

SKRINING UJI TOKSISITAS AKUT LIMA RIMPANG SUKU ZINGIBERACEAE MENGGUNAKAN EMBRIO IKAN ZEBRA

Anggra Paramita¹, Indra Wibowo², Muhamad Insanu^{1*}

Informasi Penulis

¹Kelompok Keilmuan
Biologi Farmasi,
Sekolah Farmasi,
Institut Teknologi
Bandung, Bandung,
Indonesia, 40132

²Kelompok Keilmuan
Fisiologi,
Perkembangan Hewan
dan Sains Biomedika,
Sekolah Ilmu dan
Teknologi Hayati,
Institut Teknologi
Bandung, Bandung,
Indonesia, 40132

*Korespondensi

Muhamad Insanu
insanu@fa.itb.ac.id

ABSTRAK

Tumbuhan suku Zingiberaceae dikenal sebagai sumber obat tradisional. Pemanfaatan sebagai tanaman obat sudah dikenal secara turun temurun dari generasi ke generasi. Oleh sebab itu, perlu dilakukan pengujian toksisitas untuk mengevaluasi dan memprediksi keamanan penggunaan tanaman obat tersebut. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui toksisitas akut dari ekstrak dan fraksi temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.), temu mangga (*Curcuma mangga* Roxb.), jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc. var. *rubrum*), bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dan kencur (*Kaempferia galanga* L.) berdasarkan nilai LC₅₀ (Lethal concentration 50). Proses ekstraksi rimpang dari tanaman temu hitam, temu mangga, jahe merah, bangle, dan kencur dengan ekstraksi sinambung menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak yang dihasilkan difraksinasi menggunakan pelarut bertingkat (n-heksan, etil asetat dan air). Pengujian toksisitas akut dilakukan menggunakan ikan zebra. Dari pengamatan diperoleh perbedaan morfologi embrio dan larva ikan zebra yang dipaparkan dengan ekstrak etanol, fraksi etil asetat maupun fraksi air jika dibandingkan dengan kontrol negatif yang berisi media E3 1X. Perbedaan tersebut antara lain edema perikardial, edema kantong kuning telur (*yolk sac*), tulang belakang lengkung, tulang ekor lengkung, koagulasi dan malformasi rahang. Hasil nilai LC₅₀ diperoleh melalui perhitungan regresi probit kemudian data diekstrapolasi ke dalam golongan sesuai dengan kategori toksisitasnya. Dari penelitian diperoleh hasil bahwa ekstrak, fraksi etil asetat maupun fraksi air dari sampel tergolong dalam toksisitas sedang, sedikit beracun, dan praktis tidak beracun.

Kata Kunci: abnormalitas, ikan zebra, toksisitas akut, zingiberaceae

ACUTE TOXICITY SCREENING TEST OF FIVE RHIZOMES FROM ZINGIBERACEAE FAMILY USING ZEBRAFISH EMBRYOS

ABSTRACT

The Zingiberaceae plants are known as sources of traditional medicine. Their usage as medicinal plants have been known from generation to generation. Therefore, it is necessary to conduct toxicity testing to evaluate and predict the safety of using these medicinal plants. The purpose of this study was to determine the acute toxicity of the extracts and fractions of pink and blue ginger (*Curcuma aeruginosa* Roxb.), mango ginger (*Curcuma mangga* Roxb.), red ginger (*Zingiber officinale* Rosc. var. *rubrum*), cassumunar ginger (*Zingiber cassumunar* Roxb.), and galanga (*Kaempferia galanga* L.) based on the LC₅₀ value (Lethal Concentration 50). The extraction of the rhizomes from those plants were done by continuous extraction using 70% ethanol. The resulting extracts were fractionated using gradient solvents (n-hexane, ethyl acetate, and water). Acute toxicity testing was carried out using zebrafish. From the observation, it was found that there were morphological differences between zebrafish embryos and larvae which were exposed to ethanol extract, ethyl acetate, and water fractions compared to negative controls containing E3 1X media. These differences include pericardial oedema, yolk sac oedema, arch spine, curved coccyx, coagulation, and jaw malformations. The results of the LC₅₀ value were obtained by calculating probit regression then the data was extrapolated into groups according to category of toxicity. From the research, it was found that the extract, ethyl acetate and water fraction from the samples were classified as moderately, slightly, and practically non-toxic.

Keyword: abnormality, zebrafish, acute toxicity, Zingiberaceae

PENDAHULUAN

Penelitian terkait kandungan senyawa di dalam bahan alam telah banyak dipublikasikan terutama yang berhubungan dengan aktivitas farmakologi suatu senyawa. Mayoritas yang diteliti berasal dari simplisia nabati, seperti tanaman dari suku Zingiberaceae. Walaupun tidak menutup kemungkinan digunakan simplisia hewani misalnya madu atau propolis. Simplisia sendiri umumnya dalam bentuk kering, sesuai dengan ketentuan Farmakope Herbal Indonesia bahwa kadar air simplisia tidak lebih dari 10%. Hal ini dimaksudkan untuk menjaga kestabilan simplisia selama penyimpanan.

