

TOXICOLOGICAL EVALUATION OF GINGER (*Zingiber officinale*) AND KAYU SECANG (*Biancaea sappan*) EXTRACTS USING BRINE SHRIMP (*Artemia Salina L.*)

Made Kurnia Widiastuti Giri¹, Ni Luh Putu Pranena Sastri², Made Bayu Permasutha³, I Wayan Muderawan⁴

^{1,2,3}Fakultas Kedokteran, Universitas Pendidikan Ganesha, Singaraja

⁴Fakultas Mipa, Universitas Pendidikan Ganesha, Singaraja

e-mail :kurnia.widiastuti@undiksha.ac.id, putu.pranena@undiksha.ac.id, bayu.permasutha@undiksha.ac.id, wayan.muderawan@undiksha.ac.id

Abstract

Ginger (*Zingiber officinale*) and sappan wood (*Biancaea sappan*) are herbaceous plants that are commonly used as herbal decoctions. Due to their wide biological and pharmacological activity, many natural compounds can serve as the foundation for the creation of modern medicines. Some of them are also known to have toxicological characteristics that are important in the development of cancer drugs. Objective: This study aims to evaluate the toxic effects of secang wood extract (*Biancaea sappan*) and ginger (*Zingiber officinale*) on saltwater shrimp (*Artemia salina L.*). Methods: The design of this study was a laboratory experimental analysis using the Brine Shrimp (*Artemia Salina L.*) method. The extract was prepared using standard methods and its toxicity was evaluated using a saltwater shrimp death test. Results: The results of the study were shown by determining its lethal concentration (LC50) which affects 50% of the shrimp population. showed that ginger extract was very toxic to shrimp brine with an LC50 value of 12.91. This shows that both extracts have high toxicity and can have a good effect on cells undergoing carcinogenesis even at relatively low concentrations. Conclusion: These findings highlight the importance of careful use and proper handling of extracts to minimize the potential health risks associated with the toxicity of herbal extracts. Further research is needed to elucidate the specific components responsible for the observed toxicity and to explore the potential use of herbal extracts as anti-cancer and antioxidants.

Keywords: *ginger, kayu secang, toxicological.*

Abstrak

Jahe (*Zingiber officinale*) dan kayu secang (*Biancaea sappan*) merupakan tanaman herba yang biasa digunakan sebagai jamu rebusan. Karena aktivitas biologis dan farmakologisnya yang luas, banyak senyawa alami dapat berfungsi sebagai landasan penciptaan obat – obatan modern. Beberapa diantaranya juga diketahui memiliki karakteristik toksikologi yang penting dalam perkembangan obat kanker. Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efek toksik ekstrak kayu secang (*Biancaea sappan*) dan jahe (*Zingiber officinale*) pada udang air asin (*Artemia salina L.*). Metode: Desain penelitian ini adalah analitik eksperimental laboratoris dengan metode Brine Shrimp (*Artemia Salina L.*). Ekstrak disiapkan menggunakan metode standar dan toksisitasnya dievaluasi menggunakan uji kematian udang air asin. Hasil: Hasil penelitian ditunjukkan dengan menentukan konsentrasi mematakannya (LC50) yang mempengaruhi 50% populasi udang menunjukkan bahwa ekstrak jahe memiliki kadar toksik terhadap air garam udang dengan nilai LC50 sebesar 12,91. Hal ini menunjukkan bahwa kedua ekstrak memiliki kemampuan toksik tinggi dan dapat memberikan efek baik pada sel yang mengalami karsinogenesis bahkan pada konsentrasi yang relatif rendah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jahe ± 3 kali lebih mudah mematkan sel dibandingkan dengan ekstrak kayu secang. Conclusion: Temuan ini menitikberatkan pentingnya penggunaan ekstrak yang tepat untuk meminimalkan potensi risiko kesehatan yang terkait dengan toksisitas ekstrak herbal. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menjelaskan komponen spesifik yang bertanggung jawab atas toksisitas yang diamati dan untuk mengeksplorasi potensi penggunaan ekstrak herbal sebagai anti kanker.

Kata Kunci: jahe, kayu secang, toksikologi

PENDAHULUAN

Pembuatan obat baru yang berasal dari tumbuhan semakin menarik minat dari para peneliti seluruh dunia. Senyawa alami yang dikandung dan dihasilkan dari tumbuhan dipercaya dapat menyembuhkan penyakit pada manusia. Senyawa alami ini biasanya disebut sebagai fitokimia. Fitokimia merupakan komponen alami yang tergolong metabolit sekunder yang terdapat di beberapa bagian tanaman. Fitokimia yang dapat ditemukan pada tanaman obat antara lain saponin, alkaloid, flavonoid, antosianin, dll.

