

**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK AIR DAN EKSTRAK ETANOL
DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* Less.) TERHADAP EMBRIO IKAN
ZEBRA (*Danio rerio*)**

SKRIPSI

**Oleh:
SUKMA DEWI IRAWAN PUTRI
066117354**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PAKUAN
BOGOR
2024**

**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK AIR DAN EKSTRAK ETANOL
DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* Less.) TERHADAP EMBRIO IKAN
ZEBRA (*Danio rerio*)**

SKRIPSI

**Skripsi Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar
Sarjana Pada Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam Universitas Pakuan**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PAKUAN
BOGOR
2024**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Uji Toksisitas Akut Ekstrak Air dan Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less.) Terhadap Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*)

Nama : Sukma Dewi Irawan Putri

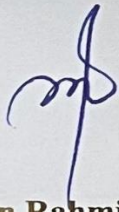
NPM : 066117354

Program Studi : Farmasi

Skripsi ini telah disetujui dan disahkan

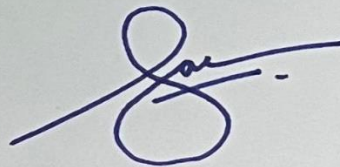
Bogor, November 2024

Pembimbing Utama



drh. Min Rahminiwati M.Sc., Ph.D.

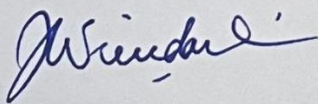
Pembimbing Pendamping



Sara Nurmala, M.Farm.

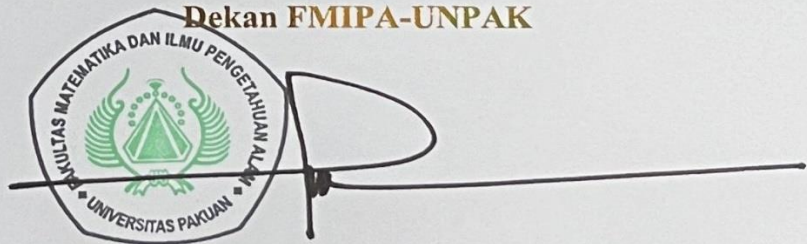
Megetahui,

Ketua Program Studi Farmasi



apt. Dra. Ike Yulia Wiendarlina, M.Farm.

Dekan FMIPA-UNPAK



Asep Denih, S.Kom., M.Sc., Ph.D.

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA TULIS

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah karya tulis yang dikerjakan sendiri dan tidak pernah dipublikasikan atau digunakan untuk mendapatkan gelar sarjana di perguruan tinggi atau lembaga lain.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya. Apabila di kemudian hari terdapat gugatan, penulis bersedia dikenakan sanksi sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Bogor, November 2024



Sukma Dewi Irawan Putri

**Surat Pelimpahan Skripsi, Sumber Informasi, Serta Kekayaan Intelektual
Kepada Universitas Pakuan**

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : **Sukma Dewi Irawan Putri**
NPM : **066117354**
Judul Tugas Akhir : **Uji Toksisitas Akut Ekstrak Air dan Ekstrak
Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less.)
Terhadap Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*)**

Dengan ini saya menyatakan bahwa Skripsi di atas adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun.

Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain yang telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir Skripsi ini. Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Universitas Pakuan.

Bogor, November 2024



Sukma Dewi Irawan Putri

HALAMAN PERSEMBAHAN

Kepada Tuhan, Allah Subhanallahuwata'ala, segala hormat, puji dan syukur kepada yang maha pengasih lagi maha penyayang. Segalanya terasa baik dan benar dengan melibatkanMu dalam setiap langkah hidupku, terima kasih untuk limpahan cinta dan kasih sayang yang begitu besar kepadaku sehingga aku dapat kesempatan untuk menyelesaikan skripsi yang merupakan pembelajaran hidup.

Kepada Ibu (Eko Retno Irianti) dan Papah (Bambang Irawan) yang amat aku sayangi, penguat hidupku, segalanya bagiku, terima kasih karena telah menjadi orang tuaku yang selalu ada untuk memberi dukungan berupa materi, waktu, doa, serta usaha yang tak pernah ada hentinya. Terima kasih untuk selalu memenuhi kebutuhanku. Maafkan aku yang masih selalu bergantung, membuat cemas, serta membuat kalian harus banyak bersabar.

Kepada Kakak-kakakku Mas Agung, Mas Fid, Mas Bambang, Teh Ami, Teh Irdha, dan Mba Susi, terima kasih untuk segala bentuk dukungan yang kalian berikan kepadaku yang masih suka merengek dan mudah menangis ini. Terima kasih untuk selalu peduli dengan bertanya “apa yang belum?, nanti bilang aja”. Dan untuk keponakan-keponakanku Satrio, Neo, Arta, Fathan, Sambodho, Erik, dan Keysha terima kasih karena memberikan lebih banyak warna dalam keluarga.

Kepada kucing-kucingku Habee, Jajang, dan Mako, terima kasih telah hadir dan menjadi sahabat sekaligus keluarga yang selalu menemaniku begadang dalam pengerjaan skripsi ini, juga terima kasih telah selalu mendengarkan curahan hatiku yang bersifat sangat rahasia.

Teman-teman seperjuanganku, Indri, Martia, Sofie, Fatihah, Aci, Yuli, Aghnia, Isna, Bima, dan Ghufrio, terima kasih telah menemani dengan banyak candaan yang membuat gelak tawa selama tumbuh di masa kuliah, semoga pertemanan kita terjalin tanpa terputus.

Teman-teman penelitian embrio yaitu Elsa dan Afifah, terima kasih telah menjadi teman mendadak di akhir semester yang tanpa ragu saling membantu dalam pengerjaan skripsi ini. Tak lupa kepada Mas Gilang teman TK ku yang menjadi laboran saat itu, terima kasih karena selalu mau aku repotkan dengan

banyak pertanyaan dan permintaan alat bahan ini dan itu selama pengerjaan penelitianku.

Kepada diriku, perjuangan belum usai, jangan lengah tapi tolong tetap jalan dengan tenang, nyaman, bahagia, dan tetap libatkan Allah SWT di setiap langkah.

Cukuplah Allah bagiku, tidak ada Tuhan selain Dia.

Hanya kepadaNya aku bertawakal.

Q.S At-Taubah: 129.

DAFTAR RIWAYAT HIDUP



SUKMA DEWI IRAWAN PUTRI, lahir di Bogor pada tanggal 09 November 1998. Penulis adalah anak ketiga dari tiga bersaudara yang lahir dari pasangan Bapak Bambang Irawan dan Ibu Eko Retno Irianti. Penulis memulai pendidikan formalnya di TK Insan Taqwa pada tahun 2003-2004. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan Sekolah Dasar di SDN Pasir Eurih 1 pada tahun 2004 dan lulus pada tahun 2010.

Selanjutnya ditahun 2010 penulis melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMPN 1 Tamansari dan lulus pada tahun 2013. Pada tahun yang sama yaitu 2013, penulis melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMAS Rimba Madya dan lulus pada tahun 2016. Penulis kemudian memilih untuk melanjutkan pendidikan jurusan Farmasi pada tingkat Sarjana (S1) di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan Bogor, selama menjadi mahasiswa di Universitas, penulis merupakan anggota aktif Himpunan Mahasiswa Farmasi (HIMAFAR).

Pada tahun 2021, penulis melakukan penelitian sebagai bagian dari persyaratan penyelesaian tugas akhir dengan judul “**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK AIR DAN EKSTRAK ETANOL DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* Less.) TERHADAP EMBRIO IKAN ZEBRA (*Danio rerio*)**” penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan, dan penulis dinyatakan lulus pada bulan Oktober 2022.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji serta syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul **“Uji Toksisitas Akut Ekstrak Air dan Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) Terhadap Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*)”**. Skripsi ini diajukan untuk memenuhi salah satu syarat dalam memperoleh gelar Sarjana Farmasi dari Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan.

Selama melakukan penulisan skripsi ini, penulis memperoleh bantuan serta bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. drh. Min Rahminiwati, M.Sc., Ph.D sebagai pembimbing utama dan Sara Nurmala, M.Farm sebagai pembimbing pendamping.
2. Ketua Program Studi Farmasi dan Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan.
3. Kedua orang tua dan kakak-kakak, serta seluruh keluarga besar yang selalu memberi dukungan, pengertian, dan doa restunya.
4. Seluruh dosen dan staf Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan.
5. Teman-teman Farmasi angkatan 2017 yang telah banyak membantu.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini belum sempurna, oleh karena itu kritik serta saran dari berbagai pihak penulis harapkan untuk kesempurnaan penulisan ini.

Bogor, November 2024.

Penulis

RINGKASAN

SUKMA DEWI IRAWAN PUTRI. 066117354. **Uji Toksisitas Akut Ekstrak Air dan Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less.) Terhadap Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*).** Dibimbing oleh: Min Rahminiwati dan Sara Nurmala.

Daun beluntas (*Pluchea indica* Less.) banyak digunakan sebagai obat tradisional, serta dilaporkan memiliki aktivitas-aktivitas farmakologis diantaranya sebagai antioksidan, antimikroba, antifertilitas, antidiabetes mellitus, dan antikanker. Dalam penggunaan obat herbal, perlu diketahui batas keamanannya, maka dari itu dilakukan uji toksisitas menggunakan embrio ikan zebra (*Danio rerio*) yang dapat menentukan toksisitas akut sekaligus dapat mengetahui target organ dengan melihat adanya malformasi yang terjadi pada embrio ikan zebra.

Penelitian ini bertujuan untuk menetapkan toksisitas akut ekstrak air dan ekstrak etanol daun beluntas dari nilai LC₅₀ yang diperoleh, serta menetapkan abnormalitas secara mikroskopis pada embrio ikan zebra. Pengujian toksisitas menggunakan metode ZFET (*Zebrafish Embryo Toxicity*) dari OECD No.236 tahun 2013, dengan 12 kelompok hewan uji, yaitu masing-masing ekstrak kering hasil maserasi dan infusa dibuat 5 kelompok uji dengan konsentrasi 50 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, dan 1000 ppm, serta 2 kelompok uji lainnya yaitu kontrol negatif dan kontrol internal. Pengamatan dilakukan setiap 24 jam selama 96 jam. Nilai probit kematian embrio dianalisis untuk menentukan LC₅₀ dan abnormalitas mayor ditentukan dengan presentase $\geq 50\%$.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kering hasil infusa dan maserasi daun beluntas tergolong ke dalam praktis tidak toksik dengan nilai LC₅₀ sebesar 549,750 ppm dan 357,496 ppm. Hasil yang diperoleh melalui pengamatan mikroskopis menunjukkan adanya abnormalitas mayor pada perkembangan embrio ikan zebra berupa edema perikardium, edema kantung kuning telur, kelainan pada notokorda, ekor, somit dan sumbu tubuh. Dapat disimpulkan bahwa daun beluntas memiliki sifat ketoksikan praktis tidak toksik dan menyebabkan abnormalitas yang spesifik pada embrio ikan zebra.

Kata kunci: Uji Toksisitas Akut, Daun Beluntas, Infusa, Maserasi.

SUMMARY

SUKMA DEWI IRAWAN PUTRI. **Acute Toxicity Test of Aqueous Extract and Ethanol Extract of Beluntas Leaves (*Pluchea indica* Less.) on Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos.** Supervised by: Min Rahminiwati and Sara Nurmala.

Beluntas leaves (*Pluchea indica* Less.) has been widely used as a traditional medicine, and reported to have pharmacological activities including antioxidant, antimicrobial, antifertility, antidiabetes mellitus, and anticancer. In the use of herbal medicines, it is necessary to know the safety limit, therefore a toxicity test is carried out using zebrafish embryos (*Danio rerio*) which can determine acute toxicity as well as detect target organs by looking at the malformations that occur in zebrafish embryos.

This study aims to determine the acute toxicity of aqueous extracts and ethanol extracts of beluntas leaves from the LC₅₀ value found, as well as to determine microscopic abnormalities in zebrafish embryos. Toxicity testing using the ZFET (Zebrafish Embryo Toxicity) method from OECD No. 236 of 2013, with 12 groups of test animals, namely each dry extract from maceration and infusion made 5 test groups with concentrations of 50 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, and 1000 ppm, as well as 2 other test groups, namely negative control and internal control. Observations were made every 24 hours for 96 hours. The probit value of embryo mortality was analyzed to determine LC₅₀ and major abnormalities were determined by a percentage of $\geq 50\%$.

The results showed that the dry extract of infusion and maceration of beluntas leaves was classified as practically non-toxic, with LC₅₀ values of 549.750 ppm and 357.496 ppm. The results got through microscopic observations showed that there were major abnormalities in the development of zebrafish embryos as pericardial edema, yolk sac edema, abnormalities in the notochord, tail, somites and body axis. Concluded that beluntas leaves have practically non-toxic characteristics and cause specific abnormalities in zebrafish embryos.

Key words: Acute Toxicity Test, Beluntas Leaves, Infusion, Maceration.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN KARYA TULIS	iii
SURAT PELIMPAHAN SKRIPSI	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
RIWAYAT HIDUP	vii
KATA PENGANTAR	viii
RINGKASAN	ix
SUMMARY	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
1.3. Hipotesis.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tanaman Beluntas	5
2.1.1 Deskripsi Daun Beluntas.....	5
2.1.2 Kandungan Kimia Daun Beluntas.....	6
2.1.3 Manfaat Daun Beluntas.....	6
2.2 Ekstraksi.....	7
2.2.1 Infusa.....	7
2.2.2 Maserasi	8
2.3 Toksisitas	8
2.3.1 Tujuan Uji Toksisitas	9
2.3.2 Ragam Uji Toksisitas	11
2.4 Toksisitas Teratogenik	13

2.5 Ikan Zebra	14
2.5.1. Perkembangan Embrio Ikan Zebra.....	15
2.5.2 Uji Toksisitas Akut Embrio Ikan Zebra	19
BAB III METODE PENELITIAN	22
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	22
3.2 Alat dan Bahan	22
3.2.1 Alat Penelitian	22
3.2.2 Bahan Penelitian.....	22
3.3 Cara Kerja	22
3.3.1. Determinasi Tanaman	22
3.3.2. Pembuatan Simplisia Daun Beluntas	22
3.3.3. Pembuatan Ekstrak Daun Beluntas	23
3.3.3.1. Maserasi	23
3.3.3.2. Infusa.....	24
3.3.4. Uji Mutu Simplisia dan Ekstrak Daun Beluntas	24
3.3.4.1 Penetapan Kadar Air	24
3.3.4.2 Penetapan Kadar Abu.....	24
3.3.5 Skrining Fitokimia Simplisia dan Ekstrak Daun Beluntas	25
3.3.5.1 Uji Flavonoid	25
3.3.5.2 Uji Alkaloid.....	25
3.3.5.3 Uji Tanin	26
3.3.5.4. Uji Steroid dan Triterpenoid	26
3.3.5.5. Uji Saponin	26
3.3.6. Uji Toksisitas Akut Terhadap Embrio Ikan Zebra.....	26
3.3.6.2. Pengenceran Ekstrak Daun Beluntas	27
3.3.6.3. Seleksi Embrio Ikan Zebra.....	27
3.3.6.4. Uji Toksisitas	27
3.3.7.5. Uji Daya Tetas terhadap Embrio Ikan Zebra	28
3.3.7.6. Waktu Pengamatan pada Uji Toksisitas.....	28
3.3.7.7. Analisis Data	29

3.3.7.8. Uji Toksisitas terhadap Malformasi	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1. Hasil Determinasi Tanaman	32
4.2. Karakteristik Serbuk Simplisia dan Ekstrak Kering Daun Beluntas	32
4.3. Mutu Serbuk Simplisia dan Ekstrak Kering Daun Beluntas	33
4.3.1. Hasil Kadar Air	33
4.3.2. Hasil Kadar Abu	34
4.4. Hasil Skrining Fitokimia Serbuk Simplisia, dan Ekstrak Kering Daun Beluntas	34
4.5. Hasil Uji Toksisitas Terhadap Embrio Ikan Zebra	36
4.5.1. Hasil Uji Toksisitas Daya Tetas Embrio Ikan Zebra	37
4.5.2. Hasil Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kering Hasil Infundasi dan Maserasi Daun Beluntas	38
4.7. Hasil Uji Toksisitas terhadap Malformasi Embrio Ikan Zebra	40
4.7.1. Morfologi Embrio Ikan Zebra pada Paparan Ekstrak 24 jam.	40
4.7.2. Morfologi Embrio Ikan Zebra pada Paparan Ekstrak 48 jam.	41
4.7.3. Morfologi Embrio Ikan Zebra pada Paparan Ekstrak 72 jam.	42
4.7.4. Morfologi Embrio Ikan Zebra pada Paparan Ekstrak 96 jam.	42
BAB V KESIMPULAN.....	51
5.1. Kesimpulan	51
5.2. Saran.....	51
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN.....	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Daun Beluntas (<i>Pluchea indica</i> L.).....	5
2. Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>)	15
3. Perkembangan Normal dari Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>) 0-5 Jam	16
4. Perkembangan Normal dari Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>) 6-14 Jam	17
5. Perkembangan Normal dari Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>) 16-72 Jam.....	18
6. Diagram Alir Seleksi Embrio.....	28
7. Indikator Kematian Embrio Ikan Zebra (<i>Danio rerio</i>)	29
8. Perkembangan Embrio Ikan Zebra yang di-Induksi Etridiazole.....	31
9. Embrio Ikan Zebra Berusia 6 Jam Pasca Fertilisasi.....	36
10. Grafik Hubungan Waktu dengan Nilai LC ₅₀ Ekstrak Daun Beluntas	38
11. Morfologi Embrio Ikan Zebra pada Usia 24 Jam	41
12. Morfologi Embrio Ikan Zebra pada Usia 48 Jam	41
13. Morfologi Embrio Ikan Zebra pada Usia 72 Jam	42
14. Morfologi Embrio Ikan Zebra pada Usia 96 Jam	43

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kategori Toksisitas Akut Berdasarkan <i>Fish and Wildlife Service</i>	20
2. Tabel Probit.....	30
3. Hasil Skrining Fitokimia Simplisia Serbuk dan Ekstrak Kering Hasil Infusa dan Maserasi Daun Beluntas	35
4. Hasil Uji Toksisitas Daya Tetas Embrio pada Akhir Paparan 96 Jam....	38
5. Hasil Nilai LC ₅₀ pada Ekstrak Kering Daun Beluntas	39
6. Presentase Jumlah Kelainan pada Seluruh Embrio Ikan Zebra	48
7. Abnormalitas Mayor pada Embrio Ikan Zebra	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Tahap Pembuatan Simplisia dan Ekstrak Daun Beluntas	63
2. Skema Tahap Uji Toksisitas dengan Embrio Ikan Zebra.....	64
3. Hasil Determinasi Tanaman.....	65
4. Perhitungan Rendemen, Kadar Air, dan Kadar Abu pada Serbuk Simplisia dan Ekstrak Kering Daun Beluntas	66
5. Hasil Komite Etik Hewan Percobaan.....	73
6. Perhitungan Pembuatan Larutan Uji	74
7. Hasil Uji Daya Tetas Embrio Ikan Zebra.....	76
8. Jumlah Kematian Embrio Ikan Zebra	79
9. Hasil Nilai LC ₅₀ Ekstrak Kering Daun Beluntas	80
10. Hasil Uji LC ₅₀ Ekstrak Kering Daun Beluntas Menggunakan Probit.....	81
11. Hasil Uji FRAK (Faktorial Rancangan Acak Kelompok) terhadap Nilai LC ₅₀	94
12. Hasil Analisis Malformasi terhadap Embrio Ikan Zebra	96
13. Hasil Perbandingan Embrio Hidup dan Abnormal	96
14. Dokumentasi	97

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Iklm tropis di Indonesia membuat negara ini banyak ditumbuhi oleh berbagai jenis tanaman terutama yang memiliki potensi sebagai tanaman obat. Salah satu diantaranya adalah beluntas. Beluntas (*Pluchea indica* L.) merupakan tanaman herba yang telah banyak dimanfaatkan sebagai pangan dan sediaan obat bahan alam. Tanaman ini hidup dan dapat tumbuh secara liar, namun pada umumnya ditanam sebagai tanaman pagar (Sulistyaningsih, 2009).

Secara empiris, daun dari tanaman beluntas diketahui kaya akan metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid, steroid (Fatmi *et al.*, 2020), monoterpen, seskuiterpen, kuinon (Sulistyaningsih, 2009), β -karoten, asam klorogenat, asam kafeat, kuersetin (Suriyaphan, 2014), lignan, fenilpropanoid, bensoid, sterol, katekin, fenil hidrokuinon, volatil oil (Widyawati *et al.*, 2013), glikosida, natrium, kalsium, magnesium, fosfor, gula, vitamin C, asam amino (Saparinto & Susiana, 2016), dan turunan asam caffeoylquinat (Arsiningtyas *et al.*, 2014; Kongkiatpaiboon *et al.*, 2018). Pada penelitian yang dilakukan oleh Ruan *et al.*, (2018) dinyatakan bahwa ekstrak 70% etanol-air dari daun beluntas mengandung senyawa thiophenes yang memiliki banyak manfaat salah satunya yaitu sebagai antimikroba.

Daun beluntas telah lama dimanfaatkan sebagai bahan obat dalam pengobatan tradisional, minuman kesehatan, juga sebagai sayuran terutama pada masyarakat di Asia Tenggara. Di Malaysia daun beluntas digunakan untuk mengeluarkan keringat dan penurun panas. Di Indonesia daun beluntas digunakan untuk mengatasi masalah lambung, obat batuk, dan meningkatkan air susu ibu, di Vietnam dan Kamboja digunakan untuk mengatasi lumbago (Raharjo & Horsten, 2001). Di Thailand digunakan untuk diabetes mellitus, tumor, hipertensi, sistitis, obat luka (Chewchida & Vongsak, 2019), batu ginjal, wasir, radang, dan keputihan (Suriyaphan, 2014). Daun beluntas dilaporkan memiliki efek sebagai antimikroba,

antioksidan, antifertilitas, antiinflamasi, analgesik, antiobesitas, antidiabetes mellitus dan antikanker.

Banyaknya manfaat yang ada tentunya tidak lepas dari peranan senyawa kimia yang terkandung dari daun beluntas. Pernyataan *Paracelcus* dalam Yulianto dan Amaloyah (2017) bahwa “*Semua zat adalah racun dan tidak ada zat yang tidak beracun, hanya dosis yang membuatnya tidak beracun.*”, menyadarkan bahwa senyawa kimia yang terkandung pada daun beluntas dapat menjadi berbahaya apabila tidak dievaluasi batas keamanannya, maka dari itu daya toksik daun beluntas perlu dievaluasi agar dapat digunakan secara luas oleh masyarakat.

Keamanan suatu senyawa kimia dapat diketahui dari hasil uji toksisitas. Uji toksisitas akut merupakan pengujian untuk mengetahui dosis letal dan dosis maksimal yang masih ditoleran oleh hewan coba dimana hasilnya akan ditransformasikan pada manusia (Priyanto, 2010). Nilai *lethal concentration* (LC₅₀) merupakan parameter dalam uji toksisitas akut. Berdasarkan nilai LC₅₀ sifat suatu bahan dapat diketahui peringkat ketoksikannya apakah sangat toksik atau tidak toksik (Khan *et al.*, 2009). Adapun uji teratogenik yang dirancang secara khusus untuk mengevaluasi lebih dalam (Lu, 1995), dimaksudkan untuk melihat efek teratogen seperti malformasi, perlambatan pertumbuhan janin, dan manifestasi perkembangan yang menyimpang.

Beberapa tahun terakhir, penggunaan ikan zebra sebagai hewan model sangat populer untuk study perkembangan genetik, toksikologi, gangguan metabolisme serta gangguan pada tubuh manusia lainnya. Hal ini dikarenakan secara genetika, ikan zebra memiliki gen yang menyerupai manusia (Yuniarto *et al.*, 2017). Pengujian efek toksik dan teratogenik pada kandungan bahan alam secara *in vivo* melalui ikan zebra telah dilakukan oleh Rusli *et al.*, (2020) Penelitian tersebut berkaitan dengan toksisitas akut dari karonda dengan hasil menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung dalam karonda memberikan kelainan pada tulang ekor, *yolk sac*, dan pericardium. Pada tahun (2014), Ahaddin menggunakan metoda yang sama untuk mengisolasi senyawa flavonoid dari daun tin dan hasilnya menunjukkan flavonoid yang terkandung memberikan kelainan utama pada sirkulasi

darah diikuti dengan edema pericardium, edema kuning telur, koagulasi darah, dan pemendekan ukuran tubuh.

Penggunaan ikan zebra dalam penelitian embriotoksik dan teratologi memiliki beberapa keuntungan diantaranya ukuran tubuh yang kecil, embrio transparan sehingga perkembangan organ tubuhnya, perkembangan embrio yang terjadi diluar tubuh induk, dan perkembangan embrio ikan zebra yang cepat mudah diamati (Yang *et al.*, 2009). Hasil uji toksisitas menggunakan embrio ikan zebra pun telah terbukti memiliki korelasi positif dengan hasil uji toksisitas pada manusia (Ma *et al.*, 2007).

Ratu dan Wirasti (2018) melaporkan peringkat ketoksikan ekstrak etanol 96% daun beluntas berdasarkan hasil uji penentuan LC_{50} menggunakan BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Nilai LC_{50} ekstrak daun beluntas tersebut mempunyai nilai LC_{50} sebesar 80,33 ppm yang masuk dalam kategori beracun. Penentuan ketoksikan ekstrak daun beluntas pada penelitian ini akan dilakukan dengan metode ZFET (*Zebrafish Embryo Acute Toxicity*) serta menetapkan efek teratogennya dengan melihat berbagai kelainan yang mungkin terjadi pada embrio ikan zebra. Proses ekstraksi daun beluntas dilakukan menggunakan dua metode yaitu infundasi dan maserasi. Pelarut untuk metode infundasi adalah air, pemilihan pelarut air ini didasarkan pada pemanfaatan tanaman obat oleh masyarakat secara umum yakni rebusan air. Selain itu air merupakan pelarut polar alami yang mudah diperoleh. Sedangkan pada metode maserasi digunakan pelarut etanol 70% karena selektif dan tidak mudah ditumbuhi mikroba, selain itu etanol juga bersifat universal sehingga dapat menarik senyawa polar dan nonpolar.

1.2. Tujuan Penelitian

1. Menetapkan peringkat ketoksikan yang bersifat akut dari ekstrak air dan ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica* Less.) pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*) dari nilai LC_{50} yang diperoleh.
2. Menetapkan organ yang menjadi target kerja ekstrak berdasarkan adanya abnormalitas tubuh ikan secara mikroskopis pada perkembangan embrio ikan zebra (*Danio rerio*).

1.3. Hipotesis

1. Terdapat salah satu nilai konsentrasi dari ekstrak air dan ekstrak etanol daun beluntas yang dapat menyebabkan 50% kematian pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*).
2. Terdapat salah satu organ yang menjadi target kerja ekstrak air dan ekstrak etanol daun beluntas terhadap perkembangan embrio ikan zebra (*Danio rerio*).

