

Efek Campuran Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dan Temuputih (*Curcuma zedoaria*) terhadap Toksisitas Akut pada Embrio Ikan Zebra

Effect of Curcuma xanthorrhiza and Curcuma zedoaria Extract Mixture on Acute Toxicity in Zebrafish Embryo

Kusdiantoro Mohamad^{1*}, Nursela Sofyanti Mirza Aryani², Wahono Esthi Prasetyaningtyas¹, Gustini Syahbirin³

¹Divisi Anatomi, Histologi, dan Embriologi, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University, Bogor, Indonesia

²Program Studi Kedokteran Hewan, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University, Bogor, Indonesia

³Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB University, Bogor, Indonesia

*Email: kusdiantoro@apps.ipb.ac.id

Naskah diterima: 17 Februari 2024, direvisi: 30 April 2024, disetujui: 4 Juli 2024

Abstract

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) and temuputih (*Curcuma zedoaria*) are herbs that have potential anticancer and antitumor properties. Some anticancer drugs and herbal extracts have high toxicity levels and can cause malformations in zebrafish embryos. This study aimed to compare the toxicity of ethanol extracts from *C. xanthorrhiza*, *C. zedoaria*, and their mixture (ratio of 1:6) in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. The rhizomes of *C. xanthorrhiza* and *C. zedoaria* were extracted by maceration in 80% ethanol. The extracts were tested for acute toxicity with zebrafish embryos using protocol from OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 236 (2013). The extract mixture's lethal concentration 50 (LC₅₀) value was 82.9 ppm, between the LC₅₀ values of each extract (16,5 ppm and 112,1 ppm for *C. xanthorrhiza* and *C. zedoaria*, respectively). The hatching process in zebrafish embryos was low in the *C. xanthorrhiza* extract and high in the *C. zedoaria* extract and the mixture. Notochord malformation and yolk sac edema were high in the *C. xanthorrhiza* extract but low in the *C. zedoaria* extract and the mixture. Blood circulation malformation was low in the *C. zedoaria* extract but high in the mixture. Pericardial edema and blood coagulation were major malformations in all groups. In conclusion, the extract mixture of *C. xanthorrhiza* and *C. zedoaria* caused pericardial edema malformation, blood coagulation, and synergistically inhibited blood circulation, which associated with anticancer potential. In addition, the mixture could reduce hatching inhibition, notochord malformation, and yolk sac edema.

Keywords: acute toxicity; *Curcuma xanthorrhiza*; *Curcuma zedoaria*; LC₅₀; zebrafish embryo

Abstrak

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dan temuputih (*Curcuma zedoaria*) termasuk tanaman herbal yang mempunyai potensi sebagai antitumor dan antikanker. Beberapa obat antikanker dan ekstrak herbal telah dilaporkan memiliki toksisitas yang tinggi dan menyebabkan malformasi pada embrio ikan zebra (*Danio rerio*). Penelitian ini bertujuan membandingkan toksisitas ekstrak etanol *C. xanthorrhiza*, *C. zedoaria*, dan campurannya (rasio 1:6) terhadap embrio ikan zebra. Rimpang *C. xanthorrhiza* dan *C. zedoaria* diekstrak dengan cara maserasi dalam etanol 80%. Ekstrak diuji toksisitas akut dengan embrio ikan zebra menggunakan metode OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals* No. 236 (2013). Nilai *lethal concentration 50* (LC₅₀) campuran ekstrak adalah 82.9 ppm, berada di antara nilai LC₅₀ masing-masing ekstrak (16.9 ppm untuk *C. xanthorrhiza* dan 112.1 ppm untuk *C. zedoaria*). Tingkat menetas embrio rendah pada ekstrak *C. xanthorrhiza* tetapi tinggi pada ekstrak *C. zedoaria* dan ekstrak campuran. Kelainan notokorda dan edema kantong kuning telur tinggi pada ekstrak *C. xanthorrhiza* tetapi rendah pada ekstrak *C. zedoaria* dan ekstrak campuran. Kelainan

sirkulasi darah rendah pada ekstrak *C. zedoaria* tetapi tinggi pada ekstrak campuran. Edema perikardium dan koagulasi darah merupakan malformasi mayor pada semua ekstrak. Dapat disimpulkan bahwa campuran ekstrak etanol temulawak dan temuputih menyebabkan malformasi edema perikardium, koagulasi darah, dan secara sinergis menghambat sirkulasi darah, yang berkaitan dengan potensi antikanker. Selain itu, ekstrak campuran dapat menurunkan hambatan menetas, malformasi notokorda, dan edema kantong kuning telur.

Kata kunci: embrio ikan zebra; LC₅₀; temulawak; temuputih; toksisitas akut

Pendahuluan

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) banyak digunakan sebagai obat tradisional oleh masyarakat Indonesia. Rimpang *C. xanthorrhiza* telah dilaporkan sebagai antimikrob (Mary *et al.*, 2012), antiinflamasi (Nurcholis *et al.*, 2012), antioksidan (Qader *et al.*, 2011), dan anti *nociceptive* (Devaraj *et al.*, 2010). Handayani (2008) melaporkan bahwa pemberian *C. xanthorrhiza* pada kultur sel tumor hati dapat mempercepat proses apoptosis pada sel tumor. Selain itu, Cheah *et al.* (2009) telah melaporkan potensi *C. xanthorrhiza* sebagai antikanker payudara pada manusia. Manfaat *C. xanthorrhiza* yang beragam disebabkan oleh kandungan utama yang terdapat dalam rimpangnya, yaitu kurkuminoid dan minyak atsiri. Ruslay *et al.* (2007) dan Syahbirin *et al.* (2017) melaporkan komponen aktif kurkuminoid dalam *C. xanthorrhiza* adalah kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin. Minyak atsiri pada *C. xanthorrhiza* mengandung seskuiterpen (β -kurkumena, ar-kurkumena), xantorizol, dan sebagian kecil kamfor (Jarikasem *et al.*, 2005). Temuputih (*Curcuma zedoaria*) juga memiliki banyak manfaat sebagai obat herbal. Kim *et al.* (2005) melaporkan bahwa ekstrak air rimpang *C. zedoaria* dapat digunakan sebagai hepatoprotektif. Senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, glikosida, dan steroid yang terkandung dalam ekstrak metanol rimpang *C. zedoaria* berkhasiat menangkal radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (Sumathi *et al.*, 2013). Jangetal. (2001) mengisolasi 3 senyawa aktif dari fraksi etil asetat yang terbukti sebagai antiradang, yaitu 1,7-bis(4-hidroksifenil)-1,4,6-heptatrien-3-on, prokurkumenol, dan epiprokurkumenol. Rahman *et al.* (2013) berhasil mengisolasi kurzerenon dan alismol yang terbukti mampu menghambat pertumbuhan

