



Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Temu Blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) terhadap Ikan Zebra (*Danio rerio*)

Toxicity Test of Temu Blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) Ethanol Extract in Zebrafish (*Danio rerio*)

Amaria Dewi¹, Oktariani Pramiastuti^{1*}, Lailiana Garna Nurhidayati¹

¹Program Studi Farmasi,
Fakultas Ilmu Kesehatan,
Universitas Bhamada Slawi,
Jl. Cut Nyak Dhien, Kalisapu,
Slawi, 52416, Indonesia

Diajukan: 03-07-2024

Direview: 21-07-2024

Disetujui: 30-09-2024

Kata Kunci: Ikan zebra,
temu blenyeh, toksisitas.

Keywords: Temu Blenyeh,
Toxicity, Zebrafish

Korespondensi:

Oktariani Pramiastuti

oktariani.pram@gmail.com



Lisensi: CC BY-NC-ND 4.0

Copyright ©2024 Penulis

Abstrak

Uji toksisitas merupakan tahap awal untuk mengevaluasi bioaktivitas senyawa yang berpotensi memberikan efek racun. Pada penelitian ini, ikan zebra (*Danio rerio*) digunakan sebagai hewan uji. Rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) diketahui mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, dan tanin yang berpotensi memiliki efek toksik. Ekstrak rimpang tersebut telah memenuhi standar hasil uji standardisasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi adanya efek toksisitas ekstrak rimpang temu blenyeh serta menentukan nilai LC₅₀-nya. Metode uji yang digunakan adalah uji toksisitas akut terhadap ikan zebra dengan mengamati jumlah kematian ikan selama 96 jam. Setiap akuarium diisi dengan 7 ekor ikan zebra, dan konsentrasi ekstrak yang diuji adalah 1000, 500, 250, 125, dan 62,5 ppm. Data kematian dianalisis menggunakan metode probit dengan perangkat lunak SPSS untuk memperoleh nilai LC₅₀, yaitu konsentrasi yang secara statistik menyebabkan kematian 50% populasi hewan uji dalam 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak rimpang temu blenyeh memiliki efek toksik dengan nilai LC₅₀ sebesar 83,7 ppm. Nilai LC₅₀ tersebut termasuk dalam kategori toksik menurut parameter uji toksisitas. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa bioaktif dalam ekstrak rimpang temu blenyeh, seperti flavonoid, alkaloid, dan tanin, yang berperan sebagai racun perut, penghambat proliferasi sel, dan pemicu apoptosis, dapat bersifat toksik bagi sel normal manusia tetapi berpotensi digunakan dalam pengobatan kanker.

Abstract

Toxicity testing is an initial step to evaluate the bioactivity of compounds that may exhibit toxic effects. In this study, zebrafish (*Danio rerio*) were used as the test animals. The rhizome of *Curcuma purpurascens* Blume is known to contain flavonoids, alkaloids, and tannins that potentially have toxic effects. The rhizome extract was standardized according to quality control tests. This study aimed to identify the toxic effects of the rhizome extract of *Curcuma purpurascens* and to determine its LC₅₀ value. The toxicity test method used was acute toxicity testing in zebrafish, observing the mortality rate over a 96-hour period. Each aquarium contained 7 zebrafish, and the tested extract concentrations were 1000, 500, 250, 125, and 62.5 ppm. Mortality data were analyzed using the probit method with SPSS software to obtain the LC₅₀ value, which represents the concentration that statistically causes 50% mortality of the test population within 24 hours. The results showed that the rhizome extract of *Curcuma purpurascens* exhibited toxic effects with an LC₅₀ value of 83.7 ppm. This LC₅₀ value falls within the toxic category based on toxicity test parameters. These findings indicate that the bioactive compounds in the rhizome extract, such as flavonoids, alkaloids, and tannins, which act as stomach poisons, cell proliferation inhibitors, and apoptosis inducers, can be toxic to normal human cells but may be useful in cancer treatment.

Cara mensitasi artikel (citation style: AMA 11th Ed.):

Dewi A, Pramiastuti O, Nurhidayati LG. Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Temu Blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) terhadap Ikan Zebra (*Danio rerio*). *J. Ilm. Medicam.*, 2024;10(2), 169-177, DOI: [10.36733/medicamento.v10i2.9483](https://doi.org/10.36733/medicamento.v10i2.9483)

PENDAHULUAN

Temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) memiliki akar yang serupa dengan kunyit dan dapat mencapai tinggi hingga 1,75 meter. Perbedaan utama antara kunyit dan temu blenyeh adalah pada warna kulitnya, temu blenyeh cenderung memiliki kulit yang lebih terang dan ukuran yang lebih besar daripada kunyit, serta kulitnya cenderung berwarna kuning kehitaman¹, sesuai yang terlampir pada **Gambar 1**. Senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak rimpang temu blenyeh bermanfaat sebagai sumber antioksidan, seperti fenol, flavonoid, tannin, dan sebagainya.² Ekstrak diklorometana rimpang temu blenyeh memiliki efek sitotoksik, menekan proliferasi kanker usus besar HT-29 sel dan memicu induksi apoptosis melalui jalur mitokondria dependen dengan nilai IC_{50} $7,79 \pm 0,54$ g/mL.³