Secara empiris tanaman herbal dari suku Zingiberaceae memiliki pemanfaatan yang luas. Indonesia merupakan salah satu negara dengan ketersediaan tanaman obat dari suku Zingiberaceae yang berlimpah, diantaranya temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.), temu mangga (*Curcuma mangga* Roxb.), jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc. var. *rubrum*), bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.), dan kencur (*Kaempferia galanga* L.). Oleh karena itu, untuk mengetahui keamanan dari tanaman obat tersebut diperlukan adanya uji toksisitas.

Pengujian toksisitas dalam tanaman herbal perlu dilakukan untuk mengevaluasi kandungan senyawa yang terdapat di dalamnya dan memprediksi keamanannya. Saat ini pengujian toksisitas secara *in vivo* dapat dilakukan dengan menggunakan model hewan uji embrio ikan zebra dengan alasan menurut Gray *et al.* (2007) mudah dalam pengamatannya dikarenakan memiliki tubuh yang transparan dan berdasarkan paparan Wibowo *et al.* (2020) pemanfaatan ikan zebra sebagai model hewan uji ini terkait dengan ukuran, pemeliharaan dan morfologinya. Hal-hal tersebut memudahkan peneliti untuk mengamati abnormalitas yang terjadi selama penelitian. Seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Fakri *et al.* (2020) dengan ekstrak etanol keladi tikus konsentrasi tinggi menunjukkan adanya toksisitas pada embrio, penurunan detak jantung, edema perikardial, tidak terbentuknya tulang rahang dan ekor. Penelitian dengan fraksi buah karonda yang juga menggunakan embrio ikan zebra diketahui mengakibatkan malformasi pada tulang ekor, edema kantong kuning telur dan perikardial (Rusli *et al.* 2020).

Pemanfaatan serta studi terkait toksisitas untuk mengetahui keamanan dari suku Zingiberaceae telah banyak dipublikasikan oleh peneliti-peneliti terdahulu dengan menggunakan hewan pengerat sebagai model uji. Akan tetapi penggunaan hewan mamalia ini dinilai mahal dan tidak efisien dalam pengamatan perubahan morfologi yang terjadi akibat paparan sampel. Oleh karenanya perlu

dilakukan optimasi pengujian toksisitas dengan menggunakan hewan alternatif yaitu ikan zebra. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui toksisitas akut dari beberapa tanaman suku Zingiberaceae berdasarkan nilai LC₅₀ dengan menggunakan model hewan uji embrio ikan zebra.

PERCOBAAN

Alat

Gelas piala, Labu Erlenmeyer, batang pengaduk, timbangan analitik, labu alas bulat, seperangkat ekstraktor Soxhlet, corong pisah, piknometer, selang air, spatula, tangas air, *rotary vaporator*, *moisture analyzer*, tabung reaksi, pipet tetes, mikropipet, tip mikropipet, vial, rak tabung reaksi, kaca arloji, cawan porselen, *24 well plate*, mikroskop stereo, satu set perlengkapan perkembangbiakan ikan, gelas ukur, alkoholmeter, kertas saring, kompor, corong kaca, deksikator, krus, tanur, dan inkubator.

Bahan

Rimpang temu hitam (*C. aeruginosa* Roxb.), temu mangga (*C. amada* Roxb.), jahe merah (*Z. officinale* Rosc. var. *rubrum*), bangle (*Z. cassumunar* Roxb.), dan kencur (*K. galanga* L.), ikan zebra (*Danio rerio*) dewasa, etanol 70%, aquades, aquabides, aquademineralisata, serbuk magnesium, HCl pekat, amil alkohol, gelatin, FeCl₃ 5%, pereaksi Stiasny, HCl 2N, NaOH 6N, pereaksi Liebermann-Burchard, eter, amonia 25%, kloroform, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer dan HCl 10%, DMSO (Dimetil sulfoksida) (Sigma Aldrich-34869), media *Ethyl 3-aminobenzoate methasulfonate*/ trikain (Sigma Aldrich-E10521), NaCl, KCl, CaCl₂.2H₂O, MgSO₄.7H₂O, Etil Asetat, TetraMin (Tetra), Tubifex Worm Kyoto, artemia, dan air dingin atau es batu.

Determinasi Rempah dan Ikan serta Pembebasan Etik

Determinasi dilakukan pada masing-masing sampel simplisia di Lembaga Ilmu Penelitian Indonesia Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya dengan nomor B-1806/IPH.3/KS/V/2019 dan B-1019/IPH.3/KS/IX/2020. Untuk identifikasi hewan uji ikan zebra dilakukan di Herbarium Bandungense dan Museum Zoologi, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung menunjukkan bahwa hewan uji yang digunakan adalah spesies *Danio rerio*. Sedangkan untuk Pembebasan Etik hewan uji ikan zebra diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Universitas Padjadjaran, Bandung dengan nomor 125/UN6.KEP/EC/2020.

