TOKSISITAS EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica* L. Urb.) PADA EMBRIO IKAN ZEBRA (*Danio rerio*)

Farida Hayati[1*], Arde Toga Nugraha[1], Radinal Ansori[1], Wan Syarifah Faizah[1]
[1]*Laboratorium Farmakologi, Jurusan Farmasi FMIPA UII*

[*]*email: farida.hayati@uii.ac.id*

ABSTRAK

Pegagan merupakan tanaman obat tradisional yang banyak digunakan di Indonesia. Pegagan mengandung triterpenoid, steroid, dan saponin. Penelitian bertujuan untuk mengetahui toksisitas pegagan pada embrio ikan zebra. Pembuatan ekstrak daun pegagan dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Desain penelitian terdiri atas 4 kelompok uji dan 3 kontrol pelarut. Kelompok uji terdiri atas embrio ikan zebra yang diberikan ekstrak etanol daun pegagan konsentrasi 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm dan 31,25 ppm. Kelompok kontrol terdiri atas kontrol positif (3,4-*dichloroaniline*), kontrol negatif (*dilution water*), dan kontrol pelarut ekstrak. Seluruh senyawa uji yang dipaparkan pada embrio ikan zebra diamati tiap 24 jam hingga 96 jam. Hasil uji menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun pegagan pada dosis 62,5 ppm, 125 ppm dan 250 ppm dapat memberikan efek toksik pada embrio ikan zebra berupa kematian, namun tidak menunjukkan efek toksik pada pemberian ekstrak daun pegagan 31,25 ppm.

Kata kunci : pegagan, embrio ikan zebra, toksisitas

ABSTRACT

Pegagan is a traditional medicinal plant that is widely used in Indonesia. Pegagan contains of triterpenoids, steroids, and saponins. This study aims to determine the toxicity of Pegagan in zebrafish embryos. The extract of pegagan leaves was made using the maceration method with 96% ethanol as a solvent. The research design consisted of 4 test groups and 3 solvent control. The test group consisted of zebrafish embryos given ethanol extract of pegagan leaves concentrations of 250 ppm, 125 ppm, 62.5 ppm and 31.25 ppm. The control group consisted of positive control (3,4-dichloroaniline), negative control (dilution water), and extract solvent control. All test compounds exposed to zebrafish embryos were observed every 24 hours to 96 hours. The results showed that giving pegagan leaf extract at doses of 62.5 ppm, 125 ppm and 250 ppm could have a toxic effect on zebrafish embryos, and giving pegagan leaf extract at doses of 31.25 ppm did not show a toxic effect.

Keywords : Centella asiatica, zebrafish embryo, toxicity

PENDAHULUAN

Pemanfaatan obat tradisional di Indonesia sangatlah tinggi, karena faktor budaya didukung kemudahannya untuk dijangkau oleh masyarakat. Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) merupakan salah satu tanaman yang banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional di Indonesia (Sutardi, 2017; Habibi, 2018). Pegagan selama ini banyak dimanfaatkan untuk pengobatan disentri, diare, epilepsi, demam, antialergi, antibakteri, penyembuhan luka dan

meningkatkan stimulan sistem syaraf pusat (Besung, 2011; Orhan, 2012). Pegagan memiliki kandungan aktif flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid, dan steroid (Azzahra and Hayati, 2019).

Uji toksisitas adalah uji yang harus dilalui dalam pengembangan sebuah produk bahan alam sebagai obat. Uji ini melihat keamanan senyawa dalam jangka waktu singkat setelah pemberian konsentrasi atau dosis tertentu. Uji toksisitas dapat dilihat pada ikan zebra, maupun embrio ikan zebra (Rusli et al., 2020). Ikan zebra (*Danio rerio*) merupakan hewan coba yang belum banyak dikembangkan di Indonesia. Ikan zebra memiliki kesamaan susunan tulang belakang dan DNA sekitar 87 (Octaviana et al., 2019; Jayasinghe and Jayawardena, 2019) sehingga menjadi salah satu subjek uji yang banyak digunakan dalam penelitian toksikologi, transgenesis, pengembangan genetik. Uji toksisitas pada embrio ikan zebra dilakukan berdasarkan protokol penelitian yang telah diatur dalam OECD 236 (OECD, 2012). Kelebihan uji toksisitas pada embrio ikan zebra adalah karena sel telur ikan zebra bersifat transparan sehingga memudahkan dalam melakukan evaluasi efek senyawa terhadap beberapa organ, termasuk jantung, pankreas, dan tulang belakang tanpa harus melalui proses yang rumit (Jayasinghe and Jayawardena, 2019).

