.H.M. Helan, A. Sabery, U. D. Palanisamy, dan M. Ilham. 2011. Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica*. *Molecules* 16(2): 1310-1322.

Hasim, F. S., R. D. Ayunda, D. N. Faridah. 2015. Potential of lemongrass leaves extract (*Cymbopogon citratus*) as prevention for oil oxidation. *J Chem Pharm Res* 7(10):55-60

Hirose, K., D. L. Long, J. J. Oppenheim, K. Matsushima. 1993. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation. *FASEB J*, 7: 361-368.

Hussin, M., A. Abdul-hamid, S. Mohamad. 2007. Protective Effect of *Centella asiatica* Extract And Powder On Oxidative Stress In Rats. *Food Chem.* 100: 535-41.

Ibrahim, A. T. A., dan M. Banaee. 2014. Ameliorative Effect of Lycopene and Vitamin E on Some Haematological and Biochemical Parameters of *Oreochromis Niloticus* Against Diazinon Toxicity. *Advances in Plants & Agriculture Research* 1(3):1-9

Inamdar, P.K., Yeole, R.D., Ghogare, A.B., de Souza, N.J., 1996. Determination of biologically active constituents in *centella asiatica*. *Journal of Chromatography A* 742:127–130.

Indriantoro, N., dan Supomo. 2002. *Metode Penelitian Bisnis Edisi Pertama*. BPFE Yogyakarta: Yogyakarta.

Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel, M. Yamamoto. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & development* 13(1): 76-86.

Jaedun, A. 2011. *Metodologi Penelitian Eksperimen*. Puslit Dikdasmen Universitas Negeri Yogyakarta: Yogyakarta.

James, J., dan J. Dubery. 2011. Identification and quantification triterpenoid centelloids in *Centella asiatica* L. Urban by densitometric TLC. *J Planar Chromatogr.* 24 (1): 82-87

Jasper, R., G. O. Locatelli, C. Pilati, C. Locatelli. 2012. Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup. *Interdiscip Toxicol.* 5(3): 133–140

Jayashree, G., Kurup, M.G., Sudarslal, V.S., Jacob, V.B., 2003. Anti-oxidant activity of *Centella asiatica* on lymphoma-bearing mice. *Fitoterapia* 74:431–434.

Jayathirtha, M. G., dan S. H. Mishra. 2004. Preliminary immunomodulatory activities of methanol extracts of *Eclipta alba* and *Centella asiatica*. *Phytomedicine* 11(4):361-365

Jia, R., J. L. Du, L. P. Cao, Y. J. Liu, P. Xu, dan G. J. Yin. 2014. Hepatoprotective and antioxidant effects of phyllanthin against carbon



tetrachloride-induced liver injury in *Cyprinus carpio*. *Aquaculture International* 23: 883-893

Jian, P., K. Guiqing, Y. Chuanxun, Z. Beibei, J. Risheng, Y. Yuan. 2007. Separation and Determination of Madecassic Acid in Extracts of *Centella asiatica* Using High Performance Liquid Chromatography with β -Cyclodextrin as Mobile Phase Additive. *Chin J Chromatogr.* 25(3): 316–318.

Jusman, S. W., dan A. Halim. Oxidative stress in liver tissue of rat induced by chronic systemic hypoxia. *Makara kesehatan* 13:34–38.

Katare, S.S., Ganachari, M.S., 2001. Effect of *Centella asiatica* on hypoxia induced convulsions and lithium-pilocarpine induced status epilepticus and anti lipidperoxidation activity. *Indian Journal of Pharmacology* 33 (2): 128-135

Kedare, S. B. and R. P. Singh. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Food Sci Technol.* 48(4):412–422

Kelabora, D. M. 2010. Pengaruh Suhu Terhadap Kelangsungan Hidup dan Pertumbuhan Larva Ikan Mas (*Cyprinus Carpio*). *Berkala Perikanan Terubuk* 38(1):71-81.

Kepekci, R. A., S. Polat, A. Elik, N. Bayat, S. D. Saygideger. 2013. Protective effect of *Spirulina platensis* enriched in phenolic compounds against hepatotoxicity induced by CCl_4 . *Food Chem.* 141:1972–1979

Khairuman. 2013. *Budidaya Ikan Mas*. Agromedia Pustaka: Jakarta

Khairuman., B. Gunadi dan D. Sudenda. 2008. *Budi Daya Ikan Mas secara Intensif*. Agromedia Pustaka: Jakarta

Khanna K, Nikunji N, Khanna HD. 2002. A study of antioxidant and their preventive potential in cervical dysplasia. *Asian J Obs Gynae Pract* 16:3-11.

Khoubnasabjafari, M., K. Ansarin, dan A. Jouyban. 2015. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BiolImpacts* 5(3):123-127

Killedar, S., H. More, G. Shah, S. Gaikwad. Phytochemical Screening and In-Vitro Antioxidant Activity of *Memecylon Umbellatum* Root Extracts. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2(6):5988-5996

Kordi, M. G. H. 2004. *Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan*. Rineka Cipta: Jakarta.

Kordi, M. G. H. dan A. B. Tancung. 2010. *Pengelolaan Kualitas Air*. Rineka Cipta: Jakarta.

Korkina, L., dan I. Afanasev, 1997. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol.* 38:151–163.



Kregel, K. C., H. J. Zhang. 2006. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292:R18-R36.

Kumar, V., dan Y. K. Gupta. 2002. Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and markers of oxidative stress in rats. *J. Ethnopharmacol*. 79: 253–260.