sel kanker. Paramapojn dan Gritsanapan (2009) melaporkan bahwa ekstrak kasar etanol rimpang *C. zedoaria* juga mengandung kurkuminoid yang terdiri atas kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin. Kurkuminoid dilaporkan mampu menghambat perkembangan sel kanker ovarium OVCAR-3 (Syu *et al.*, 1998). Ikan zebra merupakan salah satu hewan yang sering digunakan sebagai model dalam penelitian biomedis. Sifat embrio ikan zebra yang permeabel memungkinkan terjadi distribusi senyawa aktif ke dalam embrio (Kari *et al.*, 2007) sehingga dapat digunakan untuk uji toksisitas. Ikan zebra telah digunakan untuk penelitian toksisitas kardiovaskular (Hill *et al.*, 2005). Syahbirin *et al.* (2017) melaporkan bahwa embrio ikan zebra yang dipaparkan dengan ekstrak etanol *C. xanthorrhiza* memperlihatkan efek teratogenik berupa malformasi pada jantung, sumbu tubuh, ekor, pigmentasi, somit, dan kantong kuning telur serta menghambat proses menetas (*hatching*).

Penelitian mengenai campuran ekstrak temulawak dan temuputih sudah dilakukan oleh peneliti sebelumnya pada unggas (Golla *et al.*, 2014; Kaselung *et al.*, 2014), tetapi belum dilaporkan pada embrio ikan zebra. Campuran kedua ekstrak diduga dapat memberikan efek sinergis atau efek antagonis terhadap perkembangan embrio ikan zebra. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji perbandingan toksisitas akut ekstrak etanol *C. xanthorrhiza*, *C. zedoaria*, dan campurannya serta mengetahui kelainan organ utama yang disebabkan oleh paparan masing-masing ekstrak tersebut.

Materi dan Metode

Identifikasi tanaman

Rimpang *C. xanthorrhiza* dan *C. zedoaria* dikoleksi dari Unit Konservasi dan Pembibitan, Pusat Studi Biofarmaka, Bogor, Indonesia pada

Maret 2014. Identifikasi tanaman dilakukan oleh Divisi Botani, Herbarium Bogoriense, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) (dahulu Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia), Cibinong, Bogor, Indonesia.

Preparasi sampel

Rimpang *C. xanthorrhiza* dan *C. zedoaria* dicuci di air mengalir, dikeringkan, lalu dicacah menjadi ukuran kecil-kecil. Cacahan rimpang selanjutnya dikeringkan di oven pada suhu 40°C selama 24 jam. Rimpang yang telah kering digiling halus menjadi bentuk serbuk.

Ekstraksi rimpang

Metode ekstraksi serbuk rimpang *C. xanthorrhiza* dan *C. zedoaria* diadopsi dari Srijanto & Syahbirin (2007). Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi di dalam pelarut etanol 80% (v/v). Seratus gram serbuk rimpang dimaserasi dalam pelarut etanol 80% (rasio serbuk rimpang dan pelarut adalah 1:6) di dalam maserator selama 3 jam pada suhu 40–45°C. Larutan ekstrak disaring dengan kertas saring untuk memisahkan ekstrak dengan pelarut. Hasil penyaringan diuapkan dengan *vacuum evaporator* untuk menghasilkan ekstrak pekat yang akan digunakan untuk tahapan berikutnya. Ekstrak etanol dilarutkan dengan air yang digunakan untuk uji toksisitas menggunakan embrio ikan zebra (air sumur:milli-Q = 3:1). Air uji terlebih dahulu difilter, diaerasi dan ditambahkan DMSO sebanyak 20µL/100mL pada larutan ekstrak untuk mempermudah proses pelarutan. Larutan ekstrak disonikasi (20 menit pada suhu 40°C) sampai semua bahan larut. Larutan *C. xanthorrhiza* (X), *C. zedoaria* (Z),

dan campurannya (M) dibuat dengan konsentrasi seperti tercantum pada Tabel 1. Penelitian pendahuluan telah dilakukan sebelumnya untuk menghitung *lethal concentration* 50 (LC₅₀) dari masing-masing ekstrak dan diperoleh ekstrak *C. xanthorrhiza* lebih toksik dibandingkan dengan ekstrak *C. zedoaria*, dengan perbandingan LC₅₀ keduanya 1:6. Berdasarkan hasil pendahuluan ini, konsentrasi larutan campuran dari kedua bahan tersebut juga dibuat dengan perbandingan 1:6, dengan tujuan agar tingkat toksisitas kandungan kedua ekstrak pada larutan campuran menjadi setara. Jika abnormalitas muncul, diharapkan pada tingkat konsentrasi/toksitas yang sama dapat diketahui apakah terdapat perbedaan efek dari kedua ekstrak tersebut.

Ekstrak dilarutkan dengan konsentrasi tertentu (Tabel 1), difilter, dan dimasukkan ke dalam cawan petri 24 sumur. Uji menggunakan metode *fish embryo toxicity test* berdasarkan *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* No. 236 (OECD, 2013). Setiap cawan petri 24 sumur terdapat 4 sumur kontrol internal yang berisi air yang telah difilter, dan 20 sumur yang berisi larutan ekstrak dengan konsentrasi tertentu, masing-masing sebanyak 2 mL. Secara keseluruhan penelitian menggunakan 17 cawan petri 24 sumur, terdiri dari 5 cawan petri untuk ekstrak *C. xanthorrhiza*, 5 cawan petri untuk ekstrak *C. zedoaria*, 5 cawan petri untuk ekstrak campuran, serta ditambah satu cawan petri untuk kontrol negatif, dan satu cawan petri sebagai kontrol pelarut (DMSO).

Preparasi embrio ikan zebra

Embrio ikan zebra dibeli dari petani ikan di Cibinong Bogor. Embrio ikan dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi air yang

Tabel 1. Konsentrasi ekstrak *Curcuma xanthorrhiza*, *Curcuma zedoaria*, dan campurannya (rasio 1:6).