METODE PENELITIAN

Ethical Clearance

Penelitian ini telah mendapatkan Ethical Clearance dari Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia No 10/ Ka.Kom .Et/7O/KE/Vlll/2O20

Material

Bahan yang digunakan adalah daun pegagan segar, yang diperoleh dari Kalibawang, Kulonprogo, Yogyakarta, etanol 96%, n-heksan, etil asetat, 3,4-*dichloroaniline* (DCA). Hewan uji yang digunakan adalah ikan zebra (*Danio rerio*) dan embrio ikan zebra. Ikan zebra telah diidentifikasi di LIPI Bogor (B-3853/IPH.1./KS.02.03/XI/2017). Kriteria inklusi ikan zebra yang digunakan yaitu ikan zebra yang berumur 4-6 bulan, ikan sehat secara fisik. Kriteria embrio ikan zebra yang digunakan adalah embrio yang fertil dan berumur kurang dari enam jam setelah fertilisasi.

Proses Ekstraksi

Daun pegagan yang telah diseleksi, dilakukan pengeringan dalam oven dengan suhu 40 ^{0}C hingga kering. Simplisia daun pegagan diserbukkan hingga halus menggunakan *grinder*.

Serbuk tersebut ditimbang sebanyak 150 gram, kemudian di maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingannya 1:10 (serbuk simplisia : pelarut) dan dibantu dengan alat sonikasi. Proses maserasi dilakukan selama 3 hari dan sesekali dilakukan pengadukan. Hasil maserasi disaring dengan corong *buchner*. Pelarut dalam ekstrak yang didapatkan diuapkan menggunakan *vacum rotary evaporator* dengan suhu 40 ^{0}C sehingga diperoleh ekstrak kental daun pegagan.

Uji toksisitas pada embrio ikan zebra

Penyiapan dan seleksi embrio ikan zebra (OECD, 2012)

Ikan zebra dewasa dipelihara di akuarium dengan pH air 7,2, suhu 28°C, pencahayaan diatur dengan siklus 14jam terang 10 jam gelap dan diberi pakan setiap hari. Saat akan pembuahan, ikan zebra jantan dan betina dewasa (2:1) ditempatkan dalam *mating tank* semalaman terpisah antara jantan dan betina. Pembuahan dirangsang esoknya di awal periode cahaya dengan mencampurkan ikan zebra jantan dan betina. Telur diamati dan dipisahkan dalam petri disk. Embrio diseleksi melalui pengamatan di bawah mikroskop stereo (BELL). Embrio yang terseleksi adalah yang fertil dan tidak mengalami koagulasi.

Pengamatan embrio ikan zebra

Pengamatan embrio ikan zebra dilakukan di atas well plate 24. Terdapat 8 *plate* dengan pembagian 1 *plate* untuk kontrol negatif, 1 *plate* untuk kontrol positif (3,4-DCA 4mg/L), dan 1 *plate* untuk kontrol pelarut. Lima plate yang lain digunakan untuk ekstrak dengan konsentrasi 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, dan 31,25 ppm. Masing-masing plate menggunakan 20 embrio, tiap embrio dimasukkan dalam satu sumuran. Tiap plate disisakan sumuran untuk kontrol pelarut. Semua larutan uji tanpa embrio dimasukkan dalam inkubator dulu 24 jam sebelum embrio dimasukkan dalam sumuran. Pengamatan dilakukan setiap 24 jam selama 96 jam di bawah mikroskop. Parameter yang diamati yaitu parameter koagulasi embrio, pembentukan somit, lepasnya bagian *tail-bud* dari *yolk*, dan detak jantung. Selain itu bentuk bentuk malformasi yang nampak pada embrio juga dilakukan pencatatan.