Kumar, V., V. Babu, K. Nagarajan, L. Machawal, U. Bajaj. 2015. Protective effects of *Centella asiatica* against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats: biochemical, mitochondrial and histological findings. *The Journal of Phytopharmacology*. 4(2): 80-86

Kumarappan, C., M. Vijayakumar, E. Thilagam, M. Balamurugan, M. Thiagarajan, S. Senthil, S. C. Das, S. C. Mandal. 2011. Protective and curative effect of polyphenolic extract from *Ichnocarpus frutescense* leaves on experimental hepatotoxicity by carbon tetrachloride and tamoxifen. *Ann. of Hepat*. 10(1): 63-72.

Kundu, S., S. M. Haque, B. Ghosh. 2015. Comparative analysis of bioactive compounds in different habitat of *Centella asiatica* (L.) Urban: Application for in vitro clonal propagation of elite ecotype. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 5(2):030-036.

Langiano, V. C., dan C. B.R. Martinez. 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 147:222–231

Lau, A., W. Tian, S. A. Whitman, D. D. Zhang. 2013. The predicted molecular weight of Nrf2: it is what it is not. *Antioxidants & redox signaling*, 18(1): 91-93.

Lee J, E. Jung, Y. Kim, D. Park. 2006. Asiaticoside induces human collagen I synthesis through TGFbeta receptor I kinase (TbetaRI kinase)-independent Smad signaling. *Planta Med* 72(4): 324-8.

Li, W., D. Yin, Y. Zhou, S. Hu, L. Wang. 2003. 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 56: 251–255.

Li, Z. H., J. Velisek, V. Zlabek, R. Grabic, J. Machova, J.Kolarova. 2010. Hepatic antioxidant status and hematological parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after chronic exposure to carbamazepine. *Chemico-biological interactions* 183(1):98-104.

Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76:932–937.

Lv, J., A. Sharma, T. Zhang, Y. Wu, X. Ding. 2018. Pharmacological Review on Asiatic Acid and Its Derivatives: A Potential Compound. *Slas Technology: Translating Life Sciences Innovation* 1:1-17

Maehara, K., T. Hasegawa, H. Xiao, A. Takeuchi, R. Abe, K. Isobe. 1999. Cooperative interaction of NF-kappaB and C/EBP binding sites is



necessary for manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *FEBS Lett.* 449: 115-119.

Malhi, H., dan G. J. Gores. 2008. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 134:1641–1654

Martindale, J. L., N. J. Holbrook. 2002. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 192(1):1–15.

Mehrepek, M., M. Banaie, B. H. Nematdoste, A. Noori. 2016. The protective effect of vitamin C and chitosan on oxidative biomarkers in gills of common. *Iran Sci Fisheries Journal* 24(4):31-45.

Menezes, C. C., M. B. da Fonseca, V.L. Loro, A. Santi, R. Cattaneo, B. Clasen, A. Pretto, V. M. Morsch. 2011. Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and Recovery Pattern of *Rhamdia quelen*. *Arch Environ Contam Toxicol* 60:665–671

Micah, A. D. 2015. Toxicity Of the herbicide glyphosate (round-up) on fingerlings of heteroclarias (hybrid). Thesis. Department Of Biological Sciences, Faculty Of Science, Ahmadu Bello University: Zaria, Nigeria.

Mirza, I. 2012. Pengaruh Penggunaan Ekstrak Daun Pegagan (*Centella Asiatica* (L.) Urban) Terhadap Fungsi Kognitif Tikus. Tesis. Institut Pertanian Bogor: Bogor.

Misawa, E., M. Tanaka, K. Nomaguchi, K. Nabeshima, M. Yamada, T. Toida, dan K. Iwatsuki. 2012. Oral Ingestion of Aloe vera Phytosterols Alters Hepatic Gene Expression Profiles and Ameliorates Obesity-Associated Metabolic Disorders in Zucker Diabetic Fatty Rats. *J. Agric. Food Chem.* 60:2799–2806

Modesto, K. A., dan C. B. R. Martinez. 2010. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78:294–299

Mohamed, F. A. 2009. Histopathological studies on *Tilapia zillii* and *Soleavulguris* from lake Qarun, Egypt. *World J Fish and Mari Sci* 1:29-39.

Moi, P., K. Chan, I. Asunis, A. Cao, Y. W. Kan. 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(21): 9926-9930.

Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26(2):211-219

Monaco, T. J., S. C. Weller, F. M. Ashton. 2002. *Weed Science Principles and Practices*. John Wiley and Sons Inc. New York 700 Hal.

Mustafa, R. A., A. A. Hamid A.A., S. Mohamed, dan F. A. Bakar. 2010. Total phenolic compounds, flavonoids and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. *Journal of Food Science* 75(1): C28-C35.



Nansy, E., Harwoko, S. Pramono, dan A. E. Nugroho, A.E. 2015. Total flavonoid content and in vivo hypotensive effect of chloroform insoluble fraction of *Centella asiatica* leaf extract. *International Food Research Journal* 22(5): 2119-2125

Ncube, N. S., A. J. Afolayan, A. I. Okoh. 2008. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*. 7 (12): 1797-1806

Niedernhofer, L. J., J. S. Daniels, C. A. Rouzer, R. E. Greene dan L. J. Marnett. 2003. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biological Chemistry* 278(33):31426-31433

Nurjanah, U. 2003. Pengaruh dosis herbisida glifosat dan 2,4-D terhadap pergeseran gulma dan tanaman kedelai tanpa olah tanah. *Jurnal Ilmu-ilmu Pertanian Indonesia* 5(1):27-33

Nwani, C.D., N.S.Nagpure, R. Kumar, B. Kushwaha, W.S.Lakra. 2013. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36(2):539-547

Odum, E. P., 1971. *Dasar-Dasar Ekologi*. Edisi ketiga Gadjah Mada University Press: Yogyakarta.

Oroian, M, dan I. Escriche. 2015. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res Int*. 74:10-36.

Oropesa, A. L., J. P. García-Camber, F. Soler. 2009. Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine. *Environ Toxicol Pharmacol* 27(1):30-8.

