

**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK KULIT BUAH DAN SARI BUAH
DELIMA MERAH (*Punica granatum* L.) PADA EMBRIO IKAN ZEBRA
(*Danio rerio*)**

SKRIPSI

**Oleh:
ALFIA SELFIYANI
066120202**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PAKUAN
BOGOR
2025**

**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK KULIT BUAH DAN SARI BUAH
DELIMA MERAH (*Punica granatum* L.) PADA 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**

**Oleh:
ALFIA SELFIYANI
066120202**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PAKUAN
BOGOR
2025**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Buah Dan Sari
Buah Delima Merah (*Punica granatum L.*) Pada
Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*)

Nama : Alfia Selfiyani

NPM : 066120202

Program Studi : Farmasi

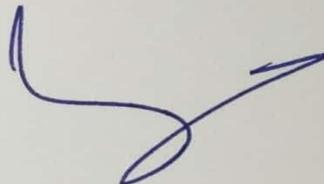
Hasil Penelitian ini telah disetujui dan disahkan
Bogor, Januari 2025

Pembimbing Pendamping



Marybet Tri Retno H., M.Farm.

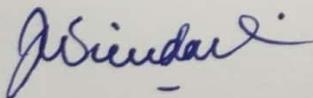
Pembimbing Utama



Dr. apt. Lusi Agus Setiani, M.Farm.

Mengetahui

Ketua Program Studi Farmasi



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

Dekan EMIPA - 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 dikemudian hari terdapat gugatan, Penulis bersedia dikenakan sanksi sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Bogor, Januari 2025



Alfia Selfiyani

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

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Alfia Selfiyani
NPM : 066120202
Judul Tugas Akhir : Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Buah Dan Sari
Buah Delima Merah (*Punica granatum* L.) Pada
Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*)

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

Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun yang tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka dibagian akhir pada skripsi ini.

Demikian pernyataan yang saya buat dengan sebenar-benarnya. Apabila di kemudian hari terdapat gugatan, saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan peraturan yang berlaku. Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Universitas Pakuan.

Bogor, Januari 2025



Alfia Selfiyani

HALAMAN PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama-mu Ya Allah. Alhamdulillahirabbil'alamin, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, karunia, hidayah dan inayyah-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan penuh kerendahan hati dan kesabaran serta penulis berharap semoga karya ini dapat bermanfaat. Keberhasilan dalam penulisan skripsi ini tentunya tidak terlepas dari berbagai bantuan pihak lainnya. Oleh karena itu penulis mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya dan mempersembahkan skripsi ini kepada:

1. Kedua orang tua terbaik penulis yaitu ayahanda Ali Sunar dan ibunda Suherni. Terimakasih telah senantiasa melimpahkan kasih sayang, cinta dan motivasi serta dukungan moril maupun materil yang tak terhingga serta do'a yang tiada hentinya dari awal perjalanan panjang penulis sampai proses penyusunan skripsi ini selesai. Terimakasih atas semua perjuangan dan pengorbanan yang diberikan selama ini dan semoga rahmat Allah SWT selalu mengiringi setiap langkah kehidupanmu yang barokah.
2. Adik dan keluarga tercinta yang selalu menjadi motivasi penulis untuk menjalani hidup yang lebih baik dan menjadi pengingat untuk selalu semangat dalam menempuh pendidikan ini agar kelak dapat membahagiakan kalian.
3. Ibu dosen pembimbing, ibu Dr. apt. Lusi Agus Setiani, M.Farm dan ibu Marybet Tri Retno H., M.Farm yang tulus memberikan bimbingan, ilmu, arahan, kesabaran, kemudahan serta dukungan selama proses penyusunan skripsi ini. Semoga ilmu yang diberikan menjadi amal jariyah dan bermanfaat bagi banyak orang.
4. Sahabat dan saudara terbaik. Sofiyanti yang selalu bersama dan mendengar keluh kesah setiap harinya selama perjalanan menempuh dibangku perkuliahan ini. Terima kasih sudah selalu peduli, mengerti keadaan dan menghiburku. Semoga persahabatan ini selalu terjalin sampai kapanpun dan semoga kamu selalu berada dalam lindungan Allah SWT.

5. Sahabat seperjuangan ku. Sofi, caca, uti, dila dan teman- teman lainnya. Terima kasih sudah selalu membantu, menemani, memberi masukan serta dukungan dari awal perkuliahan hingga selesainya skripsi ini. Terimakasih atas canda tawa kalian yang sangat membahagiakan dan moment yang telah kalian berikan selama ini. Tanpa adanya kalian perjalanan panjang ini tidak akan menyenangkan dan seberwarna ini. Semoga kita akan selalu mengenal sampai kapanpun.
6. Tim zebrafish. Sofi dan dinda, terima kasih sudah membantu, menyakinkan penulis bahwa penulis pasti bisa menyelesaikan permasalahan yang sedang terjadi, selalu ada dalam proses penyusunan skripsi ini sampai selesai.
7. Kepada diri sendiri. Terimakasih telah bertahan sampai saat ini, setiap langkah kecil yang telah diambil adalah bagian dari perjalanan. Perjalanan menuju impian bukanlah perlombaan, tetapi seperti maraton yang membutuhkan ketekunan, kesabaran dan tekad yang kuat. Apapun pilihan yang telah dipegang terimakasih sudah berjuang sejauh ini, tetap memilih berusaha sampai titik ini, tetap menjadi diri sendiri yang selalu mau berusaha dan tidak lelah untuk selalu mencoba. Berbahagialah selalu apapun kekurangan dan kelebihanmu mari tetap berjuang untuk kedepannya. Perjalananmu masih panjang.

DAFTAR RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan pada 19 April 2002 di Pandeglang, Banten yang merupakan putri pertama dari pasangan Bapak Ali Sunar dan Ibu Suherni. Penulis memulai pendidikan formalnya pada tahun 2006 di TK Aisyiyah dan lulus pada tahun 2008. Penulis kemudian melanjutkan pendidikan sekolah dasar di SD Purwaraja 2 dan lulus pada tahun 2014, lalu melanjutkan sekolah menengah pertama di Pondok Pesantren Modern Al-Mizan 2 Putri sampai tahun 2017 dan sekolah menengah akhir di SMAN 4 Pandeglang sampai tahun 2020. Pada tahun yang sama yaitu tahun 2020, penulis melanjutkan pendidikan tingkat sarjana S1 di Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan Bogor dan dinyatakan lulus pada tahun 2024. Penulis melakukan penelitian sebagai salah satu syarat tugas akhir yang berjudul “Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Buah Dan Sari Buah Delima Merah (*Punica granatum* L.) Pada Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*)” untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi (S. Farm).

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji serta syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT. Yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan dan menyusun skripsi ini dengan judul **“Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Buah Dan Sari Buah Delima Merah (*Punica granatum L.*) Pada Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*)”**. Laporan ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Farmasi dari Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan. Selama melakukan penelitian dan penulisan tugas akhir ini, penulis banyak memperoleh bimbingan, bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Sehubungan dengan hal tersebut, penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Ibu Dr. apt. Lusi Agus Setiani, M.Farm sebagai Pembimbing I dan Ibu Marybet Tri Retno H., M.Farm sebagai Pembimbing II.
2. Bapak Asep Denih, S.Kom., M.Sc., Ph.D. sebagai Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Ibu apt. Dra. Ike Yulia Wiendarlina, M.Farm. sebagai Ketua Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan.
3. Seluruh staf dosen dan karyawan di lingkungan Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan.
4. Kedua orang tua dan adik tercinta yang senantiasa mendukung dan mendoakan
5. Teman-teman yang senantiasa turut membantu dan mendukung.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari kata sempurna, namun penulis berharap karya ini dapat memberi manfaat bagi semua pihak.

Bogor, Januari 2025

Alfia Selfiyani

RINGKASAN

ALFIA SELFIYANI. 066120202. 2025. **UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK KULIT BUAH DAN SARI BUAH DELIMA MERAH (*Punica granatum L*) PADA EMBRIO IKAN ZEBRA (*Danio rerio*)**. Dibawah Bimbingan: Lusi Agus Setiani dan Marybet Tri Retno H

Buah delima merah (*Punica granatum L*) merupakan salah satu sumber daya alam hayati yang seluruh bagian tanamannya dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Buah delima sering digunakan sebagai bahan yang memiliki efek terapi seperti antidiabetes, antihiperlipidemia dan dapat menurunkan intima-media karotis. Pengujian toksisitas sangat penting dilakukan, untuk memastikan keamanan penggunaan obat tradisional dengan tujuan mengidentifikasi efek toksik suatu zat uji.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kategori toksisitas ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah (*Punica granatum L*) dengan metode ZFET (*Zebrafish Embryo Acute Toxicity*) serta mengamati kelainan pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*) setelah paparan ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah (*Punica granatum L*). Pada penelitian hewan coba yang digunakan sebanyak 10 embrio dengan 3 kali pengulangan setiap larutan uji. Larutan uji yang digunakan terdiri dari kontrol internal (*egg-water*), kontrol uji yaitu ekstrak kulit buah delima merah dan sari buah delima merah dengan masing-masing 5 konsentrasi. Pengamatan dilakukan pada jam ke-24, 48, 72 dan 96.

Hasil Penelitian didapatkan nilai LC_{50} pada ekstrak kulit buah delima merah pada jam ke-96 dan sari buah delima merah pada jam ke-96 termasuk dalam kategori *practically non-toxic* yaitu pada rentang 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai LC_{50} berturut-turut sebesar 548,0628 ppm dan 569,0161 ppm. Kelainan yang timbul pada embrio ikan zebra setelah paparan ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah (*Punica granatum L*) selama 96 jam yaitu edema kantung kuning telur (*yolk*), kelainan pada tulang belakang serta ekor.

Kata Kunci: Ekstrak Kulit Buah Delima Merah, Sari Buah Delima Merah, ZFET, Toksisitas Akut, Nilai LC_{50} .

SUMMARY

ALFIA SELFIYANI. 066120202. 2025. **ACUTE TOXICITY TEST OF RED POMEGRANATE (*Punica granatum* L) FRUIT PEEL EXTRACT AND FRUIT JUICE ON ZEBRAFISH EMBRYOS (*Danio rerio*).** Under The Guidance Of: Lusi Agus Setiani dan Marybet Tri Retno H

Red pomegranate (*Punica granatum* L) is one of the biological natural resources whose entire plant part is utilized as traditional medicine. Pomegranate is often used as an ingredient that has therapeutic effects such as antidiabetes, antihyperlipidemia and reducing carotid intima-media. Toxicity testing is very important, to ensure the safety of using traditional medicine with the aim of identifying the toxic effects of a test substance.

This study aims to determine the toxicity category of fruit peel extract and red pomegranate juice (*Punica granatum* L) with the ZFET (Zebrafish Embryo Acute Toxicity) method and observe abnormalities in zebrafish embryos (*Danio rerio*) after exposure to fruit peel extract and red pomegranate juice (*Punica granatum* L). In this study, the experimental animals used were 10 embryos with 3 repetitions for each test solution. The test solution used consists of internal control (egg water), test control, namely red pomegranate peel extract and red pomegranate juice with 5 concentrations each. Observations were made at hours 24, 48, 72 and 96.

The results showed that the LC₅₀ value of red pomegranate peel extract at the 96th hour and red pomegranate juice at the 96th hour were included in the practically non-toxic category in the range of 100-1000 µg/mL with LC₅₀ values of 548,0628 ppm and 569,0161 ppm. Abnormalities that arise in zebrafish embryos after exposure to fruit peel extract and red pomegranate juice (*Punica granatum* L) for 96 hours are edema of the yolk sac, abnormalities in the spine and tail.

Keywords: Red Pomegranate Peel Extract, Red Pomegranate Juice, ZFET, Acute Toxicity, LC₅₀ Value.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN KARYA TULIS	iv
SURAT PELIMPAHAN SKRIPSI	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	viii
KATA PENGANTAR	ix
RINGKASAN	x
SUMMARY	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR RUMUS	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan.....	3
1.3 Hipotesis	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tanaman Delima Merah (<i>Punica granatum</i> L.).....	4
2.1.1 Kandungan Senyawa.....	5
2.1.2 Manfaat	5
2.2 Ekstraksi	6
2.2.1 Maserasi	6
2.2.2 Pelarut	6

2.3 Uji Toksisitas.....	7
2.4 <i>Median Lethal Concentration</i>	8
2.5 Ikan Zebra.....	9
2.5.1 Deskripsi Ikan Zebra.....	9
2.5.2 Tahap Perkembangan Embrio Ikan Zebra.....	10
BAB III METODE PENELITIAN	12
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	12
3.2 Alat Dan Bahan	12
3.2.1 Alat.....	12
3.2.2 Bahan	12
3.3 Metode Penelitian.....	12
3.3.1 Kaji Etik	12
3.3.2 Pengumpulan Bahan Baku dan Determinasi Tanaman.....	13
3.3.3 PembuatanSimplisia.....	13
3.3.3.1 Pembuatan Serbuk Simplisia Kulit Delima Merah ..	13
3.3.3.2 Pembuatan Perasan Sari Buah Delima Merah.....	13
3.3.4 Pembuatan Ekstrak.....	13
3.3.4.1 Pembuatan Ekstrak Kulit Delima Merah.....	13
3.3.4.2 Pembuatan Sari Buah Delima Merah	14
3.3.5 Uji Karakteristik.....	14
3.3.6 Uji Fitokimia	15
3.3.7 Pengujian Toksisitas Akut.....	16
3.3.7.1 Pembuatan Larutan Kontrol	17
3.3.7.2 Penyeleksian Embrio Ikan Zebra	17
3.3.7.3 Pengujian Toksisitas Akut Pada Embrio Ikan Zebra	18
3.3.8 Analisis Data	19
BAB VI HASIL DAN PEMBAHASAN	20
4.1 Hasil Determinasi Tanaman Buah Delima Merah.....	20
4.2 Hasil Kaji Etik	20

4.3 Hasil Pembuatan Simplisia, Ekstrak Kulit Buah Dan Sari Buah Delima Merah.....	20
4.4 Hasil Uji Karakteristik.....	22
4.4.1 Penetapan Kadar Air	22
4.4.2 Penetapan Kadar Abu.....	23
4.5 Hasil Uji Fitokimia.....	24
4.6 Hasil Uji Toksisitas Akut	27
4.6.1 Hasil Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Buah	28
4.6.2 Hasil Uji Toksisitas Akut Sari Buah.....	31
4.7 Hasil Kelainan Pada Embrio Ikan Zebra	33
4.7.1 Kelainan Setelah Paparan Ekstrak Kulit Buah.....	33
4.7.2 Kelainan Setelah Paparan Sari Buah.....	36
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	39
5.1 Kesimpulan.....	39
5.2 Saran.....	39
DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN.....	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Buah Delima Merah (<i>Punica granatum</i> L)	4
2. Ikan Zebra	9
3. Perkembangan Normal Embrio Ikan Zebra	11
4. Morfologi Embrio Ikan Zebra Normal.....	18
5. Parameter Kematian Embrio Ikan Zebra.....	18
6. Serbuk Simplisia Kulit dan Sari buah Delima Merah.....	21
7. Embrio Ikan Zebra Usia 8 Jam Dengan Perbesaran 4×0.10	28
8. Kematian Embrio Ikan Zebra Setelah Paparan Ekstrak.....	28
9. Kematian Embrio Ikan Setelah Paparan Sari.....	31
10. Kelainan Embrio Ikan Zebra Setelah Paparan Ekstrak	34
11. Kelainan Embrio Ikan Zebra Setelah Paparan Sari.....	37

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kategori Tingkat Toksisitas <i>Fish and Wildlife Service</i>	8
2. Hasil Penetapan Kadar Air.....	23
3. Hasil Penetapan Kadar Abu	24
4. Hasil Uji Fitokimia.....	25
5. Persentase Kematian Embrio Ikan Zebra Pada Ekstrak.....	29
6. Hasil Nilai LC ₅₀ Ekstrak Kulit Buah Delima Merah	30
7. Persentase Kematian Embrio Ikan Zebra Pada Sari.....	32
8. Hasil Nilai LC ₅₀ Sari Buah Delima Merah	33

DAFTAR RUMUS

Rumus	Halaman
1. Rendemen Simplisia.....	13
2. Rendemen Ekstrak	14
3. Kadar Air.....	14
4. Kadar Abu	15

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Alur Penelitian.....	48
2. Surat Determinasi.....	49
3. Surat Kaji Etik.....	50
4. Perhitungan Rendemen Serbuk Simplisia dan Ekstrak.....	51
5. Hasil dan Perhitungan Kadar Air Simplisia dan Ekstrak.....	52
6. Hasil dan Perhitungan Kadar Abu Simplisia dan Ekstrak.....	53
7. Dokumentasi Pembuatan simplisia Dan Ekstrak.....	54
8. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kulit Dan Sari Buah Delima Merah.....	55
9. Perhitungan Pembuatan dan Pengenceran Larutan Uji.....	57
10. Tabel Probit.....	59
11. Perhitungan nilai LC_{50}	60
12. Hasil Nilai LC_{50}	81
13. Hasil Analisis Nilai LC_{50}	82
14. Dokumentasi Uji Toksisitas.....	86
15. Dokumentasi Kelainan Embrio Ikan Zebra.....	87

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Buah delima merah (*Punica granatum L.*) merupakan salah satu sumber daya alam hayati di Indonesia yang banyak dimanfaatkan untuk obat tradisional yang dimana bagian seluruh tanamannya dapat digunakan sebagai obat (Jumiarni & Komalasari, 2017) dan (Muthmainnah, 2017). Pada umumnya buah delima dikonsumsi segar secara langsung dan diolah sebagai jus yang dikenal sebagai sari buah sehat (Harling, 2018). Buah delima memiliki kandungan senyawa kimia yang bervariasi pada setiap bagiannya, pada kulit buah delima mengandung flavonoid, asam fenolat, tannin, antosianin, asam elagat, kuersetin, asam galat, katekin dan vitamin C yang manfaatnya sebagai antioksidan (Wijanti dkk., 2023). Biji dan daging buahnya mengandung flavonoid dan tanin (*punicalagin*, *ellagitannin* dan *gallotannin*) (Firnanda dkk., 2021). Selain flavonoid dan tanin, pada sari buah delima juga mengandung senyawa alkaloid sebagai antibakteri dan kuersetin sebagai antidiabetes (Mansur dkk., 2022).

Aktivitas farmakologi dari buah delima yaitu sebagai antibiotik, antikanker, antidiabetes dan digunakan juga untuk pengobatan aterosklerosis (Insanu dkk., 2017). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Eghbali *et al.*, (2021) jus buah delima dapat menurunkan perkembangan ketebalan intima-media karotis (CIMT) pada pasien dengan penyakit jantung koroner dengan pemberian 240 mL/hari selama 18 bulan. Penelitian yang dilakukan oleh (Priangani Roswiem, 2017) melaporkan bahwa jus buah delima dengan dosis 500 mg/kgbb dapat menurunkan peroksidasi lipid serum tikus yang diinduksi parasetamol sebesar 54,80%. Penelitian lain yang dilakukan oleh El-Hadary & Ramadan, (2019) melaporkan bahwa pemberian ekstrak kulit buah delima dosis 200 mg/kgbb pada tikus putih jantan wistar dapat menurunkan kadar glukosa dan kadar lemak dalam darah. Ekstrak kulit buah delima efektif terhadap penyembuhan luka mukosa pada konsentrasi 0,5%, 1% dan 2,5% terhadap tikus

putih (Kurniawan dkk., 2018) dan ekstrak etanol kulit buah delima (*Punica granatum* L.) juga memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} berturut-turut yaitu 12,51 dan 10,91 ppm (Wijanti dkk., 2023). Aktivitas farmakologi yang baik didapatkan dari penarikan senyawa metabolit sekunder pada tanaman delima. Penarikan senyawa dapat dilakukan dengan ekstraksi maserasi. Maserasi digunakan karena dapat menghindari resiko rusaknya senyawa-senyawa yang terkandung dalam tanaman yang memiliki sifat termolabil (Badaring dkk., 2020). Pada proses ekstraksi dipengaruhi oleh pelarut yang digunakan, dipilih etanol 96% sebagai pelarut karena bersifat selektif, tidak toksik, penyerapannya baik dan mampu menyari senyawa yang bersifat non-polar, semi polar dan polar, serta mudah berpenetrasi ke dalam dinding sel (Wendersteyt dkk., 2021).

Pengujian toksisitas sangat penting dilakukan, untuk memastikan keamanan penggunaan obat tradisional dengan tujuan mengidentifikasi efek toksik suatu zat dari sediaan uji dan (BPOM RI, 2022) untuk mengetahui batas aman pada konsumsi obat tradisional (Nurul dkk., 2023). Pengujian toksisitas dapat dilakukan dengan menggunakan embrio ikan zebra. Hal tersebut dikarenakan memiliki sensitivitas yang lebih baik karena memiliki kesamaan genetik dengan manusia 70-85% dan didapatkan melalui proses *breeding* sehingga memudahkan peneliti mengamati morfologi (Wijaya, 2020). Selain itu embrio ikan zebra mudah dalam pemeliharaan dan mampu menghasilkan sel telur yang banyak dengan jangka waktu singkat (Basu & Sachidanandan, 2013) serta mudah dalam pengamatan karena memiliki tubuh yang transparan (Paramita dkk., 2021).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Firnanda dkk., (2021) ekstrak buah delima putih (*Punica granatum* L.) memiliki nilai LC_{50} sebesar 248,6 $\mu\text{g/mL}$ terhadap larva *Artemia salina* sebagai kandidat obat antikanker dengan metode uji *Brine Shrimp Lethality Test* yang tergolong ke dalam kategori tingkat toksisitas sedang pada keseluruhan bagian buah. Akan tetapi dalam pengujian tidak dilakukan pengamatan pada masing-masing bagian buah serta pengamatan pada morfologi dan fisiologi hewan uji, maka perlu dilakukan pengujian lebih lanjut dengan menggunakan bagian kulit buah dan sari buah delima merah (*Punica granatum* L.). Selain itu diperlukan juga hewan uji yang lebih spesifik seperti

embrio ikan zebra dengan menggunakan metode ZFET (*Zebrafish Embryo Acute Toxicity*) karena terdapat parameter kematian yang terjadi pada embrio ikan zebra yaitu seperti koagulasi embrio, pembentukan somit, pelepasan *tail-bud* dari *yolk* dan detak jantung (OECD, 2013). Berdasarkan uraian di atas maka dilakukan penelitian toksisitas akut pada ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah terhadap embrio ikan zebra dengan metode *Zebrafish Embryo Acute Toxicity* (ZFET).

1.2 Tujuan

1. Menentukan kategori toksisitas ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah (*Punica granatum* L.) dengan metode *Zebrafish Embryo Acute Toxicity* (ZFET).
2. Mengamati kelainan yang terjadi pada embrio ikan zebra setelah paparan ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah (*Punica granatum* L.).

1.3 Hipotesis

1. Terdapat kategori toksisitas dari ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah (*Punica granatum* L.) terhadap embrio ikan zebra (*Danio rerio*).
2. Terdapat kelainan yang terjadi pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*) setelah paparan ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah (*Punica granatum* L.)

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Delima Merah (*Punica granatum* L.)

Delima atau disebut *Punica granatum* L. adalah pohon atau perdu yang tingginya bisa mencapai 2-5 meter, batangnya memiliki cabang berduri yang tidak beraturan, berwarna coklat ketika muda dan berwarna hijau setelah tua (V. Andriani, 2016). Daun tunggal, bertangkai pendek, letaknya berkelopak, helaian daun berbentuk lonjong sampai lanset dengan pangkal lancip, ujung tumpul, tepi rata, pertulangan menyirip yang permukaannya mengkilap dan berwarna hijau (Hardana & Warganegara, 2015). Bunga berwarna merah atau merah muda berdiameter 3 cm dan memiliki 4-5 kelopak. Buahnya berbentuk heksagonal bulat dengan diameter 5-12 cm dan berat 200 g. Memiliki kulit yang tebal yang mengelilingi sekitar 600 aril yang merangkum benih (Zarfeshany *et al.*, 2014).

