

**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*)**

**SKRIPSI**



Oleh:

**M. RADINAL ANSORI**

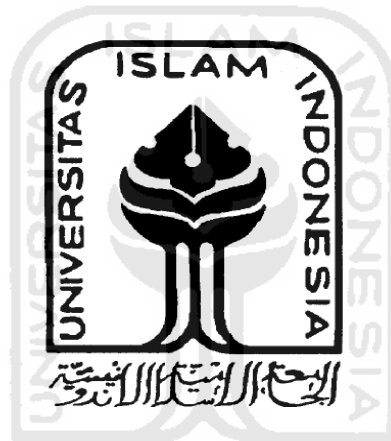
**16613091**

**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA  
YOGYAKARTA  
JULI 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*)**

**SKRIPSI**

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Farmasi (S.Farm)  
Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Islam Indonesia Yogyakarta



Oleh :

**M. RADINAL ANSORI**

**16613091**

**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA  
YOGYAKARTA  
JULI 2020**

SKRIPSI

**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*)**



Pembimbing Utama,



(Dr. Farida Hayat, M.Si., Apt.)

Pembimbing Pendamping,



(Arde Toga Nugraha, S.Farm., M.Sc., Apt.)

SKRIPSI

**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*)**

Oleh :

M. RADINAL ANSORI

16613091

Telah lolos uji etik penelitian

dan dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 17 Juli 2020

Ketuan Penguji : Dr. Arba Pramundita, M.Sc., Apt.

Anggota Penguji : 1. Dr. Farida Hayati, M.Si., Apt.

2. Arde Toga Nugraha, S.Farm., M.Sc., Apt.

3. Dr. Asih Triastuti, M. Pharm., Apt.

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 19 Agustus 2020

Penulis,



M. Radinal Ansori

## **PERSEMBAHAN**

Karya kecil ini merupakan sebagian dari wujud pertanggung jawaban akademik penulis untuk orang-orang yang telah menemani dan mendukung penulis selama menempuh pendidikan, terutama orang tua yang tidak terhitung jasanya bagi penulis. Untuk mereka semua lah karya kecil ini dipersembahkan.



## KATA PENGANTAR

*Alhamdulillahirobbil'alamin.* Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan berkat, rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini. Shalawat beserta salam semoga selalu tercurahkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW sebagai suri tauladan bagi umat manusia.

Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi Prodi Farmasi Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada :

- (1) Kedua orang tua saya, Ibu Dra. Hj. Juaeriah dan Bapak Ir. H. Azhar yang selalu mencurahkan kasih sayangnya, dan tak ada henti-hentinya memanjatkan do'a untuk saya serta selalu mendukung saya dalam hal kebaikan.
- (2) Bapak Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D. Selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia Yogyakarta.
- (3) Bapak Saepudin, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. Selaku Ketua Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia Yogyakarta.
- (4) Ibu Dr. Farida Hayati, M.Si., Apt. dan Bapak Arde Toga Nugraha, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikirannya untuk membimbing, memberikan motivasi, serta memberi arahan dalam penyusunan skripsi ini.
- (5) Ibu Cynthia Astiti Putri, S.Farm., M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan nasehat dan motivasi selama proses perkuliahan.
- (6) Ibu Dr. Arba Pramundita, M.Sc., Apt. dan Ibu Dr. Asih Triastuti, M.Pharm., Apt. selaku dosen penguji skripsi yang memberikan bimbingan, motivasi serta arahan kepada saya dalam penulisan naskah skripsi ini.

- (7) Keluarga kandung saya (Kak Azwar, Kak Sely, Lala, dan Sholeh) dan keluarga besar saya yang selalu mendo'akan, memberikan kasih sayang, perhatian, dan dukungan pada penulis.
- (8) Seluruh dosen Program Studi Farmasi FMIPA UII yang telah memberikan banyak ilmunya kepada saya, serta seluruh staff laboratorium (khususnya Pak Yon, Pak Ri, Pak Marno, Pak har, dan Mbak Naim) dan seluruh staff yang berda dalam lingkungan FMIPA UII yang telah banyak membantu saya dalam proses penelitian.
- (9) Tim *zebrafish* (Mbak Faiza, Mbak Sumayya, Tiara, Cahya, Ria, dan Echa) yang telah banyak meluangkan waktu, pikiran serta tenaga untuk membantu saya selama penelitian.
- (10) Teman-teman seperjuangan saya Farmasi angkatan 2016 terutama (Dhila, Andri, May, Udin, Hafizh, Dedew, Rina, Jijong, Dakhil, Reza, Bintang) terimakasih telah membantu dan memberi dukungan kepada saya.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu penulis baik secara moril maupun materil. Saya berharap Semoga Allah SWT membalas kebaikan semua pihak yang membantu. Penulis menyadari bahwa naskah skripsi ini jauh dari kata sempurna. Oleh sebab itu, kritik dan saran yang bersifat membangun sangat diharapkan untuk kemajuan penulis dimasa mendatang. Besar harapan penulis, semoga skripsi ini memberikan manfaat untuk pengembangan ilmu pengetahuan khususnya dibidang farmasi.

***Aamiin Yarabbal Alamin.***

Yogyakarta, 19 Agustus 2020

Penulis,



M. Radinal Ansori



## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN.....	iv
PERSEMBAHAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR BAGAN.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
INTISARI.....	xv
ABSTRACT.....	vi
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Tanaman Pegagan.....	4
2.2 <i>Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS)</i> .....	6
2.3 Ikan Zebra ( <i>Danio rerio</i> ).....	7
2.4 Uji Toksisitas Embrio Ikan Zebra.....	9
2.4.1 Prinsip Pengujian.....	10
2.4.2 Validitas Pengujian.....	11
2.4.3 <i>3,4-dichloroaniline (DCA)</i> .....	12
2.4.4 Keuntungan dan Kelemahan Menggunakan Embrio Ikan Zebra.....	12
2.5 Landasan Teori.....	13

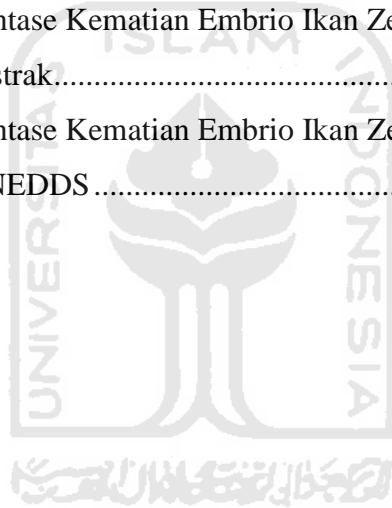
2.6	Hipotesis .....	13
2.7	Kerangka Konsep.....	14
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>		<b>15</b>
3.1	Alat dan Bahan.....	15
3.1.1	Alat.....	15
3.1.2	Bahan .....	15
3.1.3	Subjek Uji .....	15
3.1.4	Aklimatisasi Subjek Uji.....	15
3.1.5	Pemeliharaan Ikan zebra.....	16
3.2	Tahapan Penelitian.....	16
3.2.1	Koleksi Daun Pegagan.....	16
3.2.2	Determinasi Tumbuhan Pegagan ( <i>Centella asiatica L.</i> ) .....	16
3.2.3	Pengajuan <i>Ethical Clearance</i> .....	16
3.2.4	Ekstrak Etanol Daun Pegagan.....	16
3.2.5	Persiapan Fertilisasi Ikan Zebra.....	17
3.2.6	Seleksi Embrio.....	17
3.2.7	Pemaparan Embrio.....	17
3.2.8	Pengamatan Embrio .....	18
3.3	Analisis Data .....	18
3.4	Skema Penelitian.....	20
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>		<b>21</b>
4.1	Determinasi Tanaman Pegagan ( <i>Centella asiatica L.</i> ) .....	21
4.2	<i>Ethical Clearance</i> .....	21
4.3	Ekstraksi Daun Pegagan .....	22
4.3.1	Koleksi Tanaman Pegagan.....	22
4.3.2	Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pegagan.....	22
4.4	Sediaan SNEDDS Ekstrak Etanol Daun Pegagan.....	22
4.5	Seleksi Embrio .....	23

4.6 Uji Toksisitas Akut Sediaan SNEDDS Ekstrak Etanol Daun Pegagan dengan Ekstrak Etanol Daun Pegagan ( <i>Centella asiatica L.</i> ) Pada Embrio Ikan Zebra ( <i>Danio rerio</i> ).....	24
4.7 Perbandingan Hasil Pengujian SNEDDS Ekstrak Etanol Daun Pegagan ( <i>Centella Asiatica L.</i> ) Dengan Ekstrak Etanol Daun Pegagan Pada Embrio Ikan Zebra ( <i>Danio rerio</i> ) .....	37
<b>BAB V_KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>39</b>
5.1 Kesimpulan .....	39
5.2 Saran .....	39
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>40</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>45</b>



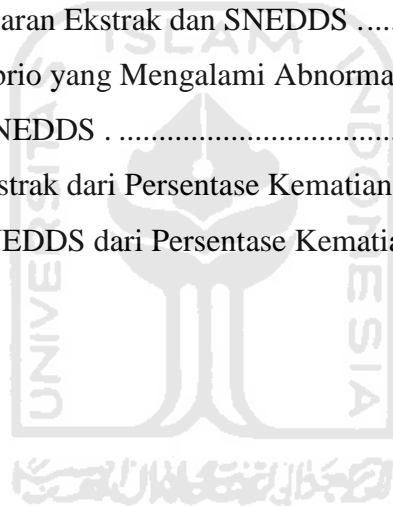
## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1</b> Tumbuhan Pegagan ( <i>Centella asiatica L.</i> ) .....	4
<b>Gambar 2.2</b> Ikan Zebra .....	8
<b>Gambar 2.3</b> Perkembangan Normal Embrio Ikan Zebra Pada Suhu 26°C .....	9
<b>Gambar 2.4</b> Parameter Pengamatan Embrio Ikan Zebra .....	11
<b>Gambar 2.5</b> Skema Prosedur Uji Toksisitas Akut Pada Embrio Ikan Zebra.....	12
<b>Gambar 4. 1</b> Ekstrak Etanol Daun Pegagan ( <i>Centella Asiatica L.</i> ) .....	22
<b>Gambar 4.2</b> Embrio ikan zebra yang berumur 2-3 jam setelah fertilisasi.....	23
<b>Gambar 4.3</b> Contoh perkembangan embrio normal dan abnormal.....	33
<b>Gambar 4.4</b> Grafik Persentase Kematian Embrio Ikan Zebra Pada Kelompok Pelakuan Ekstrak.....	33
<b>Gambar 4.5</b> Grafik Persentase Kematian Embrio Ikan Zebra Pada Kelompok Pelakuan SNEDDS .....	34



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 2. 1</b> Contoh Tabel Hasil Pengamatan .....	11
<b>Tabel 4. 1</b> Persentase Embrio yang Mengalami Koagulasi Setelah Pemaparan Ekstrak dan SNEDDS .....	24
<b>Tabel 4. 2</b> Persentase Embrio yang Mengalami Pembentukan Somit Setelah Pemaparan Ekstrak dan SNEDDS .....	26
<b>Tabel 4. 3</b> Persentase Embrio yang Mengalami Lepasnya <i>Tail-Bud</i> Dari <i>Yolk</i> Setelah Pemaparan Ekstrak dan SNEDDS .....	28
<b>Tabel 4. 4</b> Persentase Embrio Ikan Zebra yang Terlihat Adanya Detak Jantung Setelah Pemaparan Ekstrak dan SNEDDS .....	30
<b>Tabel 4. 5</b> Persentase Embrio yang Mengalami Abnormalitas Setelah Pemaparan Ekstrak dan SNEDDS .....	32
<b>Tabel 4. 6</b> Nilai Probit Ekstrak dari Persentase Kematian Embrio .....	35
<b>Tabel 4. 7</b> Nilai Probit SNEDDS dari Persentase Kematian Embrio .....	35



## DAFTAR BAGAN

<b>Bagan 2. 1</b> Kerangka Konsep Penelitian .....	14
<b>Bagan 3. 1</b> Skema Penelitian .....	20



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1</b> Hasil Identifikasi Tanaman Pegagan .....	46
<b>Lampiran 2</b> <i>Ethical Clearance</i> .....	47
<b>Lampiran 3</b> Hasil Identifikasi Ikan Zebra .....	48
<b>Lampiran 4</b> Proses Pembuatan Ekstrak Daun Pegagan.....	50
<b>Lampiran 5</b> Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Pegagan .....	51
<b>Lampiran 6</b> Perhitungan Nilai LC <sub>50</sub> SNEDDS dan Ekstrak.....	53
<b>Lampiran 7</b> Perkembangan Embrio Normal Selama 72 Jam .....	55
<b>Lampiran 8</b> Analsis Data Menggunakan <i>software</i> SPPS metode deskriptif.....	56



**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*)**

**M. Radinal Ansori**

**Prodi Farmasi**

**INTISARI**

Pegagan (*Centella asiatica L.*) merupakan tanaman yang sering dimanfaatkan sebagai obat tradisional di Indonesia. Daun pegagan mengandung bahan aktif saponin, triterpenoid yang terbukti sebagai antiinflamasi dan antibakteri. *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) merupakan sistem penghantaran obat yang efektif karena dapat meningkatkan bioavailabilitas zat aktif obat.

Pembuatan ekstrak daun pegagan dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Karena SNEDDS dapat meningkatkan efektivitas suatu senyawa perlu dilakukan uji toksisitas sediaan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan yang dibandingkan dengan ekstrak etanol daun pegagan pada embrio ikan zebra.

Penelitian ini menggunakan 14 kelompok uji dengan 5 kelompok uji diberikan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan konsentrasi 20 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2,5 ppm, 1,25 ppm, 5 kelompok uji diberikan ekstrak etanol daun pegagan konsentrasi 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm dan 31,25 ppm, 1 kontrol positif (*3,4-dichloroaniline*), dan 1 kontrol negatif (*dilution water*), 1 kontrol pelarut (SNEDDS tanpa ekstrak), 1 kontrol pelarut ekstrak. Seluruh senyawa uji yang dipaparkan pada embrio ikan zebra diamati tiap 24 jam hingga 96 jam. Hasil yang diperoleh dari pengamatan secara mikroskopis adanya abnormalitas berupa edema perikardium dan abnormalitas somit baik pada sediaan SNEDDS maupun ekstrak. Nilai  $LC_{50}$  yang diperoleh dari sediaan SNEDDS sebesar 8,4878 ppm, sedangkan pada ekstrak sebesar 14,9933. Hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa sediaan SNEDDS bersifat lebih toksik dibandingkan dengan ekstrak.

**Kata kunci :** Pegagan, SNEDDS, Ekstrak, Toksisitas, Embrio



**THE COMPARISON STUDY OF ACUTE TOXICITY TESTING OF SELF-NANOEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM (SNEDDS) PREPARATION FOR ETHANOL EXTRACT OF PEGAGAN LEAVES (*Centella asiatica L.*) AND ETHANOL EXTRACT OF PEGAGAN LEAVES ON ZEBRA FISH EMBRYOS (*Danio Rerio*)**

**M. RADINAL ANSORI**

**Departement of Pharmacy**

**ABSTRACT**

Pegagan (*Centella asiatica L.*) is a plant that often used as traditional medicine in Indonesia. Pegagan leaves contain active ingredients saponins, triterfenoid which are proven to be anti-inflammatory and antibacterial. Self Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) is an effective drug delivery system because it can increase the bioavailability of active drug substances.

In this study, pegagan leaf extract was made using maceration method with 96% ethanol solvent. Because SNEDDS can increase the effectiveness of a compound, it is necessary to test the toxicity of the SNEDDS preparation for the ethanol extract of pegagan leaves compared to the ethanol extract of pegagan leaves in zebrafish embryos.

The study used 14 test groups with 5 test groups given SNEDDS ethanol extract of pegagan leaf concentration of 20 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2.5 ppm, and 1.25 ppm. 5 test groups were given ethanol extract of pegagan leaf concentration of 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62.5 ppm and 31.25 ppm. Furthermore, the study used 1 positive control (3,4-dichloroaniline), 1 negative control (dilution water), 1 solvent control (SNEDDS without extract), and 1 solvent extract control. All of the test compounds exposed to zebra fish embryos were observed every 24 hours to 96 hours. The results of this study find from microscopic observations of abnormalities in the form of pericardial edema and abnormality of somit both on SNEDDS preparations and extracts. LC<sub>50</sub> value obtained from the SNEDDS preparation was 8.4878 ppm, while the extract was 14.9933. So, it can be concluded that SNEDDS preparations is more toxic compared to extract.

**Keywords:** Pegagan, SNEDDS, Extract, Toxicity, Embryos

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki sumber daya hayati yang beraneka ragam. Lebih dari 1000 jenis tumbuhan herbal dari 30.000 jenis yang ada di Indonesia telah dimanfaatkan untuk pembuatan obat tradisional (Salim dan Munadi, 2017). Salah satu tanaman yang digunakan sebagai upaya dalam pengobatan yaitu tanaman pegagan (*Centella asiatica L.*). Tanaman ini mengandung senyawa saponin, tanin, flavonoid, steroid dan triterpenoid (Azzahra dan Hayati, 2019). Kandungan saponin pada pegagan berfungsi menghambat produksi jaringan bekas luka yang berlebihan (Besung, 2011). Studi lainnya juga melaporkan bahwa kandungan triterpenoid yang terkandung memiliki efek farmakologi sebagai antiinflamasi dan antibakteri (Amaliya *et al.*, 2013).