<i>C. xanthorrhiza</i> (X)		<i>C. zedoaria</i> (Z)		Campuran (M)	
Kode	Konsentrasi	Kode	Konsentrasi	Kode	Konsentrasi
X1	10 ppm	Z1	40 ppm	M1	2.5 ppm X+15 ppm Z
X2	20 ppm	Z2	80 ppm	M2	5 ppm X+30 ppm Z
X3	30 ppm	Z3	120 ppm	M3	10 ppm X+60 ppm Z
X4	40 ppm	Z4	160 ppm	M4	15 ppm X+90 ppm Z
X5	50 ppm	Z5	200 ppm	M5	20 ppm X+120 ppm Z

telah diaerasi sebelumnya selama 12 jam dan difilter. Embrio yang fertil dikumpulkan dalam cawan petri untuk pemeriksaan fertilitas. Fertilitas embrio dilihat dengan menggunakan mikroskop, yaitu embrio yang fertil memiliki warna transparan, kantong amnion utuh, dan perkembangan embrio yang normal. Jumlah embrio yang dikoleksi untuk keperluan seleksi adalah dua kali lipat dari jumlah embrio yang akan digunakan. Total embrio yang digunakan sebanyak 17 cawan petri \times 24 sumur \times 1 embrio = 408 embrio. Embrio hasil seleksi dicuci dengan cara memindahkan embrio dari satu cawan petri ke cawan petri yang lain, masing-masing sebanyak tiga kali. Embrio yang telah diseleksi selanjutnya diambil dengan menggunakan pipet mikro dan ditempatkan satu embrio untuk setiap sumur. Embrio diinkubasi pada suhu ruangan ($\pm 26^\circ\text{C}$).

Waktu pengamatan dan analisis data

Pengamatan dilakukan pada 24 jam, 48 jam, 72 jam, dan 96 jam setelah pemaparan. Pengamatan dilakukan terhadap kematian dan abnormalitas yang terjadi pada embrio. Data abnormalitas berupa kelainan pada: sumbu tubuh, ekor, pigmentasi, otak, rahang, mata, gelembung pendengaran, jantung, darah, sirkulasi darah, somit, notokorda, dan kantung kuning telur. Data kematian dianalisis dengan menggunakan probit untuk memperoleh nilai LC_{50} . Abnormalitas mayor ditentukan oleh persentase abnormalitas $\geq 50\%$.

Hasil dan Pembahasan

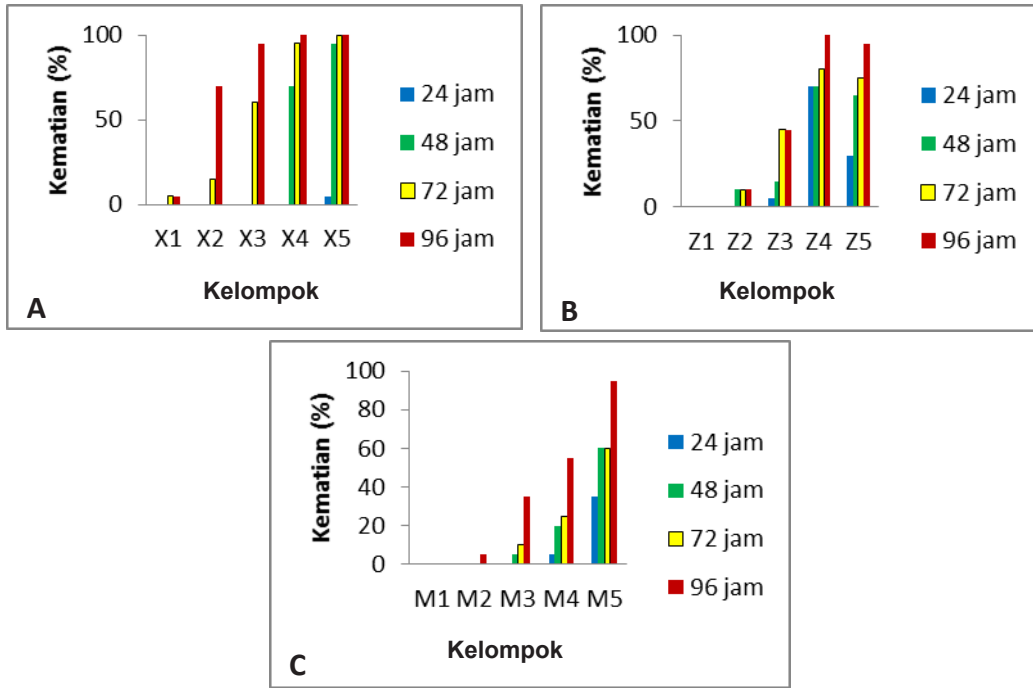
Hasil menunjukkan paparan pada ekstrak *C. xanthorrhiza* (Gambar 1A) mulai menyebabkan kematian embrio $\geq 50\%$ pada kelompok X2 (20 ppm) pada waktu 96 jam, kelompok X3 (30 ppm) pada waktu 72 jam, serta kelompok X4 (40 ppm) dan X5 (50 ppm) pada waktu paparan 48 jam. Ekstrak *C. zedoaria* (Gambar 1B) mulai menyebabkan kematian embrio $\geq 50\%$ pada kelompok Z4 (160 ppm) pada waktu paparan 24 jam dan Z5 (200 ppm) pada waktu paparan 48 jam. Pada ekstrak campuran (Gambar 1C), kematian embrio $\geq 50\%$ mulai terjadi pada kelompok M4 (15 ppm *C. xanthorrhiza* dan 90 ppm *C. zedoaria*) pada waktu paparan 96 jam, dan kelompok M5 (20 ppm X + 120 ppm Z)

pada waktu paparan 48 jam. Hasil perhitungan LC_{50} menggunakan probit dari data kematian 96 jam setelah fertilisasi menunjukkan nilai LC_{50} sebesar 16,91 ppm untuk ekstrak *C. xanthorrhiza*, 112,1 ppm untuk *C. zedoaria*, dan 82,91 ppm untuk campuran keduanya (Tabel 2).

Hasil LC_{50} menggunakan embrio ikan zebra menunjukkan temulawak lebih toksik dari temuputih. Hasil ini mendukung penelitian sebelumnya yang menggunakan uji larva udang atau (*brine shrimp lethality test* (BSLT), yaitu nilai LC_{50} dari temulawak 14,80 ppm (Prasetyorini *et al.*, 2011) dan nilai LC_{50} temuputih 145,87 ppm (Aker *et al.*, 2012). Nilai LC_{50} dari ekstrak campuran berada di antara nilai LC_{50} dari ekstrak temulawak dan temuputih secara sendiri-sendiri (Tabel 2). Seperti diketahui, nilai LC_{50} tersebut berasal dari campuran ekstrak dengan perbandingan ekstrak *C. xanthorrhiza* berbanding ekstrak *C. zedoaria* adalah 1:6 (lihat pada metode). Pada konsentrasi M5 dengan campuran temulawak 20 ppm dan temuputih 120 ppm, maka seharusnya M5 lebih toksik dari X2 yang hanya mengandung temulawak 20 ppm saja. Akan tetapi, Gambar 1 justru memperlihatkan tingkat kematian M5 lebih rendah dibandingkan dengan tingkat kematian X2. Hasil ini menunjukkan bahwa pada ekstrak campuran keberadaan ekstrak *C. zedoaria* mampu menekan tingkat kematian akibat ekstrak *C. xanthorrhiza*. Dengan kata lain, ekstrak *C. zedoaria* menyebabkan penurunan tingkat toksisitas ekstrak *C. xanthorrhiza*.

