

Uji Efek Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Sembung terhadap Ikan Zebra

Luthfi Faris Azhar *, Siti Hazar, Umi Yuniarni

Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Indonesia.

luthfi.faris15@gmail.com, Siti.hazar@unisba.ac.id, uyuniarni@gmail.com

Abstract. Acute toxicity testing is an essential early stage in the development of natural compounds as potential drug candidates, aiming to assess the safety level of a compound shortly after the administration of a specific dose. *Blumea balsamifera* (daun sembung) is widely known in traditional medicine and possesses various pharmacological activities such as antidiarrheal, antibacterial, diaphoretic, expectorant, and tonic effects. This study aimed to evaluate the acute toxicity of the ethanolic extract of *B. balsamifera* leaves on zebrafish (*Danio rerio*) as the test organism. Zebrafish were selected due to their genetic similarity to humans, which is approximately 60–70%, making them relevant for toxicological studies. The zebrafish used in this study were around 3 months old, with a body length of approximately 2 ± 1 cm, maintained under controlled conditions with daily feeding, water temperature set at 26°C using a thermostat, pH maintained at 7.0, and natural light cycles. The acute toxicity test was conducted once, involving 7 fish per treatment group, following OECD guidelines (1992). The test was repeated once and observed every 24 hours for up to 96 hours, using extract concentrations of 62.5, 125, 250, 500, and 1000 ppm. The observed parameters included mortality and LC_{50} value, which was calculated using probit regression analysis. Based on the percentage of fish mortality, the LC_{50} value was determined to be 31.2528 µg/ml, which falls under the “slightly toxic” category according to the toxicity classification scale (10–100 ppm).

Keywords: *ZebraFish*, *Blumea balsamifera*, *Acute Toxic*

Abstrak. Uji toksisitas akut merupakan tahap awal yang penting dalam pengembangan bahan alam sebagai kandidat obat, guna menilai tingkat keamanan suatu senyawa dalam waktu singkat setelah pemberian dosis tertentu. Daun sembung (*Blumea balsamifera*) dikenal luas dalam pengobatan tradisional dan memiliki berbagai aktivitas farmakologis seperti mengatasi diare, antibakteri, diaforetik, ekspektoran, dan tonikum. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi toksisitas akut ekstrak etanol daun sembung terhadap ikan zebra (*Danio rerio*) sebagai hewan uji. Ikan zebra dipilih karena memiliki kesamaan genetik sekitar 60–70% dengan manusia, sehingga relevan untuk studi toksikologi. Ikan zebra (zebrafish) yang digunakan sebagai hewan uji memiliki usia sekitar 3 bulan dengan panjang tubuh sekitar 2 ± 1 cm, dipelihara dengan pemberian makan setiap hari, suhu air terkontrol menggunakan termostat pada 26°C, air dijaga pada pH 7,0, serta siklus terang secara alam. Pengujian toksisitas akut dilakukan satu kali dengan melibatkan 7 ekor ikan per kelompok perlakuan (OECD, 1992). Pengujian Uji toksisitas dilakukan sebanyak satu kali pengulangan dan diamati setiap 24 jam sampai dengan 96 jam menggunakan variasi konsentrasi ekstrak sebesar 62,5; 125; 250; 500; dan 1000 ppm. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak daun sembung terhadap ikan zebra dengan melihat parameter yang di amati yaitu kematian dan nilai LC_{50} menggunakan regresi probit. Hasil dari persen kematian didapatkan hasil nilai LC_{50} yang didapatkan sebesar 31,2528 µg/ml, yang tergolong dalam kategori sedikit toksik atau slightly toxic berdasarkan skala toksisitas (10–100 ppm).