Lebih lanjut, pegagan (*Centella asiatica L.*) biasanya digunakan untuk pencegahan diuretika, antipiretika, hemostatika, antialergi dan stimulan. Pegagan juga bermanfaat untuk meningkatkan sirkulasi darah pada lengan dan kaki, mencegah varises, meningkatkan daya ingat, mental dan stamina tubuh serta untuk menurunkan gejala stres dan depresi (Besung, 2011). Penelitian terkait dengan ekstrak daun pegagan telah banyak dilaporkan, namun belum ada studi yang melakukan modifikasi ekstrak daun pegagan dalam bentuk sediaan nanopartikel.

Pemanfaatan teknologi nanopartikel telah banyak dikembangkan sebagai sistem penghantaran obat. Penghantaran nanopartikel dideskripsikan sebagai formulasi suatu partikel yang terdispersi pada ukuran nanometer atau skala per seribu mikron (Martien *et al.*, 2012). *Self Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) telah muncul sebagai sistem penghantaran yang efektif karena kemampuannya yang terbukti untuk meningkatkan bioavailabilitas zat aktif (Singh *et al.*, 2013). Kemampuan SNEDDS untuk meningkatkan ketersediaan hayati obat dengan kelarutan yang rendah dalam sirkulasi sistemik telah banyak dibuktikan (Bhatia *et al.*, 2011). Beberapa keuntungan potensial dari SNEDDS termasuk kemampuannya untuk menghantarkan obat dalam bentuk terlarut didalam lumen

gastrointestinal (GI) sehingga memberikan area antarmuka yang lebih besar untuk penyerapan obat, memberikan stabilitas kimia dan enzimatis yang lebih besar (Dash *et al.*, 2015). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan modifikasi bentuk sediaan nanopartikel yang diharapkan dapat meningkatkan bioavailabilitas serta meningkatkan efek terapeutik dan mengurangi toksisitas.

Namun, sediaan SNEDDS sebelum dipasarkan dan dikonsumsi, perlu dilakukan serangkaian uji untuk membuktikan keamanan, efektivitas dan mutunya. Uji toksisitas merupakan bagian dari rangkaian pengujian untuk mendeteksi efek toksik dari suatu zat pada sistem biologi dan untuk memperoleh dosis-respon yang khas dari sediaan uji (BPOM, 2014). Pengujian toksisitas dapat menggunakan hewan uji seperti tikus, mencit, kelinci, marmut, dan ikan zebra. Namun, penggunaan ikan zebra (*Danio rerio*) sebagai subjek uji banyak digunakan pada pengujian toksikologi karena memiliki beberapa kelebihan diantaranya mudah dalam penanganan, pemeliharaan, mampu menghasilkan sel telur yang tinggi sekitar 100 hingga 200 buah dengan waktu generasi singkat sekitar 3 bulan serta embrio yang mudah dilihat dalam pengamatan secara *in vivo* (Besu and Sachidanandan, 2013). Ikan zebra (*Danio rerio*) juga memiliki kesamaan DNA sekitar 70 % dengan manusia sehingga mampu memperlihatkan efek paparan toksik pada manusia (Dewanti *et al.*, 2015).

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan uji toksisitas daun pegagan pada tikus dan mencit yang menunjukkan hasil bahwa daun pegagan memiliki toksisitas rendah. Penelitian lain menunjukkan bahwa nanopartikel lebih toksik dibandingkan dengan ekstrak (Riki *et al.*, 2016). Pembuatan sediaan SNEDDS dapat meningkatkan efektifitas dari suatu senyawa sehingga perlu dilakukan uji toksisitas untuk mengetahui batas keamanan dari suatu sediaan. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan perbandingan uji toksisitas antara 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*) yang telah distandarisasi medianya.

## 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana profil ketoksikan akut ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica L.*) dibandingkan dalam bentuk formulasi SNEDDS berdasarkan parameter efek ketoksikkan dan nilai LC<sub>50</sub> pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*) ?

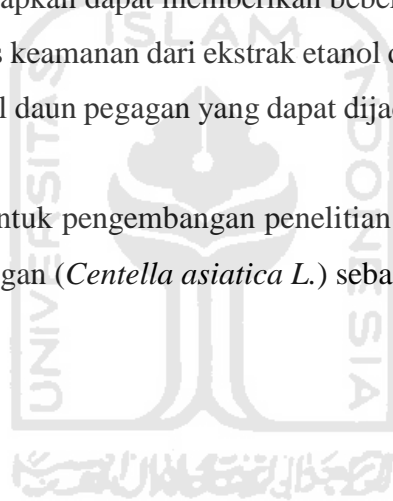
## 1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui profil ketoksikan akut ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica L.*) dibandingkan dalam bentuk formulasi SNEDDS berdasarkan parameter efek ketoksikkan dan nilai LC<sub>50</sub> pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*).

## 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan beberapa manfaat yaitu :

1. Dapat mengetahui batas keamanan dari ekstrak etanol daun pegagan dan sediaan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan yang dapat dijadikan sebagai bahan baku pembuatan obat.
2. Dapat menjadi acuan untuk pengembangan penelitian selanjutnya dalam upaya pemanfaatan daun pegagan (*Centella asiatica L.*) sebagai pengobatan.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tanaman Pegagan

Tanaman pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) memiliki sinonim (*Hydrocotyle asiatica* L. Pes), berasal dari daerah tropis di Asia. Berdasarkan klasifikasi taksonomi, pegagan termasuk ke dalam divisi Spermatophyta, sub-divisi Angiospermae, kelas Dicotyledonae, ordo Umbellales, famili Umbelliferae (Apiaceae), genus *Centella*, spesies *Centella asiatica* (L.) Urban. Pegagan merupakan tumbuhan tropis dengan daerah penyebaran cukup luas, dari dataran rendah sampai dataran tinggi, hingga 2.500 meter di atas permukaan laut. Pegagan dapat ditemukan di daerah perkebunan, ladang, tepi jalan, persawahan, ataupun di ladang yang agak basah (Besung, 2011).

Divisi : Spermatophyta  
Sub-divisi : Angiospermae  
Kelas : Dicotyledonae  
Famili : Umbelliferae (Apiaceae)  
Genus : *Centella*  
Species : *Centella asiatica* (L.)



**Gambar 2. 1** Tumbuhan Pegagan (*Centella asiatica* L.)  
Sumber : (Dokumentasi Peneliti, 2020)

Pegagan merupakan tumbuhan merayap yang menutupi tanah, memiliki batang sangat pendek, dari batang tumbuh geragih atau stolon melata dipermukaan

tanah dengan panjang 10-50 cm. Mempunyai daun tunggal dengan panjang tangkai daun 40 cm tersusun dalam bentuk roset yang terdiri dari 2-10 helai daun. Daun pegagan berwarna hijau dengan permukaan dan punggungnya yang licin, tepinya agak melengkung ke atas, bergerigi dan kadang berambut, tulangnya berpusat dipangkal dan tersebar ke ujung serta berbentuk ginjal, lebar dan bundar dengan diameter 1-7 cm. Tulang daun menjari, akar bercabang, bunga berbentuk payung tunggal, biasanya tersusun dari 3 bunga. Memiliki tangkai bunga dengan panjang 5-50 mm (Winarto dan Surbakti, 2003).

Beberapa komponen bioaktif yang terkandung didalam tumbuhan pegagan (*Centella asiatica L.*) yaitu saponin, asiatikosida, madekasosida, asam brahmik, asam madasiatik, messoinositol, centellosida, karetonoida, hidrokotilin, tanin, serta garam mineral. Tanaman pegagan juga mengandung resin, minyak atsiri, sitosterol yang terdiri dari gliserida, asam oleat, linoleat, palmitat, stearat, sentoat, dan sentelat yang berguna untuk meningkatkan sistem imun tubuh (Sutardi, 2016). Daun pegagan mengandung bahan aktif saponin, tanin, flavonoid, steroid dan triterpenoid. Pegagan memiliki banyak manfaat untuk kesehatan tubuh diantaranya untuk mengatasi demam, antibakteri, antialergi, dan stimulan sistem saraf pusat. Kandungan flavonoid pada daun pegagan berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu membran dan dinding sel (Azzahra dan Hayati, 2018). Senyawa saponin pada pegagan juga dapat memebentuk senyawa kompleks dengan membran sel melalui ikatan hidrogen yang dapat menghancurkan permeabilitas dinding sel bakteri (Ramadhan *et al.*, 2015).

Pengujian ekstrak etanol daun pegagan sebagai aktivitas antibakteri yang terbukti efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* (Widiastuti *et al.*, 2016). Penelitian sebelumnya tentang aktivitas ekstrak etanol daun pegagan yang diformulasi dalam bentuk sediaan SNEDDS sebagai antihiperqlikemia yang diuji pada ikan zebra menunjukkan hasil bahwa SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan mampu menurunkan kadar glukosa darah (Sekarraras, 2019). Penelitian lainnya membuktikan bahwa kandungan triterpenoid (*asiaticoside*) pada tanaman pegagan mampu meregenerasi sel otak nekrosis

sehingga dapat membantu memperbaiki daya ingat (Muchtaromah dan Umami, 2016).

## **2.2 Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS)**

*Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) merupakan campuran minyak isotropik, surfaktan dan ko-surfaktan yang memiliki kemampuan baik dalam membentuk nanoemulsi dengan ukuran partikel antara 10-300 nm (Christiansen *et al.*, 2014). Sediaan SNEDDS mampu menjadi sitem penghantaran yang baik untuk obat protein untuk obat protein maupun obat dengan tingkat absorpsi yang rendah. Formulasi SNEDDS yang optimal dipengaruhi oleh sifat fisikokimia dan konsentrasi minyak, surfaktan, ko-surfaktan, rasio masing-masing komponen pH, suhu, dan emulsifikasi (Date *et al.*, 2010).

Nanoemulsi yang dibuat dalam bentuk sediaan SNEDDS memiliki beberapa kelebihan diantaranya dapat mengurangi iritasi pada dinding lambung karena mekanisme kerjanya yang mengurangi kontak langsung obat dengan dinding lambung (Pol *et al.*, 2013). Kelebihan lainnya juga dapat terbentuk nanoemulsi secara spontan di dalam saluran cerna yang dapat meningkatkan kelarutan, bioavailabilitas, dan efek farmakologi obat (Garg *et al.*, 2017). Kekurangan dari sediaan SNEDDS yaitu keterbatasan dalam pengembangan bentuk sediaan dan memiliki stabilitas yang rendah (Chavda *et al.*, 2013). Berikut beberapa komponen pada sediaan SNEDDS :

### **1. Minyak**

Minyak digunakan sebagai pembawa dalam formulasi SNEDDS yang dapat melarutkan bahan aktif lipofilik. Beberapa pembawa yang digunakan pada sediaan SNEDDS diantaranya Capryol-9, Virgin Coconout Oil (VCO), Minyak zaitun dsb. Minyak ini dibawa dalam tubuh melalui sitem limfatik untuk membawa obat melewati fase *first pass metabolism* sehingga dapat meningkatkan bioavailabilitas obat dalam tubuh (Singh, 2010).

### **2. Surfaktan**

Komposisi surfaktan akan sangat mempengaruhi stabilitas campuran, oleh karena itu semakin banyak jumlah surfaktan yang diberikan maka campuran akan semakin jernih (Anindhita dan Oktaviani, 2016). Surfaktan non ionik umumnya

digunakan karena memiliki toksisitas yang rendah dibandingkan dengan surfaktan ionik (Gupta *et al.*, 2010).

### 3. Ko-Surfaktan

Pemberian surfaktan saja tidak cukup untuk mengurangi tegangan antarmuka antara minyak-air, sehingga perlu ko-surfaktan untuk menurunkan tegangan antarmuka. Kosurfaktan juga dapat meningkatkan mobilitas ekor hidrokarbon sehingga penetrasi minyak pada bagian ekor menjadi lebih besar (Gupta *et al.*, 2010).

*Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) merupakan strategi untuk menarik minat peneliti secara luas, karena dapat melarutkan dan meningkatkan ketersediaan hayati obat-obatan yang memiliki kelarutan dalam air yang rendah atau obat-obatan yang bersifat lipofilik. Kelarutan obat dalam air adalah properti molekul penting yang diperlukan untuk pengembangan obat yang baik. Hal ini sangat menentukan akseibilitas obat ke membran biologis. Itu pentingnya kelarutan dalam disposisi obat karena tingkat optimal transportasi obat pasif melintasi jalur utama penyerapan obat tidak hanya tergantung pada permeabilitas tetapi juga kelarutan obat (Obitte *et al.*, 2011). Oleh sebab itu, dibuat formulasi dalam sediaan SNEDDS untuk memperbaiki kelarutan zat aktif obat.

### 2.3 Ikan Zebra (*Danio rerio*)

Ikan zebra (*Danio rerio*) merupakan jenis ikan tropis berukuran kecil yang dapat ditemukan disungai-sungai di negara india utara (Teame *et al.*, 2019). Penggunaan ikan zebra untuk sebagai organisme model untuk pengembangan genetik, toksikologi, gangguan metabolisme, serta gangguan tubuh manusia lainnya menjadi sangat populer. Ikan zebra atau dikenal dengan nama ilmiah *Danio rerio* memiliki kurang lebih 45 spesies di dunia. Ikan ini merupakan famili *Cyprinidae*. Garis-garis sebagai corak yang ada pada tubuh ikan terdiri dari beberapa sel pigmen. Garis berwarna biru hitam terdiri dari dua sel pigmen, yaitu melanofor dan iridiofor, sedangkan pada garis berwarna kuning perak terdiri dari sel pigmen xantofor dan iridiofor. Garis-garis pada ikan berfungsi untuk adaptasi terhadap lingkungannya melalui mekanisme kamuflase (Yuniarto *et al.*, 2017).



Kingdom : Animalia  
Filum : Chordata  
Kelas : Actinopterygii  
Ordo : Cypriniformes  
Family : Cyprinidae  
Genus : *Brachydanio*  
Spesies : *Danio rerio*

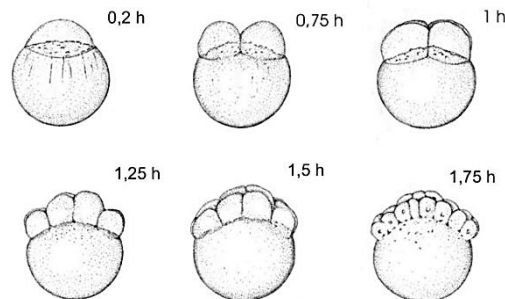


**Gambar 2. 2** Ikan Zebra  
Sumber : (Teame *et al.*, 2019)

Ikan zebra (*Danio rerio*) mewakili salah satu ikan kecil yang paling banyak digunakan dalam penelitian toksikologi, karena sifat-sifat yang menguntungkan seperti siklus hidup yang pendek, produksi telur yang sering, mudah dibudidayakan, dan korion embrio transparan yang memungkinkan untuk penentuan status pembuahan dan analisis morfologi sepanjang pengembangan (Gerhart *and* Janz, 2019).

Embrio ikan zebra (*Danio rerio*) banyak digunakan dalam penelitian, hal ini berkaitan dengan sifat fisiologis dan ekotoksikologi dari spesies ini. Keuntungan menggunakan ikan zebra karena ikan zebra memiliki ukuran yang kecil, mudah beradaptasi pada lingkungan yang berbeda, dan dapat menghasilkan telur dalam jumlah yang banyak (Kowan *et al.*, 2015). Embrio ikan zebra juga dapat digunakan dalam model penelitian toksisitas zat kimia, hal ini berkaitan dengan proses embriogenesis yang cepat dan memiliki struktur tubuh yang transparan, mudah dipelihara dan mewakili data *in vivo* dari mamalia (Kari *et al.*, 2007). Ikan zebra memiliki jantung dan sistem vaskularisasi yang sama dengan manusia. Pada embrio

ikan zebra denyut jantung normal mendekati denyut jantung pada manusia yaitu 120-170 kali per menit (Kowan *et al.*, 2015).



**Gambar 2. 3** Perkembangan Normal Embrio Ikan Zebra Pada Suhu 26°C  
(Selengkapnya Lihat Lampiran 7)  
Sumber : (OECD, 2013)

#### 2.4 Uji Toksisitas Embrio Ikan Zebra

Uji toksisitas dilakukan untuk menentukan potensi ketoksikan relatif pada suatu obat. Pengujian ini bertujuan untuk mencari besarnya dosis tunggal yang dapat menyebabkan kematian 50% sekelompok hewan uji. Pada tahap ini juga dilakukan pengamatan terhadap gejala toksik dan perubahan patologis organ hewan uji (Elya *et al.*, 2011).

Uji toksisitas dibedakan menjadi 2 jenis yaitu uji toksisitas umum dan uji toksisitas khusus. Uji toksisitas umum terdiri dari uji toksisitas akut, subakut, dan kronis, sedangkan uji toksisitas khusus terdiri dari uji teratogenik, mutagenik, dan karsinogenik (Sjabana, 2006). Uji toksisitas akut dilakukan dengan mengukur derajat efek toksik suatu senyawa yang terjadi dalam waktu 24 jam atau dicukupkan hingga 14 hari untuk melihat efek suatu ekstrak yang diberikan dengan menggunakan dosis tunggal. Parameter yang paling sering untuk menyatakan dosis toksisitas akut adalah *Lethal dose* atau disingkat (LD<sub>50</sub>). Uji toksisitas memberikan informasi tentang bahaya kesehatan akibat paparan bahan tertentu pada tubuh (Ihwan *et al.*, 2018). Tujuan dilakukan uji toksisitas untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi untuk memperoleh data dosis-respon yang khas dari sediaan uji. Data yang diperoleh dapat menjadi informasi mengenai derajat bahaya sediaan uji tersebut bila terjadi paparan pada manusia, sehingga dapat ditentukan dosis keamanannya (BPOM, 2014).