Nilai LC_{50} yang kurang dari 1000 ppm menunjukkan bahwa kedua ekstrak dan campurannya bersifat toksik (Prasetyorini *et al.*, 2011) dan berpotensi sebagai antikanker (Sukmarianti *et al.* 2013). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa temulawak dan temuputih memiliki potensi sebagai obat antikanker (Itokawa *et al.*, 2008; Lakshmi *et al.*, 2010).

Proses menetas pada embrio ikan zebra terjadi pada 48 jam setelah fertilisasi (OECD, 2013). Paparan ekstrak *C. xanthorrhiza* (Gambar 2A) menghambat proses menetas (menetas $< 50\%$) pada embrio ikan zebra mulai pada kelompok X2 (20 ppm). Sementara itu, ekstrak *C. zedoaria* (Gambar 2B) mulai menunjukkan penghambatan proses menetas $< 50\%$ pada



Gambar 1. Tingkat kematian embrio ikan zebra setelah paparan ekstrak etanol dari A. *Curcuma xanthorrhiza* (X), B. *Curcuma zedoaria* (Z), dan C. Campurannya (M). X1: 10 ppm, X2: 20 ppm, X3: 30 ppm, X4: 40 ppm, X5: 50 ppm, Z1: 40 ppm, Z2: 80 ppm, Z3: 120 ppm, Z4: 160 ppm, Z5: 200 ppm, M1: 2,5 ppm X+15 ppm Z, M2: 5 ppm X+30 ppm Z, M3: 10 ppm X+60 ppm Z, M4: 15 ppm X+90 ppm Z; M5: 20 ppm X+120 ppm Z.

konsentrasi yang lebih tinggi, mulai pada kelompok Z4 (160 ppm). Campuran ekstrak *C. xanthorrhiza* dan *C. zedoaria* (Gambar 2C) menunjukkan penghambatan proses menetas pada embrio yang hidup pada konsentrasi tertinggi, yaitu kelompok M5 (20 ppm X + 120 ppm Z). Hasil ini menunjukkan campuran ekstrak *C. zedoaria* mampu mengurangi efek penghambatan menetas pada ekstrak *C. xanthorrhiza*.

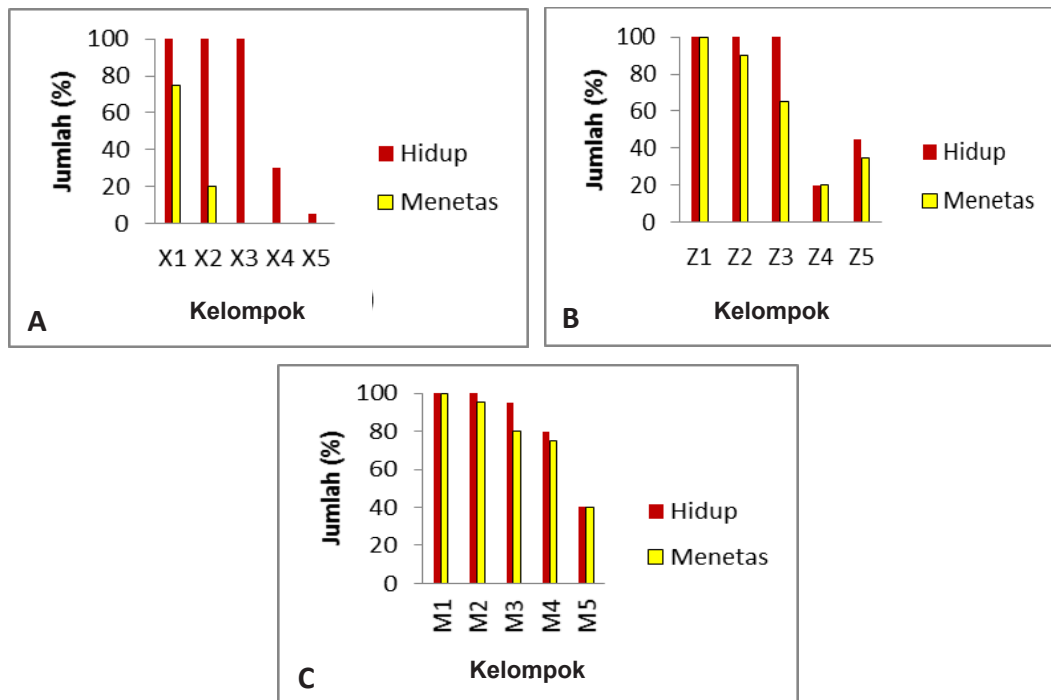
Tabel 2. Nilai lethal concentration 50 (LC50) ekstrak *Curcuma xanthorrhiza*, *Curcuma zedoaria*, dan campurannya (1:6)

Ekstrak	LC ₅₀ (ppm)	Selang kepercayaan (R ²)
<i>C. xanthorrhiza</i>	16,9	0,98
<i>C. zedoaria</i>	112,1	0,91
Campuran (1:6)	82,9	0,94

Ekstrak temulawak mampu menghambat proses menetas pada embrio ikan zebra. Proses menetas pada embrio ikan zebra terjadi pada 48 jam setelah fertilisasi. Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 4 dapat dilihat bahwa pada ekstrak temulawak hanya pada konsentrasi X1 (10 ppm) embrio

mengalami proses menetas lebih dari 50% dari embrio yang hidup, sedangkan pada konsentrasi lebih tinggi embrio tidak mengalami menetas sama sekali. Hasil penelitian ini juga mendukung penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa konsentrasi ekstrak temulawak di atas 62,50 µg/mL menyebabkan tidak ada embrio yang menetas (Alafiatayo *et al.*, 2019). Ketidakmampuan embrio menetas merupakan salah satu efek toksisitas selain kematian embrio pada uji toksisitas menggunakan embrio ikan zebra. Toksisitas penghambatan proses menetas juga ditunjukkan oleh obat antikanker. Chang *et al.* (2014) telah melaporkan bahwa paparan obat antikanker doksorubisin menunjukkan penghambatan proses penetasan pada embrio ikan zebra.

