

Pengaruh Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Rimpang Pacing (*Costus speciosus*) pada Embrio Zebrafish (*Danio rerio*)

Kharina Septi Lestari^{1*}, Aulia Utami Widiati¹, Aulia Nurfazri Istiqomah¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana, Jl. Soekarno-Hatta No. 754, Bandung 40617, Indonesia.

Koresponding author: Kharina Septi Lestari, email: kharin.septi@bku.ac.id

Abstrak

Tanaman pacing (*Costus speciosus*) dikenal luas dalam masyarakat sebagai tanaman hias dan obat tradisional. Seluruh bagian tanaman ini, termasuk rimpangnya, memiliki berbagai aktivitas farmakologis yang bermanfaat, seperti anti-diabetes, anti-kanker, anti-bakteri, dan anti-arthritis. Meskipun demikian, pemanfaatan rimpang pacing dalam pengobatan tradisional memerlukan perhatian terhadap aspek keamanannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi nilai LC_{50} dari ekstrak etanol rimpang pacing (EERP) dan menilai tingkat toksisitas akutnya. Untuk itu, pengujian toksisitas dilakukan dengan metode Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test menggunakan embrio zebrafish (*Danio rerio*) sebagai model hewan uji. Zebrafish dipilih karena memiliki kemiripan genetik sekitar 60-70% dengan manusia, sehingga memungkinkan pemetaan efek toksik yang lebih relevan. Penelitian ini melibatkan tujuh kelompok uji, yaitu dua kelompok kontrol (kontrol negatif dan kontrol positif), serta lima kelompok ekstrak dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu 62,5 ppm (konsentrasi 1), 31,25 ppm (konsentrasi 2), 15,63 ppm (konsentrasi 3), 7,81 ppm (konsentrasi 4), dan 3,91 ppm (konsentrasi 5). Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai LC_{50} dari EERP adalah 11,707 ppm, yang mengindikasikan bahwa ekstrak etanol rimpang pacing termasuk dalam kategori agak toksik. Temuan ini memberikan gambaran mengenai potensi toksisitas dari tanaman pacing, yang penting untuk mempertimbangkan dosis yang aman dalam penggunaannya sebagai obat tradisional. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengeksplorasi mekanisme toksik yang mendasari efek tersebut.

Kata kunci: *Costus speciosus*, Rimpang pacing, Toksisitas akut, Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, Zebrafish

Abstract

The *Costus speciosus* plant, commonly known as pacing, is widely used both as an ornamental plant and in traditional medicine. All parts of the plant, particularly the rhizomes, are known to possess various pharmacological activities, including anti-diabetic, anti-cancer, anti-bacterial, and anti-inflammatory properties. However, with the extensive use of the rhizomes in traditional medicine, it is essential to assess their safety. This study aims to determine the LC_{50} value of ethanol extract from *Costus speciosus* rhizomes (EERP) and evaluate its acute toxicity level. The Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test was used to assess toxicity, employing zebrafish (*Danio rerio*) embryos as the model organism. Zebrafish are chosen because their genetic makeup shares about 60-70% similarity with humans, making them a suitable model for mapping toxic effects. The study involved seven experimental groups: two control groups (negative and positive controls) and five groups treated with varying concentrations of EERP (62.5 ppm, 31.25 ppm, 15.63 ppm, 7.81 ppm, and 3.91 ppm). The results revealed an LC_{50} value of 11.707 ppm for EERP, indicating that the extract falls under the "slightly toxic" category. These findings provide valuable insights into the potential toxicity of *Costus speciosus*,

which is crucial for determining safe dosage levels in its use as a traditional medicine. Further research is needed to explore the underlying toxic mechanisms of this extract.

Keywords: *Costus speciosus*, Pacing rhizome, Acute toxicity, Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, Zebrafish

1. Pendahuluan

Obat dapat didefinisikan sebagai agen yang digunakan untuk diagnosis, pengobatan, pencegahan, atau penyembuhan penyakit pada manusia atau hewan lain (Serliani et al., 2024). Berdasarkan Undang-Undang No. 36 Tahun 2009, obat diartikan sebagai bahan atau paduan bahan, termasuk produk biologi, yang digunakan untuk mempengaruhi atau menyelidiki sistem fisiologi atau keadaan patologis dalam rangka penetapan diagnosis, pencegahan, pemulihan, peningkatan kesehatan, dan kontrasepsi pada manusia. Seiring dengan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi, perkembangan obat baru semakin meningkat. Obat-obatan baru dapat berasal dari berbagai sumber, seperti tumbuhan, hewan, mikroba, atau hasil sintesis kimia dan bioteknologi (Issusilaningtyas et al., 2024). Proses pengembangan obat baru ini bertujuan untuk menghasilkan produk yang lebih efektif dan aman, mengingat pentingnya aspek toksisitas dalam menentukan keberhasilan suatu obat.

Indonesia, sebagai negara dengan keanekaragaman hayati yang melimpah, memiliki potensi besar untuk mengembangkan obat-obatan dari sumber daya alam, termasuk tanaman obat tradisional. Tanaman pacing (*Costus speciosus*) adalah salah satu contoh tanaman yang memiliki berbagai khasiat obat dan telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional (REGITA, 2021). Tanaman ini, yang termasuk dalam keluarga Zingiberaceae, memiliki banyak aktivitas farmakologi, seperti antioksidan, anti-inflamasi, anti-bakteri, dan anti-diabetes (Hidayah et al., 2023). Secara khusus, rimpang pacing dikenal memiliki manfaat untuk mengobati berbagai penyakit, termasuk diabetes, pneumonia, dan rematik (Rahmawati, 2015).