Di Indonesia umumnya delima diklasifikasikan menjadi delima merah, delima hijau dan delima hitam yang dimana delima merah memiliki rasa lebih manis dan kandungan flavonoidnya lebih tinggi dari pada delima hijau (Khairudin & Wahyu Saputro, 2022). Menurut (Putri Febriati dkk., 2022) tanaman delima dapat diklasifikasikan ke dalam famili *Lythraceae*, genus *Punica*, spesies *P. granatum* dan nama binomial: *Punica granatum* L. Gambar buah delima merah (*Punica granatum* L) dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Buah Delima Merah (*Punica granatum* L)

2.1.1 Kandungan Senyawa

Buah delima merah memiliki beragam kandungan senyawa pada setiap bagian-bagiannya, yaitu terdiri dari kulit buah dan buah. Kulit buah delima memiliki kandungan antioksidan tertinggi yaitu sekitar 92% dari total antioksidan yang terdapat pada buah karena mengandung flavonoid (antosianin, katekin dan jenis flavonoid lain), dan tanin yang terkenal secara luas yaitu sebagai anti peradangan, diare, batuk dan infertilitas (Novera dkk., 2019). Biji dan daging buahnya mengandung flavonoid dan tanin (*punicalagin, ellagitannin dan gallotannin*) (Firnanda dkk., 2021). Sari buah delima juga mengandung senyawa alkaloid sebagai antibakteri, *ellagic, gallic, oleanolic, ursolic, gallic acids* dan kuersetin sebagai antidiabetes (Mansur dkk., 2022), serta sari buahnya tinggi akan kandungan ion kalium (potassium), vitamin A, C dan E (Harling, 2018).

Polifenol dan flavonoid merupakan senyawa yang dimiliki oleh delima yang bermanfaat bagi kesehatan tubuh. Salah satunya memiliki sifat antioksidan yang dimana senyawa tersebut mampu menangkap radikal bebas yang dapat memicu terjadinya kanker dan penyakit lainnya seperti jantung, tulang dan kesehatan organ lainnya secara keseluruhan (Khairudin & Wahyu Saputro, 2022). Kandungan polifenol dalam ekstrak etanol delima sangat tinggi khususnya flavonoid yang memiliki aktivitas dapat menurunkan resiko penyakit kronis, salah satunya sel kanker dengan target menghambat proses karsinogenesis (Kholifa, 2015).

2.1.2 Manfaat

Delima merah berpotensi sebagai anti pembengkakan, antibakteri, antimutagen dan dapat menghambat pertumbuhan tumor. Adapun khasiat lain dari buah delima yaitu sebagai antikanker karena memiliki kandungan antioksidan yang tinggi, penyakit kardiovaskular, antidiabetes, infeksi bakteri dan resisten terhadap antibiotic, memperbaiki kerusakan kulit akibat paparan sinar ultraviolet, Alzheimer, obesitas dan antiplasmodial (Harling, 2018). Menurut Wahid, (2020) ekstrak kulit buah delima mengandung senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan, antibakteri dan antifungi.

2.2 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan senyawa dengan menggunakan pelarut yang sesuai dengan tujuan memisahkan senyawa dari campurannya. Metode pemisahan ekstraksi ini menggunakan prinsip kelarutan “*like dissolve like*” yaitu suatu pelarut polar akan melarutkan senyawa yang bersifat polar dan pelarut non polar akan melarutkan senyawa yang bersifat non polar (Syamsul dkk., 2020). Menurut Miradita Lestari dkk., (2020) hasil ekstraksi dapat dipengaruhi oleh jenis pelarut, metode ekstraksi dan lama ekstraksi yang dimana apabila terlalu lama dan terlalu singkat waktu ekstraksi dapat mempengaruhi komponen bahan yang terekstrak. Metode ekstraksi dibagi menjadi dua kategori yaitu metode konvensional dan non konvensional. Pada metode konvensional dibagi menjadi 2 yaitu metode ekstraksi cara dingin dan metode cara panas, metode yang dapat digunakan yaitu maserasi, perkolasi, refluks, soxhletasi, infusa, dekokta dan destilasi, sedangkan pada kategori non konvensional metode yang dapat digunakan yaitu *microwave assisted extraction* (MAE) dan *ultrasound assisted extraction* (UAE) (Sari dkk., 2020).

2.2.1 Maserasi

Metode ekstraksi maserasi atau ekstraksi cara dingin merupakan proses ekstraksi dengan cara perendaman simplisia dalam wadah dengan menggunakan pelarut yang sesuai dan sesekali dilakukan pengocokan atau pengadukan yang disimpan pada temperatur ruang. Metode ini cukup sederhana yang memungkinkan senyawa terekstraksi lebih banyak, meskipun ada beberapa senyawa yang memiliki kelarutan yang terbatas dalam pelarut (Iswandi, 2022). Adapun kekurangan pada metode ini yaitu pelarut yang digunakan cukup banyak, waktu ekstraksi lama dan beberapa senyawa mungkin akan sulit terekstraksi dalam suhu kamar. namun metode ini juga dapat menghindari resiko rusaknya senyawa-senyawa yang terkandung dalam tanaman yang memiliki sifat termolabil (Badaring dkk., 2020).

2.2.2 Pelarut

Pelarut merupakan larutan yang dapat melarutkan zat terlarut dalam jumlah yang besar. Pemilihan pelarut juga merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi proses ekstraksi maka perlu diperhatikan. Ada hal-hal yang harus

dipertimbangkan saat memilih pelarut yaitu pelarut harus memiliki daya larut yang baik atau bersifat selektif yang artinya pelarut dapat melarutkan semua senyawa yang diinginkan, bersifat inert yang artinya pelarut tidak bereaksi dengan komponen minyak, tidak menyebabkan perubahan secara kimia pada komponen ekstrak, serta harganya murah dan mudah didapatkan (Arsa & Achmad, 2020).

a. Etanol

Etanol atau disebut juga dengan alkohol merupakan suatu cairan transparan, mudah terbakar, tidak berwarna, mudah menguap, dapat bercampur dengan air; eter dan kloroform. Etanol memiliki massa jenis 0,7893 g/mL dengan titik didih pada tekanan atmosfer yaitu 72,32°C, indeks bias dan viskositas pada temperatur 20°C yaitu 1,36143 dan 1,17 cP (Arsa & Achmad, 2020).

Penggunaan etanol sebagai pelarut yaitu karena mampu menyari senyawa kimia lebih banyak dibandingkan dengan air atau metanol (Arsa & Achmad, 2020), dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur, lebih spesifik hasil dari ekstraksi yang dilakukan dan dapat lebih tahan lama karena pelarut etanol dapat digunakan sebagai pengawet (Marjoni, 2016). Adapun keuntungan dari pelarut etanol yaitu memiliki kemampuan yang baik dalam menyari senyawa aktif dan memiliki harga yang relatif murah (Fauziyah dkk., 2022).

2.3 Uji Toksisitas

Uji toksisitas merupakan pengujian yang dilakukan untuk melihat adanya efek toksik pada suatu senyawa dengan melihat adanya reaksi biokimia, fisiologik dan patologik yang diukur melalui derajat ketoksikan terhadap manusia dengan menggunakan hewan uji. Hasil yang diperoleh digunakan untuk memberikan informasi dan petunjuk mengenai toksisitas relatif sebagai dasar identifikasi bila terjadi efek toksik pada manusia (BPOM RI, 2022). Menurut BPOM RI, (2022), pengujian toksisitas terbagi menjadi 3 yaitu uji toksisitas akut, uji toksisitas subkronis dan uji toksisitas kronis.

Uji toksisitas akut merupakan pengujian yang dilakukan terhadap dosis tunggal atau berulang (interval waktu tidak kurang dari 3 jam) dalam waktu 24 jam pada suatu sediaan uji untuk mengetahui efek toksik yang terjadi dalam waktu

singkat. Prinsip dari uji ini yaitu pengamatan yang dilakukan terhadap efek toksik dan kematian dalam beberapa kelompok hewan uji dengan beberapa tingkat dosis dengan satu dosis per kelompok dengan tujuan mengetahui toksisitas suatu zat, menentukan organ sasaran, kepekaan spesies, memperoleh informasi bahaya setelah dilakukan paparan, mengetahui informasi awal untuk menetapkan tingkat dosis, merancang uji toksisitas selanjutnya yang akan dilakukan, memperoleh nilai toksisitas dan menentukan penggolongan toksisitas suatu sediaan uji.

2.4 Median Lethal Concentration

Dalam pengujian toksisitas perlu adanya *median Lethal Concentration* (LC₅₀) yang digunakan untuk menentukan batas aman pada suatu sediaan uji. LC₅₀ adalah konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian dalam jangka waktu tertentu pada kelompok hewan uji. Nilai LC₅₀ menunjukkan pengukuran kepekaan dan berpotensi zat toksik terhadap makhluk hidup. Yang dimana semakin tinggi nilai LC₅₀ yang dihasilkan maka akan semakin besar pula konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghasilkan 50% kematian pada hewan uji (Sadat Sadeghi, 2018). Adapun Kategori tingkat toksik yang tertera pada Tabel 1 yaitu sebagai berikut:

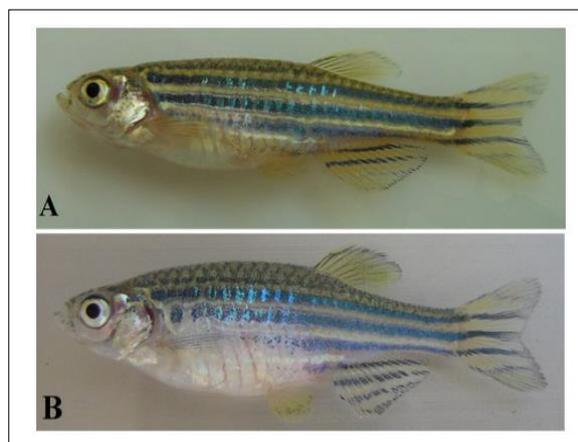
Tabel 1. Kategori Tingkat Toksisitas *Fish and Wildlife Service* (Johnson W & Finley, 2013).

No	Kategori	LC ₅₀ -96 jam (µg/mL)
1	<i>Super toxic</i>	0,01-0,1
2	<i>Highly toxic</i>	0,1-1
3	<i>Moderately toxic</i>	1-10
4	<i>Slightly toxic</i>	10-100
5	<i>Practically non-toxic</i>	100-1000
6	<i>Relatively harmless</i>	>1000

2.5 Ikan Zebra

2.5.1 Deskripsi Ikan Zebra

Menurut Karimah, U., (2021) ikan zebra atau disebut juga *Brachydanio Rerio* diklasifikasikan kedalam famili *Cyprinidae* yang merupakan salah satu dari 45 jenis danio di seluruh dunia. Ikan zebra (*Danio rerio*) adalah jenis ikan tropis yang memiliki ukuran kecil yang biasanya ditemukan di sungai-sungai di negara India dan Asia Selatan. Pada tubuh ikan zebra terdapat corak garis yang masing-masing memiliki dua sel pigmen yaitu melanor dan iridofor pada corak berwarna biru hitam, serta xantofor dan iridofor pada corak berwarna kuning perak, yang berfungsi untuk menyesuaikan diri terhadap lingkungan melalui mekanisme kamuflase (Yuniarto dkk., 2017). Gambar Ikan zebra dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Ikan Zebra

Sumber: (Avdesh *et al.*, 2012)

Keterangan: (A) Ikan zebra jantan; (B) Ikan zebra betina

Ikan zebra jantan dan ikan zebra betina memiliki ciri khas masing-masing. Pada ikan zebra jantan memiliki ciri yaitu bentuk tubuh yang *streamline* dan panjang dengan adanya garis memanjang berwarna kuning perak dan hitam pada bagian ekor dan perut, warna ikan lebih cerah dibandingkan dengan ikan zebra betina, dan memiliki berat sekitar 0,4-0,5 g. Sedangkan pada ikan zebra betina mempunyai bentuk tubuh yang lebih besar pada bagian perut ketika terdapat telur di dalamnya, memiliki berat lebih besar yaitu sekitar 0,52 – 0,78 g. Pada masa pemijahan ikan zebra, ikan harus berada di dalam air yang bersih dengan pH 7 – 8 dengan suhu 25°C - 28°C dengan perbandingan 2:1 (jantan: betina). Ikan zebra

mampu menghasilkan telur sebanyak 100 sampai 200 dalam jangka waktu yang singkat yaitu sekitar 3 bulan (Basu & Sachidanandan, 2013).

Penggunaan ikan zebra dalam pengembangan obat baru memiliki keuntungan yaitu proses pengembangbiakan yang cepat dengan satu induk yang dapat menghasilkan hingga ratusan telur, adanya kesamaan gen pada ikan zebra dengan manusia (Yuniarto dkk., 2017) dan mudah dalam pengamatan karena memiliki tubuh yang transparan (Paramita dkk., 2021). Ikan zebra memiliki detak jantung normal yaitu sekitar 120 – 170 kali dalam 1 menit yang dimana menyerupai detak jantung pada manusia, serta memiliki kesamaan genetik pada manusia yaitu sebesar 70 – 85% (Wijaya, 2020).

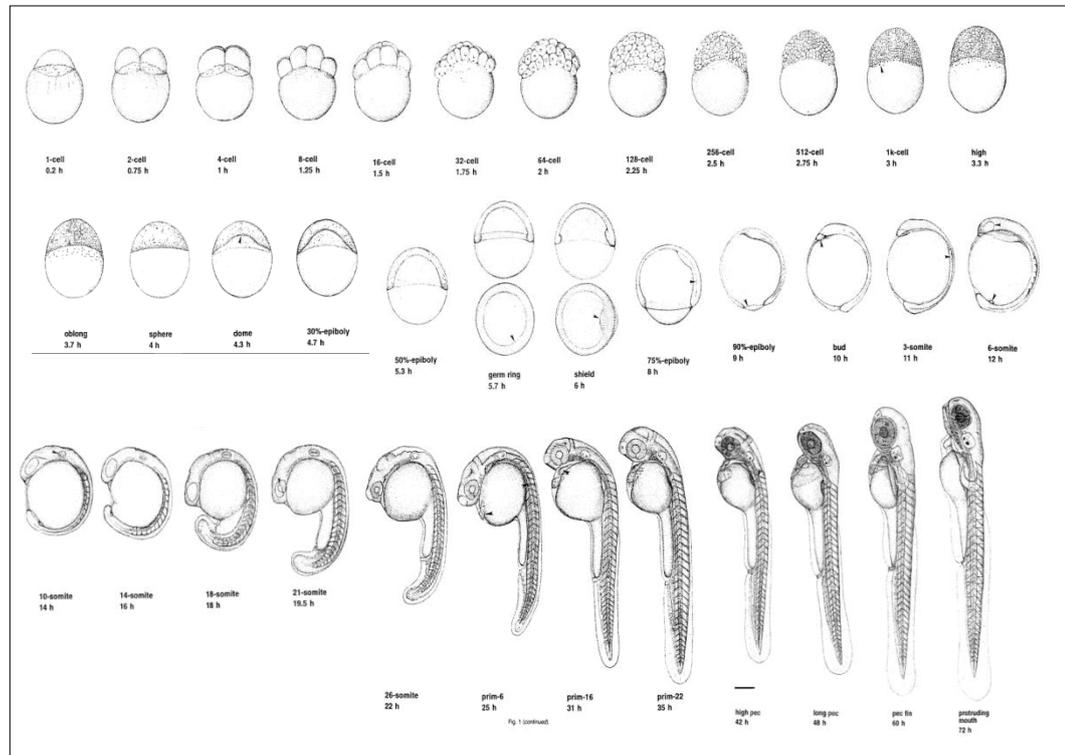
2.5.2 Tahap Perkembangan Embrio Ikan Zebra

Menurut (Kimmel *et al.*, 1995), tahapan perkembangan embrio ikan zebra terdiri dari 6 tahapan yang dimana sebelum akhirnya menetas yaitu tahap zigot, tahap pembelahan sel, tahap *blastula*, tahap *gastrula*, tahap segmentasi dan tahap yang terakhir yaitu tahap pra penetasan.

Tahapan zigot terjadi pada jam 0-0,75 setelah terjadinya fertilisasi dengan terbentuknya 1 sel dan sel selanjutnya akan membelah menjadi 2 – 64 sel hingga memasuki tahap *blastula*. Tahapan *blastula* ini dimulai pada saat sel sudah membelah mencapai 128 sel hingga membentuk 30% *epiboly*. *Epiboly* merupakan penipisan kedua yang terjadi pada YSL (*yolk synytinal layer*) dan *blastoderm*. Tahap selanjutnya yaitu *gastrula* yang dimana pada tahap ini *epiboly* terbentuk mencapai 50% (*epiboly* sempurna) dan terbentuknya *tail bud*, pada tahap ini juga *blastoderm* akan mulai menipis dan akan mulai tertutup. Tahapan selanjutnya yaitu segmentasi yang dimana embrio berusia 10-22 jam, dengan terlihatnya tulang belakang dan ekor namun masih belum bisa dibedakan dan terbentuknya sistem saraf, ginjal, jantung sirip dan organ lain yang berasal dari mesoderm.

Pada tahap pra penetasan mulai terlihat pergerakan yang spontan, selain itu ekor pun mulai terlepas dari *yolk* serta jantung mulai berdetak dan terdapat juga aliran darah yang terjadi dalam waktu 24 jam hingga 48 jam setelah terbentuknya zigot. Embrio yang berusia 48 dan 72 jam akan menetas dan memasuki periode *early larval* yang dimana morfologi ikan sudah sempurna dan

memiliki panjang sekitar 3,7 mm. Tahapan perkembangan normal embrio ikan zebra dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Perkembangan Normal Embrio Ikan Zebra
Sumber: (Kimmel *et al.*, 1995)

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Mei sampai dengan bulan Juli 2024 di Laboratorium Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan, Bogor.

3.2 Alat Dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian yaitu *aluminium foil* (Klin Pak®), akuarium, aerator (Amara®), botol kaca, cawan porselin, cawan petri, *fruit juice squeezer*, *grinder* (Panasonic®), kain batis, kertas saring (Whatman®), krus (RCC®), mesh 40 (ABM), mikroskop (XSZ®), mikropipet, neraca analitik (LabPRO DT224C®), oven (Memmert®), penangas air, peralatan gelas laboratorium (Pyrex®), pipet tetes, sendok tanduk, *silica gel*, spatel, tanur (Daihan Scientific Furnance®), thermometer, *vacuum dryer*, wadah simplisia, *multiwell*.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu kulit buah dan sari buah delima merah, embrio ikan zebra yang diperoleh di peternakan ikan lokal, Air sumur, Asam Klorida (HCl) 2N (Merck), Asam Klorida (HCl) Pekat, Besi (III) Klorida (FeCl₃), etanol 96%, gelatin (Merck), larutan pereaksi *Liebermann-Bouchard*, larutan pereaksi *Dragendorff*, larutan pereaksi *Mayer*, larutan pereaksi *Bouchardat*, serbuk Magnesium (Mg) (Merck) dan serbuk seng (Zn).

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Kaji Etik

Kaji etik merupakan suatu perizinan dalam menggunakan hewan uji sebagai subjek percobaan yang digunakan dalam penelitian. Kaji etik diajukan kepada Tim Komite Etik Farmakologi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan, Bogor.

3.3.2 Pengumpulan Bahan Baku dan Determinasi Tanaman

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian yaitu buah delima Merah (kulit dan buah) diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman, Rempah dan Obat (BALITRO), Bogor, Jawa Barat. Kemudian tanaman dilakukan Determinasi.

3.3.3 Pembuatan Simplisia

3.3.3.1 Pembuatan Serbuk Simplisia Kulit Delima Merah

Bahan baku yang telah diperoleh disortasi basah dengan memisahkan kulit buah dari pengotor dan bahan asing yang tidak digunakan, selanjutnya dicuci dengan air mengalir hingga bersih dan ditiriskan. Selanjutnya kulit buah dipotong menjadi potongan kecil dan kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama lebih 1×24 jam. Kulit buah yang sudah kering disortasi kering untuk memisahkan simplisia kering dengan pengotornya seperti debu dan bahan lain yang tidak sesuai, kemudian simplisia di *grinder* dan diayak dengan menggunakan mesh 40. Selanjutnya simplisia yang telah diayak disimpan dalam wadah tertutup dan diberikan *silica gel*. Kemudian dihitung rendemen simplisia yang didapat dengan menggunakan berikut:

Rumus 1. Rendemen Simplisia

$$\text{Rendemen Simplisia} = \frac{\text{Bobot simplisia yang didapatkan}}{\text{Bobot bahan baku awal}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

3.3.3.2 Pembuatan Perasan Sari Buah Delima Merah

Bahan baku yang telah diperoleh disortasi basah dengan memisahkan bahan yang digunakan yaitu buah delima dari pengotor dan bahan asing yang tidak digunakan, dilanjutkan dengan pencucian dengan air mengalir hingga buah delima bersih lalu tiriskan. Selanjutnya buah diperas menggunakan *fruit juice squeezer*, sari yang diperoleh kemudian disaring dan dimasukkan ke dalam wadah.

3.3.4 Pembuatan Ekstrak

3.3.4.1 Pembuatan Ekstrak Kulit Delima Merah

Ditimbang serbuk simplisia kulit buah sebanyak 300 gram, lalu dimasukkan kedalam botol berwarna coklat, kemudian dimaserasi dengan (Nurhayati dkk., 2023) direndam etanol 96% (Firnanda dkk., 2021) dengan perbandingan 1:10 (Iswandi, 2022), ditutup dan dibiarkan selama 3×24 jam dengan dilakukan pengadukan setiap hari. Ekstrak yang dihasilkan disaring dan di *vacuum dryer*

dengan tekanan 70 cmHg dalam waktu 1,5 jam sampai terbentuk ekstrak kering, kemudian ditimbang dan disimpan kedalam wadah yang tertutup dan terhindar dari matahari. Dihitung rendemen ekstrak menggunakan rumus berikut:

Rumus 2. Rendemen Ekstrak

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapatkan}}{\text{Bobot awal simplisia}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

3.3.4.2 Pembuatan Sari Buah Delima Merah

Sari buah delima yang diperoleh sebelumnya, dilakukan pengeringan menggunakan *vacuum dryer* dengan tekanan 70 cmHg dalam waktu 1,5 jam sampai terbentuk ekstrak kering, kemudian ditimbang dan disimpan kedalam wadah yang tertutup dan terhindar dari matahari. Dihitung rendemen ekstrak menggunakan rumus berikut:

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapatkan}}{\text{Bobot awal simplisia}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

3.3.5 Uji Karakteristik

1. Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode gravimetri pada simplisia dan ekstrak. Ditara cawan uap di dalam oven selama 15 menit. Ditimbang sebanyak 2 gram masing-masing serbuk simplisia dan ekstrak kering pada cawan uap yang sudah ditara. Kemudian serbuk dan ekstrak dipijarkan dalam oven dengan suhu 105°C selama 5 jam, kemudian didinginkan didalam desikator dan ditimbang yang selanjutnya dilakukan pemijaran kembali selama 1 jam. Pemijaran dilakukan kembali sampai mendapatkan bobot konstan atau sampai adanya perbedaan bobot antara 2 penimbangan terakhir yang tidak lebih dari 0,25% (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Dihitung kadar air dengan menggunakan rumus berikut:

Rumus 3. Kadar Air

$$\text{Kadar Air} = \frac{\text{Cawan isi sebelum pemanasan}(g) - \text{Cawan isi setelah pemanasan}(g)}{\text{Bobot awal sampel } (g)} \times 100\%(3)$$

2. Penetapan Kadar Abu

Penetapan kadar abu dilakukan dengan menggunakan tanur pada simplisia. Ditara krus di dalam tanur selama 15 menit pada suhu 600°C. Ditimbang Ditimbang sebanyak 2 gram masing-masing serbuk simplisia dan ekstrak dan dimasukkan kedalam krus silikat yang telah dipijar dan ditara. Dipijar kurs yang berisi sampel dalam tanur dengan suhu 600°C sampai menjadi abu. Dikeluarkan krus dengan bantuan alat penjepit besi, lalu didinginkan pada suhu kamar kemudian ditimbang hingga bobot tetap atau sampai adanya perbedaan bobot antara 2 penimbangan terakhir yang tidak lebih dari 0,25% (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Dihitung kadar abu dengan menggunakan rumus berikut:

Rumus 4. Kadar Abu

$$\text{Kadar Abu} = \frac{(\text{bobot krus+abu simplisia})(g) - \text{bobot krus kosong}(g)}{\text{Bobot ampel}(g)} \times 100\% \dots\dots (4)$$

3.3.6 Uji Fitokimia

1. Uji Alkaloid

Di timbang sampel sebanyak 0,5 gram, lalu dilarutkan dengan 1 mL Asam Klorida 2N dan 9 mL air suling, kemudian dipanaskan selama 15 menit di atas penangas. Setelah sampel dipanaskan, didinginkan dan disaring. Filtrat diteteskan pada tabung reaksi lalu masing-masing ditambah dengan pereaksi alkaloid yaitu *Mayer*, *Dragendorff* dan *Bouchardat*. Pada pereaksi *Mayer* hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih, pada pereaksi *Dragendorff* hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan jingga coklat dan pada pereaksi *Bouchardat* hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan coklat hingga hitam (Hanani, 2015).