Penapisan Fitokimia

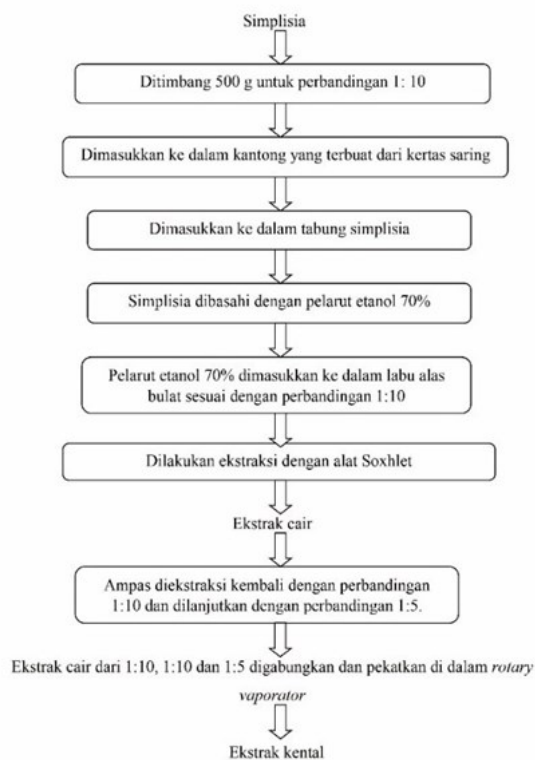
Penapisan fitokimia dalam sampel dimaksudkan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam sampel. Sehingga dapat diketahui simplisia tersebut mengandung senyawa golongan flavonoid, tanin, kuinon, steroid terpenoid, alkaloid atau saponin dibandingkan dengan standar. Uji penapisan fitokimia mengacu pada metode Farnsworth (1966) dan Procter *et al.* (1912) dengan berbagai modifikasi.

Karakterisasi Simplisia dan Ekstrak

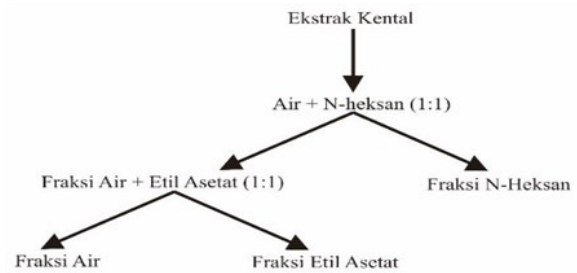
Pengujian karakterisasi simplisia dan ekstrak yang dilakukan antara lain: organoleptis, bobot jenis (Depkes RI 1995), kadar air, susut pengeringan, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol (Depkes RI 2017).

Metode Ekstraksi dan Fraksinasi

Dalam penelitian kali ini pelarut yang digunakan adalah etanol 70% yang merupakan pelarut universal sehingga diharapkan mampu menarik senyawa-senyawa dengan tingkat kepolaran yang luas. Selain itu pemakaian etanol 70% juga dimaksudkan untuk memudahkan jika nanti dilakukan *scale-up* dengan metode yang sama tidak memerlukan lagi optimasi. Perbandingan yang digunakan adalah 1:10, 1:10 dan 1:5 yang



Gambar 1. Alur ekstraksi sampel dengan alat Soxhlet.



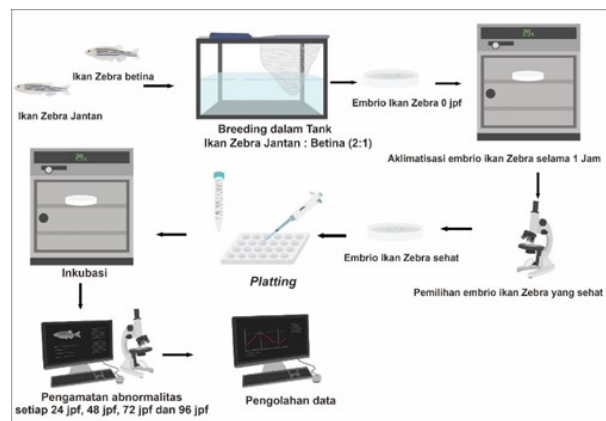
Gambar 2. Alur fraksinasi sampel.

kemudian dicampurkan dan dipekatkan dengan *rotary vaporator* untuk memperoleh ekstrak kental. Sebagai acuan proses ekstraksi, dilakukan pencatatan siklus yang diperlukan untuk masing-masing ekstrak. Berikut merupakan alur ekstraksi sampel rimpang temu hitam, temu mangga, jahe merah, bangle dan kencur dengan menggunakan alat Soxhlet (Gambar 1).

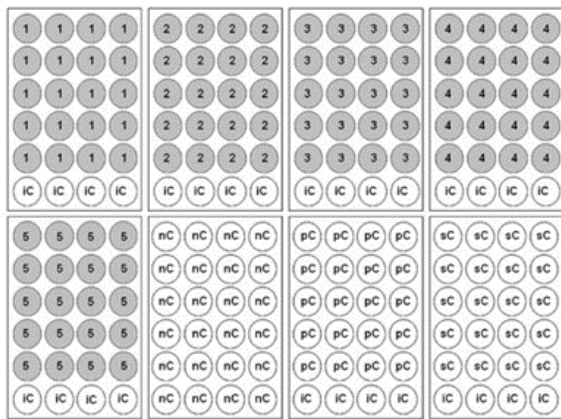
Proses fraksinasi dilakukan dengan menggunakan pelarut yang nonpolar, semi polar lalu polar. Dimaksudkan untuk menarik senyawa sesuai dengan tingkat kepolarannya. Pelarut yang digunakan n-heksan (nonpolar), etil asetat (semipolar) dan air (polar). Berikut merupakan alur fraksinasi bertingkat (Gambar 2).