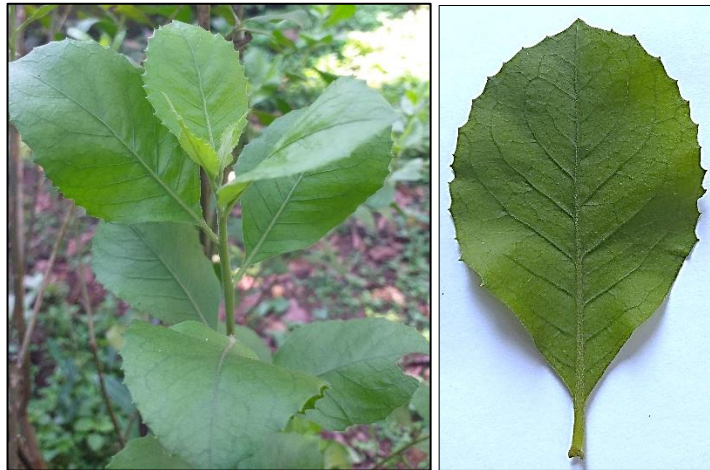
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Beluntas

2.1.1 Deskripsi Daun Beluntas

Beluntas (*Pluchea indica* Less.) merupakan tanaman yang berasal dari India dan telah tersebar luas ke berbagai negara seperti Indonesia, Inggris, Vietnam, dan Cina (DepKes RI, 1985). Tanaman beluntas dikenal dengan nama yang berbeda-beda di berbagai daerah, antara lain beluntas (Melayu), baluntas, baruntas (Sunda), luntas (Jawa), baluntas (Madura), lamutasa (Makasar), lenabou (Timor). Sedangkan nama asing untuk tanaman beluntas antara lain Luan Yi (Cina), Phatpai (Vietnam), dan Marsh fleabane (Inggris) (Susetyarini *et al.*, 2019).

Tanaman beluntas (*Pluchea indica*) termasuk dalam Kelas: *Magnoliopsida*, Ordo: *Asterales*, Famili: *Asteraceae*, Genus: *Pluchea*, Spesies: *Pluchea indica* (L) Less. (Pujowati, 2006). Daun dari tanaman beluntas dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Daun Beluntas (*Pluchea Indica* L.) (Dokumentasi Pribadi).

Tanaman beluntas (*Pluchea indica* Less.) merupakan tanaman perdu yang dapat tumbuh hingga mencapai ketinggian 1-2 meter. Batangnya berkayu, bulat, tegak, dan bercabang. Batang yang masih muda berwarna ungu kemudian setelah tua berwarna putih kotor. Daun tunggal, berbentuk bulat telur, tepi rata, ujung runcing, pangkal tumpul, memiliki bulu-bulu halus, panjangnya mencapai 3-7 cm,

dengan lebar 2-4 cm. Pertulangan daun menyirip, berwarna hijau muda sampai hijau. Bunga majemuk berbentuk mulai rata, mahkota lepas, warna putih kekuningan. Buah berukuran kecil, keras, dan berwarna coklat. Tanaman beluntas banyak dijumpai sebagai tanaman pagar yang dapat tumbuh baik sampai ketinggian 800 mdpl. Tanaman beluntas dapat diperbanyak dengan cara stek. Aroma dari daun beluntas cukup getir dan sengir (Agoes, 2010).

2.1.2 Kandungan Kimia Daun Beluntas

Terdapat banyak senyawa fitokimia yang terkandung dalam daun beluntas, seperti yang dilaporkan oleh Fatmi *et al.*, (2020) bahwa ekstrak etanol daun beluntas mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid, steroid. Selain itu daun beluntas juga mengandung monoterpen, seskuiterpen, kuinon (Sulistiyaningsih, 2009), β -karoten, asam klorogenat, asam kafeat, kuersetin (Suriyaphan, 2014), lignan, terpena, fenilpropanoid, bensoid, alkana, sterol, katekin, fenil hidrokuinon (Widyawati *et al.*, 2013). Komponen yang sangat polar penyusun rendemen ekstrak diketahui terdiri atas senyawa glikosida, natrium, kalsium, magnesium, fosfor, gula, vitamin C, asam amino yang meliputi isoleusin, triptofan, dan treonin (Saparinto & Susiana, 2016). Daun beluntas mengandung 66 senyawa volatil oil (Widyawati *et al.*, 2013), turunan asam caffeoylquinat (Arsiningtyas *et al.*, 2014; Kongkiatpaiboon *et al.*, 2018). Sedangkan ekstrak 70% etanol-air daun beluntas mengandung senyawa thiophenes (Ruan *et al.*, 2018).

2.1.3 Manfaat Daun Beluntas

Daun beluntas mengandung senyawa yang berperan aktif sebagai antioksidan (Widyawati *et al.*, 2013), antiinflamasi (Sudirman *et al.*, 2017), antipiretik, diuretik (Widyawati *et al.*, 2013), antibakteri (Amilah & Ajiningrum, 2015; Fatmi *et al.*, 2020; Maria Martina *et al.*, 2015), analgesik (Sibarani *et al.*, 2013), dan antifertilitas (Amalina *et al.*, 2010; Susetyarini *et al.*, 2019). Adanya efek farmakologi tersebut menyebabkan daun beluntas sering dimanfaatkan sebagai obat tradisional yaitu untuk menghilangkan bau badan, mengatasi kurang nafsu makan, mengatasi gangguan pencernaan pada anak, menghilangkan nyeri pada

rematik, nyeri tulang dan sakit pinggang, menurunkan demam, mengatasi keputihan dan haid yang tidak teratur (Fitriansyah & Indradi, 2018).

Daun beluntas juga dapat dimanfaatkan sebagai antiobesitas dengan mekanisme diduga melalui inhibisi terhadap aktivitas lipase pankreas (Sirichaiwetchakoon *et al.*, 2018). Efek farmakologi lainnya dari daun beluntas seperti dikemukakan oleh Werdani dan Widyawati (2018) adalah berkaitan dengan senyawa flavonoid pada daun beluntas yang berperan sebagai antidiabetes mellitus melalui hambatan terhadap aktivitas enzim α -glukosidase sehingga terjadi penurunan kadar glukosa dalam darah, selain melalui mekanisme inhibisi terhadap α -glukosidase, efek antidiabetes juga berkaitan dengan adanya daya meregenerasi sel-sel β -pankreas yang rusak sehingga efek defisiensi insulin dapat diatasi. Senyawa thiophenes yang diketahui berada dalam daun beluntas memiliki sifat biologis sebagai antimikroba, antivirus, inhibitor HIV-1 protease, antileishmania, nematisidal, insektisidal, fototoksik, dan anti kanker (Ibrahim *et al.*, 2016). Aktivitas yang tinggi dalam menghambat oksidasi lipid, menangkal radikal bebas, dan reduksi ion besi membuat daun beluntas berpotensi sebagai antikanker (Kao *et al.*, 2015; Suriyaphan, 2014)

2.2 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan secara kimia dan fisika bahan padat atau bahan cair dari suatu padatan menggunakan pelarut (Agoes, 2010). Prinsip dari proses ekstraksi dimulai dengan pembukaan dinding sel atau jaringan dengan perlakuan panas, kemudian dilanjutkan dengan proses penarikan senyawa target menggunakan pelarut organik yang sesuai berdasarkan prinsip kedekatan sifat kepolaran dari senyawa dan pelarut (Nugroho, 2017).

2.2.1 Infusa

Infusa merupakan cara ekstraksi yang dilakukan dengan penyarian menggunakan pelarut polar, yaitu air. Cara ekstraksi ini dilakukan dengan mencelupkan bejana infus ke dalam penangas air dimana suhu air stabil di 90°C

selama 15 menit. Untuk metode infusa umumnya digunakan bahan simplisia yang memiliki struktur lunak seperti pada daun dan bunga (Amelda, 2019).

Infundasi adalah proses penyarian yang umumnya digunakan untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dan bahan-bahan nabati. Penyarian dengan cara ini akan menghasilkan sari yang tidak stabil dan mudah terkontaminasi oleh bakteri dan kapang, oleh sebab itu sari yang diperoleh dengan cara ini tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam (Kristanti, 2008).

2.2.2 Maserasi

Kata maserasi berasal dari bahasa latin *macerare* yang artinya melunakkan atau mengairi. Maserasi merupakan proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut dengan cara pengocokan yang diulang beberapa kali pada temperatur atau suhu ruang dan terlindung dari cahaya matahari (DepKes RI, 2000). Maserat merupakan hasil dari penarikan simplisia menggunakan metode maserasi.

Perendaman dalam pelarut dengan suhu ruang bertujuan meminimalisir kerusakan atau degradasi metabolit. Pada maserasi, terjadi proses keseimbangan konsentrasi antara larutan yang berada di luar sel dan di dalam sel sehingga memerlukan penggantian pelarut secara berulang (Hanani, 2015). Prosedur pengulangan menggunakan sisa bahan ekstraksi pertama ditujukan untuk meningkatkan rendemen. Hal ini dimungkinkan pada ekstraksi tahap pertama, tepatnya pada saat titik *equilibrium* dimana kesetimbangan konsentrasi tercapai masih terdapat sisa senyawa metabolit yang tertinggal pada bahan dan masih ada peluang untuk diambil kembali dalam meningkatkan rendemen totalnya (Nugroho, 2017).

2.3 Toksisitas

Toksikologi merupakan ilmu pengetahuan yang telah ada sejak zaman dahulu. Ilmu pengetahuan ini memiliki perpaduan antara ilmu biologi dan ilmu kimia yang dapat digunakan untuk memahami konsep aksi dan keberadaan zat toksik. Menurut Lestari (2017) zat adalah semua zat kimia termasuk obat dan bahan langsung dari alam. Secara tradisional, toksikologi merupakan pengetahuan dasar

mengenai aksi dan perilaku racun, racun sendiri merupakan suatu bahan yang apabila tertelan atau terabsorpsi akan menimbulkan sakit atau kematian pada manusia (Mukono, 2005).

Adapun beberapa istilah yang mirip dengan racun, yaitu toksin dan toksikan yang memiliki arti yang mirip namun berbeda. Toksin merupakan racun yang diproduksi oleh organisme hidup atau dapat dikatakan sebagai produk alami seperti yang ditemukan pada jamur beracun maupun racun ular. Sedangkan toksikan adalah produk buatan manusia yang dipaparkan ke lingkungan karena aktivitas manusia, seperti produk limbah industri dan pestisida (Rahayu & Solihat, 2018). Toksisitas merupakan sifat relatif dari suatu bahan kimia yang dapat menimbulkan efek berbahaya seperti kerusakan pada organisme baik saat digunakan maupun saat berada dalam lingkungan. Pada umumnya, efek farmakologis akan muncul ketika terjadi suatu reaksi antara organisme hidup dengan zat kimia (Priyanto, 2010).

Uji toksisitas merupakan pengujian untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi dan agar memperoleh data dosis dari respon yang khusus dari sediaan yang diujikan. Data yang telah diperoleh dapat digunakan untuk informasi mengenai derajat bahaya dari sediaan uji apabila terjadi pemaparan pada manusia, sehingga demi keamanan manusia, dosis dapat ditentukan (Lestari *et al.*, 2017). Penilaian keamanan atau resiko toksikan pada manusia, idealnya dilakukan pada manusia. Namun karena terdapat hambatan etik tidak memungkinkan untuk dilakukan uji toksisitas pada manusia secara langsung. Maka dari itu, uji ini dilakukan pada hewan bersel tunggal, atau sel kultur. Adapun prinsip uji toksikologi yang terkait pada hewan, yakni adanya persamaan sistem biokimia pada spesies hewan uji dan mekanisme sistem biologi mamalia, data toksikologi dari hewan coba dapat digunakan untuk mengukur dosis yang tidak menyebabkan efek negatif pada manusia (Yulianto & Amaloyah, 2017).

2.3.1 Tujuan Uji Toksisitas

Sesuai dengan kesepakatan yang ditetapkan oleh *World Health Organization* (WHO) suatu bahan atau zat yang hendak digunakan untuk tujuan pengobatan harus melalui tahap uji, salah satunya yaitu uji toksisitas dengan tujuan

untuk mengetahui keamanan dan kebenaran khasiat suatu bahan secara ilmiah dimana tingkat ketoksikan suatu zat atau bahan dapat ditentukan melalui perubahan fungsi fisiologis maupun perubahan yang bersifat patologis (Meles, 2010).

Priyanto (2010) menyatakan bahwa uji toksisitas akut dilakukan bukan hanya untuk menentukan dosis lethal 50%, mengetahui mekanisme dan target organ dari zat toksik yang diuji, namun terdapat tujuan lain yang sangat luas meliputi:

- a. Menentukan *range* dosis (interval dosis) untuk uji selanjutnya yaitu uji farmakologi, toksisitas subakut, subkronis, dan toksisitas jangka panjang.
- b. Mengklasifikasikan kategori ketoksikan zat uji, apakah termasuk praktis tidak toksik, super toksik, dan lainnya.
- c. Mengidentifikasi kemungkinan sistem fisiologi atau target organ yang dipengaruhi.
- d. Mengetahui hubungan antara dosis dan efek yang timbul seperti perubahan perilaku, koma, maupun kematian.
- e. Mengetahui berbagai gejala toksisitas akut agar bermanfaat untuk mendiagnosis adanya keracunan.
- f. Untuk memenuhi regulasi, apabila zat uji ingin dikembangkan menjadi obat.
- g. Mencari zat yang berpotensi sebagai antikanker, karena jika suatu zat memiliki LD_{50}/LC_{50} kurang dari 1000 mg/Kg BB atau konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ zat tersebut dianggap berpotensi sebagai sitotoksik.
- h. Sebagai keperluan evaluasi bahayanya suatu zat melalui data yang didapat seperti nilai slope dari grafik hubungan antar log dosis versus respon, mencari nilai LD_{50}/LC_{50} , LD_{01}/LC_{01} , LD_{100}/LC_{100} . Nilai LD_{01}/LC_{01} dan LD_{100}/LC_{100} didapat apabila % respon nilainya diprobitkan.
- i. Mengetahui pengaruh umur, jenis kelamin, cara pemberian dan faktor lingkungan terhadap toksisitas suatu zat.
- j. Mengetahui variasi respon antar spesies dan antar strain (mikroba, hewan), serta memberikan informasi mengenai reaktivitas suatu populasi hewan.

2.3.2 Ragam Uji Toksisitas

Pengujian toksisitas ini terdapat dua jenis, yaitu uji toksisitas umum dan uji toksisitas khusus. Uji toksisitas umum dirancang untuk mengevaluasi keseluruhan efek umum suatu obat pada hewan uji menggunakan uji toksisitas akut, sub akut / sub kronis, dan kronis. Sedangkan uji toksisitas khusus dirancang untuk mengevaluasi lebih dalam tipe toksisitas secara khusus menggunakan uji teratogenik, uji mutagenik, dan uji karsinogenik (Lu, 1995).

Berikut penjabaran dari macam-macam uji toksisitas:

a. Uji Toksisitas Akut

Uji toksisitas akut merupakan pengujian untuk mengetahui nilai LD_{50} dan dosis maksimal yang masih ditoleransi oleh hewan coba, dimana hasilnya akan ditransformasi kepada manusia (Priyanto, 2010). Prinsip uji ini ialah memberikan sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis pada beberapa kelompok hewan uji dengan satu dosis untuk setiap kelompok, kemudian dilakukan pengamatan terhadap adanya efek toksik kematian. Tujuan dari pengujian ini ialah untuk mendeteksi toksisitas intrinsik suatu zat, menentukan organ sasaran, kepekaan spesies, mendapatkan informasi bahaya atau tidak setelah pemaparan suatu zat secara akut, memperoleh informasi awal untuk menetapkan tingkat dosis, merancang uji toksisitas selanjutnya (Lestari *et al.*, 2017).

Uji toksisitas dimaksudkan untuk menentukan jangkauan dosis letal dan gejala yang timbul seperti gerak dan tingkah laku akibat dari pemberian sediaan uji, hal tersebut dapat digunakan sebagai indikator penyebab kematian. Jumlah hewan uji tersebut dapat digunakan sebagai tolak ukur untuk menentukan nilai LC_{50} suatu senyawa yang ada dalam sediaan uji (Donatus & Nurlaila, 1986). Efek toksisitas yang didapat biasanya terdiri dari mortalitas dan mobilitas, pada sudut pandang kuantitatif efek ini diukur menggunakan LD_{50} , ED_{50} , LC_{50} , EC_{50} (Lestari *et al.*, 2017).

Lethal Concentration 50 (LC_{50}) merupakan konsentrasi yang menimbulkan kematian sebanyak 50% pada hewan uji. Nilai LC_{50} dapat diestimasi dengan grafik dan perhitungan pada waktu pengamatan tertentu, misalnya LC_{50} 48 jam, LC_{50} 96 jam sampai waktu hidup hewan uji (Yulianto,

2017) . Pada umumnya, semakin tinggi nilai LC_{50} maka tingkat toksisitas zat uji akan semakin rendah. Sebaliknya, semakin kecil nilai LC_{50} maka tingkat toksisitas zat uji akan semakin tinggi. Penentuan nilai LD_{50} atau LC_{50} dapat menggunakan cara Farmakope III, cara Weil, cara probit, dan cara Reed dan Muench (Priyanto, 2010).

b. Uji Toksisitas Sub Akut atau Sub Kronis

Uji toksisitas sub akut atau bisa juga disebut sub kronis merupakan pengujian yang dilakukan dengan memberi zat yang akan diuji secara berulang (1 kali sehari atau 5 kali dalam seminggu), hal tersebut bertujuan untuk melihat pengaruh paparan suatu zat yang berulang dengan dosis yang tidak mematikan atau dosis yang kemungkinan akan diberikan kepada manusia. Terkadang dosis dinaikkan untuk melihat dengan cepat efek toksiknya. Uji ini juga dilakukan untuk menentukan organ sasaran yang rentan terkena efek toksik serta melihat sifat efek toksik yang ditimbulkan (Priyanto, 2010).

c. Uji Toksisitas Kronis

Uji toksisitas kronis memiliki tujuan yang sama dengan uji toksisitas sub akut, menggunakan hewan rodent dan non rodent dalam waktu 6 bulan atau lebih. Pengujian ini dilakukan pada obat yang nantinya akan digunakan dalam waktu yang cukup panjang (Priyanto, 2010). Pengujian ini harus dirancang dengan cermat sehingga dapat diperoleh informasi toksisitas secara umum yang meliputi efek neurologi, fisiologi, hematologi, biokimia klinis dan histopatologi (BPOM RI, 2014).

d. Uji Teratogenik

Uji teratogenik atau uji efek pada organ reproduksi merupakan suatu pengujian untuk melihat perilaku yang berkaitan dengan reproduksi (perilaku kawin), perkembangan janin, kelainan pada janin, proses kelahiran, dan perkembangan janin pasca dilahirkan. (Priyanto, 2010).

e. Uji Mutagenik

Uji mutagenik merupakan pengujian untuk melihat adanya perubahan gen pada zat yang digunakan jangka panjang (Priyanto, 2010). Mutasi gen

terjadi karena penambahan atau penghilangan pasangan basa, atau penggantian pasangan basa yang keliru dalam molekul DNA (Lu, 1995)

f. Uji Karsinogenik

Uji karsinogenik merupakan pengujian untuk mengetahui suatu zat yang jika dipakai dalam waktu lama dapat menimbulkan kanker. Pengujian ini dilakukan selama 2 tahun pada 2 spesies hewan. Uji ini dilakukan apabila obat akan digunakan dalam waktu yang lama (Priyanto, 2010).

2.4 Toksisitas Teratogenik

Teratologi merupakan ilmu yang berhubungan dengan penyebab, mekanisme, dan manifestasi pada perkembangan yang menyimpang dari kondisi normal baik mental maupun fungsional (cacat bawaan). Cacat bawaan adalah kelainan struktur (anatomi), fungsi, atau metabolisme (Priyanto, 2010). Teratogenesis merupakan proses perkembangan abnormal pada embrio akibat pengaruh zat atau agen dari lingkungan. Penyebab teratogenesis disebut juga teratogen (Kapsul, 2020). Teratogen adalah bahan-bahan yang mempunyai efek yang merugikan terhadap embrio atau janin pada tahap antara fertilisasi dan kelahiran. Teratogen dapat bereaksi pada induk, plasenta, atau pada embrio. Walaupun gen dan kromosom yang abnormal dapat menimbulkan kecacatan, istilah teratogen biasanya dibatasi pada zat-zat dari lingkungan seperti obat-obatan dan virus (Wilson & Fraser, 1977). Efek teratogen yang paling impulsif yaitu abortus spontan, malformasi bawaan, perlambatan pertumbuhan janin, dan manifestasi perkembangan menyimpang dari sifat struktural dan fungsional (Hakim, 1999).

Menurut Priyanto (2010), ada 3 kategori penyebab cacat bawaan akibat faktor genetik, yaitu:

a. *Defect single gene*

Mutasi atau perubahan pada gen tunggal dapat menyebabkan cacat bawaan. Poernomo (2004) menyatakan bahwa mutasi adalah perubahan pada susunan gen nukleotida. Mutasi dapat membentuk alel dominan dan resesif. Alel merupakan gen-gen yang membentuk pasangan. Alel yang cacat dapat diturunkan bersamaan dengan karakter jenis kelamin.

b. Cacat kromosom

Abnormalitas kromosom umumnya disebabkan karena kesalahan yang terjadi ketika sel telur atau sperma dalam tahap perkembangan dimana jumlah atau susunan kromosom mengalami kelainan.

c. Multifaktor

Beberapa cacat bawaan disebabkan oleh kombinasi antara faktor genetik dan lingkungan. Dalam beberapa kasus, suatu individu dapat mewarisi satu atau lebih gen yang dapat menyebabkan kecacatan dan peka terhadap kondisi tertentu. Dengan kata lain seseorang dapat mempunyai gen predisposisi untuk cacat, dan apabila individu tersebut tidak terpapar pemicu sebelum lahir, maka kemungkinan cacat tidak terjadi.

Priyanto (2010) juga menegaskan bahwa terdapat faktor lingkungan yang dapat menyebabkan kelainan, yaitu infeksi virus seperti infeksi oleh *cytomegalo virus* (CMV) yang dapat menyebabkan disabilitas permanen meliputi retardasi mental, kehilangan penglihatan, dan pendengaran. Virus-virus lainnya yang dapat menyebabkan cacat janin ialah *Coxsackie virus*, Herpes simplek, Parvovirus, Rubella, *Toxoplasma gondii*, dan *Treponema pallidum*. Selain infeksi, beberapa obat-obatan radiasi sinar X dan zat-zat kimia juga dapat menyebabkan kelainan janin.

Uji teratogenik dikembangkan untuk skrining potensi teratogenik dengan memberikan senyawa uji selama masa kehamilan pada janin untuk melihat kelainan eksternal, viseral, maupun sketal. Pada beberapa pengujian janin dibiarkan lahir dan hidup sampai umur tertentu untuk melihat pengaruh senyawa uji terhadap perilaku, sistem saraf, atau kemampuan fungsional organ (Schumann, 2010).

2.5 Ikan Zebra

Ikan zebra (*Danio rerio*) yang termasuk dalam family *Cyprinidae* dengan genus *Brachydanio* (Spence *et al.*, 2008). Ikan ini berasal dari India, Burma, Malakka, dan Sumatera (Braunbeck & Lammer, 2006). Ikan dengan spesies *Danio rerio* ini memiliki kurang lebih 45 spesies di dunia, Ikan ini hidup di perairan yang luas dan pergerakan air yang tenang. Ikan zebra termasuk jenis ikan omnivora

(pemakan segalanya), namun secara alamiah makanan ikan zebra ialah zooplankton dan serangga (Spence *et al.*, 2008).

Pada tubuh ikan zebra terdapat garis-garis sebagai corak yang menurut Schiling (2002) garis-garis tersebut berfungsi untuk adaptasi pada lingkungannya melalui mekanisme kamuflase. Garis tersebut terdiri dari beberapa tipe sel pigmen. Garis yang berwarna biru kehitaman terdiri dari dua sel pigmen yaitu melanofor dan iridofor. Sedangkan garis berwarna kuning perak terdiri dari sel pigmen xantofor dan iridofor. Bentuk fisik dari ikan zebra dapat dilihat pada Gambar 2.



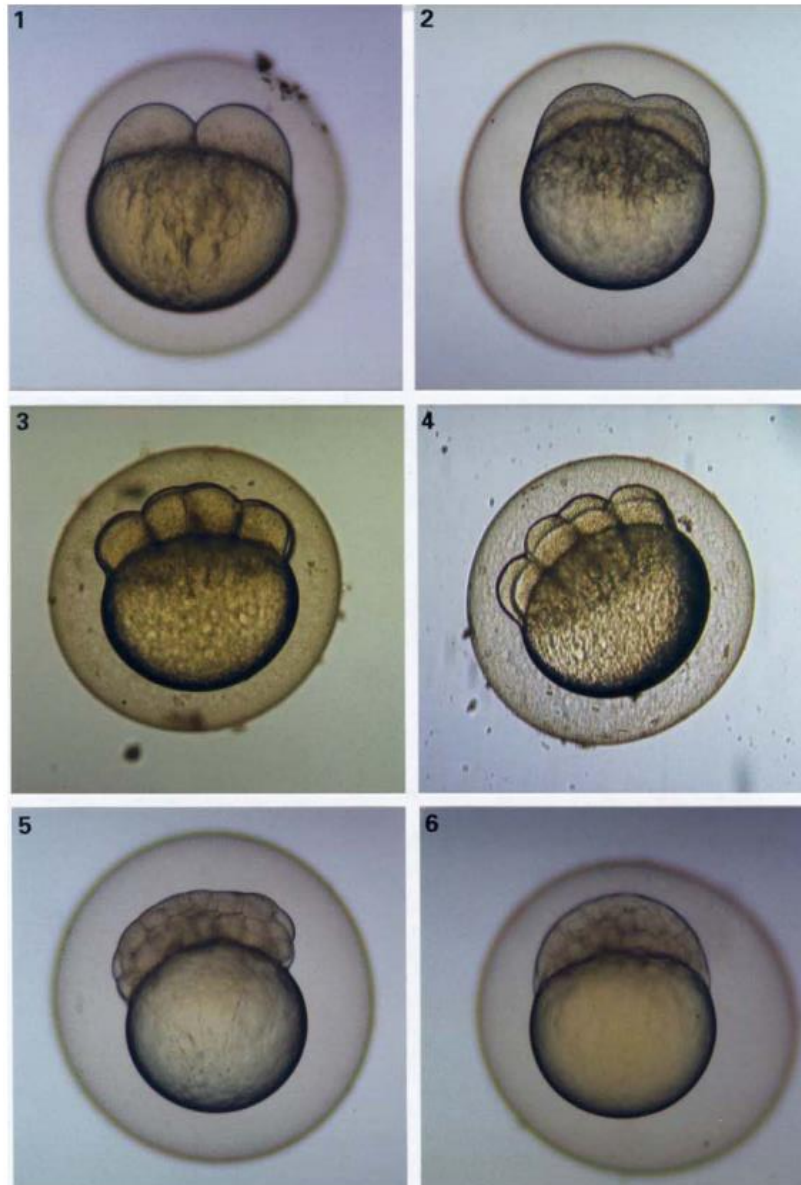
Gambar 2. Ikan Zebra (*Danio rerio*) (Guilliams, 2017).

Temperatur normal pada ikan zebra berkisar antara 25-28°C dengan derajat keasaman (pH) normal berkisar antara 6.8-7.5 (Brand *et al.*, 2002). Ikan zebra betina dewasa memiliki berat yang mencapai 0.65 ± 0.13 g dan ikan zebra jantan dewasa memiliki berat yang mencapai 0.5 ± 0.1 g (OECD, 2013).