2. Uji Flavonoid

Di timbang sampel sebanyak 0,5 gram, lalu dilarutkan dengan 5 mL etanol 96%, kemudian diuapkan selama 15 menit dan ditambahkan etanol 2-3 tetes. Masing-masing sampel ditambahkan serbuk magnesium dan serbuk seng, lalu keduanya ditambahkan 5 tetes asam klorida pekat dan dipanaskan diatas penangas. Pada serbuk magnesium hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna jingga yang menandakan terdapat senyawa flavonon, flavonol, flavononol

dan dihydroflavonol. Sedangkan pada serbuk seng hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah muda yang menandakan terdapat senyawa dihydroflavonol (Hanani, 2015).

3. Uji Tanin

Ditimbang sampel sebanyak 0,5 gram, lalu dilarutkan menggunakan air panas. Larutan sampel ditambahkan dengan larutan gelatin 10%. Pada penambahan larutan 10% gelatin hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih dan pada penambahan 3% FeCl₃ hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau-biru sampai hitam (Hanani, 2015).

4. Uji Steroid dan Terpenoid

Diambil sebanyak 2 mL sampel, dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan pereaksi *Liebermann-Bouchard*. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna biru dan menandakan bahwa sampel tersebut mengandung senyawa steroid sedangkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya warna merah jingga dan menandakan bahwa sampel mengandung senyawa terpenoid (Ergina, 2014).

5. Uji Saponin

Di timbang sampel sebanyak 0,5 gram, lalu dimasukan kedalam tabung reaksi yang didalamnya berisi 10 mL air panas, dikocok kuat selama 10 detik. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya suatu busa yang stabil, dan jika ditambahkan dengan HCl 2 N busa yang dihasilkan tidak menghilang (Hanani, 2015).

3.3.7 Pengujian Toksisitas Akut

Uji toksisitas akut dilakukan dengan mengikuti prosedur pengujian Fish Embryo Acute Toxicity yang tertera pada OECD *Guidelines For Testing Of Chemicals* Nomor 236 Tahun 2013 dengan menggunakan hewan uji yaitu embrio dari ikan zebra. Ikan zebra yang digunakan diperoleh di peternakan ikan lokal, kemudian dilakukan penyeleksian dan dilakukan pengujian dengan memaparkan bahan uji yang digunakan pada embrio ikan zebra.

3.3.7.1 Pembuatan Larutan Kontrol

1. Kontrol internal

Egg-water atau disebut juga kontrol internal merupakan air sumur yang telah dihilangkan partikel berukuran besar dan pengotor lainnya yang ada pada air sumur dengan menggunakan kertas saring *Whatman*, kemudian diberikan gelembung udara yang kaya akan oksigen dengan menggunakan aerator selama 24 jam.

2. Kontrol Uji

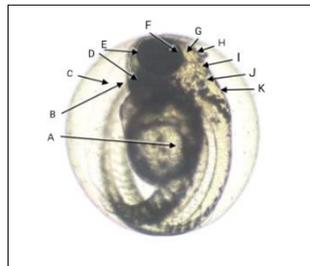
Kontrol uji merupakan larutan uji yang didalamnya mengandung ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah yang akan diujikan pada embrio ikan zebra. Pembuatan larutan uji dilakukan uji pendahuluan untuk menentukan konsentrasi dalam larutan uji. Konsentrasi yang digunakan pada masing-masing Kontrol ekstrak yaitu 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, dan 600 ppm yang dibuat dari larutan induk 4000 ppm dengan menimbang 400 mg ekstrak yang dilarutkan ke dalam 100 mL air yang digunakan dalam kontrol internal. Kemudian dilakukan uji lanjut menggunakan konsentrasi yang didapatkan pada uji pendahuluan dengan tahap yang sama yaitu pada konsentrasi 500 ppm, 520 ppm, 540 ppm, 560 ppm dan 580 ppm. Konsentrasi tersebut digunakan untuk menentukan *Lethal Concentration (LC₅₀)*.

3.3.7.2 Penyeleksian Embrio Ikan Zebra

Penyeleksian embrio yang diperoleh dilakukan dengan cara meletakkan embrio kedalam wadah yang berisi air yang digunakan sebagai kontrol internal yang telah diaerasi dengan menggunakan aerator selama 24 jam, lalu disaring dengan menggunakan kertas saring. Dipindahkan embrio ikan zebra ke dalam cawan petri dan diamati fertilitasnya dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x. Embrio ikan zebra yang digunakan pada penelitian ini yaitu embrio yang telah berusia 8 jam setelah fertilisasi. Dipilih embrio normal yang ditandai dengan adanya kuning telur, berwarna transparan dan terdapat kantung amnion. Untuk embrio yang tidak terbuahi atau mati ditandai dengan warna putih susu (OECD, 2013) No.236.

3.3.7.3 Pengujian Toksisitas Akut Pada Embrio Ikan Zebra

Pengujian toksisitas menggunakan ekstrak kulit buah dan sari buah delima dengan beberapa konsentrasi yang telah dibuat sebelumnya. Pengujian menggunakan 10 embrio pada masing-masing konsentrasi yang dimasukkan ke dalam *multiwell* untuk dilakukan pengujian dan pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan sehingga total embrio yang digunakan masing-masing konsentrasi yaitu 30 embrio ikan zebra. Pengamatan embrio terhadap morfologi dan fisiologi dilakukan selama 24 jam, 48 jam, 76 jam dan 96 jam setelah paparan kontrol internal dan kontrol uji dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x. Morfologi embrio ikan zebra dapat dilihat pada Gambar 4.

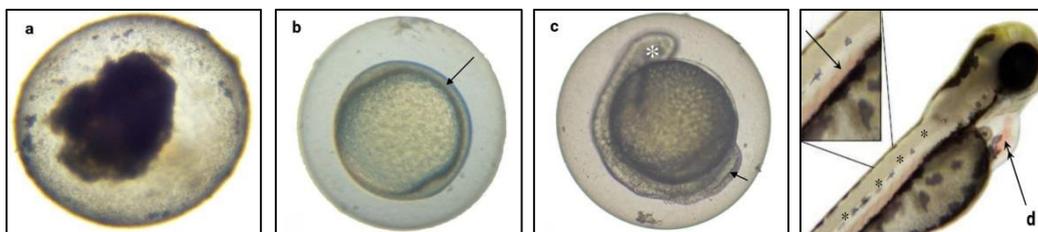


Gambar 4. Morfologi Embrio Ikan Zebra Normal

Sumber: (Von Hellfeld *et al.*, 2020)

Keterangan: (A) Vena ekor; (B) Perikardium; (C) Sirip ekor; (D) Mata; (E) Mata; (F) Tegmentum; (G) Tektum optik; (H) Mesencephalon; (I) Cerebellum; (J) Otolith dan (K) Rhombencephalon

Menurut OECD., (2013) No.236 parameter penentuan kematian embrio yaitu embrio yang mengalami koagulasi, kurangnya pembentukan somit, tidak terlepasnya *tail-bud* dari *yolk* dan kurangnya detak jantung embrio. Parameter kematian pada embrio ikan zebra dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Parameter Kematian Embrio Ikan Zebra

Sumber: (OECD, 2013)

Keterangan: (a) Koagulasi embrio, (b) Kurangnya pembentukan somit, (c) Tidak terlepasnya *tail-bud* dari *yolk* dan (d) Kurangnya detak jantung.

3.3.8 Analisis Data

Analisis data yang digunakan untuk mendapatkan nilai LC_{50} menggunakan metode analisis *Microsoft Office Excel* dengan persamaan garis lurus antara log konsentrasi (sumbu x) dan nilai probit (sumbu y), sehingga diperoleh $y = a + bx$. Tabel probit dapat dilihat pada Lampiran 10. Kemudian dimasukkan nilai (probit yang digunakan untuk memberikan 50% kematian pada hewan uji) sebagai y dari persamaan garis lurus sehingga diperoleh nilai x sebagai nilai log konsentrasi. Nilai LC_{50} diperoleh dengan meng-antilogkan nilai x . Kemudian data yang didapatkan dianalisis dengan ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan menggunakan rancangan acak kelompok (RAK). Apabila hasil analisis dengan menggunakan ANOVA terdapat perbedaan yang nyata (*significant*) maka dilakukan analisis lebih lanjut dengan menggunakan uji Duncan. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan program IBM SPSS *Statistics 24 for windows*.

BAB VI

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Determinasi Tanaman Buah Delima Merah

Hasil determinasi Buah delima merah yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman, Rempah dan Obat (BALITRO), Bogor, Jawa Barat yang dilakukan di PT. Palapa Muda Perkasa (*Chemicals Product And Chemical Analysis Service*), Jalan Kalimulya No. 23 Cilodong, Kota Depok Jawa Barat 16417. Hasil tersebut didapatkan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini merupakan tanaman buah delima dengan jenis *Punica granatum* yang termasuk ke dalam suku *Lythraceae* dengan nomor surat 996/IPH.1.06.If.10/I/2024. Surat determinasi terlampir pada Lampiran 2.

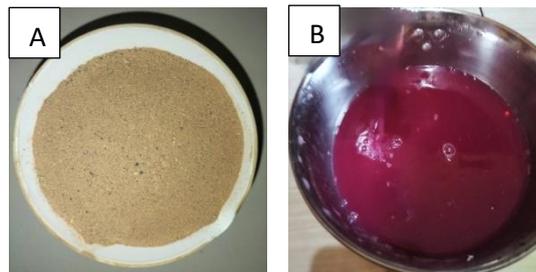
4.2 Hasil Kaji Etik

Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Buah Dan Sari Buah Delima Merah (*Punica granatum* L.) Pada Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*) dinyatakan lolos kaji etik yang diajukan kepada Tim Komite Etik Farmakologi Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan, Bogor dengan Nomor surat No. 026/KEPHP-UNPAK/06-2024. Surat Kaji Etik terlampir dalam Lampiran 3.

4.3 Hasil Pembuatan Simplisia, Ekstrak Kulit Buah Dan Sari Buah Delima Merah

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini yaitu kulit buah dan sari buah delima merah yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman, Rempah dan Obat (BALITRO), Bogor, Jawa Barat. Sebanyak 860 gram kulit buah delima merah segar diperoleh 460 gram serbuk simplisia kulit buah dengan nilai rendemen 53,24%. Buah delima merah segar sebanyak 1300 gram didapatkan 700 mL perasan sari buah delima merah. Perhitungan rendemen serbuk simplisia dapat dilihat pada Lampiran 4. Serbuk simplisia kulit buah dan perasan sari buah delima merah yang diperoleh kemudian diuji organoleptik dengan parameter yang terdiri

dari bentuk, warna, bau dan rasa yang mana dihasilkan pada serbuk simplisia kulit buah delima merah yaitu bentuk serbuk halus, berwarna kecoklatan, tidak berbau dan rasa agak pahit, serta pada perasan sari buah delima merah yaitu bentuk cair, berwarna ungu kemerahan, tidak berbau dan rasa asam manis. Serbuk simplisia kulit buah delima merah dan perasan sari buah delima merah dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Serbuk Simplisia Kulit dan Sari buah Delima Merah

Keterangan: (A) Serbuk simplisia kulit buah delima merah; (B) Perasan sari buah delima merah

Serbuk simplisia kulit buah delima merah yang telah didapatkan, kemudian dilakukan ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Serbuk simplisia kulit buah delima ditimbang sebanyak 300 gram yang dilarutkan dalam etanol 96% dengan perbandingan 1:10 yang direndam selama 3×24 jam dengan dilakukan pengadukan sesekali, kemudian filtrat yang dihasilkan disaring dan disimpan dalam wadah. Sementara sari buah delima merah dihasilkan dengan menggunakan alat *fruit juice squeezer*. Dimasukan buah delima merah kedalam wadah *fruit juice squeezer* lalu diperas buah delima merah dengan menekan wadah yang berisi buah delima merah sehingga menghasilkan perasan sari buah delima merah. Ekstrak cair kulit buah delima merah yang dihasilkan sebanyak 2300 mL dan perasan sari buah delima merah sebanyak 700 mL. Pembuatan ekstrak pada kulit buah delima merah menggunakan metode ekstraksi maserasi karena merupakan ekstraksi cara dingin yang dimana metode ekstraksi ini dapat menghindari resiko rusaknya senyawa-senyawa yang terkandung dalam tanaman yang memiliki sifat termolabil (Badaring dkk., 2020) sehingga khasiat dari senyawa-senyawa yang terkandung dalam kulit buah delima tidak mengalami kerusakan. Sementara pada sari buah delima dilakukan pemerasan untuk

menghasilkan sari karena cara tersebut sama dengan yang dilakukan masyarakat sebelum mengkonsumsi jus atau sari buah delima segar sebagai minuman sari buah sehat (Harling, 2018).

Filtrat hasil ekstraksi kulit buah dan perasan sari buah delima merah masing-masing dikeringkan hingga terbentuk ekstrak kering dengan menggunakan *vacuum dryer* dengan tekanan 70 cmHg selama 1,5 jam. Prinsip kerja *vacuum dryer* yaitu mengurangi kadar air dengan menggunakan suhu rendah yang disertai dengan penarikan uap air (Azizan & Jannifar, 2023). *Vacuum dryer* digunakan pada zat yang bersifat termolabil dan mempertahankan kandungan senyawa tanpa merusaknya dengan pemanasan (Parikh, 2015). Ekstrak yang dihasilkan yaitu ekstrak kulit buah delima merah sebanyak 120 gram dengan didapatkan nilai rendemen sebesar 21,33% berbentuk serbuk halus, berwarna kecoklatan, tidak berbau dan rasa agak pahit. Sementara untuk sari buah delima merah sebanyak 18 gram dengan didapatkan nilai rendemen 1,36% berbentuk serbuk halus, berwarna ungu kemerahan, tidak berbau dan rasa asam manis. Perbedaan hasil rendemen yang diperoleh karena pada ekstrak kulit buah delima merah dilakukan ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% untuk penarikan senyawa, sedangkan pada sari buah delima menurut El-Nemr *et al.*, (1990) memiliki kandungan air sebanyak 85,4% yang dimana kandungan air tersebut dapat mempengaruhi rendemen yang dihasilkan. Perhitungan rendemen ekstrak dapat dilihat pada Lampiran 4.

4.4 Hasil Uji Karakteristik

4.4.1 Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air bertujuan untuk menjaga mutu simplisia dan ekstrak serta untuk mengetahui kandungan air yang terdapat di dalam sampel dan memberikan batasan kandungan air yang diperbolehkan (Depkes RI, 2000), dengan menggunakan metode gravimetri yang memiliki prinsip kerja yaitu menguapkan air di dalam sampel dengan proses pemanasan hingga kandungan air dalam sampel menghilang (Fikriyah & Nasution, 2021). Penetapan kadar air yang diperoleh pada serbuk simplisia kulit buah, ekstrak kulit buah dan sari buah

delima merah yaitu berturut-turut sebesar 5,3859%, 4,3630% dan 4,7791% yang mana hasil tersebut memenuhi persyaratan kadar air $\leq 10\%$ (BPOM RI, 2014) dan kadar air untuk ekstrak kering $\leq 5\%$ (Utami dkk., 2017). Penetapan kadar air dilakukan sebanyak dua kali pengulangan atau duplo pada simplisia dan ekstrak kulit buah serta sari buah delima merah. Hasil dan perhitungan kadar air dapat dilihat pada Tabel 2 dan Lampiran 5.

Tabel 2. Hasil Penetapan Kadar Air

Sampel	Hasil Kadar Air (%)	Syarat(%)
Serbuk Simplisia Kulit Buah Delima Merah	5,3859 \pm 0,6143	$\leq 10\%$
Ekstrak Kulit Buah Delima Merah	4,3630 \pm 3,3274	$\leq 5\%$
Sari Buah Delima Merah	4,7791 \pm 1,2734	$\leq 5\%$

Perasaan sari buah delima merah tidak dilakukan pengujian kadar air karena sari buah delima memiliki kandungan air yang tinggi. Kadar air yang tinggi dapat mempengaruhi daya tahan bahan selama proses penyimpanan (Daniela dkk., 2023). Kandungan air yang terdapat dalam simplisia dan ekstrak dapat mempengaruhi kualitas simplisia dan ekstrak, yang mana semakin tinggi kandungan air memungkinkan terjadinya pertumbuhan mikroorganisme sehingga dapat membuat kualitas simplisia dan ekstrak menjadi berkurang dan dapat mempengaruhi kandungan senyawa serta aktivitas yang terdapat pada sampel (Vonna dkk., 2021).

4.4.2 Penetapan Kadar Abu

Penetapan kadar abu bertujuan untuk mendapatkan gambaran mengenai kandungan mineral dan anorganik yang terdapat dalam simplisia dan ekstrak yang memiliki prinsip yaitu pemijaran sampel dalam suhu tinggi hingga bobot konstan (Depkes RI, 2000). Penetapan kadar abu yang diperoleh pada serbuk simplisia kulit buah delima merah, ekstrak kering kulit buah delima merah dan sari buah delima merah yaitu berturut-turut sebesar 2,6711%, 2,1773% dan 1,5941% yang mana hasil tersebut memenuhi persyaratan kadar abu simplisia kulit buah delima merah $\leq 4,6\%$ dan kadar abu untuk ekstrak $\leq 10\%$ (Kementerian Kesehatan RI,

2017). Penetapan kadar abu dilakukan sebanyak dua kali pengulangan atau duplo pada simplisia dan ekstrak kulit buah serta ekstrak sari buah delima merah. Hasil dan perhitungan kadar abu dapat dilihat pada Tabel 3 dan Lampiran 6.

Tabel 3. Hasil Penetapan Kadar Abu

Sampel	Hasil Kadar Abu (%)	Syarat(%)
Serbuk Simplisia Kulit Buah Delima Merah	$2,6711 \pm 0,9390$	$\leq 4,6\%$
Ekstrak Kulit Buah Delima Merah	$2,1773 \pm 1,3382$	$\leq 10\%$
Sari Buah Delima Merah	$1,5941 \pm 0,5197$	$\leq 10\%$

Perasaan sari buah delima merah tidak dilakukan pengujian kadar abu karena sari buah delima memiliki kandungan air yang tinggi, sehingga pada pemanasan tinggi dengan suhu 600°C selama 5 jam memungkinkan kandungan mineral dan anorganik yang ada pada sari buah delima merah akan hilang bersamaan dengan kandungan air yang tinggi pada sari buah delima merah. Tingginya kadar abu menunjukkan bahwa kandungan mineral dalam tanaman juga semakin tinggi. Kandungan mineral sangat diperlukan seperti kalsium, fosfor dan magnesium untuk pertumbuhan tulang, besi untuk pembentukan hemoglobin dan sel darah merah, serta natrium dan klorida untuk cairan tubuh. Berbeda halnya dengan mineral toksik (logam berat) yang dimana dalam jangka waktu lama dapat membahayakan bagi tubuh (Utami dkk., 2017), sehingga apabila kadar abu lebih dari syarat yang ditentukan maka sampel tidak bisa digunakan karena berbahaya bagi tubuh (Depkes RI, 2000).

4.5 Hasil Uji Fitokimia

Skринing fitokimia merupakan pengujian yang bertujuan untuk mengetahui kandungan aktif yang terdapat pada tanaman (Muthmainnah, 2017) dengan bantuan reagen yang berperan dalam mengidentifikasi senyawa yang terdapat dalam tanaman melalui pengamatan hasil warna uji (Prasetyo dkk., 2021).

Kandungan senyawa yang diamati meliputi alkaloid, flavonoid, tannin, terpenoid dan saponin. Hasil uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 4 dan Lampiran 8.

Tabel 4. Hasil Uji Fitokimia

Identifikasi Senyawa	Pereaksi	Literatur	Keterangan	
			Ekstrak Kulit Buah Delima Merah	Sari Buah Delima Merah
Alkaloid	<i>Mayer</i>	↓Putih	+	+
	<i>Dragendorff</i>	↓Cokelat	+	+
	<i>Bouchardat</i>	↓Cokelat	+	+
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl P	Jingga	+	+
	Serbuk Zn + HCl P	Merah	+	+
	Gelatin 10%	↓Putih	+	+
Tanin	FeCl ₃	Biru-Hijau Kehitaman	+	+
Terpenoid	<i>Liebermann-Bourchard</i>	Jingga	+	+
Saponin		Berbusa	+	+

Keterangan:

- (↓) : Terbentuk endapan
- (+) : Hasil mengandung senyawa
- (-) : Hasil tidak mengandung senyawa

Hasil uji fitokimia pada ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah menunjukkan hasil yang positif dalam setiap pengujiannya, hasil ini sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Wijanti dkk., (2023) dan (Muthmainnah, 2017) yaitu ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, terpenoid dan saponin. Hasil positif yang didapatkan karena pembuatan ekstrak kulit buah delima merah menggunakan metode maserasi atau ekstraksi cara dingin yang prosesnya tidak menggunakan suhu sehingga dapat menghindari rusaknya senyawa yang bersifat termolabil (Badaring

dkk., 2020), selain itu penggunaan pelarut untuk menarik senyawa yaitu etanol yang bersifat polar dan pelarut tersebut dapat menarik senyawa dengan baik (Fauziyah dkk., 2022). Sedangkan hasil positif pada sari buah delima merah karena pembuatan ekstrak didapatkan langsung dari daging buahnya sehingga senyawa yang terkandung diduga tidak terpengaruhi. Selain itu hasil positif pada ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah diidentifikasi dengan adanya penambahan reagen sehingga terjadinya reaksi yang menghasilkan hasil positif.

Senyawa alkaloid positif terkandung dalam ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah yang diidentifikasi dengan adanya penambahan HCl 2 N karena alkaloid bersifat basa sehingga untuk membentuk garam, lalu dipanaskan untuk memecahkan ikatan antara alkaloid yang bukan dalam bentuk garam (Muthmainnah, 2017). Penambahan reagen akan menyebabkan adanya reaksi pengendapan dan perubahan warna pada larutan uji yang mengindikasikan adanya senyawa alkaloid. Pada uji alkaloid dengan pereaksi *mayer* ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih yang terjadi karena nitrogen yang ada pada alkaloid bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Pada uji alkaloid dengan pereaksi *dragendorff* ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat yang terjadi karena nitrogen pada alkaloid bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodobismutat membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Serta pada uji alkaloid menggunakan pereaksi *Bouchardat* ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat yang terjadi karena nitrogen pada alkaloid akan membentuk ikatan koordinat dengan ion logam K^+ membentuk kompleks kalium-alkaloid (Fajrin & Susila, 2019).