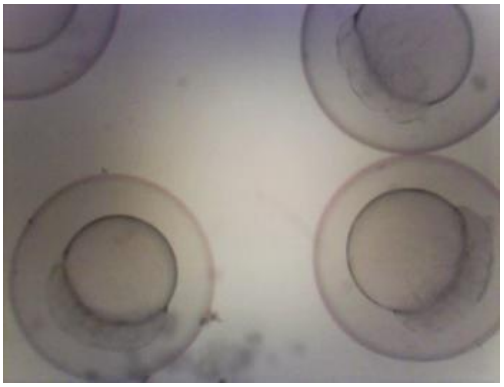
Analisa Data

Data kuantitatif berupa persentase embrio yang mengalami koagulasi, (dihitung terhadap total embrio), persentase embrio yang mengalami pembentukan somit (dihitung terhadap embrio yang berkembang), persentase Embrio yang mengalami pelepasan *tail-bud* dari *yolk* (dihitung terhadap embrio yang berkembang), persentase embrio dengan detak jantung

terlihat (dihitung terhadap embrio yang berkembang), persentase kematian embrio ikan zebra (dihitung terhadap total embrio), dan % malformasi yang terjadi setelah 96 jam pemaparan (dihitung terhadap embrio yang berkembang). Data kualitatif berupa bentuk abnormalitas embrio yang terbentuk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan bahan baku ekstrak daun pegagan yang telah digunakan secara empiris dan dibuktikan secara praklinik memiliki beberapa aktivitas farmakologis (Besung, 2011; Orhan, 2012). Uji toksisitas dilakukan pada embrio ikan zebra untuk memastikan keamanannya.



Gambar 1. Embrio ikan zebra yang terfertilisasi 2 jam setelah *breeding*

Tabel 1. Hasil pengamatan perkembangan embrio yang mengalami koagulasi dan pembentukan somit dengan menggunakan mikroskop stereo pada 24 jam, 48 jam, 72 jam, dan 96 jam setelah pemaparan

Kelompok	% embrio yang mengalami koagulasi				% embrio yang mengalami pembentukan somit			
	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam
Kontrol (+)	30	30	30	30	70	100	100	100
Kontrol (-)	5	5	5	5	100	100	100	100
Kontrol Pelarut	0	0	0	0	100	100	100	100
Ekstrak 250 ppm	5	100	100	100	100	100	100	100
Ekstrak 125 ppm	0	30	100	100	100	100	100	100
Ekstrak 62,5 ppm	0	0	45	90	100	100	100	100
Ekstrak 31,25 ppm	0	0	5	5	100	100	100	100

Penelitian ini memenuhi validasi yang diminta oleh OECD, yang mana kontrol positif yang digunakan menunjukkan kematian minimal 30% dan kontrol negatif maupun pelarut menunjukkan kematian tidak lebih dari 10%. Koagulasi embrio menunjukkan bahwa embrio yang terbentuk tidak dapat berkembang. Pada hasil di tabel 1 menunjukkan pemberian ekstrak daun pegagan dapat menyebabkan koagulasi pada embrio walaupun sifatnya tidak secara langsung, sebagian besar setelah 24 jam embrio baru mengalami koagulasi. Somit adalah tulang belakang pada ikan yang merupakan bagian penting awal pertumbuhan embrio (OECD, 2013). Data pada tabel 1 menunjukkan bahwa seluruh embrio yang berkembang (yang tidak mengalami kogulasi) menunjukkan adanya pembentukan somit, walaupun untuk kontrol positif pembentukan somitnya menjadi lebih lambat karena dampak efek toksik. Data pada tabel 1 hanya menggambarkan pembentukan somit, tanpa melihat ada tidaknya kelainan yang muncul. Kelainan pembentukan somit sebagian besar terjadi pada kelompok kontrol positif berupa *somite malformation* (gambar 2).