### 2.4.1 Prinsip Pengujian

Uji toksisitas akut menggunakan acuan OECD 236 untuk menentukan batas keamanan pada bahan kimia atau suatu sediaan yang dipaparkan pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*). Embrio ikan zebra yang digunakan untuk pengujian yaitu embrio yang berumur kurang dari 6 jam setelah fertilisasi dengan kondisi yang baik dan tahap perkembangan yang seragam untuk menghindari hasil yang bias. Embrio yang fertil dapat dilihat ketika embrio telah melewati pembelahan 32 sel atau sekitar umur lebih dari 1,75 jam. Embrio yang berumur diatas 6 jam setelah fertilisasi ketika dipaparkan senyawa uji akan sulit menembus membran embrio (OECD 2013). Embrio ikan zebra yang telah melewati tahap seleksi kemudian dipaparkan senyawa uji selama 96 jam yang diamati setiap 24 jam. Pada akhir periode paparan, toksisitas akut ditentukan berdasarkan indikator kematian dari empat parameter yang diamati yaitu embrio yang mengalami koagulasi, tidak terjadi pembentukan somit, tidak terlepasnya *tail-bud* dari *yolk* dan tidak berdetaknya jantung embrio serta dilakukan perhitungan nilai LC<sub>50</sub> (OECD, 2013). Beberapa parameter yang diamati sebagai berikut :

#### 1. Koagulasi Embrio

Embrio yang mengalami koagulasi ketika dilihat dibawah mikroskop ditandai dengan embrio berwarna gelap dan terjadi penggumpalan.

#### 2. Pembentukan Somit

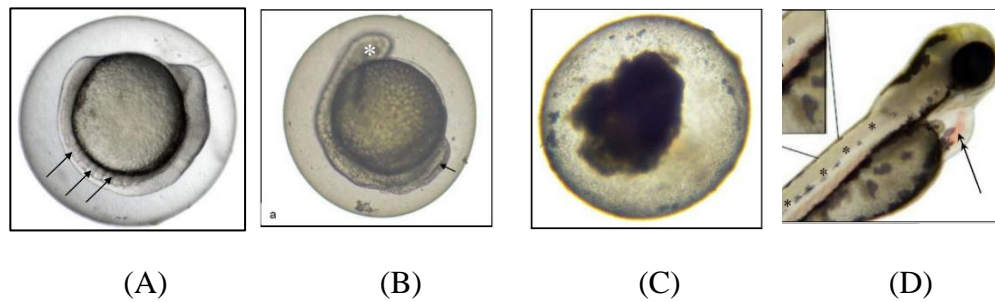
Somit merupakan masa mesoderm dalam tahap perkembangan embrio vertebrata yang didistribusikan secara lateral ke tabung saraf yang akan mengembangkan dermis (*dermatome*), otot skeletal (*myotome*), dan tulang belakang (*sclerotome*). Perkembangan normal embrio dapat terlihat pembentukan somit setelah 24 jam proses fertilisasi.

#### 3. Lepasnya *tail-bud* dari *yolk*

Setelah terjadi pemanjangan posterior dari tubuh embrionik dapat diamati pelepasan ekor dari kuning telurnya. Hal ini dapat diamati setelah 24 jam proses fertilisasi.

#### 4. Detak jantung embrio

Detak jantung embrio ikan zebra dapat diamati setelah 48 jam proses fertilisasi. Apabila setelah 48 jam proses fertilisasi tidak terlihat adanya detak jantung embrio ikan zebra menunjukkan bahwa embrio telah mengalami kematian.



**Gambar 2. 4** (A) Pembentukan somit; (B) Lepasnya bagian *tail bud* dari *yolk*; (C) Koagulasi embrio; (D) Adanya detak jantung

Sumber: (OECD, 2013)

**Tabel 2. 1** Contoh Tabel Hasil Pengamatan

	Waktu Pengamatan			
	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam
Koagulasi Embrio	+	+	+	+
Terbentuknya Somit	+	+	+	+
Lepasnya Bagian <i>Tail Bud</i> dari <i>Yolk</i>	+	+	+	+
Detak Jantung		+	+	+

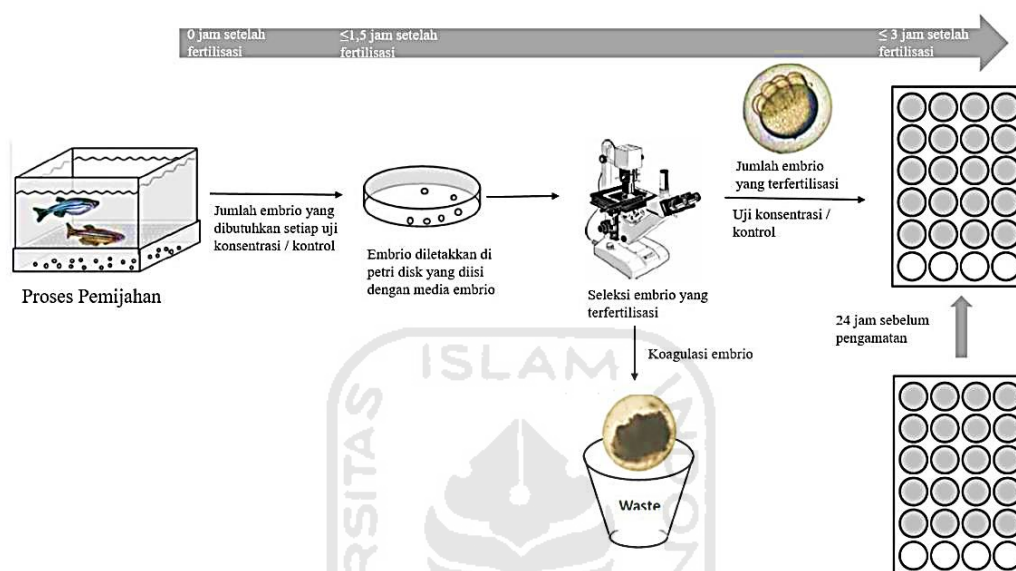
Sumber : (OECD, 2013)

#### 2.4.2 Validitas Pengujian

Beberapa syarat uji toksisitas yang valid menurut OECD 236 sebagai berikut.

1. Tingkat fertilisasi keseluruhan dari semua telur yang dikumpulkan harus  $\geq 70\%$  dalam kelompok yang diuji.
2. Suhu air dijaga pada  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  di ruang uji setiap saat selama pengujian.
3. Kelangsungan hidup keseluruhan embrio dalam kontrol negatif (*dilution-water*), dan jika relevan dalam kontrol pelarut harus  $\geq 90\%$  sampai akhir paparan hingga 96 jam.
4. Paparan kontrol positif (misalnya 4,0 mg/L 3,4-dikloroanilin untuk ikan zebra) harus menghasilkan mortalitas minimal 30% pada akhir paparan 96 jam.

5. Laju penetasan dalam kontrol negatif (dan kontrol pelarut jika sesuai) harus  $\geq 80\%$  pada akhir paparan 96 jam.
6. Pada akhir paparan 96 jam, konsentrasi oksigen terlarut dalam kontrol negatif dan konsentrasi uji tertinggi harus  $\geq 80\%$  dari saturasi.



**Gambar 2. 5** Skema Prosedur Uji Toksisitas Akut Pada Embrio Ikan Zebra  
Sumber : (OECD, 2013)

### 2.4.3 3,4-dichloroaniline (DCA)

Senyawa 3,4-dichloroaniline merupakan derivat dari 1,2-dichlorobenzene yang sangat toksik pada kehidupan air dan organisme yang dipaparkan. DCA berfungsi sebagai kontrol positif dalam uji toksisitas akut yang dapat mematikan dan menghambat perkembangan embrio ikan zebra (Hill *et al.*, 2005).

### 2.4.4 Keuntungan dan Kelemahan Menggunakan Embrio Ikan Zebra

Keuntungan bekerja menggunakan *Fish Embryo Acute Toxicity Test* (FET) yaitu dapat memungkinkan penyaringan besar-besaran secara simultan dari banyak bahan kimia karena dapat dimanipulasi dan dipapar dalam pelat multi-sumur dengan tangan, sehingga waktu lebih efisien dan mengurangi biaya (Glaberman *et al.*, 2017). Kelemahannya pada senyawa neurotoksik tidak dapat menunjukkan toksisitas pada embrio ikan zebra karena rendahnya sindrom gagal napas pada

embrio ikan akibat pengambilan oksigen oleh difusi dan bebas dari sistem kardiovaskular (Birke *and* Scholz, 2018).

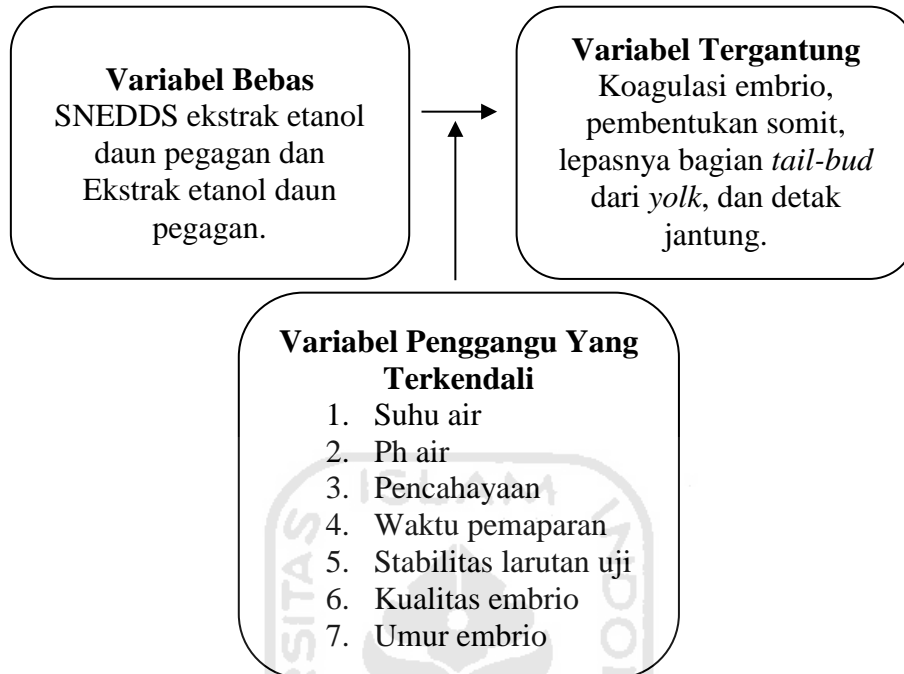
## 2.5 Landasan Teori

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan uji nilai LC<sub>50</sub> dekokta *Centella asiatica* terhadap frekuensi denyut jantung embrio ikan zebra menunjukkan hasil bahwa pemaparan dekokta *Centella asiatica* dengan dosis 83 µg/ml dan 377 µg/ml tidak mengurangi denyut jantung embrio ikan zebra, sedangkan pada pemaparan dosis 621 µg/ml menurunkan frekuensi denyut jantung embrio ikan zebra (Kowan *et al.*, 2015). Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak pegagan termasuk dalam kategori toksisitas rendah. Penelitian uji toksisitas akut dan subakut telah dilakukan pada tikus jantan dan tikus betina dengan pemberian dosis oral ekstrak aseton daun pegagan dengan dosis 4000 mg/kg tidak terjadi perubahan berat badan, serta perubahan parameter hematologi yang menunjukkan bahwa ekstrak aseton daun pegagan tidak menimbulkan efek toksik (Chauhan *and* Singh, 2012). Penelitian uji toksisitas ekstrak air daun pegagan juga telah dilakukan pada mencit dengan nilai LD<sub>50</sub> sebesar 13,6 g/KgBB menunjukkan hasil toksisitas rendah (Praptiwi *et al.*, 2010). Penelitian sebelumnya terkait sediaan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan yang diuji pada embrio ikan zebra memiliki nilai LC<sub>50</sub> sebesar 40,74 ppm yang menunjukkan hasil bahwa sediaan SNEDDS bersifat toksik pada embrio ikan zebra (Tsani, 2019). Akan tetapi, penelitian sebelumnya media embrio yang digunakan belum memenuhi standar panduan dalam OECD 236. Penelitian lain yang membandingkan ketoksikan sediaan nanopartikel dengan ekstrak menunjukkan hasil bahwa sediaan nanopartikel lebih toksik dibandingkan dengan ekstrak (Riki *et al.*, 2016).

## 2.6 Hipotesis

Berdasarkan landasan teori diatas dapat diajukan hipotesis bahwa sediaan *Self Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica L.*) lebih toksik dibandingkan dengan ekstrak etanol daun pegagan pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*).

## 2.7 Kerangka Konsep



Bagan 2. 1 Kerangka Konsep Penelitian

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Alat dan Bahan**

##### **3.1.1 Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi seperangkat alat gelas (*Pyrex*), *Rotary Evaporator* (Heidolph), *micropipette* (Thermo Scientific dan Finnipipette), timbangan analitik (Melter Toledo XS205 Dual Range), mikroskop stereo (Olympus), pipet pasteur, petri dish, akuarium, grinder, corong *buchner*, *microwell-plate-24* sumuran (IWAKI), *cabinet dryer*, *waterbat*, vortex.

##### **3.1.2 Bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi simplisia daun pegagan yang diperoleh dari Kalibawang, Kulonprogo, Yogyakarta, etanol 96%, 3,4-DCA (*dichloroaniline*).

##### **3.1.3 Subjek Uji**

Hewan uji yang digunakan yaitu ikan zebra (*Danio rerio*) dengan bibit ikan berasal dari pedagang ikan hias di Bogor, Jawa Barat, yang kemudian dikembangkan dalam Laboratorium Uji Pra Klinik FMIPA UII. Kriteria inklusi ikan zebra yang digunakan yaitu ikan berumur 4-6 bulan, ikan dalam keadaan sehat yang harus terbebas dari gejala infeksi dan penyakit yang dapat terlihat secara makroskopik dan tidak menjalani proses pengobatan. Kriteria eksklusi ikan zebra yaitu ikan sakit atau mati selama percobaan. Sedangkan kriteria embrio yang digunakan yaitu embrio yang fertil dan berumur kurang dari 6 jam setelah fertilisasi. Kriteria eksklusi embrio yaitu embrio ikan zebra yang mengalami koagulasi.

##### **3.1.4 Aklimatisasi Subjek Uji**

Ikan zebra yang diperoleh dari Bogor di adaptasi selama 7 hari dalam akuarium yang berisi air dan penambahan aquasafe untuk menetralkan bakteri. Aerator dipasang untuk udara ikan zebra dalam akuarium. Ikan diberi pakan tretamin® flakes 1-2 kali sehari dan artemia 2 kali seminggu sebagai tambahan



nutrisi. Ikan yang belum melewati masa aklimatisasi tidak boleh digunakan dalam penelitian.

### **3.1.5 Pemeliharaan Ikan zebra**

Ikan zebra yang termasuk dalam kriteria inklusi disimpan di laboratorium selama 9 hari sebelum dilakukan pengujian. Suhu ruangan diatur dengan rentang 25-28°C. Filtrasi air harus diperhatikan dan dipelihara dengan siklus fotoperiod (14 jam gelap dan 10 jam terang). Konsentrasi oksigen 80% dari saturasi udara dengan pH 6,0-8,5. Ikan diberikan pakan setiap 1-2 kali sehari dan artemia 2 kali seminggu sebagai tambahan nutrisi.

## **3.2 Tahapan Penelitian**

### **3.2.1 Koleksi Daun Pegagan**

Daun pegagan yang digunakan sebanyak 10 kg berat basah kemudian dilakukan sortasi. Setelah dilakukan sortasi, daun pegagan dikeringkan menggunakan *cabinet dryer* pada suhu 40°C selama 3 hari hingga kering. Daun pegagan yang telah kering kemudian diserbuk menggunakan grinder.

### **3.2.2 Determinasi Tumbuhan Pegagan ( *Cantella asiatica* L.)**

Tanaman pegagan diperoleh dari Kalibawang, Kulonprogo, Yogyakarta dan dilakukan determinasi di Laboratorium Biologi Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

### **3.2.3 Pengajuan *Ethical Clearance***

*Ethical clearance* pada penelitian ini diajukan kepada Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta yang disertai dengan proposal penelitian.

### **3.2.4 Ekstrak Etanol Daun Pegagan**

Ekstraksi daun pegagan dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% yang dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Universitas Islam Indonesia. Simplisia daun pegagan dihaluskan terlebih dahulu menggunakan *grinder*. Kemudian ditimbang simplisia yang sudah halus sebanyak 338 gram. Simplisia dimaserasi dalam etanol 96% dengan perbandingan 1 : 10 (b/v) selama

72 jam sesekali dilakukan pengadukan. Hasil maserasi disaring menggunakan corong *buchner*. Pelarut dalam ekstrak yang didapatkan diuapkan menggunakan *vacum rotary evaporator* dengan suhu 40°C sehingga didapatkan ekstrak kental daun pegagan. Ekstrak kental yang didapatkan ditimbang berat bersihnya, kemudian dilakukan perhitungan persen rendemen dengan rumus :

$$\% \text{ rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak kental}}{\text{bobot serbuk}} \times 100\%$$

### 3.2.5 Persiapan Fertilisasi Ikan Zebra

Ikan zebra dewasa dibiarkan dalam akuarium pada air buffer (pH 6,8-8,5) pada suhu 25-28°C dengan siklus 14 jam : 10 jam (cahaya : gelap), dengan memberikan pakan setiap hari. Tahap awal ikan jantan dan ikan betina ikan zebra dipisahkan 4 jam sebelum digabungkan. Untuk pemisahan, jantan dan betina dewasa (2:1) di tempatkan pada akuarium semalaman. Keesokan harinya, ovulasi dan pembuahan dirangsang pada awal periode cahaya dilakukan oleh ikan jantan. Hal ini disebabkan ikan jantan bereaksi terhadap cahaya dalam hal pembuahan sel telur dari betina ikan zebra. Telur yang dihasilkan langsung dipindahkan ke dalam petri dish (OECD, 2013).