Namun, meskipun pemanfaatan rimpang pacing dalam dunia pengobatan tradisional sangat luas, penting untuk memastikan keamanan dari penggunaan tanaman ini. Salah satu langkah penting dalam menjamin keamanan suatu obat adalah dengan melakukan uji toksisitas. Toksisitas suatu bahan obat dapat diketahui melalui uji toksisitas akut, yang memberikan gambaran tentang potensi efek berbahaya setelah dosis tunggal diberikan (Ramdhini, 2010). Uji toksisitas akut ini dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai metode, salah satunya adalah metode *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*, yang menggunakan embrio ikan zebrafish (*Danio rerio*) sebagai model organisme (Wiendarlina et al., 2022). Model ini sangat relevan karena memiliki kesamaan genetik sekitar 60-70% dengan manusia, memungkinkan pemetaan efek toksik yang lebih akurat (Hayati, 2020).

Meskipun zebrafish telah banyak digunakan dalam penelitian toksisitas, belum ada data yang cukup mengenai tingkat toksisitas akut dari ekstrak etanol rimpang pacing. Penelitian ini bertujuan untuk mengisi gap riset tersebut dengan menguji nilai LC_{50} dari ekstrak etanol rimpang pacing (*Costus speciosus*) menggunakan metode FET. Diharapkan hasil dari penelitian ini dapat memberikan informasi yang berguna dalam memastikan keamanan penggunaan tanaman pacing sebagai obat tradisional dan mempercepat proses pengembangan obat berbasis bahan alam yang aman dan efektif.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui nilai LC_{50} dari ekstrak etanol rimpang pacing (*Costus speciosus*) pada embrio zebrafish (*Danio rerio*) serta untuk menentukan tingkat toksisitas

ekstrak etanol rimpang pacing terhadap embrio zebrafish tersebut. Dengan mengetahui nilai LC_{50} , diharapkan dapat diperoleh gambaran tentang konsentrasi ekstrak etanol yang dapat menyebabkan kematian pada 50% populasi embrio zebrafish, yang merupakan indikator dari tingkat toksisitas bahan tersebut. Penentuan tingkat toksisitas ini penting untuk memastikan keamanan penggunaan rimpang pacing sebagai bahan obat tradisional, agar penggunaannya dapat lebih terkontrol dan aman bagi kesehatan.

2. Metode

Alat:

Berbagai alat digunakan dalam penelitian ini, antara lain microplate 24 sumuran, mikroskop, mikropipet, tip biru dan kuning, cawan petri, akuarium, lampu akuarium, aerator/filter, jarring ikan, vial, botol 100 mL dan 1000 mL, spatel, pipet tetes, corong kaca, gelas ukur, gelas beker, rotavapor, waterbath, neraca analitik, cawan uap, serta batang pengaduk.

Bahan:

Bahan utama dalam penelitian ini adalah rimpang tanaman pacing (*Costus speciosus*), yang diproses menjadi ekstrak kental melalui maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Hewan uji yang digunakan adalah zebrafish (*Danio rerio*). Selain itu, bahan lain yang digunakan meliputi 3,4-Dichloroaniline (DCA), etanol 96%, pakan ikan, NaCl, $MgSO_4$, akuades, NaOH, KCl, dan HCl.

Persiapan Bahan Uji

Pengumpulan Bahan:

Rimpang pacing digunakan dalam penelitian ini dan diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro) di Bogor, Jawa Barat, Indonesia.

Determinasi Tanaman:

Untuk memastikan keaslian tanaman yang digunakan, dilakukan determinasi di Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjajaran.

Penyiapan Simplisia Rimpang Pacing:

Rimpang pacing yang segar disortasi dan dicuci dengan air mengalir. Setelah itu, rimpang dipotong tipis dan dikeringkan di tempat yang kering serta terhindar dari sinar matahari langsung. Rimpang yang sudah kering kemudian dihancurkan menggunakan blender hingga menjadi serbuk. Serbuk simplisia disimpan dalam wadah yang kering dan tertutup.

Pemeriksaan Karakterisasi Simplisia

Kadar Abu Total:

Pemeriksaan kadar abu total dilakukan dengan cara menimbang 2-3 gram sampel, dimasukkan ke dalam krus silikat yang sudah dipijarkan dan ditara, lalu dipijarkan pada suhu $800 \pm 25^\circ C$ selama 24 jam atau

hingga arang habis, kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu dihitung dalam persen (%) berdasarkan berat bahan uji.

Kadar Abu Tidak Larut Asam:

Kadar abu tidak larut asam diperiksa dengan menambahkan asam klorida encer ke abu yang diperoleh dari uji kadar abu total, kemudian dididihkan dan disaring. Sisa abu dipijarkan kembali untuk dihitung kadarnya.

Kadar Air:

Kadar air ditentukan dengan menimbang 10 gram sampel yang telah ditara, lalu dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam. Proses pengeringan dilanjutkan hingga beratnya stabil.

Kadar Sari Larut Air dan Etanol:

Kadar sari larut air dan etanol ditentukan dengan menimbang 5 gram serbuk simplisia dan melarutkannya dalam pelarut masing-masing. Larutan kemudian disaring, diuapkan, dan ditimbang hingga bobot tetap.

Pembuatan Ekstrak Etanol Rimpang Pacing:

Sebanyak 100 gram serbuk simplisia rimpang pacing dimasukkan ke dalam wadah dan dilakukan proses maserasi dengan etanol 96% selama 3 hari (3 x 24 jam). Filtrat kemudian dipisahkan pelarutnya menggunakan rotary vacuum evaporator dan dikonsentrasi dengan waterbath hingga diperoleh ekstrak kental.

Pemeriksaan Ekstrak Etanol Rimpang Pacing:

Organoleptik: Pemeriksaan organoleptik dilakukan untuk menilai sifat-sifat ekstrak menggunakan panca indera, seperti bentuk, warna, dan bau ekstrak.

Rendemen Ekstrak:

Rendemen ekstrak dihitung dengan membandingkan berat simplisia awal dan ekstrak akhir yang dihasilkan.