2.5.1. Perkembangan Embrio Ikan Zebra

Perkembangan ikan zebra menurut Parichy *et al.*, (2009) meliputi tahap embrio, menetas, larva, remaja, dan dewasa. Perkembangan embrio umumnya dimulai dari pembelahan *zygote* (*cleavage*), stadia morula (*morulasi*), stadia blastula (*blastulasi*), stadia gastrula (*grastulasi*), dan stadia organogenesis (Gusrina, 2017). Perkembangan embrio ikan zebra menurut (Kimmel *et al.*, 1995) terbagi menjadi 8 tahapan. Tahap pertama yaitu zigot terjadi pada usia $0\text{-}^3/4$ jam setelah fertilisasi. Tahapan ini dimulai dari telur yang baru dibuahi sampai mengalami pembelahan pertama. Zigot berukuran 7 mm. Pada tahap kedua atau

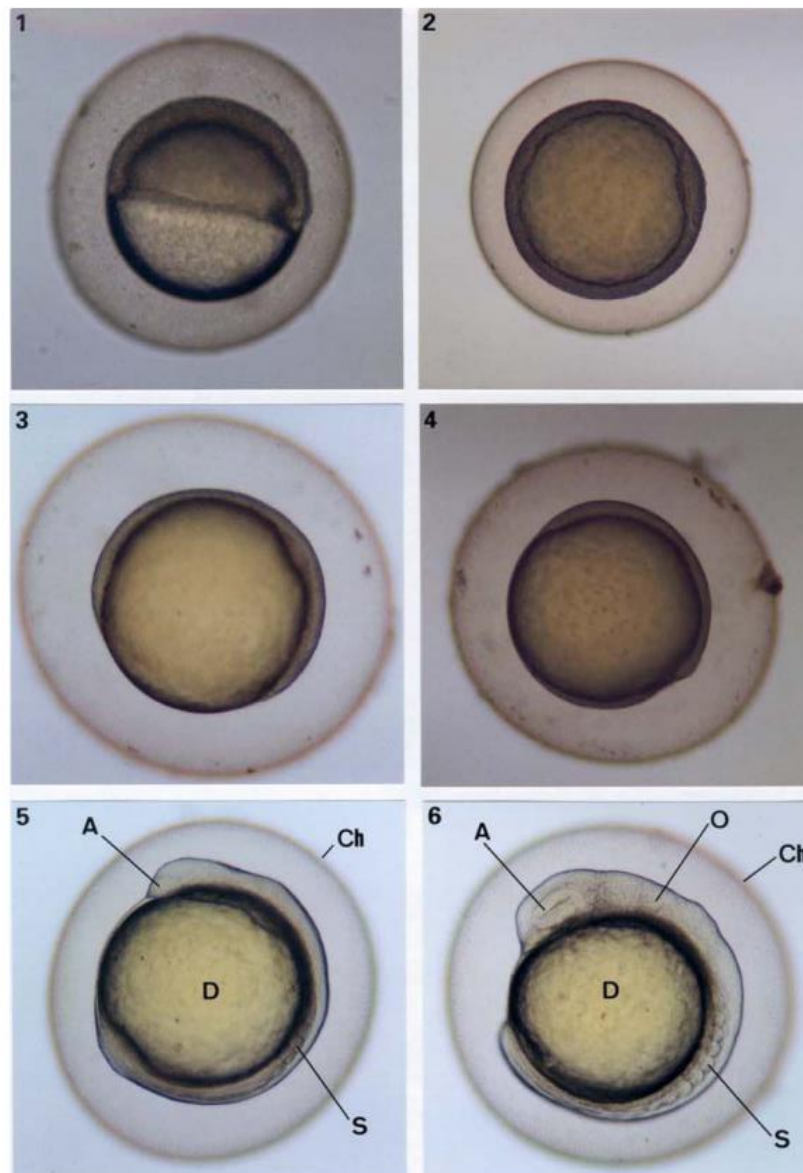
tahap morula terjadi pembelahan di $\frac{3}{4}$ – $2\frac{1}{4}$ jam setelah fertilisasi. Tahapan morula dimulai dari pembelahan pertama atau blastomer. Interval pembelahannya terjadi setiap 15 menit. Setelah itu, sel mulai membelah dari 2 sel, 4 sel, 8, sel, sampai dengan 64 sel. Tahap blastula akan terjadi pada $2\frac{1}{4}$ – $5\frac{1}{4}$ jam setelah dilakukan fertilisasi. Tahapan ini dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Perkembangan normal dari ikan zebra (*Danio rerio*) 0-5 jam.

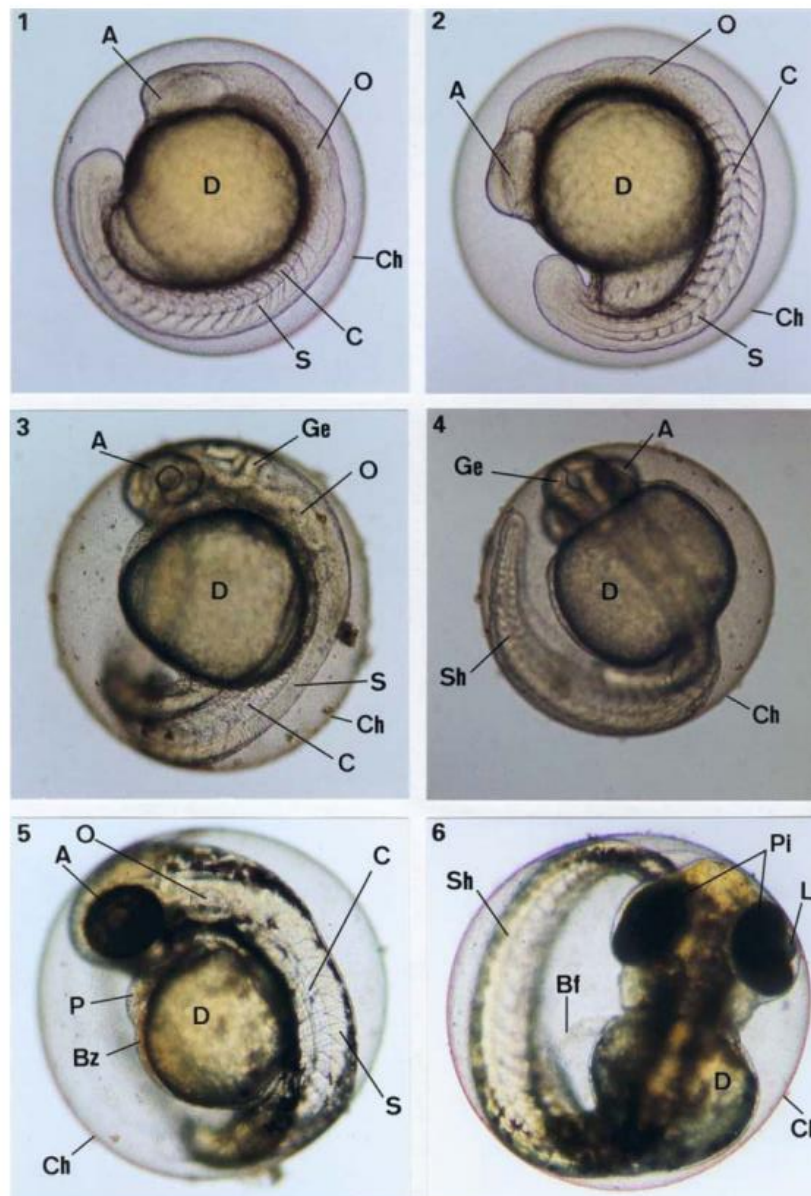
(1) 0.75 jam, pembelahan 2 sel; (2) 1 jam, pembelahan 4 sel; (3) 1.2 jam, pembelahan 8 sel; (4) 1.5 jam, pembelahan 16 sel; (5) 4.7 jam, perkembangan epiboli awal; (6) 5.3 jam, perkembangan epiboli 50% (Braunbeck & Lammer, 2006).

Adapun proses yang sangat penting pada tahap perkembangan embrio ikan zebra yaitu embrio mulai memasuki midblastula transisi (MBT) dan membran kuning telur, serta memasuki tahap epiboli. Pada tahapan tersebut, cakram embrio mulai terlihat seperti bola. Tahapan gastrulasi yang terjadi pada $5\frac{1}{4}$ –10 jam setelah fertilisasi. Tahap pada embrio memasuki midblastula transisis dan kuning telur dan tahap grastula dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Perkembangan normal dari ikan zebra (*Danio rerio*) 6-14 jam. (1) 6 jam; (2) 6 jam; (3) 8 jam; (4) 9 jam; (5) 12 jam (6) 14 jam. A.; Ch – korion; O – kuncup telinga ; S – somit (segmen otot) (Braunbeck & Lammer, 2006).

Pada tahap ini terjadi perkembangan epiboli. Kemudian tahap segmentasi akan memperlihatkan terjadinya perkembangan somit dan perkembangan kuncup ekor mulai menonjol dan memanjang. Tahap faring akan dimulai pada hari kedua dan ketiga. Pada tahapan ini akan terjadi pigmentasi pada mata. Terlihat refleks, sirkulasi, dan sumbu tubuh pada Gambar 5.



Gambar 5. Perkembangan normal dari ikan zebra (*Danio rerio*) 16-72 jam.

(1) 16 jam; (2) 18 jam; (3) 25 jam; (4) 25 jam; (5) 48 jam; (6) 72 jam. A – pembesaran mata; Bf – ujung dada; Bz – sel-sel darah; C – benang; Ch – korion; Ge – pembesaran otak; L – lensa optik; O – kuncup telinga; P – pericard; S – somit; Sh – ekor (Braunbeck & Lammer, 2006).

Tahap *hatching* embrio keluar dari korion. Tahap larva muda, pada tahap ini akan ditandai dengan perkembangan gelembung berenang dan perilaku menghindar (bergerak). Menurut Gusriana (2017), penetasan telur terjadi ketika ukuran embrio lebih panjang dari lingkaran kuningnya dan terbentuknya sirip ekor. Penetasan terjadi dengan cara pelunakan chorion oleh suatu enzim yang disebut chorionase atau substansi kimia lainnya hasil sekresi kelenjar ekstoderm. Pengujian menggunakan embrio ikan zebra harus memenuhi pedoman menurut OECD No.236 (2013).

2.5.2 Uji Toksisitas Akut Embrio Ikan Zebra

Penggunaan ikan zebra dalam pengujian toksisitas akut memiliki beberapa keuntungan, salah satunya adalah proses perkembang biakan yang tergolong cepat dimana satu induk ikan zebra dapat menghasilkan ratusan butir telur (Kar, 2013). Dengan diameter telur berkisar 1-1,5 mm (Matthews *et al.*, 2002). Embrionya transparan dan mampu menyerap bahan-bahan larut air (Amsterdam & Hopkins, 2006). Pada sistem kardiovaskular, sistem syaraf, dan sistem pencernaan ikan zebra terdapat kesamaan dengan mamalia (William, 2017), sehingga Van den Bulk *et al.*, (2011) menyatakan bahwa ikan zebra memiliki kesamaan gen dengan gen manusia. Jesubatham *et al.*, (2018) juga menyatakan bahwa lebih dari 70% gennya terkait dengan penyakit serupa yang dimiliki manusia. Hal tersebut sangat membantu dalam mengidentifikasi gen-gen yang menyebabkan suatu penyakit pada manusia (Oka *et al.*, 2010). Selain sistem saluran pencernaan, kesamaan lainnya antara manusia dan ikan zebra yaitu pada jaringan adiposa dan sistem otot rangka (Oka *et al.*, 2010).

Prinsip uji toksisitas pada embrio ikan zebra menurut OECD No.236 (2013) yaitu telur ikan zebra yang baru dibuahi (terfertilisasi) diberikan paparan larutan uji selama 96 jam. Setiap 24 jam, dilakukan pengamatan terhadap empat indikator kematian yang dijadikan parameter ketoksikan kualitatif pada embrio ikan zebra, empat indikator tersebut yakni: koagulasi embrio, tidak terjadinya pembentukan somit, tidak terjadi pelepasan *tail-bud* dari *yolk*, tidak adanya detak jantung. Pada akhir periode pemaparan, toksisitas akut ditentukan berdasarkan hasil positif dari

salah satu empat pengamatan yang tercatat, kemudian LC_{50} dihitung. Kategori toksisitas bahan uji berdasarkan nilai LC_{50} dari US *Fish and Wildlife Service* dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Kategori Toksisitas Akut Berdasarkan *Fish and Wildlife Service* (Johnson & Finley, 1980)

Tingkat toksisitas	LC_{50} -96 jam ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Super toxic</i>	0,01-0,1
<i>Highly toxic</i>	0,1-1
<i>Moderately toxic</i>	1-10
<i>Slightly toxic</i>	10-100
<i>Practicaly non-toxic</i>	100-1000
<i>Relatively harmless</i>	>1000

Hasil uji toksisitas ikan zebra dinyatakan valid saat memenuhi beberapa kriteria berikut (OECD, 2013):

1. Seluruh tingkat pembuahan dari semua telur yang dikumpulkan harus $\geq 70\%$ dalam kelompok yang diujikan.
2. Suhu air harus terjaga pada $26 \pm 1^\circ\text{C}$ dalam sumuran *wellplate* selama pengujian berlangsung.
3. Kelangsungan hidup seluruh embrio dalam kontrol negatif (pengenceran-air) harus relevan dengan kontrol pelarut sebanyak $\geq 90\%$ sampai akhir paparan 96 jam.
4. Dari paparan kontrol positif (4mg/L 3,5-dichloroaniline) harus menghasilkan kematian minimal 30% sampai akhir paparan 96 jam.
5. Tingkan penetasan embrio dalam kontrol negatif harus sebanyak $\geq 80\%$ pada akhir paparan setelah 96 jam.
6. Pada akhir pemaparan (96 jam) konsentrasi oksigen terlarut dalam kontrol negatif dan konsentrasi uji tertinggi harus 80% dari saturasi.

Terdapat dua kelompok uji yang digunakan pada pengujian toksisitas akut terhadap embrio ikan zebra, yakni (OECD, 2013):

1. Kelompok konsentrasi

Kelompok konsentrasi terdiri dari 5 konsentrasi bahan uji yang terpilih melalui proses optimasi, dimana konsentrasi tertinggi menyebabkan 100% kematian embrio dan konsentrasi terendah menyebabkan 0% kematian embrio.

2. Kelompok kontrol

Kelompok kontrol dibagi menjadi 3 sebagai berikut:

a. Kontrol positif

Digunakan konsentrasi tetap 4 mg/L 3,4-*dichloroaniline*. Hill *et al.*, (2005) menyatakan *dichloroaniline* dapat memberikan efek toksisitas akut pada embrio ikan zebra karena efeknya yang toksik.

b. Kontrol negatif

Digunakan air atau media yang digunakan untuk mengembangkan embrio (*dillution water*). Kontrol ini bertujuan untuk mengetahui apakah air atau media yang digunakan dalam penelitian memiliki efek terhadap embrio atau tidak.

c. Kontrol internal

Larutan yang digunakan sama dengan larutan pada kontrol negatif. kontrol internal bertujuan untuk meminimalisir hasil bias yang disebabkan penggunaan alat atau media. Jika ditemukan lebih dari satu embrio yang mati pada kontrol ini saat pengujian, maka *plate* yang digunakan harus dikeluarkan dari pengujian.

d. Kontrol pelarut

Digunakan pelarut pada bahan uji, kontrol ini bertujuan untuk mempertimbangkan pengujian dapat diterima atau tidak, pelarut harus dibuktikan tidak memiliki efek signifikan pada waktu menetas, kelangsungan hidup, atau menghasilkan efek merugikan pada embrio.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Agustus sampai Desember 2021, di Laboratorium Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Pada penelitian ini digunakan alat-alat gelas, mikropipet, tip mikropipet, akuarium, aerator, oven, neraca analitik Lab Pro, cawan petri, kertas saring, *vacuum dryer*, *multiwell* atau *96 – well plate*, aluminium foil, mikroskop binokuler Yazumi.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah daun beluntas yang berasal dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Akuades, etanol 70%, etanol 96%, FeCl 1%, NH₄OH, H₂SO₄, HCL pekat, reagen Wagner, Mayer, Dragendrof, Lieberman Buchard, serbuk Mg, natrium sulfat anhidrat, *egg-water* (yang telah diaerasi selama 24 jam), dan embrio ikan zebra yang berasal dari peternakan ikan di Cibinong.

3.3 Cara Kerja

3.3.1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman sebagai bahan baku pada penelitian ini dilakukan untuk memastikan bahwa daun beluntas yang digunakan adalah bahan baku yang sesuai. Determinasi tanaman ini dilakukan di Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Komplek CSC-LIPI Jl. Raya Bogor, Km.46, Cibinong, Bogor, Jawa Barat, Indonesia.

3.3.2. Pembuatan Simplisia Daun Beluntas

Bahan baku daun beluntas sebanyak 5 kg dikumpulkan, selanjutnya melewati sortasi basah untuk memisahkan cemaran dan bahan asing lainnya.

Setelah itu, pencucian daun beluntas dilakukan menggunakan air mengalir sampai bersih untuk menghilangkan cemaran yang menempel kemudian ditiriskan dan dikeringkan. Namun sebelum masuk ke dalam proses pengeringan, bahan baku yang akan digunakan ditimbang terlebih dahulu. Pengeringan dilakukan dalam oven pada suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam (KemenKes RI, 2017). Setelah daun beluntas kering sempurna, dilakukan sortasi kering untuk memisahkan bahan organik asing yang tidak diinginkan (Amelda, 2019). Bahan baku yang telah disortasi kering dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk. Serbuk yang diperoleh, diayak menggunakan ayakan mesh 40 (KemenKes RI, 2017). Serbuk yang diperoleh ditimbang dan dimasukkan ke dalam wadah tertutup baik, disimpan dalam kondisi kering dan tidak terkena cahaya matahari. Perhitungan rendemen simplisia kering dihitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{Rendemen Simplisia} = \frac{\text{Bobot kering simplisia yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot awal sampel segar (g)}} \times 100\%$$

3.3.3. Pembuatan Ekstrak Daun Beluntas

3.3.3.1. Maserasi

Simplisia serbuk daun beluntas setelah ditimbang sebanyak 200 g dimasukkan ke dalam botol kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 700 mL. Simplisia yang terendam dalam alkohol, disimpan pada suhu kamar seraya dilakukan pengadukan/pengocokan beberapa kali selama 24 jam. Selanjutnya pelarut dipisahkan menggunakan kertas saring, sehingga diperoleh maserat pertama dan residu. Residu kemudian diremaserasi menggunakan etanol 70% sebanyak 650 mL, kemudian diperlakukan sama sampai diperoleh maserat kedua dan residu kedua. Maserat pertama digabungkan dengan maserat kedua, kemudian residu kedua direndam dengan etanol 70% sebanyak 650 mL dengan perlakuan yang sama. Hasil ekstrak yang diperoleh disaring dan digabungkan dengan hasil ekstraksi sebelumnya lalu dibuat ekstrak kering menggunakan alat *vacuum dryer* (Idroes *et al.*, 2019). Rendemen dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Jumlah bobot ekstrak kering (g)}}{\text{Jumlah bobot simplisia serbuk (g)}} \times 100\%$$

3.3.3.2. Infusa

Proses ekstraksi dilakukan menggunakan metode infundasi. Sebanyak 200 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam panci infusa kemudian ditambahkan pelarut (aquadest) dengan perbandingan 1 : 10. Proses pemanasan dilakukan dengan suhu 96-98°C selama 15-20 menit (dihitung setelah suhu mencapai 96°C) sambil sesekali diaduk (Hanani, 2015). Filtrat yang diperoleh diuapkan menggunakan *vacuum dryer* hingga diperoleh ekstrak kering. Rendemen ekstraknya dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Jumlah bobot ekstrak kering (g)}}{\text{Jumlah bobot simplisia serbuk (g)}} \times 100\%$$

3.3.4. Uji Mutu Simplisia dan Ekstrak Daun Beluntas

3.3.4.1 Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dari serbuk simplisia daun beluntas dilakukan dengan metode gravimetri. Cawan uap ditara terlebih dahulu dalam oven selama 15 menit, kemudian simplisia sebanyak ± 10 g ditimbang dengan cawan yang telah ditara. Proses pengeringan dilakukan dalam oven dengan suhu 105°C selama 5 jam lalu ditimbang. Simplisia dikeringkan lagi selama 1 jam dan dilakukan penimbangan lagi, hal tersebut terus dilakukan sampai didapat perbedaan antara penimbangan dua kali berturut-turut tidak lebih dari 0,25%. Kadar air ekstrak daun beluntas tidak lebih dari 9,6% (KemenKes RI, 2017). Perhitungan kadar air dapat dilakukan menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{Kadar Air} = \frac{(\text{Cawan} + \text{isi}_{t_0}) - (\text{Cawan} + \text{isi}_{t_1})}{\text{Bobot sample yang ditimbang}} \times 100\%$$

3.3.4.2 Penetapan Kadar Abu

Serbuk simplisia daun beluntas ditimbang sebanyak 2 – 3 g, kemudian dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara. Simplisia dalam

kurs diratakan, selanjutnya dipijarkan secara perlahan menggunakan suhu $\pm 600^{\circ}\text{C}$ hingga arang habis. Penimbangan dilakukan setelah krus didinginkan terlebih dahulu (KemenKes RI, 2017). Kadar abu simplisia serbuk daun beluntas tidak boleh lebih dari 2,0%, jika diperoleh kadar abu yang tidak memenuhi syarat tersebut, maka dipijarkan kembali sampai bobot tetap (KemenKes RI, 2017). Perhitungan kadar abu dilakukan dengan rumus berikut:

$$\% \text{Kadar abu} = \frac{(\text{bobot kurs} + \text{abu simplisia}) - \text{bobot kurs (g)}}{\text{bobot sampel yang ditimbang (g)}} \times 100\%$$

3.3.5 Skrining Fitokimia Simplisia dan Ekstrak Daun Beluntas

3.3.5.1 Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 g sampel dilarutkan menggunakan 5 mL etanol 96%. Larutan sampel diambil sebanyak 2 mL lalu ditambahkan dengan 0,1 g serbuk magnesium (Mg) dan 10 tetes HCL pekat kemudian dikocok secara perlahan. Terbentuknya warna merah jingga sampai merah ungu menandakan bahwa sampel positif mengandung flavonoid. Sedangkan warna kuning jingga yang muncul menandakan adanya flavon, kalkon, juga auron (Hanani, 2015).

3.3.5.2 Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 g sampel dilarutkan dalam 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL air. Selanjutnya dipanaskan menggunakan penangas air. Hasil yang diperoleh didinginkan dan disaring, filtrat diuapkan hingga volume berkurang, kemudian dilakukan penambahan HCL 1N sebanyak 5mL, diikuti dengan penambahan 3 pereaksi alkaloid yaitu pereaksi Bouchardat, Dragendroff dan pereaksi Mayer. Apabila terbentuk endapan coklat sampai hitam dengan pereaksi Bouchardat, endapan merah jingga dengan pereaksi Dragendroff dan endapan putih kekuningan dengan pereaksi Mayer, maka hasil dinyatakan positif (Hanani, 2015).

3.3.5.3 Uji Tanin

Sebanyak 0,5 g sampel dilarutkan dengan aquadest panas. Setelah dingin larutan disaring, filtrat digunakan sebagai larutan uji yang digunakan dalam pengujian berikut:

- a. Filtrat ditambahkan dengan larutan gelatin 10%, akan timbul endapan putih.
- b. Filtrat ditambahkan dengan larutan gelatin 1% dalam 10% NaCl (perbandingan 1:1). Endapan yang timbul dibandingkan dengan hasil pada uji a.
- c. Filtrat ditambahkan dengan larutan FeCl_3 3%. Terbentuk warna hijau biru hingga kehitaman (Hanani, 2015). Terbentuknya warna tersebut setelah penambahan gelatin atau FeCl_3 menandakan sediaan positif mengandung tanin.

3.3.5.4. Uji Steroid dan Triterpenoid

Ekstrak dilarutkan menggunakan etanol 96%, kemudian disaring. Selanjutnya ke dalam filtrat ditambahkan pereaksi Lieberman-Buchard. Terbentuknya warna hijau hingga biru menandakan positif adanya senyawa steroid. Sedangkan pada senyawa triterpenoid positif apabila terbentuk warna merah atau ungu (Hanani, 2015).

3.3.5.5. Uji Saponin

Sebanyak 5 mg sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL air kemudian dilakukan pengocokan selama 10 menit. Apabila buih yang timbul tidak hilang saat penambahan 1 tetes asam klorida 2N, hasilnya dinilai positif (Malik *et al.*, 2016).

3.3.6. Uji Toksisitas Akut Terhadap Embrio Ikan Zebra

3.3.6.1. Pengajuan *ethical clearance*

Prosedur pengujian diajukan terlebih dahulu pada komite etik hewan FMIPA Universitas Pakuan untuk mendapat persetujuan. Pengujian ini mengacu

pada pedoman OECD No.246 (2013) tentang pengujian toksisitas akut pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*).

3.3.6.2. Pengenceran Ekstrak Daun Beluntas

Air sumur yang digunakan untuk media hidup ikan zebra disaring secara bertahap dengan kertas saring biasa lalu disaring kembali menggunakan kertas saring *whatman* dengan tujuan untuk menghilangkan partikel berukuran besar juga pengotor lainnya. Uji pendahuluan dilakukan terlebih dahulu sebelum dilakukan pembuatan larutan uji untuk menentukan konsentrasi larutan uji. Satu seri konsentrasi dibuat mulai dari 50 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, dan 1000 ppm dari larutan 2000 ppm (Ratu & Wirasti, 2018). Larutan induk 2000 ppm dibuat dengan melarutkan 200 mg ekstrak etanol daun beluntas yang dilarutkan dalam 100 mL air yang sebelumnya telah disaring. Ekstrak yang telah dilarutkan dimasukkan ke dalam multi well pada masing-masing konsentrasi kemudian ditambahkan kontrol internal dan kontrol negatif (*egg-water*).

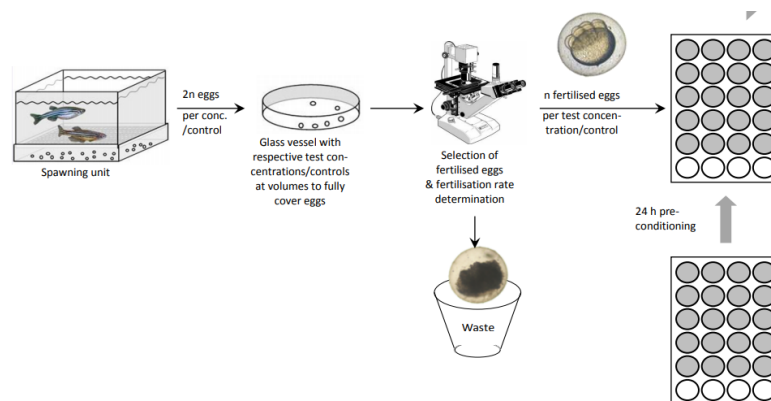
3.3.6.3. Seleksi Embrio Ikan Zebra

Embrio ikan zebra berusia 6 jam yang didapat dari peternakan ikan Cibinong dimasukkan ke dalam gelas piala yang telah diisi media sel telur (*egg water*). Media yang digunakan telah diaerasi selama 24 jam dan disaring dengan kertas saring 0,45 μm . Sebanyak 30 embrio dipindahkan ke cawan petri dan diperiksa fertilitasnya menggunakan binokuler. Telur yang dibuahi ditandai dengan warna transparan dan kantung amnion utuh sedangkan telur yang gagal dibuahi ditandai dengan warna yang tidak transparan (Lammer *et al.*, 2009).