Gambar 1. Tanaman Temu Blenyeh

Tujuan penelitian biologi medis, makhluk bertulang belakang seperti ikan zebra (*Danio rerio*) dapat digunakan sebagai subjek uji dalam berbagai disiplin ilmu, termasuk toksisitas akuatik, neurologi, dan banyak lagi.⁴ Manfaat menggunakan ikan zebra dapat mengimbangi kebutuhan untuk lebih banyak eksperimen *in vivo* dengan subjek uji tikus. Prosedur uji alternatif yang dapat mengatasi tantangan dalam menegakkan prinsip 3R (*reduce, replace, refinement*) dalam penggunaan hewan coba secara moral adalah masa hidup ikan zebra yang lebih pendek dibandingkan dengan mencit dan kemudahannya untuk diinduksi.⁵

Toksisitas merujuk pada tingkat kerusakan yang disebabkan oleh senyawa asing yang masuk ke dalam organisme. Terdapat berbagai tingkat

toksisitas yang dapat terjadi pada suatu senyawa, seperti toksisitas akut (terjadi dalam waktu singkat), subakut (terjadi dalam periode menengah), kronis (berlangsung dalam waktu yang lama), serta letal (berkaitan dengan konsentrasi yang menyebabkan kematian langsung) dan subletal (terjadi pada konsentrasi di bawah yang memicu kematian langsung).⁶ LC_{50} yaitu ukuran yang digunakan dalam uji toksisitas. Konsentrasi (LC_{50}) yang, jika diberikan satu kali atau berulang selama periode 24 jam, secara statistik menyebabkan kematian 50% hewan uji telah ditentukan. Nilai ini berguna untuk menilai apakah suatu zat bersifat sangat toksik atau tidak.⁷

Evaluasi kandungan senyawa dan prediksi keamanan tanaman herbal membutuhkan pengujian toksisitas. Saat ini, pengujian toksisitas *in vivo* dapat dilakukan menggunakan model hewan uji ikan zebra. Pemilihan ikan zebra sebagai subjek utama dalam penelitian biomedis terkait dengan beberapa alasan ilmiah yang mencakup tingkat homologi yang tinggi dengan manusia (sekitar 75%), embrio yang transparan, tingkat reproduksi yang tinggi, perkembangan embrio yang cepat, masa hidup yang relatif singkat, biaya pemeliharaan yang ekonomis, sensitivitas terhadap perubahan lingkungan (yang menjadikannya sebagai indikator biologis yang baik untuk uji toksisitas), serta kegunaannya dalam pengujian dan pengembangan obat.⁸

Dalam beberapa penelitian sebelumnya telah dipublikasikan terkait uji toksisitas untuk mengevaluasi keamanan tanaman dalam keluarga *Zingiberaceae* dengan menggunakan mencit dan tikus sebagai hewan uji.⁹ Meskipun demikian, penggunaan hewan-hewan tersebut dianggap mahal dan tidak efektif. Berdasarkan paparan di atas, maka pada penelitian uji toksisitas terhadap ekstrak etanol rimpang temu blenyeh dilakukan dengan menggunakan ikan zebra sebagai model hewan uji. Pengujian toksisitas pada ekstrak rimpang temu blenyeh penting dilakukan karena sudah cukup banyak pemanfaatan tanaman temu blenyeh sebagai pengobatan oleh masyarakat sehingga perlu pengkajian lebih dalam untuk memastikan keamanannya. Selain itu, pengujian ini juga berguna untuk mengetahui potensi temu blenyeh sebagai kandidat pengobatan kanker.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan Penelitian

Alat. Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi seperangkat alat gelas (Pyrex), *rotary evaporator*, *micropipette* (Ecopipette), timbangan analitik (ADAM), akuarium, chamber, pipet tetes, kertas saring.

Bahan. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ekstrak temu blenyeh, etanol 70% (Kimia Jaya Labora), akuades (Brataco), ikan zebra, H₂SO₄ (Kimia Jaya Labora), pereaksi Wagner (Kimia Jaya Labora), FeCl₃ (Kimia Jaya Labora), HCl 2N (Kimia Jaya Labora), kloroform (Kimia Jaya Labora), dan DMSO 0,01% (Supelco).