Oruc, E. 2010. Effects of diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the liver of *Cyprinus carpio* (L.). *Environ. Toxicol.* 26(6), 571–578.

Pang, X., J. Zhao, W. Zhang, X. Zhuang, J. Wang, R. Xu, Z. Xu, dan Z. Qu. 2008. Antihypertensive effect of total flavones extracted from seed residues of *Hippophae rhamnoides* L. in sucrose-fed rats. *Journal of Ethnopharmacology* 117: 325–331.

Panjaitan, R. G. P. 2008. Pengujian aktivitas hepatoprotektor akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.). *Disertasi*. Bogor (ID): Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.

Parry, J, L. Su, M. Luther, K. Q. Zhou, M. P. Yurawecz, P. Whittaker, L. L. Yu. 2005. Fatty acid composition and antioxidant properties of coldpressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. *J Agric Food Chem* 53:566–573

Paulino, M., M. Sakuragui, M. Fernandes. 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 86(1):1-7.



- Pittella, F., R. C. Dutra, D. D. Junior, M.T.P. Lopes, dan N. R. Barbosa. 2009. Antioxidant and cytotoxic activities of *Centella asiatica* (L) Urb. *International Journal of Molecular Science* 10(9): 3713-3721.
- Prakash, A. 2001. Antioxidant activity. *Med Lab Anal Prog* 19(2):1-6
- Praptiwi., D. Wulansari, dan Chairul. 2010. Efek toksisitas ekstrak pegagan (*Centella asiatica* Linn.) pada organ dan jaringan mencit (*Mus musculus*). *Majalah Farmasi Indonesia* 21(1), 40 – 47
- Pratama, B. B., Z. Hasan, dan H. Hamdani. 2012. Pola Migrasi Vertikal Diurnal Plankton di Pantai Santolo Kabupaten Garut. *Jurnal Perikanan dan Kelautan* 3(1): 81 - 89.
- Prior, R. L., X. Wu, K. Schaich. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agri Food Chem* 53:4290-4302
- Pudjirahaju, A., Rustidja, dan S. B. Sumitro. 2008. Penelusuran Genotipe Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) Strain Punten Gynogenetik. *Jurnal Ilmu-Ilmu Perairan dan Perikanan Indonesia* 15(1): 13-19.
- Rahman, H., T. G. Kartawinata, dan E. Julianti. 2012. Uji Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase dalam Ekstrak Mesokarp Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamarck) Menggunakan Densitometri Citra Elektrofogram. *Acta Pharmaceutica Indonesia* 37(2):43-47
- Ravi, S., A. Veerakumar, R. Manimaran, K. M. Hashim, B. Indira. 2008. Two new flavonoids from *Centella asiatica* (Linn.). *J Nat Med.* 62:369-373.
- Rudiyanti, S., dan A. D. Ekasari. 2009. Pertumbuhan dan Survival Rate Ikan Mas (*Cyprinus carpio* Linn) pada Berbagai Konsentrasi Pestisida Raegent 0,3 *Jurnal Saintek Perikanan* 5(1):49-54.
- Salamah and Farahana, 2014, Antioxidant activity assay of ethanolic extract of *Centella asiatica* (L.) Urb herb using phosphomolybdate method. *Pharmaciana* 4(1): 23-30.
- Samani, H. E. Z. M. Banaee, P. Shoukat, A. Noori, L. M. Dehmoredi. 2017. Protective Effects of Dietary *Spirulina platensis* against Cadmium-Induced Oxidative Stress in Gills of Rainbow Trout. *Iranian Journal of Toxicology* 11(4):5-12
- Santoso, B. 1993. *Petunjuk Praktis Budidaya Ikan Mas*. Kanisius: Yogyakarta
- Sanz A, Trenzado CE, Botello Castro H, López-Rodríguez MJ and Tierno de Figueroa JM. Relationship between brain and liver oxidative state and maximum lifespan potential of different fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 165: 358-364.
- Sattler, W., E. Malle, G. M. Kostner. 1998. Methodological approaches for assessing lipid and protein oxidation and modification in plasma and isolated lipoproteins. *Methods Mol Biol* 110: 167.



Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38: 995–1014.

Schulz, J.B., J. Linderau, J. Dichgans. 2000. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry* 276(16):4904–4911.

Sen, S., R. Chakraborty, C. Sridhar, Y. S. R. Reddy, dan Biplab De. 2010. Free Radicals, Antioxidants, Diseases and Phytomedicines: Current Status And Future Prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 3(1):91-100

Sendra, J. M., E. Sentandreu, J. L. Navarro. 2006. Reduction kinetics of the free stable radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) for determination of the antiradical activity of citrus juices. *Eur Food Res Technol* 223:615–624

Seyedkolaei, S. J. G., A. Mirvaghefi, H. Farahmand, A. A. Kosari. 2013. Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: Assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98:135-141

Shahidi, F., dan P. Ambigaipalan. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods* 18:820–897

Shaker, M. E., K. R. Zalata, W. Z. Mehal, G. E. Shiha, T. M. Ibrahim. 2011. Comparison of imatinib, nilotinib and silymarin in the treatment of carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative stress, injury and fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 252:165–175

Sharbidre, A. A., V. Metkari, P. Patode. 2011. Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 101(2):132-41.

Sharma, P., A. B. Jha, R. S. Dubey, dan M. Pessarakli. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* 2012:1-26.

Shukla, A., A. M. Rasik, B. N. Dhawan. 1999. Asiaticoside induced elevation of antioxidant levels in healing wounds. *Phytotherapy Research* 13(1): 50–54.