Selain alkaloid, ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah juga mengandung flavonoid. Menurut (Novera dkk., 2019) kulit buah delima mengandung flavonoid lebih tinggi dari total keseluruhan bagian buah. Identifikasi flavonoid dengan adanya penambahan serbuk magnesium (Mg) dan HCl pekat. Penambahan tersebut bertujuan untuk mereduksi inti benzopiron yang ada pada flavonoid sehingga terbentuk garam flavilium berwarna jingga atau merah (Dewi dkk., 2021). Ekstrak kulit dan sari buah delima merah positif

mengandung tanin dengan adanya perubahan warna biru-hijau kehitaman dengan penambahan FeCl_3 dan endapan putih dengan penambahan gelatin 10%. Perubahan warna dengan adanya penambahan FeCl_3 karena gugus hidroksil pada tanin akan bereaksi dengan ion Fe^{3+} dan membentuk senyawa kompleks dengan FeCl_3 (Halimu dkk., 2020).

Ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah positif mengandung terpenoid yang ditandai dengan perubahan warna menjadi jingga dengan penambahan reagen *Liebermann-Bouchard*. Selain itu, ekstrak kulit dan sari buah delima positif mengandung saponin yang ditandai dengan terbentuknya buih dan buih tidak hilang saat penambahan HCl. Terbentuknya buih juga disebabkan oleh gugus hidrofilik dan hidrofobik yang dimiliki oleh saponin yang dapat mengikat air dan udara sehingga membentuk misel (Prananda dkk., 2015).

4.6 Hasil Uji Toksisitas Akut

Pengujian toksisitas akut menggunakan embrio ikan zebra (*Danio rerio*) merupakan skrining awal dalam melihat tingkat toksisitas suatu bahan. Uji toksisitas akut dengan menggunakan embrio ikan zebra (*Danio rerio*) mengacu pada prosedur pengujian *Fish Embryo Acute Toxicity* yang tertera pada OECD (*Guidelines For Testing Of Chemicals*) Nomor 236 tahun 2013 dengan menggunakan hewan uji yaitu embrio ikan zebra dengan prinsip pengujian yaitu pemaparan larutan uji selama 96 jam yang dimana pengamatan dilakukan setiap 24 jam (24 jam, 48 jam, 72 jam dan 96 jam) menggunakan mikroskop dengan perbesaran 4×0.10 . Parameter pengujian yang digunakan yaitu LC_{50} (*Lethal Concentration 50*) yang nilainya diperoleh dari konsentrasi uji yang menyebabkan 50% kematian pada hewan uji. Menurut OECD., (2013) No.236 parameter penentuan kematian embrio yaitu embrio yang mengalami koagulasi, kurangnya pembentukan somit, tidak terlepasnya *tail-bud* dari *yolk* dan kurangnya detak jantung embrio. Embrio ikan zebra yang digunakan yaitu embrio yang berusia 8 jam (Agus Setiani *et al.*, 2023) yang penggunaannya bertujuan untuk keseragaman pada tahap perkembangan embrio agar memudahkan pengamatan dan menghindari hasil yang berbeda serta termasuk kedalam tahap gastrula dengan

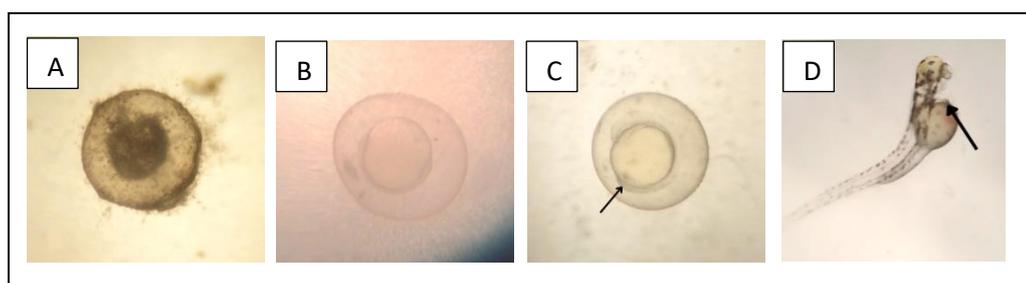
pembentukan *epiboly* 75% (Kimmel *et al.*, 1995). Pada penelitian ini menggunakan 2 kontrol larutan yaitu kontrol uji (ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah) dan kontrol internal (*egg-water*). Gambar embrio ikan zebra berusia 8 jam dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Embrio Ikan Zebra Usia 8 Jam Dengan Perbesaran 4×0.10

4.6.1 Hasil Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Buah

Penelitian ini menggunakan kontrol uji (ekstrak kulit buah delima merah) dan kontrol internal (*egg-water*) yang berfungsi sebagai kontrol negatif. Penggunaan kontrol internal (*egg-water*) pada pengujian toksisitas akut menunjukkan bahwa embrio ikan zebra 100% hidup dan tidak adanya kelainan yang terjadi pada embrio ikan zebra, sehingga dapat dikatakan kontrol internal yang digunakan tidak mempengaruhi hasil dari kontrol uji dan tidak mempunyai sifat toksik. Sementara pada kontrol uji (ekstrak kulit buah delima merah) ditemukan adanya kelainan serta kematian yang terjadi pada embrio ikan zebra. Kematian embrio ikan zebra dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Kematian Embrio Ikan Zebra Setelah Paparan Ekstrak
Keterangan: (A) Koagulasi embrio; (B) Kurangnya pembentukan somit; (C) Tidak terlepasnya *tail-bud* dari *yolk* (D) Kurangnya detak Jantung

Kematian yang terjadi pada embrio ikan zebra dilihat berdasarkan parameter kematian yaitu pada waktu ke-24 jam embrio mengalami koagulasi yang ditandai dengan embrio berwarna putih susu dan tampak gelap di bawah

mikroskop, sedangkan pada waktu ke-48 jam sampai 96 jam terjadi peningkatan kematian seperti pembentukan somit yang mana dalam 24 jam somit tidak terbentuk maka akan mengalami keterlambatan pertumbuhan dan dalam 48 jam somit tidak terbentuk maka embrio mengalami kematian dan tidak terjadinya pelepasan ekor pada kuning telur setelah 24 jam maka embrio mengalami kematian (OECD, 2013). Persentase kematian embrio ikan zebra diperoleh dari total jumlah embrio ikan zebra dari tiga kali pengulangan pada setiap masing-masing konsentrasi. Persentase kematian dapat dilihat pada Lampiran 11 dan Tabel 5.

Tabel 5. Persentase Kematian Embrio Ikan Zebra Pada Ekstrak

Konsentrasi (ppm)	%Kematian			
	24 Jam	48 Jam	72 Jam	96 Jam
500	10%	17%	17%	27%
520	20%	20%	23%	30%
540	27%	30%	30%	43%
560	37%	43%	47%	53%
580	40%	47%	53%	70%

Hasil pengamatan uji toksisitas akut ekstrak kulit buah delima pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*) menunjukkan bahwa semakin lama waktu paparan ekstrak yaitu pada jam ke-24, 48, 72 dan 96 dan semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi angka kematian pada embrio ikan zebra. Lama waktu pemaparan menyebabkan embrio menyerap ekstrak lebih banyak yang mengakibatkan daya tahan tubuh embrio ikan zebra menurun (Rusli dkk., 2020). Kematian yang terjadi pada embrio ikan zebra dihitung dan digunakan untuk menentukan nilai LC_{50} serta nilai LC_{50} ditentukan berdasarkan kategori tingkat toksisitas *Fish and Wildlife Service* (Johnson W & Finley, 2013).

Hasil nilai LC_{50} pada ekstrak kulit buah delima merah yang tertera pada Tabel 6 menunjukkan bahwa berdasarkan kategori tingkat toksisitas *Fish and Wildlife Service* (Johnson W & Finley, 2013) menyatakan nilai LC_{50} pada ekstrak kulit buah delima merah pada jam ke-96 termasuk dalam kategori *practically non-toxic* yaitu pada rentang 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai LC_{50} sebesar 548,0628

ppm. Nilai LC₅₀ ekstrak kulit buah delima merah diperoleh dari jumlah rata-rata nilai LC₅₀ pada tiga kali pengulangan pada jam ke-24, 48, 72 dan 96. Hasil nilai LC₅₀ dapat dilihat pada Tabel 6 dan Lampiran 12. Serta perhitungan LC₅₀ dapat dilihat pada Lampiran 11.

Tabel 6. Hasil Nilai LC₅₀ Ekstrak Kulit Buah Delima Merah

Waktu (Jam)	Nilai LC ₅₀ (ppm)			Rata-rata	Rata-rata (ppm)
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Nilai LC ₅₀ (ppm) ± SD	
24	599,2673	594,1363	588,5193	593,9743 ± 5,3758	593,9743 ^a
48	588,5193	584,3318	575,4535	582,7682 ± 6,6717	582,7682 ^b
72	577,2226	575,4535	564,0489	572,2417 ± 7,1501	572,2417 ^c
96	559,8375	551,3327	533,0182	548,0628 ± 13,7054	548,0628 ^d

Keterangan: Perbedaan huruf superskrip pada kolom yang berbeda menunjukkan bahwa keduanya tidak mempunyai pengaruh yang sama.

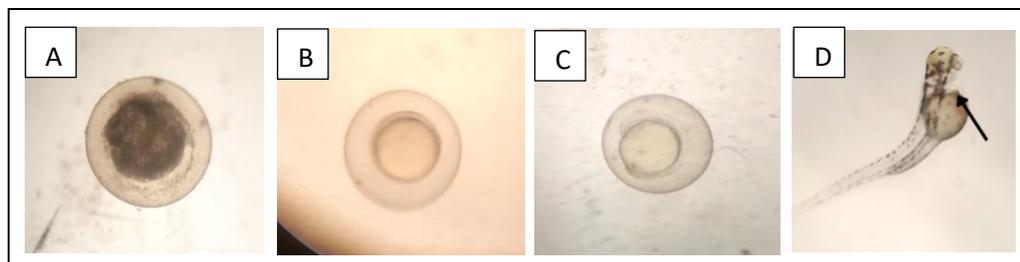
Hasil nilai LC₅₀ ekstrak kulit buah delima merah berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Firnanda dkk., (2021) yaitu ekstrak buah delima putih termasuk ke dalam kategori toksik sedang dengan nilai LC₅₀ sebesar 248,6 µg/mL terhadap larva *Artemia salina* pada uji *Brine Shrimp Lethality Test* sebagai kandidat obat antikanker dan penelitian yang dilakukan oleh Insanu dkk., (2017) yaitu ekstrak dan fraksi kulit buah delima termasuk ke dalam kategori tidak toksik pada konsentrasi 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 dan 2 µg/mL terhadap sel vero. Perbedaan hasil tersebut disebabkan oleh perbedaan jenis dan bagian buah delima yang digunakan, hewan uji yang digunakan dan kategori toksisitas yang digunakan dalam penelitian berbeda.

Hasil analisis data menunjukkan nilai $p = 0.000 \leq 0.05$, maka dapat disimpulkan tolak H₀ terima H₁ yaitu ada pengaruh yang signifikan antara

lamanya waktu pemaparan terhadap nilai LC_{50} . Dan dilakukan uji lanjut Ducan. Hasil analisis uji lanjut Ducan menunjukkan bahwa lama waktu pemaparan pada jam 24 dan 48, serta jam 72 dan jam 96 memiliki pengaruh yang berbeda nyata terhadap nilai LC_{50} , yang mana semakin lama waktu pemaparan maka terjadinya penurunan nilai LC_{50} . Hasil analisis dapat dilihat pada Lampiran 13.

4.6.2 Hasil Uji Toksisitas Akut Sari Buah

Penelitian ini menggunakan kontrol uji (sari buah delima merah) dan kontrol internal (*egg-water*) yang berfungsi sebagai kontrol negatif. Penggunaan kontrol internal (*egg-water*) pada pengujian toksisitas akut menunjukkan bahwa embrio ikan zebra 100% hidup dan tidak adanya kelainan yang terjadi pada embrio ikan zebra, sehingga dapat dikatakan kontrol internal yang digunakan tidak mempengaruhi hasil dari kontrol uji dan tidak mempunyai sifat toksik. Sementara pada kontrol uji (sari kulit buah delima merah) ditemukan adanya kelainan serta kematian yang terjadi pada embrio ikan zebra. Kematian embrio ikan zebra dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Kematian Embrio Ikan Setelah Papan Sari

Keterangan: (A) Koagulasi embrio; (B) Kurangnya pembentukan somit; (C) Tidak terlepasnya *tail-bud* dari *yolk* (D) Kurangnya detak Jantung

Kematian yang terjadi pada embrio ikan zebra dilihat berdasarkan parameter kematian yaitu pada waktu ke-24 jam embrio mengalami koagulasi yang ditandai dengan embrio berwarna putih susu dan tampak gelap di bawah mikroskop, sedangkan pada waktu ke-48 jam sampai 96 jam terjadi peningkatan kematian seperti pembentukan somit yang mana dalam 24 jam somit tidak terbentuk maka akan mengalami keterlambatan pertumbuhan dan dalam 48 jam somit tidak terbentuk maka embrio mengalami kematian dan tidak terjadinya pelepasan ekor pada kuning telur setelah 24 jam maka embrio mengalami kematian (OECD, 2013). Persentase kematian embrio ikan zebra diperoleh dari

total jumlah embrio ikan zebra dari tiga kali pengulangan pada setiap masing-masing konsentrasi. Persentase kematian dapat dilihat pada Lampiran 11 dan Tabel 7.

Tabel 7. Persentase Kematian Embrio Ikan Zebra Pada Sari

Konsentrasi (ppm)	%Kematian			
	24 Jam	48 Jam	72 Jam	96 Jam
500	10%	17%	17%	20%
520	17%	23%	27%	30%
540	23%	30%	30%	37%
560	37%	37%	37%	47%
580	40%	40%	40%	57%

Hasil pengamatan uji toksisitas akut ekstrak kulit buah delima pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*) menunjukkan bahwa semakin lama waktu paparan ekstrak yaitu pada jam ke-24, 48, 72 dan 96 dan semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi angka kematian pada embrio ikan zebra. Lama waktu pemaparan menyebabkan embrio menyerap ekstrak lebih banyak yang mengakibatkan daya tahan tubuh embrio ikan zebra menurun (Rusli dkk., 2020). Kematian yang terjadi pada embrio ikan zebra dihitung dan digunakan untuk menentukan nilai LC_{50} serta nilai LC_{50} ditentukan berdasarkan kategori tingkat toksisitas *Fish and Wildlife Service* (Johnson W & Finley, 2013).

Hasil nilai LC_{50} pada sari buah delima merah yang tertera pada Tabel 8 menunjukkan bahwa berdasarkan kategori tingkat toksisitas *Fish and Wildlife Service* (Johnson W & Finley, 2013) menyatakan nilai LC_{50} pada sari buah delima merah pada jam ke-96 termasuk dalam kategori *practically non-toxic* yaitu pada rentang 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai LC_{50} sebesar 569,0161 ppm. Nilai LC_{50} ekstrak kulit buah delima merah diperoleh dari jumlah rata-rata nilai LC_{50} pada tiga kali pengulangan pada jam ke-24, 48, 72 dan 96. Hasil nilai LC_{50} dapat dilihat pada Tabel 8 dan Lampiran 12. Serta perhitungan LC_{50} dapat dilihat pada Lampiran 11.

Tabel 8. Hasil Nilai LC₅₀ Sari Buah Delima Merah

Waktu (Jam)	Nilai LC ₅₀ (ppm)			Rata-rata	Rata-rata (ppm)
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Nilai LC ₅₀ (ppm) ± SD	
24	596,6023	594,1363	594,1363	594,9583 ± 1,4237	594,9583 ^a
48	599,2673	588,5193	589,3509	592,3792 ± 5,9798	592,3792 ^a
72	588,5193	584,9653	574,4826	582,6557 ± 7,2978	582,6557 ^a
96	584,9653	569,1035	552,9795	569,0161 ± 15,9931	569,0161 ^b

Keterangan: Perbedaan huruf superskrip pada kolom yang berbeda menunjukkan bahwa keduanya tidak mempunyai pengaruh yang sama.

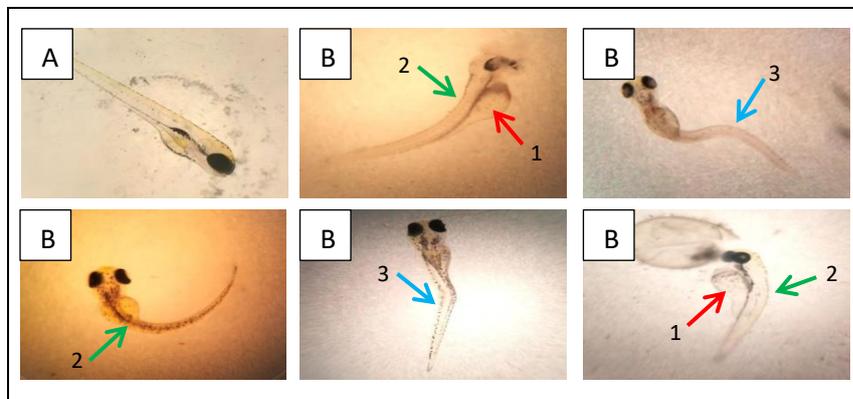
Hasil analisis data menunjukkan nilai $p = 0.011 \leq 0.05$, maka dapat disimpulkan tolak H₀ terima H₁ yaitu ada pengaruh yang signifikan antara lamanya waktu pemaparan terhadap nilai LC₅₀. Dan dilakukan uji lanjut Ducan. Hasil analisis uji lanjut Ducan lama waktu pemaparan pada jam ke 24 dan 48, serta jam 72 memiliki pengaruh yang sama terhadap nilai LC₅₀, sementara jam ke 96 memiliki pengaruh yang berbeda nyata yang mana semakin lama waktu pemaparan maka terjadinya penurunan nilai LC₅₀. Hasil analisis dapat dilihat pada Lampiran 13.

4.7 Hasil Kelainan Pada Embrio Ikan Zebra

4.7.1 Kelainan Setelah Paparan Ekstrak Kulit Buah

Pada penelitian ini dilakukan juga pengamatan kelainan yang terjadi pada embrio ikan zebra. Hasil pengamatan uji toksisitas akut menunjukkan ekstrak kulit buah delima merah pada embrio ikan zebra tidak hanya mengalami kematian, akan tetapi terjadi pula kelainan pada embrio ikan zebra. Beberapa indikator kelainan yang dapat diamati yaitu seperti kelainan tulang belakang atau ekor,

edema perikardium, edema kantung kuning telur, kelainan pada sirip dada (hilang atau bentuk melengkung), kelainan pada bentuk rahang dan mata (Hoyberghs *et al.*, 2021). Kelainan yang terjadi disebabkan oleh paparan kontrol uji yaitu ekstrak kulit buah delima merah yang terserap kedalam embrio ikan zebra (Paramita dkk., 2021). Berdasarkan pengamatan pada embrio ikan zebra setelah paparan kontrol uji terdapat beberapa kelainan yang terjadi akibat efek toksik terhadap embrio ikan zebra yaitu kelainan edema kantung kuning telur (*yolk*), kelainan pada tulang belakang serta ekor. Kelainan yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 10 dan Lampiran 15.



Gambar 10. Kelainan Embrio Ikan Zebra Setelah Paparan Ekstrak

Keterangan: (A) Embrio normal; (B) Embrio yang mengalami kelainan. (1) Edema kantung kuning telur (*yolk*); (2) Tulang belakang; (3) Ekor

Berdasarkan hasil pengamatan setelah paparan selama 96 jam terhadap embrio ikan zebra menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah delima merah di duga memiliki aktivitas yang dapat menyebabkan kelainan pada embrio ikan zebra. Kelainan mulai terlihat pada jam ke-72 sampai jam ke-96 setelah fertilisasi pada konsentrasi 580 ppm. Pada jam ke-72 sampai jam ke-96 merupakan fase *early larva* yang dimana pada fase ini embrio mulai berenang, menggerakkan rahang, mata dan sirip dada mulai bergerak (Kimmel *et al.*, 1995). Kelainan yang timbul yaitu edema kantung kuning telur (*yolk*), kelainan tulang belakang serta ekor.

Kantung kuning telur pada embrio ikan zebra berfungsi untuk menyimpan nutrisi (Sant & Timme-laragy, 2019), bila terjadi gangguan pada kantung kuning telur maka penyerapan nutrisi yang dibutuhkan akan berkurang (Syahbirin *et al.*, 2017) dan metabolisme tidak berjalan dengan baik yang akhirnya menyebabkan

pertumbuhan tidak sempurna. Gangguan ini juga terjadi karena adanya paparan ekstrak yang diserap oleh kantung kuning telur sehingga kantung kuning telur membesar, kekurangan gizi dan menurunkan pergerakan pada embrio (Chahardehi *et al.*, 2020). Penghambatan kerja enzim chorionase juga dapat terjadi karena adanya gangguan kantung kuning telur yang mengakibatkan reduksi korion terhambat sehingga tidak mampu menetas, namun bila mampu menetas ekstrak yang diserap akan terakumulasi yang mengakibatkan kelainan pada bagian tulang (Paramita dkk., 2021) seperti tulang belakang dan ekor menjadi pendek atau mengalami pembengkokan.

Pada embrio ikan zebra ekor merupakan salah satu titik akhir pertumbuhan yang ditandai dengan ekor terlepas seluruhnya pada kuning telur. Kelainan tulang belakang dan ekor dapat dipengaruhi oleh senyawa toksik yang menyebabkan terjadinya kelainan (Fazry *et al.*, 2018) serta juga dapat dipengaruhi oleh penurunan drastis dalam penyerapan makanan dan predasi (Yumnamcha *et al.*, 2015). Kelainan tulang belakang yang terjadi ditunjukkan dengan adanya pembengkokan tulang seperti lordosis, kifosis dan yang juga mungkin berkaitan dengan deregulasi ion kalsium dan fosfor yang diperlukan untuk proses perkembangan (Vasamsetti *et al.*, 2020) serta peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat menghambat aktivitas karbonik anhidrase (CA) yang berfungsi untuk mengatur keseimbangan asam-basa dalam darah dan jaringan yang berkaitan dengan tulang (Díaz-Martín *et al.*, 2021). Menurut Hayes *et al.*, (2013) perubahan degeneratif pada tulang belakang menyerupai osteoarthritis berkaitan dengan seiring bertambahnya usia ikan zebra sering mengalami deformasi pada tulang belakang.