Uji Toksisitas Akut

Untuk mengetahui batas aman konsentrasi ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan air yang digunakan maka dilakukan uji toksisitas akut. Alur pengujian seperti pada gambar 3. Pengujian ini dilakukan terhadap embrio ikan zebra (*Danio rerio*) sesuai dengan pedoman pada protokol OECD Nomor 236 Tahun 2013 yaitu dengan menggunakan embrio ikan zebra (*Danio rerio*) yang berusia 24 jpf (jam paska fertilisasi), diamati dan dicatat perubahannya mulai dari 24 jpf; 48 jpf; 72 jpf dan 96 jpf. Sebelum menentukan konsentrasi uji toksisitas akut, dilakukan *range finding test*. Konsentrasi yang digunakan pada uji ini adalah 10, 100 dan 1.000 µg/mL.



Gambar 3 Alur uji toksisitas akut dengan hewan uji embrio ikan zebra.



Gambar 4. Susunan *well-plate* (OECD 6457). Ket. 5 – 5: konsentrasi uji, nC: kontrol negatif; iC: kontrol *plate* internal (pengenceran dengan air); pC: kontrol positif (3,4 – dikloroanilin 4mg/L; sC: kontrol pelarut.

Dalam penelitian ini menggunakan *well plate* yang terdiri dari 24 *well*, dengan susunan sebagai berikut: untuk 20 *well* tiap-tiap bagian diisi dengan satu embrio ikan zebra dan larutan uji dengan konsentrasi seperti yang tertera pada Tabel 4, dan empat *well* lainnya masing-masing diisi satu embrio ikan zebra dan larutan internal kontrol (media E3 1X). Larutan uji berupa ekstrak dan fraksi dilarutkan dalam media E3 1X (dilakukan penambahan DMSO apabila ekstrak dan fraksi sukar terlarut dalam media E3). Media E3 mengandung NaCl, KCl, CaCl₂.2H₂O, dan MgSO₄.7H₂O yang dibuat larutan stok Media E3 60X dengan pH 7,2. Sedangkan untuk kontrol negatif digunakan media E3 1X tanpa penambahan sampel serta untuk kontrol positif digunakan herbisida yang telah diketahui beracun terhadap hewan akuatik yaitu 3,4-dikloroanilin dengan konsentrasi 4 µg/mL. Susunan dalam *wellplate* secara rinci telah diilustrasikan pada gambar 4. Setelah usia 96 jpf dilakukan pengamatan di bawah mikroskop stereo dengan perbesaran 3,5 x 10 mm dan didokumentasikan perubahan morfologinya. Untuk memudahkan pengamatan maka perlu ditambahkan trikain 50 µg/mL untuk anestesi. Penggunaan trikain dengan konsentrasi 50 µg/mL ini mengakibatkan embrio dalam keadaan pingsan akan tetapi tidak mempengaruhi perubahan morfologi maupun detak jantung.

Analisis Statistika

Pada penelitian kali ini digunakan metode regresi Probit untuk menentukan nilai LC₅₀ dari toksisitas sampel. Analisis statistika menggunakan metode parametrik ANOVA satu arah dengan aplikasi SPSS versi 25 dengan aras keberartian p<0,05% (95%). Data diambil secara kolektif dengan 3 kali pengulangan (triplo).

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan secara kualitatif pada sampel simplisia dan ekstrak. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder apa saja yang terdapat dalam sampel. Pada penelitian sebelumnya kandungan yang terdapat pada ekstrak temu hitam dengan pelarut metil tert-butyl eter dan metanol/ kloroform antara lain terpenoid, sterol, asam organik, asam lemak dan gula (Simoh dan Zainal 2015). Berdasarkan penelitian Tariq (2016) ekstrak temu mangga yang diekstraksi dengan pelarut bertingkat diketahui mengandung karbohidrat, flavonoid, tanin, steroid/ terpenoid, alkaloid, glikosida, saponin, antrakuinon, gum dan musilago. Untuk ekstrak jahe merah mengandung karbohidrat, lemak, terpen dan fenol (Grzanna *et al.* 2005). Singh *et al.* (2015) menyebutkan ekstrak bangle memiliki kandungan karbohidrat, tanin, alkaloid, steroid/ terpenoid dan flavonoid. Sedangkan dalam ekstrak kencur yang diekstraksi dari berbagai pelarut mengandung karbohidrat, kolesterol, protein, asam amino, steroid, alkaloid, flavonoid, glikosida jantung, saponin, tannin, terpenoid, flobatanin, asam lemak, kumarin dan fenol (Rao dan Kaladhar 2014).