3.3.6.4. Uji Toksisitas

Uji toksisitas Ekstrak air dan ekstrak etanol daun beluntas dilakukan menggunakan metoda *Fish Acute Embryo Toxicity* (FET) *test* sesuai dengan *Guidelines for The Testing of Chemical* No.236 OECD (OECD, 2013). Embrio ikan zebra yang telah diseleksi kemudian dipindahkan menggunakan mikropipet 100 μL ke dalam *multiwell* dimulai dari kelompok kontrol internal, kontrol negatif, dan

larutan uji. Pada masing-masing konsentrasi digunakan 10 buah embrio ikan zebra dan dilakukan tiga kali pengulangan. Embrio diinkubasi pada suhu kamar (Ali & Legler, 2011). Ilustrasi pengujian toksisitas terhadap embrio ikan zebra, dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Diagram alir seleksi embrio (OECD, 2013).

3.3.7.5. Uji Daya Tetas terhadap Embrio Ikan Zebra

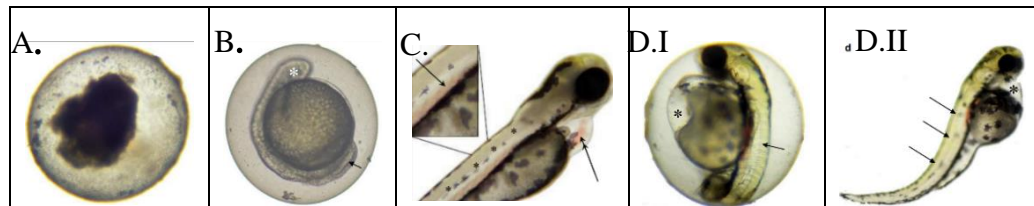
Embrio ikan zebra yang berusia 8 jam dipapar dengan ekstrak air dan ekstrak etanol daun beluntas. Daya tetas embrio ikan zebra pada kelompok kontrol negatif, internal, dan kelompok konsentrasi diamati kemudian daya tetas dihitung menggunakan rumus (Huang *et al.*, 2018):

$$\text{Daya Tetas} = \frac{\text{Jumlah embrio yang menetas pada jam ke } - 96}{\text{Jumlah awal embrio pada awal pengamatan}} \times 100\%$$

3.3.7.6. Waktu Pengamatan pada Uji Toksisitas

Pengamatan pada embrio dilakukan dalam 24 jam, 48 jam, 72 jam, dan 96 jam setelah embrio terpapar ekstrak dari daun beluntas. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah kematian hewan atau jumlah hewan yang hidup serta abnormalitas embrio (OECD, 2013). Pengamatan kondisi hidup atau kematian embrio ikan zebra didasarkan pada adanya koagulasi embrio, pembentukan somit, pelepasan ekor, dan denyut jantung ≥ 24 jam setelah paparan, juga disertai kemampuan *hatching* keluar dari 48 jam setelah pemaparan ekstrak daun beluntas. Pengamatan abnormalitas

meliputi normal atau tidaknya sumbu tubuh dan ekor, pigmentasi, otak, rahang, mata, gelembung pendengaran, darah, jantung, sirkulasi darah (koagulasi darah), notokorda, somit, dan kantung kuning telur (Kordinata, 2017). Empat indikator kematian pada embrio ikan zebra dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Indikator Kematian Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*)

(A) Koagulasi embrio, (B) Tidak terjadi pelepasan kuncup ekor dari kuning telur, (C) Kurangnya detak jantung, (D.I) Pembentukan somit normal, (D.II) Tidak terbentuk somit (OECD, 2013).

3.3.7.7. Analisis Data

Data kondisi hidup atau kematian embrio ikan zebra pada jam ke-24, 48, 72, dan 96 dicatat sebagai data pengamatan. Data kematian yang diperoleh dianalisis dengan metode probit untuk menentukan nilai *Lethal Concentration*₅₀ (LC₅₀) secara kuantitatif. Penentuan nilai LC₅₀ ditentukan dengan persamaan garis lurus hubungan antara nilai probit dengan log dosis, $Y = mX + b$ (Priyanto, 2010), dimana sumbu X merupakan nilai konsentrasi ekstrak dan sumbu Y merupakan rata-rata persen kematian pada konsentrasi yang diujikan (Heiden *et al.*, 2007). Nilai LC₅₀ dihitung menggunakan *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) (Rusli *et al.*, 2020).

Data yang diperoleh akan dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan pola Faktorial Rancangan Acak Kelompok (FRAK) yang memiliki nilai kepercayaan sebesar 95%. Hasil analisis yang menunjukkan hasil berbeda nyata akan dianalisis lebih lanjut menggunakan Uji Duncan. Hasil dari Uji Lanjut Duncan selanjutnya diproses menggunakan SPSS (Rusli *et al.*, 2020).

Tabel 2. Tabel Probit (Finney, 1952)

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,46	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
-	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09

3.3.7.8. Uji Toksisitas terhadap Malformasi

Malformasi pada embrio ikan zebra yang telah dipapar oleh bahan uji diamati. Pengamatan dilakukan pada kelompok kontrol negatif K0, konsentrasi larutan uji, dengan periode waktu 24, 48, 72, dan 96 jam. Pengamatan malformasi dilakukan menggunakan mikroskop binokuler (Rusli *et al.*, 2020). Abnormalitas mayor merupakan abnormalitas yang terjadi dengan hasil presentase $\geq 50\%$, abnormalitas mayor dapat dihitung menggunakan rumus:

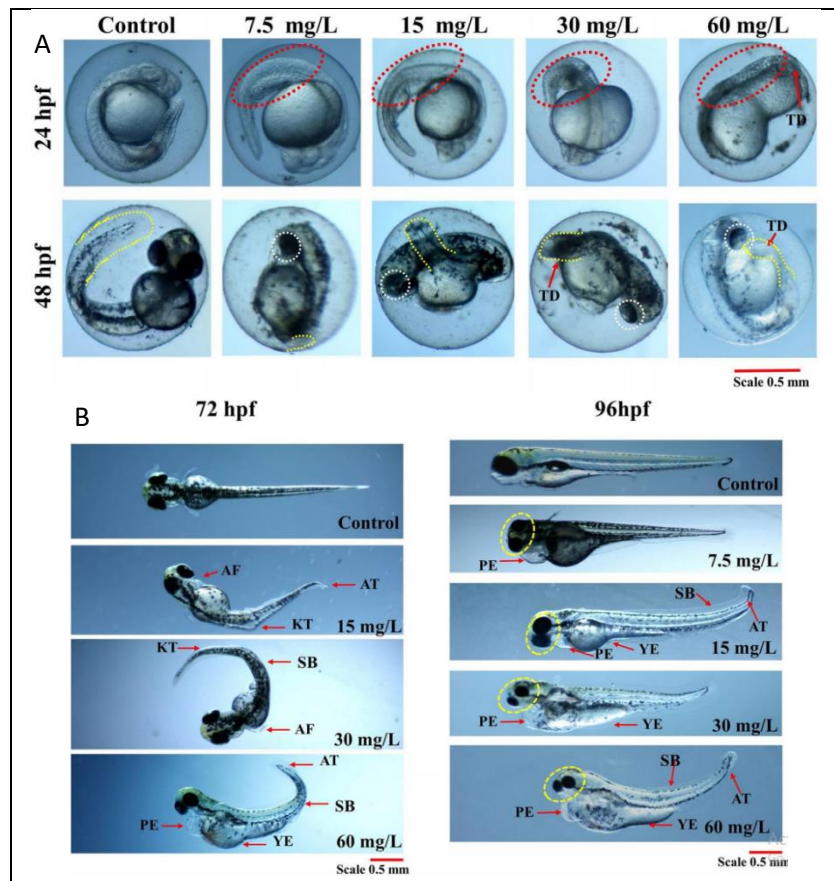
$$\% \text{Abnormalitas} = \frac{\text{Embrio hidup yang mengalami kelainan tertentu}}{\text{Jumlah total embrio hidup yang mengalami kelainan}} \times 100\%$$

(Busquet, 2008; Ahaddin, 2014; Kordinata, 2017; Vanderven, 2020)

Presentase jumlah embrio yang mengalami kelainan pada pengamatan ini dapat dihitung menggunakan rumus:

$\% \text{Abnormalitas} = \frac{\text{Embrio hidup yang mengalami kelainan tertentu}}{\text{Jumlah embrio awal}} \times 100\%$ (Sadili, 2019; Syahbirin 2017)

Perkembangan embrio ikan zebra normal dan abnormal dapat ditinjau pada Gambar 8.



Gambar 8. Perkembangan Embrio Ikan Zebra yang di-Induksi Etridiazole. (A) 24 jam *panel atas* dan 48 jam *panel bawah*, (B) 72 jam *panel sisi kiri* dan 96 jam *panel sisi kanan*. Larutan kontrol menunjukkan perkembangan normal hingga 96 jam. Garis putus-putus kuning, bentuk ekor; Lingkaran putus-putus merah, somit; Lingkaran putus-putus putih, lingkaran mata; TD, pelepasan ekor; AF, sirip dada tidak normal; PE, edema perikardium; YE, edema kuning telur; KT, Ekor berlekuk; AT, ekor tidak normal; SB, Pembengkokan tulang belakang; Lingkaran putus-putus kuning, mata. Scale, 0,5 mm (Vasamsetti *et al.*, 2020).

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Determinasi Tanaman

Hasil determinasi tanaman yang dilakukan di Kantor Pusat Riset Biologi, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Komplek CSC-LIPI Jl. Raya Bogor, Km. 46, Cibinong 16911, Bogor-Indonesia menyatakan bahwa tanaman yang digunakan merupakan tanaman Beluntas dengan nama latin *Pluchea indica.*, dari suku *Asteraceae.* Determinasi tanaman dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kebenaran dari identitas tanaman. Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 3.

4.2. Karakteristik Serbuk Simplisia dan Ekstrak Kering Daun Beluntas

Daun Beluntas yang digunakan merupakan daun beluntas segar sebanyak 5000 g, berwarna hijau, dan memiliki bulu-bulu halus. Serbuk simplisia daun beluntas sebanyak 831,26 g diperoleh dari 4000 g daun beluntas hasil sortasi basah dengan rendemen simplisia sebesar 20,78%. Penurunan bobot disebabkan oleh adanya penguapan zat yang terkandung pada saat proses pengeringan seperti air dan minyak atsiri. Hasil rendemen yang diperoleh tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Safitri, *et al.*, (2018) yaitu sebesar 20%.

Hasil ekstraksi yang diperoleh dari simplisia serbuk melalui proses infundasi dan maserasi dibuat ekstrak kering menggunakan *vacuum dryer* dengan tujuan menghilangkan kandungan etanol dan mengurangi kandungan air. Dari proses pengeringan hasil ekstraksi diperoleh ekstrak kering sebesar 31,24 g hasil infundasi dan 34,5 g hasil maserasi sehingga didapatkan rendemen sebesar 15,62% dan 17,2%. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada Lampiran 4.

Perbedaan hasil rendemen disebabkan oleh perbedaan metode ekstraksi dan perbedaan pelarut, dimana pada metode maserasi waktu yang digunakan lebih lama dari metode infundasi dan adanya pengocokan membantu proses difusi senyawa dalam sel tanaman menuju pelarut (Sadili, 2019) sehingga penarikan senyawa lebih optimal, pada metode infundasi menggunakan cara panas, cara ini

relatif lebih cepat untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan karena energi panas akan memperbesar kelarutan suatu senyawa (Amelda, 2019), namun energi panas yang digunakan dapat merusak atau mengubah senyawa yang terkandung dalam simplisia sehingga senyawa yang tersari kurang optimal. selain itu penggunaan pelarut dengan perbedaan polaritas juga dapat mempengaruhi hasil rendemen. Tingginya rendemen ekstrak kering daun beluntas dengan pelarut etanol didasari oleh kesamaan sifat kepolaran antara senyawa yang terkandung dengan pelarut.

4.3. Mutu Serbuk Simplisia dan Ekstrak Kering Daun Beluntas

4.3.1. Hasil Kadar Air

Pengujian kadar air terhadap serbuk simplisia dan ekstrak kering daun beluntas menggunakan metode gravimetri dengan prinsip penguapan air pada sampel menggunakan pemanasan hingga saat penimbangan diperoleh bobot konstan yang mengindikasikan bahwa semua air yang terdapat dalam sampel sudah teruapkan (Mahardika *et al.*, 2021). Tujuan dari pengujian kadar air ialah untuk mengetahui besarnya kandungan air dalam sampel uji (Amelda, 2019). Jumlah kadar air yang terkandung dapat menentukan kesegaran dan daya tahan lamanya suatu bahan, kadar air yang tinggi dapat membuat bahan uji menjadi media tumbuh bagi bakteri, kapang, dan kamir yang dapat merusak kualitas bahan.

Kadar air serbuk simplisia didapatkan rata-rata sebesar 5,6407%, hasil ini tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya yaitu Safitri *et al.*, (2018) sebesar 5%, sedangkan untuk ekstrak kering hasil infundasi diperoleh rata-rata sebesar 4,5361% dan hasil maserasi rata-rata sebesar 3,5612% dimana perhitungannya dapat dilihat pada Lampiran 4. Hasil kadar air serbuk simplisia dan ekstrak kering daun beluntas memenuhi syarat dimana persyaratan untuk kadar air serbuk simplisia daun beluntas senilai <10% (DepKes RI, 1995) dan untuk ekstrak kering senilai <5% (Saifudin *et al.*, 2011).

4.3.2. Hasil Kadar Abu

Pengujian kadar abu pada simplisia dan ekstrak kering daun beluntas dilakukan dengan prinsip bahan dipanaskan pada temperatur tinggi (600°C) yang menyebabkan senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap, sehingga tersisa unsur mineral dan anorganik (Amelda, 2019) dengan bobot konstan dan stabil. Tujuan pengujian kadar abu ialah untuk mengetahui jumlah kandungan mineral internal dan eksternal simplisia serbuk dan ekstrak kering.

Hasil pengujian kadar abu pada serbuk simplisia diperoleh rata-rata sebesar 1,9255%, hasil ini memenuhi persyaratan kadar abu simplisia serbuk daun beluntas yaitu sebesar 2% (KemenKes RI, 2017), adapun hasil dari penelitian ini tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian Safitri (2018) yang memperoleh kadar abu serbuk simplisia daun beluntas sebesar 1,2482%. Pada ekstrak kering hasil infusa didapatkan kadar abu sebesar 1,5989%, dan pada hasil maserasi sebesar 0,8853%, dengan mengacu pada Farmakope Herbal (2017) dimana syarat untuk ekstrak kental daun beluntas ialah tidak lebih dari 8,1% maka hasil kadar abu ekstrak kering daun beluntas memenuhi syarat.

4.4. Hasil Skrining Fitokimia Serbuk Simplisia, dan Ekstrak Kering Daun Beluntas

Skrining fitokimia pada simplisia serbuk dan ekstrak kering daun beluntas dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa atau metabolit sekunder dalam tanaman. Skrining dilakukan terhadap senyawa metabolit sekunder yakni flavonoid, alkaloid, tanin, steroid dan triterpenoid, serta saponin dengan melihat warna yang dihasilkan akibat reaksi terhadap pereaksi yang digunakan. Data yang diperoleh dari skrining fitokimia merupakan senyawa yang berkaitan dengan efek farmakologi. Hasil skrining fitokimia simplisia dan ekstrak kering daun beluntas dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Skrining Fitokimia Simplisia Serbuk dan Ekstrak Kering Hasil Infusa dan Maserasi Daun Beluntas.

Identifikasi Senyawa	Pereaksi	Parameter	Hasil		
			Simplisia	Infusa	Maserasi
Flavonoid	Serbuk Mg	Merah-Ungu	+	++	+++
	Bouchardat	↓ Coklat	+	++	+++
Alkaloid	Dragendorf	Jingga-merah coklat	++	++	+++
	Mayer	↓ Putih	+	++	+++
Tanin	Gelatin 10%	↓ Putih	+	+	+++
	Gelatin 10% + NaCl 10%	↓ Putih	+	++	+++
	FeCl ₃ 3%	Hijau biru - kehitaman	+++	+++	+++
Steroid	Lieberman-Buchard	Hijau-Biru	-	-	-
Triterpenoid	Buchard	Merah-ungu	+++	++	+++
Saponin	Aquadest	Terbentuk buih stabil	++	+	+++

Keterangan:

↓ = Endapan

- = Tidak terbentuk warna

+ = Terbentuk warna

++ = Warna / endapan terlihat jelas

+++ = Warna / endapan terlihat sangat jelas

Tabel di atas menunjukkan hasil skrining simplisia serbuk dan ekstrak kering daun beluntas mengidentifikasi adanya flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, serta triterpenoid yang merupakan golongan terpenoid. Hasil ini sesuai dengan penelitian

yang dilakukan oleh Rasyid dan Amody (2020) yang menyatakan bahwa daun beluntas mengandung flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan triterpenoid. Tingkat kepekatan warna yang berbeda dikarenakan perbedaan metode dan pelarut yang digunakan saat proses ekstraksi sehingga terdapat perbedaan dalam penarikan jumlah metabolit sekunder. Metabolit sekunder pada ekstrak kering daun beluntas terekstraksi dengan baik dengan metode maserasi dari pada metode infusa hal ini dikarenakan adanya proses pemanasan pada metode infusa sedangkan diketahui bahwa beberapa metabolit sekunder memiliki sifat fisik kurang tahan terhadap pemanasan, seperti flavonoid, alkaloid, dan tanin.

4.5. Hasil Uji Toksisitas Terhadap Embrio Ikan Zebra

Penelitian pada bidang farmakologi dengan memanfaatkan hewan uji untuk mengetahui ketoksikan ekstrak etanol dan air daun beluntas (*Pluchea indica* Less.) terhadap embrio ikan zebra (*Danio rerio*.) ini telah lolos kaji etik yang dilakukan oleh Komite Etik Penelitian FMIPA Universitas Pakuan No. 020 /KEPHP-UNPAK/09-2021. Surat persetujuan dapat ditinjau pada Lampiran 5.

Embrio ikan zebra yang digunakan adalah embrio fertil yang memiliki keseragaman pada tahap perkembangannya serta berusia kurang dari 6 jam setelah fertilisasi. Tujuan penggunaan embrio yang fertil dan seragam ialah untuk menghindari hasil bias dan memudahkan pengamatan. Penggunaan embrio berusia kurang dari 6 jam dikarenakan belum terbentuknya organ sehingga dapat membantu dalam pengamatan malformasinya. Embrio ikan zebra yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Embrio Ikan Zebra Berusia 6 Jam (Dokumentasi Pribadi)

Uji toksisitas akut terhadap embrio ikan zebra ini bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas ekstrak kering hasil infusa dan maserasi daun beluntas

yang didasarkan pada jumlah kematian dan efek teratogen dari embrio ikan zebra dengan mengacu pada pedoman OECD No.236 tahun 2013. Prinsip uji toksisitas akut terhadap embrio ikan zebra adalah embrio ikan zebra yang terfertilisasi diberikan larutan uji selama 96 jam, setiap 24 jam dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop binokuler dengan melihat empat indikator kematian yaitu koagulasi embrio, tidak terjadi pembentukan somit, tidak terjadinya pelepasan *tail bud* dari *yolk*, tidak adanya detak jantung.

Pada uji ini, embrio ikan zebra diberikan paparan larutan uji berbagai konsentrasi yakni 1000 ppm, 750 ppm, 500 ppm, 250 ppm, dan 50 ppm, selain itu embrio juga diberikan kontrol negatif dan internal yang merupakan air sumur yang telah diaerasi. Pembuatan variasi konsentrasi bertujuan untuk melihat pengaruh dari beberapa variasi konsentrasi terhadap kematian dan malformasi embrio, penggunaan kontrol negatif bertujuan untuk memastikan kematian serta malformasi embrio ikan zebra benar disebabkan oleh ekstrak daun beluntas, sedangkan untuk kontrol internal bertujuan untuk meminimalisir hasil bias penggunaan alat yang digunakan.

4.5.1. Hasil Uji Toksisitas Daya Tetas Embrio Ikan Zebra

Pengujian daya tetas terhadap embrio ikan zebra bertujuan untuk memenuhi beberapa kriteria validasi menurut OECD (2013) yaitu kelangsungan hidup seluruh embrio pada kontrol negatif harus $\geq 90\%$ sampai akhir paparan 96 jam dan tingkat penetasan embrio pada kontrol negatif harus $\geq 80\%$ pada akhir paparan 96 jam. Hasil dari pengujian daya tetas pada kontrol negatif dan internal menunjukkan penetasan pada seluruh embrio dengan presentase sebesar 100%. Data ini menunjukkan bahwa protokol uji toksisitas dengan ekstrak kering daun beluntas dinyatakan telah memenuhi syarat validasi.

Daya tetas pada embrio yang terpapar ekstrak menunjukkan penetasan tidak terjadi pada seluruh embrio, hal ini disebabkan oleh senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak menembus *chorion* sehingga terjadi keterlambatan pada pertumbuhan dan perkembangan embrio dan kematian (OECD, 2013). Jumlah

embrio yang mengalami penetasan dan hidup hingga akhir paparan 96 jam dapat dilihat pada Tabel 4.

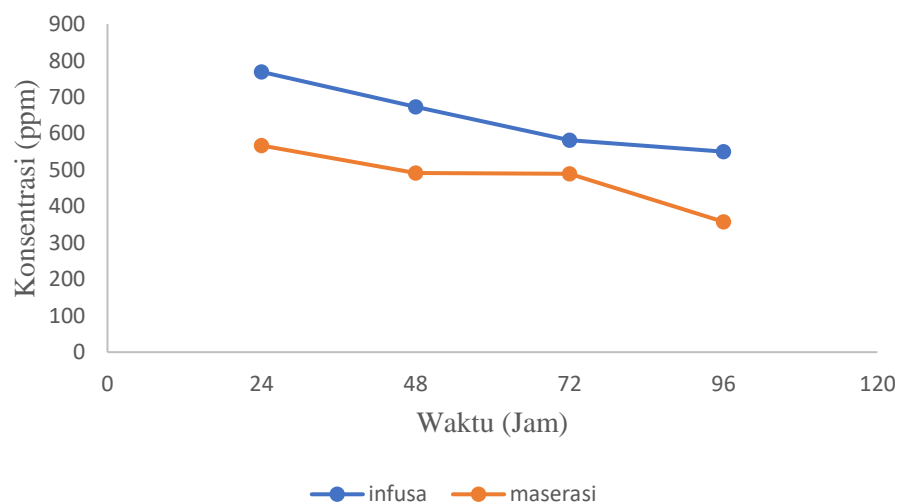
Tabel 4. Daya Tetap Embrio pada Akhir Paparan 96 Jam.

Jenis Sampel	Perlakuan terhadap Embrio (Ekor)						
	KN	KI	P1	P2	P3	P4	P5
Infusa	30	30	27	21	16	4	0
Maserasi	30	30	23	13	11	1	0

Keterangan: (KN) Kontrol Negatif, (KI) Kontrol Internal, (P1) Perlakuan pada 50 ppm, (P2) Perlakuan pada 250 ppm, (P3) Perlakuan pada 500 ppm, (P4) Perlakuan pada 750 ppm. (P5) Perlakuan pada 1000 ppm.

4.5.2. Hasil Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kering Hasil Infundasi dan Maserasi Daun Beluntas

Perolehan nilai LC_{50} ekstrak air dan etanol daun beluntas merupakan hasil kumulatif dari total banyaknya embrio yang digunakan tiap pengulangan. Hasil uji toksisitas akut menunjukkan bahwa semakin lama periode pemaparan kedua ekstrak maka semakin meningkat jumlah kematian embrio, dan dengan meningkatnya jumlah kematian hingga akhir paparan maka nilai LC_{50} yang diperoleh semakin rendah, artinya potensi ketoksikan daun beluntas semakin tinggi. Hubungan antara waktu terhadap ketoksikan ekstrak daun beluntas dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Grafik Hubungan Waktu dengan Nilai LC_{50} Ekstrak Daun Beluntas.

Grafik menunjukkan bahwa ekstrak kering hasil maserasi memiliki potensi ketoksikan lebih besar dari pada ekstrak kering hasil infusa. Hal ini ditandai dengan menurunnya garis yang menghubungkan antara waktu dengan konsentrasi. Hasil ini didapatkan berdasarkan jumlah kematian embrio yang semakin meningkat seiring lamanya waktu paparan sehingga nilai LC_{50} yang diperoleh menjadi semakin rendah.

Nilai LC_{50} diperoleh melalui data kematian embrio yang dianalisis menggunakan probit dalam SPSS (*Statistical Program for Social Science*). Hasil analisis data pada ekstrak kering hasil infundasi dan maserasi daun beluntas memperoleh nilai LC_{50} yang berkisar 300 hingga 800 ppm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun beluntas memiliki sifat ketoksikan praktis tidak toksik karena berada pada rentang 100-1000 ppm sesuai dalam Tabel 2. kategori toksisitas akut berdasarkan *Fish and Wild Service* (Johnson & Finley, 1980).

Analisis data statistik ANOVA menggunakan SPSS menghasilkan adanya perbedaan pengaruh yang nyata ($p \leq 0,05$) pada faktor ekstrak, waktu, serta interaksi ekstrak dan waktu terhadap nilai LC_{50} . Hasil uji lanjut duncan menunjukkan semua waktu memberikan pengaruh yang berbeda terhadap nilai LC_{50} . Hasil perbedaan pengaruh waktu dan ekstrak terhadap nilai LC_{50} dapat ditinjau pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Nilai LC_{50} pada Ekstrak Kering Daun Beluntas.

Sampel	Waktu			
	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam
Infundasi	768.472 ±17.754	672.502 ±22.111	581.470 ±24.577	549.750 ±24.968
Maserasi	566.623 ±3.292	490.974 ±3.388	489.263 ±3.614	357.495 ±33.194
Rata-rata	667.547 ^d ±142.729	581.738 ^c ±128.360	535.366 ^b ±65.200	453.622 ^a ±135.944

Keterangan: Angka pada kolom dan baris yang diikuti huruf superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata.

4.7. Hasil Uji Toksisitas terhadap Malformasi Embrio Ikan Zebra

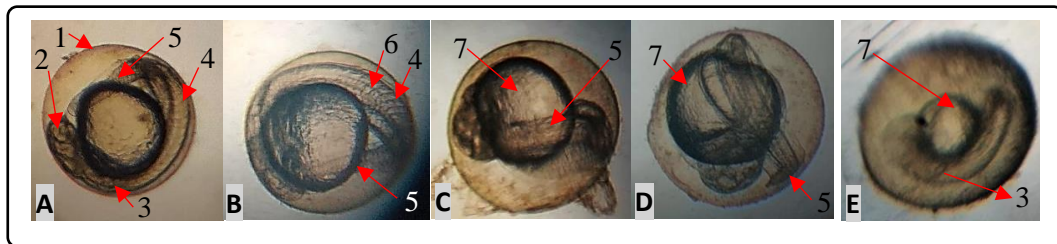
Kematian embrio ikan zebra dapat disebabkan karena adanya malformasi akibat paparan ekstrak daun beluntas. Perkembangan embrio ikan zebra diamati pada jam ke-24, 48, 72, dan 96 setelah terpapar ekstrak dengan indikator pengamatan meliputi pembentukan somit, kepala, ekor, sumbu tubuh, pigmentasi, mata, sirkulasi darah, notokorda, kantung kuning telur, dan jantung embrio.