Tabel 2. Hasil Pengamatan Pelepasan Tail-Bud dari Yolk dan Detak Jantung Pada Embrio Ikan Zebra Masing-Masing Kelompok

Kelompok	% Embrio yang mengalami pelepasan *tail-bud* dari *yolk*				% Embrio dengan detak jantung terlihat			
	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam
Kontrol (+)	70	100	100	100	0	55	50	50
Kontrol (-)	100	100	100	100	0	100	100	100
Kontrol Pelarut	100	100	100	100	0	100	100	100
Ekstrak 250 ppm	100	100	100	100	0	0	0	0
Ekstrak 125 ppm	100	100	100	100	0	42	0	0
Ekstrak 62,5 ppm	100	100	100	100	0	100	100	100
Ekstrak 31,25 ppm	100	100	100	100	0	100	100	100

Indikator yang juga digunakan untuk mengindikasikan toksisitas adalah pelepasan tailbud dari yolk. Tailbud adalah bagian dari ekor embrio, sementara yolk merupakan bagian dari kuning telur embrio yang menyediakan nutrisi bagi embrio. Data pada tabel 2 menunjukkan embrio yang berkembang (tidak mengalami koagulasi) dan sudah membentuk somit seluruhnya mengalami pelepasan tail bud dari yol, walaupun untuk kontrol positif mengalami keterlambatan pelepasan. Abnormalitas yang bisa muncul pada fase ini sebagaimana ditunjukkan di gambar 2, yaitu berupa abnormalitas sumbu tubuh. Secara normal pelepasan

tailbud yang sempurna akan membentuk garis tubuh ikan yang lurus, abnormalitas muncul ketika tubuh ikan menjadi tidak lurus dan agak melengkung (gambar 2). Bentuk abnormalitas ini salah satunya bisa disebabkan karena paparan senyawa.

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) . Secara normal detak jantung embrio ikan baru bisa diamati setelah 48 jam proses fertilisasi (OECD, 2013).

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 mengalamai abnormalitas berupa edema perikardium. Parameter adanya detak jantung ini menunjukkan embrio masih hidup atau tidak. Pemberian ekstrak daun pegagan kadar 250 dan 125 ppm ternyata menyebabkan perlemahan detak jantung (tabel 2) yang akhirnya menyebabkan kematian 100% (tabel 3). Sementara pada kontrol positif menunjukkan kematian 50% (tabel 2 dan 3), namun dengan abnormalitas yang tertinggi (tabel 4).

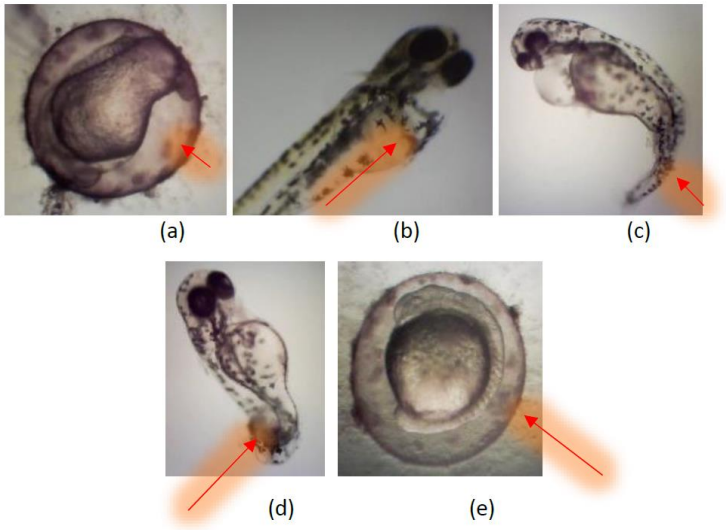
Tabel 3. Persentase Kematian Embrio Ikan Zebra setlah pemberian perlakuan ekstrak daun pegaganselama 96 jam

Kelompok	Jumlah embrio	Persentase kematian
Kontrol (+)	20	50
Kontrol (-)	20	5
Kontrol Pelarut	20	0
Ekstrak 250 ppm	20	100
Ekstrak 125 ppm	20	100
Ekstrak 62,5 ppm	20	90
Ekstrak 31,25 ppm	20	5