Kata Kunci: *ZebraFish*, Daun sembung, Uji toksisitas akut

A. Pendahuluan

Kementerian Kesehatan RI melaporkan telah ditemukan 16.218 tanaman obat dan 19.871 tanaman obat di Indonesia yang berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai obat tradisional berdasarkan hasil identifikasi 9.600 spesies menunjukkan kualitas terapeutik dan 200 spesies telah dimanfaatkan sebagai bahan baku obat tradisional (BPOM.,2023).

Uji toksisitas merupakan komponen penting dalam proses pengembangan bahan alam sebagai kandidat obat, dengan tujuan untuk memastikan keamanan senyawa yang diuji. Salah satu hewan yang digunakan untuk pengujian toksisitas adalah ikan zebra (*Danio rerio*), baik dalam bentuk ikan dewasa maupun embrio (Rusli et al., 2020). Ikan ini dianggap representatif karena memiliki kemiripan genetik dengan manusia sebesar kurang lebih 87%, serta struktur tulang belakang yang serupa (Octaviana et al., 2019; Jayasinghe & Jayawardena, 2019).

Uji toksisitas akut biasanya dilakukan dalam jangka waktu 24 jam, dengan parameter utama berupa nilai LC_{50} yang menunjukkan konsentrasi senyawa yang menyebabkan kematian pada 50% subjek uji. Untuk menentukan rentang konsentrasi yang relevan, diperlukan uji pendahuluan terlebih dahulu (Pramadita et al., 2022).

Tujuan pengujian toksisitas akut adalah untuk mengetahui konsentrasi letal suatu senyawa (nilai LC_{50}) yang akan mengakibatkan 50% populasi hewan uji mati. Nilai data LC_{50} ini ditentukan dengan menggunakan standar statistic yang sering digunakan untuk menyatakan tingkat dosis toksik sebagai data kuantitatif, sedangkan untuk memperoleh data kualitatif digunakan observasi dari fisiologi, mekanisme efek toksik, dan gejala klinis pada hewan uji (Jenova, Rika., 2009). Hewan uji untuk uji toksisitas akut antara lain ikan zebra (*Danio rerio*), tikus, mencit, kelinci, larva udang, dan untuk hewan uji ikan zebra saat ini sering digunakan untuk pengujian atau penelitian pada toksikologi (Amir,dkk., 2020). Ikan zebra merupakan kelompok ikan dari famili Cyprinidae dengan ciri tubuh berukuran kecil, dewasa berukuran 4-5 cm, berbadan silindris, dan pola warna yang berbeda bergantian horizontal terang dan gelap garis-garis. Sistem reproduksi ikan zebra berlangsung sepanjang tahun, umur ikan zebra yang sudah siap untuk bereproduksi yaitu sudah mencapai 4-6 bulan (Rizky Hadyan, n.d.).

Habitat asli ikan zebra yaitu berada di Amerika Tengah. Biasanya, ikan zebra hidup di beberapa tempat seperti sungai, danau, serta area persawahan dimana terdapat substrat berlumpur (Omelda, 2016). Pakan utama ikan zebra antara lain serangga yang sesuai dengan bukaan mulutnya (Omelda, 2016). Hal ini karena populasi serangga yang berbeda-beda sehingga menjadikan ikan zebra beradaptasi dan memanfaatkan sumber daya pakan alami lain yang tersedia, seperti zooplankton. Dalam memilih makanan, ikan zebra bersifat generalis dan dapat beradaptasi dengan ketidakstabilan ketersediaan makanan di alam. Apabila ketersediaan makanan utamanya tidak terpenuhi maka ikan zebra akan beralih pada makanan pelengkap (Fakhrul Akbar Arrahim et al., 2024).