Kelainan yang terjadi diduga karena konsentrasi yang digunakan yaitu 500 ppm, 520 ppm, 540 ppm, 560 ppm dan 580 ppm. Menurut (Jayasinghe & Jayawardena, 2019) tingginya konsentrasi dapat meningkatkan terjadinya kelainan pada embrio ikan zebra yang dimana semakin tinggi konsentrasi maka semakin banyak jumlah ekstrak yang dipaparkan, dan semakin banyak senyawa metabolit sekunder yang terserap. Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak kulit buah delima merah yaitu seperti pada hasil uji fitokimia yang

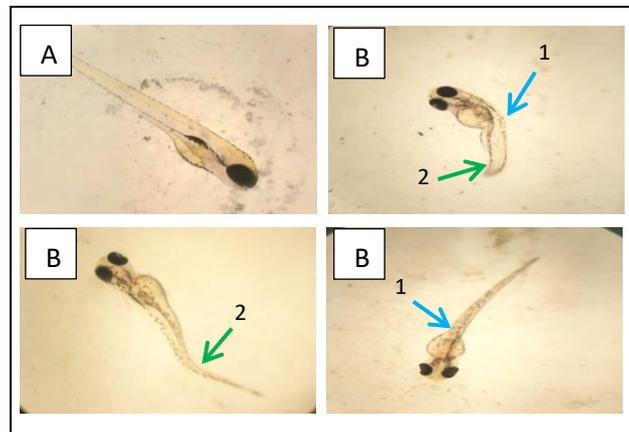
menunjukkan bahwa ekstrak kulit dan buah delima merah positif mengandung alkaloid, flavonoid, tannin, terpenoid dan saponin. Senyawa-senyawa tersebut di duga dalam konsentrasi yang tinggi dapat menghambat proses pencernaan dengan menurunkan aktivitas enzim pencernaan makanan dan penyerapan nutrisi yang membuat embrio kelaparan dan mati (Yunita *et al.*, 2009). Kurangnya pasokan nutrisi terutama kalsium dapat menyebabkan keterlambatan pembentukan tulang dalam proses osifikasi (Rita *et al.*, 2008). Penggunaan pelarut dalam metode ekstraksi juga dapat mempengaruhi pertumbuhan embrio (Christou *et al.*, 2020) yaitu pelarut etanol yang digunakan dalam proses ekstraksi pada ekstrak kulit buah delima merah. Menurut Maes *et al.*, (2012) penggunaan etanol pada embrio ikan zebra menyebabkan kelainan pada tahap perkembangan seperti kelainan pada mata dan kelainan pada tulang belakang atau ekor.

4.7.2 Kelainan Setelah Paparan Sari Buah

Pada penelitian ini dilakukan juga pengamatan kelainan yang terjadi pada embrio ikan zebra. Hasil pengamatan uji toksisitas akut menunjukkan sari kulit buah delima merah pada embrio ikan zebra tidak hanya mengalami kematian, akan tetapi terjadi pula kelainan pada embrio ikan zebra. Beberapa indikator kelainan yang dapat diamati yaitu seperti kelainan tulang belakang atau ekor, edema perikardium, edema kantung kuning telur, kelainan pada sirip dada (hilang atau bentuk melengkung), kelainan pada bentuk rahang dan mata (Hoyberghs *et al.*, 2021). Kelainan yang terjadi disebabkan oleh paparan kontrol uji yaitu sari kulit buah delima merah yang terserap kedalam embrio ikan zebra (Paramita dkk., 2021). Berdasarkan pengamatan pada embrio ikan zebra setelah paparan kontrol uji terdapat beberapa kelainan yang terjadi akibat efek toksik terhadap embrio ikan zebra yaitu kelainan pada tulang belakang serta ekor.

Berdasarkan hasil pengamatan setelah paparan selama 96 jam terhadap embrio ikan zebra menunjukkan bahwa sari kulit buah delima merah diduga memiliki aktivitas yang dapat menyebabkan kelainan pada embrio ikan zebra. Kelainan mulai terlihat jam ke-96 setelah fertilisasi pada konsentrasi tertinggi yaitu 580 ppm. Pada jam ke-96 merupakan fase *early larva* yang dimana pada fase ini embrio mulai berenang, menggerakkan rahang, mata dan sirip dada mulai

bergerak (Kimmel et al., 1995). Kelainan yang timbul yaitu kelainan tulang belakang serta ekor. Kelainan yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 11 dan Lampiran 15.



Gambar 11. Kelainan Embrio Ikan Zebra Setelah Paparan Sari
Keterangan: (A) Embrio normal; (B) Embrio yang mengalami kelainan.
 (1) Tulang belakang; (2) Ekor

Pada embrio ikan zebra ekor merupakan salah satu titik akhir pertumbuhan yang ditandai dengan ekor terlepas seluruhnya pada kuning telur. Kelainan tulang belakang dan ekor dapat dipengaruhi oleh senyawa toksik yang menyebabkan terjadinya kelainan (Fazry *et al.*, 2018) serta juga dapat dipengaruhi oleh penurunan drastis dalam penyerapan makanan dan predasi (Yumnamcha *et al.*, 2015). Perubahan degeneratif pada tulang belakang menyerupai osteoarthritis berkaitan dengan kelainan tulang, menurut Hayes *et al.*, (2013) hasil morfologi menunjukkan seiring bertambahnya usia ikan zebra sering mengalami deformitas pada tulang belakang yang menunjukkan bentuk kelengkungan (lordosis, kifosis dan skoliosis). Kelainan tulang belakang juga mungkin berkaitan dengan deregulasi ion kalsium dan fosfor yang diperlukan untuk proses perkembangan (Vasamsetti *et al.*, 2020) serta peningkatan produksi *Reactive Oxygen Rpesies* (ROS) dapat menghambat aktivitas karbonik anhidrase (CA) yang berfungsi untuk mengatur keseimbangan asam-basa dalam darah dan jaringan yang berkaitan dengan tulang (Díaz-Martín *et al.*, 2021).

Kelainan yang terjadi diduga karena konsentrasi yang digunakan yaitu 500 ppm, 520 ppm, 540 ppm, 560 ppm dan 580 ppm. Menurut (Jayasinghe &

Jayawardena, 2019) tingginya konsentrasi dapat meningkatkan terjadinya kelainan pada embrio ikan zebra yang dimana semakin tinggi konsentrasi maka semakin banyak jumlah ekstrak yang dipaparkan, dan semakin banyak senyawa metabolit sekunder yang terserap. Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak kulit buah delima merah yaitu seperti pada hasil uji fitokimia yang menunjukkan bahwa ekstrak kulit dan buah delima merah positif mengandung alkaloid, flavonoid, tannin, terpenoid dan saponin. Senyawa-senyawa tersebut diduga dalam konsentrasi yang tinggi dapat menghambat proses pencernaan dengan menurunkan aktivitas enzim pencernaan makanan dan penyerapan nutrisi yang membuat embrio kelaparan dan mati (Yunita *et al.*, 2009). Kurangnya pasokan nutrisi terutama kalsium dapat menyebabkan keterlambatan pembentukan tulang dalam proses osifikasi (Rita *et al.*, 2008).

Berdasarkan hasil penelitian uji toksisitas akut ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah (*Punica granatum L*) pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*) yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah dan sari buah delima merah termasuk ke dalam kategori practically non-toxic yang dimana bisa dikatakan bahwa kulit buah delima dan sari buah delima merah tersebut aman apabila digunakan untuk pengobatan tradisional. Namun, pada kedua bagian tanaman tersebut juga dapat menimbulkan kelainan pada embrio ikan zebra yaitu seperti kelainan kantung kuning telur, kelainan tulang belakang dan ekor. Maka dari itu perlu perhatian dalam penggunaannya. Dengan adanya hasil penelitian diatas diharapkan dapat memberikan informasi dan bermanfaat bagi masyarakat.

BAB V

KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan dari penelitian ini yaitu:

1. Nilai LC_{50} pada ekstrak kulit buah delima merah pada jam ke-96 dan sari buah delima merah pada jam ke-96 termasuk dalam kategori *practically non-toxic* yaitu pada rentang 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai LC_{50} berturut-turut sebesar 548,0628 ppm dan 569,0161 ppm.
2. Kelainan yang timbul pada embrio ikan zebra setelah paparan ekstrak kulit buah dan buah delima merah (*Punica granatum L*) selama 96 jam yaitu edema kantung kuning telur (*yolk*), kelainan pada tulang belakang serta ekor.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut uji toksisitas akut dengan hewan coba lain dan menggunakan metode ekstraksi selain metode maserasi.
2. Penelitian lebih lanjut uji toksisitas subkronik dan kronik secara *in vivo* menggunakan hewan uji dengan ordo lebih tinggi seperti tikus atau mencit.

DAFTAR PUSTAKA

- Agus Setiani, L., Wiendarlina, I. Y., & Arlindini, A. M. (2023). Acute toxicity test of water and ethanol extract from african leaf (*Gym-nanthemum amygdalina* Del.) on zebra fish embrio (*Danio rerio*). *Journal of Agriculture and Applied Biology*, 4(1), 20–27.
- Andriani. (2016). Karakteristik Anatomi Delima (*Punica granatum* L.). *Stigma Journal of science*, 9(2), 6–7.
- Arsa, A. K., & Achmad, Z. (2020). Ekstraksi Minyak Atsiri Dari Rimpang Temu Ireng (*Curcuma aeruginosa* Roxb) Dengan Pelarut Etanol Dan N-Heksana. *Jurnal Teknologi Technoscintia*, 13(1), 83–94.
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., Groth, D. M., Verdile, G., & Martins, R. N. (2012). Regular care and maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: An introduction. *Journal of Visualized Experiments*, 69.
- Azizan, M., & Jannifar, A. (2023). *Manufaktur Alat Pengurang Kadar Air (Vacuum Dryer) Dalam Crude Palm Oil (Cpo)*. 7(1), 1–4.
- Badaring, D. R., Sari, S. P. M., Nurhabiba, S., Wulan, W., & Lembang, S. A. R. (2020). Uji Ekstrak Daun Maja (*Aegle marmelos* L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Indonesian Journal of Fundamental Sciences*, 6(1), 16.
- Basu, S., & Sachidanandan, C. (2013). Zebrafish: A multifaceted tool for chemical biologists. *Chemical Reviews*, 113(10), 7952–7980.
- BPOM RI. (2014). Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia Nomor 12 Tahun 2014 Tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional. *Badan Pengawas Obat dan Makanan*, 1–25.
- BPOM RI. (2022). Peraturan Badan Pengawas Obat Dan Makanan Nomor 10 Tahun 2022 Tentang Pedoman Uji Toksisitas Praktikum Secara In Vivo. In *Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia*.
- Chahardehi, A. M., Arsad, H., & Lim, V. (2020). Zebrafish as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants. *Plants*, 9(10), 1–35.
- Christou, M., Kavaliauskis, A., Ropstad, E., & Fraser, T. W. K. (2020). DMSO effects larval zebrafish (*Danio rerio*) behavior, with additive and interaction effects when combined with positive controls. *Science of the Total Environment*, 709, 134490.
- Daniela, C., Sihombing Restuana, D., & Simanullang, T. (2023). Pengaruh Perbandingan Sari Buah Mangga dan Sari Daun Mint Serta Konsentrasi

Karagenan Terhadap Mutu Permen Jelly. *Riset Teknologi Pangan Dan Hasil Pertanian (RETIPA)*, 4, 29–37.

- Dewi, I. S., Saptawati, T., & Rachma, F. A. (2021). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit dan Biji Terong Belanda (*Solanum betaceum* Cav.) Phytochemical Screening of Tamarillo Peel and Seeds Ethanol Extracts (*Solanum Betaceum* Cav.). *Prosiding Seminar Nasional UNIMUS*, 4, 1210–1218.
- Díaz-Martín, R. D., Carvajal-Peraza, A., Yáñez-Rivera, B., & Betancourt-Lozano, M. (2021). Short exposure to glyphosate induces locomotor, craniofacial, and bone disorders in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 87(June).
- Eghbali, S., Askari, S. F., Avan, R., & Sahebkar, A. (2021). Therapeutic Effects of *Punica granatum* (Pomegranate): An Updated Review of Clinical Trials. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2021.
- El-Hadary, A. E., & Ramadan, M. F. (2019). Phenolic profiles, antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract. *Journal of Food Biochemistry*, 43(4), 1–9.
- El-Nemr, S. E., Ismail, I. A., & Ragab, M. (1990). Chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruit. *Food / Nahrung*, 34(7), 601–606.
- Ergina, S. N. dan I. D. P. (2014). Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) yang Diekstraksi dengan Pelarut Air dan Etanol. *J. Akad. Kim*, 3(3), 165–172.
- Fajrin, F. I., & Susila, I. (2019). Uji Fitokimia Ekstrak Kulit Petai Menggunakan Metode Maserasi. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi dan Sains*, 1(1), 458–460.
- Fauziyah, N., Widyasanti, A., & Sutresna, Y. (2022). Kajian Pengaruh Konsentrasi Etanol Terhadap Karakteristik Oleoresin Ampas Jahe Merah (*Zingiber officinale* Roscoe) Limbah Penyulingan. *Teknotan*, 16(3), 169.
- Fazry, S., Noordin, M. A. M., Sanusi, S., Noor, M. M., Aizat, W. M., Lazim, A. M., Dyari, H. R. E., Jamar, N. H., Remali, J., Othman, B. A., Law, D., Sidik, N. M., Cheah, Y. H., & Lim, Y. C. (2018). Cytotoxicity and toxicity evaluation of xanthone crude extract on hypoxic human hepatocellular carcinoma and zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Toxics*, 6(4).
- Fikriyah, Y. U., & Nasution, R. S. (2021). Analisis Kadar Air Dan Kadar Abu Pada Teh Hitam yang Dijual di Pasaran dengan Menggunakan Metode Gravimetri. *Amina*, 3(2), 50–54.
- Firnanda, F., Bimo Aksono Herupradoto, E., Rahmawati, K., Kurnijasanti, R.,

- Sukmanadi, M., Hidajati, N., & Kedokteran Hewan Dasar, D. (2021). Uji Toksisitas Ektrak Buah Delima Putih (*Punica granatum L.*) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test Sebagai Kandidat Obat Antikanker Toxicity Testing Of White Pomegranate (*Punica granatum L.*) Fruit Extracts Using Brine Shrimp Lethality Test Method As A. *Journal of Basic Medical Veterinary Firnanda et al. Desember 2021*, 10(2), 45–50.
- Hanani, E. (2015). Analisis Fitokimia (T. V. D. Hadinata & A. Hanif (eds.)). EGC.
- Halimu, R. B., S.Sulistijowati, R., & Mile, L. (2020). Identifikasi kandungan tanin pada *Sonneratia alba*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 5(4), 93–97.
- Hardana, H., & Warganegara, E. (2015). Ekstrak Buah Delima Sebagai Antibiotik Pengobatan Infeksi MRSA. *Majority*, 4(9), 83–87.
- Harling, V. N. Van. (2018). Penentuan Kadar Asam Elagat Ekstrak Metanol. *Sosced*, 1(2), 2–5.
- Hayes, A. J., Reynolds, S., Nowell, M. A., Meakin, L. B., Habicher, J., Ledin, J., Bashford, A., Caterson, B., & Hammond, C. L. (2013). Spinal Deformity in Aged Zebrafish Is Accompanied by Degenerative Changes to Their Vertebrae that Resemble Osteoarthritis. *PLoS ONE*, 8(9), 1–12.
- Hoyberghs, J., Bars, C., Ayuso, M., Van Ginneken, C., Foubert, K., & Van Cruchten, S. (2021). DMSO Concentrations up to 1% are Safe to be Used in the Zebrafish Embryo Developmental Toxicity Assay. *Frontiers in Toxicology*, 3(December), 1–10.
- Insanu, M., Mutia, C., & Artarini, A. (2017). Pengujian Toksisitas in Vitro Ekstrak Dan Fraksi Dari Daun Jambu Air (*Syzygium Aqueum*) Dan Kulit Buah Delima (*Punica Granatum*) Terhadap Sel Vero. *Acta Pharmaceutica Indonesia*, 42(2), 76–83.
- Iswandi. (2022). the Effect Inclusion on Caffeine Levels in Coffee Beans of Surakarta By Uv-Vis Spectrophotometry. *Pharmacon*, 11, 1512–1516.
- Jayasinghe, C. D., & Jayawardena, U. A. (2019). Toxicity Assessment of Herbal Medicine Using Zebrafish Embryos: A Systematic Review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
- Johnson W, W., & Finley, M. T. (2013). Handbook of Acute Toxicity of Chemicals To Fish and Aquatic Invertebrates. In *Psihologija* (Vol. 46, Nomor 4).
- Jumiarni, W. O., & Komalasari, O. (2017). Inventory of Medicines Plant As Utilized By Muna Tribe in Kota Wuna Settlement. *Majalah Obat Tradisional*, 22(1), 45.

- Karimah, U. (2021). Pengadaan Awal Fasilitas Pemeliharaan dan Upaya Perolehan Filial 1 (F1) Ikan Zebra (*Danio rerio*) sebagai Hewan Laboratorium. *Bioscientist : Jurnal Ilmiah Biologi*, 9(1), 142.
- Kementerian Kesehatan RI. (2017). Farmakope Herbal Indonesia Herbal. In *Pocket Handbook of Nonhuman Primate Clinical Medicine*.
- Khairudin, N. A., & Wahyu Saputro. (2022). Klasifikasi Kualitas Mutu Buah Delima Dengan Menggunakan Ekstraksi Gray Level Co-Occurrence Matrix (GlcM) Dan K-Nearest Neighbor (Knn). *Jurnal Informatika Teknologi dan Sains*, 4(3), 273–278.
- Kholifa, M. (2015). Pemanfaatan Ekstrak Etanol Biji Buah Delima sebagai Anti Kanker Lidah sp-c1. *The 2nd University Research Coloquium*, 8(71), 265–272.
- Kim, V. (1972). Probit Analysis. *The Statistician*, 21(3), 222.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310.
- Kurniawan, J., Edrizal, E., & Desnita, E. (2018). Efektifitas Estrak Buah Delima (*Punica granatum*) Secara Topikal Dalam Proses Penyembuhan Luka Mukosa Pada Tikus Putih (Galur Wistar). *B-Dent: Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Baiturrahmah*, 1(2), 126–133.
- Maes, J., Verlooy, L., Buenafe, O. E., de Witte, P. A. M., Esguerra, C. V., & Crawford, A. D. (2012). Evaluation of 14 Organic Solvents and Carriers for Screening Applications in Zebrafish Embryos and Larvae. *PLoS ONE*, 7(10), 1–9.
- Mansur, S. A., Deroyeen, A. F., Indriyanti, M. N., Annisak, A. K., Fajriati, D. R., & Amiruddin, M. (2022). Kandungan Buah Delima (*Punica granatum* L.) dalam Perspektif Al-Qur'an, Sunnah, dan Sains. *Proceedings of International Pharmacy Ulul Albab Conference and Seminar (PLANAR)*, 2, 69.
- Marjoni, M, R, (2016). Dasar-Dasar Fitokimia Untuk Diplomasi III Farmasi (T. Ismail (ed.)). Penerbit Buku Kesehatan.
- Miradita Lestari, N. M., Yusa, N. M., & Ayu Nocianitri, K. (2020). Pengaruh Lama Ekstraksi Menggunakan Ultrasonik Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 9(3), 321.
- Muthmainnah. (2017). Skrining Fitokimia Ssenyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Etanol Buah Delima (*Punica granatum* L.) Dengan Metode Uji Warna. *Media Farmasi*, 4(2), 9–15.

- Novera, Y., Busman, & Edrizal. (2019). Efektivitas Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punicagranatum*) Secara Topikal Terhadap Proses Pembentukan Kembali (Remodelling) Pada Fraktur Tulang Paha Tikus Putih Galur Wistar Betina (*Rattus Novergicus*). *Menara Ilmu*, XIII(10), 1–9.
- Nurhayati, N., Septiarini, A. D., & Aisyah, P. (2023). Uji Ekstrak Biji Kopi Hijau (*Coffea canephora* var. *robusta*) terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus aureus* Secara Difusi. *Publikasi Penelitian Terapan dan Kebijakan*, 6(1), 56–64.
- Nurul, F., Gama, S. I., & Rusli, R. (2023). Pengujian Toksisitas Produk Herbal Secara In Vivo. *Mulawarman Pharmaceutical Conference*, 10.
- OECD. (2013). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. In *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing*.
- Paramita, A., Wibowo, I., & Insanu, M. (2021). Skrining Toksisitas Akut Lima Rimpang Suku Zingiberaceae Menggunakan Embrio Ikan Zebra. *Acta Pharmaceutica Indonesia*, 46(2), 1–9.
- Parikh, D. M. (2015). Vacuum Drying: Basics and application. *Chemical Engineering (United States)*, 122(4), 48–54.
- Prananda, Y., Riza, H., Fajriaty, I., Hasibuan, V. M., & Hadari Nawawi, J. (2015). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Simpung (*Dillenia indica* L.) Sebagai Tahapan Awal Pada Pengujian Toksisitas. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 3(2), 1–13.
- Prasetyo, B., Ma'arif, A. S., Pratiwi, D. W., Udaibah, W., & Abidin, Z. (2021). Skrining Fitokimia Dan Analisis Gc-MS Dari Ekstrak Batang *Punica Granatum* (Studi Ayat Mengenai Delima Dan Qs. Ali Imran [3]: 191). *Prosiding Konferensi Integrasi Interkoneksi Islam Dan Sains*, 3, 127–137.
- Priangani Roswiem, A. (2017). Aktivitas Jus Buah Delima (*Punica granatum* L.) terhadap Peroksidasi Lipid Darah Tikus yang Diinduksi Parasetamol. *Jurnal Kedokteran YARSI*, 22(2), 114–124. h
- Putri Febriati, A., Putty Zahra, F. B., Yundasari, N., & Yuniarsih, N. (2022). Manfaat Ekstrak Buah Delima (*Punica Granatum* L.) Sebagai Zat Aktif dalam Formulasi Sediaan Kosmetika. *Jurnal Health Sains*, 3(6), 793–797.
- RI, D. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*.
- Rita, W. S. R., Suirta, I. W., & Sabikin, A. (2008). Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Yang Berpotensi Sebagai Antitumor Pada Daging Buah Pare (*Momordica Charantia* L.). *Jurnal Kimia*, Vol. 2 No., 1–6.
- Rusli, Z., Sari, B. L., Wardatun, S., & Aristyo, W. (2020). *Skrining Toksisitas Akut Beberapa Fraksi Buah Karonda (Carossa carandas L.) Pada Embrio*

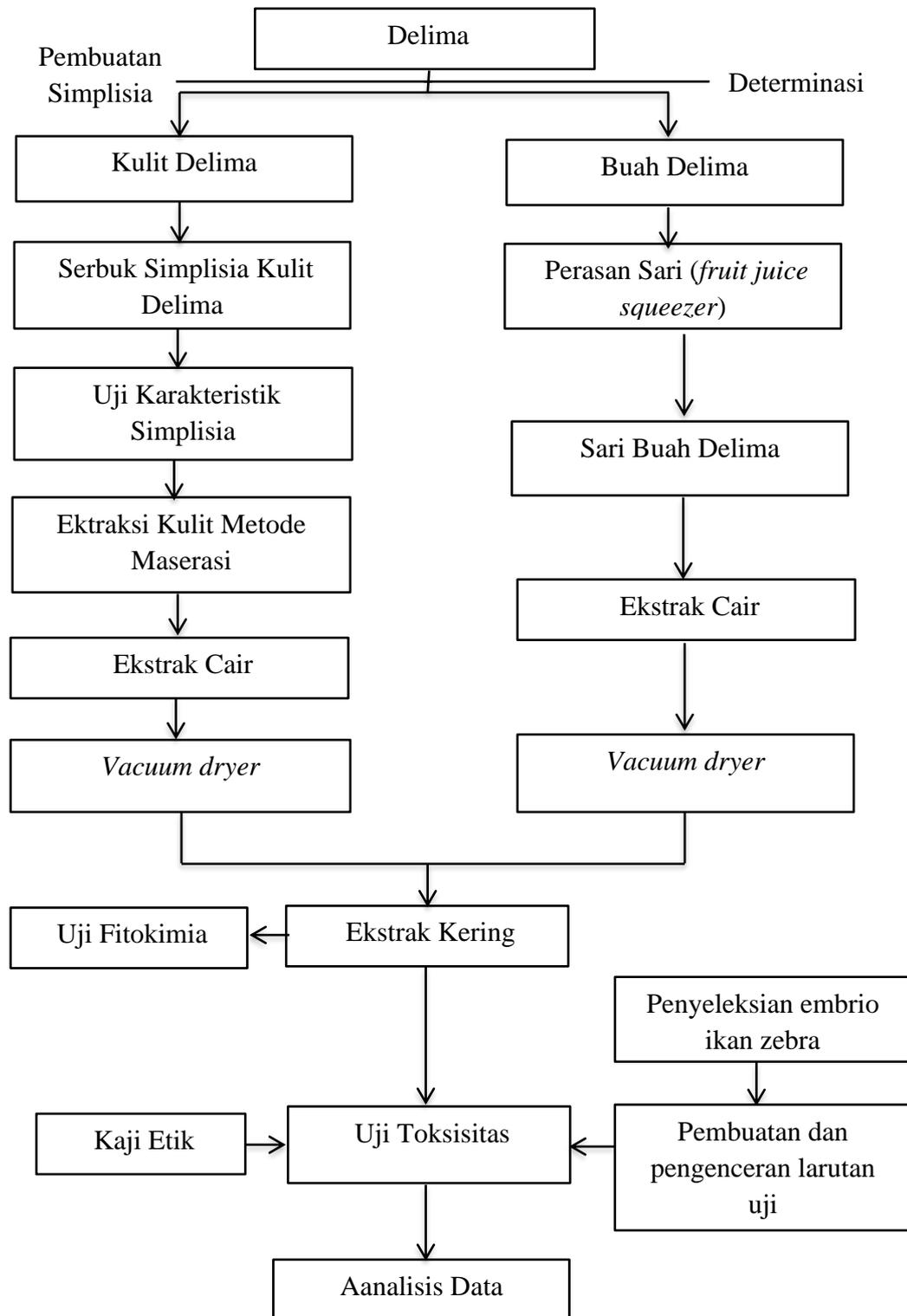
Zebrafish (Danio rerio). 10(1), 42–53.