### 3.2.6 Seleksi Embrio

Embrio yang digunakan yaitu embrio yang terfertilisasi. Digunakan embrio sebelum 6 jam setelah fertilisasi, biasanya digunakan embrio berumur 3 jam agar senyawa yang dipaparkan dapat menembus membran embrio (OECD, 2013).

### 3.2.7 Pemaparan Embrio

Disiapkan 14 *microwell-plate*, terdiri dari 5 *plate* untuk 5 konsentrasi ekstrak daun pegagan dengan konsentrasi 31,25 ppm, 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, dan 500 ppm, 5 *plate* untuk 5 konsentrasi sediaan SNEDDS dengan konsentrasi 1,25 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, dan 20 ppm, 1 *plate* untuk kontrol positif (3,4-DCA 4mg/L), 1 *plate* untuk kontrol negatif (*dilution water*) berupa media embrio dan 1 *plate* untuk kontrol pelarut (SNEDDS tanpa ekstrak), 1 *plate* untuk kontrol pelarut ekstrak. Sebanyak 24 embrio digunakan untuk 1 *plate*, 1 embrio dimasukkan dalam 1 sumuran. Tiap *plate* disisakan beberapa sumuran untuk internal kontrol. Internal

kontrol yang digunakan berupa media embrio untuk memastikan bahwa *plate* yang digunakan tidak ada kontaminasi. Media embrio yang digunakan yaitu air *reverse osmosis* yang ditambahkan dengan E3 yang berisi NaCl, KCl, CaCl, dan MgSO<sub>4</sub> sebagai nutrisi yang telah dilakukan sterilisasi dan penambahan *methylene blue*. Semua larutan uji dimasukkan tanpa embrio dalam inkubator terlebih dahulu selama 24 jam sebelum embrio dimasukkan dalam sumuran (OECD, 2013).

Pada saat pemaparan, suhu larutan uji dijaga dalam suhu 26±1°C dan pH dengan rentang 6,8-8,5. Dalam larutan uji dengan konsentrasi yang telah ditetapkan, dimungkinkan akan terjadi kematian embrio yang kemudian akan dihitung sebagai data LC<sub>50</sub>. Dalam paparan kontrol positif harus menghasilkan kematian dengan jumlah minimum 30% dari seluruh total embrio yang di uji sedangkan kontrol negatif maksimal kematian embrio tidak lebih dari 20% dari total embrio yang di uji pada paparan selama 96 jam (OECD, 2013).

### 3.2.8 Pengamatan Embrio

Pengamatan dilakukan setiap 24 jam hingga 96 jam. Pengamatan embrio dilakukan dibawah mikroskop stereo. Adapun parameter yang diamati yaitu koagulasi embrio, pembentukan somit, lepasnya bagian *tail-bud* dari *yolk*, dan detak jantung (OECD, 2013). Selain itu, juga diamati abnormalitas perkembangan embrio ikan zebra.

## 3.3 Analisis Data

Setelah dilakukan pengamatan secara mikroskopis, kemudian dihitung presentase kematian embrio ikan zebra, presentase embrio yang mengalami koagulasi, terjadi pembentukan somit pada embrio, lepasnya bagian-bagian *tail-bud* dari *yolk*, embrio yang terlihat adanya detak jantung serta persentase embrio yang mengalami abnormalitas. Berikut rumus-rumus yang digunakan :

1. Rumus perhitungan persentase embrio yang mengalami koagulasi dalam satu kelompok uji :

$$= \frac{\text{Jumlah embrio yang mengalami koagulasi}}{\text{Jumlah embrio}} \times 100\%$$

2. Rumus perhitungan persentase embrio yang mengalami pembentukan somit dalam satu kelompok uji:

$$= \frac{\text{Jumlah embrio yang mengalami pembentukan somit}}{\text{jumlah embrio yang hidup}} \times 100\%$$

3. Rumus perhitungan persentase embrio yang mengalami pelepasan *tail-bud* dari *yolk* dalam satu kelompok uji :

$$= \frac{\text{Jumlah embrio yang mengalami pelepasan tail-bud dari yolk}}{\text{Jumlah embrio yang hidup}} \times 100\%$$

4. Rumus perhitungan persentase embrio yang terlihat adanya detak jantung dalam satu kelompok uji :

$$= \frac{\text{Jumlah embrio yang diamati detak jantung terlihat}}{\text{Jumlah embrio yang hidup}} \times 100\%$$

5. Rumus perhitungan persentase jumlah embrio yang mengalami kematian :

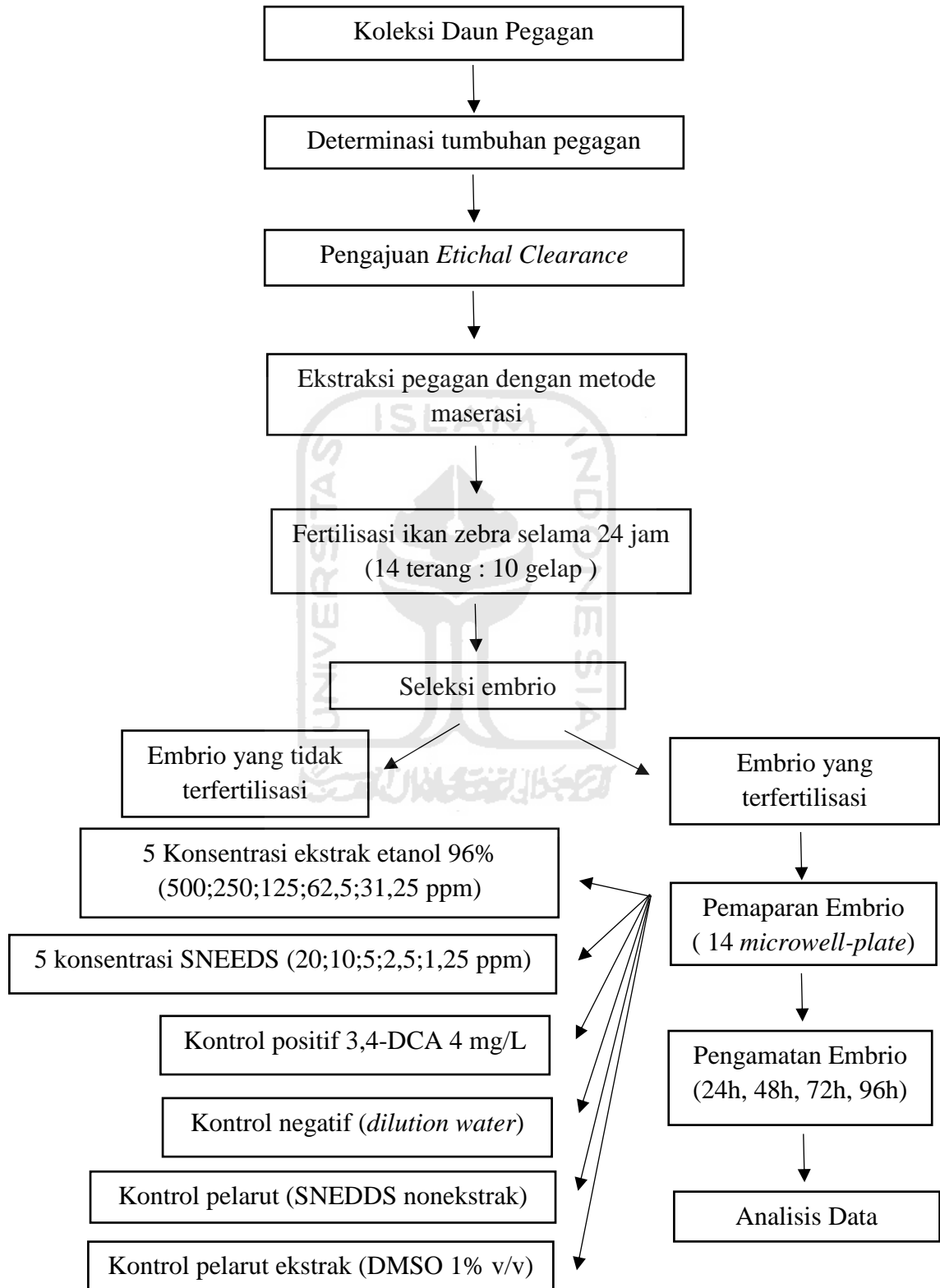
$$= \frac{\text{Jumlah embrio yang mengalami kematian}}{\text{Jumlah embrio yang digunakan}} \times 100\%$$

Selain perhitungan diatas, dihitung juga persentase jumlah embrio yang mengalami abnormalitas dengan rumus :

$$= \frac{\text{Jumlah embrio yang mengalami abnormalitas perkembangan}}{\text{Jumlah embrio yang digunakan}} \times 100\%$$

Persentase kematian embrio yang didapatkan kemudian digunakan untuk menghitung nilai  $LC_{50}$  menggunakan metode analisis dalam *Microsoft Office Excel* dengan membuat persamaan garis lurus hubungan antara nilai probit dengan log konsentrasi. Persamaan garis lurus untuk menghasilkan nilai  $LC_{50}$  dihitung dengan cara memasukkan nilai 5 (probit untuk 50% kematian hewan uji) sebagai garis y sehingga didapatkan x sebagai nilai log konsentrasi. Antilog dari nilai x yang didapatkan yaitu nilai  $LC_{50}$ . Analisis data perbandingan ekstrak dengan SNEDDS ekstrak daun pegagan menggunakan metode deskriptif menggunakan *software SPSS IBM* versi 24.

### 3.4 Skema Penelitian



**Bagan 3. 1** Skema Penelitian

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan tingkat toksisitas atau batas keamanan antara sediaan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica* L.) dengan ekstrak etanol daun pegagan pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*). Kandungan senyawa dari daun pegagan memiliki banyak manfaat salah satunya senyawa triterpenoid yang dipercaya memiliki efek farmakologi sebagai antiinflamasi, antibakteri, dan juga dapat memperbaiki daya ingat. Karena tingginya penggunaan daun pegagan sebagai obat tradisional sangat perlu dilakukan uji toksisitas untuk mengetahui batas keamanan dari daun pegagan. Ekstrak etanol daun pegagan yang dipaparkan pada embrio ikan zebra konsentrasi 31,25 ppm, 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm dan 500 ppm. Sedangkan sediaan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan pada konsentrasi 1,25 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, dan 20 ppm. Kontrol pelarut ekstrak yang digunakan berupa media embrio yang ditambahkan 1% DMSO v/v. Kontrol pelarut yang digunakan pada sediaan SNEDDS berupa media embrio yang ditambahkan dengan SNEDDS tanpa senyawa uji. Dari hasil persentase jumlah kematian embrio ikan zebra diperoleh nilai LC<sub>50</sub> untuk mengetahui konsentrasi kematian 50% dari subjek uji.

#### **4.1 Determinasi Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* L.)**

Determinasi tanaman pegagan telah dilakukan di Laboratorium Sisitematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta (Lampiran 1). Determinasi dilakukan oleh peneliti sebelumnya dengan surat keterangan nomor 014519/S.Tb/II/2019 menunjukkan bahwa hasil identifikasi tanaman termasuk dalam famili *apiaceae* , spesies *centella asiatica* (L.) Urb (Tsani, 2019).

#### **4.2 Ethical Clearance**

Penelitian ini telah lolos kaji etik yang dilakukan oleh Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta dengan nomor 10/Ka.Kom.Et/70/KE/VII/2020 yang dapat dilihat pada lampiran 2.

### 4.3 Ekstraksi Daun Pegagan

#### 4.3.1 Koleksi Tanaman Pegagan

Tanaman pegagan yang diambil dari Kalibawang, Kulonprogo, Yogyakarta sebanyak 10 kg dilakukan pemisahan daun dengan batangnya. Serbuk daun pegagan didapatkan sebesar 338 gram dari hasil penimbangan (Lampiran 4).

#### 4.3.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pegagan

Pembuatan ekstrak etanol daun pegagan dilakukan dengan metode maserasi dengan cara merendam serbuk daun pegagan menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan serbuk : pelarut (1 : 10 b/v) yaitu sebesar 338 gram : 3,38 liter yang diletakkan pada toples kaca, kemudian diaduk dan disimpan di lemari yang terhindar dari paparan cahaya matahari langsung selama 3 hari sesekali dilakukan pengadukan. Ekstrak kental yang didapatkan dilakukan perhitungan persen rendemen sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \% \text{ rendemen ekstrak} &= \frac{\text{bobot ekstrak kental}}{\text{bobot serbuk}} \times 100\% \\ &= \frac{42 \text{ gram}}{338 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 12,426 \% \end{aligned}$$



**Gambar 4. 1** Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella Asiatica L.*) Setelah Dikentalkan

Sumber : (Dokumentasi Peneliti, 2020)

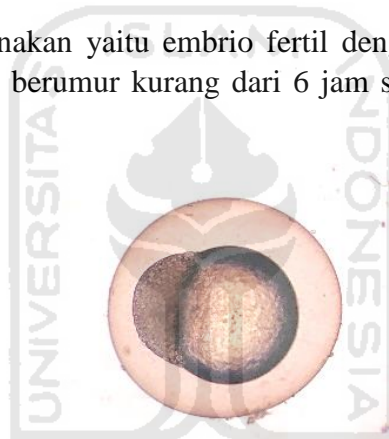
#### 4.4 Sediaan SNEDDS Ekstrak Etanol Daun Pegagan

Sediaan SNEDDS ekstrak daun pegagan yang digunakan telah dibuat oleh peneliti sebelumnya yang telah melewati proses evaluasi sediaan berupa ukuran partikel, zeta potensial, persen transmittan dan juga dilakukan evaluasi stabilitas fisik (Tsani, 2019). Hasil evaluasi yang didapatkan pada ukuran partikel sebesar

103,5 nm berada dalam rentang 50-500 nm yang menunjukkan bahwa SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan memiliki ukuran partikel yang baik. Hasil yang didapatkan pada uji zeta potensial sebesar -8,5 mV yang tidak melebihi +30 mV dan tidak -30 mV yang menunjukkan hasil bahwa sediaan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan memiliki stabilitas yang baik. Hasil nilai persen transmisi yang didapatkan sebesar 75,42% yang menunjukkan bahwa SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan menghasilkan dispersi yang jernih. Hasil yang diperoleh pada pengujian stabilitas fisik sediaan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan tidak terjadi *creaming*, *cracking*, pemisahan dan pengendapan (Tsani, 2019).

#### 4.5 Seleksi Embrio

Embrio yang digunakan yaitu embrio fertil dengan tahap perkembangan embrio yang seragam dan berumur kurang dari 6 jam setelah fertilisasi (OECD, 2013).



**Gambar 4.2** Embrio ikan zebra yang berumur 2-3 jam setelah fertilisasi  
Sumber : (Dokumentasi Peneliti, 2020)



**4.6 Uji Toksisitas Akut Sediaan SNEDDS Ekstrak Etanol Daun Pegagan dengan Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica* L.) Pada Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*)**

**Tabel 4. 1** Persentase Embrio Ikan Zebra yang Mengalami Koagulasi Setelah Dilakukan Pemaparan Ekstrak Etanol Daun Pegagan dan SNEDDS Ekstrak Etanol Daun Pegagan Selama 96 Jam

Kelompok Ekstrak	% embrio yang mengalami koagulasi				Kelompok SNEDDS	% embrio yang mengalami koagulasi			
	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam		24 jam	48 jam	72 jam	96 jam
<b>500 ppm</b>	100	100	100	100	<b>20 ppm</b>	100	100	100	100
<b>250 ppm</b>	5	100	100	100	<b>10 ppm</b>	35	35	35	40
<b>125 ppm</b>	0	30	100	100	<b>5 ppm</b>	5	5	5	5
<b>62,5 ppm</b>	0	0	45	90	<b>2,5 ppm</b>	5	5	5	5
<b>31,25 ppm</b>	0	0	5	55	<b>1,25 ppm</b>	0	0	0	0
<b>Kontrol (+)</b>	5	5	10	15	<b>Kontrol (+)</b>	5	5	10	15
<b>Kontrol (-)</b>	5	5	5	5	<b>Kontrol (-)</b>	5	5	5	5
<b>Kontrol Pelarut</b>	0	0	0	0	<b>Kontrol Pelarut</b>	5	5	5	5

Pada kontrol (+) hingga akhir pemaparan 96 jam persentase embrio yang mengalami koagulasi sebesar 15%. Koagulasi merupakan indikator dari kematian embrio ikan zebra, hasil dari kontrol positif yang didapatkan belum sesuai dengan validitas uji yang tercantum pada OECD 236 tahun 2013 bahwa kontrol positif 3,4-*dichloroaniline* pada akhir pemaparan seharusnya embrio mengalami kematian minimal sebesar 30%. Meskipun embrio tidak mengalami koagulasi, akan tetapi semua embrio mengalami abnormalitas akibat paparan senyawa 3,4-*dichloroaniline* yang menunjukkan bahwa senyawa uji bersifat toksik. Sedangkan hasil persentase koagulasi embrio ikan zebra pada kontrol negatif sebesar 5%. Hasil tersebut masih dalam rentang syarat validitas menurut OECD 236 tahun 2013 bahwa kontrol negatif pada akhir pemaparan 96 jam laju penetasan harus sebesar

$\geq 90\%$ . Pada kontrol pelarut SNEDDS embrio mengalami koagulasi sebesar 5 %. Hasil tersebut masih dalam rentang syarat validitas OECD 236 tahun 2013 bahwa kontrol pelarut pada akhir pemaparan 96 jam laju penetasan harus sebesar  $\geq 90\%$ .