Tanaman herbal sudah lazim digunakan oleh masyarakat kawasan Asia Tenggara khususnya, Indonesia. Secara turun temurun tanaman herbal digunakan sebagai obat tradisional sebagai alternatif obat – obat modern yang beredar di pasaran. Tanaman herbal yang digunakan antara lain jahe (*Zingiber officinale*) dan kayu secang (*Biancaea sappan*). Kandungan shogaol dan gingerol pada jahe membuatnya memiliki manfaat sebagai anti-inflamasi sehingga jahe biasanya diminum untuk mengurangi radang dan meredakan mual. Kayu secang memiliki antioksidan yang dipercaya dapat meningkatkan kesuburan kaum pria.

Meningkatnya penggunaan obat tradisional sebagai obat alternatif juga meningkatkan kepekaan akan pentingnya keamanan obat yang digunakan. Penelitian tentang toksisitas obat dilakukan agar penggunaan obat tradisional dapat dipastikan aman. Evaluasi toksikologi produk alami sangat penting untuk menilai potensi risikonya dan menentukan tingkat dosis yang aman untuk dikonsumsi. Tes toksikologi ekstrak herbal dilakukan menggunakan berbagai tes berbasis pada model biologis, seperti penelitian *in vivo* pada hewan. Brine shrimp atau udang air asin (*Artemia salina* L.) merupakan salah satu hewan yang dapat digunakan untuk skrining awal terhadap efek toksik berbagai zat.

Tes brine shrimp digunakan karena mudah dilakukan, biaya terjangkau, dan hasilnya cepat terlihat. Tes sejenis ini juga telah banyak dilakukan. Dengan menggunakan uji ini diharapkan mampu menyelidiki toksisitas dari suatu ekstrak herbal.

METODE

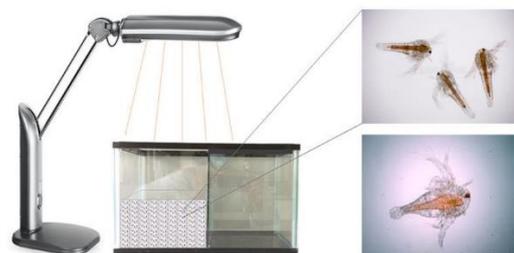
Pembuatan Ekstrak Jahe dan Kayu Secang

Rimpang jahe dan bagian batang dari kayu secang yang telah didapatkan akan dipotong ukuran kecil. Potongan tersebut kemudian dikeringkan di suhu ruang hingga berat konstan tanpa adanya kandungan air. Bagian yang telah kering akan dihaluskan. Sepuluh gram bahan halus kering tersebut dimaserasi dalam 25 mL etanol 96% masing – masing selama 48 jam. Campuran tersebut lalu disaring dengan kertas saring Whatman dan didistilasi untuk menghilangkan pelarut sehingga mendapatkan ekstrak pekat. Ekstrak pekat disimpan dalam desikator vakum untuk mendapatkan ekstrak kering. Ekstrak kering disimpan dalam lemari es pada suhu 5°C sampai digunakan lebih lanjut.

Penetasan *A. salina*

Wadah yang digunakan untuk penetasan brine shrimp terdiri dari dua bagian yang sama besar dengan sekat berlubang diantaranya. Dengan adanya lubang akan memudahkan brine shrimp yang telah menetas bermigrasi dari kompartemen penetasan (ruang gelap) menuju kompartemen yang terang. Kedua wadah tersebut berisi air laut atau air garam 3,8%.

Wadah yang digunakan tidak lupa disinari dengan bola lampu 80 watt dan dialirkan udara menggunakan pompa udara. Penerangan dan aliran udara yang teratur sangat penting untuk proses penetasan. Setelah inkubasi selama 36 jam telur akan menetas menjadi larva. Larva akan menjadi brine shrimp dewasa dalam 48 jam. Brine shrimp dewasalah yang akan digunakan untuk penelitian.