Singh, S., A. Gautam, A. Sharma dan A. Batra. 2010. *Centella Asiatica* (L.): A Plant With Immense Medicinal Potential But Threatened. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* 4(2):9-17

Sivakumar, V., A. M. Sadiq, S. D. Bharathi. 2018. Hepatoprotective activity of *Centella asiatica* linn. against paracetamol induced liver damage in experimental animals. *Emer Life Sci Res.* 4(1): 19-26



Srivastava, R., Y. N. Shukla, dan S. Kumar. 1997. Chemistry and pharmacology of *Centella asiatica*: a review. *J. Medi. Arom. Plant Sci.* 19:1049-1056.

Strange, R. M., dan R. L. Mayden. 2009. Phylogenetic Relationships and a Revised Taxonomy for North American Cyprinids Currently Assigned to Phoxinus (Actinopterygii: Cyprinidae). *Copeia* 2009(3): 494-501

Subban, R., A. Veerakumar, R. Manimaran, K. M. Hashim, I. Balachandran. 2008. Two new flavonoids from *Centella asiatica* (Linn.). *J Nat Med* 62:369-373

Sumardikan, H. 2007. Penggunaan *Carboxymethyl Cellulose (cmc)* terhadap pH, Keasaman, Viskositas, Sineresis dan Mutu Organoleptik Yogurt set. *Skripsi*. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya: Malang

Sumitra, M., P. Manikandan, P. A. Kumar, N. Arutselvan, K. Balakrishna, B. Muralimonohar, R. Puvanakrishnan. 2001. Experimental myocardial necrosis in rats: Role of arjunolic acid on platelet aggregation, coagulation and antioxidant status. *Molecular and Cellular Biochemistry* 224:135-142.

Surakhmad, W. 2004. *Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar, Metode dan Teknik (Edisi Revisi)*. Penerbit Tarsito: Bandung

Susana, T. 2010. Tingkat Keasaman (pH) dan Oksigen Terlarut sebagai Indikator Kualitas Perairan Sekitar Muara Sungai Cisadane. *Jurnal Teknologi Lingkungan* 5(2):33-39

Svasand, T., D. Crosetti, E. García-Vázquez, E. Verspoor. 2007. *Genimpact - Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations*. Final scientific report 6th Framework plan of the European Commission. A European network (EU contract n. RICA-CT-2005-022802) 176 Hal.

Tanaka, M., E. Misawa, Y. Ito, N. Habara, K. Nomaguchi, M. Yamada, T. Toida, H. Hayasawa, M. Takase, M. Inagaki, R. Higuchi. 2006. Identification of five phytosterols from *Aloe vera* gel as anti-diabetic compounds. *Biol. Pharm. Bull.* 29:1418-1422.

Tatangindatu, F., O. Kalesaran, dan R. Rompas. 2013. Studi Parameter Fisika Kimia Air pada Areal Budidaya Ikan di Danau Tondano, Desa Paleloan, Kabupaten Minahasa. *Budidaya Perairan* 1(2):8-19.

Tilvi, S., M. S. Majik, K. S. Singh. 2014. Analysis of Marine sample in search of bioactive compounds: Mass Spectrometry for Determination of Bioactive Compounds. Elsevier pp.193-218

Tim Agriminakultura. 2014. *Sukses Bisnis dan Budidaya Ikan Mas*. Gramedia Pustaka Utama: Jakarta

Tim Lentera. 2002. *Pembesaran Ikan Mas di Kolam Air Deras*. Agromedia Pustaka: Jakarta

Tiwari, P., B. Kumar, M. Kaur, G. Kaur, H. Kaur. 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia* 1(1):98-106



Tomlin, C. D. S. 2006. *The Pesticide Manual: A World Compendium*, 14th ed. British Crop Protection Council, Hampshire: UK., pp. 545-548.

Tu, M., C. Hurd, R. Robison dan J.M. Randall. 2001. *Glyphosate*. Weed Control Methods Handbook, The Nature Conservancy. www.invasive.org/gist/products/handbook/methods-handbook.pdf

Upadhyay S.K., Saha Abhijeet, Bhatia B.D., and Kulkarni Kala Suhas, Evaluation of the efficacy of mental in children with learning disability Placebo-Controlled Double-Blind clinical C. asiatica. *Neurosciences Today* 6(3):184-188.

Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncola, M.T.D. Cronin, M. Mazura, J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39:44-84.

Vaya, J., dan M. Aviram. 2000. Nutritional antioxidants mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. *Curr Med Chem-Immunol Endo Metabolic Agents* 1: 99-117.

Vencill, W. K. 2002. *Herbicide Handbook*, 8th ed. Weed Science Society of America, Lawrence, KS, pp. 231-234.

Visner, G. A., W. C. Dougali, J. M. Wilson, I. A. Burr, H. S. Nick. 1990. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J. Biol. Chem.* 265: 2856-2864.

Voight, R., 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, Edisi ke-5, diterjemahkan oleh Dr. Soendani Noerono, Gajah Mada University Press: Yogyakarta.

Wanasundara, P. K. J. P. D., dan F. Shahidi. 2005. *Antioxidants: Science, Technology, and Applications*. Bailey's Industrial Oil and Fat Products: John Wiley & Sons, Inc.

Wandansari, N. P. 2013. Perlakuan Akuntansi atas PPH Pasal 21 pada PT. Artha Prima Finance Kotabagu. *Jurnal EMBA* 1(3):558-566.

Wang, X., Q. Dong, J. P. Zuo, dan J. N. Frong. 2003. Structures and potential immunological activity of a pectin from *Centella asiatica* (L.) Urban. *Carbohydr Res.* 338 (22):2393-2402.

Wardhana, W.A. 2004. *Dampak Pencemaran Lingkungan*. Penerbit Andi, Yogyakarta.

Webster, T. M. U., dan E. M. Santos. 2015. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics* 16(32):1-14

Wetzel, R. G. 1983. *Limnology* Second Edition. Saunders College Publishing: Toronto, Canada.



WHO. 2005. *Glyphosate and AMPA in drinking-water*. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization: Geneva

Willcox, J. K., S. L. Ash, dan G. L. Catignani. 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 44: 275–295.

Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius: Yogyakarta

Winston, G. W., dan R. T. Di Gullio. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organism. *Aquatic Toxicology* 19:137-161

Won, J. H., J. S. Shin, h. J. Park, H. J. Jung, D. J. Koh, B. G. Jo, J. Y. Lee, K. J. Yun, K. T. Lee. 2009. Anti-inflammatory Effects of Madecassic Acid via the Suppression of NF- κ B Pathway in LPS-Induced RAW264.7 Macrophage Cells. *Planta Med*. 76: 251–257

Yonar, M. E., dan F. Sakin. 2011. Ameliorative effect of lycopene on antioxidant status in *Cyprinus carpio* during pyrethroid deltamethrin exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99(3):226-31.

Young, I. S., dan J. V. Woodside. 2001. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 54:176–186

Yu, L. L. 2001. Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. *J Agric Food Chem* 49:3452–3456

Zainol, M.K., A. Hamid, S. Yusof, dan R. Muse. 2003. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Food Chemistry* 81: 575–581.

Zhao, Y., P. Shu, Y. Zhang, L. Lin, H. Zhou, Z. Xu. 2014. Effect of *Centella asiatica* on oxidative stress and lipid metabolism in hyperlipidemic animal models. *Oxid Med Cell Longev*. 1–7.

Zhou, J. C Li, L. Wang, H. Ji, T. Zhu. 2014. Hepatoprotective effects of a Chinese herbal formulation, Yingchen decoction, on olaquinox-induced hepatopancreas injury in Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Fish physiology and biochemistry* 41(1):1-12



LAMPIRAN

Lampiran 1. Uji Antioksidan

1. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

$$\text{Mr} (\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6) = (\text{Ar C} \times \sum \text{Atom C}) + (\text{Ar H} \times \sum \text{Atom H}) + (\text{Ar N} \times \sum \text{Atom N}) + (\text{Ar O} \times \sum \text{Atom O})$$

$$\begin{aligned} \text{Mr } \text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6 &= (12 \times 18) + (1 \times 12) + (14 \times 5) + (16 \times 6) \\ &= 216 + 12 + 70 + 96 \\ &= 394 \text{ g/mol} \end{aligned}$$

Jadi, dalam 1 mol DPPH $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$ terdapat 394 g

2. DPPH 1Mm sebanyak 50 ml

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{Berat DPPH}}{\text{Mr DPPH}} \times \frac{1000}{\text{ml volume}}$$

$$\text{Berat DPPH} = \frac{\text{Konsentrasi} \times \text{Mr DPPH} \times \text{ml volume}}{1000}$$

$$\begin{aligned} &= \frac{0,001 \text{ M} \times 394 \times 50}{1000} = 0,0197 \text{ g} = 19,7 \text{ mg} \end{aligned}$$

Jadi dibutuhkan 19,7 mg DPPH dilarutkan dalam pelarut metanol 50 ml

4. Pembuatan Larutan Induk Sampel 600 ppm

Melarutkan 30 mg ekstrak + 50 ml metanol

5. Pengenceran Larutan Seri Sampel

a. 10 µg/mL

$$600 \times V_1 = 10 \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{100}{600} = 0,167 \text{ ml}$$

b. 50 µg/mL

$$600 \times V_1 = 50 \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{500}{600} = 0,833 \text{ ml}$$



Lampiran 1. Lanjutan

c. 100 µg/mL

$$600 \times V_1 = 100 \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{1000}{600} = 1,667 \text{ ml}$$

d. 150 µg/mL

$$600 \times V_1 = 150 \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{1500}{600} = 2,5 \text{ ml}$$

e. 200 µg/mL

$$600 \times V_1 = 200 \times 10 \text{ ml}$$

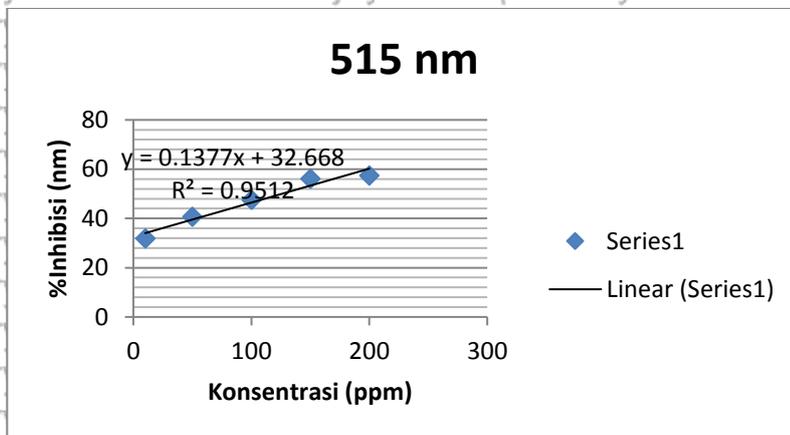
$$V_1 = \frac{2000}{600} = 3,3 \text{ ml}$$

6. % Inhibisi

Tabel% Inhibisi Uji Aktifitas Ekstrak *Sargassum* sp. Sebagai Antioksidan

Konsentrasi ekstrak etanol pegagan (ppm)	Absorbansi	Inhibisi (%)
Kontrol	0,768	-
10	0,520	32,292
50	0,456	40,625
100	0,403	47,526
150	0,337	56,120
200	0,327	57,422

Kurva Standart Sampel





Lampiran 1. Lanjutan

IC₅₀ Sampel

$$y = 0,1377x + 32,668$$

$$50 = 0,1377x + 32,668$$

$$50 - 32,668 = 0,1377x$$

$$x = \frac{50 - 32,668}{0,1377x}$$

$$0,1377x$$

$$x = 125,87, \text{ jadi IC}_{50} = 125,87 \text{ ppm}$$



Lampiran 2. Perhitungan Pengenceran Herbisida Roundup pada Uji Pendahuluan

Pengenceran herbisida *Roundup* dengan bahan aktif Isopropilamina glifosat 486 mg/l = 486000 mg/l (ppm) adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan larutan induk (stok)