Penapisan Fitokimia:

Ekstrak diuji untuk kandungan fitokimia, seperti flavonoid, steroid, terpenoid, saponin, alkaloid, dan fenolik menggunakan reaksi kimia yang sesuai. Setiap pengujian dilakukan dengan menambahkan reagen tertentu dan mengamati perubahan warna atau pembentukan endapan.

Persiapan Hewan Uji

Ethical Clearance:

Penelitian ini memperoleh izin etik yang diajukan ke komite etik Universitas Padjajaran.

Determinasi Hewan:

Zebrafish yang digunakan dalam penelitian ini telah dideteksi dan ditentukan di Museum Zoologi SITH ITB, Bandung, Jawa Barat.

Pemeliharaan Hewan Uji:

Zebrafish dipelihara di akuarium yang dilengkapi aerator, dengan suhu air dijaga pada $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Ikan diberi pakan tetramin dua hingga tiga kali sehari atau cacing sutra sekali sehari sebagai nutrisi tambahan. Ikan yang sehat, aktif, dan bebas dari cacat dipilih untuk digunakan dalam penelitian.

Pemijahan dan Seleksi Embrio:

Zebrafish dipilih dengan rasio jantan dan betina 2:1 untuk proses pemijahan. Setelah pemijahan, ikan dikembalikan ke akuarium, dan embrio yang fertil dipilih menggunakan mikroskop. Embrio yang fertil memiliki warna transparan, sedangkan yang infertil berwarna putih susu.

Cara Kerja

Pembuatan Media E3:

Media E3 terdiri dari campuran garam NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, dan $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan dalam 1 L akuades, pH disesuaikan hingga 7,2, lalu disterilisasi dan disimpan pada suhu 4°C . Larutan 1x E3 digunakan setelah larutan stok diencerkan dengan akuades.

Finding Range Concentration:

Uji ini bertujuan untuk menentukan dosis yang akan digunakan pada penelitian. Ekstrak rimpang pacing dibuat dalam tiga konsentrasi berbeda (10 ppm, 100 ppm, 1000 ppm), yang kemudian diaplikasikan pada telur zebrafish yang telah diseleksi.

Pengujian Toksisitas Akut:

Ekstrak yang telah dilarutkan dalam akuades kemudian diencerkan sesuai dengan hasil uji finding range concentration. Pengujian dilakukan pada 7 microplate 24 sumuran, yang masing-masing diisi dengan telur zebrafish dan diuji dengan larutan ekstrak serta kontrol positif dan negatif. Embrio diamati setiap 24 jam selama 96 jam.

Pengamatan Embrio Zebrafish:

Pengamatan dilakukan setiap 24 jam menggunakan mikroskop untuk menilai koagulasi embrio, pembentukan somit, lepasnya tail-bud, dan detak jantung. Data mortalitas dihitung untuk analisis lebih lanjut.

Analisis Hasil:

Persentase mortalitas dihitung dan nilai LC_{50} dihitung menggunakan perangkat lunak SPSS dengan uji analisis probit, yang kemudian digunakan untuk menentukan tingkat toksisitas ekstrak.

3. Hasil dan Pembahasan

Karakterisasi Simplisia Rimpang Pacing (*Costus speciosus*)

Karakterisasi simplisia rimpang pacing (*Costus speciosus*) dilakukan untuk menilai kualitas dan kesesuaian rimpang yang digunakan dalam penelitian. Berdasarkan hasil analisis (Tabel 1), karakteristik simplisia rimpang pacing yang diperoleh dapat dijelaskan sebagai berikut:

Tabel 1. Hasil karakterisasi simplisia rimpang pacing (*Costus speciosus*)

No	Karakteristik	Hasil (%)	Syarat (MMI)
1	Kadar Abu Total	4,5	<6%
2	Kadar Abu Tidak Larut Asam	0,8	<1,5%
3.	Kadar Air	6.16	<10%
4.	Kadar Sari Larut Air	14,09	>13%
5.	Kadar Sari Larut Ethanol	10,09	>6%
6.	Susut Pengeringan	6,06	<10%

Kadar abu total yang ditemukan pada rimpang pacing adalah sebesar 4,5%, yang mana hasil ini memenuhi syarat yang ditentukan yaitu <6%. Kadar abu total yang rendah menunjukkan bahwa kandungan mineral dalam rimpang pacing tergolong sedikit, yang umumnya diinginkan untuk ekstrak yang lebih berkualitas.

Hasil pemeriksaan kadar abu tidak larut asam menunjukkan angka sebesar 0,8%. Hasil ini juga memenuhi syarat yang diinginkan, yakni <1,5%. Kadar abu yang tidak larut dalam asam umumnya mengindikasikan adanya senyawa-senyawa yang lebih stabil dan tidak mudah larut dalam kondisi asam, seperti kalsium karbonat atau senyawa mineral lainnya.

Kadar air pada simplisia rimpang pacing tercatat sebesar 6,16%, yang masih berada di bawah batas maksimal yang diinginkan, yaitu <10%. Kadar air yang rendah menunjukkan bahwa simplisia telah cukup kering dan dapat menghindari pembusukan atau pertumbuhan mikroba selama penyimpanan.

Kadar sari larut air pada rimpang pacing ditemukan sebesar 14,09%, yang lebih tinggi dari nilai standar yang disyaratkan, yaitu >13%. Nilai ini menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa aktif dalam rimpang pacing dapat larut dalam air, yang menandakan potensinya sebagai bahan baku ekstrak yang dapat dimanfaatkan lebih lanjut.

Hasil pengujian menunjukkan kadar sari larut etanol sebesar 10,09%, yang juga memenuhi syarat yaitu >6%. Ini menandakan bahwa rimpang pacing memiliki kandungan senyawa aktif yang cukup larut dalam pelarut etanol, sehingga dapat diekstraksi dengan baik menggunakan etanol sebagai pelarut.