Daun sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) merupakan salah satu tanaman obat yang telah lama dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional. Masyarakat memanfaatkannya untuk berbagai keperluan, seperti memperkuat gigi, menghilangkan bau badan, mengatasi diare, bertindak sebagai antibakteri, melancarkan sirkulasi darah, serta sebagai karminatif, diaforetik, ekspektoran, astringen, tonikum, dan obat batuk. Selain sebagai obat, daun sembung juga dapat dikonsumsi sebagai bahan pangan. Tanaman ini mengandung berbagai senyawa aktif, antara lain minyak atsiri, tanin, saponin, alkaloid, glikosida, borneol, sineol, limonen, serta senyawa golongan seskuiterpenoid dan flavonoid (Annisa Yunia Rachmatika & Suwendar, 2023).

Berdasarkan uraian tersebut, maka rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu apakah ekstrak etanol daun sembung (*Blumea balsamifera*) memiliki efek toksik berdasarkan nilai LC_{50} terhadap ikan zebra dan berapa nilai LC_{50} yang didapat pada uji toksisitas akut ekstrak etanol daun sembung.

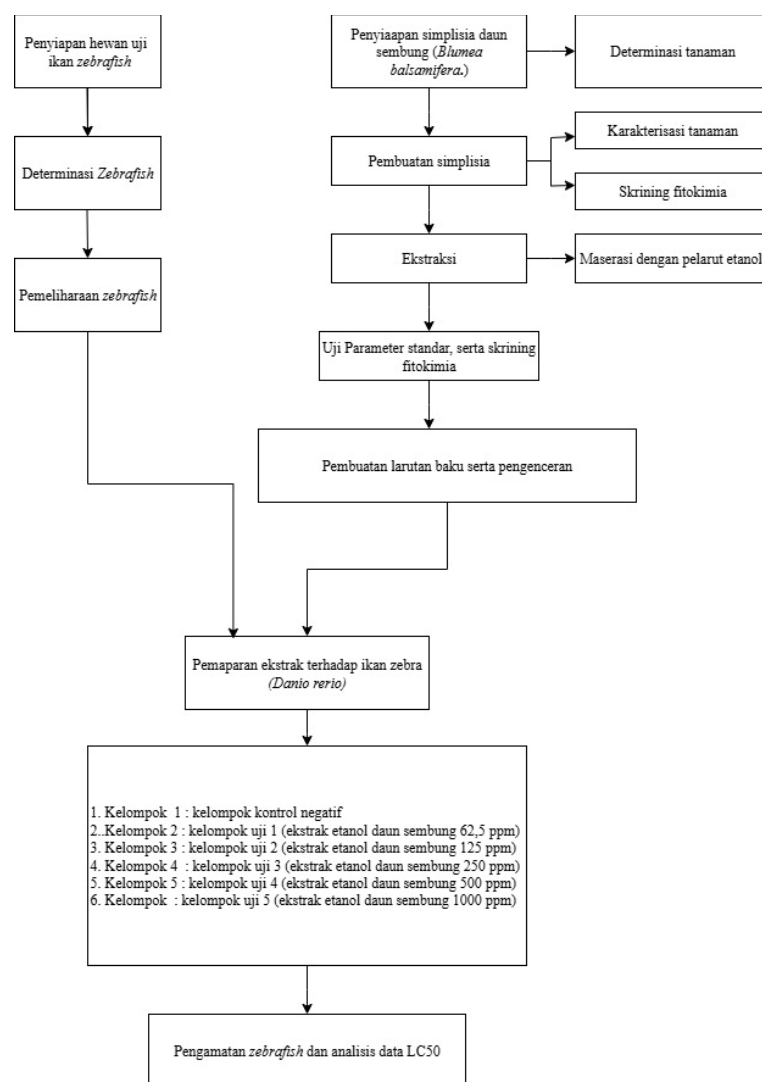
Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui keamanan dan toksisitas dari ekstrak etanol daun sembung terhadap ikan zebra serta mengetahui konsentrasi ekstrak etanol yang dapat menyebabkan kematian pada LC_{50} populasi ikan zebra.