Stok 1 L dengan konsentrasi 1000 ppm

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 (486000) = 1000 (1000)$$

$$V_1 = \frac{1.000.000}{486.000}$$

$$V_1 = 2,06 \text{ ml}$$

Jadi diperlukan 2,06 ml Herbisida + Aquades hingga 1 L

2. Perlakuan Konsentrasi 2 ppm

$$V_1 (1000) = 20000 (2)$$

$$V_1 = \frac{20 \times 2}{1000}$$

$$V_1 = 0,02 \text{ L} = 20 \text{ ml}$$

Jadi diperlukan 20 ml dari larutan stok herbisida untuk 20 L air pada akuarium



Lampiran 3. Tabel Skala Rand

Skala konsentrasi yang dapat digunakan untuk menentukan variasi konsentrasi pada perlakuan suatu bioassay berdasarkan atas interval progressive bisection pada suatu skala logaritmik (Guthrie dan Perry, 1980)

1	2	3	4	5
10	-	-	-	-
-	-	-	-	8.7
-	-	-	7.5	-
-	-	-	-	6.5
-	-	5.6	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	4.2	-
-	-	-	-	3.7
-	3.2	-	-	-
-	-	-	-	2.8
-	-	-	2.4	-
-	-	-	-	2.1
-	1.8	-	-	-
-	-	-	-	1.55
-	-	-	1.35	-
-	-	-	-	1.15
1	-	-	-	-



Lampiran 4. Tabel Transformasi Probit

%	0	01	02	03	04	05	06	07	08	09
0		19098	21218	22522	23479	24242	24879	25427	25911	26344
1	26737	27096	27429	27738	28027	28299	28556	28799	29031	29251
2	29463	29665	29859	30046	30226	30400	30569	30732	3089	31043
3	31192	31337	31478	31616	3175	31881	32009	32134	32256	32376
4	32493	32608	32721	32831	3294	33046	33151	33253	33354	33454
5	33551	33648	33742	33836	33928	34018	34107	34195	34282	34368
6	34452	34536	34618	34699	3478	34859	34937	35051	35091	35167
7	35242	35315	35389	35462	35534	35605	35675	35745	35813	35882
8	35949	36015	36083	36148	36213	36278	36342	36405	36468	36531
9	36502	36654	36715	36775	36835	36894	36953	37012	3707	37127
10	37184	37241	37298	37354	37409	37464	37519	37574	37628	37681
11	37735	37788	3784	37893	37945	37996	38048	38099	3815	382
12	3825	383	3835	38395	38448	38497	38545	38593	38641	38689
13	38735	38783	3883	38877	38923	38969	39015	39061	39107	39152
14	39197	39242	39286	39331	39375	39419	39463	39506	3955	39593
15	39636	39678	39721	39763	39806	39848	3989	39931	39973	40014
16	40055	40096	40137	40178	40218	40259	40299	40339	40379	40419
17	40458	40496	40537	40576	40615	40654	40693	40731	4077	40808
18	40846	40884	40922	4096	40998	41035	41073	4111	41147	41184
19	41221	41258	41295	41331	41367	41404	4144	41475	41512	41548
20	41584	41619	41655	4169	41726	41761	41796	41831	41866	41901
21	41936	4197	42005	42039	42074	42108	42142	42176	4221	42244
22	42278	42312	42345	42379	42412	42446	42479	42512	42546	42579
23	42612	42644	42677	4271	42743	42775	42808	4284	42872	42905
24	42937	42969	43001	43033	43065	43097	43129	4316	43192	43224
25	43255	43287	43318	43349	4338	43412	43443	43474	43505	43536
26	43567	43597	43628	43659	43689	4372	4375	43781	43811	43842
27	43872	43902	43932	43962	43992	44022	44052	44082	44112	44142
28	44172	44201	44231	4426	4429	44319	44349	44378	44406	44437
29	44466	44495	44524	44554	44583	44612	44641	4467	44696	44727
30	44756	44785	44813	44842	44871	44899	44928	44956	44985	45013
31	45041	4507	45098	45126	45155	45183	45211	45239	45267	45295
32	45323	45354	45379	45407	45435	45462	4549	45518	45546	45573
33	45601	45628	45655	45684	45711	45738	45766	45793	45821	45848
34	45875	45903	4593	45957	45984	46011	46039	46066	46093	4612
35	46147	46174	46201	46228	46255	46281	46308	46335	46362	46389
36	46415	46442	46469	46495	46522	46549	46575	46602	46628	46655
37	46681	46708	46734	46761	46787	46814	4684	46866	46893	46919
38	08945	46971	46998	47024	4705	47075	47102	47129	47155	47181
39	47207	47233	47259	47285	47311	47337	47363	47389	47415	47441
40	47467	47492	47518	47544	4757	47596	47622	47647	47673	47699
41	47725	4775	47776	47802	47827	47853	47879	47904	4793	47955
42	47981	48007	48032	48058	48083	48109	48134	4816	48185	48211
43	48236	48262	48287	48313	48338	48363	48389	48414	4844	48465
44	4849	48516	48541	48566	48592	48617	48642	48668	48693	48718
45	48743	48769	48794	48819	48844	4887	48895	4892	48945	4897
46	48996	49021	49045	49071	49096	49122	49147	49172	49197	49222
47	49247	49272	49298	49323	49348	49373	49398	49423	49448	49473
48	49498	49524	49549	49574	49599	49624	49649	49674	49699	49724
49	49749	49774	49799	49825	4985	49875	499	49975	4995	49975
50	50000	50025	5005	50075	501	50125	5015	50175	50201	50226
51	50251	50276	50301	50326	50351	50376	50401	50426	50451	50476
52	50502	50527	50552	50577	50602	50627	50652	50677	50702	50728
53	50753	50778	50803	50828	50853	50878	50904	50929	50954	50979
54	51004	5103	51055	5108	51105	5113	51156	51181	51206	51231
55	51257	51282	51307	51332	51358	51383	51408	51434	51459	51484
56	5151	51535	5156	51586	51611	51637	51662	51689	51713	51738