Hasil penapisan fitokimia yang dilakukan dalam semua sampel simplisia dan ekstrak mengandung flavonoid dan steroid/triterpenoid (Tabel 1). Ini

Tabel 1 Hasil Penapisan Fitokimia Simplisia dan Ekstrak Etanol 70%

Sampel		Golongan					
		F	S	K	T	S/T	A
Temu Hitam	Simplisia	+	-	-	-	+	-
	Ekstrak	+	-	-	-	+	-
Temu Mangga	Simplisia	+	-	-	-	+	-
	Ekstrak	+	-	-	-	+	-
Jahe Merah	Simplisia	+	-	-	-	+	-
	Ekstrak	+	-	-	-	+	-
Bangle	Simplisia	+	-	-	-	+	-
	Ekstrak	+	-	-	-	+	-
Kencur	Simplisia	+	-	-	-	+	-
	Ekstrak	+	-	-	-	+	-

Keterangan: + = terdeteksi, - = tidak terdeteksi, F = Flavonoid, S = Saponin, K = Kuinon, T = Tanin, S/T = Steroid/Triterpenoid, A = Alkaloid

Tabel 2 Karakterisasi simplisia berdasarkan susut pengeringan, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air, dan kadar sari larut etanol

Simplisia	Susut Pengeringan (% b/b)	Kadar Abu Total (% b/b)	Kadar Abu Tidak Larut Asam (% b/b)	Kadar Sari Larut Air (% b/b)	Kadar Sari Larut Etanol (% b/b)
Rimpang Temu Hitam	8,17	7,81	2,09	26,18	4,85
Rimpang Temu Mangga	7,50	7,32	1,87	21,20	13,35
Rimpang Jahe Merah	7,48	7,98	0,35	34,16	10,54
Rimpang Bangle	8,19	5,59	1,31	19,71	12,44
Rimpang Kencur	7,75	6,58	1,31	14,59	4,70

Tabel 3 Karakterisasi ekstrak berdasarkan bobot jenis, kadar air, kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam

Ekstrak	Bobot Jenis (g/mL)	Kadar Air (% v/b)	Kadar Abu Total (% b/b)	Kadar Abu Tidak Larut Asam (% b/b)
Rimpang Temu Hitam	1,08	12,93	7,20	0,14
Rimpang Temu Mangga	1,07	8,40	6,17	0,44
Rimpang Jahe Merah	1,08	7,92	1,21	0,20
Rimpang Bangle	1,08	6,93	3,78	1,64
Rimpang Kencur	1,08	4,10	0,74	0,17

menunjukkan adanya perbedaan antara hasil penelitian dengan literatur yang dipaparkan sebelumnya, dimungkinkan karena adanya perbedaan lokasi dan waktu sampling, metode pengeringan, jenis pelarut serta metode ekstraksi yang digunakan.

Seperti yang disebutkan dalam penelitian Ghasemzadeh *et al.* (2016) bahwa perbedaan metode pengeringan ekstrak etanol jahe merah yang diekstraksi dengan menggunakan metode refluks berpengaruh terhadap kandungan metabolit sekunder 6- dan 8-shogaol, pada metode pengeringan oven vakum memberikan hasil lebih tinggi jika dibandingkan dengan pengeringan beku dan teduh (diangin-anginkan). Sukrasno (2014) menyebutkan selain metode pengeringan, terdapat pula metode pemotongan yang akan mempengaruhi kandungan metabolit sekunder yang sensitif sehingga mudah untuk teroksidasi dan terpolimerisasi, selain itu proses penggilingan akan mempengaruhi penurunan kandungan minyak atsiri.

Karakterisasi Simplisia

Simplisia yang digunakan dalam penelitian ini memiliki karakteristik secara organoleptis yang mirip satu dengan yang lain, diantaranya: bentuk rimpang kering dengan serat kasar, bau khas aromatik, rasa pahit dan memiliki warna coklat muda dengan daging rimpang berwarna putih kecoklatan. Untuk hasil karakterisasi simplisia dapat dilihat dalam tabel 2.

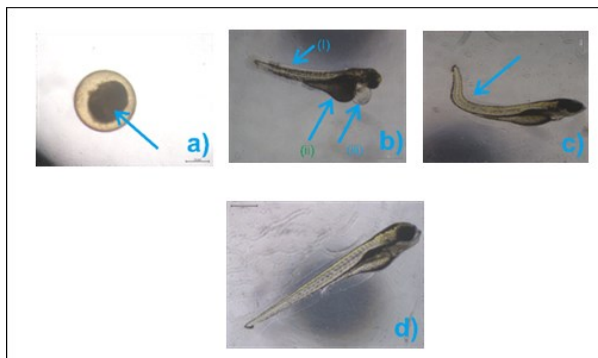
Karakterisasi Ekstrak

Pengamatan organoleptis ekstrak diperoleh hasil antara lain: bentuknya berupa ekstrak kental tetapi untuk ekstrak kencur mengandung minyak, warna coklat tua dan bau khas aromatik. Hasil karakterisasi ekstrak dapat dilihat di tabel 3.

Kondisi Abnormalitas Morfologi Ikan Zebra dalam Uji Toksisitas Akut

Dalam pengujian toksisitas akut ini sampel yang digunakan adalah ekstrak dan fraksi yang telah dilarutkan dalam media E3 (larutan fisiologis untuk media embrio ikan zebra) dan diamati perubahan morfologi dari hewan uji baik berupa abnormalitas maupun mortalitasnya yang kesemuanya akan dikelompokkan dalam parameter persentase mortalitas. Abnormalitas yang diamati antara lain tulang belakang lengkung atau lurus, edema perikardial atau tidak, edema pada kantong kuning telur atau tidak, tulang ekor lengkung atau lurus, bentuk rahang, koagulasi dan detak jantung. Masing-masing ekstrak pada usia 96 jpf menunjukkan abnormalitas yang beragam (Tabel 5) jika dibandingkan dengan kelompok normal yang berkembang dengan baik (Gambar 5).