Prosedur Penelitian

1. Persiapan sampel

Rimpang temu blenyeh sebanyak 6,5 kg yang digunakan dalam penelitian ini diidentifikasi di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi. Sampel diperoleh dari Wisata Kesehatan Jamu (WKJ) Kalibakung Kab. Tegal. Rimpang yang telah kering dibersihkan dan digiling menjadi serbuk. Setelah itu dilakukan prosedur ekstraksi selama tiga hari dengan menggunakan teknik maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

2. Standardisasi ekstrak

a. Uji parameter spesifik

Uji ini dilakukan menggunakan pengamatan organoleptis yang meliputi pengamatan warna, bentuk, bau dan rasa dari ekstrak.¹⁰

b. Uji parameter non-spesifik

1) Uji kadar air

Uji ini dilakukan dengan meletakkan 1 gram ekstrak kental temu blenyeh pada cawan aluminium *moisture analyzer* diatur pada suhu 105°C lalu ditutup dan tunggu hingga alat tersebut berbunyi yang menandakan berat ekstrak menjadi konstan. Syarat kadar air yang baik pada ekstrak yaitu <10%.¹⁰

2) Uji kadar abu total

Pengukuran kadar abu total dilakukan dengan menimbang krus porselen kosong dan ekstrak etanol rimpang temu blenyeh sebanyak 1 gram. Kemudian dipijarkan sampai terbentuk abu pada suhu 600°C. Setelah itu diletakkan pada

eksikator sampai suhu kembali seperti semula. Selanjutnya ditimbang serta dicatat beratnya. Syarat kadar abu total yang baik yaitu maksimal 1%.¹¹

3) Uji susut pengeringan

Uji susut pengeringan dilakukan dengan menimbang 0,5 gram ekstrak dan dimasukkan ke dalam botol timbang dan dimasukkan pada oven dengan suhu 105°C. Syarat nilai susut pengeringan yaitu tidak lebih dari 10%.¹¹

4) Uji bebas etanol

Untuk melakukan uji bebas etanol, larutkan ekstrak dalam H₂SO₄, pindahkan ke tabung reaksi, tambahkan C₄H₆O₃, tutup dengan kapas, dan panaskan hingga mendidih. Hasil positif uji ini yaitu ditandai dengan tidak terciumnya aroma ester dari etanol.¹⁰

5) Uji bobot jenis

Dengan menggunakan piknometer, uji berat jenis dilakukan dengan menimbang piknometer kosong dan piknometer yang telah diisi air murni. kemudian encerkan ekstrak sebanyak 5% menggunakan etanol 70%. Ekstrak tersebut dimasukkan ke dalam piknometer dan ditimbang kembali. Setelah itu dihitung nilai bobot jenis menggunakan rumus bobot jenis.¹⁰

3. Skrining Fitokimia Ekstrak

a. Uji alkaloid

Reagen Wagner dan beberapa tetes H₂SO₄ ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi ekstrak. Produksi endapan coklat merupakan indikasi hasil yang berhasil.¹²

b. Uji flavonoid

H₂SO₄ pekat ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi ekstrak. Larutan berubah menjadi warna merah tua, yang mengindikasikan hasil yang positif.¹²

c. Uji tannin

Setelah menempatkan ekstrak dalam tabung reaksi, Sampel positif memiliki tanin bila terbentuk warna hijau kehitaman ataupun biru kehitaman setelah ditambahkan FeCl₃.¹²

d. Uji saponin

Setelah menambahkan air mendidih ke dalam tabung reaksi yang berisi ekstrak, kocok campuran sampai terbentuk busa. Busa yang konsisten dengan ketinggian satu sentimeter

selama sepuluh menit menunjukkan hasil positif mengandung saponin.

e. Uji steroid dan triterpenoid

Ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, larutan $C_4H_6O_3$ dan kloroform ditambahkan. Produksi larutan berwarna ungu menunjukkan temuan positif untuk triterpenoid, sedangkan pembentukan larutan berwarna biru menunjukkan hasil positif untuk steroid.¹²

f. Uji minyak atsiri

Ekstrak dimasukkan dalam cawan porselen, lalu dilarutkan dengan etanol dan dipanaskan. Hasil positif minyak atsiri dengan terciumnya aroma khas minyak atsiri.¹³

4. Pembuatan larutan uji

Larutan induk dibuat pada konsentrasi 10.000 ppm dengan cara menimbang 10 gram ekstrak dan dilarutkan menggunakan air sampai tanda batas 1.000 mL. Kemudian larutan induk dibuat pengenceran pada konsentrasi 1.000, 500, 250, 125, dan 62,5 ppm dan larutan kontrol negatif DMSO 0,01% sesuai yang tertuang pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Variasi Konsentrasi Ekstrak Etanol Temu Blenyeh

Konsentrasi Ekstrak (ppm)	Volume Larutan Ekstrak (mL)	Air (mL)
1.000	100	Ad 1000
500	50	Ad 1000
250	25	Ad 1000
125	12,5	Ad 1000
62,5	6,25	Ad 1000