Lampiran 5. Perhitungan LC_{50-96jam} dengan Analisa Probit

Konsentrasi (ppm)	Log. Kons (x)	Σ Organisme	Ulangan			Rata-rata Mortalitas	Mortalitas (%)	Koreksi Kematian (%)	Konversi Probit (y)
			1	2	3				
0		10	0	0	0	0	0	0	
1,35	0,130334	10	0	0	0	0	0	0	
1,8	0,255273	10	0	0	0	0	0	0	
2,4	0,380211	10	0	0	0	0	0	0	
3,2	0,505154	10	0	0	0	0	0	0	
4,2	0,623249	10	1	0	0	1	10	3,7184	
6,5	0,812913	10	1	2	2	2	20	4,1584	
8,7	0,939519	10	6	5	6	6	60	5,2533	

Konsentrasi (ppm)	Log. Kons (x)	Konversi Probit (y)	x ²	xy
4,2	0,62	3,7184	0,39	2,32
6,5	0,81	4,1584	0,66	3,38
8,7	0,94	5,2533	0,88	4,94
Jumlah (Σ)	2,38	13,13	1,93	10,63
Rata-rata	0,79	4,38	0,64	3,54

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$= \frac{3(10,63) - (2,38)(13,13)}{3(1,93) - (2,38)^2}$$

$$= \frac{0,71}{0,15} = 4,73$$

$$a = y - bx$$

$$= 4,38 - (4,73 \times 0,79)$$

$$= 0,64$$

$$Y = a + bx$$

$$5 = 0,64 + 4,73x$$

$$4,36 = 4,73x$$

$$x = 0,92$$

$$LC_{50} = \text{antilog } x$$

$$= \text{antilog } (0,92)$$

$$= 8,32 \text{ ppm}$$

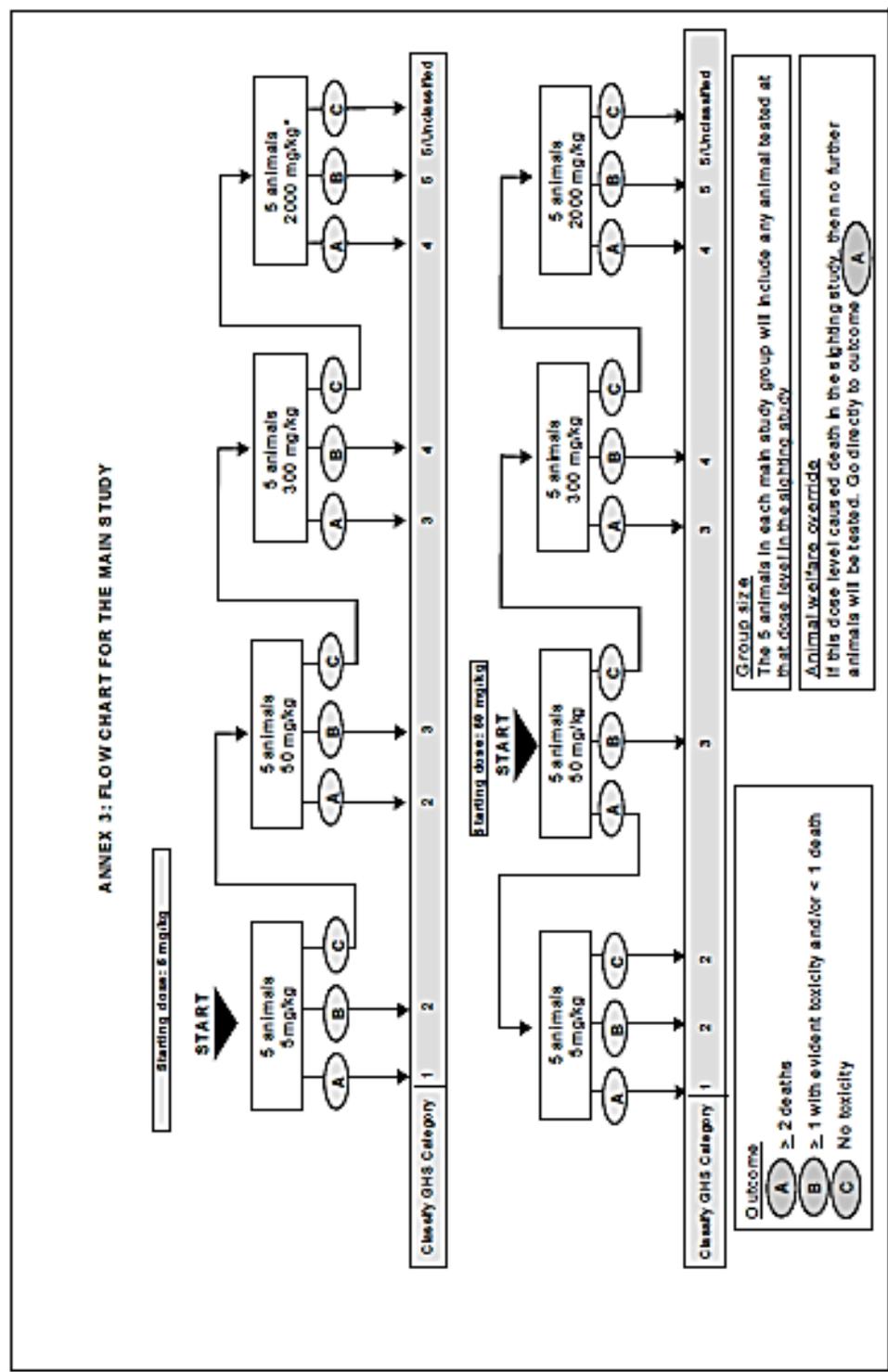
Jadi dapat disimpulkan bahwa toksisitas akut herbisida *Roundup* berbahan aktif

Isopropilamina glifosat terhadap ikan mas adalah sebesar 8,32 ppm.