Gambar 1. Wadah yang digunakan untuk penetasan

Persiapan Larutan Ekstrak Tumbuhan

Ekstrak tumbuhan sebanyak 50mg ditimbang dengan neraca analitik. Larutan (2000 µg/mL) dibuat dengan melarutkan 50 mg ekstrak tumbuhan dalam DMO (1% v/v) dan diencerkan dengan air suling dalam labu takar

25 mL. Konsentrasi 200, 20, dan 2 µg/mL dibuat dengan pengenceran berulang dari larutan stok dalam 25 mL. Air suling juga digunakan sebagai larutan control (0 µg/mL).

Uji Letalitas Brine Shrimp

Sepuluh larva *A. salina* bersamaan dengan 2,5 mL air laut dipindahkan ke dalam lima gelas plastik menggunakan pipet pasteur. Kemudian 2,5 mL setiap larutan yang disiapkan dimasukkan ke dalam gelas plastik berisi 10 larva. Penambahan larutan mengakibatkan penambahan volume akhir menjadi 5,0 mL dan konsentrasi akhir masing – masing larutan juga berubah menjadi 1000, 100, 10, 1 dan 0 µg/mL. Jumlah larva yang mati dan persentase kematian dihitung setelah 24 jam. Pengujian dilakukan rangkap tiga.

%Mati =

$$\frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah larva mati+ larva hidup}} \times 100\%$$

Penetapan LC₅₀

Setelah 24 jam, median konsentrasi yang mematikan (LC₅₀) sampel uji diperoleh dengan memplot nilai probit persentase *A. salina* yang mati terhadap logaritma konsentrasi sampel (Tabel 1). Nilai LC₅₀ diperkirakan menggunakan analisis regresi probit. Konsentrasi ekstrak yang mematikan dan membunuh 50% populasi, LC₅₀, ditentukan berdasarkan nilai probit mortalitas 50%.

Tabel 1. Tabel Finney untuk perubahan dari persentase kematian dan nilai probit

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.25	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Kriteria Toksisitas

Toksisitas ekstrak herbal yang dinyatakan sebagai LC₅₀ biasanya didapatkan dengan membandingkan pada indeks toksisitas Meyer atau Clarkson. Menurut indeks toksisitas Meyer, ekstrak dengan LC₅₀ <1000 µg/mL dianggap beracun dan ekstrak dengan LC₅₀ >1000 µg/mL dianggap tidak beracun. Sedangkan indeks toksisitas Clarkson mengklasifikasikannya sebagai berikut: LC₅₀ >1000 µg/mL tidak beracun, LC₅₀ 500-1000 µg/mL bersifat toksik rendah, LC₅₀ 100-500 µg/mL bersifat toksik sedang, dan LC₅₀ 0-100 µg/mL sangat beracun.

HASIL

Toksisitas dari ekstrak etanol kayu secang (*Biancaea sappan*) dan ekstrak jahe (*Zingiber officinale*) masing – masing dievaluasi menggunakan Brine Shrimp Lethality Assay (BSLA) atau dengan melihat kematian udang air laut. Hasilnya disajikan pada tabel 2 dan 3. Median konsentrasi yang mematikan LC₅₀ dari tes sampel diperoleh dari plot persentase *A. salina* yang mati terhadap logaritma konsentrasi sampel. Nilai LC₅₀ diperkirakan menggunakan probit analisis regresi dan dibandingkan dengan kriteria Meyer atau Clarkson.

Tabel 2. Persentase kematian dan nilai probit dari setiap konsentrsi ekstrak kayu secang

C (ppm)	Log C	M1	M2	M3	Total M	%M	P
0	-	0	2	1	3	10%	3,72
1	0	2	1	0	3	10%	3,72
10	1	1	0	2	3	10%	3,72
100	2	2	0	4	6	20%	4,16
1000	3	10	10	10	30	100%	8,09

Tabel 3. Persentase kematian dan nilai probit dari setiap konsentrasi ekstrak jahe

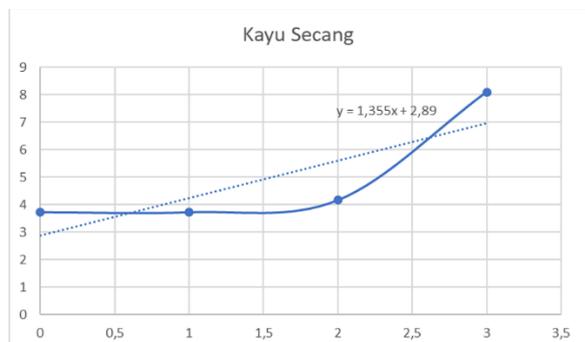
C (ppm)	Log C	M1	M2	M3	Total M	%M	P
0	-	2	2	1	5	16,7%	4,05
1	0	2	2	2	6	20%	4,16
10	1	2	2	3	7	23,3%	4,26
100	2	8	6	7	21	70%	5,52
1000	3	10	10	10	30	100%	8,09