- Sadat Sadeghi, M. (2018). Evaluation of toxicity and lethal concentration (LC50) of silver and selenium nanoparticle in different life stages of the fish *Tenualosa ilish* (Hamilton 1822). *Oceanography & Fisheries Open access Journal*, 7(5).
- Sant, K. E., & Timme-laragy, A. R. (2019). Nutrition in the Early Embryo. *Curr Environ Health Rep.*, 5(1), 125–133.
- Sari, B. L., Triastinurmiatiningsih, T., & Haryani, T. S. (2020). Optimasi Metode Microwave-Assisted Extraction (MAE) untuk Menentukan Kadar Flavonoid Total Alga Coklat Padina australis. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 16(1), 38.
- 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.
- Syamsul, E. S., Amanda, N. A., & Lestari, D. (2020). Perbandingan Ekstrak Lamur *Aquilaria malaccensis* Dengan Metode Maserasi Dan Refluks. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*, 2(2), 97–104.
- Utami, P. Y., Umar, H. Abdul, Syahrani, R., & Kadullah, I. (2017). Standardisasi Simplisia dan Ekstrak Etanol Daun Leilem (*Clerodendrum minahassae* Teijsm. & Binn.) Reny Syahrani Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar. *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*, 2(1), 32–39.
- 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).
- von Hellfeld, R., Brotzmann, K., Baumann, L., Strecker, R., & Braunbeck, T. (2020). Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Sciences Europe*, 32(1).
- Vonna, A., Desiyana, L. S., Hafsyari, R., & Illian, D. N. (2021). Analisis Fitokimia dan Karakterisasi dari Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.). *Indonesia. Jurnal Bioleuser*, 5(3), 8–12.
- Wahid, R. A. H. (2020). Pengaruh Polivinilpirolidon sebagai Polimer Mukoadhesif terhadap Sifat Fisik Patch Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum* L.). *Lambung Farmasi: Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 1(2), 85.
- Wendersteyt, N. V., Wewengkang, D. S., & Abdullah, S. S. (2021). Uji Aktivitas Antimikroba Dari Ekstrak Dan Fraksi Ascidian *Herdmania momus* Dari Perairan Pulau Bangka Likupang Terhadap Pertumbuhan Mikroba

- Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* Dan *Candida albicans*. *Pharmacon*, 10(1), 706.
- Wijanti, T., Pahlani, E., & Lestari, R. K. (2023). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Delima (*Punica granatum L.*) Dari Dua Metode Ekstraksi. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada: Jurnal Ilmu Ilmu Keperawatan, Analisis Kesehatan dan Farmasi*, 23(2), 14–22.
- Wijaya, R. C. (2020). Lethal Concentration 50% OF Pathchouli Oil (*Pogostemon cablin*) Towards Zebrafish Embryo(*Danio rerio*). *Herb-Medicine Journal*, 3(2), 1.
- Yumnamcha, T., Roy, D., Devi, M. D., & Nongthomba, U. (2015). Evaluation of developmental toxicity and apoptotic induction of the aqueous extract of *Millettia pachycarpa* using zebrafish as model organism. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 97(10), 1363–1381.
- 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.
- Yunita, E. A., Suprpti, N. H., & Hidayat, J. W. (2009). Pengaruh Ekstrak daun Teklan (*eupatorium riparium*) terhadap Mortalitas dan Perkembangan Larva *Aedes aegypti*. *Bioma*, 11(1), 11–17.
- Zarfeshany, A., Asgary, S., & Javanmard, S. (2014). Potent health effects of pomegranate. *Advanced Biomedical Research*, 3(1), 100.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Alur Penelitian



Lampiran 2. Surat Determinasi



PT. PALAPA MUDA PERKASA
CHEMICALS PRODUCT AND CHEMICAL ANALYSIS SERVICE
 Jalan Kalimulya No 23 Cilodong, Kota Depok Jawa Barat, 16417
 Telepon : 08118397999, Email : palapamudaperkasa2017@gmail.com



Depok, 10 Juni 2024

Nomor : 996/IPH.1.06/If.10/I/2024
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil Identifikasi/Determinasi Tumbuhan

Kepada Yth,
 Sdr(i). **ALFIA SELFIANI**
 NIM. **066120202**
 UNIVERSITAS PAKUAN
 Jalan Ciheuleut Pakuan No.162, RT.3/RW.6 Kota Bogor, Jawa Barat 16121

Dengan hormat,

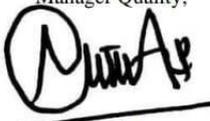
Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi / determinasi tumbuhan yang saudara kirimkan ke“PMP”, adalah :

No	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Buah Delima	<i>P. granatum</i>	<i>Lythraceae</i>

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Depok, 10 Juni 2024

Manager Quality,


 Novita

Lampiran 3. Surat Kaji Etik

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

**SURAT KEPUTUSAN KOMITE ETIK
No. 026 /KEPHP-UNPAK/06-2024**

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 Ekstrak Kulit Buah Dan Buah Delima (*Punica granatum L.*) Pada Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*)

Peneliti Utama : Alfia Sefiyani
Institusi : Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan Bogor

Dan MENERIMA rancangan penelitian tersebut.

Tanggal ditetapkan

Bogor, 7 Juni 2024

Sekretaris Komite Etik



Nisa Najwa Rokhmah, M.Farm., Apt

Ketua Komite Etik



Drh. Min Rahminiwati, PhD

Lampiran 4. Perhitungan Rendemen Serbuk Simplisia dan Ekstrak

1. Rendemen Simplisia Serbuk Simplisia Kulit Buah Delima

$$\begin{aligned}
 \text{Bobot Kulit Buah Segar} &= 864 \text{ gram} \\
 \text{Bobot Serbuk Simplisia} &= 460 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Bobot Serbuk Simplisia}}{\text{Bobot Kulit Buah Segar}} \times 100\% \\
 &= \frac{460 \text{ gram}}{864 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 53,24\%
 \end{aligned}$$

2. Rendemen Ekstrak

a. Ekstrak Kulit Buah Delima

$$\begin{aligned}
 \text{Bobot Ekstrak} &= 64 \text{ gram} \\
 \text{Bobot Serbuk Simplisia} &= 300 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Serbuk Sumplisia}} \times 100\% \\
 &= \frac{64 \text{ gram}}{300 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 21,33\%
 \end{aligned}$$

b. Ekstrak Sari Buah Delima

$$\begin{aligned}
 \text{Bobot Buah Segar} &= 1323 \text{ gram} \\
 \text{Bobot Serbuk Sari Buah} &= 18 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Buah Segar}} \times 100\% \\
 &= \frac{18 \text{ gram}}{1323 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 1,36\%
 \end{aligned}$$

Lampiran 5. Hasil dan Perhitungan Kadar Air Simplisia dan Ekstrak

Perlakuan	Ulangan	Cawan isi Sebelum Pemanasan (gram)	Bobot Sampel (gram)	Berat Akhir (gram)	Kadar (%)	Rata- Rata Kadar (%) ± SD
Simplisia Kulit Buah Delima	1	77,3725	2,0291	77,2642	5,8203	5,3859 ± 0,6143
				77,2547		
	2	77,2237	2,0418	77,2544	4,9515	
				77,1259		
Ekstrak Kulit Buah Delima	1	60,3037	2,0595	60,2655	2,0102	4,3630 ± 3,3274
				60,2624		
	2	57,7638	2,0191	60,2623	6,7149	
				57,6299		
Ekstrak Sari Buah Delima	1	61,7730	2,1023	61,6580	5,6795	4,7791 ± 1,2734
				61,6541		
	2	54,4003	2,176	61,6536	3,8787	
				54,3331		
				54,3173		
				54,3159		

Rumus dan Perhitungan

$$\text{Kadar Air} = \frac{\text{Cawan isi sebelum pemanasan}(g) - \text{Cawan isi setelah pemanasan}(g)}{\text{Bobot awal sampel}(g)} \times 100\%$$

$$= \frac{77,3725 - 77,2544}{2,0291} \times 100\% = 5,8203\%$$

Lampiran 6. Hasil dan Perhitungan Kadar Abu Simplisia dan Ekstrak

Perlakuan	Ulangan	Krus Kosong (gram)	Bobot Sampel (gram)	Krus + Abu (gram)	Kadar (%)	Rata-Rata Kadar (%) ± SD
Simplisia Kulit Buah	1	38,6407	2,0178	38,6988	2,0071	2,6711 ± 0,9390
				38,6832		
				38,6812		
Delima	2	39,1526	2,0899	39,2322	3,3351	± 0,9390
				39,2242		
				39,2223		
Ekstrak Kulit Buah	1	46,0574	2,0867	46,1116	1,4185	2,1773 ± 1,3382
				46,0894		
				46,0870		
Delima	2	45,0642	2,0436	45,1323	2,9360	± 1,3382
				45,1263		
				45,1242		
Ekstrak Sari Buah	1	42,2952	2,0797	42,3596	2,1590	1,5941 ± 0,5197
				42,3421		
				42,3401		
Delima	2	38,7203	2,0307	38,7493	1,0292	± 0,5197
				38,7442		
				38,7412		

Rumus dan Perhitungan

$$\text{Kadar Abu} = \frac{(\text{bobot krus} + \text{abu simplisia})(g) - \text{bobot krus kosong}(g)}{\text{Bobot ampel}(g)} \times 100\%$$

$$= \frac{38,6812 - 38,6407}{2,0178} \times 100\% = 2,0071\%$$

Lampiran 7. Dokumentasi Pembuatan simplisia Dan Ekstrak



Pembuatan Serbuk Simplisia Kulit
Buah Delima



Perasaan Sari Buah Delima Merah



Metode Maserasi Kulit Buah Delima



Vaccum dry

Lampiran 8. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kulit Dan Sari Buah Delima Merah

Identifikasi Senyawa	Pereaksi	Keterangan	
		Ekstrak Kulit Buah Delima Merah	Ekstrak Sari Buah Delima Merah
Alkaloid	<i>Mayer</i>		
	<i>Dragendorff</i>		
	<i>Bouchardat</i>		
Flavonoid	Sebuk Mg + HCl P		
	Sebuk Zn + HCl P		
Tanin	Gelatin 10%		
	FeCl_3		

Terpenoid	<i>Liebermann- Bouchard</i>	 A test tube held by a blue-gloved hand, containing a clear liquid with a small amount of orange precipitate at the bottom. The test tube has a label with 'VREX' and 'Liebermann-Bouchard'.	 A test tube held by a blue-gloved hand, containing a clear liquid with a small amount of orange precipitate at the bottom. The test tube has a label with 'VREX' and 'Liebermann-Bouchard'.
Saponin		 A test tube held by a blue-gloved hand, containing a clear liquid with a small amount of orange precipitate at the bottom. The test tube has a label with 'VREX' and 'Liebermann-Bouchard'.	 A test tube held by a blue-gloved hand, containing a clear liquid with a small amount of red liquid at the bottom. The test tube has a label with 'VREX' and 'Liebermann-Bouchard'.

Lampiran 9. Perhitungan Pembuatan dan Pengenceran Larutan Uji

1. Pembuatan Larutan Induk 4000 ppm

$$4000 \text{ ppm} = 400 \text{ mg dalam } 100 \text{ mL}$$

2. Pengenceran Larutan Uji

$$\text{Rumus Pengenceran } V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

a. Uji Pendahuluan

- 200 ppm

$$V_1 \times 4000 \text{ ppm} = 200 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{200 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{4000 \text{ ppm}}$$

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

- 300 ppm

$$V_1 \times 4000 \text{ ppm} = 300 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{300 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{4000 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 7,5 \text{ mL}$$

- 400 ppm

$$V_1 \times 4000 \text{ ppm} = 400 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{400 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{4000 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 10 \text{ mL}$$

- 500 ppm

$$V_1 \times 4000 \text{ ppm} = 500 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{500 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{4000 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 12,5 \text{ mL}$$

- 600 ppm

$$V_1 \times 4000 \text{ ppm} = 600 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{600 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{4000 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 15 \text{ mL}$$

b. Uji Lanjut

- 500 ppm

$$V_1 \times 4000 \text{ ppm} = 200 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{500 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{4000 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 12,5 \text{ mL}$$

- 520 ppm

$$V_1 \times 4000 \text{ ppm} = 300 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{520 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{4000 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 13 \text{ mL}$$

- 540 ppm

$$V_1 \times 4000 \text{ ppm} = 400 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{540 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{4000 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 13,5 \text{ mL}$$

- 560 ppm

$$V_1 \times 4000 \text{ ppm} = 500 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{560 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{4000 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 14 \text{ mL}$$

- 580 ppm

$$V_1 \times 4000 \text{ ppm} = 600 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{580 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}}{4000 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 14,5 \text{ mL}$$

Lampiran 10. Tabel Probit

Analisis probit digunakan untuk menentukan toksisitas antara sampel (ekstrak kulit dan buah delima merah) terhadap organisme hidup (embrio ikan zebra) dengan menguji respons hewan uji dibawah berbagai konsentrasi ekstrak dengan titik akhir nilai LC₅₀.

%	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	4,16	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	4,55	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	5,92	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

(Kim, 1972)

Lampiran 11. Perhitungan nilai LC₅₀

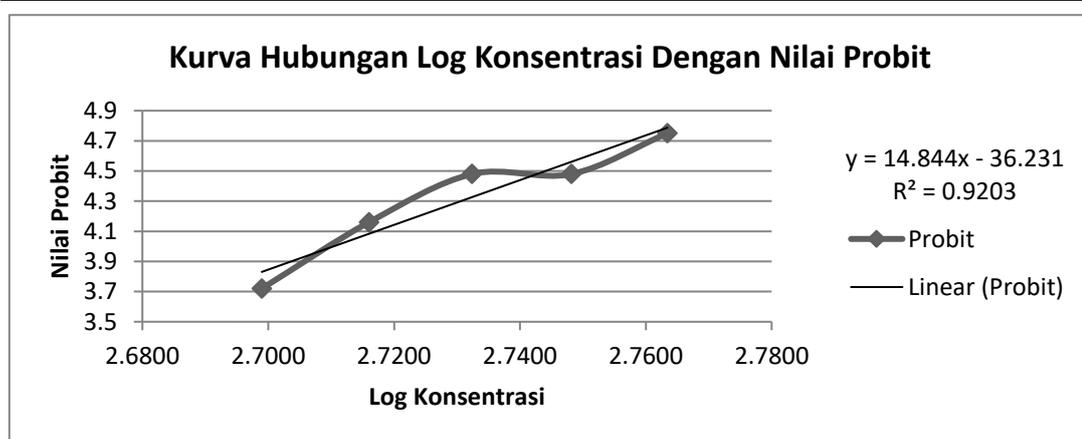
Perhitungan Nilai LC₅₀ dapat diperoleh menggunakan tabel probit dan metode analisis *Microspft Office Excel* dengan persamaan garis lurus antara log konsentrasi (sumbu x) dan nilai probit (sumbu y) sehingga diperoleh $y = bx + a$. Nilai LC₅₀ diperoleh melalui perhitungan *Microspft Office Excel*.

a. Ekstrak Kulit Buah Delima Merah

1. LC₅₀ pada jam ke-24

Ulangan 1

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	3,72	10	9	1	10%
520	2,7160	4,16	10	8	2	20%
540	2,7324	4,48	10	7	3	30%
560	2,7482	4,48	10	7	3	30%
580	2,7634	4,75	10	6	4	40%



$$y = bx + a$$

$$y = 14,844x + (-36,231)$$

$$y = 5$$

$$y = a + bx$$

$$x = (y-a)/b$$

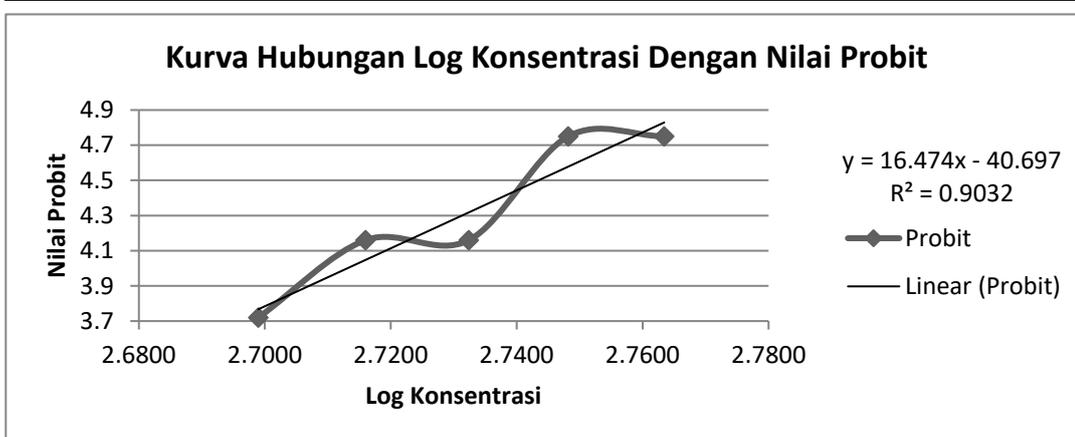
$$x = (5 - (-36,231))/14,844$$

$$x = 2,7776$$

$$\text{Antilog } x = 599,2673 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Ulangan 2

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	3,72	10	9	1	10%
520	2,7160	4,16	10	8	2	20%
540	2,7324	4,16	10	8	2	20%
560	2,7482	4,75	10	6	4	40%
580	2,7634	4,75	10	6	4	40%



$$y = bx + a$$

$$x = (y-a)/b$$

$$y = 16,474x + (-40,697)$$

$$x = (5 - (-40,697))/16,474$$

$$y = 5$$

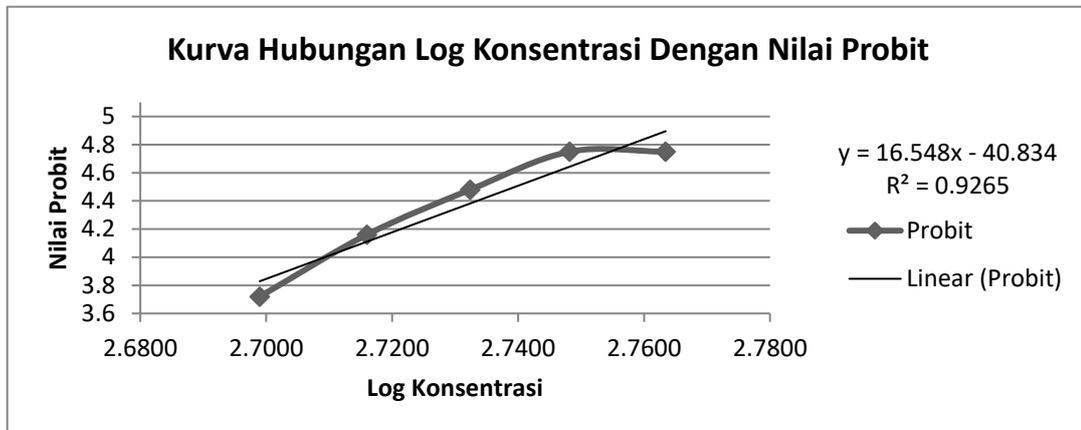
$$x = 2,7739$$

$$y = a + bx$$

$$\text{Antilog } x = 594,1363 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Ulangan 3

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	3,72	10	9	1	10%
520	2,7160	4,16	10	8	2	20%
540	2,7324	4,75	10	7	3	30%
560	2,7482	4,75	10	6	4	40%
580	2,7634	4,75	10	6	4	40%



$$y = bx + a$$

$$x = (y-a)/b$$

$$y = 16,548x + (-40,834)$$

$$x = (5 - (-40,834))/16,548$$

$$y = 5$$

$$x = 2,7698$$

$$y = a + bx$$

$$\text{Antilog } x = 588,5193 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

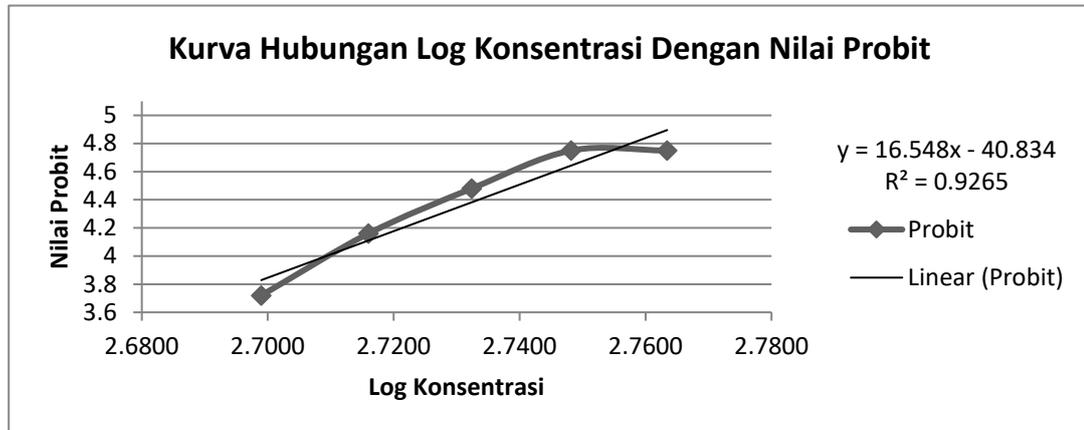
Rata-Rata Nilai LC₅₀ pada Jam ke-24

Ulangan Ke	Nilai LC ₅₀ (ppm)
1	599,2673
2	594,1363
3	588,5193
Rata-rata	593,9743

2. LC₅₀ pada jam ke-48

Ulangan 1

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	3,72	10	9	1	10%
520	2,7160	4,16	10	8	2	20%
540	2,7324	4,75	10	7	3	30%
560	2,7482	4,75	10	6	4	40%
580	2,7634	4,75	10	6	4	40%



$$y = bx + a$$

$$x = (y-a)/b$$

$$y = 16,548x + (-40,834)$$

$$x = (5 - (-40,834))/16,548$$

$$y = 5$$

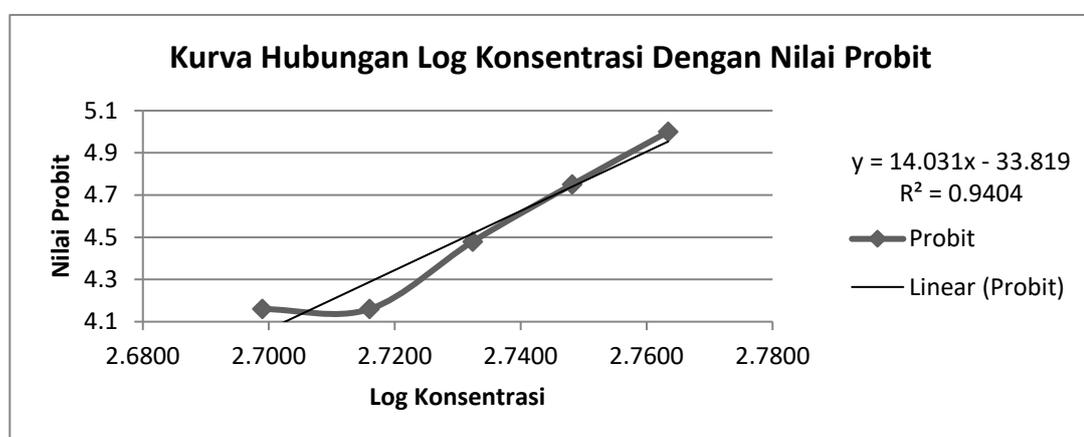
$$x = 2,7698$$

$$y = a + bx$$

$$\text{Antilog } x = 588,5193 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Ulangan 2