Terjadinya abnormalitas pada embrio ikan zebra memberikan gambaran organ sasaran yang akan dirusak oleh suatu bahan toksik atau menunjukkan efek samping dari suatu bahan uji. Hasil pengamatan morfologi pada embrio ikan zebra yang telah dipapar ekstrak daun beluntas hingga jam ke-96 menunjukkan adanya abnormalitas pada embrio ikan zebra, diantaranya adalah edema kantung kuning telur, edema perikardium, kelainan pada notokorda, somit, sumbu tubuh, ekor, mata, dan koagulasi darah. Kontrol negatif dan internal tidak menimbulkan abnormalitas pada embrio ikan zebra.

Jumlah presentase jenis kelainan pada seluruh embrio ikan zebra yang terpapar ekstrak didapatkan dengan perhitungan jumlah seluruh embrio yang mengalami kelainan dibagi dengan jumlah embrio awal kemudian dikali 100%, hasil perhitungan tersebut dapat dilihat pada Tabel 6. Hasil tersebut dapat menunjukkan bahwa satu embrio dapat mengalami berbagai kelainan. Didapatkan hasil presentase pada jenis kelainan embrio lebih besar pada embrio yang terpapar ekstrak kering hasil infusa, hal ini dikarenakan pada embrio yang terpapar ekstrak kering hasil maserasi mengalami banyak kematian.

4.7.1. Morfologi Embrio Ikan Zebra pada Paparan Ekstrak 24 jam.

Hasil morfologi embrio ikan zebra yang telah terpapar ekstrak dalam waktu 24 jam dapat dilihat pada Gambar 11. Pada tahap ini embrio memasuki tahap organogenesis dimana pembentukan organ mulai terjadi seperti mata, telinga, jantung, dan terlepasnya ekor dari kantung kuning telur. Abnormalitas pada notokordia atau cikal bakal tulang belakang terlihat jelas pada embrio yang terpapar ekstrak dengan konsentrasi 750 ppm. Konsentrasi 1000 ppm pada ekstrak kering hasil maserasi memberikan kematian pada seluruh embrio ikan zebra.



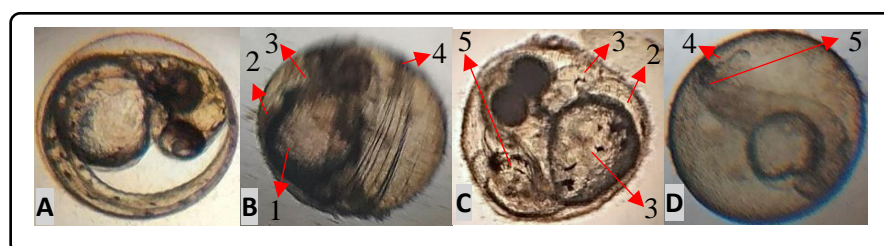
Gambar 11. Morfologi Embrio Ikan Zebra pada Usia 24 Jam.

A. Kontrol Internal, B. Infusa 250 ppm, C. Infusa 750 ppm, D. Maserasi 250 ppm, E. Maserasi 750 ppm. 1. *chorion*, 2. Mata, 3. Telinga, 4. *somite*, 5. Ekor, 6. *notochord*, 7. *yolk sac*

4.7.2. Morfologi Embrio Ikan Zebra pada Paparan Ekstrak 48 jam.

Hasil morfologi embrio ikan zebra yang telah terpapar ekstrak selama 48 jam dapat ditinjau pada Gambar 12. Pada tahap ini, hasil pengamatan menunjukkan bahwa dalam satu embrio yang hidup terjadi beberapa jenis kelainan. Pada Gambar (B dan C) Embrio ikan mengalami pembengkakan pada kantung kuning telur (*edema yolk sac*) dan pembengkakan jantung (*edema pericardium*). Gambar (C) menunjukkan embrio ikan mengalami kelainan pada sumbu tubuh (Aksis), pembengkakan kantung kuning telur dan jantung. Embrio pada Gambar (D) mengalami aksis, dan terlihat adanya kelainan pada ekor.

Gambar A merupakan gambar dari embrio normal. Pengamatan detak jantung pada jantung normal dan yang mengalami pembengkakan dimulai pada jam ke-48 hingga akhir pengamatan karena detak jantung pada embrio akan terlihat setelah 48 jam (OECD, 2013). Pada pengamatan ini, embrio normal dengan bagian kepala dan ekor melengkung sejajar seperti huruf O bergerak aktif memutar untuk merubah posisinya, hal ini dikarenakan ruang gerak memiliki ukuran lebih kecil dibandingkan dengan ukuran embrio yang semakin membesar.

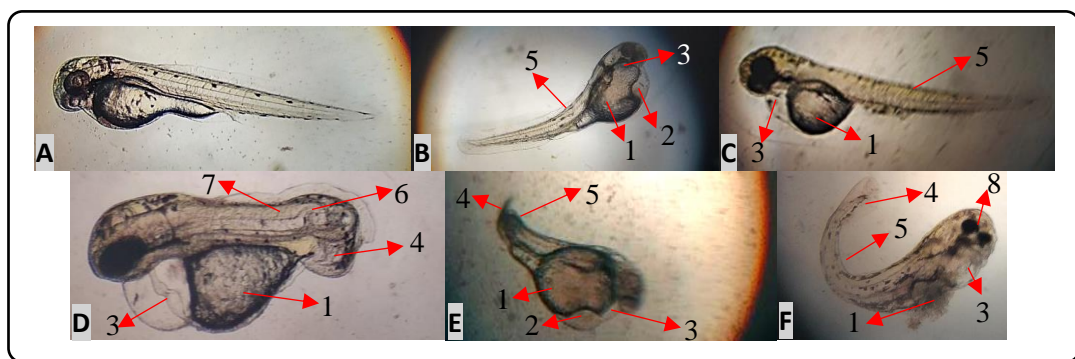


Gambar 12. Morfologi Embrio Ikan Zebra pada Usia 48 Jam.

A. Kontrol Internal, B. Infusa 250 ppm, C. Maserasi 500 ppm, E. Maserasi 750 ppm. 1. *Yolk sac*, 2. Sirkulasi darah, 3. Perikardium, 4. Ekor, 5. Sumbu tubuh.

4.7.3. Morfologi Embrio Ikan Zebra pada Paparan Ekstrak 72 jam.

Morfologi embrio ikan zebra yang telah terpapar ekstrak selama 72 jam dapat dilihat pada Gambar 13. Embrio ikan zebra yang telah mengalami perkembangan organ dan keluar dari chorion menunjukkan banyak kelainan yang lebih jelas pada edema *yolk sac*, edema pericardium, kelainan sumbu tubuh (aksis), ekor, dan ukuran mata. Pada Gambar E, *yolk sac* tidak mengalami perkembangan sehingga embrio dinyatakan mati.

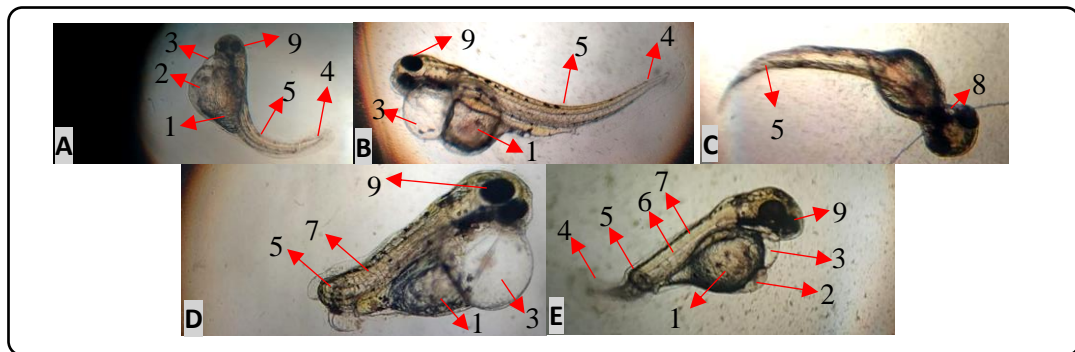


Gambar 13. Morfologi Embrio Ikan Zebra pada Usia 72 Jam.

A. Kontrol Internal, B. Infusa 250 ppm, C. Infusa 750 ppm, D. Maserasi 250 ppm, E. Maserasi 750 ppm, F. Maserasi 750. 1. *Yolk sac*, 2. Sirkulasi darah, 3. Perikardium, 4. Ekor, 5. Sumbu tubuh, 6. Notokorda, 7. Somit, 8. Mata.

4.7.4. Morfologi Embrio Ikan Zebra pada Paparan Ekstrak 96 jam.

Pada akhir paparan di waktu 96 jam yang merupakan tahap akhir dalam pengujian, embrio yang telah melalui tahap organogenesis mengalami pematangan pada perkembangan organ embrio. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa jenis kelainan yang terjadi tidak berbeda signifikan dengan pengamatan pada waktu 72 jam. Hasil morfologi embrio ikan zebra yang telah terpapar ekstrak 96 jam dapat ditinjau pada Gambar 14.



Gambar 14. Morfologi Embrio Ikan Zebra pada Usia 96 Jam.

A. Infusa 250 ppm, B. Infusa 750 ppm, C. I, D. Maserasi 250 ppm, E. Maserasi 750 ppm. 1. *Yolk sac*, 2. Sirkulasi darah, 3. Perikardium, 4. Ekor, 5. Sumbu tubuh, 6. Notokorda, 7. Somit, 8. Insang, 9. Mata.

Kelainan yang ditunjukkan pada Gambar A, B, C, D, dan E ialah edema pericardium, edema *yolk sac*, abnormalitas sumbu tubuh, ekor, notokorda, dan somit. Kelainan tersebut merupakan kelainan yang terjadi pada beberapa embrio yang terpapar ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*. L) selama 96 jam.

Abnormalitas mayor merupakan jumlah embrio hidup yang mengalami abnormalitas tertentu dibagi jumlah total embrio hidup yang mengalami abnormalitas dengan menunjukkan hasil presentase $\geq 50\%$ sedangkan abnormalitas minor menunjukkan hasil presentase $\leq 50\%$ (Busquet *et al.*, 2008). Embrio yang terpapar ekstrak kering hasil infundasi menunjukkan adanya abnormalitas mayor yaitu pada sumbu tubuh, *yolk sac*, jantung, notokorda, ekor dan somit. Sedangkan abnormalitas mayor yang terjadi pada embrio yang terpapar ekstrak kering hasil maserasi yaitu sumbu tubuh, *yolk sac*, jantung, notokorda, dan ekor. Hasil presentase pada embrio hidup yang mengalami abnormalitas mayor dapat dilihat pada Tabel 7. Hasil perbandingan jumlah embrio hidup dengan embrio yang mengalami kelainan pada Lampiran 13. menunjukkan bahwa embrio yang terpapar ekstrak kering hasil maserasi menyebabkan lebih banyak kelainan dibandingkan dengan embrio yang terpapar ekstrak kering hasil infusa.

Edema merupakan suatu kondisi dimana jumlah cairan dalam jaringan mengalami peningkatan yang disebabkan oleh meningkatnya tekanan hidrostatis, sehingga cairan dipaksa masuk ke dalam ruang interstisial tubuh. Edema dapat mengakibatkan pembengkakan pada jaringan yang mengalami radang karena

adanya akumulasi cairan (Akpoilih & Adebayo, 2011). Kelainan yang banyak ditemukan ialah edema kantung kuning telur dan edema perikardium.

Kantung kuning telur memiliki fungsi sebagai reservoir nutrisi bagi embrio ikan zebra selama masa perkembangan (Sant & Timme-laragy, 2019). Terjadinya abnormalitas pada kantung kuning telur yaitu edema menjadi indikasi bahwa terganggunya proses penyerapan makanan dan nutrisi oleh embrio. Gangguan yang terjadi pada kantung kuning telur dapat menyebabkan malformasi pada organ lain yang membantu distribusi nutrisi sehingga dapat menyebabkan embrio kekurangan gizi bahkan kematian (Syahbirin et al., 2017).

Jantung pada ikan zebra terletak di anteroventral, antara operculum dan gelang dada pada rongga dada (Farrell & Pieperhoff, 2011). Mekanisme toksisitas suatu senyawa disebabkan oleh aktivasi inhibitor Na^+ dan K^+ , dimana terganggunya ion Na^+ dapat memicu peningkatan pada detak jantung yang mengakibatkan terbebannya miokardium dan menyebabkan kerusakan fungsional dan biologis pada jantung ikan zebra (Ye et al., 2021). Jantung memainkan peran penting dalam pertumbuhan embrio. Sistem kardiovaskular yang terbentuk secara tidak normal dapat mengakibatkan kelainan pertumbuhan pada hewan, Edema perikardium yang dikarenakan paparan senyawa uji dapat mengiritasi sel-sel jantung (Fitzgerald et al., 2013) dan dapat menyebabkan malformasi parah hingga hilangnya fungsi tubuh (Chen et al., 2018). Menurut Chen (2013) edema pericardium dapat disebabkan oleh multifaktor. Faktor apapun yang membuat embrio ikan zebra mengalami stres dapat berakibat pada gangguan sirkulasi darah dan gangguan fungsi jantung.

Brand et al., (1996) menyatakan bahwa pertumbuhan sumbu tubuh berkaitan dengan lempeng dasar dan notokorda. Sumbu tubuh pada sisi kiri dan kanan dipengaruhi oleh gen polaris (Bisgrove et al., 2005) dan polycytn (Bisgrove et al., 2005; Schottenfeld et al., 2007). Terdapat jenis-jenis dari abnormalitas pada sumbu tubuh, antara lain *ballonhead*, *bent*, *curly up*, *curly down*, *iguana*, *monorail*, *schmalspur*, dan *sinus* (Brand et al., 1996). Kelainan yang terjadi pada sumbu tubuh embrio ikan zebra akibat paparan ekstrak daun beluntas ialah berupa *bent* (tubuh membengkok ke samping), *curly up* (tubuh membengkok ke atas), dan kompleks. Kelainan sumbu tubuh dapat dikaitkan dengan kelainan notokorda.

Sumbu tubuh *curly up* terjadi akibat adanya mutasi pada alel tc30b dan tc321 dan pkd 2 (Schottenfeld *et al.*, 2007), pada sumbu tubuh *bent* terjadi akibat adanya kerusakan pada medula spinalis (Brand *et al.*, 1996). Menurut Willaert *et al.*, (2012) kelainan yang terjadi pada sumbu tubuh (Gambar 14 (D)) terjadi akibat adanya pengaruh gen Slc2a10 oligonukleotida splice-MO. PKD-2 yang menyebabkan *curly up* dan ekor keriting (Schottenfeld *et al.*, 2007).

Notokorda memiliki peran penting dalam pergerakan, perkembangan pola jaringan tubuh seperti somit (Kordinata, 2017). Somit merupakan jaringan yang akan berdiferensiasi menjadi tulang punggung dan otot rangka. Malformasi pada somit akan mempengaruhi perkembangan sumbu tubuh dan proses penetasan.

Notokorda merupakan tulang rawan yang memanjang seperti batang dan berada di tengah di antara susunan saraf (Kimmel *et al.*, 1995) pada hewan bertulang belakang. Menurut Vasamsetti (2020) kelainan tulang belakang merupakan dampak dari penurunan kolagen pada bagian-bagian tulang belakang. Pada selubung kolagen terdapat sel vakuola (Bagnat & Gray, 2020). Di dalam notokorda terdapat sel vakuola yang berperan dalam pembentukan tulang belakang dan pemanjangan tubuh pada ikan zebra (Ellis *et al.*, 2013). Vakuola yang terfragmentasi atau hilang dapat menyebabkan pertumbuhan tulang vertebrata menjadi asimetris dan terjadi kelengkungan belakang (Bagwell *et al.*, 2020). Kelainan pada notokorda dapat juga dikaitkan dengan penyusutan atau pengurangan kalsium dan fosfor yang diperlukan dalam perkembangan normal ikan zebra (Vasamsetti *et al.*, 2020). Terhambatnya proses penetasan embrio dapat diakibatkan oleh adanya kelainan pada notokorda (Haendel *et al.*, 2004). Abnormalitas pada notokorda dapat menyebabkan kelainan pada *Collumna vertebralis* saat dewasa (Gray *et al.*, 2014). Menurut Vasamsetti (2020) kelainan pada notokorda dapat menjadi salah satu penyebab embrio tidak dapat berenang.

Kematian dan abnormalitas yang terjadi pada embrio ikan zebra tidak lepas kaitannya dengan senyawa yang terdapat pada ekstrak daun beluntas. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak kering daun beluntas mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan triterpenoid dengan kepekatan warna yang dominan pada ekstrak hasil maserasi, Hal ini dapat menjadi penyebab kematian dan

kelainan yang terjadi pada ekstrak hasil maserasi lebih parah hingga menyebabkan kematian lebih banyak pada embrio ikan zebra. Data kelainan yang dihasilkan dapat memberikan gambaran organ yang paling sensitif terhadap ekstrak, yaitu sumbu tubuh, diikuti dengan jantung dan kantung kuning telur. Senyawa yang terkandung memiliki potensi sebagai penyebab kematian dan malformasi pada embrio ikan zebra.

Flavonoid merupakan senyawa yang memiliki sifat antioksidan, selain itu flavonoid juga memiliki gugus -OH yang dapat berikatan dengan protein integral pada membran sel yang mengganggu proses transpor aktif dari ion Na^+ dan K^+ (Sadili, 2019). jumlah ion Na^+ dapat tidak terkendali hingga menyebabkan penurunan kadar ion K^+ . Hal ini menyebabkan daya kontraksi pada otot jantung berkurang akibat kurangnya kadar kalsium dan mengakibatkan terjadinya berbagai macam penyakit pada jantung. Sesuai dengan hasil yang didapatkan yaitu embrio mengalami edema perikardium. Kekurangan kalsium juga dapat menimbulkan gangguan pada pertumbuhan tulang. Flavonoid menyerang beberapa organ saraf sehingga timbul kelemahan pada saraf seperti pernafasan hingga kematian (Muta & Indah, 2015). Menurut Hodek *et al.*, (2002) flavonoid dalam konsentrasi tinggi dapat meningkatkan oksidasi yang mengganggu perkembangan janin. Penelitian Ahaddin (2014) dengan mengisolasi flavonoid memberikan efek abnormalitas mayor pada sirkulasi darah, diikuti dengan abnormalitas minor pada sumbu tubuh, edema kantung kuning telur, dan edema jantung.

Menurut Suari *et al.*, (2021) alkaloid memiliki peran sebagai racun, menimbulkan rasa pahit, dan mengganggu sistem saraf. Alkaloid diketahui telah menyebabkan cacat perkembangan pada manusia dan hewan (Green *et al.*, 2018). Saponin memiliki efek menurunkan tegangan permukaan sehingga dapat merusak membran sel dan mengaktifkan enzim serta merusak sel protein, saponin juga dapat merusak ovarium dan rahim yang dapat menyebabkan keracunan pada induk dan mempengaruhi keturunan setelah lahir (Shu *et al.*, 2015). Menurut Shubah *et al.*, (2021) saponin dapat menghambat kerja enzim yang menyebabkan penurunan protein, saponin memiliki sifat berbusa dalam air atau pelarut polar, memiliki sifat detergen yang baik dan beracun bagi binatang berdarah dingin, memiliki aktifitas

hemolisis, memiliki sifat anti eksodatis dan inflammatory. Saponin juga memiliki kemampuan untuk merusak membranel (Yunita *et al.*, 2009) .

Tanin merupakan senyawa polifenol yang dapat membentuk senyawa kompleks dengan protein (Muta & Indah, 2015). Tanin tidak dapat dicerna lambung dan memiliki daya ikat dengan protein, karbohidrat, vitamin dan mineral (Ridwan *et al.*, 2010). Tanin yang masuk dalam embrio ikan zebra dapat mempengaruhi transportasi oksigen dimana tanin akan berikatan dengan Hb mengakibatkan konformasi Hb berubah dan kehilangan stabilitas helix (Xi & Guo, 2007), terganggunya mekanisme transportasi oksigen dapat menyebabkan kematian jaringan internal karena hipoksi (Xie *et al.*, 2022). Terpenoid yang menembus plasenta dalam jangka waktu lama dapat mempengaruhi perkembangan embrio hingga menyebabkan terjadinya malformasi dan kematian (Bancin, 2012).

Tabel 6. Presentase Jumlah Kelainan pada Seluruh Embrio Ikan Zebra

		Jumlah Kelainan Embrio (%)									
Waktu	Jenis	Maserasi					Infundasi				
		50 ppm	250 ppm	500 ppm	750 ppm	1000 ppm	50 ppm	250 ppm	500 ppm	750 ppm	1000 ppm
Pengamatan	Malformasi	50 ppm	250 ppm	500 ppm	750 ppm	1000 ppm	50 ppm	250 ppm	500 ppm	750 ppm	1000 ppm
	Edema jantung	0	10	13,33	16,7	0	0	6,7	23,3	36,7	33,3
	Edema yolksac	3,3	6,7	16,7	20	0	0	16,7	26,7	53,3	36,7
24 Jam	ekor	10	13,33	16,7	16,7	0	0	0	20	30	23,3
	mata	0	0	0	3,3	0	0	0	0	0	0
	notokorda	0	0	3,3	0	0	0	0	0	26,7	0
	somit	0	0	0	3,3	0	0	0	0	20	0
	sumbu tubuh	0	3,3	3,3	3,3	0	0	0	0	26,7	26,7
48 Jam	Edema jantung	3,3	26,7	30	16,7	0	3,3	16,7	23,3	30	33,3
	Edema yolksac	3,3	30	33,3	20	0	6,7	23,3	30	40	36,7
	ekor	13,3	23,3	20	16,7	0	0	23,3	26,7	26,7	23,33
	mata	0	0	3,3	3,3	0	0	0	0	0	0
	notokorda	0	10	13,3	16,7	0	0	23,3	23,3	26,7	10
	sirkulasi darah	0	0	6,7	6,7	0	0	6,7	3,3	13,3	0

	somit	0	10	6,7	10	0	0	0	0	23,3	23,3	13,3
	sumbu tubuh	0	3,3	3,3	6,7	0	0	13,3	23,3	26,7	26,7	
72 jam	Edema jantung	10	26,7	30	16,7	0	6,7	13,3	23,3	30	33,3	
	Edema yolksac	6,7	33,3	33,3	20	0	13,3	20	30	40	36,7	
	ekor	13,3	23,3	20	16,7	0	3,3	26,7	26,7	26,7	23,3	
	mata	0	10	13,3	6,67	0	0	6,7	10	16,7	0	
	notokorda	3,3	20	23,3	16,7	0	0	23,3	23,3	26,7	10	
	sirkulasi darah	0	3,3	6,67	3,3	0	0	6,7	3,3	13,3	0	
	somit	0	10	23,3	10	0	0	0	23,3	13,3	13,3	
	sumbu tubuh	10	26,7	30	6,7	0	6,7	30	23,3	23,3	26,7	
	Edema jantung	10	26,7	30	16,7	0	6,7	13,3	23,3	30	33,3	
	Edema yolksac	6,7	33,3	33,3	20	0	10	10	30	40	36,7	
96 Jam	ekor	13,3	16,7	20	16,7	0	3,3	26,7	26,7	26,7	23,3	
	mata	0	10	13,3	6,67	0	0	6,7	10	16,7	0	
	notokorda	3,3	20	23,3	16,7	0	0	23,3	23,3	26,7	10	
	sirkulasi darah	0	0	3,3	3,3	0	0	6,7	3,3	13,3	0	
	somit	0	10	23,3	10	0	0	20	23,3	13,3	13,3	
	sumbu tubuh	10	26,7	30	6,7	0	6,7	26,7	23,3	23,3	26,7	

Tabel 7. Abnormalitas Mayor pada Embrio Ikan Zebra

Jenis Malformasi	Maserasi		Infundasi	
	Jumlah Embrio	Presentase (%)	Jumlah Embrio	Presentase (%)
Edema jantung	18	69.2	14	51.9
Edema yolksac	19	73.1	16	59.3
Ekor	15	57.7	17	63.0
Mata	8	30.8	7	25.9
Notokorda	14	53.8	14	51.9
Pigmentasi	0	0.0	0	0.0
Sirkulasi Darah	2	7.7	4	14.8
Somit	10	38.5	14	51.9
Sumbu Tubuh	20	76.9	19	70.4
Total Embrio		26		27
Abnormal				

BAB V

KESIMPULAN

5.1. Kesimpulan

1. Nilai LC_{50} untuk ekstrak kering hasil infundasi dan maserasi yakni 549,750 ppm dan 357,495 ppm. Toksisitas ekstrak daun beluntas hasil infundasi dan maserasi termasuk ke dalam praktis tidak toksik. Ekstrak kering hasil maserasi lebih toksik dibandingkan ekstrak kering hasil infusa.
2. Peningkatan konsentrasi pada ekstrak menyebabkan penurunan proses penetasan dan peningkatan abnormalitas embrio ikan zebra. Abnormalitas mayor yang disebabkan oleh ekstrak kering hasil maserasi daun beluntas adalah kelainan pada notokorda, sumbu tubuh, ekor, kantung kuning telur, dan perikardium, sedangkan abnormalitas mayor pada ekstrak kering hasil infundasi yaitu kelainan pada notokorda, sumbu tubuh, ekor, kantung kuning telur, somit, dan perikardium.

5.2. Saran

1. Penelitian ini dapat dilanjutkan dengan pengujian *in vivo* menggunakan jenis hewan yang lebih besar seperti mamalia untuk mengamati kelainan yang mungkin terjadi dan mengetahui toksisitas sub-kronis dan kronisnya.
2. Perlu dilakukan fraksinasi atau isolasi dari ekstrak daun beluntas untuk mengetahui komponen senyawa teraktif dalam daun beluntas.

DAFTAR PUSTAKA

- Agoes, A. 2010. *Tanaman Obat Indonesia. Buku 2*. Salemba Medika.
- Agoes, G. 2010. *Seri Farmasi Industri: Teknologi Bahan Alam*. ITB Press.
- Ahaddin, A. Y. 2014. *Isolasi dan Sitotoksitas Ekstrak Flavonoid Daun Tin (Ficus Carica Linn.)*. Institut Pertanian Bogor.
- Akpoilih, B., & Adebayo, O. 2011. Effect of Formalin on the Hatching Rate of eggs and Survival of larvae of the African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 14(4). <https://doi.org/10.4314/jasem.v14i4.63252>
- Ali, T. E. S., & Legler, J. 2011. Developmental Toxicity of Nonylphenol in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Indian Journal of Marine Sciences*, 40(4), 509–515.
- Amalina, N., Suyatmi, & Suparayanti, E. L. 2010. Effect of Beluntas (*Pluchea indica*) Leaf Extract on Mice Spermatogenesis. *Biofarmasi Journal of Natural Product Biochemistry*, 8(2), 47–51. <https://doi.org/10.13057/biofar/f080202>
- Amelda. 2019. *Farmakognosi untuk Mahasiswa Kompetensi Keahlian Farmasi*. Pustaka Baru Press.
- Amilah, S., & Ajiningrum, P. 2015. Uji Efektivitas Daya Hambat Sari Daun Pegagan (*Centella asiatica*) dan Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less) Terhadap Pertumbuhan Mycobacterium tuberculosis. *Stigma Journal of Science*, 8(2), 6–11.
- Amsterdam, A., & Hopkins, N. 2006. Mutagenesis Strategies in Zebrafish for Identifying Genes Involved in Development and Disease. *Trends in Genetics*, 22(9), 473–478. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.06.011>
- Arsiningtyas, I. S., Gunawan-Puteri, M. D. P. T., Kato, E., & Kawabata, J. 2014. Identification of α -glucosidase Inhibitors from the Leaves of *Pluchea indica* (L.) Less., a Traditional Indonesian herb: Promotion of Natural Product use. *Natural Product Research*, 28(17), 1350–1353.
- Bagnat, M., & Gray, R. S. 2020. Development of a straight vertebrate body axis. *Development (Cambridge)*, 147(21). <https://doi.org/10.1242/dev.175794>
- Bagwell, J., Norman, J., Ellis, K., Peskin, B., Hwang, J., Ge, X., Nguyen, S., McMenamain, S. K., Stainier, D. Y. R., & Bagnat, M. 2020. Notochord vacuoles absorb compressive bone growth during zebrafish spine formation.