Sebagian besar embrio yang hidup pada ekstrak temuputih mengalami proses menetas, sekalipun pada konsentrasi tinggi, berbeda dengan ekstrak temulawak yang menunjukkan penghambatan proses menetas. Pada ekstrak campuran, embrio juga mengalami proses menetas sama seperti pada ekstrak temuputih. Ekstrak temulawak, yang awalnya menghambat proses menetas, jika digabungkan dengan



Gambar 2. Jumlah embrio ikan zebra yang hidup dan menetas setelah paparan ekstrak etanol dari A. *Curcuma xanthorrhiza* (X), B. *Curcuma zedoaria* (Z), dan C. Campurannya (M). X1: 10 ppm, X2: 20 ppm, X3: 30 ppm, X4: 40 ppm, X5: 50 ppm, Z1: 40 ppm, Z2: 80 ppm, Z3: 120 ppm, Z4: 160 ppm, Z5: 200 ppm, M1: 2,5 ppm X+15 ppm Z, M2: 5 ppm X+30 ppm Z, M3: 10 ppm X+60 ppm Z, M4: 15 ppm X+90 ppm Z; M5: 20 ppm X+120 ppm Z.

ekstrak temuputih menyebabkan embrio menjadi menetas. Hasil ini menunjukkan bahwa toksisitas ekstrak temulawak yang menghambat proses menetas dapat dinetralkan oleh ekstrak temuputih sehingga campuran kedua ekstrak tersebut menjadi tidak toksik terhadap proses penetasan. Embrio ikan zebra bisa menetas lebih awal (kurang dari 48 jam) yang terjadi di alam ketika ada rangsangan senyawa kimia yang dilepas oleh predator. Akan tetapi penetasan yang lebih awal ini diikuti kelainan tubuh yang memendek pada embrio tersebut (Wisenden *et al.*, 2022). Pada penelitian ini tidak ditemukan penetasan yang lebih awal pada ekstrak *C. zedoaria* seperti pada penelitian sebelumnya (Syahbirin *et al.*, 2024). Selain itu, embrio yang menetas pada ekstrak *C. zedoaria* dan ekstrak campuran semuanya tidak menunjukkan kelainan tubuh yang memendek. Dengan demikian, kemampuan ekstrak *C. zedoaria* yang ada di dalam ekstrak campuran mampu mengurangi toksisitas ekstrak temulawak pada proses menetas pada embrio ikan zebra.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi dan lama waktu paparan menyebabkan peningkatan abnormalitas

(Gambar 3). Paparan ekstrak *C. xanthorrhiza* pada kelompok X1 (10 ppm) menyebabkan abnormalitas embrio $\geq 50\%$ dengan waktu paparan 72 jam, sedangkan pada konsentrasi lebih besar membutuhkan waktu paparan 48 jam (Gambar 3A). Pada ekstrak *C. zedoaria*, abnormalitas embrio $\geq 50\%$ terjadi pada konsentrasi Z2 (80 ppm) pada waktu paparan 72 jam, konsentrasi Z3 (120 ppm) pada waktu paparan 48 jam, konsentrasi Z4 (160 ppm) pada waktu paparan 24 jam, dan konsentrasi Z5 (200 ppm) pada waktu paparan 48 jam (Gambar 3B). Ekstrak campuran juga menunjukkan pola yang sama, yaitu embrio mengalami abnormalitas $\geq 50\%$ pada konsentrasi M2 (5 ppm X + 30 ppm Z) pada waktu paparan 96 jam, konsentrasi M3 (10 ppm X + 60 ppm Z) pada waktu paparan 72 jam, konsentrasi M4 (15 ppm X + 90 ppm Z) dan M5 (20 ppm X + 120 ppm Z) pada waktu paparan 48 jam (Gambar 3C).

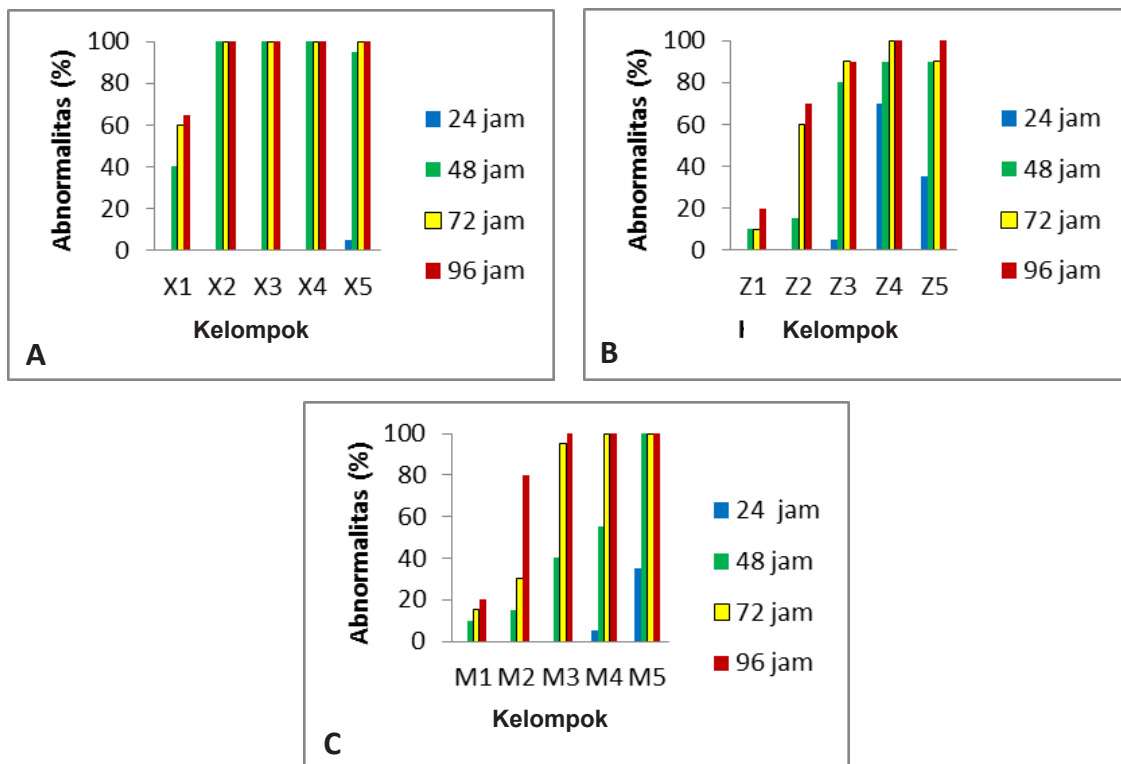
Malformasi yang terjadi pada embrio dapat memberikan gambaran kerja atau organ target dari ekstrak tersebut. Hasil pada Tabel 3 dan Gambar 4 menunjukkan jenis dan persentase abnormalitas yang terjadi akibat paparan ekstrak *C. xanthorrhiza*, *C. zedoaria*, dan campurannya.