Pengujian susut pengeringan menunjukkan angka sebesar 6,06%, yang masih dalam batas yang diinginkan yaitu <10%. Hal ini mengindikasikan bahwa simplisia rimpang pacing memiliki kadar kelembapan yang tepat, dan proses pengeringannya cukup efisien.

Secara keseluruhan, hasil karakterisasi simplisia rimpang pacing menunjukkan bahwa bahan yang digunakan dalam penelitian ini memenuhi standar kualitas yang diharapkan, sehingga dapat digunakan untuk tujuan ekstraksi dan penelitian lebih lanjut.

Rendemen Ekstraksi

Setelah simplisia rimpang pacing (*Costus speciosus*) dipersiapkan dengan baik, proses ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Etanol dipilih sebagai pelarut karena memiliki keunggulan dibandingkan air, yaitu lebih stabil dan tidak mudah terkontaminasi mikroba. Penggunaan air sebagai pelarut dalam ekstraksi yang memerlukan waktu lama, seperti pada metode maserasi, dapat meningkatkan risiko pertumbuhan mikroba, yang dapat mengurangi kualitas ekstrak yang dihasilkan.

Metode maserasi dimulai dengan mencampurkan serbuk simplisia kering dengan pelarut etanol dalam rasio 1:10, yakni satu bagian serbuk simplisia dan sepuluh bagian etanol. Proses perendaman dilakukan selama 6 jam pertama dengan sesekali diaduk untuk memastikan ekstraksi yang merata, kemudian dilanjutkan dengan diamkan selama 18 jam. Selama proses ini, senyawa-senyawa yang larut dalam etanol akan terambil dari simplisia. Setelah itu, maserat yang dihasilkan dipisahkan melalui proses filtrasi. Proses ini diulang sebanyak tiga kali dengan menggunakan pelarut yang sama, namun dengan volume pelarut yang lebih sedikit (setengah dari volume pelarut pada penyarian pertama), untuk memastikan ekstraksi yang maksimal.

Setelah maserasi selesai, maserat yang dihasilkan diproses lebih lanjut dengan alat rotary vacuum evaporator untuk menghilangkan sebagian besar pelarut etanol. Proses evaporasi dilakukan pada suhu 45°C dengan tekanan 175 mBar, sehingga pelarut dapat menguap tanpa merusak senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak. Evaporasi dilakukan hingga tidak ada pelarut yang tersisa, menghasilkan ekstrak yang lebih pekat.

Namun, ekstrak yang dihasilkan dari rotary vacuum evaporator masih berupa ekstrak yang relatif cair. Oleh karena itu, ekstrak tersebut kemudian diuapkan lagi menggunakan waterbath pada suhu 70°C untuk mendapatkan ekstrak yang lebih kental. Proses ini bertujuan untuk menghilangkan sisa pelarut dan meningkatkan kekentalan ekstrak sehingga siap untuk dianalisis lebih lanjut. Ekstrak yang dihasilkan berwarna coklat kehijauan dengan aroma khas yang sedikit pedas, mencerminkan kandungan senyawa aktif yang terlarut dalam ekstrak.

Dari proses ekstraksi ini, diperoleh rendemen ekstrak sebesar 7,74%. Rendemen ini menunjukkan jumlah ekstrak yang berhasil diperoleh dibandingkan dengan jumlah simplisia yang digunakan. Nilai rendemen yang diperoleh memberikan gambaran tentang efisiensi proses ekstraksi dan keberhasilan dalam menarik senyawa-senyawa aktif dari simplisia. Hasil ini menandakan bahwa ekstraksi menggunakan etanol dengan metode maserasi menghasilkan ekstrak yang cukup baik dan layak untuk digunakan dalam penelitian lebih lanjut mengenai potensi bioaktivitas dari ekstrak rimpang pacing.

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi golongan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol rimpang pacing (*Costus speciosus*). Hasil skrining menunjukkan bahwa ekstrak ini mengandung berbagai senyawa bioaktif yang berpotensi memiliki aktivitas farmakologis.

Tabel 2 Skrining fitokimia EERP

Golongan Senyawa	Hasil
Alkaloid	+
Saponin	+
Tanin	+
Fenolik	+
Flavonoid	+
Glikosida	+
Triterpenoid	+
Steroid	-

Dari hasil skrining, diketahui bahwa senyawa alkaloid, saponin, tanin, fenolik, flavonoid, dan glikosida terdeteksi dalam ekstrak etanol rimpang pacing. Senyawa alkaloid yang terdeteksi dalam ekstrak ini dikenal memiliki berbagai aktivitas biologis, seperti antimikroba dan analgesik, yang menjadikannya senyawa penting dalam penelitian obat-obatan. Selain itu, keberadaan saponin, yang memiliki sifat antidiabetes dan antikanker, juga menunjukkan potensi ekstrak ini untuk digunakan dalam pengembangan terapi kesehatan.

Senyawa tanin, yang terdeteksi dalam ekstrak, memiliki aktivitas antioksidan dan antimikroba yang dapat memberikan manfaat bagi kesehatan. Senyawa fenolik dan flavonoid juga terdeteksi dalam ekstrak, yang keduanya dikenal memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dan berpotensi melawan radikal bebas yang dapat merusak sel-sel tubuh. Keberadaan glikosida menambah potensi ekstrak ini dalam hal aktivitas biologis, yang sering kali terkait dengan efek kardioprotektif dan antimikroba.

Namun, dalam skrining fitokimia ini, senyawa steroid tidak terdeteksi dalam ekstrak. Meskipun steroid dikenal memiliki banyak manfaat terapeutik, seperti sifat antiinflamasi dan imunomodulator, ketidakhadirannya dalam ekstrak ini tidak mengurangi potensi farmakologis lainnya yang sudah ada dalam ekstrak.