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	4,16	10	8	2	20%
520	2,7160	4,16	10	8	2	20%
540	2,7324	4,48	10	7	3	30%
560	2,7482	4,75	10	6	4	40%
580	2,7634	5,00	10	5	5	50%



$$y = bx + a$$

$$y = 14,031x + (-33,819)$$

$$y = 5$$

$$y = a + bx$$

$$x = (y-a)/b$$

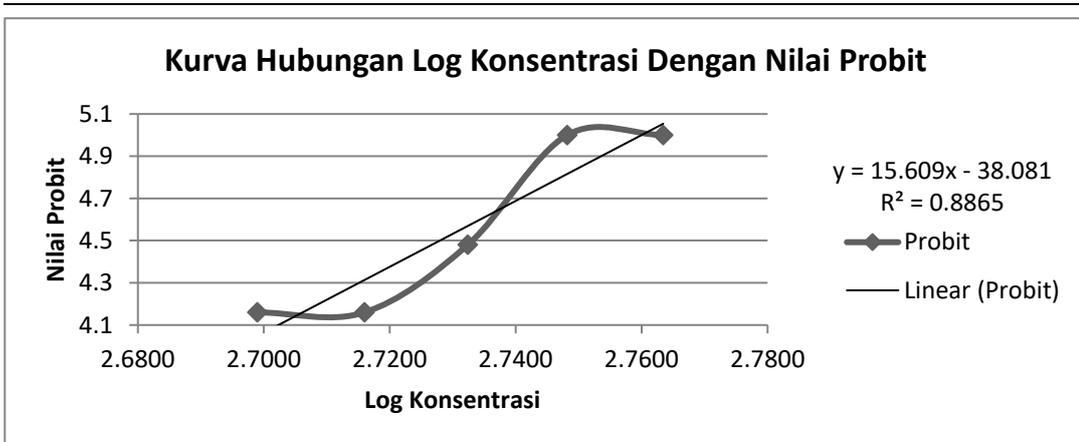
$$x = (5 - (-33,819))/14,031$$

$$x = 2,7667$$

$$\text{Antilog } x = 584,3318 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Ulangan 3

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	4,16	10	8	2	20%
520	2,7160	4,16	10	8	2	20%
540	2,7324	4,48	10	7	3	30%
560	2,7482	5,00	10	5	5	50%
580	2,7634	5,00	10	5	5	50%



$$y = bx + a$$

$$y = 15,609x + (-38,081)$$

$$y = 5$$

$$y = a + bx$$

$$x = (y-a)/b$$

$$x = (5 - (-38,081))/15,609$$

$$x = 2,7600$$

$$\text{Antilog } x = 575,4535 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

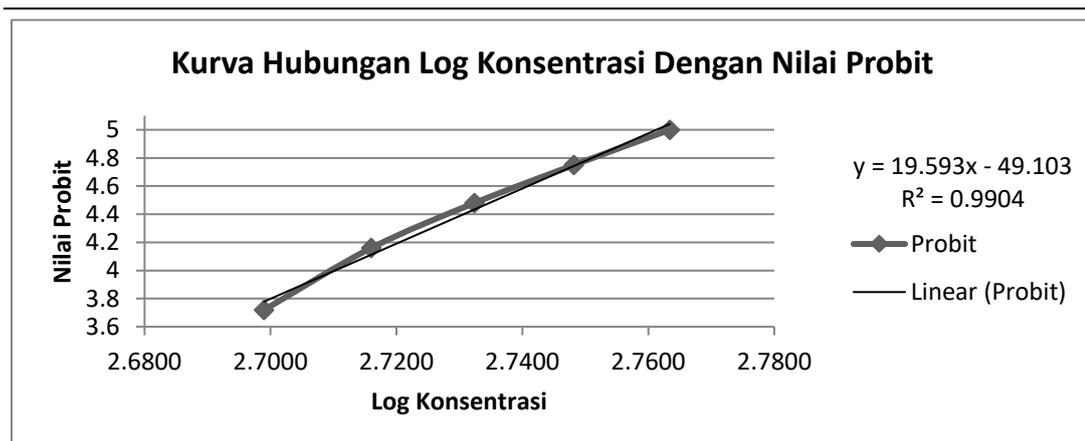
Rata-Rata Nilai LC₅₀ pada Jam ke-48

Ulangan Ke	Nilai LC ₅₀ (ppm)
1	588,5193
2	584,3318
3	575,4535
Rata-rata	582,7682

3. LC₅₀ pada jam ke-72

Ulangan 1

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	3,72	10	9	1	10%
520	2,7160	4,16	10	8	2	20%
540	2,7324	4,48	10	7	3	30%
560	2,7482	4,75	10	6	4	40%
580	2,7634	5,00	10	5	5	50%



$$y = bx + a$$

$$y = 19,593x + (-49,103)$$

$$y = 5$$

$$y = a + bx$$

$$x = (y-a)/b$$

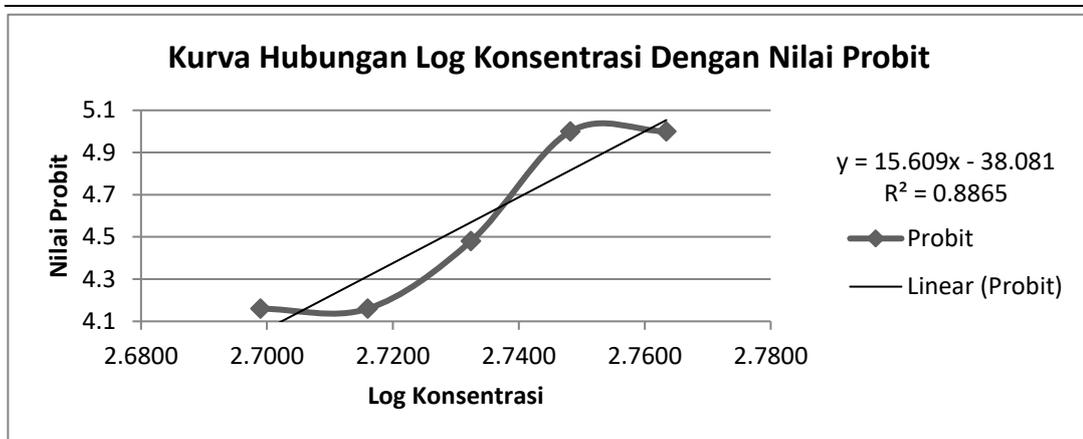
$$x = (5 - (-49,103))/19,593$$

$$x = 2,7613$$

$$\text{Antilog } x = 577,2226 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Ulangan 2

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	4,16	10	8	2	20%
520	2,7160	4,16	10	8	2	20%
540	2,7324	4,48	10	7	3	30%
560	2,7482	5,00	10	5	5	50%
580	2,7634	5,00	10	5	5	50%



$$y = bx + a$$

$$x = (y-a)/b$$

$$y = 15,609x + (-38,081)$$

$$x = (5 - (-38,081))/15,609$$

$$y = 5$$

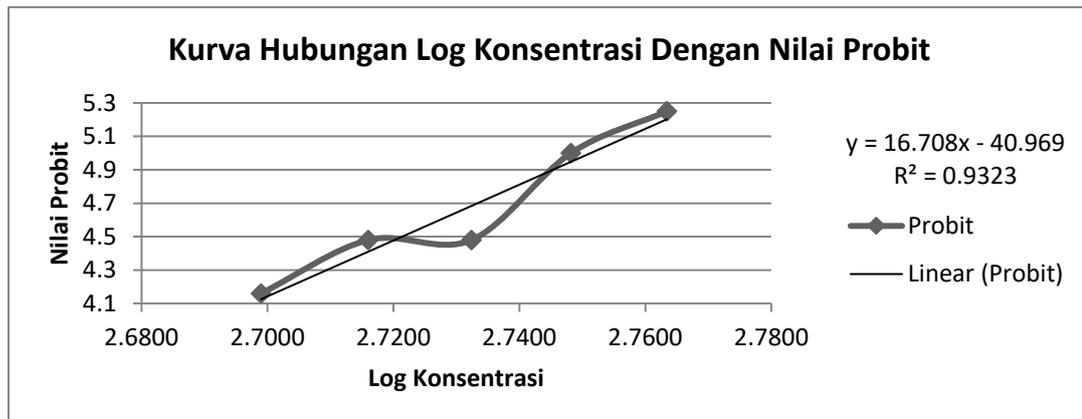
$$x = 2,7600$$

$$y = a + bx$$

$$\text{Antilog } x = 575,4535 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Ulangan 3

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	4,16	10	8	2	20%
520	2,7160	4,48	10	7	3	30%
540	2,7324	4,48	10	7	3	30%
560	2,7482	5,00	10	5	5	50%
580	2,7634	5,25	10	4	6	60%



$$y = bx + a$$

$$x = (y-a)/b$$

$$y = 16,708x + (-40,969)$$

$$x = (5 - (-40,969))/16,708$$

$$y = 5$$

$$x = 2,7513$$

$$y = a + bx$$

$$\text{Antilog } x = 564,0489 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

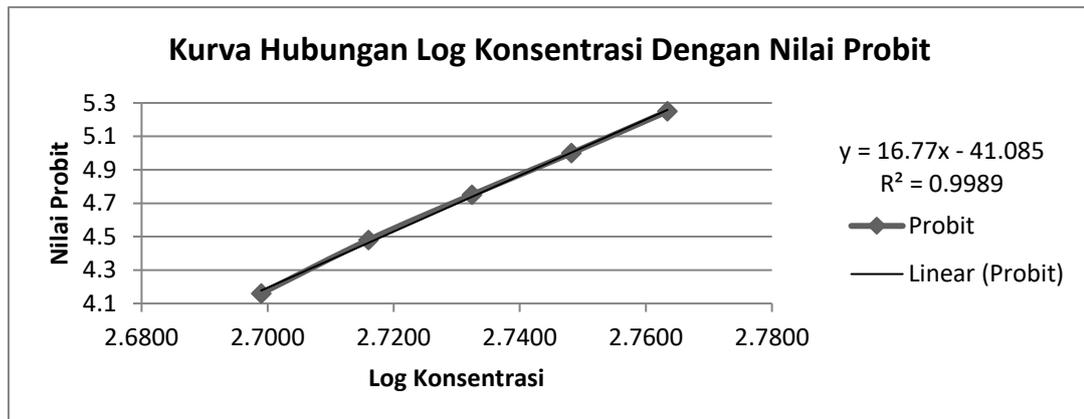
Rata-Rata Nilai LC₅₀ pada Jam ke-72

Ulangan Ke	Nilai LC ₅₀ (ppm)
1	577,2226
2	575,4535
3	564,0489
Rata-rata	572,2417

4. LC₅₀ pada jam ke-96

Ulangan 1

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	4,16	10	8	2	20%
520	2,7160	4,48	10	7	3	30%
540	2,7324	4,75	10	6	4	40%
560	2,7482	5,00	10	5	5	50%
580	2,7634	5,25	10	4	6	60%



$$y = bx + a$$

$$x = (y-a)/b$$

$$y = 16,77x + (-41,085)$$

$$x = (5 - (-41,085))/16,77$$

$$y = 5$$

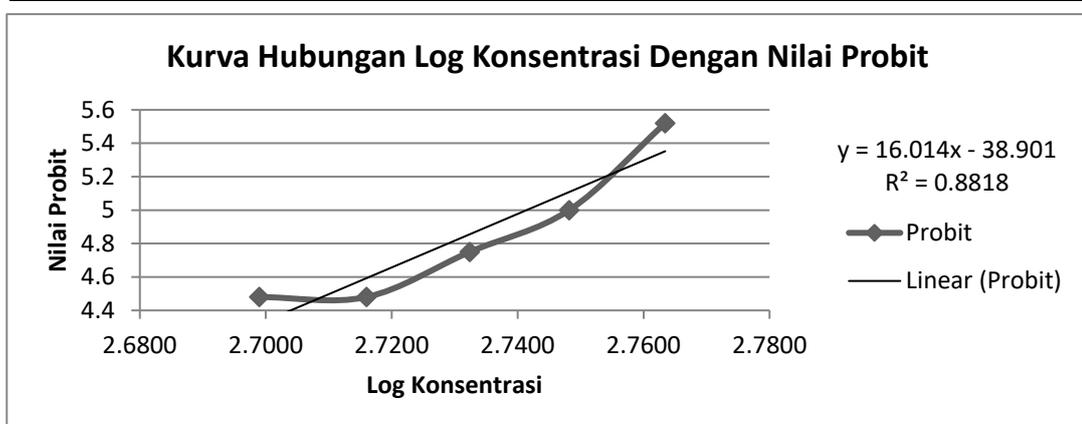
$$x = 2,7481$$

$$y = a + bx$$

$$\text{Antilog } x = 559,8375 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Ulangan 2

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	4,16	10	8	3	30%
520	2,7160	4,16	10	7	3	30%
540	2,7324	4,75	10	6	4	40%
560	2,7482	5,00	10	5	5	50%
580	2,7634	5,52	10	4	7	70%



$$y = bx + a$$

$$y = 16,014x + (-38,901)$$

$$y = 5$$

$$y = a + bx$$

$$x = (y-a)/b$$

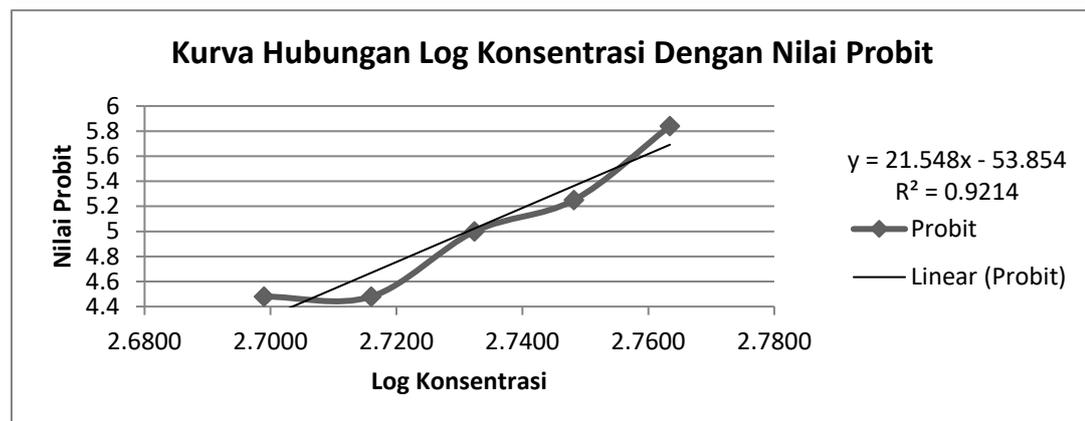
$$x = (5 - (-38,901)) / 16,014$$

$$x = 2,7414$$

$$\text{Antilog } x = 551,3327 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Ulangan 3

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	4,48	10	7	3	20%
520	2,7160	4,48	10	7	3	30%
540	2,7324	5,00	10	5	5	40%
560	2,7482	5,25	10	4	6	50%
580	2,7634	5,84	10	2	8	60%



$$y = bx + a$$

$$y = 21,584x + (-53,854)$$

$$y = 5$$

$$y = a + bx$$

$$x = (y-a)/b$$

$$x = (5 - (-53,854)) / 21,584$$

$$x = 2,7267$$

$$\text{Antilog } x = 533,0182 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Rata-Rata Nilai LC₅₀ pada Jam ke-96

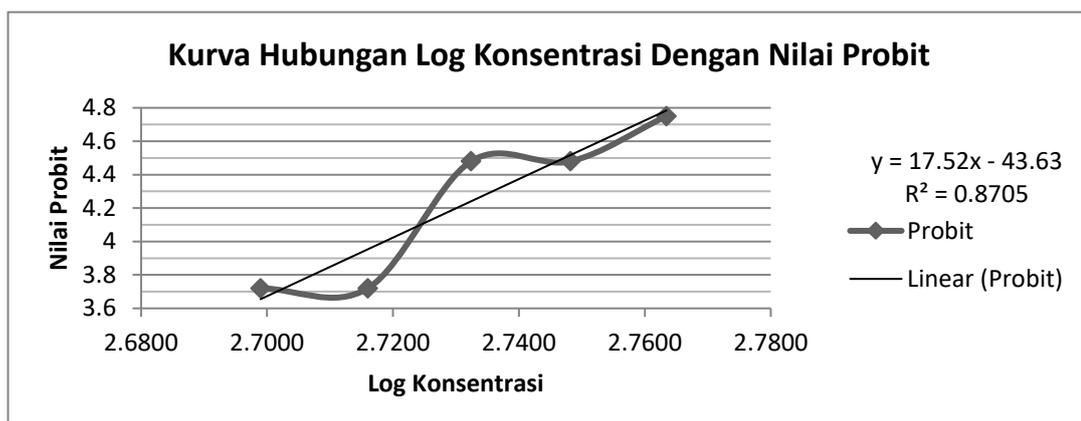
Ulangan Ke	Nilai LC ₅₀ (ppm)
1	559,8375
2	551,3327
3	533,0182
Rata-rata	548,0628

b. Ekstrak Sari Buah Delima Merah

1. LC₅₀ pada jam ke-24

Ulangan 1

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	3,72	10	9	1	10%
520	2,7160	3,72	10	9	1	10%
540	2,7324	4,48	10	7	3	30%
560	2,7482	4,48	10	7	3	30%
580	2,7634	4,75	10	6	4	40%



$$y = bx + a$$

$$x = (y-a)/b$$

$$y = 17,52x + (-43,63)$$

$$x = (5 - (-43,63))/17,52$$

$$y = 5$$

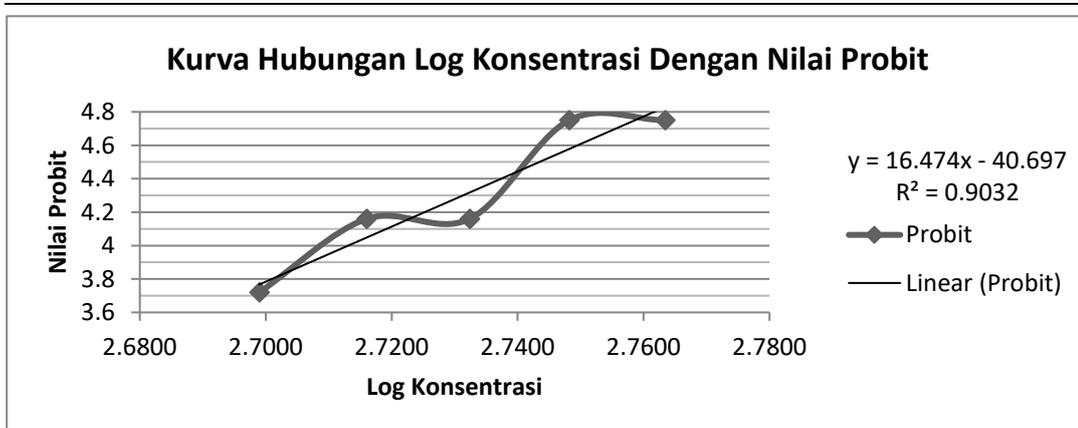
$$x = 2,7757$$

$$y = a + bx$$

$$\text{Antilog } x = 596,6023 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Ulangan 2

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	3,72	10	9	1	10%
520	2,7160	4,16	10	8	2	20%
540	2,7324	4,16	10	8	2	20%
560	2,7482	4,75	10	6	4	40%
580	2,7634	4,75	10	6	4	40%



$$y = bx + a$$

$$x = (y-a)/b$$

$$y = 16,474x + (-40,697)$$

$$x = (5 - (-40,697))/16,474$$

$$y = 5$$

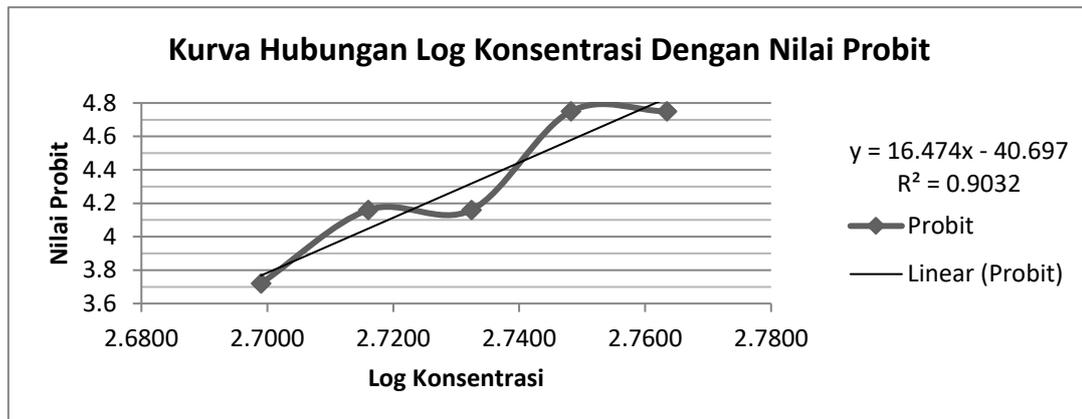
$$x = 2,7739$$

$$y = a + bx$$

$$\text{Antilog } x = 594,1363 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Ulangan 3

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	3,72	10	9	1	10%
520	2,7160	4,16	10	8	2	20%
540	2,7324	4,16	10	8	2	20%
560	2,7482	4,75	10	6	4	40%
580	2,7634	4,75	10	6	4	40%



$$y = bx + a$$

$$x = (y-a)/b$$

$$y = 16,474x + (-40,697)$$

$$x = (5 - (-40,697))/16,474$$

$$y = 5$$

$$x = 2,7739$$

$$y = a + bx$$

$$\text{Antilog } x = 594,1363 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