Paparan ekstrak *C. xanthorrhiza* menyebabkan kelainan mayor berupa edema perikardium, koagulasi darah, kelainan notokorda, dan edema kantong kuning telur, serta malformasi minor berupa kelainan pada sumbu tubuh dan ekor (*caudal fin*). Paparan ekstrak *C. zedoaria* menyebabkan malformasi mayor berupa edema perikardium dan koagulasi darah, serta malformasi minor berupa kelainan pada sumbu tubuh, ekor, sirkulasi darah, notokorda, dan edema kantong kuning telur. Paparan campuran kedua ekstrak menyebabkan malformasi mayor berupa edema perikardium, koagulasi darah, dan sirkulasi, serta malformasi minor berupa kelainan pada sumbu tubuh, ekor, notokorda, dan edema kantong kuning telur. Tingkat abnormalitas juga menunjukkan pola yang sama seperti pada tingkat penetasan, yaitu ekstrak temulawak memiliki tingkat abnormalitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan tingkat abnormalitas temuputih. Ekstrak campuran mampu menunjukkan pengurangan tingkat abnormalitas akibat toksisitas temulawak.

Jenis malformasi mayor pada ekstrak temulawak, temuputih, dan campurannya

selanjutnya dirangkum pada Tabel 4. Berdasarkan hasil rangkuman, ada tiga pola kejadian kelainan yang dapat diamati. Pola pertama mengikuti pola penurunan hambatan proses menetas, yakni kelainan mayor pada salah satu campuran menurun menjadi kelainan minor pada ekstrak campuran. Pola kelainan ini teramati pada kelainan notokorda dan kantong kuning telur. Hasil ini menunjukkan kelainan notokorda dan kantong kuning telur sangat bergantung kepada keberadaan senyawa yang ada pada ekstrak temulawak (malformasi mayor). Pada ekstrak campuran, ketika kandungan ekstrak temulawak menjadi lebih sedikit, maka kedua jenis kelainan pada notokorda dan kantong kuning telur mengalami penurunan pula sehingga menjadi kelainan minor.

Ada kemungkinan bahwa kelainan notokorda dan kantong kuning telur ini diakibatkan oleh kurkuminoid. Seperti yang telah dilaporkan sebelumnya, kurkumin merupakan kurkuminoid yang dominan di dalam ekstrak temulawak (Ruslay *et al.*, 2007; Syahbirin *et al.*, 2017), sebaliknya kandungan kurkumin pada temuputih tidak setinggi pada



Gambar 3. Tingkat abnormalitas embrio ikan zebra setelah paparan ekstrak etanol dari A. *Curcuma xanthorrhiza* (X), B. *Curcuma zedoaria* (Z), dan C. Campurannya (M). X1: 10 ppm, X2: 20 ppm, X3: 30 ppm, X4: 40 ppm, X5: 50 ppm, Z1: 40 ppm, Z2: 80 ppm, Z3: 120 ppm, Z4: 160 ppm, Z5: 200 ppm, M1: 2,5 ppm X+15 ppm Z, M2: 5 ppm X+30 ppm Z, M3: 10 ppm X+60 ppm Z, M4: 15 ppm X+90 ppm Z; M5: 20 ppm X+120 ppm Z.

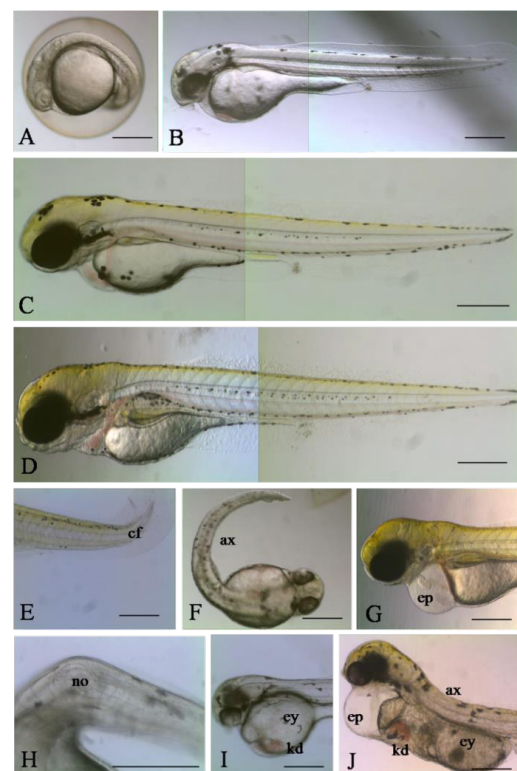
Tabel 3. Jenis abnormalitas embrio ikan zebra setelah paparan ekstrak *Curcuma xanthorrhiza*, *Curcuma zedoaria*, dan campurannya

Abnormalitas	Jumlah abnormalitas (%) setelah paparan		
	<i>C. xanthorrhiza</i>	<i>C. zedoaria</i>	Campuran (1:6)
Sumbu tubuh	3 (5)	3 (6,98)	3 (5,56)
Ekor	9 (11,67)	4 (9,30)	19 (35,19)
Pigmentasi	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Otak	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Rahang	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Mata	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Gel. pendengaran	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Edema perikardium	47 (78,33)*	39 (90,70)*	49 (90,74)*
Koagulasi darah	35 (58,33)*	28 (65,12)*	39 (72,42)*
Sirkulasi darah	0 (0)	20 (46,51)	34 (62,96)*
Somit	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Notokorda	49 (81,67)*	2 (4,65)	19 (35,19)
Kantong kuning telur	40 (66,67)*	11 (25,58)	17 (37,04)

*Malformasi mayor ($\geq 50\%$ abnormalitas)

temulawak (Syahbirin *et al.*, 2024). Oleh karena itu, diduga penyebab kedua kelainan ini adalah kurkumin. Wu *et al.* (2007) melaporkan bahwa kelainan khas yang teramati akibat paparan senyawa kurkumin murni pada ikan zebra adalah kelainan pada ekor (sirip ekor), dan tubuh yang memendek. Kelainan pada ekor ditemukan pada penelitian ini dengan jumlah minor $<50\%$, sedangkan kelainan tubuh yang memendek tidak ditemukan pada penelitian ini. Meski kelainan tubuh pendek tidak ditemukan, kelainan tubuh yang lain berupa sumbu tubuh melengkung ditemukan pada penelitian ini, dengan jumlah kejadian bersifat minor. Kelainan ekor yang bersifat minor ini menunjukkan kemungkinan kadar kurkumin pada penelitian ini yang lebih rendah dibandingkan dengan kadar kurkumin murni yang digunakan oleh Wu *et al.* (2007) dalam penelitian tersebut.

Pola kedua kejadian kelainan pada penelitian ini adalah kelainan mayor pada masing-masing ekstrak tetap bersifat mayor pada ekstrak campurannya. Pola kelainan ini teramati pada edema perikardium dan koagulasi darah (Tabel 4). Kedua jenis kelainan ini menunjukkan kemungkinan efek senyawa-senyawa yang terdapat pada kedua jenis ekstrak, baik pada temulawak maupun pada temuputih, sehingga toksisitas masing-masing ekstrak (malformasi mayor) tetap tinggi dan sama dengan ekstrak campuran (malformasi mayor).