5. Uji toksisitas ekstrak etanol temu blenyeh menggunakan ikan zebra

Ikan zebra yang digunakan berumur sekitar 2-3 bulan dengan panjang 2 ± 1 cm dan dipelihara dengan pemberian makan setiap hari, suhu termostat 26°C dan pH air 7,0 dalam ruangan dipertahankan pada suhu $24-26^\circ\text{C}$ dengan siklus terang gelap secara alami,¹⁴ seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Ikan Zebra

Ekstrak dibuat dengan memvariasikan konsentrasi sebesar 1.000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, dan 62,5 ppm yang ditunjukkan pada **Gambar 3**. Setelah mengeluarkan setiap konsentrasi dari larutan induk, 800 mL dikumpulkan untuk pengujian. Larutan uji hanya diberikan sekali saja pada awal pengujian. Masing-masing menerima terapi selama 96 jam dan pengamatan harian saat ditempatkan di akuarium dengan tujuh ikan zebra. Jumlah ikan yang mati dihitung untuk memperkirakan tingkat toksisitas setelah pengamatan. Ikan yang tidak bergerak dan mengambang merupakan tanda-tanda kematian ikan.¹⁵



Gambar 3. Larutan seri konsentrasi 62,5, 125, 250, 500, 1.000 ppm dan kontrol negatif

Analisis Data.

Setelah menentukan nilai kematian, analisis data dilakukan dan nilai LC_{50} ditentukan dengan menggunakan pendekatan analisis regresi probit. Perangkat lunak IBM SPSS statistik versi 25 digunakan

untuk melakukan perhitungan. Pendekatan analisis regresi yang paling sering digunakan untuk memperkirakan dosis atau konsentrasi yang dapat mematikan 50% hewan coba adalah analisis regresi probit (LC_{50}/LD_{50}). Analisis regresi probit dapat

memprediksi waktu kematian hewan percobaan ketika paparan mencapai 96 jam dan lebih akurat dalam memprediksi dosis/konsentrasi pada berbagai macam mortalitas.¹⁶

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Ekstrak

Prosedur ekstraksi dalam penelitian ini melibatkan maserasi pelarut etanol 70% selama tiga hari. Dibandingkan dengan pendekatan lain, pendekatan ini lebih berhasil dan memiliki manfaat. Proses dan peralatannya yang mudah mencegah komponen alami terdegradasi karena tidak menggunakan panas.¹⁷ Etanol 70% adalah pelarut polar yang dapat mengekstrak bahan kimia polar yang berbeda dan memisahkan senyawa polar dari senyawa nonpolar. Etanol dipilih sebagai pelarut pilihan untuk analisis. Pelarut menjadi lebih polar saat konsentrasi etanol meningkat. Larutan dapat menarik dan melarutkan bahan jika pelarut yang dikandungnya memiliki polaritas yang sama.¹⁸

Sebanyak 500 gram serbuk rimpang temu blenyeh diekstraksi dengan metode maserasi selama tiga hari sambil sesekali diaduk dengan pelarut etanol 70%. Pengadukan dilakukan untuk meningkatkan proses ekstraksi agar terjadi kontak antara sampel dan pelarut. Setelah diperoleh maserat, filtrat dan residu dipisahkan dengan penyaringan. Setelah penyaringan, filtrat diuapkan di atas penangas air untuk menghasilkan ekstrak kental yang bebas pelarut. Ekstrak rimpang temu blenyeh yang dihasilkan berwarna coklat pekat. Menghitung rendemen bahan yang diekstraksi dapat dilakukan setelah ekstrak kental diperoleh.

Rendemen yang diperoleh dari simplisia sebesar 8,1%, rendemen serbuk sebesar 98,3% dan rendemen ekstrak sebesar 20,0%. Dimana rendemen tersebut merupakan suatu perbandingan berat kering yang dihasilkan sampel dengan berat awal sampel. Rendemen lebih dari 10% dianggap sebagai rendemen yang baik karena rendemen yang lebih besar dikaitkan dengan kandungan bahan kimia yang lebih tinggi yang akan ditarik ke bahan baku. Kandungan air yang tinggi pada simplisia adalah alasan mengapa nilai rendemennya rendah.¹⁹

Standardisasi Ekstrak

Standardisasi ekstrak dilakukan dengan dua parameter yaitu parameter spesifik dan non-spesifik untuk memperoleh ekstrak yang berkualitas. Pengujian yang pertama dilakukan untuk memenuhi parameter spesifik yaitu dengan uji organoleptis.¹⁰ Karakteristik organoleptik dari ekstrak rimpang temu blenyeh diketahui berupa cairan kental berwarna coklat tua kehitaman dengan bau yang khas dan cenderung pahit. Sedangkan standardisasi ekstrak temu blenyeh secara non-spesifik menunjukkan bahwa ekstrak etanol temu blenyeh telah memenuhi parameter pengujian non-spesifik. Hasil standardisasi ekstrak pada **Tabel 2**, menunjukkan bahwa ekstrak etanol temu blenyeh telah memenuhi syarat standardisasi ekstrak dengan kadar air 9,79%, kadar abu total 3,73%, susut pengeringan 0,9%, bobot jenis 0,87% dan pada uji bebas etanol tidak tercium bau ester sehingga dapat dibuktikan bahwa ekstrak yang dihasilkan berkualitas dan dapat dilakukan pengujian selanjutnya.