Secara keseluruhan, hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol rimpang pacing (*Costus speciosus*) mengandung berbagai senyawa bioaktif yang dapat memberikan kontribusi pada aktivitas farmakologis yang bermanfaat bagi kesehatan.

Pengujian Toksisitas Akut

Pengujian toksisitas akut menggunakan zebrafish (ikan zebra) merupakan metode yang efektif untuk menilai potensi toksik suatu zat dengan menggunakan telur zebrafish yang baru dibuahi. Prinsip utama dari uji toksisitas ini adalah paparan telur zebrafish terhadap larutan uji selama 96 jam, dengan pemantauan setiap 24 jam terhadap empat indikator kematian. Indikator tersebut meliputi koagulasi pada telur yang telah dibuahi, kurangnya pembentukan somit, ketidakmampuan pelepasan ekor dari kantung kuning telur, dan tidak terdeteksinya detak jantung pada embrio yang sedang berkembang. Pemantauan ini bertujuan untuk mengidentifikasi efek toksik yang dapat mempengaruhi kelangsungan hidup dan perkembangan embrio zebrafish.

Dalam pengujian ini, chamber yang digunakan adalah well plate 24 yang terbuat dari bahan gelas atau polistiren, dengan kapasitas masing-masing sumuran antara 2,5 mL hingga 5 mL. Setiap kelompok konsentrasi melibatkan 20 telur, dengan kelompok kontrol positif yang berisi larutan beracun 3,4-dikloroanilin, dan kelompok kontrol negatif yang hanya menggunakan media E3. Untuk larutan uji, setiap sumuran pada well plate dipaparkan dengan 2 mL larutan uji sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan berdasarkan uji "finding range concentration" sebelumnya ("OECD," 2013).

Hasil dari uji "finding range concentration" menunjukkan bahwa konsentrasi yang digunakan untuk pengujian toksisitas akut terdiri dari lima konsentrasi yang berbeda, yaitu 62,5 ppm, 31,25 ppm, 15,63 ppm, 7,81 ppm, dan 3,91 ppm. Konsentrasi tertinggi, yaitu 1000 ppm dan 100 ppm, menyebabkan kematian 100% pada telur zebrafish, sementara pada konsentrasi terendah (10 ppm), hanya sekitar 20% telur yang mati. Dengan demikian, kelima konsentrasi tersebut dipilih karena memberikan rentang mortalitas yang jelas, mulai dari 100% pada konsentrasi tertinggi hingga 0% pada konsentrasi terendah, memungkinkan evaluasi yang lebih akurat terhadap potensi toksisitas.

Kelompok kontrol negatif menggunakan media E3, yang merupakan larutan yang mengandung campuran NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, dan $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan dalam akuades, dengan pH disesuaikan antara 6,5 – 8,5 agar sesuai dengan kondisi alami zebrafish ("OECD," 2013). Media E3 berfungsi sebagai sumber nutrisi mineral bagi pertumbuhan embrio ikan (Carnovali et al., 2022), dan dengan demikian digunakan sebagai kontrol negatif dalam pengujian ini. Setelah persiapan, media E3 disterilisasi dengan autoclave dan disimpan pada suhu 4°C.

Kelompok kontrol positif menggunakan larutan 3,4-dikloroanilin, yang dikenal sebagai bahan kimia yang sangat beracun dan memiliki efek toksik yang signifikan pada perkembangan embrio zebrafish (Bailone et al., 2022). Larutan ini dibuat dengan melarutkan 4 mg 3,4-dikloroanilin dalam 1 liter media E3. Penggunaan kontrol positif ini bertujuan untuk memastikan bahwa uji toksisitas dapat mendeteksi reaksi yang diinginkan terhadap senyawa beracun yang diketahui.

Selama 96 jam pemaparan, setiap well plate yang berisi telur zebrafish dan larutan uji disimpan pada suhu ruang, yaitu sekitar $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Pemantauan dilakukan setiap 24 jam menggunakan mikroskop untuk mengamati perubahan pada perkembangan embrio serta tingkat mortalitas yang terjadi. Dengan metode ini, pengujian toksisitas akut dapat memberikan gambaran yang jelas mengenai dampak toksik dari suatu senyawa terhadap organisme hidup, dan pada akhirnya membantu menentukan keamanan atau potensi bahaya suatu zat bagi lingkungan dan kesehatan manusia.

Hasil Pengujian Toksisitas Akut

Pengamatan dalam pengujian toksisitas akut dilakukan setiap 24 jam hingga mencapai 96 jam untuk memantau perkembangan embrio zebrafish yang terpapar larutan uji. Setiap interval waktu pengamatan, sejumlah parameter penting dicatat, sebagaimana tercantum dalam Tabel 5.5 di bawah ini:

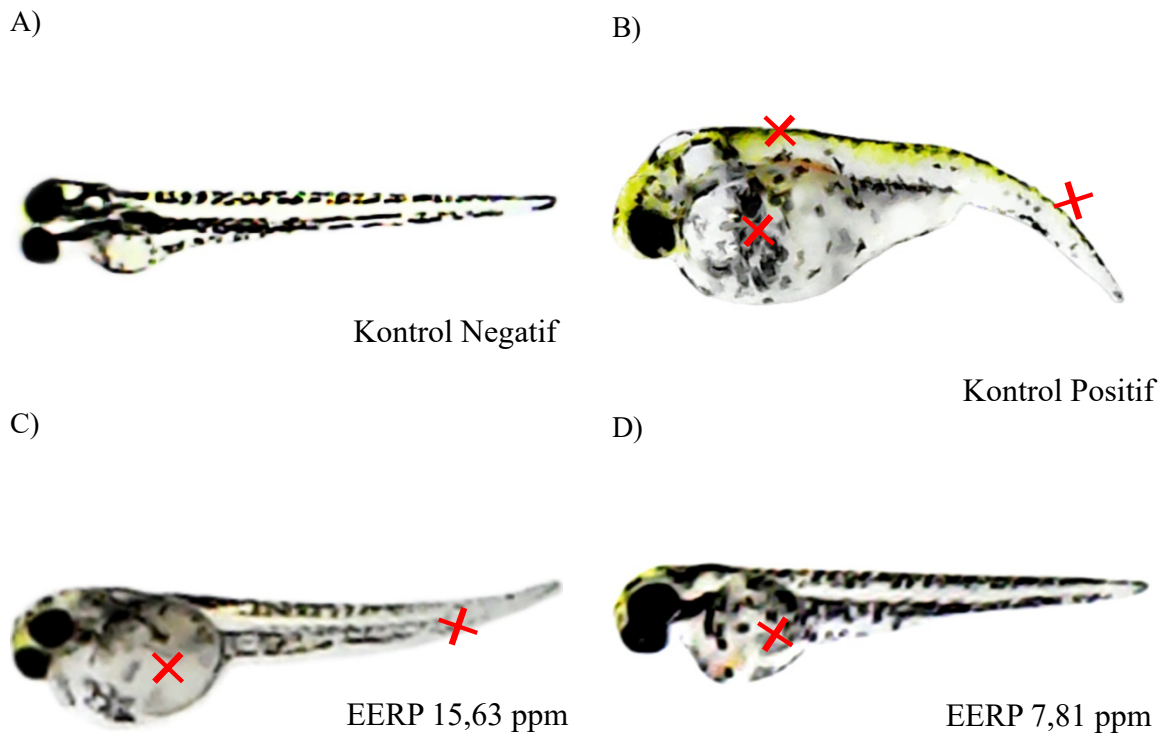
Tabel 3. Parameter Pengamatan Setiap 24 Jam

Waktu Pengamatan	Keterangan Pengamatan
24 jam	Koagulasi, pembentukan somit
48 jam	Jumlah yang menetas, perubahan morfologi, mortalitas
72 jam	Jumlah yang menetas, perubahan morfologi, mortalitas
96 jam	Perubahan morfologi, mortalitas

Dalam pengujian ini, terdapat empat indikator utama kematian embrio yang dijadikan parameter untuk mengukur toksisitas pada embrio zebrafish, yaitu koagulasi telur yang telah dibuahi, kurangnya pembentukan somit, keterlambatan atau ketidakmampuan pelepasan ekor dari kantung kuning telur, dan tidak adanya detak jantung pada embrio ("OECD," 2013). Indikator-indikator ini berfungsi untuk mengidentifikasi efek toksik yang terjadi akibat paparan zat uji, yang berpotensi mengganggu proses perkembangan embrio.

Koagulasi embrio merupakan salah satu tanda awal kematian pada uji toksisitas akut. Kematian embrio dapat terjadi dalam waktu kurang dari 24 jam setelah fertilisasi (hpf, hour post fertilization), atau segera setelah embrio menetas. Pada tahap ini, kelainan pada bentuk jantung juga kadang terdeteksi, seperti **edema perikardial** (penumpukan cairan di sekitar jantung) atau kelainan bentuk jantung yang disebabkan oleh edema atau aplasia (ketidakmampuan untuk berkembang). Selain itu, **titik akhir perkembangan embrio** adalah ketika ekor sepenuhnya terlepas dari kantung kuning telur. Proses pelepasan ekor ini dapat terhambat atau terganggu oleh pengaruh toksik dari senyawa yang diuji, yang menyebabkan gangguan pada perkembangan embrio.

Pada tahap larva, kemunculan ekor adalah hal yang sangat penting. Ketika ekor mulai muncul, perubahan pada ketegaran dan pembengkokan ekor dapat menjadi indikasi malformasi yang disebabkan oleh zat-zat toksik (Modarresi Chahardehi et al., 2020). Ekor yang tidak berkembang dengan baik atau bengkok dapat mencerminkan adanya gangguan perkembangan yang serius, yang sering kali disebabkan oleh bahan kimia berbahaya yang mempengaruhi jaringan atau organ tubuh embrio zebrafish.



Gambar 1. Hasil Pengamatan embrio *zebrafish* A) Embrio normal. B) Embrio dengan abnormalitas tulang belakang, ekor bengkok dan edema perikardial. C) Embrio dengan edema perikardial dan ekor bengkok. D) Embrio dengan edema perikardial.

Gambar 1 menunjukkan perbedaan fisik antara kelompok uji yang terpapar larutan uji dan kelompok kontrol, mulai dari embrio yang berkembang normal hingga embrio yang menunjukkan abnormalitas perkembangan. Perbedaan yang paling mencolok dapat dilihat pada perubahan morfologi, seperti deformasi bentuk tubuh, keterlambatan perkembangan, dan adanya cacat pada organ-organ penting seperti jantung dan ekor.

Secara keseluruhan, hasil pengamatan ini memberikan gambaran yang jelas mengenai dampak toksik dari senyawa yang diuji pada perkembangan embrio zebrafish. Dengan menggunakan metode pengujian ini, dapat diketahui tingkat toksisitas suatu bahan berdasarkan efek yang ditimbulkan terhadap indikator-indikator tersebut, yang sangat penting untuk menentukan apakah senyawa tersebut aman untuk digunakan atau berpotensi berbahaya bagi kesehatan dan lingkungan.