ELife, 9, 1–28. <https://doi.org/10.7554/eLife.51221>

- Bisgrove, B. W., Snarr, B. S., Emrazian, A., & Yost, H. J. 2005. Polaris and Polycystin-2 in dorsal forerunner cells and Kupffer's vesicle are required for specification of the zebrafish left-right axis. *Developmental Biology*, 287(2), 274–288. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.08.047>
- BPOM RI. 2014. *Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik Secara In Vitro*. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Brand, M., Granato, M., & Nüsslein-Volhard, C. 2002. Keeping and Raising Zebrafish. *Zebrafish* (2002).
- Brand, M., Heisenberg, C. P., Warga, R. M., Pelegri, F., Karlstrom, R. O., Beuchle, D., Picker, A., Jiang, Y. J., Furutani-Seiki, M., Van Eeden, F. J. M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Kelsh, R. N., Mullins, M. C., Odenthal, J., & Nüsslein-Volhard, C. 1996. Mutations affecting development of the midline and general body shape during zebrafish embryogenesis. *Development*, 123, 129–142. <https://doi.org/10.1242/dev.123.1.129>
- Braunbeck, T., & Lammer, E. 2006. Fish Embryo Toxicity Assays. *Contract*, 20(203), 725–731. <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10811-007-9182-7>
- Chen, J. 2013. Impaired cardiovascular function caused by different stressors elicits a common pathological and transcriptional response in zebrafish embryos. *Zebrafish*, 10(3), 389–400. <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0875>
- Chen, L., Xu, M., Gong, Z., Zonyane, S., Xu, S., & Makunga, N. P. 2018. Comparative cardio and developmental toxicity induced by the popular medicinal extract of *Sutherlandia frutescens* (L.) R.Br. detected using a zebrafish Tuebingen embryo model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2303-9>
- Chewchida, S., & Vongsak, B. (2019). Simultaneous HPTLC Quantification of Three Caffeoylquinic Acids in *Pluchea indica* leaves and Their Commercial Products in Thailand. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(2), 177–181. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.12.007>
- DepKes RI. 1985. *Tanaman Obat Indonesia Jilid II*. Departemen Jendral Pengawas Obat dan Makanan.
- DepKes RI. 1995. *Farmakope Indonesia* (4th ed.). Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan.
- DepKes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Direktorat Jendral POM-Depkes RI.

- Donatus, I. A., & Nurlaila. 1986. *Obat Tradisional & Fitoterapi Uji Toksikologi*. Fakultas Farmasi UGM.
- Dwi Wahyu Werdani, Y., & Sri Widayawati, P. 2018. Antidiabetic Effect On Tea Of *Pluchea Indica* Less As Functional Beverage in Diabetic Patients. *Atlantis Press*, 98(Icpsuas 2017), 164–167. <https://doi.org/10.2991/icpsuas-17.2018.36>
- Ellis, K., Bagwell, J., & Bagnat, M. 2013. Notochord vacuoles are lysosome-related organelles that function in axis and spine morphogenesis. *Journal of Cell Biology*, 200(5), 667–679. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212095>
- Fatmi, M., Wibowo, A. E., & Rahmat, D. 2020. Uji Efektivitas Ekstrak Kombinasi Daun Beluntas (*Pluchea Indica* L. Less) dan Rimpang Jahe Merah (*Zingiber Officinale Roscoe*) terhadap Bakteri Penyebab Jerawat. *FITOFARMAKA: Jurnal Ilmiah Farmas*, 10(2), 97–105. <https://doi.org/10.33751/jf.v10i2.2170>
- Fitriansyah, M. I., & Indradi, R. B. 2018. Profil Fitokimia Dan Aktivitas Farmakologi Baluntas (*Pluchea indica* L.). *Farmaka*, 16(2), 337–346.
- Fitzgerald, C., Gallagher, E., O'Connor, P., Prieto, J., Mora-Soler, L., Grealy, M., & Hayes, M. 2013. Development of a seaweed derived platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) inhibitory hydrolysate, synthesis of inhibitory peptides and assessment of their toxicity using the Zebrafish larvae assay. *Peptides*, 50, 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.10.006>
- Gray, R. S., Wilm, T. P., Smith, J., Bagnat, M., Dale, R. M., Topczewski, J., Johnson, S. L., & Solnica-Krezel, L. 2014. Loss of col8a1a function during zebrafish embryogenesis results in congenital vertebral malformations. *Developmental Biology*, 386(1), 72–85.
- Green, M. L., Lebron, J. A., Tanis, K. Q., Redfern, B. G., Zhu, L., Yu, Y., Wang, E., Kaczor, A. R., Wysoczanski, E., Chen, F., Raymond, C. S., Mattson, B., Sistare, F. D., & Degeorge, J. J. 2018. *Machine Translated by Google Penggunaan Tes Toksisitas Perkembangan Alternatif untuk Menilai Potensi Teratogenisitas Farmasi*. 44–53.
- Guilliams, B. M. 2017. *Macrophage, a Long-distance Middleman*. 355(6331).
- Gusrina. 2017. *Genetika dan Reproduksi Ikan*. Deepublish.
- Haendel, M. A., Tilton, F., Bailey, G. S., & Tanguay, R. L. 2004. Developmental toxicity of the dithiocarbamate pesticide sodium metam in Zebrafish. *Toxicological Sciences*, 81(2), 390–400. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh202>

- Hakim, L. 1999. Obat dan Kehamilan. *Buletin PioGAMA*, 1, 1–4.
- Hanani, E. 2015. *Analisis Fitokimia*. Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Heiden, T. C. K., Dengler, E., Kao, W. J., Heideman, W., & Peterson, R. E. 2007. Developmental Toxicity of Low Generation PAMAM Dendrimers in Zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol*, 225(1), 70–79.
- Hodek, P., Trefil, P., & Stiborová, M. 2002. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, 139(1), 1–21. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(01\)00285-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(01)00285-X)
- Huang, D., Li, H., He, Q., Yuan, W., Chen, Z., & Yang, H. 2018. Developmental Toxicity of Diethylnitrosamine in Zebrafish Embryos/Juveniles Related to Excessive Oxidative Stress. *Water, Air, and Soil Pollution*, 229(3). <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3739-8>
- Ibrahim, S. R. M., Abdallah, H. M., El-Halawany, A. M., & Mohamed, G. A. 2016. Naturally Occurring Thiophenes: Isolation, Purification, Structural Elucidation, and Evaluation of Bioactivities. *Phytochemistry Reviews*, 15(2), 197–220. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9403-7>
- Idroes, R. K., Nurisma, N. W., Mawaddah, N., Pradysta, R. G., & Rofina. 2019. *Skrining Aktivitas Tumbuhan Yang Berpotensi Sebagai Bahan Antimikroba di Kawasan Ie Brôk (Upflow Geothermal Zone) Aceh Besar*. Syiah Kuala University Press.
- Johnson, W. W., & Finley, M. T. 1980. Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates : Summaries of Toxicity Tests Conducted at Columbia National Fisheries Research Laboratory, 1965-78. In *Resource Publication* (Vol. 137, p. 106).
- Kao, C. L., Cho, J., Lee, Y. Z., Cheng, Y. Bin, Chien, C. Y., Hwang, C. F., Hong, Y. R., Tseng, C. N., & Cho, C. L. 2015. Ethanolic Extracts of *Pluchea Indica* Induce Apoptosis and Antiproliferation Effects in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Molecules*, 20(6), 11508–11523. <https://doi.org/10.3390/molecules200611508>
- Kapsul. 2020. *Embriologi, Teratologi Teori dan Praktik: Buku Ajar Embriologi*. LeutikaPrio.
- Kar, B. 2013. Zebrafish: An in Vivo Model for the Study of Human Diseases. *International Journal of Genetics and Genomics*, 1(1), 6. <https://doi.org/10.11648/j.ijgg.20130101.12>
- KemenKes RI. 2017. *Farmakope Herbal Indonesia* (II). Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.

- Khan, A., Rahman, M., & Islam, M. S. 2009. Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activities of Salviasperanol Isolated from *Amorphophallus campanulatus*. *Pharmaceutical Biology*, 47(12), 1187–1191. <https://doi.org/10.3109/13880200903019192>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ulmann, B., & Schilling, T. F. 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203:253-310.
- Kongkiatpaiboon, S., Chewchinda, S., & Vongsak, B. 2018. Optimization of Extraction Method and HPLC Analysis of Six Caffeoylquinic Acids in *Pluchea indica* Leaves from Different Provenances in Thailand. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(2), 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.03.002>
- Kordinata, E. 2017. *Toksistas Akut Timokuinon Terhadap Embrio Ikan Zebra (Danio rerio)*. Institut Pertanian Bogo.
- Kristanti, A. N. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Airlangga Universitas Press.
- Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., & Braunbeck, T. 2009. Is the Fish Embryo Toxicity Test (FET) with the Zebrafish (*Danio rerio*) a Potential Alternative for the Fish Acute Toxicity Test? *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 149(2), 196–209. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006>
- Lestari, B., Soeharto, S., Nurdiana, Kalsum, U., Permatasari, N., Khotimah, H., Nugrahenny, D., & Mayangsari, E. 2017. *Buku Ajar Farmakologi Dasar*. UB Press.
- Lu, F. C. 1995. *Toksikologi Dasar: Asas, Organ Sasaran, dan Penilaian Risiko, Edisi 2* (N. T. E (ed.)). UI Press.
- Ma, C., Parng, C., Seng, W. L., Zhang, C., Willett, C., & Mcgrath, P. 2007. Zebrafish - an In vivo Model for Drug Screening. *Drug Discovery*, 38–45.
- Malik, A., Edward, F., & Waris, R. 2016. Skrining Fitokimia dan Penetapan Kandungan Flavonoid Total Ekstrak Metanolik Herba Boroco (*Celosia argentea* L.). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 1(1), 1–5. <https://doi.org/10.33096/jffi.v1i1.193>
- Maria Martina, N. N. N., Regina, T., & Sumerti. 2015. Efektivitas Kumur Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* L .) Untuk Menurunkan Jumlah Koloni *Streptococcus* sp . Pada Plak Gigi. *Jurnal Skala Husada*, 12(1), 56–64.
- Matthews, M., Trevarrow, B., & Matthews, J. 2002. A Virtual Tour of the Guide

- for Zebrafish Users. *Lab Animal*, 31, 34–40.
- Meles, D. K. 2010. *Peran Uji Praktikum dalam Bidang Farmakologi*. ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga.
- Mukono. 2005. *Toksikologi Lingkungan*. Airlangga University Press.
- Muta, R., & Indah, K. 2015. Pengaruh Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) terhadap Mortalitas dan Perkembangan Larva *Spodoptera litura* F. *Jurnal Sains Dan Seni ITS*, 4(2), 2–5.
- Nugroho, A. 2017. *Buku Ajar Teknologi Bahan Alam*. Lambung Mangkurat University Press.
- OECD. 2013. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. In *Dermatotoxicology Issue July*, pp. 509–511. <https://doi.org/10.3109/9781841848570-66>
- Oka, T., Nishimura, Y., Zang, L., Hirano, M., Shimada, Y., Wang, Z., Umamoto, N., Kuroyanagi, J., Nishimura, N., & Tanaka, T. 2010. Diet-induced Obesity in Zebrafish Shares Common Pathophysiological Pathways with Mammalian Obesity. *BMC Physiology*, 10(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-10-21>
- Parichy, D. M., Elizondo, M. R., Mills, M. G., Gordon, T. N., & Engeszer, R. E. 2009. Normal Table of Postembryonic Zebrafish Development: Staging by Externally Visible Anatomy of the Living Fish. *Developmental Dynamics*, 238(12), 2975–3015. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22113>
- Priyanto. 2010. *Toksikologi: Mekanisme, Terapi Antidotum, dan Penilaian Risiko Edisi 2*. Leskonfi.
- Pujowati, P. 2006. *Pengenalan Ragan Tanaman Lanskap Asteraceae*. Institut Pertanian Bogor.
- Raharjo, I., & Horsten, S. F. A. 2001. *Pluchea indica*. Backhuys Publishers.
- Rahayu, M., & Solihat, M. F. 2018. *Toksikologi Klinik*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Rahman, M. R., Razak, F. A., & Bakri, M. M. 2014. Evaluation of Wound Closure Activity of *Nigella sativa*, *Melastoma malabathricum*, *Pluchea indica*, and *Piper sarmentosum* Extracts on Scratched Monolayer of Human Gingival Fibroblasts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1–9. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2014/190342/>
- Rasyid, A. U. M., & Amody, Z. 2020. Pengujian Efektivitas Formula Gel Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) dengan Variasi Konsentrasi Gelling Agent Sebagai Kandidat Sediaan Anti Jerawat. *Jurnal Ilmiah Manuntung*,

6(2), 312. <https://doi.org/10.51352/jim.v6i2.393>

- Ratu, A. P., & Wirasti, W. 2018. Uji Toksisitas Daun Beluntas (*Pluchea Indica* Less), Daun Kemangi (*Ocimum Basilicum* L.), Kulit Biji Jengkol (*Archidendron Pauciflorum*) dan Kulit Rimpang Kencur (*Kaempferia Galanga* Linn.) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Jurnal Farmasi Sains Dan Praktis*, 4(2), 15–19.
- Ridwan, Y., Satrija, F., Darusman, L. K., & Handharyani, E. 2010. Efektivitas anticestoda ekstrak daun miana (*Coleus blumei* Bent) terhadap cacing hymenolepis microstoma pada mencit. *Media Peternakan*, 33(1), 6–11.
- Ruan, J., Li, Z., Yan, J., Huang, P., Yu, H., Han, L., Zhang, Y., & Wang, T. 2018. Bioactive Constituents from the Aerial Parts of *Pluchea indica* Less. *Molecules*, 23(9), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules23092104>
- Rusli, Z., Sari, B. L., Wardatun, S., & Arsityo, W. 2020. Skrining Toksisitas Akut Beberapa Fraksi Buah Karonda (*Carissa carandas* L.) Pada Embrio Zebrafish (*Danio rerio*). *Fitofarmaka Jurnal Ilmiah Farmasi*, 10 (1), 45–53.
- Safitri, I., Nuria, M. C., & Puspitasari, A. D. 2018. Perbandingan Kadar Flavonoid dan Fenolik Total Ekstrak Metanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) PADA BERBAGAI METODE EKSTRAKSI. *Jurnal Inovasi Teknik Kimia*, 3(1), 31–36. <https://doi.org/10.31942/inteka.v3i1.2123>
- Sadili, A. A. U. 2019. *Toksisitas Teratogenik Ekstrak Etanol Daun Tanjung (Mimusops elengi L.) Metode MAE pada Embrio Ikan Zebra*. Universitas Pakuan.
- Saifudin, A., Tahayu, V., & Teruna, H. Y. 2011. *Standardisasi bahan obat alam*. Graha Ilmu.
- Sant, K. E., & Timme-laragy, A. R. 2019. Nutrition in the Early Embryo. *Curr Environ Health Rep.* , 5(1), 125–133. <https://doi.org/10.1007/s40572-018-0183-2.Zebrafish>
- Saparinto, C., & Susiana, R. 2016. *Grow Your Own Medical Plant: Panduan Praktis Menanam 51 Tanaman Obat Populer di Perkarangan*. Lily Publisher.
- Schilling, T. F. 2002. The Morphology of Larva and Adult Zebrafish. In R. Nusslein-Volhard, Christiane; Dahm (Ed.), *Zebrafish* (pp. 59–95). Practical Approach.
- Schottenfeld, J., Sullivan-Brown, J., & Burdine, R. D. 2007. Zebrafish curly up encodes a Pkd2 ortholog that restricts left-side-specific expression of southpaw. *Development*, 134(8), 1605–1615.

<https://doi.org/10.1242/dev.02827>

- Schumann, J. 2010. Teratogen Screening: State of the Art. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 2(3), 115–121.
- Shobah, A. N., Noviyanto, F., & Kurnia, N. M. 2021. Kombinasi Ekstrak Daun Kecombrang (*Etlingera elatior*) dan Daun Beluntas (*Pluchea indica*) sebagai Biolarvasida. *Jurnal Kesehatan Perintis (Perintis's Health Journal)*, 8(2), 100–109. <https://doi.org/10.33653/jkp.v8i2.675>
- Shu, Y., Cao, M., Yin, Z. Q., Li, P., Li, T. Q., Long, X. F., Zhu, L. F., Jia, R. Y., Dai, S. J., & Zhao, J. 2015. The reproductive toxicity of saponins isolated from Cortex *Albiziae* in female mice. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(2), 119–126. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)60015-2](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)60015-2)
- Sibarani, V. R., Wowor, P. M., & Awaloei, H. 2013. Uji Efek Analgesik Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.) pada Mencit (*Mus musculus*). *Jurnal E-Biomedik*, 1(1), 621–628.
- Sirichaiwetchakoon, K., Lowe, G. M., Thumanu, K., & Eumkeb, G. 2018. The Effect of *Pluchea indica* (L.) Less. Tea on Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes and Lipase Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4108787>
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. 2008. The Behaviour and Ecology of the Zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- Suari, A. L. G. S., Haq, A. D., & Rahayu, L. A. D. 2021. Potensi Ekstrak Bunga Kamboja (*Plumeria* Sp.) Dan Bunga Kluwih (*Artocarpus Camansi*) Sebagai Biolarvasida Nyamuk *Anopheles* Sp. Dalam Upaya Pencegahan Penyakit Malaria. *JIMKI: Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kedokteran Indonesia*, 8(3), 137–145. <https://doi.org/10.53366/jimki.v8i3.267>
- Sudirman, R. S., Usmar, U., Rahim, A., & Bahar, M. A. 2017. Aktivitas Anti-inflamasi Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) pada Model Inflamasi Terinduksi CFA (Complete Freund's Adjuvant). *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 3(2), 191–198. <https://doi.org/10.22487/j24428744.0.v0.i0.8921>
- Sulistiyarningsih, R. 2009. *Potensi Daun Beluntas (Pluchea indica Less.) sebagai Inhibitor terhadap Pseudomonas aeruginosa Multi Resistant dan Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. Universitas Padjadjaran.
- Suriyaphan, O. 2014. Nutrition, Health Benefits and Applications of *Pluchea indica* (L.) Less Leaves. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*,

41(4), 1–10.

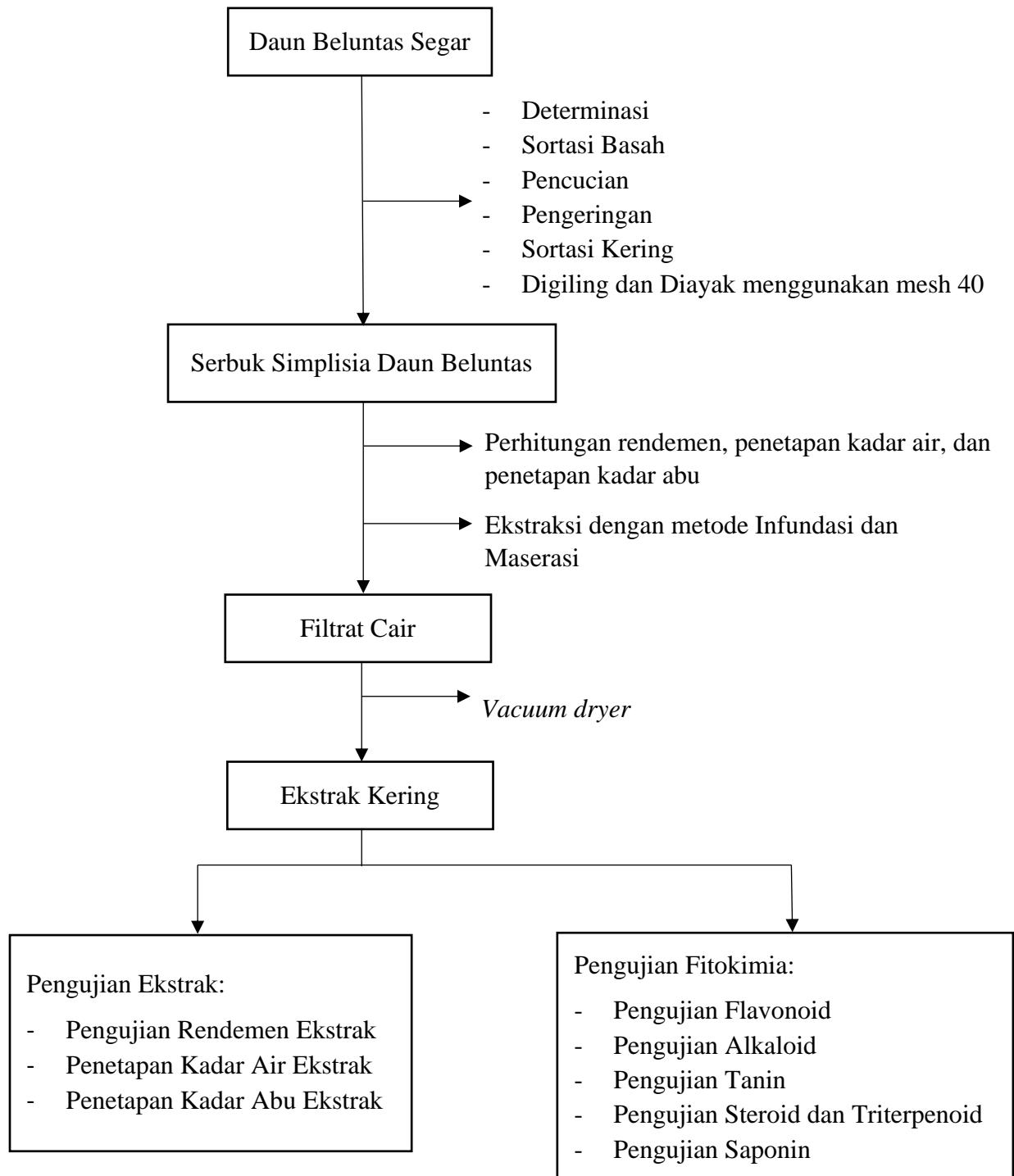
- Susetyarini, E., Latifa, R., Wahyono, P., & Nurrohman, E. 2019. Atlas Morfologi Anatomi Beluntas (*Pluchea indica*). Universitas Muhammadiyah Malang. <http://eprints.umm.ac.id/id/eprint/71251>
- Syahbirin, G., Mumuh, N., & Mohamad, K. 2017. Curcuminoid and toxicity levels of ethanol extract of javanese ginger (*Curcuma xanthorrhiza*) on brine shrimp (*Artemia salina*) larvae and zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(4), 169–173. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i4.16429>
- Van den Bulck, K., Hill, A., Mesens, N., Diekman, H., De Schaepdrijver, L., & Lammens, L. 2011. Zebrafish Developmental Toxicity Assay: A Fishy Solution to Reproductive Toxicity Screening, or just a Red Herring? *Reproductive Toxicology*, 32(2), 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.06.119>
- Vasamsetti, B. M. K., Kim, N. S., Chon, K., & Park, H. H. 2020. Teratogenic and developmental toxic effects of etridiazole on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Applied Biological Chemistry*, 63(1). <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00566-2>
- Widyawati, P. S., Wijaya, C. H., Hardjosworo, P. S., & Sajhuti, D. 2013. Volatile Compounds of *Pluchea indica* Less and *Ocimum basillicum* Linn Essential Oil and Potency as Antioxidant. *HAYATI Journal of Biosciences*, 20(3), 117–126. <https://doi.org/10.4308/hjb.20.3.117>
- Willaert, A., Khatri, S., Callewaert, B. L., Coucke, P. J., Crosby, S. D., Lee, J. G. H., Davis, E. C., Shiva, S., Tsang, M., De paepe, A., & Urban, Z. 2012. GLUT10 is required for the development of the cardiovascular system and the notochord and connects mitochondrial function to TGF β signaling. *Human Molecular Genetics*, 21(6), 1248–1259. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr555>
- William, W. 2017. Ikan zebra (*Danio rerio*) dan Kegunaanya dalam Penelitian Fisiologi. *Kedokt. Meditek*, 23(64), 41–46.
- Wilson, J. G., & Fraser, F. C. 1977. *Handbook of Teratology* (1: General). Plenum Press.
- Xi, J., & Guo, R. 2007. Interactions between flavonoids and hemoglobin in lecithin liposomes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(4), 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.08.011>
- Xie, Z., Wang, M., Deng, Y., Li, J., Li, J., Pang, W., Xie, L., Jiang, D., Huang, Z., He, T., & Yang, G. 2022. Acute toxicity of eucalyptus leachate tannins to

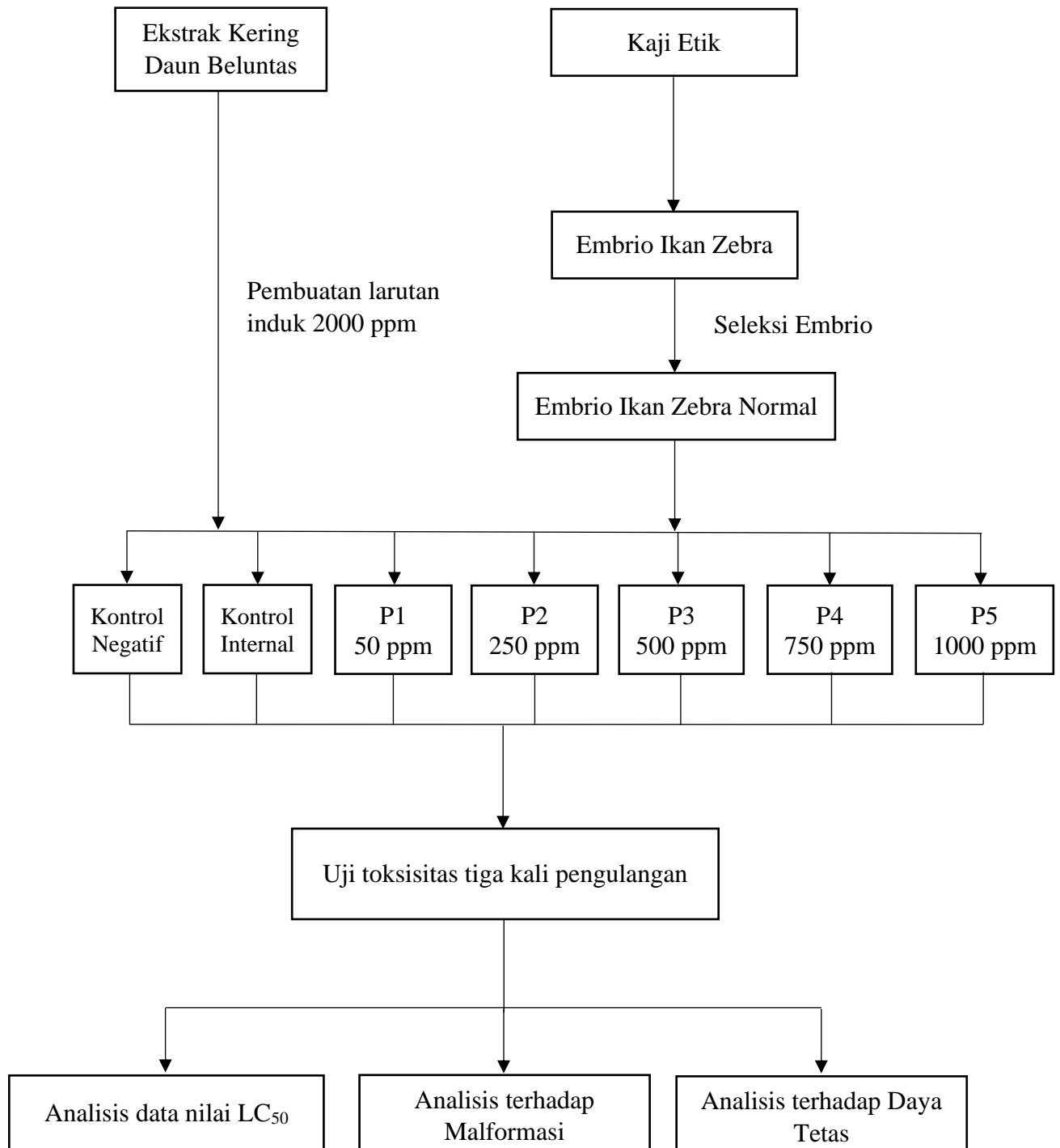
zebrafish and the mitigation effect of Fe³⁺ on tannin toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 229, 113077.