Tabel 2. Hasil Standardisasi Non Spesifik

Uji	Hasil	Parameter
Kadar air	9,79%	<10%
Kadar abu total	3,73%	<10%
Susut pengeringan	0,9%	1%
Bobot jenis	0,87 gram	-
Bebas etanol	Tidak ada bau ester	Tidak ada bau ester

Penapisan Fitokimia

Proses penapisan fitokimia dilakukan dengan mereaksikan ekstrak uji dengan pereaksi tertentu, skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak rimpang temu blenyeh.²⁰ Beberapa golongan senyawa metabolit sekunder yang diteliti dalam penelitian ini antara lain alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, steroid, triterpenoid dan minyak atsiri. Beberapa pengujian yang telah dilakukan dengan menggunakan beberapa reagen spesifik yang diuraikan pada **Tabel 3**.

Ekstrak rimpang temu blenyeh telah terbukti mengandung triterpenoid, alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin, menurut hasil penapisan fitokimia. Hasil uji tersebut terdapat sedikit ketidaksesuaian dengan penelitian terdahulu ekstrak temu blenyeh

menunjukkan terdapat senyawa steroid². Sedangkan untuk penapisan fitokimia minyak atsiri ekstrak rimpang temu blenyeh belum ada penelitian terdahulu yang melakukannya. Minyak atsiri tergolong senyawa metabolit sekunder yang sangat mudah menguap sehingga proses ekstraksi yang paling baik untuk mendeteksi keberadaan senyawa ini adalah dengan metode destilasi dan dapat dideteksi dengan analisis kromatografi gas.²¹

Tabel 3. Penapisan Fitokimia Ekstrak Etanol Temu Blenyeh

No.	Uji	Pereaksi	Hasil
1.	Alkaloid	(+) H ₂ SO ₄ (+) Wagner	+
2.	Flavonoid	H ₂ SO ₄ pekat	+
3.	Tannin	FeCl ₃	+
4.	Saponin	Air panas	+
5.	Triterpenoid	(+) kloroform (+) asam asetat anhidrat (+) H ₂ SO ₄ pekat	+
6.	Minyak atsiri	(+) etanol diuapkan	-

Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Temu Blenyeh

Ekstrak rimpang temu blenyeh adalah ekstrak yang digunakan, diencerkan untuk membuat larutan dengan berbagai konsentrasi: 1000, 500, 250, 125, dan 62,5 ppm. Tujuannya adalah untuk menentukan nilai LC₅₀ ekstrak pada konsentrasi yang berbeda. Sehingga dapat diketahui secara statistik konsentrasi yang dapat mematikan 50% hewan uji, baik itu dalam sekali maupun beberapa kali paparan dalam sehari.⁷ Penentuan rentang konsentrasi tersebut dipilih berdasarkan hasil pengamatan beberapa pengujian toksisitas menggunakan ikan zebra yang telah dilakukan sebelumnya.¹⁴

Tujuan penambahan DMSO adalah untuk melarutkan konstituen nonpolar ekstrak ke dalam air polar. Hal ini disebabkan karena DMSO berfungsi sebagai surfaktan dan dapat mengikat ujung hidrofilik gugus S=O dan ujung hidrofobik gugus -CH₃.²² Oleh karena itu, setiap ekstrak dilarutkan terlebih dahulu dalam DMSO sebelum ditambahkan 800 ml air. Selain itu, larutan ekstrak dari setiap konsentrasi dimasukkan ke dalam tangki yang berisi tujuh ekor ikan zebra. Tujuan penggunaan teknik eksperimental dalam studi toksisitas pada ikan zebra dewasa adalah untuk memastikan toksisitas jangka pendek dari ekstrak herbal yang mengandung bahan kimia yang telah diidentifikasi. Jika nilai LC₅₀ suatu

senyawa kurang dari 1000 ppm, maka senyawa tersebut dianggap toksik.¹⁴ **Tabel 4** menampilkan tingkat kematian ikan zebra pada masing-masing larutan uji pada setiap konsentrasi ekstrak etanol yang berasal dari rimpang temu blenyeh. Pada hari pertama seluruh ikan zebra pada konsentrasi 1000, 500 dan 250 ppm mengalami kematian, sedangkan pada konsentrasi 125, 62,5 ppm tidak terlihat adanya kematian pada ikan zebra. Lalu pada hari kedua terdapat kematian ikan zebra pada konsentrasi 125 ppm sebanyak 6 ekor dan konsentrasi 62,5 ppm sebanyak 2 ekor. Pada hari ketiga dan keempat tidak ada ikan zebra yang mati. Ikan zebra yang terdapat pada larutan kontrol negatif tidak mengalami kematian pada hari pertama hingga hari keempat.