B. Metode

Dalam penelitian ini menggunakan metode eksperimental murni (true experimental design) secara in vitro dengan hewan penelitian yaitu zebrafish di Laboratorium Farmakologi, Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Pada penelitian ini akan digunakan Simple Randomized Post Test Only Controlled Group Design yaitu sebuah penelitian rancangan untuk

mengukur pengaruh perlakuan terhadap kelompok uji yang membandingkan kelompok kontrol dengan perlakuan (Amat, 2011).

Penelitian ini diawali dengan tahapan persiapan alat dan bahan, dilanjutkan dengan proses determinasi tanaman dan hewan uji, pembuatan simplisia, serta dilakukan karakterisasi dan skrining fitokimia terhadap simplisia yang diperoleh. Selanjutnya, dilakukan proses ekstraksi daun sembung menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% untuk menghasilkan ekstrak. Ekstrak kemudian dikarakterisasi dan diuji kembali kandungan senyawa metabolit sekundernya melalui skrining fitokimia. Ikan zebra (zebrafish) yang digunakan sebagai hewan uji memiliki usia sekitar 3 bulan dengan panjang tubuh sekitar 2 ± 1 cm, dipelihara dengan pemberian makan setiap hari, suhu air terkontrol menggunakan termostat pada 26°C , pH air dijaga pada 7,0, serta siklus terang secara alam. Pengujian toksisitas akut dilakukan sekali dengan melibatkan 7 ekor ikan per kelompok perlakuan (OECD, 1992). Parameter utama yang diamati adalah persentase kematian ikan uji. Data yang didapat akan dioalah menggunakan metode regresi probit, yaitu metode statistik yang umum digunakan untuk menentukan nilai LC_{50} , yakni konsentrasi yang diperkirakan dapat menyebabkan kematian pada 50% populasi hewan uji (Wijaya, 2020).



Gambar 1. Bagan Alir Penelitian

C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Penetapan parameter standar dalam penelitian ini dibagi menjadi dua kategori, yaitu parameter spesifik dan parameter non-spesifik. Standarisasi spesifik mencakup pengamatan makroskopis atau

organoleptik yang meliputi evaluasi warna, bau, dan rasa simplisia, serta analisis kuantitatif terhadap kadar sari larut dalam etanol dan kadar sari larut dalam air, yang merepresentasikan kelarutan senyawa aktif dalam pelarut polar maupun semi-polar. Sementara itu, penetapan karakteristik non-spesifik meliputi beberapa parameter fisik-kimia, yaitu kadar air, susut pengeringan, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut dalam asam. Parameter-parameter ini digunakan untuk menjamin kualitas, kemurnian, dan stabilitas simplisia serta ekstrak daun sembung yang digunakan dalam penelitian Pengamatan organoleptik dilakukan untuk menilai karakteristik fisik simplisia dan ekstrak berdasarkan parameter warna, bau, dan rasa (Arziah et al., 2022).

Tabel 1. Hasil Uji Organoleptik simplisia dan Ekstrak

jenis Penetapan	Hasil		
	Pengamatan	Simplisia	Ekstrak
Organoleptik	Bentuk	Bubuk daun	Kental
	Warna	Hijau	Hijau Pekat
	Bau	Khas Daun kering	Bau Khas Daun
	Rasa	Pahit	Pahit

Berdasarkan hasil pengamatan, simplisia daun sembung (*Blumea balsamifera* L.) menunjukkan warna hijau yang cenderung pudar dan mendekati kecokelatan. Perubahan warna ini kemungkinan disebabkan oleh proses pemanasan selama pengeringan, yang dapat memicu degradasi pigmen alami sehingga warna menjadi lebih gelap. Bentuk simplisia yang diperoleh masih menyerupai bentuk daun segar, namun ukurannya lebih kecil akibat penyusutan yang terjadi selama proses pengeringan. Aroma yang terdeteksi bersifat khas dan mencerminkan karakteristik daun yang telah mengalami proses pengeringan. Hasil pengamatan organoleptik terhadap ekstrak daun sembung menunjukkan warna hijau yang sangat pekat. Hal ini berkaitan dengan penggunaan etanol sebagai pelarut dalam proses ekstraksi.