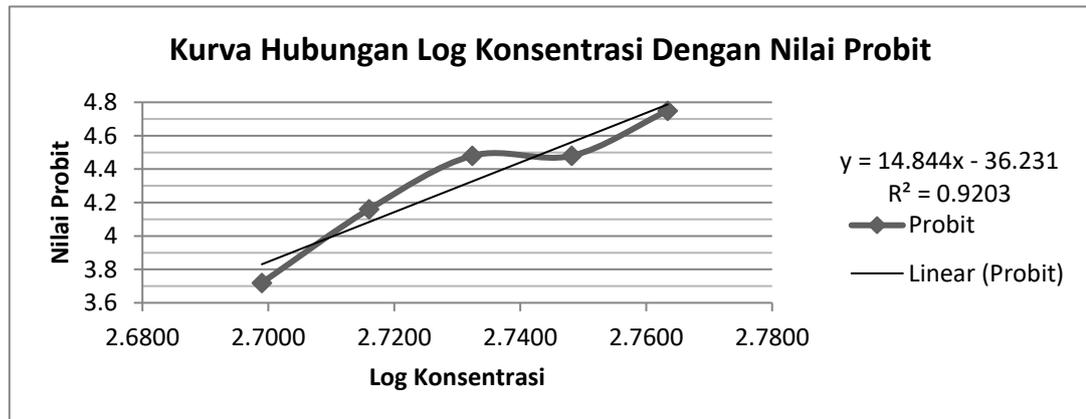
Rata-Rata Nilai LC₅₀ pada Jam ke-24

Ulangan Ke	Nilai LC ₅₀ (ppm)
1	596,6023
2	594,1363
3	594,1363
Rata-rata	594,9583

2. LC₅₀ pada jam ke-48

Ulangan 1

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	3,72	10	9	1	10%
520	2,7160	3,72	10	8	2	20%
540	2,7324	4,48	10	7	3	30%
560	2,7482	4,48	10	7	3	30%
580	2,7634	4,75	10	6	4	40%



$$y = bx + a$$

$$x = (y-a)/b$$

$$y = 14,884x + (-36,231)$$

$$x = (5 - (-36,231))/14,884$$

$$y = 5$$

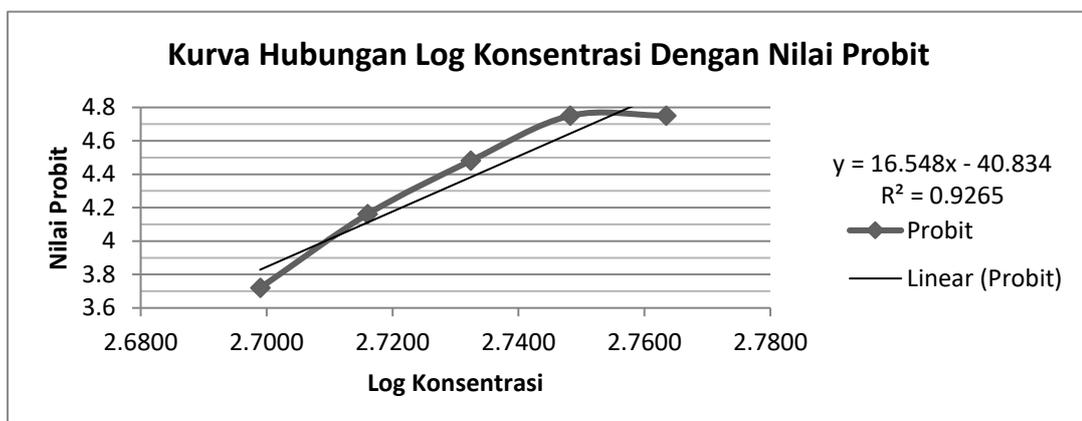
$$x = 2,7776$$

$$y = a + bx$$

$$\text{Antilog } x = 599,2673 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Ulangan 2

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	3,72	10	9	1	10%
520	2,7160	4,16	10	8	2	20%
540	2,7324	4,48	10	7	3	30%
560	2,7482	4,75	10	6	4	40%
580	2,7634	4,75	10	6	4	40%



$$y = bx + a$$

$$y = 16,548x + (-40,834)$$

$$y = 5$$

$$y = a + bx$$

$$x = (y-a)/b$$

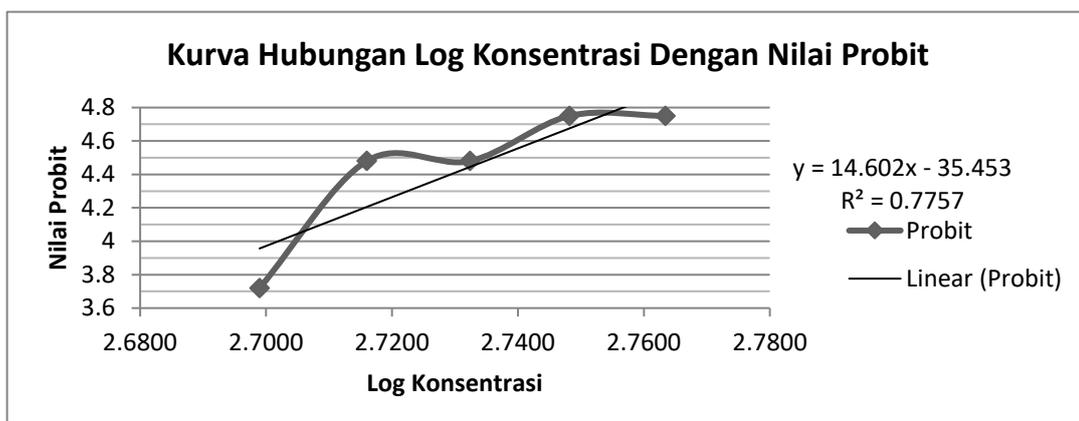
$$x = (5 - (-40,834)) / 16,548$$

$$x = 2,7698$$

$$\text{Antilog } x = 588,5193 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Ulangan 3

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	3,72	10	8	1	10%
520	2,7160	4,48	10	8	3	30%
540	2,7324	4,48	10	7	3	30%
560	2,7482	4,75	10	6	4	40%
580	2,7634	4,75	10	6	4	40%



$$y = bx + a$$

$$y = 14,602x + (-35,453)$$

$$y = 5$$

$$y = a + bx$$

$$x = (y-a)/b$$

$$x = (5 - (-35,453)) / 14,602$$

$$x = 2,7704$$

$$\text{Antilog } x = 589,3509 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

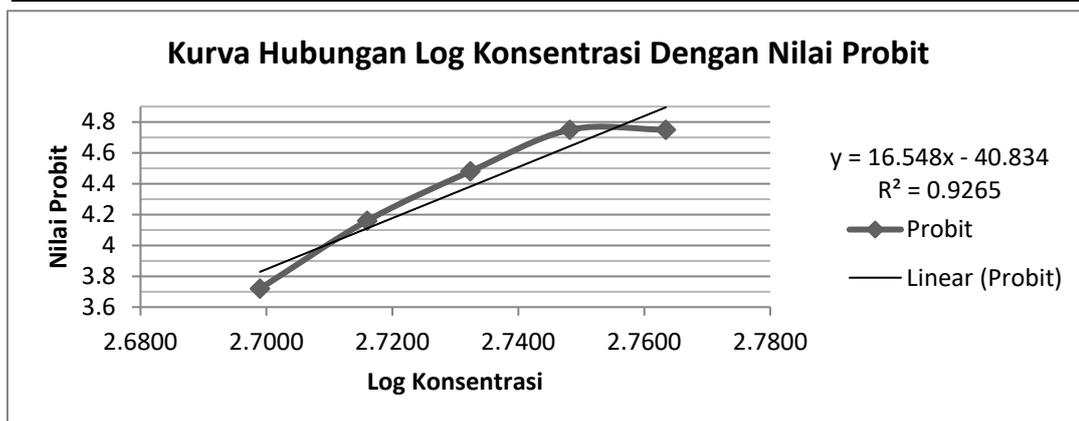
Rata-Rata Nilai LC₅₀ pada Jam ke-48

Ulangan Ke	Nilai LC ₅₀ (ppm)
1	599,2673
2	588,5193
3	589,3509
Rata-rata	592,3792

3. LC₅₀ pada jam ke-72

Ulangan 1

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	3,72	10	9	1	10%
520	2,7160	4,16	10	8	2	20%
540	2,7324	4,48	10	7	3	30%
560	2,7482	4,75	10	6	4	40%
580	2,7634	4,75	10	6	4	40%



$$y = bx + a$$

$$y = 16,548x + (-40,834)$$

$$y = 5$$

$$y = a + bx$$

$$x = (y-a)/b$$

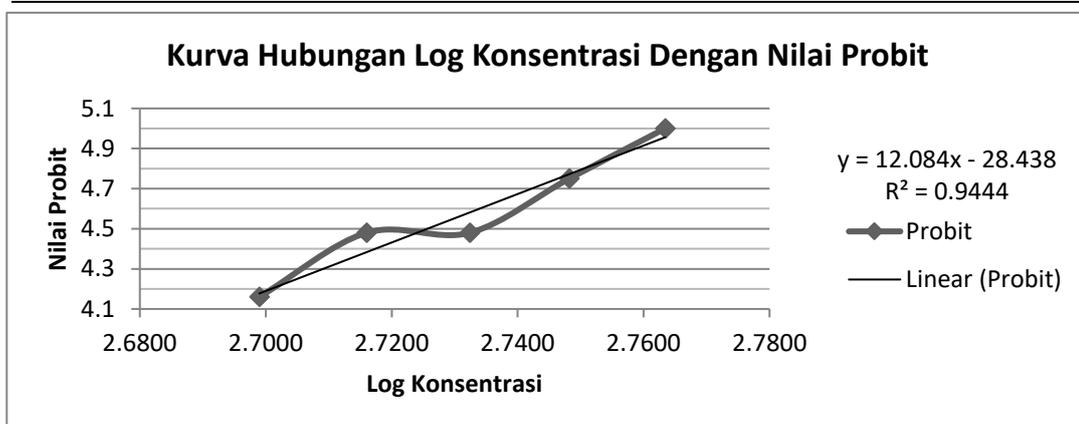
$$x = (5 - (-40,834))/16,548$$

$$x = 2,7698$$

$$\text{Antilog } x = 588,5193 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Ulangan 2

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	4,16	10	8	2	20%
520	2,7160	4,48	10	7	3	30%
540	2,7324	4,48	10	7	3	30%
560	2,7482	4,75	10	6	4	40%
580	2,7634	5,00	10	5	5	50%



$$y = bx + a$$

$$x = (y-a)/b$$

$$y = 12,084x + (-28,438)$$

$$x = (5 - (-28,438)) / 12,084$$

$$y = 5$$

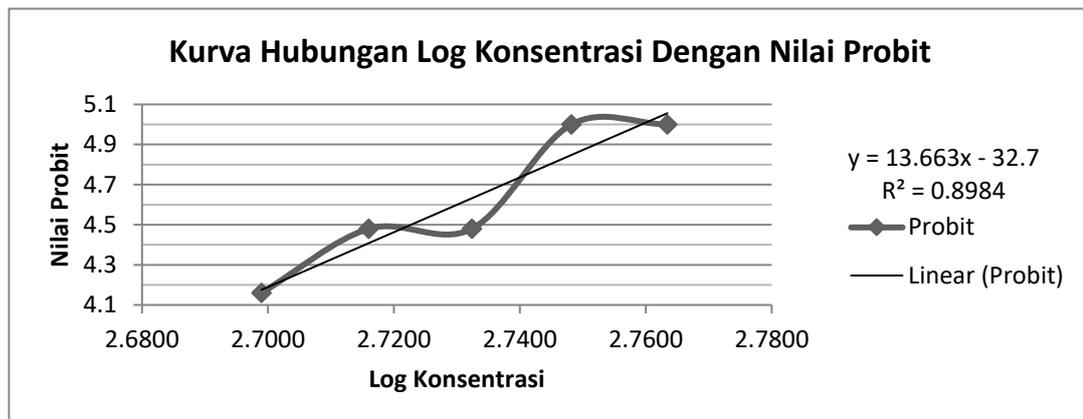
$$x = 2,7671$$

$$y = a + bx$$

$$\text{Antilog } x = 584,9653 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Ulangan 3

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	4,16	10	8	2	20%
520	2,7160	4,48	10	7	3	30%
540	2,7324	4,48	10	7	3	30%
560	2,7482	5,00	10	5	5	50%
580	2,7634	5,00	10	5	5	50%



$$y = bx + a$$

$$x = (y-a)/b$$

$$y = 13,663x + (-32,7)$$

$$x = (5 - (-32,7)) / 13,663$$

$$y = 5$$

$$x = 2,7593$$

$$y = a + bx$$

$$\text{Antilog } x = 574,4826 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

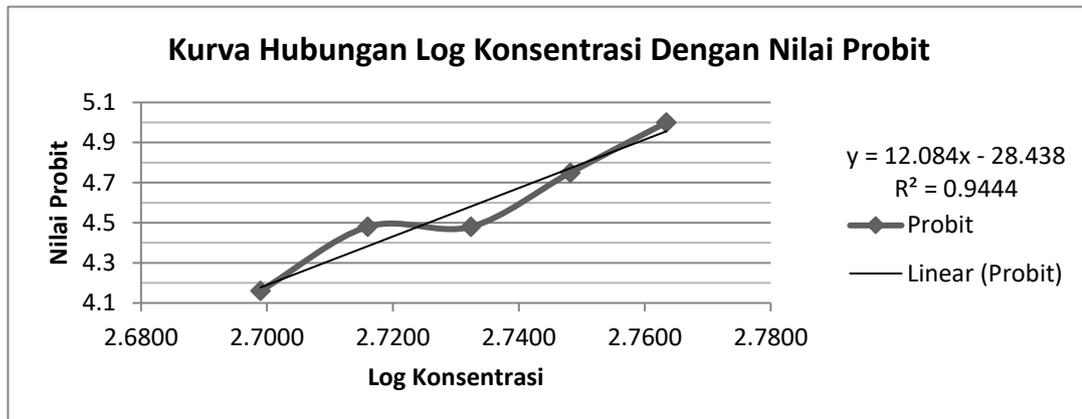
Rata-Rata Nilai LC₅₀ pada Jam ke-72

Ulangan Ke	Nilai LC ₅₀ (ppm)
1	588,5193
2	584,9653
3	574,4826
Rata-rata	582,6557

4. LC₅₀ pada jam ke-96

Ulangan 1

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	4,16	10	8	2	20%
520	2,7160	4,48	10	7	3	30%
540	2,7324	4,48	10	7	3	30%
560	2,7482	4,75	10	6	4	40%
580	2,7634	5,00	10	5	5	50%



$$y = bx + a$$

$$x = (y-a)/b$$

$$y = 12,084x + (-28,438)$$

$$x = (5 - (-28,438)) / 12,084$$

$$y = 5$$

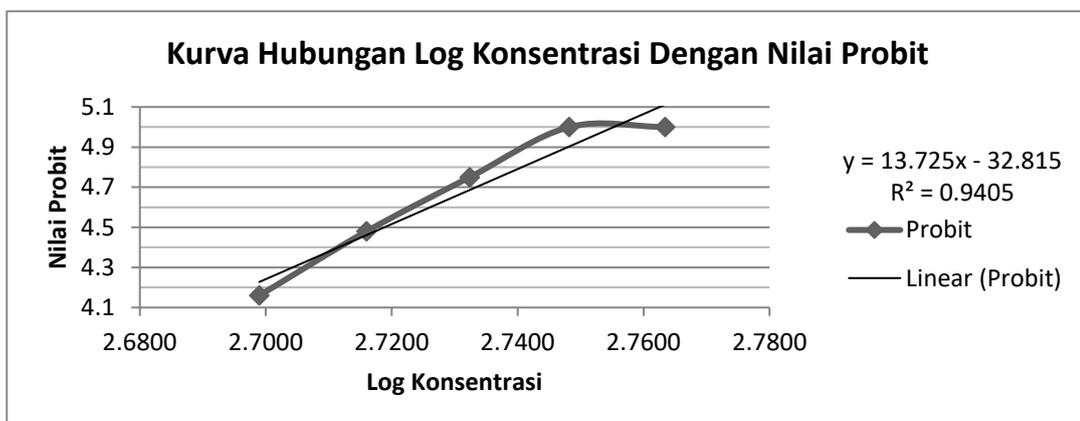
$$x = 2,7671$$

$$y = a + bx$$

$$\text{Antilog } x = 584,9653 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Ulangan 2

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	4,16	10	8	2	20%
520	2,7160	4,48	10	7	3	30%
540	2,7324	4,75	10	6	4	40%
560	2,7482	5,00	10	5	5	50%
580	2,7634	5,00	10	5	5	50%



$$y = bx + a$$

$$y = 13,725x + (-32,815)$$

$$y = 5$$

$$y = a + bx$$

$$x = (y-a)/b$$

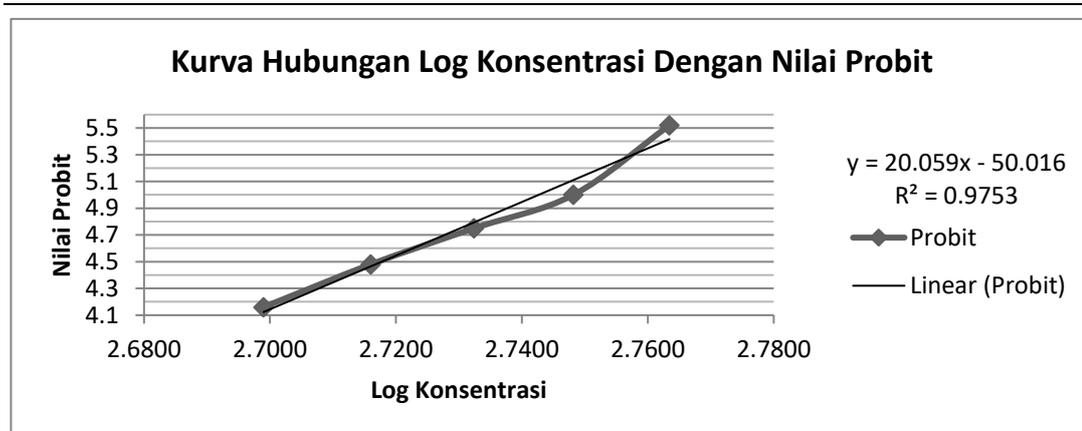
$$x = (5 - (-32,815)) / 13,725$$

$$x = 2,7552$$

$$\text{Antilog } x = 569,1035 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Ulangan 3

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (ppm)	Nilai Probit	Total Embrio	Embrio Hidup	Embrio Mati	% Kematian
500	2,6990	4,16	10	8	2	20%
520	2,7160	4,48	10	7	3	30%
540	2,7324	4,75	10	6	4	40%
560	2,7482	5,00	10	5	5	50%
580	2,7634	5,52	10	3	7	70%



$$y = bx + a$$

$$y = 20,059x + (-50,016)$$

$$y = 5$$

$$y = a + bx$$

$$x = (y-a)/b$$

$$x = (5 - (-50,016)) / 20,059$$

$$x = 2,7427$$

$$\text{Antilog } x = 552,9795 \text{ ppm (LC}_{50}\text{)}$$

Rata-Rata Nilai LC₅₀ pada Jam ke-96

Ulangan Ke	Nilai LC₅₀ (ppm)
1	584,9653
2	569,1035
3	552,9795
Rata-rata	569,0161

Lampiran 12. Hasil Nilai LC₅₀

a. Ekstrak Kulit Buah Delima Merah

Waktu (Jam)	Ulangan	Nilai LC ₅₀ (ppm)	Rata-rata LC ₅₀ (ppm)	±SD
24	1	599,2673	593,9743	5,3758
	2	594,1363		
	3	588,5193		
48	1	588,5193	582,7682	6,6717
	2	584,3318		
	3	575,4535		
72	1	577,2226	572,2417	7,1501
	2	575,4535		
	3	564,0489		
96	1	559,8375	548,0628	13,7054
	2	551,3327		
	3	533,0182		

b. Ekstrak Sari Buah Delima Merah

c. Waktu (Jam)	Ulangan	Nilai LC ₅₀ (ppm)	Rata-rata LC ₅₀ (ppm)	±SD
24	1	596,6023	594,9583	1,4237
	2	594,1363		
	3	599,2673		
48	1	599,2673	592,3792	5,9798
	2	588,5193		
	3	589,3509		
72	1	588,5192	582,6557	7,2978
	2	584,9653		
	3	574,4826		
96	1	584,9653	569,0161	15,9931
	2	569,1035		
	3	552,9795		

Lampiran 13. Hasil Analisis Nilai LC₅₀

1. Analisis ANOVA

a. Ekstrak kulit buah delima merah

Hasil analisis data menggunakan statistik menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang nyata ($p \leq 0.05$) artinya perlakuan yaitu pengaruh lamanya waktu pemaparan terhadap nilai LC₅₀ sehingga dilakukan uji lanjut Ducan.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Nilai_LC50

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3988.404 ^a	5	797.681	52.842	.000
Intercept	3957318.575	1	3957318.575	262151.753	.000
Jam_Pemaparan	3454.230	3	1151.410	76.275	.000
Ulangan	534.174	2	267.087	17.693	.003
Error	90.573	6	15.096		
Total	3961397.552	12			
Corrected Total	4078.977	11			

a. R Squared = .978 (Adjusted R Squared = .959)

H₀ = Tidak ada pengaruh signifikan antara lama waktu pemaparan terhadap nilai LC₅₀

H₁ = Ada pengaruh signifikan antara lama waktu pemaparan terhadap nilai LC₅₀

Hasil analisis data menunjukkan nilai $p = 0.000 \leq 0.05$, maka dapat disimpulkan tolak H₀ terima H₁ yaitu ada pengaruh signifikan antara lamanya waktu pemaparan terhadap nilai LC₅₀. Dan dilakukan uji lanjut Ducan.

b. Sari Buah Delima Merah

Hasil analisis data menggunakan statistik menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang nyata ($p \leq 0.05$) artinya perlakuan yaitu pengaruh lamanya waktu pemaparan terhadap nilai LC_{50} sehingga dilakukan uji lanjut Ducan.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Nilai_LC50

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1671.415 ^a	5	334.283	7.560	.014
Intercept	4103223.379	1	4103223.379	92800.599	.000
Jam_Pemaparan	1243.065	3	414.355	9.371	.011
Ulangan	428.349	2	214.175	4.844	.056
Error	265.293	6	44.215		
Total	4105160.087	12			
Corrected Total	1936.708	11			

a. R Squared = .863 (Adjusted R Squared = .749)

H_0 = Tidak ada pengaruh signifikan antara lama waktu pemaparan terhadap nilai LC_{50}

H_1 = Ada pengaruh signifikan lama waktu pemaparan terhadap nilai LC_{50}

Hasil analisis data menunjukkan nilai $p = 0.011 \leq 0.05$, maka dapat disimpulkan tolak H_0 terima H_1 yaitu ada pengaruh signifikan antara lamanya waktu pemaparan terhadap nilai LC_{50} . Dan dilakukan uji lanjut Ducan.

2. Uji Lanjut Ducan

a. Ekstrak Kulit Buah Delima Merah

Hasil analisis uji lanjut Ducan menunjukkan bahwa lama waktu pemaparan pada jam 24 dan 48, serta jam 72 dan jam 96 memiliki pengaruh yang berbeda nyata terhadap nilai LC₅₀.

Nilai_LC50

Duncan^{a,b}

Jam_Pemaparan	N	Subset			
		1	2	3	4
96	6	558.539450			
72	6		577.448700		
48	6			587.573683	
24	6				594.466300
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) = 27.024.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

b. Alpha = 0,05.

Keterangan:

Berdasarkan hasil yang diperoleh melalui tabel diatas menunjukan adanya pengaruh yang berbeda nyata terhadap nilai LC₅₀

b. Sari Buah Delima Merah

Hasil analisis uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa lama waktu pemaparan pada jam ke 24 dan 48, serta jam 72 memiliki pengaruh yang sama terhadap nilai LC_{50} , sementara jam ke 96 memiliki pengaruh yang berbeda nyata.

Nilai LC_{50}

Duncan^{a,b}

Jam_Pemaparan	N	Subset	
		1	2
96	3	569.016100	
72	3		582.655733
48	3		592.379167
24	3		594.958300
Sig.		1.000	.071

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 44.215.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = 0,05.

Keterangan:

Berdasarkan hasil yang diperoleh melalui tabel diatas menunjukan adanya pengaruh yang sama dan adanya pengaruh yang berbeda nyata terhadap nilai LC_{50}

Lampiran 14. Dokumentasi Uji Toksisitas



Aerasi



Adaptasi Embrio



Larutan Ekstrak Kulit Buah Delima
Merah



Larutan Ekstrak Sari Buah Delima
Merah



Wellplate Ekstrak Kulit



Wellplate Ekstrak Kulit



Mikroskop



Alat-alat

Lampiran 15. Dokumentasi Kelainan Embrio Ikan Zebra**a. Kelainan Embrio Ikan Zebra Setelah Paparan Ekstrak Kulit Buah Delima Merah****b. Kelainan Embrio Ikan Zebra Setelah Paparan Ekstrak Sari Buah Delima Merah**