Tabel 4. Hasil pengamatan perkembangan embrio yang mengalami malformasi setelah pemaparan ekstrak daun pegagan pada akhir 96 jam setelah pemaparan

kelompok	% malformasi yang terjadi setelah 96 jam pemaparan
Kontrol (+)	100%
Kontrol (-)	0%
Kontrol Pelarut	0%

Ekstrak 250 ppm	0%
Ekstrak 125 ppm	0%
Ekstrak 62,5 ppm	0%
Ekstrak 31,25 ppm	0%



Gambar 2. Malformasi pada embrio ikan zebra

Ket : (a) edema yolk, (b) edema perikardial, (c) abnormalitas sumbu tubuh, (d) kelainan bentuk ekor dan (e) kelainan bentuk somit.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kontrol positif menunjukkan adanya kematian sebesar 50% dengan kejadian malformasi yang ditemukan terjadi pada 100% kematian tersebut (tabel 3 dan 4). Abnormalitas pada embrio muncul karena senyawa yang terabsorpsi dalam embrio mengganggu pertumbuh kembangan embrio. Abnormalitas yang muncul berupa edema kuning telur, edema perikardial, abnormalitas sumbu tubuh, kelainan bentuk ekor dan kelainan bentuk somit. Tanda tanda ketoksikan yang muncul akibat pemberian ekstrak daun pegagan hanya ditunjukkan oleh kematian embrio namun tidak didukung oleh abnormalitas atau malformasi dari embrio. Hal ini berbeda dengan yang ditunjukkan pada data kontrol positif, yang lebih nyata bentuk ketoksikannya, karena didukung dengan data abnormalitas embrio.

KESIMPULAN

1. Pemberian ekstrak daun pegagan pada dosis 62,5 ppm, 125 ppm dan 250 ppm dapat memberikan efek toksik pada embrio ikan zebra berupa kematian.
2. Pemberian ekstrak daun pegagan pada dosis 31,5 ppm tidak menunjukkan adanya toksisitas pada Embrio ikan zebra.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih diberikan pada Kementerian Ristek Dikti atas pendanaan Hibah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi 2019 (No.1627.1/LL5/PG/2020), dan pada Direktorat Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Islam Indoneisa.

DAFTAR PUSTAKA

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.

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. Habibi, M.W., Setiawan, M.A., Ulfa, R.M., Istiqomah, L., 2018. Efektivitas Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) terhadap Pertumbuhan Jamur *Aspergillus flavus*. CHEESA 1, 58. https://doi.org/10.25273/cheesa.v1i2.3168

Jayasinghe, C.D., Jayawardena, U.A., 2019. Toxicity Assessment of Herbal Medicine Using Zebrafish Embryos: A Systematic Review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2019, 1–17. https://doi.org/10.1155/2019/7272808

Octaviana, A., Wari, F.E., Noviasari, D., Khotimah, H., Ali, M.M., Nudiana, Kalsum, U., 2019. Effect of Centella asiatica to developmental process of lead-induced zebrafish larvae. Presented at the International Conference On Bioinformatics And Nano-Medicine From Natural Resources For Biomedical Research: 3rd Annual Scientific Meeting for Biomedical Sciences, Malang, Indonesia, p. 020033. https://doi.org/10.1063/1.5110008

OECD, 2012. Fish Embryo Acute Toxicity (FET). Guideline For The Testing Of Chemicals.

Orhan, I.E., 2012. *Centella asiatica* (L.) Urban: From Traditional Medicine to Modern Medicine with Neuroprotective Potential. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012, 1–8. https://doi.org/10.1155/2012/946259

Rusli, Z., Sari, B.L., Wardatun, S., Aristyo, W., 2020. Skrining Toksisitas Akut Beberapa Fraksi Buah Karonda (Carissa Carandas L.) Pada Embrio Zebrafish (*Danio rerio*). fitofarmaka JIF 10, 42–53. https://doi.org/10.33751/jf.v10i1.1923

Sutardi, S., 2017. Kandungan Bahan Aktif Tanaman Pegagan dan Khasiatnya untuk Meningkatkan Sistem Imun Tubuh. J. Litbang Pert. 35, 121. https://doi.org/10.21082/jp3.v35n3.2016.p121-130