Faktor yang mengakibatkan abnormalitas ini dimungkinkan karena paparan senyawa aktif yang terkandung dalam sampel terdifusi ke embrio ikan zebra. Senyawa aktif tersebut masuk ke dalam kantong kuning telur dan mengakibatkan penghambatan kerja enzim korionase. Nirmala dan Suptijah (2006) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa terhambatnya kerja enzim korionase dapat



Gambar 5 Pengamatan visual ikan zebra usia 96 jpf: a) koagulasi, b) tulang belakang lengkung (i), edema kantong kuning telur (ii), dan edema perikardial (iii), c) tulang ekor lengkung, d) normal.

Tabel 4 Konsentrasi larutan uji toksisitas akut

Sampel	Konsentrasi (µg/mL)		
	Ekstrak	Fraksi Etil Asetat	Fraksi Air
Rimpang Temu Hitam	12,50	31,25	1,25
	25,00	62,50	2,50
	50,00	125,00	5,00
	100,00	250,00	10,00
	200,00	500,00	20,00
Rimpang Temu Mangga	12,50	31,25	1,25
	25,00	62,50	2,50
	50,00	125,00	5,00
	100,00	250,00	10,00
	200,00	500,00	20,00
Rimpang Jahe Merah	12,50	62,50	0,63
	25,00	125,00	1,25
	50,00	250,00	2,50
	100,00	500,00	5,00
	200,00	1000,00	10,00
Rimpang Bangle	12,50	6,25	6,25
	25,00	12,50	12,50
	50,00	25,00	25,00
	100,00	50,00	50,00
	200,00	100,00	100,00
Rimpang Kencur	1,25	0,63	0,63
	2,50	1,25	1,25
	5,00	2,50	2,50
	10,00	5,00	5,00
	20,00	10,00	10,00

mengakibatkan reduksi korion sehingga larva tidak mampu menetas. Jika embrio mampu menetas akan tetapi senyawa aktif ini terakumulasi dalam jaringan maka akan mengakibatkan abnormalitas jaringan terutama bagian tulang. Menurut Korwin (2012) enzim korionase bekerja efektif pada pH 7,1-9,6. Oleh sebab itu medium E3 1X yang digunakan dalam penelitian ini diatur pada pH 7,2.

Data LC₅₀ Uji Toksisitas Akut Ekstrak dan Fraksi

Pengujian toksisitas akut dimaksudkan untuk memperoleh nilai LC₅₀ dari suatu sampel sehingga dapat ditentukan konsentrasi yang akan

Tabel 5 Pengamatan abnormalitas ikan zebra selama uji toksisitas akut

Sampel	Abnormalitas
Rimpang Temu Hitam	Tulang belakang lengkung, edema perikardial, edema kantong kuning telur, tulang ekor lengkung
Rimpang Temu Mangga	Malformasi rahang, edema perikardial, edema kantong kuning telur, tulang belakang lengkung, tulang ekor lengkung, koagulasi
Rimpang Jahe Merah	Edema kantong kuning telur, tulang ekor lengkung, edema perikardial.
Rimpang Bangle	Edema kantong kuning telur, tulang belakang lengkung, edema perikardial.
Rimpang Kencur	Tulang belakang lengkung, edema kantong kuning telur, edema perikardial.

digunakan untuk pengujian aktivitas selanjutnya. Ali *et al.* (2011) dalam penelitiannya menemukan korelasi baik antara LD₅₀ dan LC₅₀ dengan berdasarkan uji korelasi *Spearman's rank correlation* dan *Pearson's product moment correlation* membuktikan bahwa embrio ikan zebra juga dapat digunakan sebagai model prediksi untuk pengembangan toksisitas. Sedangkan penelitian yang mengamati organ yang tidak terdapat pada ikan zebra seperti prostat, kelenjar susu, dan paru-paru tidak dapat dilakukan. (Burke 2016).

Selain menggunakan ikan zebra, uji toksisitas akut juga bisa menggunakan hewan uji mencit seperti yang dilakukan oleh Yuandani dan Suwarso (2017), ekstrak etanol temu mangga menunjukkan nilai LD₅₀ 5.000 mg/kg bb dan tidak memberikan efek toksik pada mencit. Nurmala (2017) pada penelitiannya dengan menggunakan isolat etil p-metoksisinamat yang terdapat pada rimpang kencur menunjukkan nilai LD₅₀ sebesar 3.652 mg/kg berat badan mencit, sehingga digolongkan dalam kategori toksik sedang. Selain mencit juga digunakan model hewan uji udang *Artemia salina* seperti pada paparan Kaban *et al.* (2016) yang melaporkan hasil uji toksisitas akut ekstrak metanol jahe merah memiliki nilai LC₅₀ sebesar 71,0121 ppm

Sedangkan Safira *et al.* (2012) melakukan uji untuk fraksi metanol dan etil asetat rimpang bangle dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dilaporkan memiliki nilai LC₅₀ sebesar 41,645 dan 56,603 ppm secara berturut-turut. Uji toksisitas akut dengan BSLT juga dilakukan oleh Septaningsih *et al.* (2018) pada ekstrak etanol rimpang temu hitam dari tiga daerah yang berbeda di Indonesia (Cikabayan, Nagrak dan Tawangmangu), rata-rata diperoleh nilai LC₅₀ di bawah 1.000 ppm sehingga mengindikasikan sampel memiliki efek toksik, berdasarkan analisis kemometrik diperkirakan senyawa yang memberikan efek toksik antara lain 9-

Tabel 6 Hasil LC₅₀ uji toksisitas akut pada sampel ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan fraksi air diuji dengan analisis statistika regresi probit.