Tabel 4. Jumlah Kematian Ikan Zebra

Konsentrasi larutan uji (ppm)	Jumlah ikan zebra (ekor)				Total
	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam	
1000	7	0	0	0	7
500	7	0	0	0	7
250	7	0	0	0	7
125	0	6	0	0	6
62,5	0	2	0	0	2
Kontrol negatif	0	0	0	0	0

Jumlah ikan yang mati dalam pengujian 50% dari total hewan uji adalah hasil akhir yang dievaluasi. Perangkat lunak statistik SPSS digunakan untuk melakukan analisis regresi probit dan mendapatkan nilai LC₅₀. Nilai LC₅₀ ekstrak ekstrak etanol temu blenyeh dalam analisis probit ini adalah 83,7 ppm. Senyawa diklasifikasikan ke dalam tiga kelompok toksisitas tergantung pada nilai LC₅₀, senyawa yang sangat toksik (nilai LC₅₀ < 30 ppm), toksik (nilai LC₅₀ < 30-1000 ppm), dan tidak toksik (nilai LC₅₀ > 1000 ppm).²³ Dari hasil penelitian terdahulu menunjukkan korelasi positif dengan nilai LC₅₀ pada penelitian uji toksisitas dengan ikan zebra ini. Tingkat toksisitas temu blenyeh memiliki kemiripan dengan temu hitam (nilai LC₅₀ 64,23 ppm), temu mangga (nilai LC₅₀ 118,68 ppm), jahe merah (nilai LC₅₀ 72,56 ppm), dan temu bangle (nilai LC₅₀ 72,09 ppm), yang mana nilai LC₅₀ pada ekstrak etanol rimpang keempat temu-temuan tersebut tergolong toksik. Namun, berbeda dengan ekstrak etanol kencur yang memiliki nilai LC₅₀ 4,29 ppm atau tergolong dalam kategori sangat toksik.²⁴

Ekstrak rimpang temu blenyeh diklasifikasikan sebagai senyawa toksik menurut kategori ini. Artinya, senyawa alami yang menyebabkan toksik pada ekstrak rimpang temu blenyeh umumnya dapat ditoleransi dan tidak bersifat toksik bagi sel normal manusia tetapi dapat digunakan untuk mengatasi sel kanker.²⁵ Oleh karena itu, dengan nilai $LC_{50} < 1000$ ppm yang tergolong dalam kategori toksik ini dapat digunakan untuk mengetahui efek sitotoksitas pada garis sel kanker sehingga dapat dilakukan uji lanjutan secara *in vitro*.²⁵ Selain itu, hasil uji toksisitas ini dapat digunakan sebagai rujukan keamanan sebelum penggunaan suatu bahan uji pada manusia.²⁶

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam rimpang temu blenyeh inilah yang bertanggungjawab terhadap efek toksik pada ikan zebra. Aktivitas biologis pada ekstrak rimpang temu blenyeh terhadap ikan zebra disebabkan oleh kandungan senyawa seperti flavonoid, alkaloid, tanin, dan saponin. Berdasarkan penelitian terdahulu, persentase kandungan senyawa aktif yang paling tinggi dari ekstrak etanol temu blenyeh yaitu flavonoid mencapai 4,77%.²⁷

Mekanisme kematian ikan zebra berhubungan senyawa flavonoid, alkaloid dan tannin dalam ekstrak rimpang temu blenyeh yang dapat menghambat daya makan ikan zebra.²⁸ Zat ini berfungsi sebagai racun perut atau keracunan, mencegah siklus sel atau apoptosis, dan menghambat pertumbuhan sel kanker. Dengan demikian, sistem pencernaan ikan zebra akan terganggu jika zat tersebut masuk ke dalamnya. Reseptor perasa hewan uji akan terganggu, sehingga tidak memungkinkan untuk mengonsumsi makanannya, yang berujung pada kematian kelaparan pada ikan tersebut.^{29,30} Di antara zat metabolit sekunder yang memiliki sifat antikanker adalah flavonoid, alkaloid, dan tanin. Cara kerja dari senyawa bahan kimia dalam menghancurkan sel kanker telah diketahui dapat dilakukan dengan berbagai mekanisme, seperti misalnya mekanisme kerja anti-kanker senyawa tanin adalah dengan melibatkan pencegahan pertumbuhan sel untuk memblokir rute transduksi sinyal dari membran ke sel inti.²⁹