Pada tabel 4.1 kelompok pemaparan ekstrak etanol daun pegagan pada konsentrasi terendah 31,25 ppm embrio mengalami koagulasi sebesar 55% selama pemaparan 96 jam. Pada konsentrasi 62,5 ppm embrio mengalami koagulasi sebesar 90% selama pemaparan 96 jam. Pada konsentrasi 125 ppm embrio mengalami koagulasi sebesar 100% pada jam ke-72 setelah pemaparan. Pada konsentrasi 250 ppm embrio mengalami koagulasi sebesar 100% pada jam ke-48 setelah pemaparan dan pada konsentrasi tertinggi 500 ppm embrio tidak mampu bertahan hidup dari awal dilakukan pengamatan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun pegagan akan semakin cepat embrio mengalami koagulasi.

Pada kelompok pemaparan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan menunjukkan bahwa hasil persentase tertinggi embrio yang mengalami koagulasi terjadi pada konsentrasi 20 ppm sebesar 100% dari awal pengamatan jam ke-24 hingga jam ke-96. Pada konsentrasi 10 ppm dari awal pengamatan jam ke-24 hingga jam ke-72 mengalami koagulasi sebesar 35% sedangkan pada jam ke-96 sebesar 40%. Pada konsentrasi 2,5 ppm dan 5 ppm mengalami koagulasi sebesar 5% dari awal pengamatan jam ke-24 hingga jam ke-96. Pada konsentrasi terendah 1,25 ppm embrio tidak mengalami koagulasi hingga akhir pemaparan. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan akan menyebabkan semakin tingginya persentase embrio yang mengalami koagulasi.

Berdasarkan hasil analisis data deskriptif menggunakan *software* SPSS untuk perlakuan ekstrak keseluruhan konsentrasi pada jam ke-24 didapatkan hasil koagulasi minimal sebesar 0%, koagulasi maksimal sebesar 100% dan rata-rata sebesar 21%, pada jam ke-48 koagulasi minimal sebesar 0%, koagulasi maksimal sebesar 100%, dan rata-rata sebesar 46%, pada jam ke-72 koagulasi minimal sebesar 5%, koagulasi maksimal sebesar 100%, dan rata-rata sebesar 70%, pada jam ke-96 koagulasi minimal sebesar 55%, koagulasi maksimal sebesar 100%, dan

rata-rata sebesar 89%. Sedangkan pada kelompok perlakuan SNEDDS keseluruhan konsentrasi pada jam ke-24 didapatkan hasil koagulasi minimal sebesar 0%, koagulasi maksimal sebesar 100%, dan rata-rata sebesar 21%, pada jam ke-48 koagulasi minimal sebesar 0%, koagulasi maksimal sebesar 100%, dan rata-rata sebesar 29%, pada jam ke-72 koagulasi minimal sebesar 0% , koagulasi maksimal sebesar 100% dan rata-rata sebesar 29%, pada jam ke-96 koagulasi minimal sebesar 0%, koagulasi maksimal sebesar 100% dan rata-rata sebesar 30% (Lampiran 8).

**Tabel 4. 2** Persentase Embrio Ikan Zebra yang Mengalami Pembentukan Somit Setelah Dilakukan Pemaparan Ekstrak Etanol Daun Pegagan dan SNEDDS Ekstrak Etanol Daun Pegagan Selama 96 Jam

Kelompok Ekstrak	% embrio yang mengalami pembentukan somit				Kelompok SNEDDS	% embrio yang mengalami pembentukan somit			
	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam		24 jam	48 jam	72 jam	96 jam
<b>500 ppm</b>	0	0	0	0	<b>20 ppm</b>	0	0	0	0
<b>250 ppm</b>	100	0	0	0	<b>10 ppm</b>	100	100	100	100
<b>125 ppm</b>	100	100	0	0	<b>5 ppm</b>	100	100	100	100
<b>62,5 ppm</b>	100	100	100	100	<b>2,5 ppm</b>	100	100	100	100
<b>31,25 ppm</b>	100	100	100	100	<b>1,25 ppm</b>	100	100	100	100
<b>Kontrol (+)</b>	100	100	100	100	<b>Kontrol (+)</b>	100	100	100	100
<b>Kontrol (-)</b>	100	100	100	100	<b>Kontrol (-)</b>	100	100	100	100
<b>Kontrol Pelarut</b>	100	100	100	100	<b>Kontrol Pelarut</b>	100	100	100	100

Pembentukan somit pada embrio ikan zebra akan terlihat setelah 24 jam proses fertilisasi. Terhambatnya pembentukan somit akan mengakibatkan embrio mengalami kelainan sumbu tubuh. Pada kelompok kontrol positif dan negatif keseluruhan embrio mengalami pembentukan somit dari awal pengamatan hingga 96 jam. Akan tetapi, pada kontrol positif embrio mengalami abnormalitas

pembentukan somit yang menunjukkan bahwa kontrol positif dapat menghambat perkembangan somit.

Berdasarkan tabel diatas pada kelompok perlakuan ekstrak etanol daun pegagan pada konsentrasi 31,25 ppm dan 62,5 ppm embrio mengalami pembentukan somit sebesar 100% hingga akhir pemaparan 96 jam. Pada konsentrasi 125 ppm pembentukan somit hanya dapat diamati hingga 48 jam setelah pemaparan yaitu sebesar 100% karena pada jam ke-72 embrio mengalami koagulasi. Pada konsentrasi 250 ppm pembentukan somit hanya dapat diamati pada jam ke-24 dan konsentrasi 500 ppm tidak dapat dilihat pembentukan somit dari awal pengamatan karena embrio telah mengalami koagulasi. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun pegagan yang dipaparkan akan semakin terhambat pemeentukan somit pada embrio ikan zebra.

Pada konsentrasi tertinggi pemaparan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan yaitu 20 ppm tidak terjadi pembentukan somit karena dari awal pengamatan jam ke-24 hingga jam ke-96 keseluruhan embrio mengalami koagulasi. Dari beberapa konsentrasi yang dilakukan pemaparan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan selama embrio tidak mengalami koagulasi, maka tidak akan mempengaruhi pembentukan somit.

Berdasarkan hasil analisis data deskriptif menggunakan *software* SPSS untuk perlakuan ekstrak keseluruhan konsentrasi pada jam ke-24 didapatkan hasil pembentukan somit minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100% dan rata-rata sebesar 80%, pada jam ke-48 pembentukan somit minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100%, dan rata-rata sebesar 60%, pada jam ke-72 pembentukan somit minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100%, dan rata-rata sebesar 40%, dan pada jam ke-96 pembentukan somit minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100%, dan rata-rata sebesar 40%. Sedangkan pada kelompok perlakuan SNEDDS keseluruhan konsentrasi pada jam ke-24 didapatkan hasil pembentukan somit minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100%, dan rata-rata sebesar 80%, pada jam ke-48 pembentukan somit minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100% dan rata-rata sebesar 80%, pada jam ke-72 pembentukan somit minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100% dan rata-rata sebesar 80%, dan pada jam ke-96

pembentukan somit minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100% dan rata-rata sebesar 80% (Lampiran 8).

**Tabel 4. 3** Persentase Embrio Ikan Zebra yang Mengalami Lepasnya *Tail-Bud* Dari *Yolk* Setelah Dilakukan Pemaparan Ekstrak Etanol Daun Pegagan dan SNEEDS Ekstrak Etanol Daun Pegagan Selama 96 Jam

Kelompok Ekstrak	% embrio yang mengalami lepasnya <i>tail-bud</i> dari <i>yolk</i>				Kelompok SNEEDS	% embrio yang mengalami lepasnya <i>tail-bud</i> dari <i>yolk</i>			
	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam		24 jam	48 jam	72 jam	96 jam
<b>500 ppm</b>	0	0	0	0	<b>20 ppm</b>	0	0	0	0
<b>250 ppm</b>	100	0	0	0	<b>10 ppm</b>	100	100	100	100
<b>125 ppm</b>	100	100	0	0	<b>5 ppm</b>	100	100	100	100
<b>62,5 ppm</b>	100	100	100	100	<b>2,5 ppm</b>	100	100	100	100
<b>31,25 ppm</b>	100	100	100	100	<b>1,25 ppm</b>	100	100	100	100
<b>Kontrol (+)</b>	80	100	100	100	<b>Kontrol (+)</b>	80	100	100	100
<b>Kontrol (-)</b>	100	100	100	100	<b>Kontrol (-)</b>	100	100	100	100
<b>Kontrol Pelarut</b>	100	100	100	100	<b>Kontrol Pelarut</b>	100	100	100	100

Indikator yang juga diamati selama pemaparan senyawa uji yaitu pelepasan *tail-bud* dari *yolk*. *Tail-bud* merupakan bagian dari ekor embrio. Sedangkan *yolk* merupakan bagian kuning telur dari embrio yang berbentuk bulat yang ditempel di ekor dari embrio yang berfungsi menyediakan nutrisi bagi embrio. Perkembangan embrio dilihat dari kemampuan melepaskan *tail-bud* dari *yolk* yang akan mempengaruhi penetasan telur. Pada kelompok kontrol positif 3,4-*dichloroaniline* pada jam ke-24 embrio yang mengalami pelepasan *tail-bud* dari *yolk* sebesar 80% dan meningkat 100% hingga jam ke-96. Hal tersebut dapat terjadi karena senyawa 3,4-*dichloroaniline* dapat mempengaruhi pelepasan *tail-bud* dari *yolk*. Sedangkan pada kontrol negatif semua embrio mengalami pelepasan *tailbud* dari *yolk* sebesar 100% dari hasil pengamatan jam ke-24 hingga jam ke-96.

Berdasarkan data tabel 4.3 pada kelompok perlakuan ekstrak etanol daun pegagan konsentrasi 31,25 ppm dan 62,5 ppm hingga akhir pemaparan 96 jam embrio mengalami pelepasan *tail-bud* dari *yolk* sebesar 100%. Pada konsentrasi 125 ppm lepasnya *tail-bud* dari *yolk* hanya dapat diamati hingga 48 jam pemaparan sebesar 100% karena pada pengamatan jam ke-72 embrio tidak ada yang mampu bertahan hidup. Pada konsentrasi 250 ppm embrio yang mengalami lepasnya *tail-bud* dari *yolk* hanya dapat diamati hingga jam ke-24 pemaparan sebesar 100% karena pada jam ke-48 pengamatan semua embrio telah mengalami koagulasi. Pada konsentrasi 500 ppm embrio tidak dapat diamati dari awal pengamatan 24 jam hingga 96 jam karena seluruh embrio telah mengalami koagulasi. Hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun pegagan akan semakin mempengaruhi pelepasan *tail-bud* dari *yolk*.

Pada kelompok perlakuan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan menunjukkan hasil bahwa semua embrio yang bertahan hidup akan mengalami pelepasan *tail-bud* dari *yolk*. Pada konsentrasi 20 ppm tidak ada satupun embrio yang mampu bertahan hidup setelah dilakukan pengamatan pada jam ke-24 hingga jam ke-96, sehingga menyebabkan embrio tidak mengalami pelepasan *tail-bud* dari *yolk*.

Berdasarkan hasil analisis data deskriptif menggunakan *software* SPSS untuk perlakuan ekstrak keseluruhan konsentrasi pada jam ke-24 didapatkan hasil lepasnya *tail-bud* dari *yolk* minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100% dan rata-rata sebesar 80%, pada jam ke-48 lepasnya *tail-bud* dari *yolk* minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100%, dan rata-rata sebesar 60%, pada jam ke-72 lepasnya *tail-bud* dari *yolk* minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100%, dan rata-rata sebesar 40%, dan pada jam ke-96 lepasnya *tail-bud* dari *yolk* minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100%, dan rata-rata sebesar 40%. Sedangkan pada kelompok perlakuan SNEDDS keseluruhan konsentrasi pada jam ke-24 didapatkan hasil lepasnya *tail-bud* dari *yolk* minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100%, dan rata-rata sebesar 80%, pada jam ke-48 lepasnya *tail-bud* dari *yolk* minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100% dan rata-rata sebesar 80%, pada jam ke-72 lepasnya *tail-bud* dari *yolk* minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100% dan rata-rata sebesar 80%, dan pada

jam ke-96 lepasnya *tail-bud* dari *yolk* minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100% dan rata-rata sebesar 80% (Lampiran 8).

**Tabel 4. 4** Persentase Embrio Ikan Zebra yang Terlihat Adanya Detak Jantung Setelah Dilakukan Pemaparan Ekstrak Etanol Daun Pegagan dan SNEDDS Ekstrak Etanol Daun Pegagan selama 96 Jam

Kelompok Ekstrak	% embrio yang terlihat adanya detak jantung				Kelompok SNEDDS	% embrio yang terlihat adanya detak jantung			
	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam		24 jam	48 jam	72 jam	96 jam
500 ppm	0	0	0	0	20 ppm	0	0	0	0
250 ppm	0	0	0	0	10 ppm	0	100	100	100
125 ppm	0	42	0	0	5 ppm	0	100	100	100
62,5 ppm	0	100	100	100	2,5 ppm	0	100	100	100
31,25 ppm	0	100	100	100	1,25 ppm	0	100	100	100
Kontrol (+)	0	100	100	100	Kontrol (+)	0	100	100	100
Kontrol (-)	0	100	100	100	Kontrol (-)	0	100	100	100
Kontrol pelarut	0	100	100	100	Kontrol pelarut	0	100	100	100

Jantung merupakan organ yang pertama kali terbentuk pada ikan zebra dan memiliki kemiripan dengan embriogenesis pada manusia. Perkembangan jantung setelah 24 jam proses fertilisasi pada ikan zebra sebanding dengan usia 3 minggu intrauterin pada manusia (Denvir *et al.*,2008) . Berdasarkan OECD 236 tahun 2016 bahwa detak jantung embrio ikan zebra dapat diamati setelah jam ke-48 dari proses fertilisasi. Pada kelompok kontrol positif dan negatif dapat diamati detak jantungnya dari jam ke-48 hingga jam ke-96 sebesar 100%. Akan tetapi, pada kelompok kontrol positif embrio mengalami abnormalitas berupa edema perikardium.

Dari tabel 4.4 pada kelompok pemaparan ekstrak etanol daun pegagan konsentrasi 31,25 ppm dan 62,5 ppm yang terlihat adanya detak jantung hingga 96 jam pemaparan sebesar 100%. Pada konsentrasi 125 ppm detak jantung embrio

yang terlihat pada jam ke-48 pengamatan sebesar 42 %, sedangkan pada jam ke-72 pengamatan embrio sudah mengalami kematian. Pada konsentrasi 250 dan 500 ppm tidak ada satupun embrio yang terlihat adanya detak jantung dari awal pengamatan 48 jam hingga 96 jam karena embrio telah mengalami kematian. Hal tersebut dikarenakan ekstrak etanol daun pegagan dapat memengaruhi detak jantung embrio ikan zebra.

Pada kelompok pemaparan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan semua embrio yang masih hidup dapat diamati detak jantungnya dari jam ke-48 hingga jam ke-96. Sedangkan pada konsentrasi 20 ppm tidak ada satupun embrio yang dapat diamati detak jantungnya karena embrio telah mengalami kematian dari awal pengamatan hingga jam ke-96. Dari hasil tersebut dapat diambil kesimpulan bahwa SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan tidak mempengaruhi detak jantung embrio ikan zebra.

Berdasarkan hasil analisis data deskriptif menggunakan *software* SPSS untuk perlakuan ekstrak keseluruhan konsentrasi pada jam ke-48 didapatkan hasil embrio yang terlihat adanya detak jantung minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100% dan rata-rata sebesar 48,4%, pada jam ke-72 embrio yang terlihat adanya detak jantung minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100%, dan rata-rata sebesar 40%, dan pada jam ke-96 embrio yang terlihat adanya detak jantung minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100%, dan rata-rata sebesar 40%. Sedangkan pada kelompok perlakuan SNEDDS keseluruhan konsentrasi pada jam ke-48 didapatkan hasil embrio yang terlihat adanya detak jantung minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100%, dan rata-rata sebesar 80%, pada jam ke-72 embrio yang terlihat adanya detak jantung minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100% dan rata-rata sebesar 80%, dan pada jam ke-96 embrio yang terlihat adanya detak jantung minimal sebesar 0%, maksimal sebesar 100% dan rata-rata sebesar 80% (Lampiran 8).

Selain empat parameter diatas, dilakukan juga perhitungan persentase embrio yang mengalami abnormalitas berdasarkan data hasil dari empat parameter yang digunakan. Perhitungan persentase abnormalitas dilakukan setelah 96 jam pemaparan pada setiap kelompok perlakuan.