Sampel Rimpang	Ekstrak Etanol		Fraksi Etil Asetat		Fraksi Air	
	Konsentrasi (µg/mL)	Kategori Toksisitas	Konsentrasi (µg/mL)	Kategori Toksisitas	Konsentrasi (µg/mL)	Kategori Toksisitas
Temu Hitam	64,23	Sedikit Beracun	90,42	Sedikit Beracun	12,08	Sedikit Beracun
Temu Mangga	118,68	Praktis Tidak Beracun	153,72	Praktis Tidak Beracun	10,03	Sedikit Beracun
Jahe Merah	72,56	Sedikit Beracun	154,66	Praktis Tidak Beracun	3,66	Toksisitas sedang
Bangle	72,09	Sedikit Beracun	39,92	Sedikit Beracun	41,03	Sedikit Beracun
Kencur	4,29	Toksisitas sedang	5,22	Toksisitas sedang	2,94	Toksisitas sedang

oksoneoprokurkumenol; 7 α ,11 α -epoksi-5 β -hidroksi-9-guaiaen-8-one; kurkumenolakton A; atau kurkumenolakton B dan tetrahidro-bisdemetoksikurkumin.

Hasil pengolahan data untuk memperoleh nilai LC₅₀ pada penelitian ini menggunakan perangkat lunak SPSS versi 25 dengan analisis regresi probit. Standar penentuan toksisitas berdasarkan *Ecotoxicity Categories for Terrestrial and Aquatic Organisms* dari *United States Environmental Protection Agency*: sangat sangat beracun > 4,5 µg/mL; sangat beracun 0,1-1 µg/mL; toksisitas sedang >1-10 µg/mL; sedikit beracun >10-100 µg/mL; praktis tidak beracun >100 µg/mL. Jika mengacu pada standar tersebut maka nilai LC₅₀ dari ekstrak dan fraksi (Tabel 6) memiliki rentang dari toksisitas sedang sampai praktis tidak beracun. Hal ini dimungkinkan karena kandungan minyak atsiri dalam sampel yang memiliki beberapa aktivitas fisiologis sehingga beracun bagi ikan zebra, seperti yang dinyatakan oleh Tewtrakul *et al.* (2005) dalam penelitiannya yang menggunakan hewan uji udang air asin. Selain itu, dari hasil penelitian terdahulu dengan berbagai hewan uji juga menunjukkan korelasi positif dengan nilai LC₅₀ pada penelitian uji toksisitas dengan embrio ikan zebra ini. Penelitian dengan menggunakan hewan uji ikan zebra memberikan kemudahan dan keuntungan terutama untuk uji pendahuluan dan skrining toksisitas dalam pengembangan obat untuk berbagai penyakit. Akan tetapi, pemanfaatan hewan uji ikan zebra ini juga memiliki keterbatasan terkait dengan target penelitian pada organ-organ tertentu seperti organ reproduksi dan respirasi yang tidak sama dengan manusia (Teame *et al.* 2019).

KESIMPULAN

Berdasarkan uji toksisitas, diperoleh data bahwa rata-rata hewan uji setelah terpapar ekstrak akan mengalami beberapa abnormalitas antara lain:

edema perikardial, kantong kuning telur dan tulang belakang lengkung. Untuk ekstrak temu hitam terdapat abnormalitas lain yaitu tulang ekor lengkung serta untuk ekstrak temu mangga juga ditemukan hewan uji yang koagulasi dan malformasi rahang. Hasil nilai LC₅₀ yang tergolong dalam kategori toksisitas sedang adalah ekstrak, fraksi etil asetat dan fraksi air dari kencur yang secara berturut-turut memberikan nilai sebesar 4,29; 5,22; 2,94 µg/mL, serta untuk fraksi air jahe merah diperoleh nilai sebesar 3,66 µg/mL. Sedangkan yang tergolong kategori sedikit beracun pada ekstrak antara lain: temu hitam (64,23 µg/mL), jahe merah (72,56 µg/mL), dan bangle (72,09 µg/mL), kemudian untuk fraksi etil asetat yaitu: temu hitam (90,42 µg/mL) dan bangle (39,92 µg/mL), lalu untuk fraksi air terdapat temu hitam (12,08 µg/mL), temu mangga (10,03 µg/mL), dan bangle (41,03 µg/mL). Pada kategori praktis tidak beracun terdapat ekstrak temu mangga (118,68 µg/mL); fraksi etil asetat temu mangga (153,72 µg/mL); dan fraksi etil asetat jahe merah (154,66 µg/mL).

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) atas dukungan finansial selama studi melalui skema Beasiswa Pendidikan Indonesia Dalam Negeri (BPI DN) program Magister dan juga kepada Sekolah Farmasi serta Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung yang telah memfasilitasi selama proses penelitian berlangsung

DAFTAR PUSTAKA

Ali S, Mil HGJ, Richardson MK, 2011, Large scale assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing, PLoS ONE 6 (6): 1-11.