Gambar 4. Beberapa jenis abnormalitas yang ditemukan pada embrio ikan zebra yang disebabkan oleh paparan ekstrak etanol *Curcuma xanthorrhiza* (X), *Curcuma zedoaria* (Z), dan campurannya (M). A. Kontrol 24 jpf. B. Kontrol 48 jpf. C. Kontrol 72 jpf. D. Kontrol 96 jpf. E. Temulawak X2 48 jpf. F. Campuran M1 96 jpf. G. Campuran M3 72 jpf. H. Temuputih Z3 48 jpf. I. Temuputih Z1 48 jpf. J. Campuran M3 72 jpf. X2: 20 ppm, Z1: 40 ppm, Z3: 120 ppm, M1: 2,5 ppm X+15 ppm Z, M3: 10 ppm X+60 ppm Z. Jpf: jam pascafertilisasi, ax: kelainan sumbu tubuh, cf: kelainan ekor, ey: edema kantong kuning telur, ep: edema perikardium, kd: koagulasi darah, no: kelainan notokorda. Bar: 300 μ m.

Pembuktian perbandingan kandungan dan konsentrasi senyawa dari kedua ekstrak yang memiliki efek toksisitas yang sama masih perlu penelitian lebih lanjut.

Pola ketiga kejadian kelainan pada penelitian ini adalah kelainan minor pada salah satu ekstrak kemudian menjadi mayor pada ekstrak campuran. Pola ini merupakan pola kebalikan dari pola yang pertama. Pola ini teramati pada kelainan sirkulasi darah (Tabel 4), Kelainan sirkulasi darah yang ditemukan adalah darah berhenti bersirkulasi (tanpa aliran darah), dan kelainan ini terdapat pada ekstrak temuputih, dengan persentase kurang dari 50% (malformasi minor). Pada ekstrak campuran, kelainan ini meningkat menjadi malformasi mayor, maka diduga terdapat senyawa yang kandungannya lebih tinggi pada temuputih dibandingkan dengan pada temulawak. Kemungkinan lain adalah terdapat senyawa yang berbeda tetapi memiliki efek sinergis, sehingga efek pada ekstrak campuran menjadi lebih tinggi dibandingkan efek pada masing-masing ekstrak.

Ekstrak temuputih menyebabkan kelainan pada sirkulasi berupa aliran darah (vaskularisasi) yang berhenti. Suplai darah merupakan salah satu faktor penting bagi pertumbuhan tumor, karena tumor memerlukan sirkulasi dari pembuluh darah baru (neovaskularisasi) untuk kebutuhan nutrisi dan oksigen bagi pertumbuhan jaringan tumor atau sel kanker (Katayama *et al.*, 2019). Jika pembentukan pembuluh darah dihambat, maka sel kanker akan mati. Hal ini menunjukkan temuputih dan ekstrak campuran memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai antikanker.

Penelitian ini telah menunjukkan efek ekstrak campuran yang menyebabkan kelainan mayor pada edema perikardium, koagulasi darah, dan sirkulasi darah. Ketiga jenis kelainan ini sangat terkait dengan aktivitas suatu senyawa sebagai antikanker. Uji obat antikanker doksorubisin menunjukkan penurunan denyut jantung pada embrio ikan zebra (Chang *et al.*, 2014). Meskipun pada penelitian ini tidak mengukur denyut jantung embrio, akan tetapi kelainan berupa edema perikardium pada penelitian ini termasuk salah satu kelainan pada organ jantung. Seperti diketahui, obat anti kanker menyebabkan

toksisitas pada jantung pada manusia (Morelli *et al.*, 2022). Oleh karena itu, penelitian ini yang menunjukkan kelainan mayor berupa edema perikardium, koagulasi darah, dan sirkulasi darah pada embrio ikan zebra dapat mendukung kemungkinan potensi antikanker campuran ekstrak *C. xanthorrhiza* dan *C. zedoaria*.

Kesimpulan

Ekstrak etanol temulawak lebih toksik dibandingkan dengan ekstrak temuputih pada embrio ikan zebra, dengan nilai LC_{50} adalah 16,9 ppm dan 112,1 ppm; dengan toksisitas ekstrak campuran pada perbandingan 1:6 terletak di antara nilai keduanya, yakni dengan LC_{50} 82,9 ppm. Campuran ekstrak etanol temulawak dan temuputih menyebabkan malformasi mayor ($\geq 50\%$) berupa edema perikardium, koagulasi darah, dan efek sinergis penghambatan sirkulasi darah, yang ketiganya berkaitan dengan potensi antikanker. Selain itu, ekstrak campuran mampu menurunkan toksisitas pada proses menetas, malformasi notokorda, dan edema kantong kuning telur pada embrio ikan zebra.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Wahyudin, A.Md atas bantuan teknis di laboratorium selama proses penelitian.

Daftar Pustaka

- Akter, R., Satter, M.A., Khan, M.S., Rahman, M.S., and Ahmad, N.U. (2012). Cytotoxic Effect of Five Medicinal Plants Extract Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Test. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*. 47 (1): 133-136.
- Alafiatayo, A.A., Lai, K.S., Syahida, A., Mahmood, M., and Shahrudin, N.A. (2019). Phytochemical Evaluation, Embryotoxicity, and Teratogenic Effects of Curcuma Longa Extract on Zebrafish (*Danio rerio*). *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2019: 3807207.
- Chang, C., Wu, S.L., Zhao, X.D., Zhao, C.T., Li, and Y.H. (2014). Developmental Toxicity of Doxorubicin Hydrochloride in Embryo-Larval Stages of Zebrafish. *Bio-*