- Yang, L., Ho, N. Y., Alshut, R., Legradi, J., Weiss, C., Reischl, M., Mikut, R., Liebel, U., Müller, F., & Strähle, U. 2009. Zebrafish Embryos as Models for Embryotoxic and Teratological Effects of Chemicals. *Reproductive Toxicology*, 28(2), 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.04.013>
- Ye, Q., Liu, H., Fang, C., Liu, Y., Liu, X., Liu, J., Zhang, C., Zhang, T., Peng, C., & Guo, L. 2021. Cardiotoxicity evaluation and comparison of diterpene alkaloids on zebrafish. *Drug and Chemical Toxicology*, 44(3), 294–301. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1586916>
- Yulianto, & Amaloyah, N. 2017. *Toksikologi Lingkungan*. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- Yuniarto, A., Sukandar, E. Y., Fidrianny, I., & Adnyana, I. K. 2017. Aplikasi Zebrafish (*Danio rerio*) pada Beberapa Model Penyakit Eksperimental. *MPI (Media Pharmaceutica Indonesiana)*, 1(3), 116–126. <https://doi.org/10.24123/mpi.v1i3.215>
- Yunita, E., Suparpti, N., & Hidayat, J. 2009. Pengaruh Ekstrak daun Teklan (*eupatorium riparium*) terhadap Mortalitas dan Perkembangan Larva *Aedes aegypti*. *Bioma*, 11(1), 11–17.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Tahap Pembuatan Simplisia dan Ekstrak Daun Beluntas



Lampiran 2. Skema Uji Toksisitas dengan Embrio Ikan Zebra

Lampiran 3. Hasil Determinasi Tanaman



ORGANISASI RISET ILMU PENGETAHUAN HAYATI
Kantor Pusat Riset Biologi

Jl. Raya Jakarta-Bogor Km. 46, Cibinong, Kabupaten Bogor, Jawa Barat 16911
Telepon/wa: 08118610183 | email: organisasirisetiph@brin.go.id
<https://www.brin.go.id>

Cibinong, 29 Oktober 2021

Nomor : B-463/V/DI.05.07/10/2021
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/ determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). **Sukma Dewi Irawan Putri**
NPM : 066117354
Universitas Pakuan
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Di
Bogor

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Riset Biologi - BRIN Cibinong, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1.	Daun Beluntas	<i>Pluchea indica</i> (L.) Less.	Asteraceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Kantor Pusat Riset Biologi-BRIN

 Dr. Bambang Setiawan Achmadi, S.KH., M.Sc.
 NIDN: 197810262005021003

Lampiran 4. Perhitungan Rendemen, Kadar Air, dan Kadar Abu pada Serbuk Simplisia dan Ekstrak Kering Daun Beluntas

- **Perhitungan Rendemen Simplisia**

Bobot Awal Daun Beluntas = 5000 g

Bobot Hasil Sortasi Basah = 4000 g

Bobot Serbuk Simplisia = 831,26 g

$$\begin{aligned} \% \text{Rendemen Simplisia} &= \frac{\text{Bobot kering simplisia yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot awal sampel segar (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{831,26 \text{ g}}{4000 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 20,78\% \end{aligned}$$

- **Perhitungan Rendemen Ekstrak Kering**

- Ekstrak Kering Daun Beluntas Hasil Infundasi

Bobot Awal Simplisia = 200 g

Bobot Ekstrak Kering = 31,24 g

$$\begin{aligned} \% \text{Rendemen Ekstrak} &= \frac{\text{Jumlah bobot ekstrak kering (g)}}{\text{Jumlah bobot simplisia serbuk (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{31,24 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 15,62\% \end{aligned}$$

- Ekstrak Kering Daun Beluntas Hasil Maserasi

Bobot Awal Simplisia = 200 g

Bobot Ekstrak Kering = 34,5 g

$$\% \text{Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Jumlah bobot ekstrak kering (g)}}{\text{Jumlah bobot simplisia serbuk (g)}} \times 100\%$$

$$= \frac{34,5 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 17,25\%$$

- **Perhitungan Kadar Air Serbuk Simplisia dan Ekstrak Kering Daun**

- **Beluntas**

- **Kadar Air Serbuk Simplisia Daun Beluntas**

Ulangan	Bobot Sampel	Bobot Kurs Kosong	Bobot Kurs + Sampel Sebelum Pemanasan	Bobot Kurs + Sampel Setelah Pemanasan	% Kadar Air	%Rata-rata ± SD
				37.8408		
1	2.0007	35.9392	37.9399	37.8343	5,5430	
				37.8307		
				37.8290		5,6407
				38.1742		±0,1380
2	2.0006	36.2778	38.2784	38.1683	5,7383	
				38.1648		
				38.1636		

$$\% \text{Kadar air} = \frac{(\text{Kurs} + \text{Isi}_{t_0}) - (\text{Kurs} + \text{Isi}_{t_1})}{\text{Bobot sampel yang ditimbang}} \times 100\%$$

$$1. \% \text{Kadar air} = \frac{(37,9399) - (37,8290)}{2,0007} \times 100\%$$

$$= 5,5430\%$$

$$2. \% \text{Kadar air} = \frac{(38,2784) - (38,1636)}{2,0006} \times 100\%$$

$$= 5,7383\%$$

- Kadar Air Ekstrak Kering Hasil Maserasi Simplisia Daun Beluntas

Ulangan	Bobot Sampel	Bobot Kurs Kosong	Bobot Kurs + Sampel Sebelum Pemanasan	Bobot Kurs + Sampel Setelah Pemanasan	% Kadar Air	% Rata-rata ± SD
				40,6697		
1	2.0010	38.7215	40.7225	40,6638	3,1884	3,5612 ±0,5272
				40,6606		
				40,6587		
				40,8644		
2	2.0005	38.9312	40.9317	40,8580	3,9340	
				40,8547		
				40,8530		

$$\% \text{Kadar air} = \frac{(\text{Kurs} + \text{Isi}_{t_0}) - (\text{Kurs} + \text{Isi}_{t_1})}{\text{Bobot sampel yang ditimbang}} \times 100\%$$

$$1. \% \text{Kadar air} = \frac{(40.7225) - (40,6587)}{2,0010} \times 100\%$$

$$= 3,1884\%$$

$$2. \% \text{Kadar air} = \frac{(40.9317) - (40,8530)}{2,0005} \times 100\%$$

$$= 3,9340\%$$

- Kadar Air Ekstrak Kering Hasil Infundasi Simplisia Daun Beluntas

Ulangan	Bobot Sampel	Bobot Kurs Kosong	Bobot Kurs + Sampel Sebelum Pemanasan	Bobot Kurs + Sampel Setelah Pemanasan	% Kadar Air	%Rata-rata \pm SD
1	2.0013	38.7618	40.7631	40,6831	4,5520	4,5361 $\pm 0,0225$
				40,6770		
				40,6736		
				40,6720		
2	2.0021	35.6280	37.6301	37,5518	4,5202	
				37,5450		
				37,5414		
				37,5396		

$$\% \text{Kadar air} = \frac{(\text{Kurs} + \text{Isi}_{t_0}) - (\text{Kurs} + \text{Isi}_{t_1})}{\text{Bobot sampel yang ditimbang}} \times 100\%$$

$$1. \% \text{Kadar air} = \frac{(40.7631) - (40,6720)}{2,0013} \times 100\%$$

$$= 4,5520\%$$

$$2. \% \text{Kadar air} = \frac{(37.6301) - (37,5396)}{2,0021} \times 100\%$$

$$= 4,5202\%$$

- **Perhitungan Kadar Abu Serbuk Simplisia dan Ekstrak Kering Daun Beluntas**
 - Kadar Abu Simplisia Serbuk Daun Beluntas

Ulangan	Bobot Sampel	Bobot Kurs Kosong	Bobot Kurs + Sampel Setelah Pemanasan	%Kadar Abu	%Rata-rata ± SD
1	2.0010	38.8616	38.9048 38.9020 38.9008	1.9590	1.9244 ±0.0489
2	2.0002	39.0858	39.1272 39.1245 39.1236	1.8898	

$$\% \text{ Kadar Abu} = \frac{(\text{Bobot Kurs} + \text{Isi Setelah Pemanasan}) - \text{Bobot Kurs Kosong}}{\text{Bobot sampel yang ditimbang}} \times 100\%$$

$$1. \% \text{ Kadar Abu} = \frac{38,9008 - 38,8616}{2,0010} \times 100\%$$

$$= 1,9590\%$$

$$2. \% \text{ Kadar Abu} = \frac{39,1236 - 39,0858}{2,0002} \times 100\%$$

$$= 1,8898\%$$

- Kadar Abu Ekstrak Kering Hasil Maserasi Simplisia Serbuk Daun Beluntas

Ulangan	Bobot Sampel	Bobot Kurs Kosong	Bobot Kurs + Sampel Setelah Pemanasan	%Kadar Abu	%Rata-rata ± SD
1	2.0094	36.9285	36.9483 36.9456 36.9438	0,7614	0.8853 ±0.1752
2	2.0016	38.8674	38.8920 38.8894 38.8876	1,0092	

$$\% \text{ Kadar Abu} = \frac{(\text{Bobot Kurs} + \text{Isi Setelah Pemanasan}) - \text{Bobot Kurs Kosong}}{\text{Bobot sampel yang ditimbang}} \times 100\%$$

$$1. \% \text{ Kadar Abu} = \frac{36,9438 - 36,9285}{2,0094} \times 100\%$$

$$= 0,7614\%$$

$$2. \% \text{ Kadar Abu} = \frac{38,8876 - 38,8674}{2,0016} \times 100\%$$

$$= 1,0092\%$$

- Kadar Abu Ekstrak Kering Hasil Infundasi Simplisia Serbuk Daun Beluntas

Ulangan	Bobot Sampel	Bobot Kurs Kosong	Bobot Kurs + Sampel Setelah Pemanasan	%Kadar Abu	%Rata-rata ± SD
1	2.0008	35.8461	35.8841 35.8813 35.8792	1,6543	1.5989 ±0.0783
2	2.0019	37.1211	37.1572 37.1543 37.1520	1,5435	

$$\% \text{ Kadar Abu} = \frac{(\text{Bobot Kurs} + \text{Isi Setelah Pemanasan}) - \text{Bobot Kurs Kosong}}{\text{Bobot sampel yang ditimbang}} \times 100\%$$

$$1. \% \text{ Kadar Abu} = \frac{35,8792 - 35,8461}{2,0008} \times 100\%$$

$$= 1,6543\%$$

$$2. \% \text{ Kadar Abu} = \frac{37,1520 - 37,1211}{2,0019} \times 100\%$$

$$= 1,5435\%$$

Lampiran 5. Hasil Komite Etik Hewan Percobaan

**KOMITE ETIK PENGGUNAAN HEWAN PERCOBAAN
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PAKUAN
Jl. Pakuan PO BOX 452**

**SURAT KEPUTUSAN KOMITE ETIK
No. 020/KEPHP-UNPAK/09-2021**


Komite Etik Penggunaan Hewan Percobaan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan, dalam upaya melindungi hak dan kesejahteraan subjek hewan percobaan dalam penelitian dengan teliti telah mengkaji rancangan penelitian berjudul


**Uji Toksisitas Akut Infusa Dan Maserat Daun Beluntas (*Pluchea Indica Less.*)
Terhadap Embrio Ikan Zebra (*Danio Rerio*)**


Peneliti Utama : Sukma Dewi Irawan Putri
Institusi : Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan Bogor

Dan MENERIMA rancangan penelitian tersebut.

Tanggal ditetapkan
Bogor, 3 September 2021

Sekretaris Komite Etik

apt Nisa Najwa Rokhmah, M.Farm

Ketua Komite Etik

Drh. Min Rakhmawati, PhD



Lampiran 6. Perhitungan Pembuatan Larutan Uji.

- Larutan Induk = 200 mg ad 100 mL air
= 2000 mg/L = 2000 ppm
- Pengenceran

Rumus $V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$

- a. 1000 ppm
 $V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$
 $V_1 \cdot 2000 \text{ ppm} = 100 \text{ mL} \cdot 1000 \text{ ppm}$
 $V_1 = 50 \text{ mL}$
 Ad 100 mL sampai batas
- b. 750 ppm
 $V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$
 $V_1 \cdot 2000 \text{ ppm} = 100 \text{ mL} \cdot 750 \text{ ppm}$
 $V_1 = 37,5 \text{ mL}$
 Ad 100 mL sampai batas
- c. 500 ppm
 $V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$
 $V_1 \cdot 2000 \text{ ppm} = 100 \text{ mL} \cdot 500 \text{ ppm}$
 $V_1 = 25 \text{ mL}$
 Ad 100 mL sampai batas
- d. 250 ppm
 $V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$
 $V_1 \cdot 2000 \text{ ppm} = 100 \text{ mL} \cdot 250 \text{ ppm}$
 $V_1 = 12,5 \text{ mL}$
 Ad 100 mL sampai batas

e. 50 ppm

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$V_1 \cdot 2000 \text{ ppm} = 100 \text{ mL} \cdot 50 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ mL}$$

Ad 100 mL sampai batas

Lampiran 7. Hasil Uji Daya Tetas Embrio Ikan Zebra

Jenis Sampel	Waktu	Perlakuan						
		KN	KI	P1	P2	P3	P4	P5
Infundasi	24 jam	0	0	0	0	0	0	0
	48 jam	0	0	0	0	0	0	0
	72 jam	30	30	27	22	17	6	0
	96 jam	30	30	27	21	16	4	0
Maserasi	24 jam	0	0	0	0	0	0	0
	48 jam	0	0	0	1	0	0	0
	72 jam	30	30	23	16	12	2	0
	96 jam	30	30	23	13	11	1	0

Rumus Perhitungan Daya Tetas:

$$\text{Daya Tetas} = \frac{\text{Jumlah Embrio yang Menetas pada Jam ke } - 96}{\text{Jumlah Embrio Awal Pengamatan}} \times 100\%$$

➤ Hasil Perhitungan Daya Tetas pada Ekstrak Kering Hasil Infundasi ke-96 jam

- Kontrol Negatif

$$\text{Daya Tetas} = \frac{30}{30} \times 100\%$$

=

100%

- Kontrol Internal

$$\text{Daya Tetas} = \frac{30}{30} \times 100\%$$

= 100%

- Konsentrasi 50 ppm

$$\begin{aligned}\text{Daya Tetas} &= \frac{27}{30} \times 100\% \\ &= 90\%\end{aligned}$$

- Konsentrasi 250 ppm

$$\begin{aligned}\text{Daya Tetas} &= \frac{21}{30} \times 100\% \\ &= 70\%\end{aligned}$$

- Konsentrasi 500 ppm

$$\begin{aligned}\text{Daya Tetas} &= \frac{16}{30} \times 100\% \\ &= 53,33\%\end{aligned}$$

- Konsentrasi 750 ppm

$$\begin{aligned}\text{Daya Tetas} &= \frac{4}{30} \times 100\% \\ &= 13,33\%\end{aligned}$$

- Konsentrasi 1000 ppm

$$\begin{aligned}\text{Daya Tetas} &= \frac{0}{30} \times 100\% \\ &= 0\%\end{aligned}$$

➤ **Hasil Perhitungan Daya Tetas pada Ekstrak Kering Hasil Maserasi ke-96 jam**

- Kontrol Negatif

$$\begin{aligned}\text{Daya Tetas} &= \frac{30}{30} \times 100\% \\ &= 100\%\end{aligned}$$

- Kontrol Internal

$$\begin{aligned}\text{Daya Tetas} &= \frac{30}{30} \times 100\% \\ &= 100\%\end{aligned}$$

- Konsentrasi 50 ppm

$$\begin{aligned}\text{Daya Tetas} &= \frac{23}{30} \times 100\% \\ &= 76,67\%\end{aligned}$$

- Konsentrasi 250 ppm

$$\begin{aligned}\text{Daya Tetas} &= \frac{13}{30} \times 100\% \\ &= 43,33\%\end{aligned}$$

- Konsentrasi 500 ppm

$$\begin{aligned}\text{Daya Tetas} &= \frac{11}{30} \times 100\% \\ &= 36,67\%\end{aligned}$$

- Konsentrasi 750 ppm

$$\begin{aligned}\text{Daya Tetas} &= \frac{1}{30} \times 100\% \\ &= 3,33\%\end{aligned}$$

- Konsentrasi 1000 ppm

$$\begin{aligned}\text{Daya Tetas} &= \frac{0}{30} \times 100\% \\ &= 0\%\end{aligned}$$

Lampiran 8. Jumlah Kematian Embrio Ikan Zebra

A. Infundasi

Waktu	Ulangan	Konsentrasi (ppm)						
		KN	KI	50 ppm	250 ppm	500 ppm	750 ppm	1000 ppm
24 Jam	1	0	0	0	2	3	5	6
	2	0	0	0	2	3	4	7
	3	0	0	0	2	4	4	6
48 Jam	1	0	0	0	2	3	5	7
	2	0	0	1	3	4	5	9
	3	0	0	1	3	4	6	10
72 Jam	1	0	0	1	2	4	7	10
	2	0	0	1	3	5	8	10
	3	0	0	1	3	4	8	10
96 Jam	1	0	0	1	3	4	9	10
	2	0	0	1	3	5	8	10
	3	0	0	1	3	5	9	10

B. Maserasi

Waktu	Ulangan	Konsentrasi (ppm)						
		KN	KI	50 ppm	250 ppm	500 ppm	750 ppm	1000 ppm
24 Jam	1	0	0	1	3	4	9	10
	2	0	0	1	2	5	7	10
	3	0	0	2	2	5	8	10
48 Jam	1	0	0	1	4	5	10	10
	2	0	0	2	4	6	7	10
	3	0	0	2	4	6	8	10
72 Jam	1	0	0	2	5	6	10	10
	2	0	0	2	4	6	8	10
	3	0	0	3	5	7	10	10
96 Jam	1	0	0	2	6	6	10	10
	2	0	0	2	5	6	9	10
	3	0	0	3	6	7	10	10

Lampiran 9. Hasil Nilai LC₅₀ Ekstrak Kering Daun Beluntas

A. Infundasi

Waktu	Ulangan	LC50 ppm	Rata-rata LC50 (ppm)	±SD
	1	766.465		
24	2	751.806	768.472	17.754
	3	787.144		
	1	691.15		
48	2	648.075	672.502	22.111
	3	678.282		
	1	588.79		
72	2	564.092	581.470	24.577
	3	598.849		
	1	564.237		
96	2	564.092	549.750	24.968
	3	520.921		

B. Maserasi

Waktu	Ulangan	LC50 (ppm)	Rata-rata LC50 (ppm)	±SD
	1	564.237		
24	2	565.253	566.623	3.292
	3	570.378		
	1	494.170		
48	2	491.330	490.974	3.388
	3	487.422		
	1	493.427		
72	2	487.422	489.263	3.614
	3	486.941		
	1	328.231		
96	2	393.564	357.495	33.194
	3	350.689		

Lampiran 10. Hasil Uji LC₅₀ Ekstrak Kering Daun Beluntas Menggunakan Probit

A. Infundasi (Jam ke-96)

● Ulangan 1

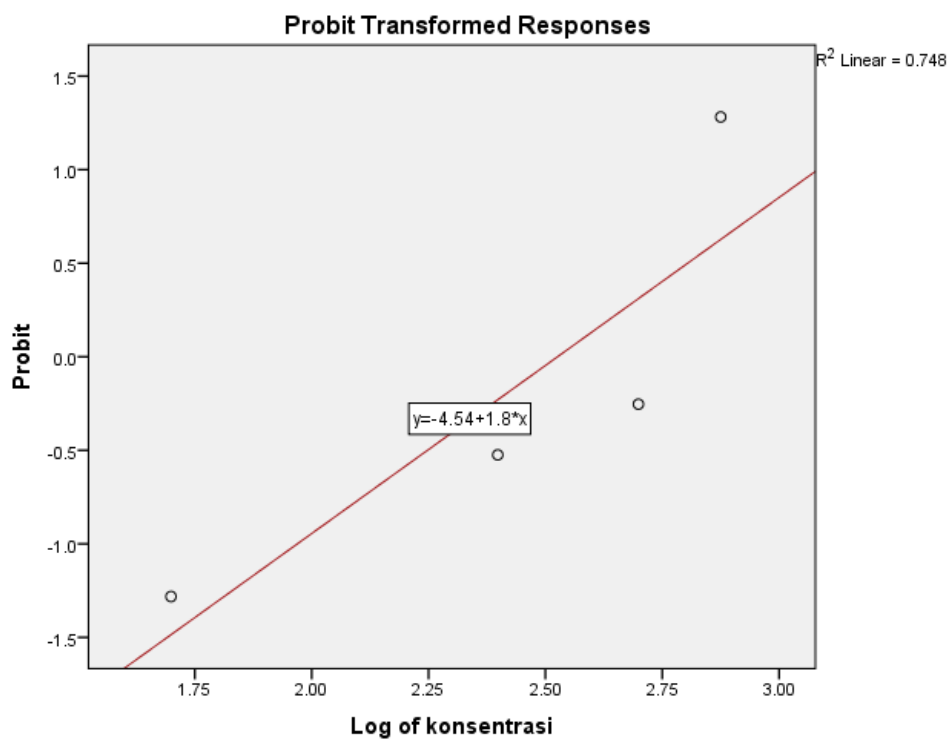
Confidence Limits							
	95% Confidence Limits for konsentrasi				95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^b		
	Probability	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	.010	322.226	.	.	2.508	.	.
	.020	344.089	.	.	2.537	.	.
	.030	358.723	.	.	2.555	.	.
	.040	370.140	.	.	2.568	.	.
	.050	379.695	.	.	2.579	.	.
	.060	388.021	.	.	2.589	.	.
	.070	395.472	.	.	2.597	.	.
	.080	402.265	.	.	2.605	.	.
	.090	408.544	.	.	2.611	.	.
	.100	414.410	.	.	2.617	.	.
	.150	439.609	.	.	2.643	.	.
	.200	460.724	.	.	2.663	.	.
	.250	479.645	.	.	2.681	.	.
	.300	497.298	.	.	2.697	.	.
	.350	514.236	.	.	2.711	.	.
	.400	530.842	.	.	2.725	.	.
	.450	547.418	.	.	2.738	.	.
	.500	564.237	.	.	2.751	.	.
	.550	581.572	.	.	2.765	.	.
	.600	599.733	.	.	2.778	.	.
	.650	619.099	.	.	2.792	.	.
	.700	640.185	.	.	2.806	.	.
	.750	663.747	.	.	2.822	.	.
	.800	691.007	.	.	2.839	.	.
	.850	724.197	.	.	2.860	.	.
	.900	768.232	.	.	2.885	.	.
	.910	779.263	.	.	2.892	.	.

.920	791.426	.	.	2.898	.	.
.930	805.020	.	.	2.906	.	.
.940	820.478	.	.	2.914	.	.
.950	838.471	.	.	2.923	.	.
.960	860.115	.	.	2.935	.	.
.970	887.491	.	.	2.948	.	.
.980	925.236	.	.	2.966	.	.
.990	988.012	.	.	2.995	.	.

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

Cell Counts and Residuals							
	Number	konsentrasi	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	1.699	10	1	1.955	-.955	.196
	2	2.398	10	3	1.958	1.042	.196
	3	2.699	10	4	4.432	-.432	.443
	4	2.875	10	9	9.046	-.046	.905
	5	3.000	10	10	9.930	.070	.993



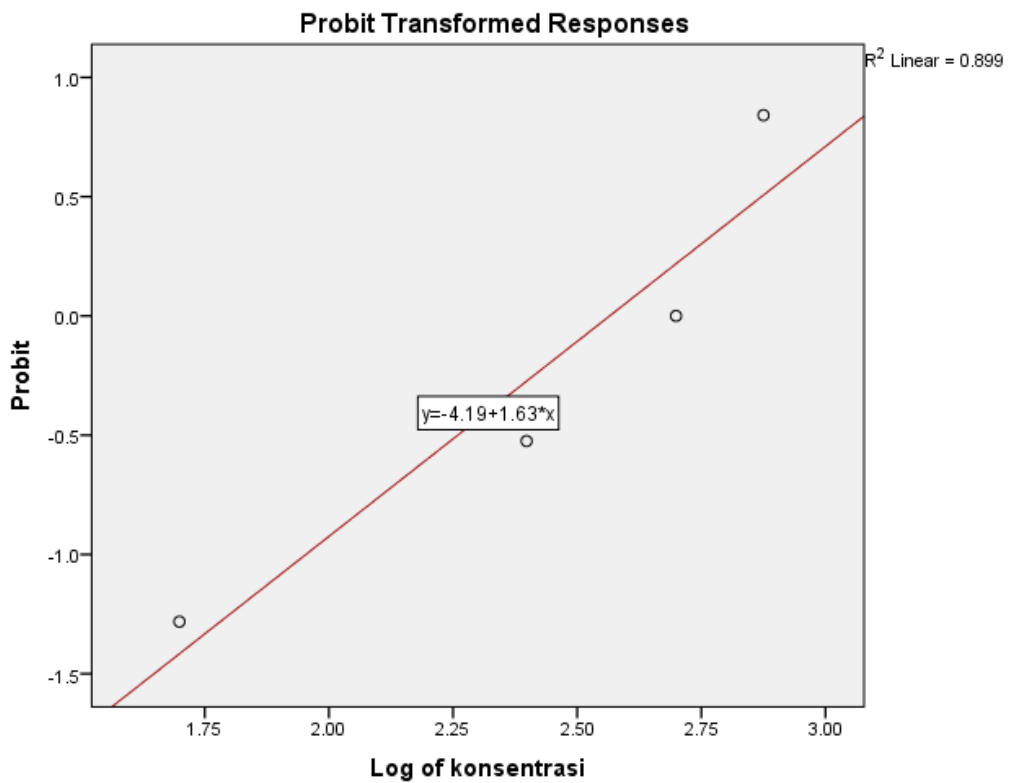
● **Ulangan 2**

Confidence Limits							
	Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^b		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	.010	265.552	.	.	2.424	.	.
	.020	290.062	.	.	2.462	.	.
	.030	306.773	.	.	2.487	.	.
	.040	319.975	.	.	2.505	.	.
	.050	331.133	.	.	2.520	.	.
	.060	340.935	.	.	2.533	.	.
	.070	349.768	.	.	2.544	.	.
	.080	357.871	.	.	2.554	.	.
	.090	365.404	.	.	2.563	.	.
	.100	372.478	.	.	2.571	.	.
	.150	403.251	.	.	2.606	.	.
	.200	429.513	.	.	2.633	.	.
	.250	453.402	.	.	2.656	.	.
	.300	475.985	.	.	2.678	.	.
	.350	497.914	.	.	2.697	.	.
	.400	519.657	.	.	2.716	.	.
	.450	541.596	.	.	2.734	.	.
	.500	564.092	.	.	2.751	.	.
	.550	587.522	.	.	2.769	.	.
	.600	612.326	.	.	2.787	.	.
	.650	639.065	.	.	2.806	.	.
	.700	668.508	.	.	2.825	.	.
	.750	701.805	.	.	2.846	.	.
	.800	740.838	.	.	2.870	.	.
	.850	789.085	.	.	2.897	.	.
	.900	854.278	.	.	2.932	.	.
	.910	870.816	.	.	2.940	.	.
	.920	889.145	.	.	2.949	.	.
	.930	909.744	.	.	2.959	.	.
	.940	933.314	.	.	2.970	.	.
	.950	960.943	.	.	2.983	.	.
	.960	994.450	.	.	2.998	.	.