Tabel 4 menunjukkan hasil persentase mortalitas pada kelompok kontrol yang digunakan dalam pengujian toksisitas akut:

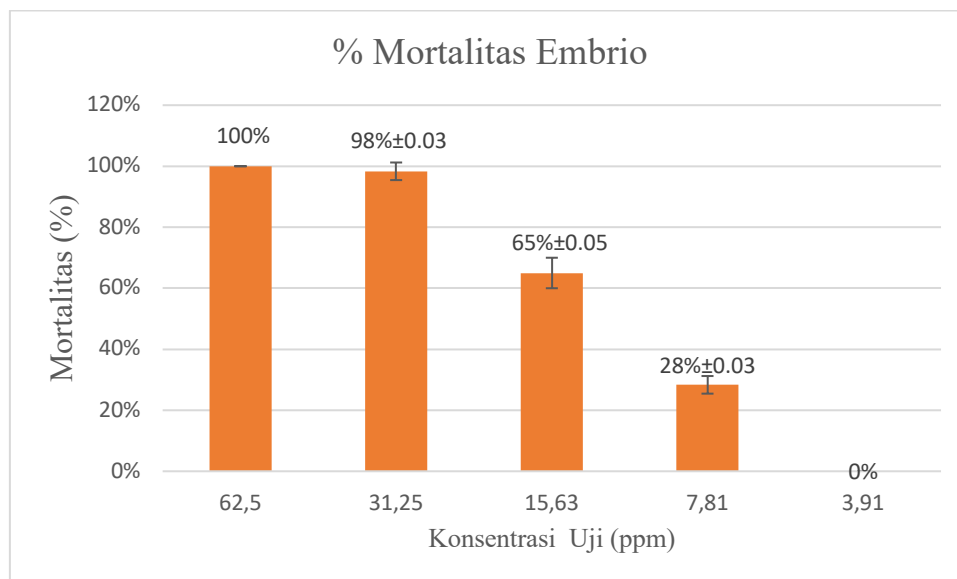
Tabel 4. Hasil Persentase Mortalitas Kelompok Kontrol

Kelompok Uji	% Mortalitas
Kontrol Negatif (Media E3)	0%
Kontrol Positif (3,4 Dikloroanilin)	100%

Berdasarkan pengujian toksisitas akut yang dilakukan, diperoleh hasil yang menggembirakan, yaitu persentase kematian pada kelompok kontrol negatif adalah 0%, sedangkan pada kelompok kontrol positif mencapai 100%. Hasil ini menunjukkan bahwa pengujian toksisitas akut ekstrak etanol rimpang pacing (*Costus speciosus*) telah memenuhi kriteria validitas pengujian, yang mengindikasikan bahwa metode yang digunakan dapat diandalkan. Pada kelompok kontrol negatif, kematian harus bernilai rendah, karena larutan yang digunakan adalah media nutrisi berupa mineral yang tidak mengandung bahan toksik. Mineral yang terkandung dalam media E3, seperti Natrium (Na), Kalium (K), Kalsium (Ca), dan Magnesium (Mg), berfungsi sebagai sumber nutrisi yang diperlukan untuk proses biologis, seperti osmosis dan osmoregulasi, pada embrio zebrafish (Harper & Lawrence, 2016).

Di sisi lain, pada kelompok kontrol positif, persentase kematian yang sangat tinggi (100%) adalah hal yang diharapkan, mengingat larutan yang digunakan mengandung 3,4 dikloroanilin, sebuah senyawa yang diketahui memiliki sifat toksik. 3,4 dikloroanilin merupakan metabolit dari beberapa herbisida yang dapat mencemari ekosistem akuatik dalam konsentrasi tinggi, menyebabkan kerusakan pada sistem metabolisme sel dan mengganggu perkembangan embrio, bahkan berpotensi merusak ginjal serta memiliki sifat toksik pada mamalia dan manusia. Senyawa ini juga terbukti berbahaya bagi berbagai spesies akuatik lainnya seperti *Pimephales promelas*, *Oncorhynchus mykiss*, dan *Artemia salina* (Ibrahim et al., 2020).

Hasil pengujian toksisitas akut terhadap ekstrak etanol rimpang pacing pada embrio zebrafish menunjukkan bahwa kematian embrio meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak yang digunakan. Pada konsentrasi tertinggi, yaitu 62,5 ppm, 100% embrio mengalami kematian. Sedangkan pada konsentrasi yang lebih rendah, persentase kematian menunjukkan penurunan, dengan hasil $98 \pm 0,03\%$ pada konsentrasi 31,25 ppm, $65 \pm 0,05\%$ pada konsentrasi 15,63 ppm, $28 \pm 0,03\%$ pada konsentrasi 7,81 ppm, dan 0% pada konsentrasi 3,91 ppm.



Gambar 2 Diagram Persentase Mortalitas Embrio Zebrafish

Analisis lebih lanjut menggunakan perangkat statistik SPSS dan metode analisis probit menunjukkan bahwa nilai LC_{50} untuk ekstrak etanol rimpang pacing (*Costus speciosus*) adalah 11,707 ppm. Nilai LC_{50} ini mengindikasikan bahwa ekstrak tersebut termasuk dalam kategori agak toksik, yang berarti dapat menyebabkan kematian pada 50% populasi embrio zebrafish pada konsentrasi tersebut. Berdasarkan data ini, ekstrak etanol rimpang pacing memiliki potensi toksik yang cukup signifikan pada embrio zebrafish, tergantung pada konsentrasi yang diberikan.

Kematian atau kelainan yang terjadi pada embrio zebrafish disebabkan oleh senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak rimpang pacing, seperti flavonoid, saponin, dan alkaloid. Senyawa-senyawa ini dapat diserap melalui membran korion embrio zebrafish, yang menyebabkan berbagai efek toksik. Flavonoid, misalnya, diketahui dapat memicu stres oksidatif pada sel-sel embrio, yang dapat mengurangi kelangsungan hidup embrio. Senyawa saponin, dengan sifat surfaktan, dapat merusak membran korion dan mengganggu perkembangan embrio, sedangkan kombinasi antara saponin dan alkaloid dapat menyebabkan kerusakan pada DNA embrio (Modarresi Chahardehi et al., 2020). Diosgenin, yang merupakan senyawa utama dalam saponin dari rimpang pacing, juga diketahui memiliki efek toksik yang dapat berkontribusi pada kerusakan seluler dan kematian embrio.