Lampiran 6. Bagan Fix Dose Procedure (OECD 420)

420

OECD/OECD





Lampiran 7. Perhitungan dosis pada Uji LD₅₀

1. Jumlah ekstrak yang dibutuhkan per ekor ikan jika tidak boleh >1 ml/100 g BB

- Berat badan ikan 10 g

$$\frac{10 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 10 \text{ ml} = 0,1 \text{ ml}$$

2. Kebutuhan ekstrak untuk masing-masing dosis per BB ikan

- Dosis 5 mg = $\frac{10 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 5 \text{ mg} = 0,05 \text{ mg}$

- Dosis 50 mg = $\frac{10 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 50 \text{ mg} = 0,5 \text{ mg}$

- Dosis 300 mg = $\frac{10 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 300 \text{ mg} = 3 \text{ mg}$

- Dosis 2000 mg = $\frac{10 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 50 \text{ mg} = 20 \text{ mg}$

3. Pengenceran 120 ekor ikan @ 0,1 ml

- Dosis 5 mg = $\frac{10 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 5 \text{ mg} = 0,05 \text{ mg}$

Ekstrak => $120 \times 0,05 \text{ mg} = 6 \text{ mg}$

Pelarut => $120 \times 0,1 \text{ ml} = 12 \text{ ml}$

Jadi untuk dosis 5 mg/kg BB dibutuhkan 6 mg ekstrak + 12 ml pelarut

- Dosis 50 mg = $\frac{10 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 50 \text{ mg} = 0,5 \text{ mg}$

Ekstrak => $120 \times 0,5 \text{ mg} = 60 \text{ mg}$

Pelarut => $120 \times 0,1 \text{ ml} = 12 \text{ ml}$

Jadi untuk dosis 50 mg/kg BB dibutuhkan 60 mg ekstrak + 12 ml pelarut

- Dosis 300 mg = $\frac{10 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 300 \text{ mg} = 3 \text{ mg}$

Ekstrak => $120 \times 3 \text{ mg} = 360 \text{ mg}$

Pelarut => $120 \times 0,1 \text{ ml} = 12 \text{ ml}$



Jadi untuk dosis 300 mg/kg BB dibutuhkan 360 mg ekstrak + 12 ml pelarut

Lampiran 7. Lanjutan

$$\bullet \text{ Dosis } 2000 \text{ mg} = \frac{10 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 2000 \text{ mg} = 20 \text{ mg}$$

$$\text{Ekstrak} \Rightarrow 120 \times 20 \text{ mg} = 2400 \text{ mg}$$

$$\text{Pelarut} \Rightarrow 120 \times 0,1 \text{ ml} = 12 \text{ ml}$$

Jadi untuk dosis 5 mg/kg BB dibutuhkan 2400 mg ekstrak + 12 ml pelarut



Lampiran 8. Perhitungan dosis pada Uji In-Vivo

1. Jumlah ekstrak yang dibutuhkan per ekor ikan jika tidak boleh >1 ml/100 g BB

- Berat badan ikan 10 g

$$\frac{10 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 10 \text{ ml} = 0,1 \text{ ml}$$

- Berat badan ikan 20 g

$$\frac{20 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 10 \text{ ml} = 0,2 \text{ ml}$$

2. Kebutuhan ekstrak untuk masing-masing dosis per BB ikan

- Dosis 50 mg/ 10 g BB ikan = $\frac{10 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 50 \text{ mg} = 0,5 \text{ mg}$

- Dosis 100 mg/ 10 g BB ikan = $\frac{10 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 100 \text{ mg} = 1 \text{ mg}$

- Dosis 150 mg/ 10 g BB ikan = $\frac{10 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 150 \text{ mg} = 1,5 \text{ mg}$

- Dosis 300 mg/ 10 g BB ikan = $\frac{10 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 300 \text{ mg} = 3 \text{ mg}$

3. Pengenceran => 240 ekor ikan @ 0,1 ml untuk ikan dengan BB 10 g

- Dosis 50 mg

Ekstrak => $240 \times 0,5 \text{ mg} = 120 \text{ mg}$

Pelarut => $240 \times 0,1 \text{ ml} = 24 \text{ ml}$

Jadi untuk dosis 50 mg/kg BB dibutuhkan 120 mg ekstrak + 24 ml pelarut

- Dosis 100 mg

Ekstrak => $240 \times 1 \text{ mg} = 240 \text{ mg}$

Pelarut => $240 \times 0,1 \text{ ml} = 24 \text{ ml}$

Jadi untuk dosis 100 mg/kg BB dibutuhkan 240 mg ekstrak + 24 ml pelarut



Lampiran 8. Lanjutan

- Dosis 150 mg

Ekstrak => $240 \times 1,5 \text{ mg} = 360 \text{ mg}$

Pelarut => $240 \times 0,1 \text{ ml} = 24 \text{ ml}$

Jadi untuk dosis 150 mg/kg BB dibutuhkan 360 mg ekstrak + 24 ml pelarut

- Dosis 300 mg

Ekstrak => $240 \times 3 \text{ mg} = 720 \text{ mg}$

Pelarut => $240 \times 0,1 \text{ ml} = 24 \text{ ml}$

Jadi untuk dosis 300 mg/kg BB dibutuhkan 720 mg ekstrak + 24 ml pelarut