- Burke E, 2016, Why use zebrafish to study human diseases?
<https://irp.nih.gov/blog/post/2016/08/why-use-zebrafish-to-study-human-diseases>.
Diakses pada tanggal 10 September 2021.
- Depkes RI, 1995, Farmakope Indonesia, ed IV, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 1030.
- Depkes RI, 2017, Farmakope Herbal Indonesia, ed II, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Ecotoxicity Categories for Terrestrial and Aquatic Organisms, diperoleh melalui situs internet: <https://www.epa.gov/pesticidescience-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment>-. Diakses pada tanggal 18 Desember 2020.
- Fakri F, Idrus LS, Iskandar MA, Wibowo I, Adnyana IK, 2020, Acute toxicity of keladi tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume) ethanol extract on zebrafish (*Danio rerio*) embryo in vivo, *Indones J Pharm* 31(4): 297-304.
- Farnsworth NR, 1966, Biological and phytochemical screening of plants, *J Pharm Sci* 55 (3): 225-276.
- Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Rahmat A, 2016, Variation of the phytochemical constituents and antioxidant activities of *Zingiber officinale* var *rubrum* theilade associated with different drying methods and polyphenol oxidase activity, *Molecules* 21: 1-12.
- Gray C, Packham IM, Wurmser F, Eastley NC, Hellewell PG, Ingham PW, Crossman DC, Chico TJA, 2007, Ischemia is not Required for Arteriogenesis in Zebrafish Embryos, *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 27: 2135-2141.
- Grzanna R, Lindmark L, Frondoza CG, 2005, Ginger -an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions, *J Med Food* 8(2): 125-132.
- Harborne JB, 1984, *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis* second edition, Chapman and Hall, New York, 5-6.
- Kaban AN, Daniel, Saleh C, 2016, Uji Fitokimia, Toksisitas dan aktivitas antioksidan fraksi n-heksan dan etil asetat terhadap ekstrak jahe merah, *Jurnal Kimia Mulawarman* 14(1): 24-28.
- Korwin KM, 2012, Fish hatching strategies: a review, *Rev Fish Biol Fish* 22(1): 225-240.
- Nirmala KJS, P Suptijah, 2006, Efektifitas khitosan sebagai pengkhelat logam timbal dan pengaruh terhadap perkembangan awal embrio ikan zebra (*Danio rerio*), *Jurnal Akuakultur Indonesia* 5(2): 157-165.
- Nurmala S, 2017, Uji toksisitas akut senyawa etil p-metoksisinamat yang diisolasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* L.), *Fitofarmaka* 7(2): 30-33.
- OECD, 2013, *OECD Guidelines for The Testing of Chemicals: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test No. 236*.
- Procter HR, Brumwell H, Stiasny E, 1912, *Leather chemist pocket book: a short compendium of analytical methods*, Spon and Chamberlain, New York, 51.
- Rao N, Kaladhar DSVGK, 2014, Biochemical and phytochemical analysis of the medicinal plant, *kaempferia galanga* rhizome extracts, *Int J Sci Res* 3(1): 18-20.
- Rusli Z, Sari BL, Wardatun S, Aristyo W, 2020, Skrining toksisitas akut beberapa fraksi buah karonda (*Carissa carandas* L.) pada embrio zebrafish (*Danio rerio*), *Fitofarmaka Jurnal Ilmiah Farmasi* 10(1): 42-53.
- Safira, Fachriyah E, Kusri D, 2012, Isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid dari ekstrak etil asetat rimpang bengle (*Zingiber cassumunar* Roxb.), *J kim sains apl* 15(1): 36-38.
- Septaningsih DA, Darusman LK, Afendi FM, Heryanto R, 2018, Liquid chromatography mass spectrometry (lc-ms) fingerprint combined with chemometrics for identification of metabolites content and biological activities of *Curcuma aeruginosa*, *Indones J Chem* 18(1): 43-52.
- Simoh S, Zainal A, 2015, Chemical profiling of *Curcuma aeruginosa* Roxb. rhizome using different techniques solvent extraction, *Asian Pac J Trop Biomed* 5(5): 412-417.
- Singh Cb, Manglembi N, Swapana N, Chanu Sb, 2015, Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Zingiber cassumunar* Roxb. (*zingiberaceae*), *J pharmacogn phytochem* 4(1): 01-06.
- Sukrasno, 2014, Changes in secondary metabolite contents following crude drug preparation, *Procedia Chem* 13: 57-62.
- Tariq AL, 2016, Preliminary phytochemical screening and anti-angiogenesis studies of different extracts of *curcuma amada*, *Int J Curr*

Microbiol App Sci 5(10): 109-117.

Teame T, Zhang Z, Ran C, Zhang H, Yang Y, Ding Q, Xie M, Gao C, Ye Y, Duan M, Zhou Z, 2019, The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical model, *Animal Frontiers* 9(3): 68-77.

Tewtrakul S, Yuenyongsawad S, Kummee S, Atsawajaruwan L, 2005, Chemical components and biological activities of volatile oil of *Kaempferia galanga* Linn., *Songklanakarin J Sci Technol* 27(2): 503-507.

Wibowo I, Kurniati NF, Damayanti S, 2020, Toksisitas in vivo & in silico prinsip dan aplikasi, ITB Press, Bandung, 57.