Etanol merupakan pelarut organik yang mampu mengekstraksi senyawa polar hingga semi-polar, termasuk pigmen seperti klorofil. Oleh karena itu, klorofil yang ikut terekstrak memberikan warna hijau intens pada ekstrak yang dihasilkan.

Hasil uji karakterisasi simplisia dan ekstrak menunjukkan simplisia dan ekstrak daun sembung (*Blumea balsamifera* L.) memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder sebagai berikut.

Tabel 2. Hasil Karakterisasi Simplisia dan Ekstrak Dengan Metode Skrining Senyawa Fitokimia

Golongan Senyawa	Simplisia Daun Sembung	Ekstrak Etanol Daun Sembung
Alkaloid	(+)	(+)
Flavanoid	(+)	(+)
Saponin	(+)	(+)
Tanin	(+)	(+)
Steroid/Terpenoid	(-)	(-)
Monoterpen dan Sesquiterpen	(-)	(-)

Keterangan

(+) = Terdeteksi

(-) = Tidak Terdeteksi

Berdasarkan hasil karakterisasi simplisia dan ekstrak maka dapat disimpulkan bahwa simplisia dan ekstrak memiliki kandungan senyawa Alkaloid, saponin, flavonoid, dan tanin. Sedangkan hasil standarisasi simplisia dan ekstrak menunjukkan hasil sebagai berikut :

Tabel 3. Hasil Standarisasi Simplisia dan Ekstrak

Hasil Standarisasi Simplisia dan Ekstrak			
Komponen Standarisasi	simplisia	Ekstrak	Pustaka (Kemenkes RI, 2017)
Kadar Sari Larut Air	16,55%		>13,9%
Kadar Sari Larut Etanol	10,55%		>6,8%
Kadar Air	7,2%		
Susut Pengerinan	7,62%		<10%
Kadar Abu Total	8,51%	0,12%	<8,4%
Kadar Abu Tidak Larut Asam	1,1%	0,67%	<1,7%

Berdasarkan hasil penetapan parameter standarisasi simplisia dan ekstrak menunjukkan bahwa kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, susut pengeringan dan kadar air pada simplisia menunjukkan nilai yang memenuhi persyaratan. Kemudian pada kadar abu total pada simplisia tidak memenuhi persyaratan hal ini bisa disebabkan kandungan mineral yang terkandung pada bahan itu sendiri karena semakin tinggi nilai kadar abu total, maka semakin besar pula jumlah senyawa mineral dan anorganik yang terkandung di dalamnya (Falah & Sa'diyah, 2024).

Kandungan mineral dan senyawa anorganik ini perlu dibatasi karena dapat menjadi salah satu faktor penyebab toksisitas apabila dikonsumsi dalam jumlah berlebihan. Oleh karena itu, penetapan kadar abu total menjadi parameter penting dalam menilai kemurnian serta keamanan bahan herbal yang akan digunakan. Kemudian pada kadar abu tidak larut asam memenuhi persyaratan apabila kadar abu tidak larut asam tinggi, hal tersebut dapat disebabkan oleh faktor lingkungan, seperti lokasi penanaman yang berdekatan dengan jalan raya. Kondisi ini memungkinkan adanya kontaminasi berupa debu, tanah, atau partikel pasir yang menempel pada permukaan daun selama proses pertumbuhan dan panen. Kemudian dapat disebabkan oleh adanya proses penggunaan pupuk untuk membantu menyuburkan tanaman dan residu sisa penggunaan pupuk masih menempel. Atau dapat disebabkan oleh adanya kandungan logam berat yang tidak dapat melarut di dalam cairan asam (Digna Evifania dkk., 2020).