**Tabel 4. 5** Persentase Embrio yang Mengalami Abnormalitas Setelah Dilakukan Pemaparan Ekstrak Etanol Daun Pegagan dan SNEDDS Ekstrak Etanol Daun Pegagan Setelah 96 Jam Pemaparan

<b>Kelompok Ekstrak</b>	<b>% abnormalitas 96 jam setelah pemaparan</b>	<b>Kelompok SNEDDS</b>	<b>% abnormalitas 96 jam setelah pemaparan</b>
<b>500 ppm</b>	0	<b>20 ppm</b>	0
<b>250 ppm</b>	0	<b>10 ppm</b>	34
<b>125 ppm</b>	0	<b>5 ppm</b>	0
<b>62,5 ppm</b>	0	<b>2,5 ppm</b>	0
<b>31,25 ppm</b>	33	<b>1,25 ppm</b>	0
<b>Kontrol (+)</b>	100	<b>Kontrol (+)</b>	100
<b>Kontrol (-)</b>	0	<b>Kontrol (-)</b>	0
<b>Kontrol Pelarut</b>	0	<b>Kontrol Pelarut</b>	0

Abnormalitas pada embrio ikan zebra terjadi karena senyawa uji yang dipaparkan bersifat toksik sehingga embrio tidak mampu berkembang dengan sempurna. Diantara abnormalitas yang terjadi yaitu edema perikardium, edema kantung kuning telur, pertumbuhan somit tidak lurus, perlambatan pelepasan *tail-bud* dari *yolk* dan kelainan pada ekor. Pada kontrol positif (3,4-dichloroaniline) persentase embrio yang mengalami abnormalitas sebesar 100% yang ditandai dengan terjadinya edema perikardium, perlambatan pelepasan *tail-bud* dari *yolk* dan pembentukan somit yang tidak lurus. Abnormalitas dapat terjadi karena sifat kontrol positif (3,4-dichloroaniline) yang toksik sehingga dapat menghambat pertumbuhan embrio ikan zebra.

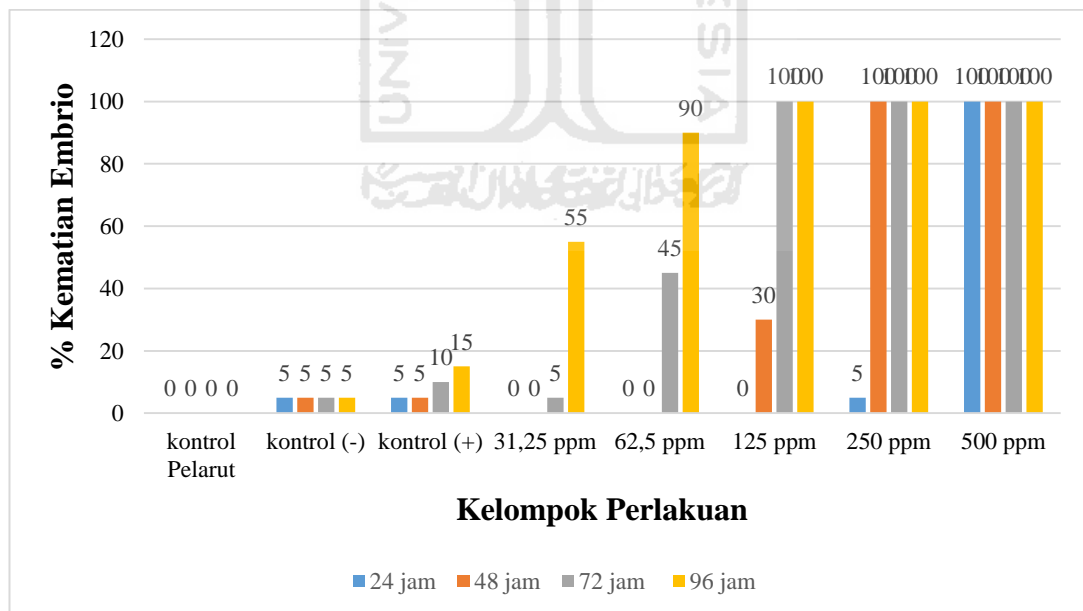
Berdasarkan data tabel 4.5 pada kelompok pemaparan ekstrak etanol daun pegagan konsentrasi terendah yaitu 31,25 ppm terjadi abnormalitas pada embrio ikan zebra sebesar 33%. Pada kelompok pemaparan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan konsentrasi 10 ppm terjadi abnormalitas sebesar 34% yang ditandai dengan terjadinya edema perikardium, pertumbuhan somit yang tidak lurus dan terjadi abnormalitas pada ekor.



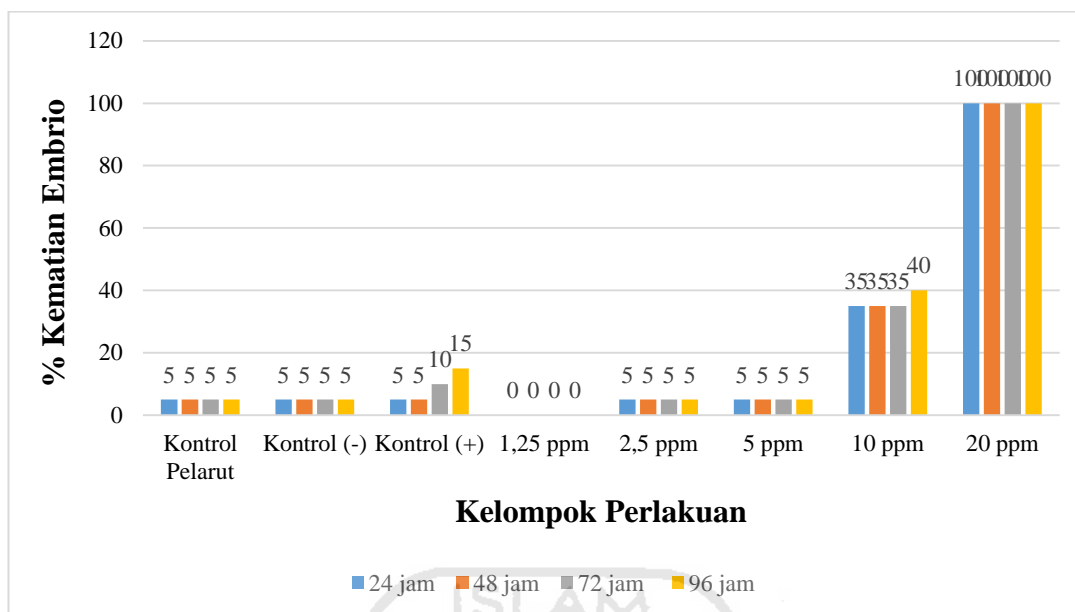
**Gambar 4.3** (A) Contoh perkembangan embrio normal selama 96 jam pemaparan; (B) Contoh embrio abnormal dengan edema kantung kuning telur, edema perikardium, dan somit yang tidak lurus selama 96 jam pemaparan; (C) Abnormalitas ekor.

Sumber : (Cavalcante *et al.*, 2017; Tsani, 2019)

Data yang telah dipaparkan diatas kemudian dilakukan perhitungan persentase kematian embrio ikan zebra. Kematian pada embrio ikan zebra dikarenakan ketoksikan pada senyawa uji yang dipaparkan. Kematian dapat dilihat dari banyaknya embrio yang mengalami koagulasi dan juga embrio yang tidak terlihat detak jantungnya hingga akhir dilakukan pengamatan selama 96 jam. Berikut grafik persentase embrio ikan zebra yang mengalami kematian setelah dilakukan pemaparan senyawa uji yang diamati setiap 24 jam hingga 96 jam :



**Gambar 4.4** Grafik Persentase Kematian Embrio Ikan Zebra Pada Kelompok Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Pegagan Konsentrasi 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm dan 31,25 ppm serta Kontrol Positif, Kontrol Negatif dan Kontrol Pelarut Dengan Lama Waktu Pemaparan 96 Jam



**Gambar 4.5** Grafik Persentase Kematian Embrio Ikan Zebra Pada Kelompok Perlakuan SNEDDS Ekstrak Etanol Daun Pegagan Konsentrasi 20 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2,5 ppm dan 1,25 ppm serta Kontrol Positif, Kontrol Negatif dan Kontrol Pelarut Dengan Lama Waktu Pemaparan 96 Jam

Dari gambar grafik diatas, Pada kelompok kontrol positif embrio mengalami kematian sebesar 15% hingga akhir pemaparan 96 jam dan kelompok kontrol negatif mengalami kematian sebesar 5% hingga akhir pemaparan 96 jam. Pada kelompok pemaparan ekstrak etanol daun pegagan konsentrasi 31,25 ppm terjadi kematian sebesar 55% hingga akhir pemaparan 96 jam. Pada konsentrasi 62,5 ppm terjadi kematian sebesar 90% hingga akhir pemaparan 96 jam. Pada konsentrasi 500 ppm, 250 ppm dan 125 ppm terjadi kematian sebesar 100% pada akhir pemaparan 96 jam. Pada kelompok pemaparan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan konsentrasi 1,25 ppm embrio ikan zebra tidak mengalami kematian hingga akhir pemaparan 96 jam. Pada konsentrasi 2,5 dan 5 ppm terjadi kematian sebesar 5% hingga akhir pemaparan 96 jam. Pada konsentrasi 10 ppm terjadi kematian sebesar 40% hingga akhir pemaparan 96 jam. Pada konsentrasi tertinggi 20 ppm terjadi kematian sebesar 100% dari awal pengamatan jam ke-24 hingga akhir pemaparan 96 jam. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi senyawa uji yang dipaparkan akan semakin tinggi jumlah kematian embrio ikan zebra.

Dari data persentase kematian yang didapatkan kemudian dilakukan perhitungan nilai  $LC_{50}$  ekstrak etanol daun pegagan dan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan dengan menggunakan analisis probit. Nilai  $LC_{50}$  merupakan nilai konsentrasi dari suatu senyawa uji yang menyebabkan 50% kematian hewan uji yang digunakan. Uji nilai  $LC_{50}$  dilakukan untuk mengetahui level konsentrasi senyawa uji pada embrio ikan zebra. Analisis nilai  $LC_{50}$  dilakukan menggunakan aplikasi *Microsoft Office Excel*.

**Tabel 4. 6** Nilai Probit Ekstrak Etanol Daun Pegagan dari Nilai Persentase Kematian Embrio Ikan Zebra

Konsentrasi (ppm)	Log 10 Konsentrasi	% Kematian	Probit
31,25	1,49485002	55	5,13
62,5	1,79588001	90	6,28
125	2,09691001	100	7,37
250	2,397940008	100	7,37
500	2,698970004	100	7,37

Keterangan :  $LC_{50}$  Ekstrak = 14,9933 ppm

**Tabel 4. 7** Nilai Probit SNEDDS Ekstrak Etanol Daun Pegagan dari Nilai Persentase Kematian Embrio Ikan Zebra

Konsentrasi (ppm)	Log 10 (Konsentrasi)	% Kematian	Probit
1,25	0,096910013	0	0
2,5	0,397940008	5	3,36
5	0,698970004	5	3,36
10	1	40	4,75
20	1,301029995	100	7,37

Keterangan :  $LC_{50}$  SNEDDS = 8,4878 ppm

Nilai  $LC_{50}$  yang diperoleh dari ekstrak etanol daun pegagan sebesar 14,9933 ppm. Semakin toksik senyawa uji maka semakin kecil konsentrasi yang dapat mematikan subjek uji. Tingkat toksisitas suatu ekstrak yang diukur dengan  $LC_{50}$

jika nilainya  $\leq 30$  ppm dikatakan sangat toksik, 31 ppm – 100 ppm dikatakan toksik, dan  $LC_{50} \geq 1000$  ppm dikatakan tidak toksik (Manullang *et al.*, 2013). Dari hasil  $LC_{50}$  yang didapatkan sebesar 14,9933 ppm yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun pegagan bersifat sangat toksik pada embrio ikan zebra. Penelitian sebelumnya nilai  $LC_{50}$  yang didapatkan pada ekstrak daun pegagan yang diuji pada denyut jantung embrio ikan zebra sebesar 621 ppm termasuk toksisitas ringan (Kowan *et al.*, 2015). Pada penelitian lainnya nilai  $LC_{50}$  yang diperoleh pada ekstrak daun pegagan sebesar 612 ppm pada larva udang (Sulaksono dan Syamsudin, 2012). Metode ekstraksi dan pelarut yang digunakan sangat berpengaruh pada nilai  $LC_{50}$  yang didapatkan karena perbedaan kandungan senyawa yang ditarik oleh pelarut.

Nilai  $LC_{50}$  yang diperoleh dari SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan sebesar 8,4878 ppm. Penelitian sebelumnya menunjukkan hasil bahwa SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan memiliki nilai  $LC_{50}$  sebesar 40,74 ppm yang diuji pada embrio ikan zebra (Tsani, 2019). Perbedaan hasil dari kematian embrio ikan zebra kemungkinan disebabkan karena penurunan stabilitas sediaan sehingga menjadi lebih toksik. Penurunan stabilitas dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti suhu penyimpanan dan radiasi cahaya. Faktor formulasi juga mempengaruhi stabilitas seperti ukuran partikel, pH, dan sifat pelarut (Pratiwi *et al.*, 2018). Faktor lain yang menyebabkan perbedaan nilai  $LC_{50}$  karena pada penelitian sebelumnya belum dilakukan standarisasi media embrio yang sesuai dengan OECD 236. Standarisasi belum dilakukan karena perlu penyesuaian air dan kandungan nutrisi untuk media agar embrio dapat hidup dengan sempurna atau tidak terjadi kematian. Semakin toksik suatu senyawa uji maka semakin kecil konsentrasi yang dapat mematikan subjek uji.

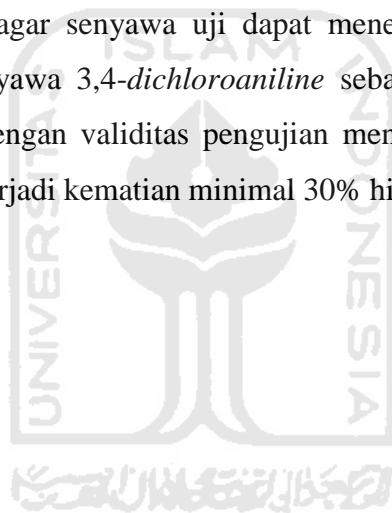
#### **4.7 Perbandingan Hasil Pengujian SNEDDS Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella Asiatica* L.) Dengan Ekstrak Etanol Daun Pegagan Pada Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*)**

Dari hasil pengamatan yang telah dilakukan, beberapa parameter yang digunakan pada uji toksisitas embrio ikan zebra yaitu koagulasi embrio, pembentukan somit, lepasnya *tail-bud* dari *yolk*, dan adanya detak jantung pada embrio ikan zebra. Selain keempat parameter tersebut, dilakukan juga pengamatan abnormalitas yang terlihat pada ekstrak etanol daun pegagan pada konsentrasi 31,25 ppm sebesar 33% yang ditandai dengan edema pada kantung kuning telur, edema perikardium, kelainan bentuk somit dan kelainan pada ekor. Sedangkan abnormalitas yang terjadi pada senyawa uji SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan terjadi pada konsentrasi 10 ppm sebesar 34% yang ditandai dengan adanya edema perikardium, pertumbuhan somit yang tidak lurus dan terjadi abnormalitas pada ekor. Dari parameter-parameter yang digunakan didapatkan hasil persentase kematian embrio ikan zebra tertinggi pada ekstrak etanol daun pegagan pada konsentrasi 500 ppm, 250 ppm, dan 125 ppm sebesar 100% hingga akhir pemaparan 96 jam. Sedangkan pada senyawa uji SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan kematian embrio tertinggi pada konsentrasi 20 ppm sebesar 100%. Setelah didapatkan data persentase kematian embrio ikan zebra, kemudian diperoleh data  $LC_{50}$  pada ekstrak etanol daun pegagan sebesar 14,9933 ppm, sedangkan pada SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan diperoleh nilai  $LC_{50}$  sebesar 8,4878 ppm. Klasifikasi toksisitas berdasarkan nilai  $LC_{50}$  dikatakan tidak toksik jika berada dalam rentang 100-1000 ppm untuk pengamatan selama 96 jam (Waynon and Finley, 1980). Nilai  $LC_{50}$  yang didapatkan pada kelompok pemaparan ekstrak dan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan  $\leq 100$  ppm yang menunjukkan bahwa kedua senyawa uji bersifat toksik pada embrio ikan zebra. Semakin rendah nilai  $LC_{50}$  yang didapatkan, maka senyawa uji akan semakin bersifat toksik karena konsentrasi untuk mematikan 50% hewan uji akan semakin kecil (Nugroho *et al.*, 2018).

Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan, hasil dari nilai  $LC_{50}$  yang didapatkan pada sediaan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak etanol daun pegagan. Hasil tersebut menunjukkan

bahwa SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan lebih toksik pada embrio ikan zebra dibandingkan dengan ekstrak etanol daun pegagan. Hal ini disebabkan karena nanopartikel dapat masuk ke sel dengan mekanisme endositosis. Nanopartikel diproses melalui interaksi spesifik antara permukaan nanopartikel dan reseptor permukaan sel yang akan mengaktifkan beberapa jalur persinyalan. Selain mekanisme endositosis, nanopartikel juga dapat masuk ke dalam sel melalui penetrasi bilayer pasif (Tsuda *and* Gehr, 2015).

Keterbatasan dari penelitian ini yaitu harus menggunakan ikan zebra yang mampu bertelur memiliki kualitas embrio yang baik dengan tingkat fertilisasi minimal  $\geq 70\%$  dari jumlah keseluruhan embrio yang dihasilkan, juga waktu pemaparan harus sesuai agar senyawa uji dapat menembus membran embrio. Keterbatasan lainnya senyawa 3,4-*dichloroaniline* sebagai kontrol positif yang digunakan tidak sesuai dengan validitas pengujian menurut OECD 236 dimana embrio ikan zebra harus terjadi kematian minimal 30% hingga akhir pemaparan 96 jam.



## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Pemaparan ekstrak etanol daun pegagan maupun sediaan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan menyebabkan abnormalitas pada embrio ikan zebra yang ditandai dengan adanya edema perikardium, edema pada kantung kuning telur, pertumbuhan somit yang tidak lurus dan abnormalitas ekor. Nilai  $LC_{50}$  yang diperoleh dari ekstrak etanol daun pegagan sebesar 8,4878 ppm, sedangkan nilai  $LC_{50}$  yang diperoleh dari sediaan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan sebesar 14,9933 ppm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kedua senyawa uji tersebut bersifat toksik pada embrio ikan zebra. Akan tetapi, sediaan SNEDDS ekstrak etanol daun pegagan lebih toksik dibandingkan dengan ekstrak etanol daun pegagan.

#### **5.2 Saran**

Penelitian lebih lanjut diharapkan dapat melakukan identifikasi senyawa aktif daun pegagan yang bersifat toksik pada perkembangan embrio ikan zebra serta dapat melakukan pengamatan abnormalitas perkembangan embrio yang lain.



## DAFTAR PUSTAKA

- Amaliya, S., Soemantri, B., Utami, Y.W., 2013. Efek Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) Dalam Mempercepat Penyembuhan Luka Terkontaminasi Pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Galur Wistar. *J. Ilmu Keperawatan* 1(1): 19-25.
- Anindhita, M.A., Oktaviani, N., 2016. Formulasi Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) dengan Virgin Coconut Oil (VCO) sebagai Minyak Pembawa, 9.
- Azzahra, F., Hayati, M., 2019. Uji Aktivitas Ekstrak Daun Pegagan (*Centella Asiatica* (L). Urb) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus Mutans*. *B-Dent J. Kedokt. Gigi Univ. Baiturrahmah* 5(1): 9–19. <https://doi.org/10.33854/jbd.v5i1.133>
- Besung, I.N.K., 2011. Pengaruh Ekstrak Pegagan (*Centella Asiatica*) Dalam Meningkatkan Kapasitas Fagosit Makrofag Peritoneum Mencit Terhadap *Salmonella Typhi*. *Bul. Vet. Udayana* 3(2): 71–78.
- Besu, S., Sachidanandan, C., 2013. Zebrafish : A Multifaceted Tool for Chemical Biologists. *Chemical Review*, A-AC : 1-29.
- Bhatia, A., Shard, P., Chopra, D., Mishra, T., 2011. Chitosan Nanoparticles As Carrier of Immunorestoratory Plant Extract: Synthesis, Characterization and Immunorestoratory Efficacy. *International Journal of Drug Delivery* 3 : pp.381-385.
- Birke, A., Scholz, S., 2018. Zebrafish Embryo and Acute Fish Toxicity Test Show Similar Sensitivity For Narcotic Compounds. *Altex*, 36(1) : 131-135.
- BPOM, 2014. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2014. *Tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik Secara In Vivo*. Jakarta: Badan Pengawasan Obat dan Makanan RI. Hal. 3, 4, 11, 15, 28, 30, 32.
- Cavalcante, A.K., Lopes-Ferreira, M., Rogero, S.O., Rogero, J.R., 2017. Evaluation of resveratrol toxicity in the embryolarval stage of *Danio rerio* fish. *Ecotoxicol. Environ. Contam.*, 12(1): 133-139.
- Chauhan, P.K., Singh, V., 2012. Acute and Subacute Toxicity study of the Acetone Leaf extract of *Centella asiatica* in Experimental Animal Models. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, S511–S513. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60263-9](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60263-9)
- Chavda, H., Patel, J., Chavda, G., Dave, S., Patel, A., Patel, C., 2013. Self-Nanoemulsifying powder of isotretinoin: preparation and characterization. *J. Powder. Tech*, 1-3.

- Christiansen, M.L., Holm, R., Kristensen, J., Kreilgaard, M., Jacobsen, J., Abrahamsson, B., Müllertz, A., 2014. Cinnarizine food-effects in beagle dogs can be avoided by administration in a Self Nano Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 57, 164–172.
- Date, A.A., Desai, N., Dixit, R., Nagarsenker, M., 2010. Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications, and advances. *Nanomed*, 5: 1595-1616.
- Denvir, M.A., Tucker, C.S., Mullias, J.J., 2008. Systolic and diastolic ventricular function in zebrafish embryos: influence of norepineprine, MS-22, and temperature. *Biomed Central*, 21: 1-8.
- Dewanti, R.T.A., Andriana, D., Yahya, A., 2015. Nilai LC50 Dekokta Kumis Kucing (*Orthosiphon stamineus*, Benth) pada Embrio dan Ikan Zebra Dewasa. *J. Kedokt. Komunitas* 3(1): 22-26.
- Elya, B., Amin, J.E., 2011. Toksisitas Akut Daun *Justicia Gendarussa* Burm. *Makara Sci. Ser.* 14(2) : 129–134. <https://doi.org/10.7454/mss.v14i2.740>
- Garg, V., Kaur, P., Singh, S.K., Kumar, B., Bawa, P., Gulati, M., Yadav, A.K., 2017. Solid self-nanoemulsifying drug delivery systems for oral delivery of polypeptide-k: Formulation, optimization, in-vitro and in-vivo antidiabetic evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 109, 297–315.
- Gerhart, A.K., Janz, D.M., 2019. Toxicity of Aqueous L-Selenomethionine and Tert-Butyl Hydroperoxide Exposure to Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos Following Tert-Butyl Hydroquinone Treatment. *Toxics* 7(44): 1-17. <https://doi.org/10.3390/toxics7030044>
- Glaberman, S., Padilla, S., Barron, M.G., 2017. Evaluating the zebrafish embryo toxicity test for pesticide hazard screening: Evaluating zebrafish embryo toxicity testing for pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 36(5), pp.1221–1226. <https://doi.org/10.1002/etc.3641>
- Gupta, P.K., Pandit, J.K., Kumar, A., Swaroop, P., Gupta, S., 2010. Pharmaceutical Nanotechnology Novel Nanoemulsion-High Energy Nanoemulsifying Preparation, Evaluation, and Application the Pharmacy Research.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, RE., 2005. Zebrafish as a model vertebrata for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.* 86(1): 6-19.
- Hu, X., Lin, C., Chen, D., Zhang, J., Liu, Z., Wu, W., Song, H., 2012. Sirolimus Solid Self-Microemulsifying Pellets: Formulation Development, Characterization and Bioavailability Evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 438, pp.123-133.
- Ihwan, Asabri, M., Khumaidi, A., 2018. Uji Toksisitas Akut Dan Letal Dose (LD50) Ekstrak Etanol Daun Pepolo (*Bischofia javanica* Blume) Pada Mencit Putih (*Mus musculus*). *Nat. Sci. J. Sci. Technol.* 7(1) pp.110–116.

- Kari, G., Rodeck, U., Dicker, A.P., 2007. Zebrafish: An Emerging Model System for Human Disease and Drug Discovery. *Clin. Pharmacol. Ther.* 82(1), pp.70–80. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100223>
- Kowan, K.A., Airlangga, H., Aini, N., 2015. Uji Nilai Lc50 ekstrak Centella Asiatica Terhadap Frekuensi Denyut Antung Embrio Ikan Zebra (Danio Rerio). *J. Kedokt. Komunitas* 3(1), pp.148–155.
- Martien, R., Adhyatmika, Krianto, I.D.K., Farida, V., Sari, D.P., 2012. Perkembangan Teknologi Nanopartikel Sebagai Sistem Penghantaran Obat. *Majalah Farmaseutik* 8(1) pp.133-144.
- Manullang, L., Daniel, Enos, T.A., 2013. Uji Toksisitas dan Antioksidan Ekstrak Buah Kelepesoh (*Baccaurea Lanceolata* (Miq.) Mull. Arg). *Journal Science East Borneo*, 1(1) 75-81.
- Muchtaromah, B., Umami, L.R., 2016. Efek Farmakologi Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) Sebagai Suplemen Pemacu daya Ingot. *Jurnal*. pp. 262-266.
- Nugroho, H., Pasaribu, M., Ismail, S., 2018. Toksisitas Akut Ekstrak *Alburtisia papuana* Becc. pada *Daphnia magna* dan *Danio rerio*. *Biota*, 3(3): 96-103.
- Obitte, N.C., Ofokansi, K.C., Nzekwe, I.T., Esimone, C.O., Okoye, I.E., 2011. Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems Based on Melon Oil and its Admixture with a Homolipid from *Bos indicus* for the Delivery of Indomethacin. *Trop. J. Pharm. Res.* 10(3) : 299-307.
- OECD, 2013. Fish Embryo Acute Toxicity (FET), Test Guideline No. 236, Guidelines on The Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing. *Canadian Council on Animal Care*, Ottawa.
- Pol, A.S., Patel, P.A., Hegde, D., 2013. Peppermint oil based drug delivery system of aceclofenac with improved anti-inflammatory activity and reduced ulcerogenicity. *Int. J. Pharm. Biosci. Technol.* 1, 89–101.
- Pratiwi, Wulansari, D., Chairul, 2010. Efek Toksisitas Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban) pada Organ dan Jaringan Mencit (*Mus musculus*). *Maj. Farm. Indones*, 21(1) pp. 40–47.
- Pratiwi, L., Fudholi, A., Martien, R., Pramono, S., 2018. Uji Stabilitas Fisik dan Kimia Sediaan SNEDDS (Self-nanoemulsifying Drug Delivery System) dan Nanoemulsi Fraksi Etil Asetat Kulit Manggis. *Trad. Med. J.*, 23(2), p.84-90
- Ramadhan, N.S., Rasyid, R., Elmatris., 2015. Daya Hambat Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) yang Diambil di Batusangkar Terhadap Pertumbuhan Kuman *Vibrio Cholerae* Secara *Invitro*. *J. Kes. Andalas.*, 4(1).

- Riki, Kurniatin, P.A., Ambarsari, L., Nurcholis, W., Darusman, L.K., 2016. Karakteristik dan Toksisitas Nanopartikel Kurkuminoid Temulawak. *Curr. Biochem.*, 3(1): 43-53.
- Sekarraras, F.D., 2019. Uji Aktivitas Antihiperglikemia SNEDDS Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb.) Pada Ikan Zebra (*Danio rerio*). Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Salim, Z., Munadi, E., 2017. *Info Komoditi Tanaman Obat*. Badan Pengkajian dan Pengembangan Perdagangan Kementerian Perdagangan Republik Indonesia, p. 106.
- Singh, B., Singh, R., Bandyopadhyay, S., Kapil, R., Garg, B., 2013. Optimized Nanoemulsifying Systems with Enhanced Bioavailability of Carvedilol. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 101: 465-474. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.017>
- Singh, S., Gautam, A., Sharma, A., Batra, A., 2010. *Centella asiatica* (L.) : a plant with immense Medicinal Potential but Threatened 4, 9.
- Sjabana, D., 2006. *Uji Toksisitas Akut*, Universitas Airlangga, Fakultas Farmasi, Surabaya.
- Sulaksono, F.D., Syamsudin, A.B., 2012. Koreksi Kadar Flavonoid dan Toksisitas Dalam Ekstrak Tempuyung (*Sonchus Arvensis*) dan Pegagan (*Centella Asiatica*). *Konversi*, 1(2) : 33-42.
- Sutardi, S., 2016. Kandungan Bahan Aktif Tanaman Pegagan dan Khasiatnya untuk Meningkatkan Sistem Imun Tubuh. *J. Penelit. Dan Pengemb. Pertan.* 35(3), pp.121-130. <https://doi.org/10.21082/jp3.v35n3.2016.p121-130>
- Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Xie, M., Gao, C., Ye, Y., Duan, M., Zhou, Z., 2019. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Anim. Front.* 9(3), pp.68-77. <https://doi.org/10.1093/af/vfz020>
- Tsani, S.F.I., 2019. Uji Toksisitas Akut Sediaan Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb.) Terhadap Perkembangan Embrio Ikan Zebra. Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Tsuda, A., Gehr, P., 2015. *Nanoparticles in the Lung : Environmental Exposure and Drug Delivery*. CRC press. Taylor and Francis group.
- Utami, N., 2018. Zebrafish (*Danio Rerio*) Sebagai Hewan Model Diabetes Mellitus. *Bio Trends* 9(1), pp.15-19.
- Waynon, W.J., Finley, M.F., 1980. *Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates*. United States Department of the Interior Fish and Wildlife Service, Resources Publication, p. 137.

- Widiastuti, R., Nurhaeni, F., Marfuah, L.D., Wibowo, S.G., 2016. Potensi Antibakteri dan Anticandida Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb.). *Jurnal. Farmasi Poltekkes Bhakti Setya Indonesia*, Yogyakarta.
- Winarto, w, Surbakti, M., 2003. *Khasiat dan Manfaat Pegagan : Tanaman Penambah Daya Ingat*. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Yuniarto, A., Sukandar, E.Y., Fidrianny, I., Adnyana, I.K., 2017. Aplikasi Zebrafish (*Danio rerio*) pada Beberapa Model Penyakit Eksperimental. *Media Pharm. Indones.* 1(3), p.116. <https://doi.org/10.24123/mpi.v1i3.215>



# LAMPIRAN



## Lampiran 1 Hasil Identifikasi Tanaman Pegagan



UNIVERSITAS GADJAH MADA  
 FAKULTAS BIOLOGI  
 LABORATORIUM SISTEMATIKA TUMBUHAN  
Jalan Teknika Selatan Sekip Utara Yogyakarta 55281 Telpom (0274) 6492262/6492272, Fax: (0274) 580839

### SURAT KETERANGAN

Nomor : 014519/ S.Tb. /II/ 2019

Yang bertanda tangan dibawah ini, Kepala Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi UGM, menerangkan dengan sesungguhnya bahwa,

Nama : Silmi Fauzi Izza Tsani  
 NIM : 15613006  
 Asal instansi : Fakultas MIPA - UII Yogyakarta

telah melakukan identifikasi tumbuhan dengan hasil sebagai berikut,

Kingdom : Plantae  
 Divisi : Tracheophyta  
 Kelas : Magnoliopsida  
 Ordo : Apiales  
 Familia : Apiaceae  
 Genus : Centella  
 Spesies : *Centella asiatica* (L.) Urb.  
 Sinonim : *Centella erecta* (L. f.) Fernald.  
*Hydrocotyle asiatica* L.  
*Hydrocotyle erecta* L. f.  
*Centella repanda* (Pers.) Small

Nama lokal : Kaki kuda, pegagan, antanan, papagan

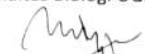
identifikasi tersebut dibantu oleh Abdul Razaq Chasani, S.Si., M.Si.

Demikian surat keterangan ini diberikan untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Mengetahui,  
 Dekan Fakultas Biologi  
 Universitas Gadjah Mada

  
 Dr. Budi Setiadi Daryono, M.Agr.Sc.  
 NIP. 197003261995121001

Yogyakarta, 19 Februari 2019  
 Kepala Laboratorium  
 Sistematika Tumbuhan  
 Fakultas Biologi UGM

  
 Prof. Dr. Purnomo, M.S.  
 NIP. 195504211982031005

## Lampiran 2 Ethical Clearance



UNIVERSITAS  
ISLAM  
INDONESIA

**FAKULTAS  
KEDOKTERAN**  
Gedung Dr. Soekiman Wirjosandjojo  
Kampus Terpadu Universitas Islam Indonesia  
Jl. Kalurang km. 14,5 Yogyakarta 55584  
T. (0274) 898444 ext. 2096, 2097  
F. (0274) 898459 ext. 2007  
E. [fk@uii.ac.id](mailto:fk@uii.ac.id)  
W. [fk.uui.ac.id](http://fk.uui.ac.id)

Nomor : 10/ Ka.Kom .Et/70/KE/VII/2020

**KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK  
ETHICAL APPROVAL**

Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran dan kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

*The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Islamic University of Indonesia, with regards of the protection of human rights and welfare in medical and health research, has carefully reviewed the research protocol entitled :*

**"Uji Toksisitas Fraksi Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica L.*) pada Embrio Ikan Zebra (*Danio rerio*)"**

Peneliti Utama : M. Radinal Ansori  
*Principal Investigator*

Nama Institusi : Program Studi Farmasi FMIPA UII  
*Name of the Institution*

dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.  
*and approved the above-mentioned protocol.*

Yogyakarta, 22 Juli 2020

Ketua  
*Chairman*  
Dr. Rahma Yuantari, M.Sc, Sp.PK



**\*Ethical Approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan  
\*\*Peneliti berkewajiban**

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila :
  - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical clearance* harus diperpanjang
  - b. Penelitian berhenti di tangan jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*



### Lampiran 3 Hasil Identifikasi Ikan Zebra



**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA**  
**(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)**  
**PUSAT PENELITIAN BIOLOGI**  
**(RESEARCH CENTER FOR BIOLOGY)**  
 Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta - Bogor KM. 46 Cibinong 16911  
 Telp. (+62 21) 87907636 - 87907604, Fax. 87907612  
 Website : www.biologi.lipi.go.id



Cibinong, 09 November 2017

Nomor : B-3853/IPH.1./KS.02.03/XI/2017  
 Lamp. :  
 Hal : Hasil identifikasi fauna

Kepada Yth.  
 Dr. Farida Hayati, M.Si, Apt  
 Universitas Islam Indonesia  
 Fakultas MIPA  
 Kampus UII Terpadu Jl. Kaliurangn  
 Yogyakarta 55584 Kotak Pos 75

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil verifikasi fauna yang telah dilaksanakan oleh Sdr. Gema Wahyu Dewantoro, M.Si. staf peneliti Laboratorium Ichtiologi Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, dengan hasil terlampir.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

An. Kepala Pusat Penelitian Biologi - LIPI  
 Kepala Bidang Zoologi,

Dr. Hari Sutrisno  
 NIP. 196606051994031009

### HASIL IDENTIFIKASI IKAN

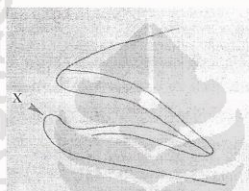
Nama ilmiah : *Danio rerio* (Hamilton, 1822)  
 Lokasi : -  
 Jumlah : 5 ekor

Klasifikasi berdasar Nelson (2006):

Ordo : Cypriniformes  
 Familia : Cyprinidae  
 Genus : *Danio*  
 Species : *Danio rerio*  
 Distribusi : Pakistan, India, Bangladesh, Nepal, Myanmar, Bhutan

Deskripsi:

- Tubuh ikan relatif ramping memanjang dengan panjang standar 23,5 – 25,7 mm.
- Mata besar, mulut menghadap ke atas dan terdapat tonjolan kecil di ujung rahang bawah (Gambar 1).