- medical Materials and Engineering*. 24 (1): 909–916.
- Cheah, Y.H., Nordin, F.J., Sarip, R., Tee, T.T., Azimahtol, H.L.P., Sirat, H.M., Rashid, B.A.A., Abdullah, N.R., and Ismail, Z. (2009). Combined Xanthorrhizol-Curcumin Exhibits Synergistic Growth Inhibitory Activity Via Apoptosis Induction in Human Breast Cancer Cells MDA-MB-231. *Cancer Cell International*. 9: 1.
- Devaraj, S., Esfahani, A.S., Ismail, S., Ramanathan, S., and Yam, M.F. (2010). Evaluation of the Antinociceptive Activity and Acute Oral Toxicity of Standardized Ethanolic Extract of the Rhizome of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Molecules*. 15 (4): 2925-2934.
- Golla, Y., Montong, M.E.R., Laihad, J.T., and Rembet, G.D.G. (2014). Penambahan Tepung Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) dan Tepung Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoaria* Rosc) dalam Ransum Komersial terhadap Persentase Karkas, Lemak Abdomen, dan Persentase Hati pada Ayam Pedaging. *Jurnal ZooteK*. 34: 115-123.
- Handayani, T. (2008). Pengaruh Xanthorrhizol terhadap Sel Hepatoma HepG2. *Jurnal Kesehatan Maranatha*. 8 (1): 29-35.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., and Peterson, R.E. (2005). Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences*, 86 (1): 6-19.
- Itokawa, H., Shi Q., Akiyama, T., Morris-Natschke, S.L., and Lee, K.H. (2008). Review Recent Advances in the Investigation of Curcuminoids. *Chinese Medicine*. 3 (11): 1-13.
- Katayama, Y., Uchino, J., Chihara, Y., Tamiya, N., Kaneko, Y., Yamada, T., and Takayama, K. (2019). Tumor Neovascularization and Developments in Therapeutics. *Cancers*, 11 (3): 316.
- Jang, M.K., Sohn, D.H., and Ryu, J.H. (2001). Inhibitors of Macrophage TNF-Release from *Curcuma Zedoaria*. *Planta Medica*. 67 (6): 550-552.
- Jarikasem, S., Thubthimthed, S., Chawanoraseth, K., and Suntornatanasat, T. (2005). Essential Oils from Three *Curcuma* Species Collected in Thailand. *Acta Horticulturae* 3(675): 37-40. DOI:10.17660/ActaHortic.2005.675.4
- Kari, G., Rodeck, U., and Dicker, A.P. (2007). Zebrafish: An Emerging Model System for Human Disease and Drug Discovery. *Discovery*. 82 (1): 70-80.
- Kaselung, P.S., Montong, M.E.K., Sarayar, C.L.K., and Saerang, J.L.P. (2014). Penambahan Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica* Val), Rimpang Temu Lawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) dan Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoaria* Rosc) dalam Ransum Komersial terhadap Performans Burung Puyuh (*Coturnixcoturnix japonica*). *Jurnal ZooteK*. 35 (1): 114-123.
- Kim, D.I., Lee, T.K., Jang, T.H., and Kim, C.H. (2005). The Inhibitory Effect of a Korean Herbal Medicine, *Zedoariae rhizome*, on Growth of Cultured Human Hepatic Myofibroblast Cells. *Life Sciences*. 77 (2005): 890-906.
- Lakshmi, S., Padmaja, G., and Remani, P. (2010). Antitumour Effects of Isocurcumenol Isolated from *Curcuma Zedoaria* Rhizomes on Human and Murine Cancer Cells. *International Journal of Medicinal Chemistry*. 2011: 1-13.
- Mary, H., Susheela, G., Jayasree, S., Nizzy, A.M., Rajagopal, B.S., and Jeeva, S. (2012). Phytochemical Characterization and Antimicrobial Activity of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2 (2): S637-S640.
- Nurcholis, W., Chelsea, Ambarsari, L. (2019). Potensi Nanokurkuminoid Temulawak sebagai Pencegah Peroksidasi Lipid pada Tikus Inflamasi. *Current Biochemistry*. 6 (1): 45-55.

- [OECD] The Organization for Economic Co-operation and Development. (2013). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 236. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD, Paris.
- Paramapojn, S. and Gritsanapan, W. (2009). Free Radical Scavenging Activity Determination and Quantitative Analysis of Curcuminoids in *Curcuma zedoaria* Rhizome Extracts by HPLC Method. *Current Science*. 97(7) :1069-1073.
- Prasetyorini, Wiendarlina, I.Y., and Peron, A.B. (2011). Toksisitas Beberapa Ekstrak Rimpang Cabang Temu Lawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) pada Larva Udang (*Artemia salina* Leach). *Fitofarmaka*. 1(2) :14-21.
- Qader, S.W., Abdulla, M.A., Chua, L.S., Najim, N., Zain, M.M., and Hamdan, S. (2011). Antioxidant, Total Phenolic Content and Cytotoxicity Evaluation of Selected Malaysian Plants. *Molecules*, 16 (4): 3433-3443.
- Rahman, S.N.S.A., Wahab, N.A., and Malek, S.N.A. (2013). *In Vitro* Morphological Assessment of Apoptosis Induced by Antiproliferative Constituents from Rhizome of *Curcuma zedoaria*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2013: 257108.
- Ruslay, S., Abas, F., Shaari, K., Zainal, Z., Maulidiani, Sirat, H., Israf, D.A., and Lajis, N.H. (2007). Characterization of the Components Present in the Active Fractions of Health Gingers (*Curcuma xanthorrhiza* and *Zingiber zerumbet*) by HPLC-DAD-ESIMS. *Food Chemistry*. 104 (3): 1183-1191.
- Srijanto, B. and Syahbirin, G. (2007). Optimasi Ekstraksi Kurkumin dari Temu Lawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) secara Batch. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia Universitas Parahyangan*. 22 November 2007, Bandung, Indonesia.
- Sukmarianti, N.W.S., Suaniti, N.M., and Swantara, I.M.D. (2013). Identifikasi dan Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Spons *Ianthella Basta* terhadap Larva *Artemia salina* L. *Cakra Kimia Indonesia*. 1 (1): 14-19.
- Sumathi, S., Iswariya, G.T., Sivaprabha, B., Dharani B., Radha, P., and Padma, P.R. (2013). Comparative Study of Radical Scavenging Activity and Phytochemical Analysis of Fresh and Dry Rhizomes of *Curcuma zedoaria*. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 4 (3): 10691073.
- Syahbirin, G., Nurfadilawati, and Mohamad, K. (2017). Curcuminoid and Toxicity Levels of Ethanol Extract of Javanese Ginger (*Curcuma xanthorrhiza*) on Brine Shrimp (*Artemia salina*) Larvae and Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 10 (4): 169-173.
- Syahbirin, G., Aditiningrum, K.A., and Mohamad, K. (2024). Acute Toxicity of Ethanol Extract of *Curcuma zedoaria* Rosc (Zingiberaceae) Rhizomes Against Brine Shrimp Larvae and Zebrafish Embryos. *Jurnal Medik Veteriner*. 7 (1): 7-18.
- Syu, W.J., Shen, C.C., Don, M.J., Ou, J.C., Lee G.H., and Sun, C.M. (1998). Cytotoxicity of Curcuminoids and Some Novel Compounds from *Curcuma zedoaria*. *Journal of Natural Products*. 61 (12): 1531-1534.
- Wisenden, B.D., Paulson, D.C., and Orr M. (2022). Zebrafish Embryos Hatch Early in Response to Chemical and Mechanical Indicators of Predation Risk, Resulting in Underdeveloped Swimming Ability of Hatchling Larvae. *Biology Open*. 11 (12): bio059229.