Berdasarkan analisis regresi probit untuk ekstrak kayu secang, gambar 2, nilai probit dibandingkan dengan log konsentrasi memberikan garis lurus ($r^2 = 0,6797$). Kemudian LC_{50} dihitung dengan rumus berikut:
 $P = a \text{ Log } C + b$
 Dimana P adalah nilai probit pada mortalitas 50%, a adalah kemiringan, dan b adalah intersep

$\text{Log } C_{50} =$

$$\frac{P-b}{a} = \frac{5,00-2,890}{1,355} = 1,55$$

$$LC_{50} = \text{anti-Log } C_{50} = 35,48 \mu\text{g/mL.}$$



Gambar 2. Nilai plot probit berbanding dengan log konsentrasi

Berbeda dengan kayu secang, berdasarkan analisis regresi probit untuk ekstrak jahe, gambar 3, nilai probit dibandingkan dengan log konsentrasi memberikan garis lurus ($r^2 = 0,848$). Kemudian LC_{50} dihitung dengan rumus berikut:

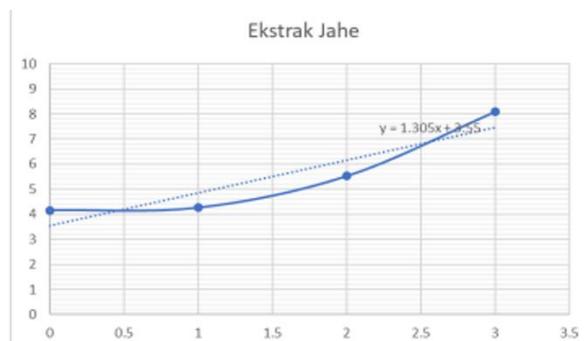
$$P = a \text{ Log } C + b$$

Dimana P adalah nilai probit pada mortalitas 50%, a adalah kemiringan, dan b adalah intersep

$\text{Log } C_{50} =$

$$\frac{P-b}{a} = \frac{5,00-3,55}{1,305} = 1,11$$

$$LC_{50} = \text{anti-Log } C_{50} = 12,9154 \mu\text{g/mL.}$$



Gambar 3. Nilai plot probit berbanding dengan log konsentrasi

Analisis bivariate menunjukkan bahwa jahe ± 3 kali lebih mudah mematikan sel dibandingkan dengan ekstrak kayu secang.

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil evaluasi toksisitas ekstrak kayu secang menggunakan Brine Shrimp Lethality Test didapatkan angka kematian sebesar 10% pada ekstrak dengan konsentrasi sebesar 1 ppm, dalam ekstrak 10 ppm sebesar 10%, dalam ekstrak 100 ppm sebesar 20%, dan dalam ekstrak 1000ppm sebesar 100%. Setelah dihitung, LC_{50} diperoleh pada uji toksisitas ini sebesar 35,48 $\mu\text{g/mL}$ yang menunjukkan ekstrak Kayu secang (*Biancaea sappan*) mempunyai toksisitas yang tinggi (highly toksik).

Hasil BSLT dapat digunakan sebagai metode skrining untuk mencari antikanker senyawa dari tumbuhan. Semakin tinggi tingkat toksisitas sekunder metabolit tanaman, semakin kecil nilai LC_{50} maka semakin besar potensi tanaman tersebut digunakan dalam pengobatan antikanker. Dengan nilai LC_{50} ekstrak uji yang sangat kecil, di bawah 100 $\mu\text{g/ml}$, aktivitas biologis ekstrak uji sebagai antikanker sangat tinggi.

Berdasarkan penelitian Seeewaboon Sireeratawong, dkk (2010) tentang Evaluasi Toksisitas Ekstrak Kayu Secang pada Tikus, menunjukkan bahwa tikus betina dan jantan diberikandengan ekstrak kayu secang dengan dosis 5.000 mg/kg tidak menunjukkan tanda-tanda toksik dan gejala selama periode percobaan. Selain itu, beberapa penelitian lain menunjukkan bahwa, Sappan, produk alami dari Indonesia, telah terbukti diketahui dapat menghambat pertumbuhan tumor di banyak sel kanker dan juga dikanker payudara.