.970	1037.248	.	.	3.016	.	.
.980	1097.005	.	.	3.040	.	.
.990	1198.256	.	.	3.079	.	.

a. A heterogeneity factor is used.
 b. Logarithm base = 10.

	Number	konsentrasi	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT 1	1	1.699	10	1	2.157	-1.157	.216
	2	2.398	10	3	2.204	.796	.220
	3	2.699	10	5	4.940	.060	.494
	4	2.875	10	8	8.513	-.513	.851
	5	3.000	10	10	9.698	.302	.970



● **Ulangan 3**

Confidence Limits							
	Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^b		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	.010	252.505	.	.	2.402	.	.
	.020	274.867	.	.	2.439	.	.
	.030	290.072	.	.	2.463	.	.
	.040	302.061	.	.	2.480	.	.
	.050	312.178	.	.	2.494	.	.
	.060	321.056	.	.	2.507	.	.
	.070	329.047	.	.	2.517	.	.
	.080	336.371	.	.	2.527	.	.
	.090	343.173	.	.	2.536	.	.
	.100	349.557	.	.	2.544	.	.
	.150	377.273	.	.	2.577	.	.
	.200	400.860	.	.	2.603	.	.
	.250	422.267	.	.	2.626	.	.
	.300	442.464	.	.	2.646	.	.
	.350	462.041	.	.	2.665	.	.
	.400	481.417	.	.	2.683	.	.
	.450	500.938	.	.	2.700	.	.
	.500	520.921	.	.	2.717	.	.
	.550	541.702	.	.	2.734	.	.
	.600	563.667	.	.	2.751	.	.
	.650	587.306	.	.	2.769	.	.
	.700	613.291	.	.	2.788	.	.
	.750	642.625	.	.	2.808	.	.
	.800	676.943	.	.	2.831	.	.
	.850	719.265	.	.	2.857	.	.
	.900	776.295	.	.	2.890	.	.
	.910	790.734	.	.	2.898	.	.
	.920	806.725	.	.	2.907	.	.
	.930	824.682	.	.	2.916	.	.
	.940	845.209	.	.	2.927	.	.
	.950	869.245	.	.	2.939	.	.
	.960	898.359	.	.	2.953	.	.

.970	935.490	.	.	2.971	.	.
.980	987.236	.	.	2.994	.	.
.990	1074.668	.	.	3.031	.	.

a. A heterogeneity factor is used.
b. Logarithm base = 10.

Cell Counts and Residuals							
	Number	konsentrasi	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	1.699	10	1	2.135	-1.135	.214
	2	2.398	10	3	2.208	.792	.221
	3	2.699	10	5	5.656	-.656	.566
	4	2.875	10	9	9.050	-.050	.905
	5	3.000	10	10	9.858	.142	.986

B. Maserasi

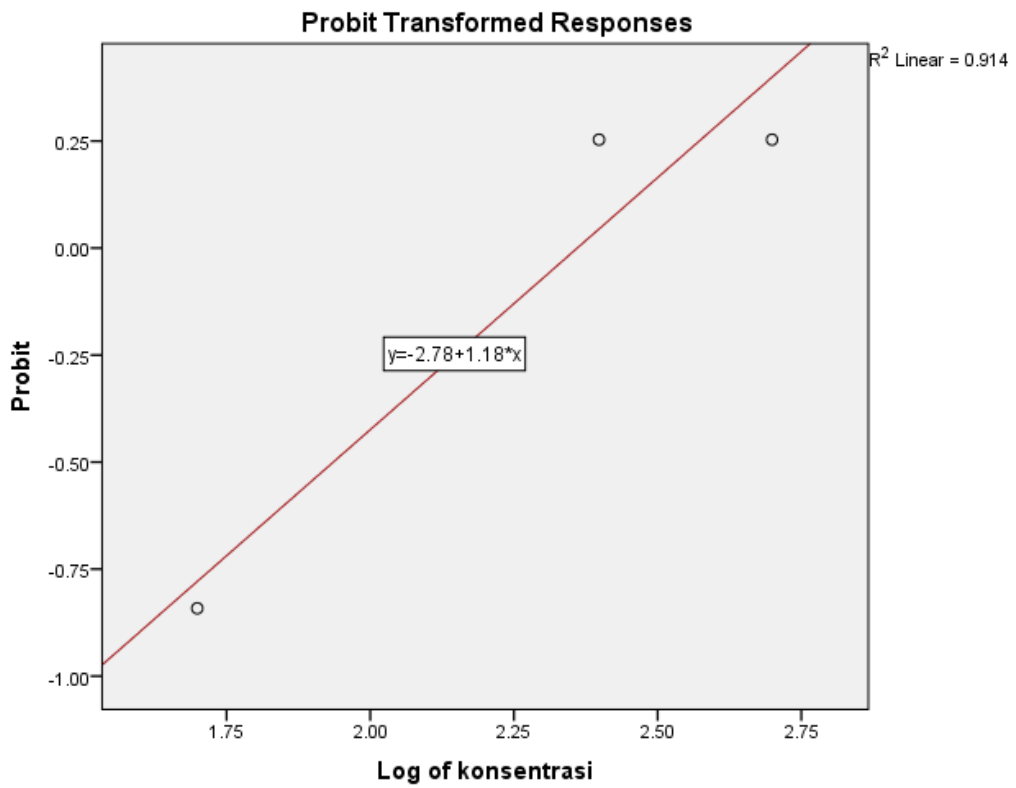
● Ulangan 1

	Confidence Limits						
	Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^b		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	.010	79.463	.	.	1.900	.	.
	.020	93.832	.	.	1.972	.	.
	.030	104.268	.	.	2.018	.	.
	.040	112.876	.	.	2.053	.	.
	.050	120.400	.	.	2.081	.	.
	.060	127.198	.	.	2.104	.	.
	.070	133.473	.	.	2.125	.	.
	.080	139.354	.	.	2.144	.	.
	.090	144.927	.	.	2.161	.	.
	.100	150.254	.	.	2.177	.	.
	.150	174.475	.	.	2.242	.	.
	.200	196.481	.	.	2.293	.	.
	.250	217.558	.	.	2.338	.	.
	.300	238.407	.	.	2.377	.	.
	.350	259.506	.	.	2.414	.	.
	.400	281.251	.	.	2.449	.	.
	.450	304.022	.	.	2.483	.	.
	.500	328.231	.	.	2.516	.	.
	.550	354.368	.	.	2.549	.	.
	.600	383.059	.	.	2.583	.	.
	.650	415.156	.	.	2.618	.	.
.700	451.897	.	.	2.655	.	.	
.750	495.203	.	.	2.695	.	.	
.800	548.326	.	.	2.739	.	.	
.850	617.483	.	.	2.791	.	.	
.900	717.021	.	.	2.856	.	.	
.910	743.376	.	.	2.871	.	.	
.920	773.107	.	.	2.888	.	.	
.930	807.172	.	.	2.907	.	.	
.940	846.994	.	.	2.928	.	.	
.950	894.815	.	.	2.952	.	.	

.960	954.460	.	.	2.980	.	.
.970	1033.260	.	.	3.014	.	.
.980	1148.175	.	.	3.060	.	.
.990	1355.787	.	.	3.132	.	.

a. A heterogeneity factor is used.
b. Logarithm base = 10.

	Number	konsentrasi	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	1.699	10	2	2.224	-.224	.222
	2	2.398	10	6	4.766	1.234	.477
	3	2.699	10	6	8.093	-2.093	.809
	4	2.875	10	10	9.318	.682	.932
	5	3.000	10	10	9.737	.263	.974



● **Ulangan 2**

Confidence Limits							
	Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^b		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	.010	100.223	.	.	2.001	.	.
	.020	117.646	.	.	2.071	.	.
	.030	130.240	.	.	2.115	.	.
	.040	140.594	.	.	2.148	.	.
	.050	149.621	.	.	2.175	.	.
	.060	157.759	.	.	2.198	.	.
	.070	165.258	.	.	2.218	.	.
	.080	172.275	.	.	2.236	.	.
	.090	178.914	.	.	2.253	.	.
	.100	185.252	.	.	2.268	.	.
	.150	213.971	.	.	2.330	.	.
	.200	239.940	.	.	2.380	.	.
	.250	264.716	.	.	2.423	.	.
	.300	289.139	.	.	2.461	.	.
	.350	313.777	.	.	2.497	.	.
	.400	339.095	.	.	2.530	.	.
	.450	365.533	.	.	2.563	.	.
	.500	393.564	.	.	2.595	.	.
	.550	423.744	.	.	2.627	.	.
	.600	456.782	.	.	2.660	.	.
	.650	493.639	.	.	2.693	.	.
	.700	535.703	.	.	2.729	.	.
	.750	585.127	.	.	2.767	.	.
	.800	645.548	.	.	2.810	.	.
	.850	723.894	.	.	2.860	.	.
	.900	836.117	.	.	2.922	.	.
	.910	865.735	.	.	2.937	.	.
	.920	899.101	.	.	2.954	.	.
	.930	937.276	.	.	2.972	.	.
	.940	981.829	.	.	2.992	.	.
	.950	1035.234	.	.	3.015	.	.

.960	1101.700	.	.	3.042	.	.
.970	1189.288	.	.	3.075	.	.
.980	1316.596	.	.	3.119	.	.
.990	1545.476	.	.	3.189	.	.

a. A heterogeneity factor is used.
 b. Logarithm base = 10.

Cell Counts and Residuals								
	Number	konsentrasi	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability	
PROBIT	1	1.699	10	2	2.281	-.281	.228	
	2	2.398	10	5	3.979	1.021	.398	
	3	2.699	10	6	7.360	-1.360	.736	
	4	2.875	10	9	8.947	.053	.895	
	5	3.000	10	10	9.565	.435	.956	



● **Ulangan 3**

Confidence Limits							
	Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi		95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^b			
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	.010	108.977	.	.	2.037	.	.
	.020	124.973	.	.	2.097	.	.
	.030	136.318	.	.	2.135	.	.
	.040	145.526	.	.	2.163	.	.
	.050	153.473	.	.	2.186	.	.
	.060	160.578	.	.	2.206	.	.
	.070	167.078	.	.	2.223	.	.
	.080	173.121	.	.	2.238	.	.
	.090	178.806	.	.	2.252	.	.
	.100	184.204	.	.	2.265	.	.
	.150	208.345	.	.	2.319	.	.
	.200	229.768	.	.	2.361	.	.
	.250	249.894	.	.	2.398	.	.
	.300	269.465	.	.	2.431	.	.
	.350	288.967	.	.	2.461	.	.
	.400	308.776	.	.	2.490	.	.
	.450	329.233	.	.	2.518	.	.
	.500	350.689	.	.	2.545	.	.
	.550	373.542	.	.	2.572	.	.
	.600	398.290	.	.	2.600	.	.
	.650	425.593	.	.	2.629	.	.
	.700	456.395	.	.	2.659	.	.
	.750	492.140	.	.	2.692	.	.
	.800	535.248	.	.	2.729	.	.
	.850	590.284	.	.	2.771	.	.
	.900	667.642	.	.	2.825	.	.
	.910	687.798	.	.	2.837	.	.
	.920	710.386	.	.	2.851	.	.
	.930	736.079	.	.	2.867	.	.
	.940	765.875	.	.	2.884	.	.
	.950	801.332	.	.	2.904	.	.

.960	845.092	.	.	2.927	.	.
.970	902.178	.	.	2.955	.	.
.980	984.078	.	.	2.993	.	.
.990	1128.516	.	.	3.053	.	.

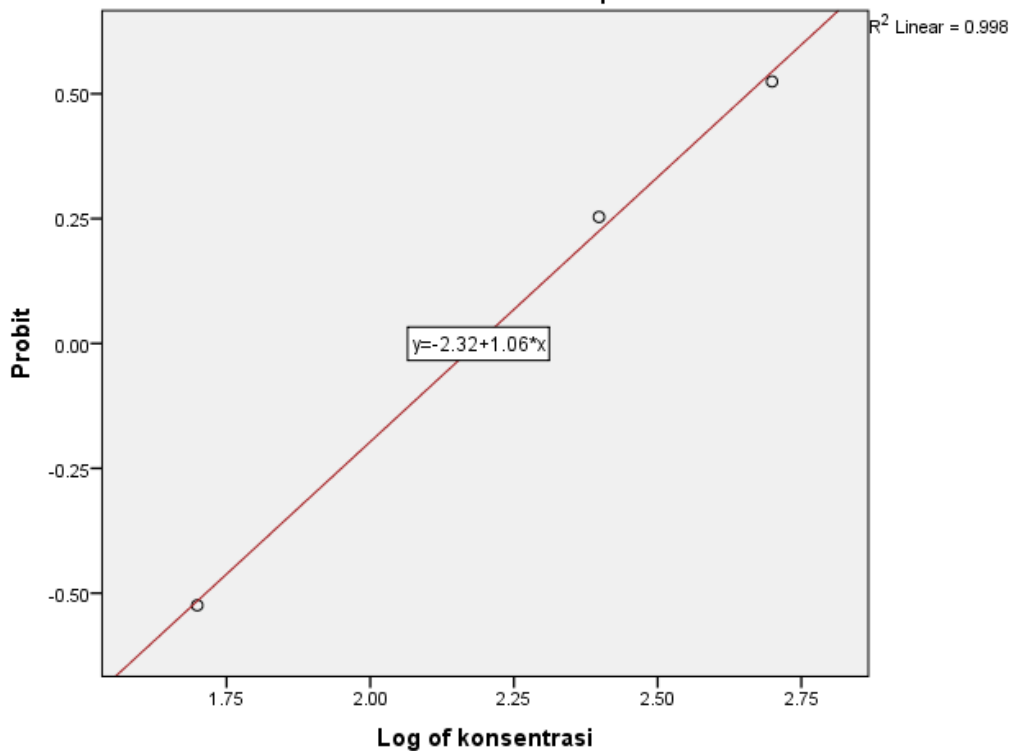
a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

Cell Counts and Residuals

	Number	konsentrasi	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT 1	1	1.699	10	3	3.330	-.330	.333
2	2	2.398	10	6	4.999	1.001	.500
3	3	2.699	10	7	8.399	-1.399	.840
4	4	2.875	10	10	9.566	.434	.957
5	5	3.000	10	10	9.877	.123	.988

Probit Transformed Responses



Lampiran 11. Hasil Uji FRAK (Faktorial Rancangan Acak Kelompok) terhadap Nilai LC₅₀

A. Tabel Anova

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: LC50					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	322882.946 ^a	9	35875.883	87.665	.000
Intercept	7523003.423	1	7523003.423	18383.022	.000
Ekstrak	168478.062	1	168478.062	411.689	.000
Waktu	143419.568	3	47806.523	116.819	.000
Ulangan	39.793	2	19.897	.049	.953
Ekstrak * Waktu	10945.522	3	3648.507	8.915	.001
Error	5729.311	14	409.236		
Total	7851615.680	24			
Corrected Total	328612.256	23			

a. R Squared = .983 (Adjusted R Squared = .971)

H₀ : Tidak ada perbedaan pengaruh antar faktor terhadap nilai LC₅₀

H₁ : Terdapat perbedaan pengaruh antar faktor terhadap nilai LC₅₀

Kesimpulan:

- Sig Ekstrak = 0.000 < 0.05 (Tolak H₀, Terima H₁) artinya terdapat perbedaan pengaruh yang nyata antar ekstrak terhadap nilai LC₅₀
- Sig Waktu = 0.000 < 0.05 (Tolak H₀, Terima H₁) artinya terdapat perbedaan pengaruh yang nyata antar waktu terhadap nilai LC₅₀
- Sig Ekstrak*Waktu = 0.001 < 0.05 (Tolak H₀, Terima H₁) artinya terdapat perbedaan pengaruh interaksi yang nyata antara ekstrak dan waktu terhadap nilai LC₅₀.

B. Uji Lanjut Duncan

Waktu

LC50					
Duncan ^{a,b}					
Waktu	N	Subset			
		1	2	3	4
96 jam	6	453.622333			
72 jam	6		536.586833		
48 jam	6			581.738167	
24 jam	6				667.547167
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 Based on observed means.
 The error term is Mean Square(Error) = 409.236.
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.
 b. Alpha = 0.05.

Keterangan:

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari tabel diatas, dapat diketahui bahwa pada waktu 96, 72, 48, dan 24 jam menunjukkan adanya pengaruh yang nyata terhadap nilai LC₅₀.

Lampiran 12. Hasil Analisis Malformasi terhadap Embrio Ikan Zebra hidup

waktu	Jumlah Total Embrio yang Mengalami Malformasi											
	Maserasi						Infusa					
	50 ppm	250 ppm	500 ppm	750 ppm	1000 ppm	Total	50 ppm	250 ppm	500 ppm	750 ppm	1000 ppm	total
24 Jam	4	7	9	6	0	26	0	5	10	17	11	43
48 Jam	4	13	11	5	0	33	2	13	13	14	4	46
72 Jam	6	12	9	2	0	29	4	12	8	7	0	31
96 Jam	6	10	9	1	0	26	4	11	8	4	0	27

Lampiran 13. Hasil Perbandingan Embrio Abnormal dan Embrio Hidup.

- Maserasi

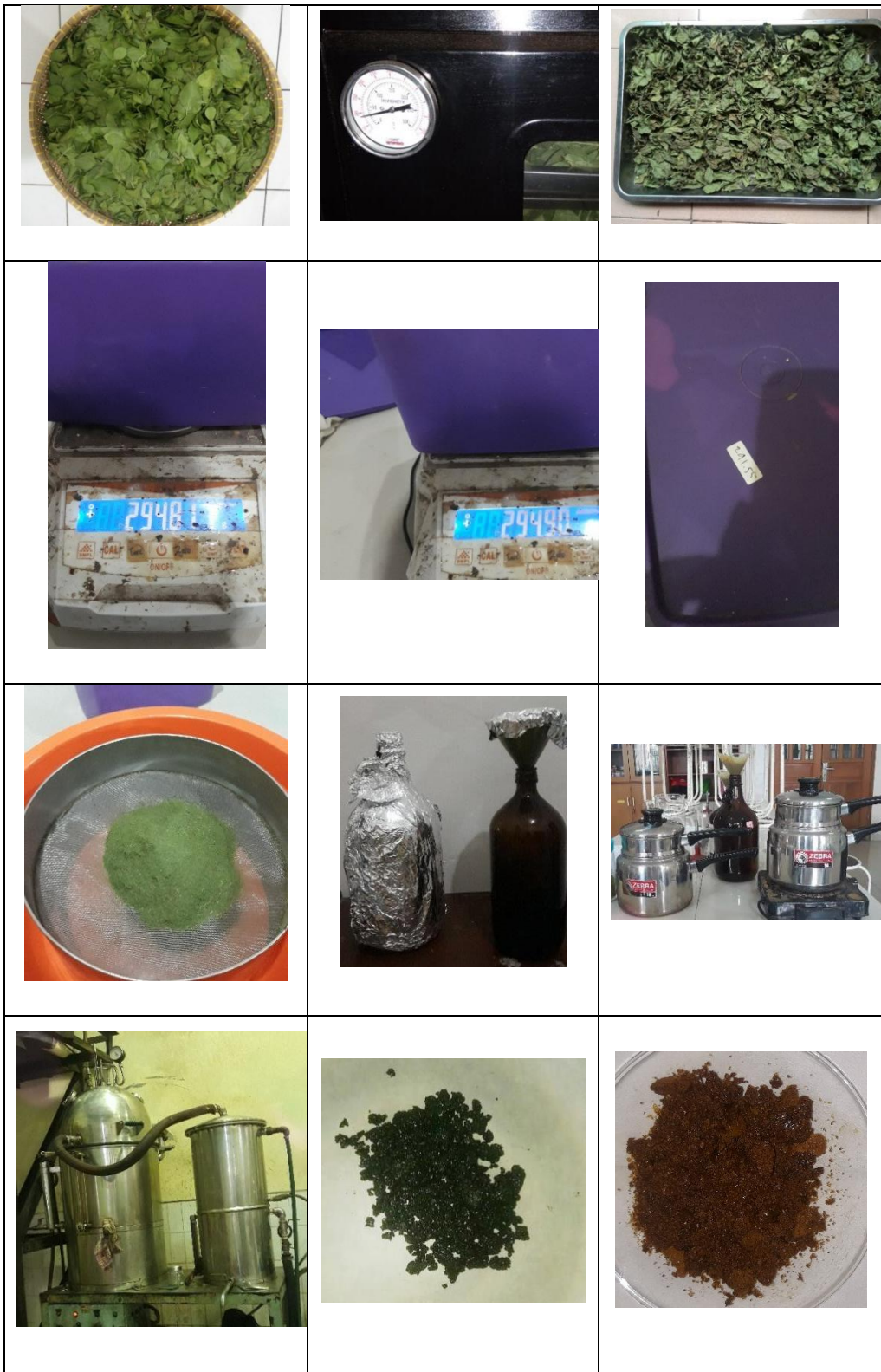
Waktu	50 ppm			250 ppm			500 ppm			750 ppm			1000 ppm		
	H	A	%	H	A	%	H	A	%	H	A	%	H	A	%
24 jam	26	4	15	23	7	30,43	16	9	56,25	7	6	85,1	0	0	0
48 jam	25	4	15	18	13	72,22	13	11	84,6	5	5	100	0	0	0
72 jam	23	6	26,09	16	12	75	11	9	81,81	2	2	100	0	0	0
96 jam	23	6	26,09	13	10	76,92	11	9	81,81	1	1	100	0	0	0

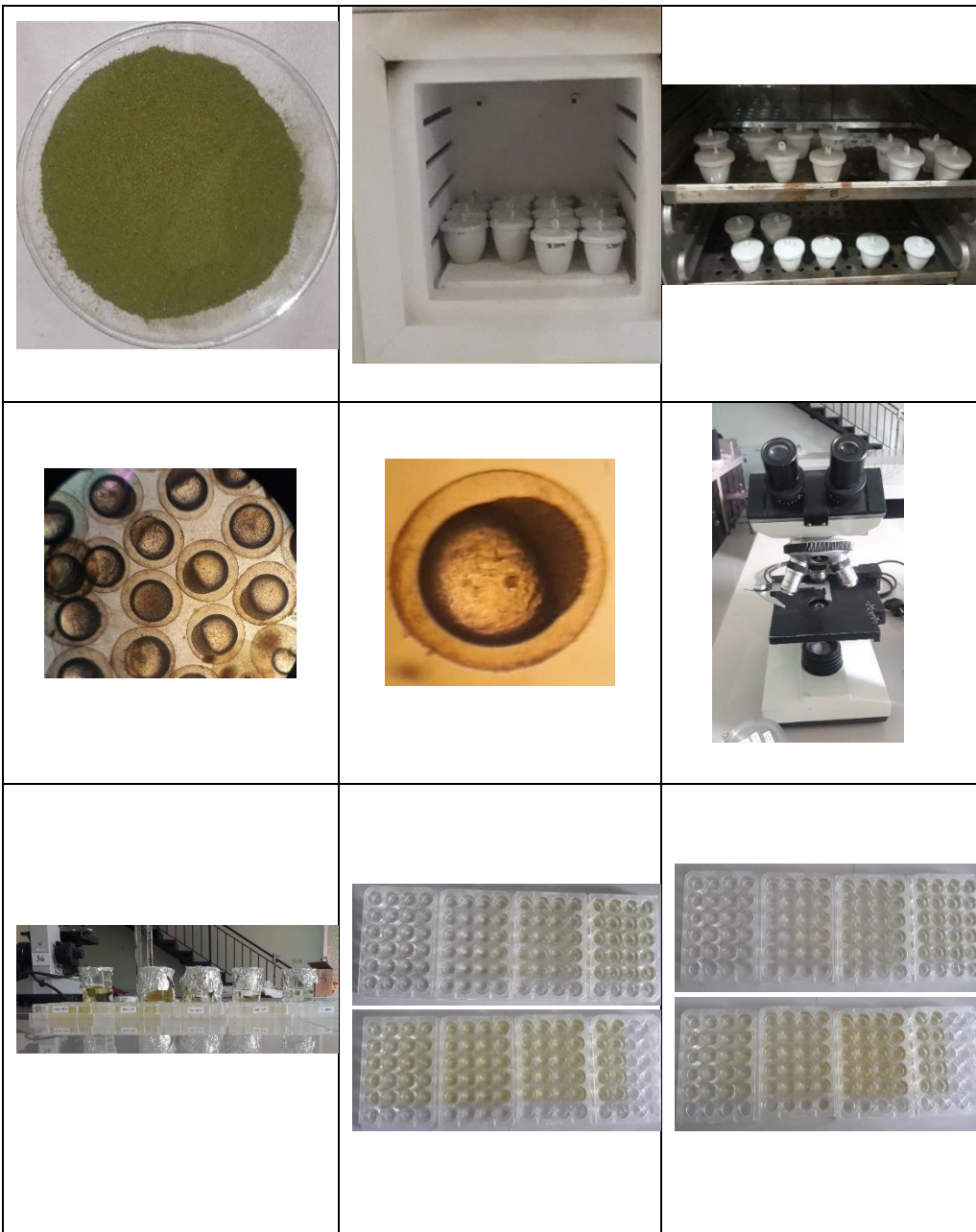
- Infusa
















Waktu	50 ppm			250 ppm			500 ppm			750 ppm			1000 ppm		
	H	A	%	H	A	%	H	A	%	H	A	%	H	A	%
24 jam	30	0	0	24	5	29,83	20	10	50	21	17	80,22	11	11	100
48 jam	28	2	7,14	22	13	59,09	19	13	68,42	14	14	100	4	4	100
72 jam	27	4	14,8	22	12	54,5	17	8	47,05	7	7	100	0	0	0
96 jam	27	4	14,8	21	11	52,3	16	8	50	4	4	100	0	0	0










Keterangan: (H) Hidup, (A) Abnormal, (%) Hasil presentase.

Lampiran 14. Dokumentasi





Identifikasi Senyawa	Parameter	Simplisia	Infundasi	Maserasi
Flavonoid	Merah-Ungu			
Alkaloid	↓ Coklat			
	Jingga-merah coklat			
	↓ Putih			
Tanin	↓ Putih			

	↓ Putih			
	Hijau biru - kehitaman			
Steroid	Hijau-Biru			
Triterpenoid	Merah- ungu			
Saponin	Hijau-Biru	