Hasil uji toksisitas akut menggunakan ikan zebra dihitung dengan menjumlahkan hewan yang mengalami kematian pada rentang waktu 96 jam dengan interval pengamatan setiap 24 jam. Data kematian ikan zebra dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Hasil Jumlah Kematian Ikan Zebra

konsterasi larutan uji (ppm)	jumlah ikan zebra				Total
	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam	
1000	7	0	0	0	7

500	7	0	0	0	7
250	7	0	0	0	7
125	7	0	0	0	7
62,5	0	0	2	0	2
kontrol negatif	0	0	0	0	0

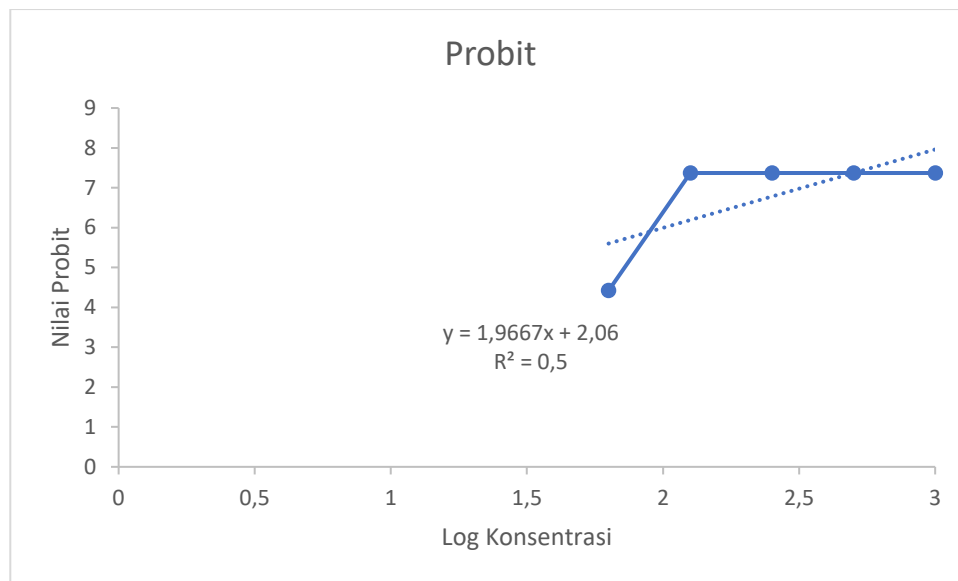
Hasil yang didapat dari pengamatan yaitu pada 24 jam seluruh ikan zebra pada konsentrasi 1000, 500, 250 ppm dan 125 ppm mengalami kematian, sedangkan pada konsentrasi 62,5 ppm tidak terlihat adanya kematian pada ikan zebra. Lalu pada 48 jam tidak terdapat kematian ikan zebra. Pada 72 jam terdapat kematian ikan zebra kematian ikan zebra pada konsentrasi 62,5 ppm sebanyak 2 ekor dan keempat tidak ada ikan zebra yang mati. Ikan zebra yang terdapat pada larutan kontrol negatif tidak mengalami kematian pada 24 – 96 jam.

Dari data kematian yang diperoleh, kemudian dihitung kematian dan nilai probit yaitu pada konsentrasi 100, 500, 250 ppm dan 125 ppm didapat hasil 100% kematian, sedangkan pada konsentrasi 62,5 ppm didapat hasil 28,57% kematian. Kemudian untuk nilai probit pada konsentrasi 100, 500, 250 ppm dan 125 ppm didapat nilai probit 7,37, sedangkan pada konsentrasi 62,5 ppm didapat nilai probit 4,42. Setelah didapatkan hasil dari persen kematian dan nilai probit dilakukan perhitungan LC50 dengan menggunakan excel untuk mendapatkan hasil regresi dan kurva kalibrasi yang nanti mengetahui nilai dari LC50 terhadap ikan zebra hasil yang di dapat pada nilai LC50 ekstrak daun sembung terhadap ikan zebra yaitu 31,25. Menurut skala toksisitas akut berdasarkan Fish and Wildlife Servis 31,25 termasuk Sedikit beracun atau *Slightly toxic* dengan rentang nilai LC50 10-100.