Pada ekstrak jahe tingkat toksisitasnya berdasarkan Brine Shrimp Lethality Test sebagai berikut, pada konsentrasi 1 ppm persentase kematian sebesar 20%, konsentrasi 10 ppm sebesar 23,3%, konsentrasi 100 ppm sebesar 70%, dan konsentrasi 1000 ppm sebesar 100%. Nilai LC_{50} yang dihasilkan sebesar 12,91 menunjukkan bahwa ekstrak jahe menunjukkan tingkat toksisitas yang tinggi terhadap udang air asin, sehingga dapat menyebabkan kerusakan yang signifikan terhadap organisme hidup.

Hal ini sejalan dengan penelitian Akmalita (2021) yang menyatakan bahwa ekstrak jahe (*Zingiber officinale*) memiliki toksisitas yang

tinggi ($LC_{50} < 10 \text{ ppm}$) 3,87 ppm. Studi dari Akmalita (2021) juga menunjukkan bahwa ekstrak jahe mengandung Alkaloid, Flavonoid, Tanin dan Saponin yang memiliki sifat antioksidan, antiinflamasi, dan antikanker. Salah satu efek jahe yang paling mengesankan adalah sifat anti kankernya berkat adanya senyawa kuat yang disebut 6-gingerol.

Sebuah penelitian yang diterbitkan oleh Akimoto (2015) menemukan bahwa turunan jahe, dalam bentuk ekstrak atau senyawa terisolasi, menunjukkan efek antiproliferatif dan antitumor yang relevan. Ekstrak jahe juga menunjukkan aktivitas antikanker yang kuat terhadap sel kanker pankreas dengan menginduksi autosis yang dimediasi ROS. . Studi praklinis menunjukkan bahwa jahe memiliki efek antiemetik, antikanker, antiinflamasi, anti ketergantungan obat, dan hipoglikemik.

SIMPULAN

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa dengan pengaplikasian Brine Shrimp Lethality Test terhadap ekstrak dari kayu secang dan jahe, kedua ekstrak tersebut termasuk ke dalam kategori toksik tingkat tinggi, masing – masing memiliki nilai LC_{50} sebesar 35,48 dan 12,9154 $\mu\text{g/mL}$. Tetapi perlu dicatat bahwa metode BSLT ini umumnya digunakan sebagai metode awal untuk menilai tingkat toksik dari suatu ekstrak alami. Meskipun hasil pengujian menunjukkan indikasi toksisitas, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memastikan dampaknya terhadap organisme lain dan menentukan relevansi temuan tersebut terhadap kesehatan manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, Y., Sohrab, H., Al-Reza, S.M., Shahidulla Tareq, F., Hasan, C.M., Sattar, M.A., 2010. Antimicrobial and cytotoxic constituents from leaves of *Sapium baccatum*. *Food Chem Tox.* 48, 549-552.
- Akimoto, M., Iizuka, M., Kanematsu, R., Yoshida, M., & Takenaga, K. 2015. Anticancer Effect of Ginger Extract against Pancreatic Cancer Cells Mainly through Reactive Oxygen Species-

Mediated Autotic Cell Death. PloS one, 10(5), e0126605.

- Fina, Akmalita. 2021. Phytochemical screening and Toxicity Test of Red Ginger (*Zingiber officinale*) Rhizome Extract with the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Method. (Electronic Thesis or Dissertation). Finney, D., 1971. Probit analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Finney, D., 1971. Probit analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 45, 31-34.
- Rachmady R, Muntafiah L, Rosyadi F, Sholihah I, Handayani S, Jenie RI. 2016. Antiproliferative Effect of Secang Heartwood Ethanolic Extract (*Caesalpinia sappan* L.) on HER2 Positive Breast Cancer Cells. *Indones J Cancer Chemoprevention*. 7(1):1–5. doi:10.14499/indonesianjcanceremo rev7iss1pp1-5
- Rahayu, S., Fitri, L. and Ismail, Y.S. 2021. The Endophytic Actinobacterial Toxicity Test of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Used The BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) Method. *Elkawanie*, 7(1). doi:https://doi.org/10.22373/ekw.v7 1.8027.
- Rivanti E, Shabrina BA, Nurzijah I, Ayu C, Hermawan A. 2016. Heartwood of Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Ethanolic Extract Show Selective Cytotoxic Activities on T47D and Widr Cells But Not on Hela Cells. *Indones J Cancer Chemoprevention*.