Secara keseluruhan, uji toksisitas akut menggunakan zebrafish menunjukkan bahwa ekstrak etanol rimpang pacing memiliki potensi toksik yang perlu diperhatikan. Pengujian ini menjadi langkah awal yang sangat berguna sebelum melanjutkan uji toksisitas pada model hewan pengerat, mengingat kelebihan uji menggunakan zebrafish, seperti biaya yang lebih rendah, waktu yang lebih singkat, dan jumlah senyawa yang digunakan juga lebih sedikit. Oleh karena itu, uji toksisitas akut ini sangat membantu dalam mempercepat pengembangan obat atau bahan aktif baru dengan meminimalkan penggunaan hewan uji yang lebih besar dan kompleks, serta memberikan gambaran awal yang lebih cepat dan efisien tentang potensi toksisitas senyawa yang diuji (Hardianti et al., 2021).

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis data dan pembahasan yang telah dilakukan dalam penelitian uji toksisitas akut ekstrak etanol rimpang pacing (*Costus speciosus*) terhadap embrio zebrafish (*Danio rerio*), dapat disimpulkan bahwa nilai LC₅₀ untuk ekstrak etanol rimpang pacing terhadap embrio zebrafish adalah 11,707 ppm. Nilai ini menggambarkan konsentrasi ekstrak yang dapat menyebabkan kematian pada 50% populasi embrio zebrafish yang diuji, yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol rimpang pacing memiliki potensi toksik yang perlu diwaspadai pada konsentrasi tertentu. Berdasarkan hasil analisis toksisitas akut, ekstrak etanol rimpang pacing (*Costus speciosus*) termasuk dalam kategori agak toksik. Meskipun pada konsentrasi tinggi senyawa ini dapat menyebabkan kematian pada embrio zebrafish, pada konsentrasi yang lebih rendah, efek toksiknya cenderung menurun. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol rimpang pacing memiliki potensi untuk menimbulkan dampak toksik pada organisme akuatik, namun pengaruhnya dapat dikendalikan dengan mengatur dosis yang tepat. Sebagai langkah selanjutnya, diperlukan pengujian lebih mendalam untuk mengeksplorasi keamanan dan efikasi ekstrak ini sebelum dapat diterapkan dalam pengembangan produk yang lebih luas.

5. References

- Bailone, R. L., Fukushima, H. C. S., De Aguiar, L. K., & Borra, R. C. (2022). Calcium Chloride Toxicology for Food Safety Assessment Using Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Comparative Medicine*, 72(5), 342–348. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-22-000009>
- Carnovali, M., Banfi, G., Porta, G., & Mariotti, M. (2022). Soybean meal-dependent acute intestinal inflammation delays osteogenesis in zebrafish larvae. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7480.
- Hardianti, M., Yuniarto, A., & Hasimun, P. (2021). Zebrafish (*Danio rerio*) Sebagai Model Obesitas dan Diabetes Melitus Tipe 2. *JSFK (Jurnal Sains Farmasi & Klinis)*, 8(2), 69–79.
- Harper, C., & Lawrence, C. (2016). *The laboratory zebrafish*. Crc Press.
- Hayati, F. (2020). *Perbandingan Uji Toksisitas Akut Sediaan Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (Snedds) Ekstrak Etanol Daun Pegagan (Centella asiatica L.) dengan Ekstrak Etanol Daun Pegagan pada Embrio Ikan Zebra (Danio rerio)*.
- Hidayah, A. B., Ashfannada, N., Khasanah, A. N., Annisa, S. N., Tiffany, G. R., & Murwanti, R. (2023). Apoptosis Induction of SKOV-3 Ovarian Cancer Cells from Pacing Rhizome (*Costus speciosus*) Through the Modulation of BAX and P53 Genes Expression. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 14(2), 139–150.
- Ibrahim, M. A., Zulkifli, S. Z., Azmai, M. N. A., Mohamat-Yusuff, F., & Ismail, A. (2020). Embryonic toxicity of 3, 4-dichloroaniline (3, 4-DCA) on Javanese medaka (*Oryzias javanicus* Bleeker, 1854). *Toxicology Reports*, 7, 1039–1045.
- Issusilaningtyas, E., Yulianto, A. N., Rochmah, N. N., Pertiwi, Y., Faoziyah, A. R., Sari, W. Y., & Balfas, R. F. (2024). *Teknologi Farmasi Bahan Alam*. TOHAR MEDIA.
- Modarresi Chahardehi, A., Arsad, H., & Lim, V. (2020). Zebrafish as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants. *Plants*, 9(10), 1345.
- OECD. (2013). In *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. OECD.
- Rahmawati, M. (2015). *Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol dan Air Rimpang Pacing (Costus spiralis) Terhadap Bakteri Escherichia coli, Shigella dysenteriae, Salmonella typhimurium, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus Serta Fungi Candida albicans*.

- Ramdhini, R. N. (2010). *Uji toksisitas terhadap Artemia salina Leach. Dan toksisitas akut komponen bioaktif Pandanus conoideus var. Conoideus Lam. Sebagai kandidat antikanker.*
- REGITA, K. W. (2021). *Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun, Bunga, Dan Batang Pacing (Costus speciosus) Dengan Metode I, 1-Diphenyl-2-Picrylhydrazin (Dpph).*
- Serliani, D., Shafira, D., Mila, S., & Afandi, S. H. P. F. (2024). Analisis Penetapan Kadar Ibuprofen Dan Validasi Metode Spektrofotometri Infra Red. *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*, 10(16), 212–221.
- Wiendarlina, I. Y., Herlina, N., & Mareta, E. (2022). Toksisitas akut sediaan cair berbasis bawang putih dengan metode Zebrafish embryo toxicity (Zfet). *FITOFARMAKA: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 12(1), 78–88.