Tabel 5. Hasil persen kematian, nilai probit, nilai LC50

Konsentrasi	Log Konsentrasi	% Kematian	Probit	Nilai LC50
1000	3	100	7,37	31,25
500	2,7	100	7,37	
250	2,4	100	7,37	
125	2,1	100	7,37	
62,5	1,8	28,57	4,42	
Kontrol negatif	0	0	0	

% kematian ikan *zebrafish* paling tinggi adalah pada konstentrasi mulai dari 125-1000 ppm. Dari data ini dapat dicari nilai LC50 dengan cara regresi linier dengan menghitung menggunakan excel yaitu log konsentrasi dan nilai probit yang di dapat dan di dapat nilai regresi dari persamaan garis lurus $Y = 1,9667, A = 1,9967, b 2,06$ dan nilai X didapatkan hasil 1,4948. Kemudian nilai LC50 didapatkan hasil 31,2528 ppm.



Gambar 2. Kurva Kalibrasi

Garfik regresi linier % kematian terhadap log konsentrasi dan nilai probit ekstrak etanol daun sembung (*Blumea balsamifera*) jika dikaitkan dengan gambar skala toksisitas akut berdasarkan Fish and Wildlife Servis. Ekstrak etanol daun sembung termasuk kedalam Slightly toxic dengan rentang 10-100 µg/ml dengan nilai LC50 yang didapat yaitu sebesar 31,2528.

Mengenai uji toksisitas sub akut Penelitian mengenai pengaruh ekstrak etanol daun sembung (*Blumea balsamifera* L. DC) terhadap fungsi hati dan ginjal pada mencit putih jantan menunjukkan bahwa pemberian ekstrak secara sub akut, baik dalam variasi dosis maupun lama pemberian, tidak menimbulkan efek toksik yang signifikan terhadap fungsi organ hati dan ginjal. Hasil ini mengindikasikan bahwa ekstrak etanol daun sembung relatif aman digunakan dalam rentang dosis dan durasi pemberian yang telah diuji. Tetapi karena kekurangan pada uji toksisitas akut pada ikan zebra ini belum ada konversi dosis seperti pada penelitian uji toksisitas akut pada mencit sehingga harus diteliti lebih lanjut lagi mengenai cara konversi dosis manusia ke ikan.

Kemudian mengenai uji toksisitas ekstrak etanol daun temu blenyeh (*Curcuma purpurancens* Blume) didapatkan hasil ekstrak etanol temu blenyeh memiliki efek toksik terhadap ikan zebra dengan nilai LC50 sebesar 83,7 ppm yang tergolong dalam kategori toksik pada parameter uji toksisitas. Karena pada hari pertama seluruh ikan zebra pada konsentrasi 1000, 500 dan 250 ppm mengalami kematian, sedangkan pada konsentrasi 125, 62,5 ppm tidak terlihat adanya kematian pada ikan zebra. Lalu pada hari kedua terdapat kematian ikan zebra pada konsentrasi 125 ppm sebanyak 6 ekor dan konsentrasi 62,5 ppm sebanyak 2 ekor. Pada hari ketiga dan keempat tidak ada ikan zebra yang mati. Ikan zebra yang terdapat pada larutan kontrol negatif tidak mengalami kematian pada hari pertama hingga hari keempat.