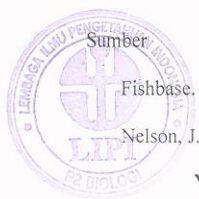
(Gambar 1. X menunjukkan tonjolan kecil)

- Mempunyai 2 pasang sungut, dimana sungut rahang atas mencapai operkulum (tutup insang).
- Pada sisi tubuhnya terdapat 5 buah garis horisontal yang mengarah ke sirip ekor.
- Sirip analnya bercorak garis-garis.
- Jumlah jari-jari sirip punggung 8 buah jari-jari.
- Jumlah jari-jari sirip anal yaitu 13-14 buah jari-jari lemah bercabang.
- Sisik sebelum sirip punggung 13-14 buah sisik.
- Sisik pada linea lateralis 32-34 buah sisik.

Sumber :

Fishbase. 2017. *Danio rerio*. <http://fishbase.org>. Diakses tanggal 1 November 2017.

Nelson, J.S. 2006. *Fishes of The World*. John Wiley and Sons, Inc. 601p.



#### Lampiran 4 Proses Pembuatan Ekstrak Daun Pegagan



(a)



(b)



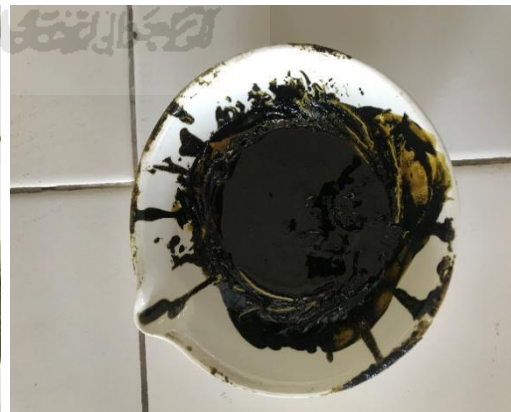
(c)



(d)



(e)



(f)

**Keterangan :** (a) Lokasi Pengambilan Daun Pegagan (Kalibawang, Kulonprogo),  
 (b) Sortasi Kering (c) Setelah Sortasi Basah Dikering Anginkan  
 (d) Pengeringan dalam *Cabinet Dryer* (e) Serbuk Daun Pegagan  
 (f) Ekstrak Kental Daun Pegagan

**Lampiran 5** Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica L.*)

- Dibuat larutan stok 1000 ppm :

$$\begin{aligned} 1000 \text{ ppm} &= 1000 \text{ mg/L} \\ &= 1000 \text{ mg}/1000 \text{ ml} \\ &= 100 \text{ mg}/100 \text{ ml} \end{aligned}$$

Ditimbang 10 mg ekstrak etanol daun pegagan, kemudian dilarutkan dengan pelarut *Dimethyl sulfoxide* 1% v/v dalam labu ukur 100 ml.

- Volume yang dibutuhkan = volume *microwell-plate* x jumlah sumuran

$$\begin{aligned} &= 500 \mu\text{l} \times 20 \text{ sumuran} \\ &= 10.000 \mu\text{l} \end{aligned}$$

- Konsentrasi ekstrak etanol daun yang diencerkan dari stok 1000 ppm :

1. Konsentrasi 500 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 500 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{500 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}}{1000 \text{ ppm}} = 5 \text{ ml}$$

Diambil 5 ml dari larutan stok, kemudian dilarutkan dengan media embrio dalam labu ukur 10 ml

2. Konsentrasi 250 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 250 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{250 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}}{1000 \text{ ppm}} = 2,5 \text{ ml}$$

Diambil 2,5 ml dari larutan stok, kemudian dilarutkan dengan media embrio dalam labu ukur 10 ml

3. Konsentrasi 125 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 125 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{125 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}}{1000 \text{ ppm}} = 1,25 \text{ ml}$$

Diambil 1,25 ml dari larutan stok, kemudian dilarutkan dengan media embrio dalam labu ukur 10 ml

4. Konsentrasi 62,5 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 62,5 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{62,5 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}}{1000 \text{ ppm}} = 0,625 \text{ ml}$$

Diambil 0,625 ml dari larutan stok, kemudian dilarutkan dengan media embrio dalam labu ukur 10 ml

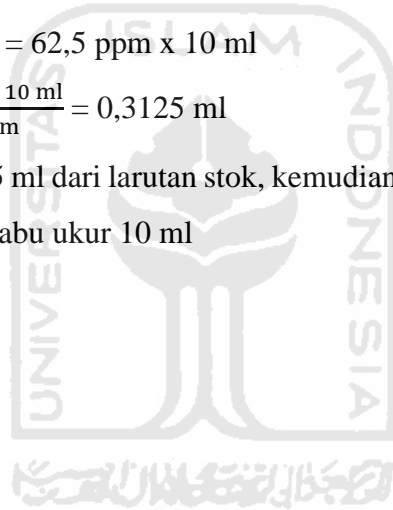
5. Konsentrasi 31,25 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 31,25 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{31,25 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}}{1000 \text{ ppm}} = 0,3125 \text{ ml}$$

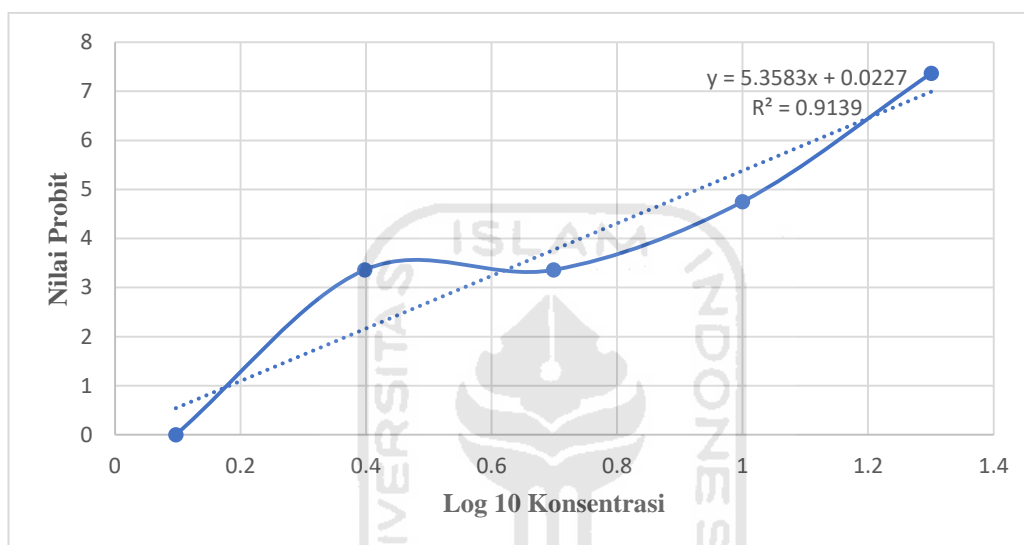
Diambil 0,3125 ml dari larutan stok, kemudian dilarutkan dengan media embrio dalam labu ukur 10 ml



### Lampiran 6 Perhitungan Nilai LC<sub>50</sub> SNEDDS dan Ekstrak

1. Perhitungan Nilai LC<sub>50</sub> SNEDDS Ekstrak Etanol Daun Pegagan Pada Embrio Ikan Zebra

Berikut Grafik Regresi Linier Log 10 Konsentrasi SNEDDS Ekstrak Etanol Daun Pegagan Vs Nilai Probit :



Berikut hasil perhitungan menggunakan *Microsoft Office Excel* :

$$Y = 5,3583x + 0,0227$$

$$5 = 5,3583x + 0,0227$$

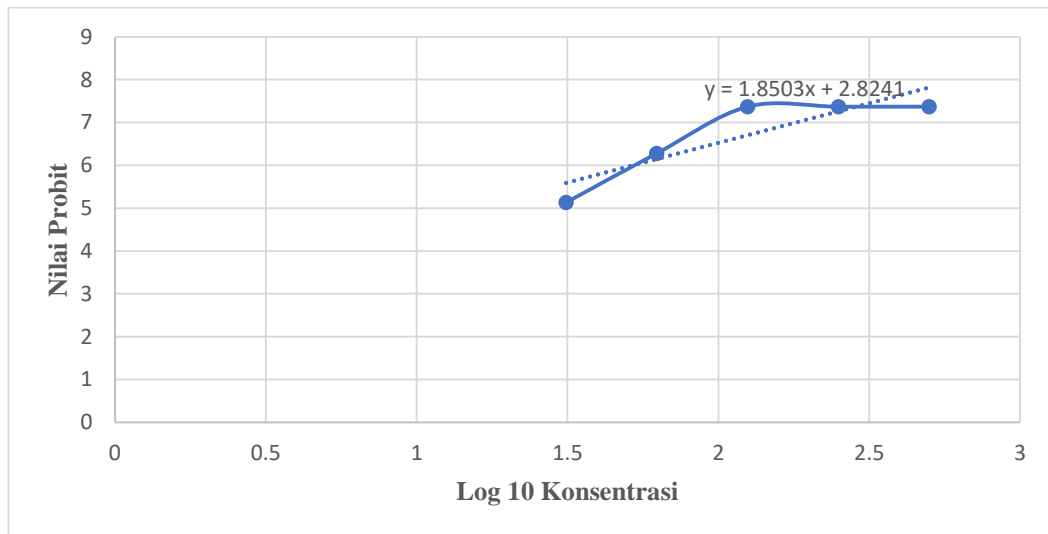
$$4,9773 = 5,3583x$$

$$X = 0,9288$$

$$LC_{50} = 10^X = 8,4878 \text{ ppm}$$

2. Perhitungan Nilai LC<sub>50</sub> Ekstrak Etanol Daun Pegagan Pada Embrio Ikan Zebra

Berikut Grafik Regresi Linier Log 10 Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Pegagan Vs Nilai Probit :



Berikut hasil perhitungan menggunakan *Microsoft Office Excel* :

$$Y = 1,8503x + 2,8241$$

$$5 = 1,8503x + 2,8241$$

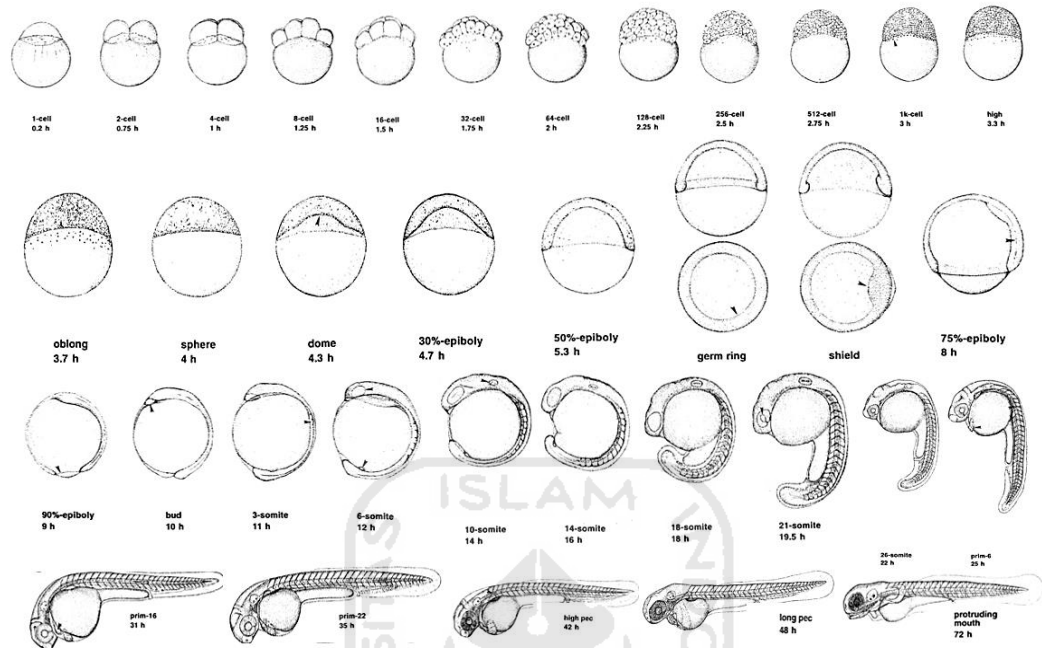
$$2,1759 = 1,8503x$$

$$X = 1,1759$$

$$LC_{50} = 10^x = 14,9933 \text{ ppm}$$



## Lampiran 7 Perkembangan Embrio Normal Selama 72 Jam





## Lampiran 8 Analisis data menggunakan *software* SPSS metode deskriptif

### 1. Koagulasi

#### Descriptives

[DataSet0]

##### Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ekstrakkoagu24	5	0	100	21.00	44.215
sneddskoagu24	5	0	100	21.00	44.215
Valid N (listwise)	5				

```
DESCRIPTIVES VARIABLES=ekstraskoagu48 sneddskoagu48
  /STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.
```

#### Descriptives

##### Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ekstraskoagu48	5	0	100	46.00	50.794
sneddskoagu48	5	0	100	29.00	42.042
Valid N (listwise)	5				

```
DESCRIPTIVES VARIABLES=ekstrakoagu72 ekstraksnedds72
  /STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.
```

#### Descriptives

##### Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ekstrakoagu72	5	5	100	70.00	43.445
ekstraksnedds72	5	0	100	29.00	42.042
Valid N (listwise)	5				

```
DESCRIPTIVES VARIABLES=ekstrakuagu96 ekstraksnedds96
  /STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.
```

#### → Descriptives

##### Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ekstrakuagu96	5	55	100	89.00	19.494
ekstraksnedds96	5	0	100	30.00	42.279
Valid N (listwise)	5				

## 2. Pembentukan Somit

### Descriptives

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ekstraksomit24	5	.00	100.00	80.0000	44.72136
sneddssomit24	5	.00	100.00	80.0000	44.72136
Valid N (listwise)	5				

DESCRIPTIVES VARIABLES=ekstraksomit48 sneddssomit48  
/STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.

### Descriptives

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ekstraksomit48	5	.00	100.00	60.0000	54.77226
sneddssomit48	5	.00	100.00	80.0000	44.72136
Valid N (listwise)	5				

DESCRIPTIVES VARIABLES=ektraksomit72 sneddssomit72  
/STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.

### Descriptives

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ektraksomit72	5	.00	100.00	40.0000	54.77226
sneddssomit72	5	.00	100.00	80.0000	44.72136
Valid N (listwise)	5				

DESCRIPTIVES VARIABLES=ekstraksomit96 sneddssomit96  
/STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.

### → Descriptives

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ekstraksomit96	5	.00	100.00	40.0000	54.77226
sneddssomit96	5	.00	100.00	80.0000	44.72136
Valid N (listwise)	5				

### 3. Lepasnya *tail-bud* dari *yolk*

#### Descriptives

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ekstraktailbud24	5	.00	100.00	80.0000	44.72136
sneddstailbud24	5	.00	100.00	80.0000	44.72136
Valid N (listwise)	5				

```
DESCRIPTIVES VARIABLES=ekstraktailbud48 sneddstailbud48
  /STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.
```

#### Descriptives

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ekstraktailbud48	5	.00	100.00	60.0000	54.77226
sneddstailbud48	5	.00	100.00	80.0000	44.72136
Valid N (listwise)	5				

```
DESCRIPTIVES VARIABLES=ekstraktailbud72 sneddstailbud72
  /STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.
```

#### Descriptives

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ekstraktailbud72	5	.00	100.00	40.0000	54.77226
sneddstailbud72	5	.00	100.00	80.0000	44.72136
Valid N (listwise)	5				

```
DESCRIPTIVES VARIABLES=ekstraktailbud96 sneddstailbud96
  /STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.
```

#### → Descriptives

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ekstraktailbud96	5	.00	100.00	40.0000	54.77226
sneddstailbud96	5	.00	100.00	80.0000	44.72136
Valid N (listwise)	5				

## 4. Adanya detak jantung

**Descriptives**

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ekstrkadetak24	5	.00	.00	.0000	.00000
sneddsdetak24	5	.00	.00	.0000	.00000
Valid N (listwise)	5				

```
DESCRIPTIVES VARIABLES=ekstrakdetak48 sneddsdetak48
  /STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.
```

**Descriptives**

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ekstrakdetak48	5	.00	100.00	48.4000	50.12784
sneddsdetak48	5	.00	100.00	80.0000	44.72136
Valid N (listwise)	5				

```
DESCRIPTIVES VARIABLES=ekstrakdetak72 sneddsdetak72
  /STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.
```

**Descriptives**

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ekstrakdetak72	5	.00	100.00	40.0000	54.77226
sneddsdetak72	5	.00	100.00	80.0000	44.72136
Valid N (listwise)	5				

```
DESCRIPTIVES VARIABLES=ekstrakdetak96 sneddsdetak96
  /STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.
```

**Descriptives**

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ekstrakdetak96	5	.00	100.00	40.0000	54.77226
sneddsdetak96	5	.00	100.00	80.0000	44.72136
Valid N (listwise)	5				