Sedangkan senyawa alkaloid memiliki beberapa mekanisme sebagai antikanker yaitu dengan menghentikan siklus sel atau apoptosis, menginduksi pembentukan spesies oksigen reaktif intraseluler (ROS) dalam sel kanker dan menghambat pembaharuan sel induk payudara dan tidak menyebabkan toksisitas pada sel-sel yang berdiferensiasi.³¹ Meskipun ada bukti kuat bahwa beberapa flavonoid memiliki sifat antikanker, proses molekuler yang mendasarinya masih belum jelas. Flavonoid berpartisipasi dalam penghentian siklus sel, memicu autofagi dan apoptosis, serta menghambat pertumbuhan dan invasi sel kanker.^{32,33} Isoflavon genistein mendorong penghentian sel kanker payudara pada fase G2/M dan selanjutnya apoptosis yang bergantung pada reactive oxygen species (ROS).³⁴ Flavanon naringenin memberikan efek antikanker pada lini sel koriokarsinoma JAR dan JEG 3 dengan menginduksi pembentukan ROS dan aktivasi jalur pensinyalan.³⁵

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian pada ekstrak etanol temu blenyeh dapat disimpulkan bahan ekstrak etanol temu blenyeh memiliki efek toksik terhadap ikan zebra dengan nilai LC_{50} sebesar 83,7 ppm yang tergolong dalam kategori toksik pada parameter uji toksisitas.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hong SL, Lee GS, Syed Abdul Rahman SN, et al. Essential oil content of the rhizome of curcuma purpurascens Bl. (Temu Tis) and its antiproliferative effect on selected human carcinoma cell lines. *Scientific World Journal*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/397430
2. Pramiastuti O, Murti FK. Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Temu Blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume). *Jurnal Ilmiah Kesehatan*. 2022;15(1):12-22. doi:10.48144/jiks.v15i1.627
3. Rouhollahi E, Moghadamtousi SZ, Al-Henhena N, et al. The chemopreventive potential of Curcuma purpurascens rhizome in reducing azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rats. *Drug Design, Development and Therapy*. 2015;9:3911-3922. doi:10.2147/DDDT.S84560
4. Rahmah MASAR. Uji Perlakuan Irisan Daun Mimba (*Azadirachta Indica*) TERHADAP Penyusutan Luka Ikan Zebra (*Danio Rerio*)