D. Kesimpulan

Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan dalam penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa nilai LC50 dari ekstrak etanol daun sembung dengan waktu pengamatan selama 96 jam termasuk dalam kategori Slightly toxic atau sedikit toksik yaitu pada rentang 10-100 µg/ml dengan nilai LC50 sebesar 31,2528 µg/ml.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada Bapak/Ibu Dekan FMIPA Unisba dan Ketua Program Studi Farmasi FMIPA Unisba. Selain itu, penulis mengucapkan terimakasih kepada seluruh kasie lab dan laboran Farmasi Unisba yang telah membantu penulis dalam melakukan

riset mengenai penelitian ini. Terimakasih kepada teman-teman penulis yang selalu memberikan dukungan kepada penulis dan berbagi ide serta saran sehingga penelitian ini terlaksana dengan baik, semoga segala bantuan yang diberikan mendapat balasan yang setimpal dan bermanfaat bagi kita semua.

Daftar Pustaka

- Annisa Yunia Rachmatika, & Suwendar. (2023). Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol Kulit Batang Awar-awar dengan Metode BSLT. *Jurnal Riset Farmasi*, 103–108. <https://doi.org/10.29313/jrf.v3i2.3161>
- Fakhrul Akbar Arrahim, Vinda Maharani Patricia, & Livia Syafnir. (2024). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Alkesa terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. *Jurnal Riset Farmasi (JRF)*, 4(1).
- Rizky Hadyan, M. (n.d.). *Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Sirsak (Annona Muricata L.) yang Tumbuh di Daerah Cianjur Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. <https://journals.sangkuriangpublisher.com/pharmacomedic>
- Arziyah, D., Yusmita, L., & Wijayanti, R. (2022). Analisis Mutu Organoleptik Sirup Kayu Manis Dengan Modifikasi Perbandingan Konsentrasi Gula Aren Dan Gula Pasir. *Jurnal Penelitian Dan Pengkajian Ilmiah Eksakta*, 1(2), 105–109. <https://doi.org/10.47233/jppie.v1i2.602>
- BPOM. (2023). *Pedoman Evaluasi Data Empiris Obat Bahan Alam*.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2011). *Suplemen 1 Farmakope herbal Indonesia*. Jakarta:Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Digna Evifania, R., Apridamayanti, P., & Sari, R. (2020). Uji parameter spesifik dan nonspesifik simplisia daun senggani (*Melastoma malabathricum* L.). Dalam *Jurnal Cerebellum* (Vol. 6, Nomor 1).
- Falah, M. N. A., & Sa'diyah, K. (2024). PENGARUH RASIO AMPAS TAHU TERHADAP KUALITAS PRODUK PAKAN IKAN NILA. DISTILAT: *Jurnal Teknologi Separasi*, 10(1), 170–179. <https://doi.org/10.33795/distilat.v10i1.4215>
- 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>
- 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>
- OECD. 1992. *Compendium of Environmental Exposure Assesment Methods for Chemicals in Model Ecosystem*. National Research Council.
- Pramadita, S., Sulastris, A., & Desmaiani, H. (2022). Uji Toksisitas Akut LC50 Limbah Cair Industri Karet PT . X terhadap *Daphnia Magna* dengan Metode Batch. *Jurnal Teknologi Lingkungan Lahan Basah*, 10(1), 57–63.
- Jenova, R. (2009). *Uji Toksisitas Akut yang Diukur Dengan Penentuan LD50 Ekstrak Herba Putri Malu (Mimosa pudica L.) Terhadap Mencit Balb/C*[Undergraduate thesis]. Universitas Diponegoro.
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. the behavior and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*. 2008;83(1):13-34.
- Sentosa, A. A., & Wijaya, D. 2016. Potensi Invasif Ikan Zebra Cichlid (*Amatitlania nigrofasciata* Günther, 1867) di Danau Beratan, Bali Ditinjau dari Aspek Biologinya. *BAWAL Widya Riset Perikanan Tangkap*. 5(2): 113- 121. <http://dx.doi.org/10.15578/bawal.5.2.2013.113-121>.
- Omelda JFL, Vazquez FJS. 2011. Thermal Biology of Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of thermal biologi*. 36(32): 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijthermalsci.2008.12.012>