- (Kajian Eksperimen Biologi). 2021.
5. Indriyanti N. Zebrafish (*Danio rerio*) Sebagai Model Hewan Coba pada Pengujian Aktivitas Obat. *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*. 2020;11:80-83. doi:10.25026/mpc.v11i1.398
 6. Kurt TL. A Textbook of Modern Toxicology, Third Edition Edited by E. Hodgson (North Carolina State University). Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ. 2004. xxi + 557 pp. 17.8 × 25.4 cm. \$89.95. ISBN 0-471-26508-X. *Journal of Natural Products*. 2004;67(12):2158-2159. doi:10.1021/np0307643
 7. Purnama P, Ramadani R, Puji Lestari, S.Si,M.Sc R. Pengujian Toksisitas Lethal Concentration 50 (LC50) Terhadap Udang Windu (*Penaeus monodon*) Menggunakan Larutan Acuan Toksik Kalium Klorida (KCl). *Ecolab*. 2023;17(2):85-93. doi:10.59495/jklh.2023.17.2.85-93
 8. Khotimah H, Ali MM. Ikan Zebra (*Danio rerio*) sebagai Binatang Model pada Penelitian Biomedis dan Cara Pemeliharaannya. *Sanus Medical Journal*. 2020;1(1):1-10.
 9. Fakri F, Idrus LS, Iskandar MA, Wibowo I, Adnyana IK. Acute toxicity of Keladi Tikus (*typhonium flagelliforme* (Lodd.) blume) ethanol extract on Zebrafish (*Danio Rerio*) embryo in Vivo. *Indonesian Journal of Pharmacy*. 2020;31(4):297-304. doi:10.22146/ijp.1121
 10. Depkes RI. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2000.
 11. Heru Agus Cahyanto. Standardisasi Simplisia Dan Ekstrak Etanol Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rosch. var *rubrum*) dari Lahan Gambut Kubu Raya, Kalimantan Barat. *Jurnal Borneo Akcaya*. 2022;7(2):49-55. doi:10.51266/borneoakcaya.v7i2.204
 12. Shaikh JR, Patil MK. Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. *International Journal of Chemical Studies*. 2020;8(2):603-608.
 13. Rukmini.Afifah, Utomo, Laily. Skrining fitokimia familia piperaceae 1. 2020;7(1):28-32.
 14. Marihot Pasaribu,Sjarif Ismail HN. Toksisitas Akut Ekstrak *Albertisia papuana* Becc. pada *Daphnia magna* dan *Danio rerio*. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*. 2019;3(September):96-103. doi:10.24002/biota.v3i3.1898
 15. Tiara R, Dewanti A, Andriana D, Yahya A. Nilai LC 50 Dekokta Kumis Kucing. 50.
 16. Wijaya RC. Lethal Concentration 50% Of Patchouli Oil (*Pogostemon cablin*) Towards Zebrafish Embryo (*Danio rerio*). *Herb-Medicine Journal*. 2020;3(2):1. doi:10.30595/hmj.v3i2.6360
 17. Susanty S, Bachmid F. Perbandingan metode ekstraksi maserasi dan refluks terhadap kadar fenolik dari ekstrak tongkol jagung (*Zea mays* L.). *Jurnal Konversi*. 2016;5(2):87-92.
 18. Surya A, Luhurningtyas FP. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 70% dan 96% Buah Parijoto Asal Bandungan dan Profil Kromatografinya. *Pharmaceutical and Biomedical Sciences Journal*. 2021;3(1):39-44.
 19. Depkes RI. Farmakope Herbal Indonesia Edisi 2. Published online 2017:561.
 20. Saragih DE, Arsita EV. The phytochemical content of *Zanthoxylum acanthopodium* and its potential as a medicinal plant in the regions of Toba Samosir and North Tapanuli, North Sumatra. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*. 2019;5(1):71-76. doi:10.13057/psnmbi/m050114
 21. Rahayu SN. Isolasi minyak atsiri dari temulawak (*Curcuma Xanthorrhiza*) dan identifikasi bioaktif menggunakan GCMS. Published online 2019:26-32.
 22. Wati VS. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kltf Fraksi Etil Asetat Dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata*. 2020;2507(1):1-9.
 23. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 1982;45(1):31-34. doi:10.1055/s-2007-971236
 24. Paramita A, Wibowo I, Insanu M. Skrining Toksisitas Akut Lima Rimpang Suku Zingiberaceae Menggunakan Embrio Ikan Zebra. *Acta Pharmaceutica Indonesia*. 2021;46(2):1-9. doi:10.5614/api.v46i2.16093
 25. Greenwell M, Rahman PKSM. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *International journal of pharmaceutical sciences and research*. 2015;6(10):4103-4112. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.6(10).4103-12
 26. Almulqu AA, Emi R. Jurnal Pendidikan Biologi. *Jurnal Pendidikan Biologi*. 2021;12(3):146-157.
 27. Sinaga, Ernawati, Suprihatin, Rastuti, Rina M. Kadar Flavonoid Total, Daya Antioksidan dan Daya Hepatoprotektif Ekstrak Etanol Rimpang Temu Tis (*Curcuma purpurascens*). *Prosiding Kongres XX & Pertemuan Ilmiah Tahunan*

- Ikatan Apoteker Indonesia 2018. Published online 2018:13-19.
28. Muaja AD, Koleangan HSJ, Runtuwene MRJ. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan Metode Soxhletasi. *Jurnal MIPA*. 2013;2(2):115. doi:10.35799/jm.2.2.2013.3000
29. Fitriana DS. Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak dan Isolat Tanin Rumpun Bambu (*Lophaterum gracile* B.) yang Diembankan pada Zeolit Nax terhadap Sel Kanker Payudara T47D dengan Metode Mtt. 2019.
30. Meiyanto E, Handayani, Sri S, Susidarti. Synergistic Effect of Areca catecha L. Ethanol Extract and Its Chloroform Fraction with Doxorubicin on MCF7. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Published online 2009:13-18.
31. Lu JJ, Bao JL, Chen XP, Huang M, Wang YT. Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;2012. doi:10.1155/2012/485042
32. Chirumbolo S, Bjørklund G, Lysiuk R, Vella A, Lenchyk L, Upyr T. Targeting cancer with phytochemicals via their fine tuning of the cell survival signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(11). doi:10.3390/ijms19113568
33. Perez-Vizcaino F, Fraga CG. Research trends in flavonoids and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2018;646(March):107-112. doi:10.1016/j.abb.2018.03.022
34. Kaushik S, Shyam H, Agarwal S, et al. Genistein potentiates Centchroman induced antineoplasticity in breast cancer via PI3K/Akt deactivation and ROS dependent induction of apoptosis. *Life Sciences*. 2019;239:117073. doi:10.1016/j.lfs.2019.117073
35. Park S, Lim W, Bazer FW, Song G. Naringenin suppresses growth of human placental choriocarcinoma via reactive oxygen species-mediated P38 and JNK MAPK pathways. *Phytomedicine*. 2018;50:238-246. doi:10.1016/j.phymed.2017.08.026